

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

BIOTRANSFORMATION DU DEC-604 ET SON EFFET SUR LA DÉIODINASE THYROÏDIENNE DE TYPE
1 CHEZ DES GOÉLANDS FORTEMENT EXPOSÉS AUX RETARDATEURS DE FLAMME HALOGÉNÉS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ(E)
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MADELEINE LÉPINE

AVRIL 2022

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

J'aimerais commencer par remercier mon directeur de recherche Jonathan Verreault d'avoir accepté de me donner ma chance. Je me suis énormément développée en tant que chercheuse sous son aile et avec son aide j'ai pu m'impliquer auprès de réseaux de chercheurs dans mon domaine. Merci pour ton soutien et tes encouragements, ce fût un plaisir de travailler sur ce projet et de faire de nouvelles découvertes avec toi.

J'en profite pour remercier Catherine Jumarie et Monique Boily de m'avoir permis de prendre un peu d'espace dans le vôtre. Merci à Serge Paquet pour ta patience et toutes tes réponses à mes questions qui m'ont permis d'avancer. Un merci reconnaissant aussi à Jill Vandermeerche qui est arrivée au bon moment et qui m'a permis de prendre confiance côté statistiques. J'aimerais bien sûr remercier mes collègues qui ont été présentes et présents pendant mon parcours quoi que solitaire en raison de la fermeture des universités en 2020. Merci donc à Anaïs ma collègue de bureau, comaman de l'aloès, mais aussi ma mentore question terrain et débroussaillage uqamiens. Merci à Anthony qui a su avec patience répondre à mon appel lorsque j'avais des questions et qui m'a appris plusieurs techniques essentielles pour ce projet. Merci à Ling, ton courage a permis à de nombreux résultats d'aboutir dans ce projet et je t'en remercie. Enfin merci à Manon, Valérie, Fred, Alexandre et même Charbel, Maxime, Julien et Alex pour votre présence, votre sourire et votre aide dans les moments plus difficiles. Vous m'avez toutes et tous permis de persévérer jusqu'à l'aboutissement de ce projet. Je pense également à ceux et celles qui ont été à mon écoute pendant ces deux ans et demi. Merci spécialement à mes amies Joëlle, Elena, et Laurence et un énorme merci à mon amie Daphné qui cheminait avec moi à chaque semaine.

Enfin je remercie ma grand-maman Ghislaine pour ses beaux-mots d'encouragements tout au long de ma maîtrise. Mes parents, Marie-France et Sylvain, qui m'ont soutenue jour après jour et qui ont sacrifié beaucoup pour que je me rende jusqu'ici, entre autres en m'écoutant encore et encore leur présenter mon projet pour la 56^e fois. Merci à vous deux, je vous aime. Et je n'oublie pas mon confident, mon meilleur ami, mon coloc et conjoint. Merci, Pierre-Antoine, d'avoir été présent, ouvert, encourageant, consolant et aimant. Je n'aurais jamais pu réussir sans toi.

DÉDICACE

À ma grand-mère, Ghislaine,

*Je ne suis pas devenue médecin,
mais j'ai fait un bon bout de chemin.*

AVANT-PROPOS

Le présent travail de recherche expose le mémoire de maîtrise déposé en décembre 2021 au département des sciences biologiques de l'Université du Québec à Montréal comme exigence partielle de la maîtrise en biologie.

Encore peu d'études portent sur les impacts du Dec-604 sur la faune et encore moins sur sa métabolisation par l'organisme. Ainsi, le choix d'étudier ce composé a été guidé par l'intérêt scientifique accordé aux contaminants de synthèses retrouvés dans l'environnement plus spécifiquement dans les milieux urbains. Ces derniers sont depuis longtemps considérés comme des sources d'une pollution d'origine anthropique qui affecte l'environnement entourant des zones densément peuplées. Pour étudier le potentiel de biotransformation du Dec-604 *in vivo*, le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant sur l'île Deslauriers, située à proximité de la région de Montréal ayant une forte activité humaine, constitue un modèle de choix en raison de son abondance, son alimentation opportuniste ainsi que la bioaccumulation élevée observée par des recherches antérieures du Dec-604 CB, un produit de dégradation du Dec-604.

Le but du présent mémoire fut d'élucider le potentiel de biotransformation d'un retardateur de flamme organohalogéné peu étudié, soit le Dec-604 et d'identifier une possible relation entre la contamination à ce composé et l'activité des déiodinases. Ainsi les résultats permettront d'appuyer les hypothèses de débromation du Dec-604 par les déiodinases hépatiques chez une espèce aviaire fortement exposée aux retardateurs de flamme considérée comme bio-indicatrice pour son milieu.

Au cours du projet, différentes séries d'expériences ont été produites. La préparation des microsomes de foies des individus récoltés à l'été 2019 ainsi que d'oiseaux contrôles élevés dans les laboratoires de l'Université McGill s'est faite dans nos laboratoires. Ensuite deux séries d'essais enzymatiques ont permis de produire des échantillons mesurant l'activité enzymatique en présence de cinq concentrations différentes de Dec-604 et d'observer la biotransformation *in vitro* du Dec-604 par les microsomes. La crise sanitaire survenue en mars 2020 a causé quelques

complications aux expériences qui ont dû être reportées puis condensées à l'été 2020. Nous sommes toutefois satisfaits des résultats obtenus. En raison de la faible quantité d'échantillons de microsomes d'espèces aviaires disponibles sur le marché et des coûts fort élevés, les microsomes de foie d'oiseaux contrôles ont été obtenus par préparation avec des échantillons de foies de cailles japonaises (*Coturnix japonica*) gracieuseté de la Professeure Jessica Head de l'Université McGill de Montréal.

Ce mémoire se divise en quatre sections soit, une introduction générale, un premier chapitre faisant la revue des connaissances sur le sujet, un deuxième chapitre prenant la forme d'un article scientifique (incluant la méthodologie du projet, les résultats et une discussion) et finalement, une conclusion générale. Le chapitre II de ce mémoire a été rédigé en anglais avec l'assistance de mon directeur de maîtrise, Jonathan Verreault, professeur à l'Université du Québec à Montréal et sera soumis à *Environmental Toxicology and Chemistry*. Ce projet fait partie intégrante de la Chaire de recherche du Canada en toxicologie comparée des espèces aviaires dirigée également par Jonathan Verreault.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
AVANT-PROPOS.....	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	x
RÉSUMÉ.....	xi
Abstract.....	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 États des connaissances	5
1.1 Revue de littérature.....	5
1.1.1 Les retardateurs de flamme.....	5
1.1.1.1 Les PBDE et leur héritage	5
1.1.2 Le Dec-604.....	7
1.1.2.1 Métabolisme des déchloranes	8
1.1.3 Perturbateurs endocriniens	9
1.1.3.1 Le système thyroïdien	10
1.1.4 Le goéland à bec cerclé	12
1.1.4.1 Métabolisme des retardateurs de flamme chez le goéland à bec cerclé	14
1.1.4.2 Conséquences de l'exposition sur l'espèce.....	16
1.2 Objectifs et Hypothèses.....	18
1.2.1 Objectifs spécifiques	18
CHAPITRE 2 Biotransformation of Dec-604 and its Effect on Thyroid Deiodinase Activity in Highly Flame Retardant-Exposed Gulls	20
2.1 Abstract.....	20
2.2 Introduction	22
2.3 Materials and Methods	27
2.3.1 Sample collection	27
2.3.2 Liver microsome preparation.....	28
2.3.3 Deiodinase activity determination.....	29

2.3.3.1	<i>In vitro</i> D1 activity assay.....	29
2.3.3.2	Dec-604 <i>in vitro</i> exposition assay.....	31
2.3.4	<i>In vitro</i> biotransformation assay.....	32
2.3.5	Chemical analysis.....	32
2.3.6	Statistical analysis.....	34
2.4	Results.....	36
2.4.1	HFR profiles in gull liver.....	36
2.4.2	<i>In vitro</i> D1 activity in gull liver microsomes.....	36
2.4.3	<i>In vitro</i> biotransformation of Dec-604 in gull liver microsomes.....	39
2.5	Discussion.....	41
2.5.1	HFR concentrations.....	41
2.5.2	Factors influencing <i>in vitro</i> D1 activity.....	42
2.5.3	Biotransformation of Dec-604.....	45
2.6	Conclusions.....	47
2.7	Acknowledgments.....	48
2.8	Supporting information.....	49
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	53
	BIBLIOGRAPHIE.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Structure moléculaire du BDE-209, Dec-604 et Dec-604 CB.....	8
Figure 1.2. Conversion de la thyroxine (T ₄) en triiodothyronine (T ₃) par la déiodinase de type 1 (D1) dans les cellules, et similitudes avec la déshalogénéation réductrice du BDE-99 en BDE-47 observée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans le tissu hépatique de la carpe commune (Noyes, P. <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figure 1.3. L'île Deslauriers située dans le fleuve Saint-Laurent dans la région densément peuplée de Montréal (Qc, Canada) abrite une des plus grandes colonies de goélands à bec cerclé d'Amérique du Nord (Figure produite à partir de Google maps).	13
Figure 2.1. Mean (\pm SEM) total D1 activity (pmol.min ⁻¹ .g ⁻¹) determined in liver microsomes of combined ring-billed gull males and females ($n = 18$) from the Montreal area (QC, Canada) incubated with ¹²⁵ I-T ₄ for the vehicle control (0.5% acetone) of five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone). The asterisks represent a significant difference from the vehicle control (**) or a tendency to be significant (*).	38
Figure 2.2 Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios in the <i>in vitro</i> biotransformation assay with male ring-billed gull liver microsomes ($n = 5$) incubated with the cofactor DTT (activated) or not (vehicle control).....	40
Figure 2.3. Total D1 activity (mean \pm SEM; pmol.min ⁻¹ .g ⁻¹) determined in liver microsomes of female (F) ($n = 9$) and male (M) ($n = 9$) ring-billed gulls from Montreal area (QC, Canada) incubated with ¹²⁵ I-T ₄ for controls (0 nM of Dec-604), vehicle control (0 nM of Dec-604, 0.5% acetone) and five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone).	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
<p>Table 2.1. Results of model selection ($\Delta\text{BIC} < 2$) among linear mixed effect models explaining total D1 activity and T_3 and T_2 formation rates determined in liver microsomes of male and female ring-billed gulls ($n = 18$) from the Montreal area (QC, Canada). All models included bird ID as a random effect. Explanatory variables included assay concentrations of Dec-604, liver concentrations of $\Sigma_{40}\text{HFRs}$, Dec-604 CB and Dec-604, body condition, total D1 activity in vehicle control samples, and sex.</p>	37
<p>Table 2.2. Mean (\pm standard error of the mean (SEM)) concentrations (ng.g^{-1} ww) of HFRs in liver of ring-billed gull female ($n = 9$) and males ($n = 9$) breeding in the Montreal area (QC, Canada) and their liver microsome D1 activity (T_3 and T_2 formation rate and total D1 activity) ($\text{pmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) in control samples (no Dec-604 or vehicle added).</p>	49
<p>Table 2.3. Estimated Marginal Means (EMMs) (standard error (SE), degree of freedom (df), t statistic (t), p-value (p)) assessing differences between total D1 activity in liver microsomes of combined ring-billed gull males and females ($n = 18$) from the Montreal area (QC, Canada) incubated with $^{125}\text{I-T}_4$ to five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone) with the vehicle control (0 nM Dec-604; 0.5% acetone). EMMs were obtained from linear mixed models including bird ID as a random effect and assay concentrations of Dec-604 as explanatory variables (Model effect).</p>	51
<p>Table 2.4. Mean (\pm standard error of the means (SEM)) concentrations (ng.g^{-1} ww) of Dec-604 and Dec-604 CB in the <i>in vitro</i> biotransformation assay with male ring-billed gull liver microsomes ($n = 5$) incubated with cofactor DTT (activated) or not (vehicle control).</p>	52

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

PBDE	Polybromodiphényléther
BDE-99	2,2', 4,4', 5-Pentabromodiphenyl ether
RFB	Retardateur de flamme bromé
RFH/HFR	Retardateur de flamme halogéné/Halogenated flame retardant
D1, D2, D3	Déiodinase type 1, type 2, type 3
DTT	Dithiothreitol
Dec-604	Déchlorane 604
Dec-604 CB	Déchlorane 604 Composé B
PTU	6-n-propyl-2-thiouracil
T ₃	Triiodothyronine
T ₂	Diiodothyronine
T ₄	Thyroxine
DP	Déchlorane Plus
CYP	Cytochrome P450
ARNm	Acide ribonucléique messenger
TR β	Récepteur d'hormone thyroïdienne β
TR α	Récepteur d'hormone thyroïdienne α
GC/MS-ECNI	Gas Chromatography/Mass Spectroscopy- Electron-Capture Negative-Ion (Chromatographie gazeuse/ Spectroscopie de masse- Ionisation négative par capture d'électrons)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
MLOD	Method limit of detection (Limite de detection de la méthode)
MLOQ	Method limit of quantification (Limite de quantification de la méthode)
UNEP	United Nations Environment Programme (Programme des Nations unies pour l'environnement)
US EPA	US Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement des États-Unis)

RÉSUMÉ

Il a été démontré que les retardateurs de flamme halogénés (RFH) s'accumulent à des concentrations élevées chez les oiseaux sauvages, y compris les goélands adaptés aux zones urbaines. Un certain nombre de RFH a été reconnu comme des perturbateurs de l'axe thyroïdien, notamment les mélanges omniprésents de polybromodiphényléther (PBDE) qui ont été, en partie, interdits d'utilisation et de production et donc remplacés par de nouveaux composants tels que le Dechlorane 604 (Dec-604).

Le Dechlorane 604 Composant B (Dec-604 CB), un produit de déshalogénéation putatif du Dec-604, a été fréquemment détecté dans les tissus de goélands à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant dans la région de Montréal (QC, Canada). Les voies métaboliques du Dec-604 n'ont pas encore été caractérisées, bien que la présence fréquente du Dec-604 CB dans les tissus des goélands suggère une déshalogénéation enzymatique (élimination du brome). La débromation du Dec-604 pourrait impliquer les déiodinases thyroïdiennes responsables de l'élimination de l'iode des hormones thyroïdiennes dans les tissus périphériques.

L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet du Dec-604 sur la déiodinase de type 1 (D1), qui catalyse la formation de triiodothyronine (T_3) et de diiodothyronine (T_2) à partir de la thyroxine (T_4) et la biotransformation *in vitro* du Dec-604 chez les goélands à bec cerclé. Nous avons testé l'activité *in vitro* de D1 dans des microsomes de foie de goéland en présence de cinq concentrations du Dec-604 allant de 0,86 à 86,21 nM. Les concentrations de RFH (Σ_{40} HFR) ont été mesurées dans des échantillons de foie des mêmes individus. Les résultats ont montré que l'activité D1 totale dans les microsomes du foie de goéland était stimulée par plusieurs des concentrations du Dec-604. Aucun effet des concentrations hépatiques de Σ_{40} HFR sur l'activité D1 n'a été observé, à l'exception des taux de formation de T_2 qui diminuaient avec des concentrations plus élevées de RFH dans le foie. De plus, les taux de formation du Dec-604 CB plus élevés en présence du cofacteur de D1 suggèrent une débromation enzymatique. Ces résultats suggèrent que l'exposition au Dec-604 peut perturber l'activité normale de D1 chez les goélands à bec cerclé et que D1 pourrait être impliquée dans sa débromation expliquant ainsi, en partie, la détection du Dec-604 CB chez ces oiseaux. Par conséquent, l'exposition au Dec-604 pourrait entraîner une perturbation de la régulation de l'axe thyroïdien et, à son tour, des niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes chez cette espèce de goéland pour laquelle de nombreux effets liés à la thyroïde ont été documentés.

Mots-clés : Déchloranes ; retardateur de flamme émergent; biotransformation; essai *in vitro*; oiseau

Abstract

Halogenated flame retardants (HFRs) have been shown to accumulate at elevated concentrations in wild birds, especially in urban-adapted gulls. A number of HFRs have been recognized as thyroid axis disruptors including the now-banned polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixtures, which have been replaced with other HFRs such as Dechlorane 604 (Dec-604).

Dechlorane 604 Component B (Dec-604 CB), a putative dehalogenation product of Dec-604, has been frequently reported in tissues of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) breeding in the Montreal area (QC, Canada). The metabolic pathways of Dec-604 are yet to be characterized, although the frequent occurrence of Dec-604 CB in gull tissues may suggest enzyme-mediated dehalogenation (bromine removal). Debromination of Dec-604 may involve the thyroid deiodinases that remove iodine from thyroid hormones in peripheral tissues.

The objective of this study was to investigate the effect of Dec-604 on type 1 deiodinase (D1), which catalyzes the formation of triiodothyronine (T_3) and diiodothyronine (T_2) from thyroxine (T_4) and Dec-604 *in vitro* biotransformation in ring-billed gulls. We tested the *in vitro* activity of D1 in gull liver microsomes in the presence of five concentrations of Dec-604 ranging from 0.86 to 86.21 nM. HFR concentrations (Σ_{40} HFRs) were also determined in liver samples of the same individuals. Results showed that total D1 activity in gull liver microsomes was increased by several concentrations of Dec-604. No effect of liver Σ_{40} HFRs concentrations on D1 activity was observed, with the exception of T_2 formation rates that decreased with higher liver HFRs concentrations. Moreover, higher Dec-604 CB to Dec-604 concentration ratios in activated gull microsomes (with the D1 cofactor dithiothreitol) were found at the intermediate Dec-604 concentration compared to controls. These results suggest that D1 activity may be perturbed by exposure to Dec-604 in ring-billed gulls, and be involved at least in part, in the biotransformation (debromination) of Dec-604 leading to the formation of Dec-604 CB in these birds.

Keywords: Halogenated flame retardant; Dechlorane; biotransformation; *in vitro* assay; bird.

INTRODUCTION

Afin de respecter les réglementations en matière de sécurité incendie, des composés synthétiques appelés retardateurs de flamme bromés (RFB) sont ajoutés à divers matériaux dans le but de limiter la propagation des flammes lors d'incendie. Aujourd'hui, les RFB sont utilisés notamment pour les meubles rembourrés, mais aussi pour les appareils électroniques, les textiles, les plastiques et les matériaux de construction (Akortia *et al.*, 2016). La plupart sont des additifs, c'est-à-dire qu'ils sont mélangés aux polymères sans être liés de manière covalente aux matrices. Ainsi, ils sont susceptibles d'être rejetés dans l'environnement, contaminant ainsi le biote, l'eau, le sol, les sédiments et la poussière (de Wit, Herzke, *et al.*, 2010). En raison de leur utilisation abondante, les polybromodiphényléthers (PBDE) sont parmi les RFB les plus répandus dans l'environnement. En raison de leur bioaccumulation, leur persistance, leur toxicité et leur capacité à être transportés sur de longues distances, ils sont aujourd'hui confirmés comme à risque pour la santé humaine et la santé de la faune (Shunthirasingham *et al.*, 2018). En effet, selon plusieurs études, ils seraient responsables d'effets toxiques (Akortia *et al.*, 2016), notamment des effets de perturbation du système thyroïdien et au niveau du développement (Costa et Giordano, 2011).

Leurs effets délétères sur les organismes vivants et l'environnement en général ont conduit à la restriction de leur utilisation et de leur production dans de nombreux pays. Cependant, cela a conduit à la production et à l'utilisation de composés de remplacement. Parmi ceux-ci, une série de produits halogénés ayant des propriétés ignifuges similaires aux PBDE tels que les déchloranes (Dechlorane Plus (DP), Dechlorane (Dec)-601, -602 et -603 ainsi que le Dec-604 (C₁₃H₄Cl₆Br₄) qui comprend à la fois du chlore et du brome (Shen *et al.*, 2011)). Encore très peu d'études ont été faites sur la toxicité de ces nouveaux composés et elles sont majoritairement axées sur le DP qui a été identifié comme un perturbateur des hormones thyroïdiennes chez le poisson-zèbre (Kang *et al.*, 2016). Toutefois, une étude récente basée sur des cellules hypophysaires tumorales de rat GH3 a montré que certains déchloranes, dont le Dec-604, pouvaient se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (α et β) (Zhu *et al.*, 2022). Les résultats ont montré que le Dec-604 pouvait inhiber l'activité transcriptionnelle et la prolifération des cellules GH3, toutes deux induites par l'hormone thyroïdienne active, la triiodothyronine (T₃) (Zhu *et al.*, 2022).

Comme plusieurs RFB, le métabolisme du Dec-604 est encore inconnu. Il n'est donc pas impossible que les interactions entre celui-ci et des enzymes clés de la fonction thyroïdienne puissent conduire à sa biotransformation. Dans le cas du 2,2', 4,4', 5-Pentabromodiphenyl ether (BDE-99), Noyes et al. (2010) ont observé sa biotransformation *in vitro* via des microsomes hépatiques de carpe commune (*Cyprinus carpio*). Les résultats de cette même étude ont montré une inhibition du taux de biotransformation du BDE-99 suite à l'ajout de 3,3',5'-triiodothyronine inverse (rT_3) et de T_4 , qui sont toutes deux des substrats des déiodinases, comme la iodothyrosine déiodinase de type 1 (D1) (Noyes, P. *et al.*, 2010). D'autres études se sont intéressées à des espèces aviaires pour étudier la biotransformation de RFB, comme le PBDE complètement bromé, le BDE-209 (Chabot-Giguère *et al.*, 2013; François *et al.*, 2016).

Des études suggèrent que les congénères provenant de la débromation du BDE-209 pourraient avoir des effets perturbateurs du système thyroïdien tels qu'observés chez des oiseaux exposés aux BDE-47 et -99 (Guigueno et Fernie, 2017). Aucune information n'a pu être trouvée sur la production et l'utilisation du produit de débromation du Dec-604, le Dec-604 Composé B (Dec-604 CB), mais il a été reconnu comme produit de photo-débromation du Dec-604 (Shen *et al.*, 2014), ce qui pourrait potentiellement expliquer sa présence dans les sédiments et les poissons (Shen *et al.*, 2014) ainsi que chez des oiseaux fortement exposés aux RFB tels que le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant dans la région de Montréal (QC, Canada).

Les goélands à bec cerclé se nourrissent de manière opportuniste et se reproduisent généralement dans les régions urbanisées d'Amérique du Nord. Le Dec-604 CB a été fréquemment détecté dans le foie (Sorais *et al.*, 2021; Técher *et al.*, 2018), ainsi que dans le plasma et le guano (Desjardins *et al.*, 2019) prélevés sur des goélands à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant près de Montréal. Chez cette colonie, Sorais et al. (2021) ont constaté que la présence de goélands à bec cerclé dans les dépotoirs de la région de Montréal lors de leur recherche de nourriture avait un effet sur les concentrations dans le foie de retardateurs de flamme halogénés. Dans le cas des composés n'appartenant pas à la famille des PBDE, cet effet était hautement spécifique d'un composé à l'autre, c'est-à-dire que les concentrations variaient différemment d'une molécule à l'autre, et différait de l'effet observé pour les concentrations des

PBDE. De plus, la présence de goélands dans les dépotoirs n'a pas été associée à l'exposition atmosphérique ou à la bioaccumulation du Dec-604 CB (Sorais *et al.*, 2021). Par conséquent, sa présence dans des échantillons d'animaux tels que les poissons et les oiseaux pourrait suggérer que la dégradation du Dec-604 par débromation se produit dans l'organisme lui-même, du moins en partie.

La biotransformation *in vitro* du DP et du BDE-209 a déjà été vérifiée chez les goélands de cette colonie, mais aucune débromation n'a été observée par l'action des CYP (Chabot-Giguère *et al.*, 2013) ni par D1 (François et Verreault, 2018). Toutefois, les taux d'acide ribonucléique messager (ARNm) de D1 ont été associés aux concentrations hépatiques d'octa-BDE suggérant une relation entre l'exposition aux PBDE et la fonction normale de la D1 (François *et al.*, 2016). D'ailleurs, selon une étude sur les poussins de cette même colonie, les niveaux d'ARNm du foie de certains gènes lié au système thyroïdien pourraient être affectés par les concentrations de six composés appartenant à la famille des déchloranes (Técher *et al.*, 2018). Les auteurs ont conclu qu'une altération de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes chez les goélands à bec cerclé en développement se produisait et que des voies de compensation pourraient être déclenchées au stade de développement des goélands fortement exposés environnementalement aux retardateurs de flamme halogénés (Técher *et al.*, 2018). Ces résultats font de cette espèce un modèle de prédilection pour l'étude des mécanismes de biotransformation *in vitro* du Dec-604. Le lien entre l'exposition aux retardateurs de flamme halogénés et le système thyroïdien pourrait mener à une meilleure compréhension de leur neurotoxicité chez le goéland à bec cerclé et mener à des pistes pour expliquer certains phénomènes comportementaux.

L'objectif de ce projet était de développer et valider un essai de biotransformation *in vitro* du Dec-604 avec des microsomes de foie de goéland à bec cerclé nichant dans une zone fortement contaminée. Ce projet devait également nous permettre d'étudier l'effet d'une exposition au Dec-604 sur l'activité de la D1 avec ces mêmes microsomes. Enfin, les données recueillies devaient permettre d'établir un lien entre la biotransformation *in vitro* du Dec-604 et les concentrations *in vivo* du Dec-604 et du Dec-604 CB dans le foie des goélands à bec cerclé. Pour ce faire, des essais enzymatiques ont été produits à l'aide de microsomes hépatiques préparés en laboratoire à partir

d'échantillons de foie récupérés sur l'île Deslauriers (QC, Montréal) à l'été 2019. Ce projet est ici présenté sous forme de mémoire par article se divisant en deux chapitres. Le premier chapitre comprend un état des connaissances actuelles sur les éléments importants en lien avec le projet soit les déchloranes et leurs métabolismes, les effets toxiques des retardateurs de flammes ainsi que les données actuelles sur l'effet de ces polluants sur les oiseaux en particulier le goéland à bec cerclé de la région de Montréal. Le deuxième chapitre, rédigé en anglais sous forme d'article scientifique, porte sur la débromation du Dec-604 et son effet sur la D1 observés *in vitro* via des microsomes hépatiques de goéland à bec cerclé.

CHAPITRE 1

États des connaissances

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Les retardateurs de flamme

Les retardateurs de flamme sont ajoutés à divers produits de consommation pour prévenir la propagation du feu lors d'incendie. En raison des législations visant à protéger les victimes et les pompiers dans l'exercice de leur fonction, ces agents chimiques sont ajoutés aux mousses de polyuréthane, aux mousses isolantes, aux textiles ou encore aux appareils électroniques (Covaci *et al.*, 2011; Shunthirasingham *et al.*, 2018). Les retardateurs de flamme se distinguent par leur liaison covalente ou non à la matrice à laquelle ils sont ajoutés (de Wit, Herzke, *et al.*, 2010). Les retardateurs de flamme dits additifs ne forment pas de lien covalent et sont ainsi plus à risque de s'échapper de la matrice et d'être relâchés dans l'environnement (Akortia *et al.*, 2016). Dans le cas des retardateurs de flamme bromés (RFB), leur capacité ignifuge est considérable puisque les bromes présents dans la molécule permettent lorsqu'il y a dégagement de chaleur une décomposition rapide qui libère des radicaux halogénés. Ceux-ci vont étouffer les flammes et empêcher la propagation du feu. De plus, ils sont peu coûteux ce qui en fait des composés de choix pour les fabricants (Bientinesi et Petarca, 2009). Ils sont donc utilisés en grande quantité ce qui a pour conséquence d'accroître leurs émissions globales dans l'environnement. Au courant des deux dernières décennies, un groupe de retardateurs de flamme halogénés a particulièrement attiré l'attention des chercheurs en raison de l'omniprésence de ses congénères dans l'environnement, les polybromodiphényléthers (PBDE).

1.1.1.1 Les PBDE et leur héritage

Les PBDE sont, depuis quelques années, considérés comme un risque pour la santé humaine et de la faune en raison de leur persistance, leur capacité à être transportés sur de longues distances, leur bioaccumulation dans l'environnement et leurs propriétés toxiques (Akortia *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2008; Law *et al.*, 2014; Shunthirasingham *et al.*, 2018). En effet, l'exposition aux PBDE peut provoquer une perturbation des hormones thyroïdiennes, un déficit neurodéveloppemental et le

cancer selon des études *in vivo* et *in vitro* (McDonald, 2002). Cette classe de contaminants compte 209 congénères qui se divisent principalement en 3 mélanges commerciaux différenciés par le nombre de bromes liés et leur position sur les cycles aromatiques des congénères. Les mélanges sont : le pentabromodiphényléther (penta-BDE), l'octabromodiphényléther (octa-BDE) et le décabromodiphényléther (déca-BDE) (Darnerud *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2016; Lorber, 2008). Principalement en raison des inquiétudes de plus en plus nombreuses concernant leur persistance, leur bioaccumulation et leur toxicité, les mélanges commerciaux de PBDE utilisés comme retardateurs de flamme ont été inclus dans l'annexe A de la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants depuis 2009 pour le penta-BDE, le octa-PDE et en 2017 pour le déca-BDE (UNEP, 2017).

Par conséquent, on observe le remplacement des mélanges des PBDE par d'autres retardateurs de flamme halogénés alternatifs, incluant plusieurs composés émergents (Hou *et al.*, 2021; Zuiderveen *et al.*, 2020). Comme les retardateurs de flamme halogénés traditionnels, ceux-ci peuvent être classés en deux classes principales, à savoir des retardateurs de flamme bromés (Bergman *et al.*, 2012; Covaci *et al.*, 2011; de WitKierkegaard, *et al.*, 2010) et des retardateurs de flamme chlorés qui sont principalement composés des dechloranes (Bergman *et al.*, 2012; Sverko *et al.*, 2011). De nos jours, ces retardateurs de flamme halogénés sont largement utilisés dans les produits de consommation du quotidien pour répondre aux normes d'inflammabilité prescrites (Klosterhaus *et al.*, 2012), et à mesure que leur production et leur utilisation augmentent, leur détection dans l'environnement augmente également. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont rapporté leur distribution dans les matrices environnementales biotiques (Houde *et al.*, 2014; Verreault *et al.*, 2018; Zacs *et al.*, 2018) et abiotiques (Brown, F. R. *et al.*, 2014; Stapleton *et al.*, 2008). Cependant, puisque ces substances ont des propriétés physicochimiques fort semblables à celles des mélanges des PBDE, il y a également des risques qu'elles se dispersent et se bioaccumulent dans l'environnement de façon semblable (Wu *et al.*, 2012). En effet, il a également été rapporté que ces retardateurs de flamme halogénés possèdent un certain potentiel de toxicité (Jing *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2019). Parmi ceux-ci, une série de produits chlorés ayant des propriétés ignifuges similaires aux PBDE; les

déchloranes (Dechlorane Plus (DP), Dechlorane (Dec)-601, -602 et -603 ainsi que le Dec-604 ($C_{13}H_4Cl_6Br_4$) (qui comprend à la fois du chlore et du brome) (Shen et al., 2011).

1.1.2 Le Dec-604

Les déchloranes sont principalement utilisés dans les polymères des câbles électriques, des écrans d'ordinateurs et de téléviseurs ou encore de matériaux de toiture (Feo *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2008; Sverko *et al.*, 2011; Wang, P. *et al.*, 2016). Tout comme les PBDE, ils ont, grâce à leurs caractéristiques physicochimiques, une bonne stabilité chimique et thermique, une grande liposolubilité et une faible pression de vapeur (OxyChem, 2007). Après le Mirex, les Dec-602 et -604 étaient les déchloranes les plus abondants trouvés dans les échantillons de sédiments en suspension de la rivière Niagara (prélevés de 1980 à 2002) et les carottes de sédiments du lac Ontario (prélevées de 1923 à 2004)(Shen *et al.*, 2011). Les informations sur la production et l'utilisation de Dec-602 et -604 sont limitées, mais le Dec-604 se trouve parmi les ingrédients de la graisse de silicone Molykote AS-810 produit par Dow Corning Corp USA (MatWeb, 2009).

Quoique l'utilisation commerciale du Dec-604 (#CAS : 34571-16-9) n'a pas encore été rapportée au Canada, sa présence sur la liste extérieure des substances publiée par Environnement et Changement climatique Canada signifie que ce composé est commercialisé au niveau international (Environnement et Changement climatique Canada, 2021). La présence de ce composé dans l'environnement a été démontrée dans les sédiments et la biote aquatique des Grands Lacs (Shen *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011) ainsi que dans les régions côtières du Nord de la Chine (Jia *et al.*, 2011). De plus, ce composé a été détecté dans le foie du maskinongé (*Esox masquinongy*) et du grand brochet (*Esox lucius*) dans la région urbaine du fleuve Saint-Laurent proche de Montréal (Québec, Canada) (Houde *et al.*, 2014). Chez les mammifères marins, le Dec-604 a été détecté dans le foie du dauphin de la Plata (*Pontoporia blainvillei*) (De La Torre *et al.*, 2012). Chez les espèces aviaires, le Dec-604 a été détecté dans les œufs du faucon pèlerin du Canada et de l'Espagne (Guerra *et al.*, 2011) ainsi que dans le foie du goéland à bec cerclé dans la région de Montréal (Sorais *et al.*, 2021).

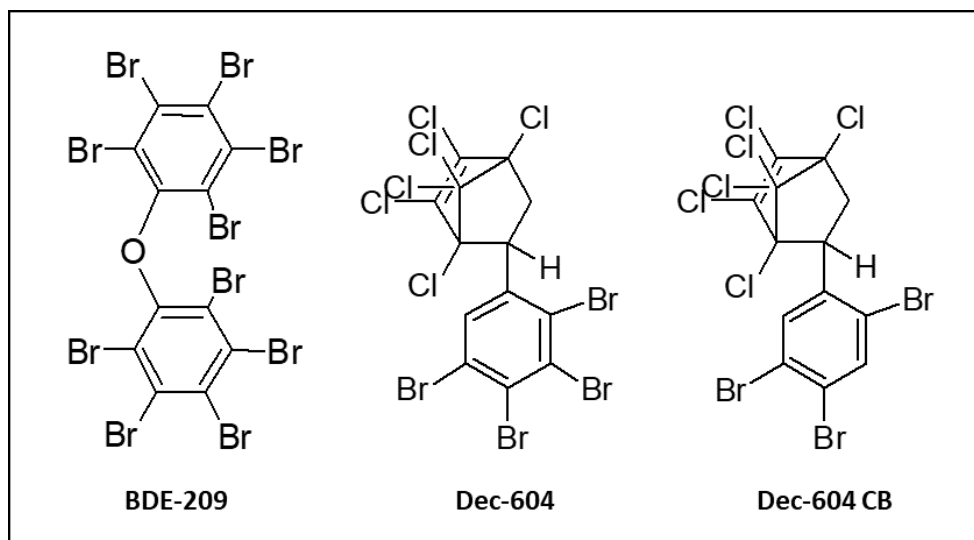


Figure 1.1 Structure moléculaire du BDE-209, Dec-604 et Dec-604 CB.

1.1.2.1 Métabolisme des déchloranes

En raison de la ressemblance structurelle entre les hormones thyroïdiennes et certains RFB comme les congénères de PBDE (Figure 1.1), plusieurs chercheurs ont proposé des interactions au niveau du système thyroïdien (Boas *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2015). Cela a mené à l'étude de leur métabolisme par l'organisme qui, encore aujourd'hui, est très peu compris. Dans le cas du BDE-209, il a été montré que ses produits de débromation connus ou présumés sont plus persistants, bioaccumulables et toxiques pour l'environnement (Ross *et al.*, 2009; Söderström *et al.*, 2004). Ainsi, il devient capital d'étudier le métabolisme des RFB et d'en comprendre les répercussions sur l'organisme (toxicité).

Le produit de dégradation du Dec-604 le plus souvent retrouvé dans l'environnement, le Dec-604 Composé B (CB), a été détecté pour la première fois chez les poissons appartenant à deux espèces prédatrices (grand brochet et maskinongé) du fleuve Saint-Laurent (Montréal, Québec, Canada) (Houde *et al.*, 2014). Puis, il a été détecté chez la truite grise (*Salvelinus namaycush*) et le grand corégone (*Coregonus clupeaformis*) et ce à des concentrations jusqu'à 200 fois plus grandes que les concentrations en Dec-604 (Shen *et al.*, 2014). Ce produit a également été retrouvé chez le béluga (*Delphinapterus leucas*) de l'Arctique canadien ainsi que de l'Estuaire du fleuve Saint-Laurent, et du petit rorqual (*Balaenoptera acutorostrata*) de l'Estuaire du fleuve Saint-Laurent

également (Simond *et al.*, 2017). Non seulement ce produit de dégradation (perte d'un brome en position *méta*) est plus présent, mais il aurait un meilleur potentiel de bioaccumulation que ses analogues (Shen *et al.*, 2014). Chez les espèces aviaires, ce congénère a été détecté chez le fulmar boréal (*Fulmarus glacialis*) des îles Féroé (Atlantique Nord) (Mortensen *et al.*, 2021) et le goéland à bec cerclé de la région de Montréal (Desjardins *et al.*, 2019; Sorais *et al.*, 2021).

Desjardins *et al.* (2019) ont comparé les concentrations de différents retardateurs de flamme dans le plasma et le guano des goélands à bec cerclé de la région de Montréal et ont trouvé des ratios plasma/guano plus élevés de Dec-604 CB que de Dec-604 (coélution avec le BDE-183), suggérant une excrétion relative plus faible, et donc une accumulation relative plus importante. La présence de ce produit de dégradation chez des espèces exposées au Dec-604 permet de supposer qu'il y a dégradation du Dec-604 au sein de l'organisme lui-même. Une forte exposition combinée à une forte biotransformation du Dec-604 pourrait être la cause de ces concentrations élevées du Dec-604 CB. Aucune information sur le métabolisme du Dec-604 n'a pu être trouvée au moment de l'écriture de ce mémoire.

1.1.3 Perturbateurs endocriniens

Certains RFB ont été reconnus comme des composés chimiques pouvant perturber l'équilibre hormonal altérant ainsi des fonctions vitales telles que la croissance et le développement.

Les PBDE et certains de leurs produits de dégradation (ex. produits débromés et hydroxylés) ont été identifiés comme des perturbateurs endocriniens (Ferne *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2010). Des perturbations du système endocrinien peuvent affecter le comportement reproducteur qui est essentiel à la reproduction aviaire (Martinson *et al.*, 2010). Chez les oiseaux, des changements du comportement liés à ces perturbations ont notamment été observés lors des comportements de séduction chez les crécerelles d'Amérique (*Falco sparverius*) (Ferne *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2010). Selon plusieurs chercheurs, les PBDE perturbant le système endocrinien affectent particulièrement le système thyroïdien (Sheikh et Beg, 2020).

1.1.3.1 Le système thyroïdien

En raison des similitudes entre la structure de certains RFB et des hormones thyroïdiennes, certains chercheurs ont proposé une analogie entre leur métabolisme respectif (Figure 1.2) (Boas *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2015). L'étude des perturbations de système thyroïdien est d'autant plus importante puisque celui-ci est bien conservé à travers les vertébrés (Noyes, P. D. *et al.*, 2013).

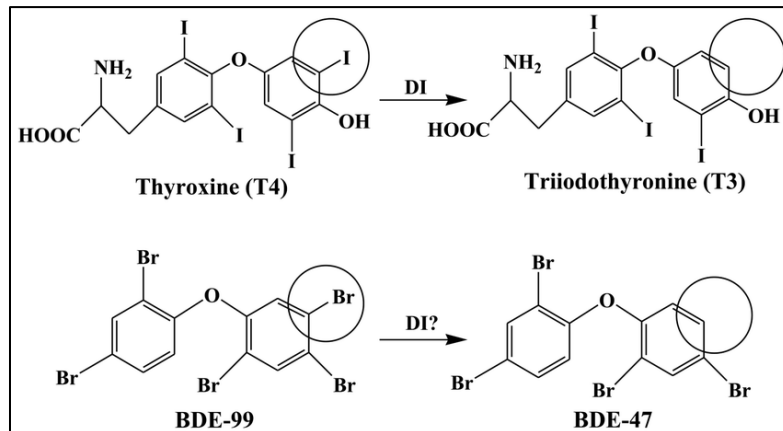


Figure 1.2. Conversion de la thyroxine (T₄) en triiodothyronine (T₃) par la déiodinase de type 1 (D1) dans les cellules, et similitudes avec la déshalogénéation réductrice du BDE-99 en BDE-47 observée *in vitro* et *in vivo* dans le tissu hépatique de la carpe commune (Noyes, P. *et al.*, 2010)

La biodisponibilité de l'hormone active dans les tissus, la T₃, dépend de sa bioactivation obtenue par la déiodination de la prohormone T₄ dans les tissus périphériques. Cette activation est rendue possible grâce à une iodothyronine déiodinase (Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 2002). Cette enzyme possède trois isoformes, soit les iodothyronines déiodinases de type 1, 2 et 3, respectivement D1, D2 et D3. La D2 va convertir la T₄ en T₃ par une déiodination de l'anneau externe de la molécule alors que la D3 va convertir la T₄ en rT₃ par la déiodination de l'anneau interne de la molécule, la rendant inactive (Bianco *et al.*, 2002; Friesema *et al.*, 2004; Gereben *et al.*, 2008). La D1 est quant à elle en mesure d'éliminer l'iode sur l'un ou l'autre des anneaux (Moreno *et al.*, 1994).

Très peu d'études de toxicité ont été rapportées sur les déchloranes, à l'exception du DP (Feo *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2016). Toutefois, il a été suggéré que les déchloranes pourraient interagir avec des acteurs clés du système thyroïdien puisque ceux-ci affectaient les niveaux d'hormones et de transcription des gènes des deiodinases et des récepteurs des hormones thyroïdiennes (Kang *et al.*, 2016; Técher *et al.*, 2018; Wang, S. *et al.*, 2020). D'ailleurs, une étude récente a montré que certains déchloranes, dont le Dec-604, pouvaient se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (α et β) dans un essai de liaison compétitif avec des cellules cancéreuses hypophysaires de rat GH3 (Zhu *et al.*, 2022). Les auteurs ont observé que bien que l'affinité de liaison du Dec-604 à TR α et TR β soit significativement plus faible par rapport aux autres déchloranes (DP, Dec-602 et Dec-603), sa capacité à inhiber l'expression médiée par les récepteurs du gène rapporteur de la luciférase et la prolifération cellulaire de la GH3 était similaire à DP, soit supérieure à Dec-602 et Dec-603 (Zhu *et al.*, 2022).

De même, une étude a examiné les liens entre les concentrations adipeuses des autres retardateurs de flamme halogénés tels que le Dec-604 et la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la thyroïde chez le béluga et le petit rorqual de l'estuaire du Saint-Laurent (Simond *et al.*, 2019). Les concentrations de Dec-604 CB ont été corrélées négativement à la transcription de gènes de la thyroïde, notamment pour le TR β (Simond *et al.*, 2019). Chez les espèces aviaires, encore très peu d'études ont investigué l'interaction des dechloranes avec la fonction thyroïdienne. Toutefois, dans une étude précédente de notre laboratoire, l'effet des concentrations hépatiques de Σ_6 Decs (somme des Dec-602, chlordane plus, Dec-604 CB, Dec-603, and *syn*- and *anti*-DP) sur l'expression de la D1 a été vérifié. Les résultats montrent que les niveaux d'ARNm du foie de la D1 corrôlaient positivement avec les concentrations chez des poussins en période de *brêchage* externe (pré-éclosion, percée de la coquille) de la colonie de goélands à bec cerclé nichant dans la région de Montréal (Técher *et al.*, 2018). Les auteurs de cette étude suggèrent que des voies de compensation régulant l'homéostasie des hormones thyroïdiennes pourraient être déclenchées au stade de développement (avant l'éclosion) de ces oiseaux fortement exposés dans l'environnement aux retardateurs de flamme halogénés incluant les déchloranes (Técher *et al.*, 2018).

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour suggèrent qu'il pourrait y avoir une interaction du Dec-604 avec les joueurs clés du système thyroïdien comme la D1 conduisant à la dégradation de ce retardateur de flamme par déshalogénéation. Un tel mécanisme pourrait mener à une perturbation de la fonction thyroïdienne.

1.1.4 Le goéland à bec cerclé

Parmi les espèces migratrices de l'Amérique du Nord, le goéland à bec cerclé se distingue par sa présence importante au Québec. La démographie de cette espèce a vécu une croissance exponentielle (Gauthier et Aubry, 1995) et le nombre actuel de couples établis dans la région de la métropole est d'un peu plus de 60 000 dont 44 000 à 51 000 nicheraient sur l'île Deslauriers à proximité de Varennes près de Montréal (Giroux *et al.*, 2016). Il s'agit d'une espèce opportuniste qui se nourrit de ce qu'elle trouve que ce soit du poisson, des insectes, des vers de terre, des petits mammifères ou des déchets (Brousseau *et al.*, 1996; Gentes *et al.*, 2012). Dans la région de Montréal, les goélands à bec cerclé vont parfois choisir comme aire d'alimentation des sites d'enfouissement (Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). Une étude a révélé grâce à un suivi GPS sur des goélands à bec cerclé de la colonie de l'île Deslauriers (Figure 1.3) que l'exposition au déca-BDE la plus importante se faisait dans les sites de gestion des déchets tels que les dépotoirs et les bassins des usines de traitement des eaux usées (Gentes *et al.*, 2012). Des études subséquentes sur la même population ont rapporté des résultats qui confirment cette tendance tout en identifiant la présence d'autres produits de débromation tels que les hexa-, penta-, tetra-BDEs (Chabot-Giguère *et al.*, 2013; François *et al.*, 2016; François et Verreault, 2018).

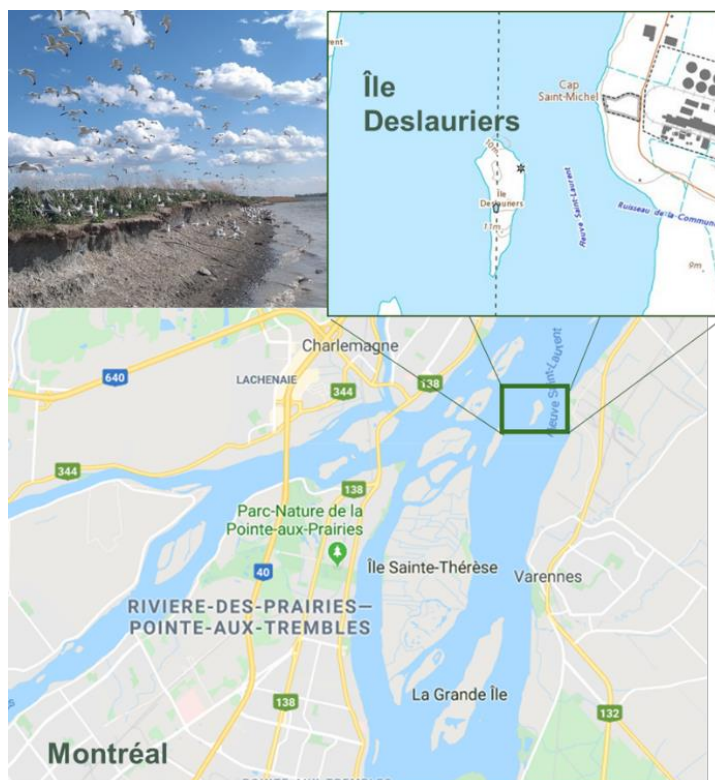


Figure 1.3. L'île Deslauriers située dans le fleuve Saint-Laurent dans la région densément peuplée de Montréal (Qc, Canada) abrite une des plus grandes colonies de goélands à bec cerclé d'Amérique du Nord (Figure produite à partir de Google maps).

Ainsi le goéland à bec cerclé a toutes les caractéristiques pour être choisi comme modèle d'étude afin d'examiner dans la région métropolitaine de Montréal les niveaux de contamination de la faune exposée à un milieu anthropique. D'abord, son lieu de nidification étant en périphérie de zones fortement polluées, il est exposé à un spectre de polluants incluant le Dec-604. Ensuite, sa disponibilité, son accessibilité et son repérage facile en font une espèce pratique à échantillonner. Le goéland à bec cerclé est un modèle d'autant plus intéressant pour notre étude puisque le Dec-604 CB a été détecté dans le foie (Sorais *et al.*, 2021), le plasma et le guano (Desjardins *et al.*, 2019).

L'omniprésence de multiples congénères de RFB dont les dechloranes dans le foie des goélands à bec cerclé d'une colonie se nourrissant dans des dépotoirs de la région de Montréal n'a pu être expliquée exclusivement par l'exposition alimentaire (Gentes *et al.*, 2015). En conséquence, l'exposition atmosphérique a été étudiée comme une source potentielle de Dec-604 CB de

goélands à bec cerclé à l'aide d'un échantillonneur d'air passif miniature porté par des oiseaux (Sorais *et al.*, 2021). Les résultats ont montré que la probabilité de présence d'oiseaux dans les dépotoirs n'avait pas d'effet sur les concentrations de Dec-604 CB dans le foie des goélands, ce qui suggère que l'exposition atmosphérique ne serait pas la principale source de ce produit de débromation (Sorais *et al.*, 2021). Une étude antérieure a évalué la relation entre les brefs jeûnes successifs des goélands (temps passé au nid pendant la nidification provoquant une restriction alimentaire) et les niveaux de contaminants dans le foie et le plasma des oiseaux. Les concentrations combinées de composés des déchloranes (Dec-602, -603, BDE-183/-604 et -604 CB, Chlordene Plus (CP) et *syn*- et *anti*-DP) dans le foie étaient positivement liées à la proportion de temps passé au site de nidification (Marteinson *et al.*, 2016). Il a été précédemment rapporté que le jeûne pourrait augmenter le métabolisme hépatique (enzymatique) des contaminants chez les goélands argentés (*Larus argentatus*) (Routti *et al.*, 2013), mais les processus sous-jacents restent difficiles à expliquer. La présence du Dec-604 CB dans des échantillons d'animaux tels que les poissons et les oiseaux pourraient suggérer que la dégradation du Dec-604 par débromation se produit dans l'organisme lui-même, du moins en partie.

1.1.4.1 Métabolisme des retardateurs de flamme chez le goéland à bec cerclé

Quelques études ont été menées sur le métabolisme de retardateurs de flamme chez le goéland à bec cerclé, mais les résultats n'ont pas confirmé le mécanisme de biotransformation. En effet, une première étude s'est penchée sur l'implication des enzymes de la famille des CYP dans le métabolisme du BDE-209 et du DP par incubation *in vitro* de microsomes de foie du goéland à bec cerclé. Cependant, aucune dégradation du BDE-209 ni du DP n'a été observée contrairement au contrôle positif (BDE-15). Ces résultats suggèrent que la déshalogénéation réductrice médiée par les isoenzymes des CYP n'est pas impliquée dans la biotransformation du BDE-209 ou du DP chez le goéland à bec cerclé (Chabot-Giguère *et al.*, 2013).

Une autre étude de François *et al.* (2016) s'est intéressée à l'implication de la déiodinase de type 1 (D1) dans la biotransformation et l'accumulation des PBDE fortement bromés dans le foie des goélands à bec cerclé. La relation entre les concentrations des polluants et la transcription ainsi que l'activité de la D1 a été étudiée via un essai *in vitro* avec des microsomes de foie. Les

échantillons ont été séparés en fonction de l'activité de la D1 et le groupe avec la plus haute activité de D1 présentait les concentrations les plus élevées de produits de débromation, hepta-BDEs et octa-BDEs, dans le foie (François *et al.*, 2016). Les auteurs ont observé que l'activité de la D1 chez le goéland à bec cerclé était inversement proportionnelle aux ratios des concentrations de BDE-209 sur les octa-BDEs (François *et al.*, 2016). De plus, les niveaux d'ARNm de la D1 étaient inversement proportionnels aux concentrations hépatiques de l'octa-BDE. Ces résultats ont fait de la D1 un acteur potentiel dans le processus de biotransformation du BDE-209 chez le goéland à bec cerclé (François *et al.*, 2016). Cependant, aucune relation directe n'a pu être établie entre la transcription de l'ARNm de la D1 et son activité totale chez le goéland à bec cerclé. Les auteurs ont proposé que les organohalogénés puissent perturber la fonction thyroïdienne et déclencher un mécanisme compensatoire. Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence d'association entre l'activité totale de la D1 et les concentrations hépatiques de BDE-209 chez les goélands à bec cerclé (François *et al.*, 2016).

À la suite de cette étude, François et Verreault (2018) ont étudié *in vitro* l'implication de la D1 dans la débromation de BDE-209 dans les microsomes de foie des goélands à bec cerclé en plus de vérifier la présence d'une interaction entre D1 et BDE-209 grâce à un essai d'activité. L'activité totale de la D1 a montré une augmentation en présence d'une concentration moyenne de BDE-209 (1,0 nM), mais pas à une concentration plus faible (0,5 nM) ni à une concentration plus forte (2,5 nM). Ainsi, les auteurs suggèrent que l'interaction entre l'enzyme et le polluant n'est pas dose-dépendante. Toutefois, les résultats n'ont montré aucune débromation du BDE-209 lors de l'expérience avec les microsomes hépatiques. Les résultats de cette étude suggèrent donc que les conditions utilisées pour l'essai *in vitro* n'ont pas mené à la déplétion de BDE-209 (François et Verreault, 2018). Si l'essai *in vitro* présenté n'a pas été en mesure de démontrer l'implication de la D1 dans la biotransformation du BDE-209, l'effet du Dec-604 sur l'activité de cette déiodinase reste à vérifier. Aucune étude à notre connaissance ne s'est pour l'instant penchée sur le métabolisme du Dec-604 chez le goéland à bec cerclé ou toute autre espèce animale. Considérant la similarité de la structure du Dec-604 avec les hormones thyroïdiennes, une déhalogénéation serait possible par l'action des enzymes responsables de la déiodination de ces hormones.

1.1.4.2 Conséquences de l'exposition sur l'espèce

Les conséquences possibles de la débromation du Dec-604 chez le goéland à bec cerclé pourraient s'apparenter aux effets déjà observés causés par l'exposition d'espèces aviaires aux RFB. Par exemple, les congénères BDE-99, -47, -100 et -153 qui sont les constituants majeurs des mélanges penta-BDE, ont été retrouvés dans les échantillons de foie et de plasma de goélands à bec cerclé (Gentes *et al.*, 2012). Une débromation du BDE-209 pourrait produire ces congénères menant à des effets comparables à ceux observés suite à l'exposition au mélange DE-71 (penta-BDE) des crécerelles; l'amincissement des coquilles et la diminution du succès lors de l'éclosion (Ferne *et al.*, 2009; McKernan *et al.*, 2009). Une étude s'est également penchée sur les effets de l'exposition embryonnaire (*in ovo*) au DE-71 sur les crécerelles d'Amérique mâles pour déterminer les effets multigénérationnels de l'exposition aux PBDE, y compris leurs effets sur les soins parentaux observés expérimentalement. Les résultats montrent que l'exposition *in ovo* au DE-71 a des effets néfastes sur la reproduction et le comportement des crécerelles mâles et que les changements observés sont constants d'une génération à l'autre (Marteinson *et al.*, 2010). Les niveaux d'exposition utilisés au cours des expériences étaient comparables aux niveaux dans l'environnement, ce qui porte à croire que les changements observés dans le comportement et le succès reproducteur sont également présents chez les oiseaux sauvages exposés aux PBDE dans leur habitat naturel. D'ailleurs, une étude portant sur la colonie de goélands à bec cerclé nichant sur l'île Deslauriers a établi qu'une forte exposition aux PBDE avait un effet négatif sur la densité minérale du tarse chez les mâles. En effet, Plourde Pellerin *et al.* (2013) ont étudié les relations entre les biomarqueurs du métabolisme et de l'intégrité structurale des os avec les concentrations hépatiques et plasmiques de retardateurs de flamme via les taux de calcium libre et de phosphate inorganique dans le plasma (Plourde Pellerin *et al.*, 2013). La qualité de la structure du tarse a été évaluée selon le ratio de volume de tissus osseux et la densité minérale de l'os. Les résultats ont montré une corrélation négative entre la densité minérale de l'os et les taux de certains RFB dans le foie et dans le plasma suggérant une possible déminéralisation du tissu osseux causée par l'exposition des goélands à bec cerclé mâles de la région de Montréal (Plourde Pellerin *et al.*, 2013). Ces résultats pourraient être liés, entre autres, à une perturbation des hormones thyroïdiennes impliquées dans le métabolisme des os (Bassett et Williams, 2003).

D'ailleurs, Técher et al. (2016) ont étudié les relations entre l'exposition des goélands à bec cerclé à certains retardateurs de flamme et la perturbation de l'axe thyroïdien. Une association positive a été observée entre les niveaux totaux de T₄ dans le plasma et les concentrations de plusieurs retardateurs de flamme dans le foie dont les PBDE mais aussi certains dechloranes. Les auteurs ont également observé une association négative entre les concentrations dans le foie de plusieurs PBDE et les niveaux d'ARNm de la D3, de la peroxydase thyroïdienne et des récepteurs des hormones thyroïdiennes β (TR β). Les auteurs ont conclu que ces associations pourraient signifier que les organohalogénés puissent perturber l'axe thyroïdien via différents mécanismes tels que la transcription de gènes (Técher et al., 2016). De plus, une étude subséquente sur la même colonie a rapporté que les concentrations hépatiques de Σ_6 Dec (somme de Dec-602, chlordanes plus, Dec-604 CB, Dec-603 et *syn- et anti-DP*) chez les poussins de goélands étaient positivement corrélées avec des niveaux d'ARNm de D1 dans le foie (Técher *et al.*, 2018).

Puisque la perturbation du système thyroïdien peut également avoir de graves conséquences sur le succès de reproduction qui nécessite différents événements hormonaux, physiologiques et comportementaux (Wingfield, 1990), l'exposition aux retardateurs de flammes comme le Dec-604 pourrait affecter les taux de reproduction et le développement des espèces aviaires comme le goéland à bec cerclé.

1.2 Objectifs et Hypothèses

Les études sur les goélands à bec cerclé qui nichent dans la région de Montréal ont montré que ces oiseaux sont exposés à une diversité de polluants organiques et inorganiques dont les retardateurs de flamme halogénés, faisant de cette exposition un mélange complexe. Plusieurs facteurs en font de bons candidats pour l'étude des mécanismes de biotransformation du Dec-604 tels que la proximité de leur site de nidification avec des zones fortement polluées, la composition actuelle de leur alimentation, des déchets majoritairement, et l'échantillonnage facile de cette espèce chez qui différents chercheurs ont retrouvé le Dec-604 (et surtout son métabolite le Dec-604 CB) dans le foie, le plasma et le guano. Les concentrations importantes de Dec-604 CB pourrait être explicable par une biotransformation partielle du Dec-604. À notre connaissance, aucune étude n'a été en mesure jusqu'à présent de déterminer les mécanismes enzymatiques responsables de la formation *in vitro* de métabolite du Dec-604 chez une espèce animale. Des recherches se sont penchées précédemment sur l'implication des CYPs ainsi que de la D1 sur la biotransformation du BDE-209. Puisqu'une étude précédente de notre laboratoire a observé une corrélation entre les concentrations de dechloranes et la transcription de la D1, celle-ci a été étudiée à l'aide de microsome hépatique du goéland à bec cerclé de la région de Montréal. L'effet du Dec-604 sur l'activité de la D1 a été pour une première fois étudié. Ces résultats apporteront de nouvelles informations et possiblement des éclaircissements sur les processus de biotransformation du Dec-604 chez les oiseaux.

1.2.1 Objectifs spécifiques

1) Étudier l'interaction entre le Dec-604 et la D1 lors d'un essai de biotransformation *in vitro* avec des microsomes de foie de goéland à bec cerclé.

Hypothèse : Considérant le potentiel de perturbation du système thyroïdien par les dechloranes ainsi que leur similarité structurale avec les hormones thyroïdiennes, le Dec-604 pourrait interagir avec la D1 ce qui affecterait la deiodination de T_4 provoquant, ainsi, une perturbation de la quantité de T_3 . La comparaison entre un contrôle en absence du Dec-604 et nos essais à différente concentration de Dec-604 a permis d'évaluer l'effet du RFB sur la production de la T_3 .

2) Investiguer la biotransformation *in vitro* avec des microsomes de foie de goéland à bec cerclé pour vérifier si le Dec-604 subit une débromation par la D1 pour former le Dec-604 CB.

Hypothèse : Considérant la présence de Dec-604 CB dans les échantillons de goéland à bec cerclé n'étant pas expliqué par l'alimentation ni l'exposition par l'air, la biotransformation du Dec-604 s'effectue par retrait d'un brome de la molécule mère par la D1 ce qui génère du Dec-604 CB chez le goéland à bec cerclé. Ce phénomène s'est observé par la production de Dec-604 CB dans un essai *in vitro* en présence de microsomes hépatiques activés par le cofacteur de la D1.

CHAPITRE 2

Biotransformation of Dec-604 and its Effect on Thyroid Deiodinase Activity in Highly Flame Retardant-Exposed Gulls

Madeleine Lépine, Jonathan Verreault*

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

Corresponding author: Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada. Tel.: +1-514-987-3000, ext.1070; Fax: +1-514-987-4647.

E-mail address: verreault.jonathan@uqam.ca (J. Verreault)

2.1 Abstract

Halogenated flame retardants (HFRs) have been shown to accumulate at elevated concentrations in some species of wild birds, especially in urban-adapted gulls. A number of HFRs have been recognized as thyroid axis disruptors including the now-banned polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixtures, which have been replaced with other HFRs such as Dechlorane 604 (Dec-604). Dechlorane 604 Component B (Dec-604 CB), a putative dehalogenation product of Dec-604, has been frequently reported in tissues of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) breeding in the Montreal area (QC, Canada). The metabolic pathways of Dec-604 are yet to be characterized, although the frequent occurrence of Dec-604 CB in gull tissues may suggest enzyme-mediated

dehalogenation (bromine removal). Debromination of Dec-604 may involve the thyroid deiodinases that remove iodine from thyroid hormones in peripheral tissues. The objective of this study was to investigate the effect of Dec-604 with type 1 deiodinase (D1), which catalyzes the formation of triiodothyronine (T₃) and diiodothyronine (T₂) from thyroxine (T₄) as well as Dec-604 *in vitro* biotransformation in ring-billed gulls. We tested the *in vitro* activity of D1 in gull liver microsomes in the presence of five concentrations of Dec-604 ranging from 0.86 to 86.21 nM. HFR concentrations (Σ_{40} HFRs) were also determined in liver samples of the same individuals. Results showed that total D1 activity in gull liver microsomes was increased by three of the five concentrations of Dec-604. No effect of liver Σ_{40} HFRs concentrations on D1 activity was observed, with the exception of T₂ formation rates that decreased with higher liver HFRs concentrations. Moreover, higher Dec-604 CB to Dec-604 concentration ratios in activated gull microsomes (with the D1 cofactor dithiothreitol) were found at the intermediate Dec-604 concentration compared to controls. These results suggest that D1 activity may be perturbed by exposure to Dec-604 in ring-billed gulls, and be involved at least in part, in the biotransformation (debromination) of Dec-604 leading to the formation of Dec-604 CB in these birds.

Keywords: Halogenated flame retardant; Dechlorane; biotransformation; *in vitro* assay; bird.

2.2 Introduction

In order to comply with fire safety regulations, flame retardants are added to a wide range of materials to limit the spread of fire. Several of these are additive chemicals (not chemically bound) in consumer products and can be released into the environment, particularly during production, recycling, and landfill processes. Certain widespread halogenated flame retardants (HFRs; e.g., polybrominated diphenyl ethers (PBDE) and hexabromocyclododecane (HBCDD)) are known for their harmful effects in several experimentally and naturally exposed animals (Darnerud, 2003; Feiteiro *et al.*, 2021). As a result, the commercial PBDE mixtures (penta-, octa, and deca-BDE) and HBCDD have been included under Annex A of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (UNEP, 2017). Consequently, we observe the replacement of PBDE mixtures by other alternative halogenated flame retardants, including several emerging compounds (Hou *et al.*, 2021; Zuiderveen *et al.*, 2020). The formerly used chlorinated pesticide Dechlorane (or Mirex; $C_{10}Cl_{12}$) was also used as HFR in various materials including plastics, paint, paper, and electrical components (Shen *et al.*, 2010). Since its ban, it was replaced by a series of chlorinated and/or brominated chemicals with similar flame retardant properties such as Dechlorane (Dec)-601, -602, -603, -604, and Dechlorane Plus (Shen *et al.*, 2011). At the time this article was written, a risk profile on Dechlorane Plus was evaluated by the Stockholm Convention on POPs Review Committee (UNEP, 2021). Dec-604 (or Dec-604 Component A; $C_{13}H_4Cl_6Br_4$; CAS: 34571-16-9) currently is on the List of Non-Domestic Substances in Canada (traded internationally) and was listed among the ingredients of Molykote AS-810 silicone grease produced by Dow Corning Corp USA (MatWeb, 2009), although its use has not yet been reported in Canada (Environment and Climate Change Canada, 2021). The occurrence of this compound in the environment was first

reported in sediments (0.84-8,000 pg.g⁻¹ dry weight), lake trout (*Salvelinus namaycush*), and whitefish (*Coregonus clupeaformis*) (63-1,300 pg.g⁻¹ lipid weight) from Lake Ontario (North America) (Shen *et al.*, 2010). Moreover, Dec-604 was reported in eggs of bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) (Guo *et al.*, 2018), peregrine falcon (*Falco peregrinus*) (Guerra *et al.*, 2011) as well as Audouin's gulls (*Larus audouinii*) and yellow-legged gulls (*Larus michahellis*) (Ayala-Cabrera *et al.*, 2021). Specifically, lower concentrations of Dec-604 were found in eggs of Audouin's gulls (mean: 0.29 ng.g⁻¹ wet weight (ww)) compared to yellow-legged gulls (mean: 0.56 ng.g⁻¹ ww) from the Ebro Delta Natural Park, Spain (Ayala-Cabrera *et al.*, 2021). Since both these gull species have comparable biology and share the same habitat, these authors suggested that interspecies variations in egg Dec-604 levels could be explained by dietary differences. As such, Audouin's gulls feed exclusively on pelagic fish, while yellow-legged gull is an opportunistic species (i.e., diet composed of human refuse, terrestrial preys, and organisms from coastal marshes). Yet, diet might not be the only factor explaining interspecies variations in levels of Dec-604 in birds. Enzyme-mediated metabolism may play a role in bird tissue or egg Dec-604 accumulation; however, limited information is available on the metabolism of dechloranes, and the formation of their metabolites.

Analogues and/or putative degradation products of Dec-604 have been reported in the environment including Dec-604 Component B (Dec-604 CB; 2,4,5-Br₃Dec-604; CAS# 56890-89-2) (Shen *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2010) for which no information could be found on production volumes and usage. Dec-604 CB was shown by Shen *et al.* (2014) to be a photo-debromination product of Dec-604 and suggested by these authors to potentially explain its occurrence in sediments and fish from Lake Ontario. Moreover, elevated concentrations of Dec-

604 CB were reported in the liver of muskellunge (*Esox masquinongy*) and northern pike (*Esox lucius*) from the St. Lawrence River (QC, Canada) (Houde *et al.*, 2014) as well as in blubber of belugas (*Delphinapterus leucas*) and minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) from the St. Lawrence estuary (QC, Canada) (Simond *et al.*, 2017). Furthermore, Dec-604 CB has been frequently detected in the liver (Sorais *et al.*, 2021; Técher *et al.*, 2018) and plasma and guano (Desjardins *et al.*, 2019) collected from ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) breeding near the metropolis of Montreal (QC, Canada).

Studies have reported elevated tissue concentrations of PBDEs and other HFRs including emerging compounds in a ring-billed gull breeding colony located near the densely populated Montreal area (Chen *et al.*, 2012; Gentes *et al.*, 2012). The variety of compounds detected in the gull tissues of this colony suggested a strong exposition to a mix of pollutants (Brown, L. *et al.*, 2019; Kerric *et al.*, 2021). Using GPS-based tracking of ring-billed gulls from this colony, Gentes *et al.* (2015) showed that male gulls foraging more frequently in waste management facilities (e.g., landfills) exhibited greater plasma concentrations of Deca-BDE (composed of 97% of BDE-209) than those foraging in other habitats including agricultural fields, St. Lawrence River, and urban areas. Since food items consumed by gulls in landfills (human refuse) contain traces or undetectable concentrations of PBDEs (Schechter *et al.*, 2010), these results suggested that elevated tissue concentrations of Deca-BDE and other PBDEs in ring-billed gulls could not be explained exclusively by their diet (Gentes *et al.*, 2015). In a follow-up study, atmospheric exposure was investigated as a potential source of HFRs (including Dec-604 CB) in this same ring-billed gull colony using miniature bird-borne passive air samplers (Sorais *et al.*, 2021). Results of this study demonstrated that the influence of foraging in landfills on the liver concentrations of

non-PBDE HFRs in Montreal-breeding ring-billed gulls was highly compound-specific and somewhat different from the PBDEs. As such, the presence of gulls in landfills in this study was not associated with atmospheric exposure or bioaccumulation (liver) of Dec-604 CB. Therefore, it can be suggested that the accumulation of Dec-604 CB in ring-billed gull tissues could be attributed, at least in part, to the metabolism of Dec-604 via debromination, which was shown elsewhere for other highly brominated HFRs in birds. For instance, sequential debromination was suggested as an important biotransformation pathway for the fully brominated PBDE congener, BDE-209, in European starlings (*Sturnus vulgaris*) (Van den Steen *et al.*, 2007) and American kestrels (*Falco sparverius*) (Letcher *et al.*, 2014), which led to the formation of lower brominated PBDE congeners (i.e., octa- and hepta-BDEs). These authors suggested that Cytochrome P450 (CYP) isoenzymes could mediate this debromination in birds (Letcher *et al.*, 2014) since CYP2A2 and 3A1 were found to be involved in BDE-47 and -99 *in vitro* metabolism in rats (Erratico *et al.*, 2011). Likewise, in the Letcher *et al.* (2014) study, liver microsome CYP1A1 activity was higher in BDE-209-exposed kestrels (36.1 pmol.min⁻¹.mg⁻¹) compared to controls (10.3 pmol.min⁻¹.mg⁻¹), which was consistent with their observations on the occurrence of lower brominated PBDE concentrations that were significantly higher in the exposed birds. Hence, these authors suggested that BDE-209 depletion may occur via CYP-mediated debromination (Letcher *et al.*, 2014). In contrast, in an *in vitro* biotransformation assay with BDE-209 and DP in Montreal ring-billed gulls, no depletion of neither BDE-209 nor DP was observed via CYP isoenzyme-mediated reductive dehalogenation (Chabot-Giguère *et al.*, 2013). A follow-up study on BDE-209 biotransformation via type 1 deiodinase (D1) in the same species showed no depletion; yet, the results showed a potential interaction between BDE-209 and D1 (François et Verreault, 2018).

This study prompted further investigation on deiodinase-mediated debromination of PBDEs and other HFRs that share a similar brominated phenyl structure with PBDEs.

Very few toxicity studies have been reported for dechlorane-related compounds, with the exception of DP (Feo *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2016). It has been suggested that dechloranes may interfere with key components in the thyroid axis (Kang *et al.*, 2016; Técher *et al.*, 2018; Wang, S. *et al.*, 2019). Other HFRs (mostly PBDEs) were also found to disrupt thyroid hormone regulation, e.g., fish (Yu *et al.*, 2015) and birds (Guigueno et Fernie, 2017). The main hypothesis explaining this effect is the structural resemblance of PBDEs and other HFRs with thyroid hormones. As such, in pipping ring-billed gulls collected in the Montreal region, liver D1 mRNA levels were reported to positively correlate with liver concentrations of Σ_6 Dec (sum of *syn*- and *anti*-DP, chlordane plus, and Dec-602, -603, and -604 CB) (Técher *et al.*, 2018). A recent study further showed that some dechloranes, including Dec-604, bound to thyroid hormone receptors (α and β) in a competitive binding assay based on GH3 rat pituitary cancer cells (Zhu *et al.*, 2022). In the same study, a reporter gene assay and a T-screen assay showed that Dec-604 inhibited the transcriptional activity and GH3 cell proliferation, both induced by the active thyroid hormone triiodothyronine (T_3) (Zhu *et al.*, 2022). However, the interaction between Dec-604 and components of the thyroid axis including D1 as well as its potential for biotransformation in birds remains to be characterized.

The first objective of the present study was to investigate the effect of Dec-604 on D1 in the presence of thyroxine (T_4) in an *in vitro* D1 exposition assay using liver microsomes of ring-billed gulls that are highly exposed to HFRs in the Montreal area. We hypothesized that, considering the potential for disturbance of the thyroid system by dechloranes as well as their structural similarity

with thyroid hormones, Dec-604 modulate D1 activity that in turn affects the formation rate of T3 through T4 deiodination. The second objective was to determine if D1 was involved in the *in vitro* debromination of Dec-604 in liver microsomes of ring-billed gulls. We hypothesized that biotransformation can, at least in part, explain Dec-604 CB occurrence previously reported in tissues of this species. The results of this study will provide insights into the biotransformation capacity and toxicological effects on deiodinase of the poorly studied Dec-604 in a bird living in a highly contaminated environment to HFRs.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Sample collection

Collection of ring-billed gull samples was carried out during the incubation period, from May through June 2019, on Deslauriers Island located 3 km downstream of Montreal (QC, Canada) in the St. Lawrence River, where approximately 65,000 individuals breed annually (2016; Canadian Wildlife Service; unpublished data). Ring-billed gull males ($n = 9$) and females ($n = 9$) were randomly captured on their nest upon clutch completion (3-egg clutch) from a distance using a remote-controlled trap in all areas of the colony. Morphometric measurements (body mass, length of head, culmen, tarsus and 9th primary, and beak thickness) were recorded, and the gulls were euthanized by cervical dislocation. To assess body condition, a scaled mass index was calculated following (Peig et Green, 2009): $SMI = M_i [L_0/L_1]^{b_{sma}}$ (Eq. (1)), where M_i is the body mass and L_i is the morphometric measure that most strongly correlated with body mass (beak thickness for males and tarsus length for females). Samples of the left liver lobe were collected within 5 min of euthanasia, transferred to cryovials, and stored immediately in liquid nitrogen. The remainder of the liver samples were wrapped in aluminum foil and stored in hermetic bags

in a cooler (~ 4 °C) during fieldwork. The sex of each bird was confirmed by gonad examination. In the laboratory, liver samples stored in liquid nitrogen were transferred into a -80 °C freezer until microsome preparation (section 2.3.2) and the remainder of the liver samples were transferred into a -20 °C freezer until chemical analyses (section 2.4). Capture and handling methods were approved by the Institutional Committee on Animal Care of the Université du Québec à Montréal (permit no. 885), which follows guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada).

In order to compare results on ring-billed gulls with a control (surrogate) species, we used liver samples collected from one male and one female Japanese quail (*Coturnix japonica*) that were kindly donated by the McGill Ecotoxicology Laboratory (Dr. Jessica Head, McGill University, Montreal, QC, Canada). These quails had been obtained by this laboratory in 2017 at 1 or 2 days of age from Loudounberry Farm & Garden (Leesburg, Virginia, USA). From 8 weeks of age, the birds had been given corn oil that was administered orally through gavage for 14 days. The birds were then euthanized and the liver samples were collected, frozen immediately on dry ice, and then stored at -80 °C until microsome preparation (section 2.3.2).

2.3.2 Liver microsome preparation

Ring-billed gull and Japanese quail liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation in accordance with methods described previously (François and Verreault, 2018) with minor modifications. Briefly, 700 mg of liver (left lobe) was thawed on ice and homogenized using a Potter-Elvehjem tissue grinder in a phosphate buffer (0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 7.4). The liver homogenate was centrifuged at 9000 x *g* for 15 min and the

supernatant (S-9 fraction) was further centrifuged at 100,000 x *g*. The pellets were then re-suspended in a phosphate-sucrose buffer (0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.25 M sucrose; pH 7.0). The final suspension was separated into aliquots that were kept at -80 °C until the *in vitro* enzyme assays (section 2.3.3). Protein concentrations in liver microsomes were determined following methods based on Lowry (1951) using the Pierce Modified Lowry Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions.

2.3.3 Deiodinase activity determination

2.3.3.1 *In vitro* D1 activity assay

Measurement of hepatic microsomal D1 activity was carried out using an *in vitro* assay based on the methods of François and Verreault (2018). All assay tubes were tested in triplicates. Briefly, the reaction tubes, kept on ice in every step unless mentioned otherwise, contained 1 mg of gull and quail hepatic microsomal protein suspension in phosphate buffer (0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄; pH 7.4) with 0.0086 nM (1 µCi) of ¹²⁵I-T₄ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Test tubes were used to calculate the formation rates of T₂ and T₃, while the control tubes were used to control for any non-microsomal transformation of ¹²⁵I-T₄ (without adding the cofactor). The blanks contained only hepatic microsome suspension and phosphate buffer. The tubes were first preincubated for 5 min at the bird's body temperature (41 °C) in a water bath. The assay reaction was initiated with the addition of 10 mM of the cofactor dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) and tubes were incubated at 41 °C in a shaking water bath (90 rpm) using a reaction time (75 min) validated by François et al. (2016) who observed that the reaction using 1mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins was found to be linear at 75 min. The reaction

was stopped by adding 500 μL ice-cold high-performance liquid chromatography (HPLC) grade methanol (Sigma Aldrich). The tubes were then centrifuged at $9000 \times g$ for 10 min to isolate supernatant in aliquots that were kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until high-performance liquid chromatography analysis (see below).

Levels of $^{125}\text{I-T}_4$ and its deiodinated products $^{125}\text{I-diiodothyronine}$ ($^{125}\text{I-T}_2$) and ($^{125}\text{I-T}_3$) were measured by HPLC (1200 series; Agilent Technologies, Toronto, ON, Canada) comprised of a degasser, binary pump, and automatic injector. A Zorbax Eclipse Plus C-18 analytical column (solvent saver High Throughput; $3 \times 50\text{ mm}$; particle size $1.8\text{ }\mu\text{m}$) coupled with a Zorbax Eclipse Plus C-18 guard column ($3 \times 5\text{ mm}$; particle size $1.8\text{ }\mu\text{m}$) (Agilent Technologies) was used to separate the $^{125}\text{I-T}_4$, $^{125}\text{I-T}_2$, and $^{125}\text{I-T}_3$. Standards and test samples were quantified using a PerkinElmer flow scintillation detector (Radiomatics model 610TR; 125 mL volume; Gamma C-Flow counting cell) with a ProFSA data acquisition package. Continuous peak monitoring was conducted at 230 nm using 400 nm as a reference with an ultraviolet (UV) detector (series 1100 diode-array detector; Agilent Technologies), which was used to determine retention times for authentic T_4 , T_3 , and T_2 standards (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA).

The equation used to determine the liver microsome D1 activity was based on the methods described by François and Verreault (2018) with minor modifications, and is defined as follows:

$$[\text{T}_3] = \frac{^{125}\text{I-T}_3 \text{ area (CPM)} \times [^{125}\text{I-T}_4]_i (\mu\text{M})}{^{125}\text{I-T}_4 \text{ area (CPM)}}$$

where $^{125}\text{I-T}_3$ area (CPM) corresponds to the mean $^{125}\text{I-T}_3$ peak area in reaction tubes, $[^{125}\text{I-T}_4]_i$ (mM) to initial spiked $^{125}\text{I-T}_4$ concentration, and $^{125}\text{I-T}_4$ area (CPM) to mean $^{125}\text{I-T}_4$ peak area in control tubes. Microsomal T_2 formation rate was calculated by replacing $^{125}\text{I-T}_3$ area (CPM) with

$^{125}\text{I-T}_2$ area (CPM) in the first term of the equation. This result was divided by the time of reaction (min) and protein content (g). Because T_2 can be formed through both outer and inner ring deiodination, which could not be discriminated in the present assay, total D1 activity was calculated by summing $^{125}\text{I-T}_3$ and $^{125}\text{I-T}_2$ formation rates (in $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of proteins) and used to express the overall D1 activity in ring-billed gull liver microsomes.

2.3.3.2 Dec-604 *in vitro* exposition assay

The methods used for the *in vitro* exposition assay were based on François and Verreault (2018) with minor modifications. Briefly, the control and reaction tubes consisted of a phosphate buffer (0.1 M KH_2PO_4 , 0.1 M Na_2HPO_4 ; pH 7.4), 1 mg of gull and quail liver microsomal protein suspension and 0.0086 nM (1 μCi) of $^{125}\text{I-T}_4$. The reaction tubes contained Dec-604 (Wellington Laboratories; Guelph, ON, Canada) in acetone (analytical grade, 0.5%) at five concentrations (0.00086, 0.0017, 0.0086, 0.043, and 0.086 nM). No effect of acetone on D1 activity was previously observed at concentration used in present study by François et Verreault (2018), which was confirmed by the present results. The mentioned concentrations were selected to cover a range of concentrations around that of $^{125}\text{I-T}_4$ (0.0086 nM). The blank contained only buffer, ring-billed gull, and quail liver microsomes, and $^{125}\text{I-T}_4$ as did the vehicle control, which also contained acetone (0.5%, analytical grade). The tubes were first preincubated for 5 min at the bird's body temperature (41 °C). The assay reaction was initiated with the addition of 10 mM of DTT (Sigma Aldrich) and the tubes were incubated at 41 °C for 75 min in a shaking water bath (90 rpm). The reaction was stopped by adding ice-cold HPLC grade methanol (Sigma Aldrich). The tubes were then centrifuged at 9000 x g for 10 min to isolate the supernatant in aliquots that were kept at -20 °C until HPLC analysis.

Levels of ^{125}I -T₄ and its deiodinated products were measured using the same method as for the *in vitro* D1 activity assay (section 2.3.3.1).

2.3.4 *In vitro* biotransformation assay

The methods used for the *in vitro* biotransformation assay were based on François and Verreault (2018) with minor modifications. Briefly, the blanks and vehicle control used for the exposition assays were also used as blanks for the biotransformation assay as both assays were conducted simultaneously. Reaction tubes consisted of buffer and 1 mg of gull liver microsomal protein suspension. The reaction tubes contained Dec-604 in analytical grade acetone (0.5%) at 0.0086 nM, which corresponded to the intermediate concentration in the exposition assay (section 2.3.3.2). The tubes were first preincubated for 5 min at the bird's body temperature (41 °C). The assay reaction was then initiated with the addition of 10 mM of DTT (Sigma Aldrich), and the tubes were incubated at 41 °C for 75 min in a shaking water bath (90 rpm). The reaction was stopped by adding ice-cold HPLC grade methanol (Sigma Aldrich). Samples were stored at -20 °C until chemical analysis (section 2.3.5).

2.3.5 Chemical analysis

A suite of 35 PBDE congeners and 14 other HFRs (Wellington Laboratories) including two analogues of Dec-604 (Br-Dec-604 and Br₂-Dec-604; Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada) were analyzed in liver microsomes (for assays results) and liver samples (for liver concentrations) of ring-billed gulls ($n = 18$) based on methods described by Sorais et al. (2021) with minor modifications. Briefly, thawed liver samples and microsomal suspensions were homogenized with diatomaceous earth (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), spiked with 100 µL of an internal standard solution (BDE-30, BDE-156, ^{13}C -BDE-209, and ^{13}C -*syn*-DP; Wellington

Laboratories), transferred into stainless steel cells, and extracted using a pressurized liquid extraction system (Fluid Management Systems, Watertown, MA, USA) using dichloromethane and *n*-hexanes (1:1, volume ratio). Sample extracts were further cleaned-up using PBDE-free acid-basic-neutral silica columns followed by PBDE-free neutral alumina columns (Fluid Management Systems). Identification and quantification of targeted analytes were conducted using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA, USA) operating in electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI). The analytical column was a DB-5 HT capillary column (15 m × 0.25 mm × 0.10 μm) (J & W Scientific, Brockville, ON, Canada). Quality control and assurance procedures included analysis of procedural method blanks, duplicate samples, and standard reference materials (SRM 1947; Lake Michigan fish tissue, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) for each batch of ten samples. Concentrations in liver samples were blank-corrected for BDE-183/Dec-604 and Dec-604 CB. Mean (± SEM) recoveries of internal standards in gull liver samples were 90 ± 3% for BDE-30, 87 ± 3% for BDE-156, 46 ± 4% for ¹³C-BDE-209, and 78 ± 3% for ¹³C-*syn*-DP; and in microsome suspensions: 98 ± 1% for BDE-30, 90 ± 2% for BDE-156, 42 ± 2% for ¹³C-BDE-209, and 88 ± 2% for ¹³C-*syn*-DP. Concentrations of the six PBDE congeners in SRM 1947 samples (*n* = 2) showed an average variation of 21% from the certified values. Method limits of detection (MLODs; defined as signal to noise ratio *S/N* = 3) and method limits of quantification (MLOQs; minimum amount of analyte producing a peak with *S/N* = 10) were based on replicate analyses (*n* = 18) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit. The mean (± SEM) liver concentrations of a given compound were calculated if more than 60% of the samples were above the compound-specific

instrumental detection limits. When this criterion was respected, non-detected values were generated using NDExpo Version 1.0 (<http://expostats.ca/site/app-local/NDExpo/>). The Expostats toolkit implements robust regression on order statistics (ROS), which is a semiparametric method to estimate censored data with the assumption of log-normal distribution (Lavoué *et al.*, 2019).

2.3.6 Statistical analysis

Concentrations of target compounds in ring-billed gull liver samples were a-priori explored for normality (Shapiro-Wilk and q-q plots) and transformed (log or square-root) to achieve normality, when necessary. No statistical test could be performed on the quail data as only two individuals were used. Normal distribution of the data and homoscedasticity of the mixed model residuals were verified by analysis of q-q plots and residual plots. Linear mixed effect (LME) models (“*nlme*” package in R) (Pinheiro *et al.*, 2021) were used to investigate the effect of spiked (in liver microsomes) Dec-604 on the total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates in the assay. A total of 16 candidate LME models that could potentially explain changes in D1 activity in liver microsomes were compared. Bird ID was included as a random effect to avoid pseudoreplication and models were fitted using maximum likelihood. Explanatory variables included assay concentrations of Dec-604, liver concentrations of the sum of all targeted HFRs (Σ_{40} HFRs), Dec-604 CB and Dec-604, body condition (scaled mass index), total D1 activity in control samples, and sex. Candidate models were compared using Bayesian information criterion (BIC) using the *AICcmodavg* package in R (Mazerolle, 2020). Models within Δ BIC<2 from the top-ranked model were considered to best explain the variation in total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates analyzed separately (Burnham et Anderson, 2002).

LME models within the “nlme” library of R were used to investigate the effect of ring-billed gull liver microsome activation (i.e., presence of cofactor) on Dec-604 and Dec-604 CB concentrations in the *in vitro* biotransformation assay as well as Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios. Bird ID was included as a random effect to avoid pseudoreplication and models were fitted using maximum likelihood. Explanatory variables included microsome activation (presence of cofactor), liver concentrations of the sum of all target HFRs (Σ_{40} HFRs), Dec-604 CB and Dec-604, body condition, total D1 activity without Dec-604 (vehicle control) or with 8.62 nM of Dec-604. A total of 24 candidate LME models that could potentially explain the variations in concentrations of Dec-604 and Dec-604 CB as well as Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios in liver microsome assays were compared using BIC. Models within Δ BIC<2 from the top-ranked model were considered to best explain the variation in Dec-604 and Dec-604 CB concentrations in the biotransformation assay as well as Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios.

Data were analyzed using R version 3.6.2 (R Core Team, 2019). The raw data and the R script used can be found in the supplementary materials. Tests were considered significant when $p \leq 0.05$ or tendencies when $0.05 < p < 0.1$.

2.4 Results

2.4.1 HFR profiles in gull liver

Σ_{35} PBDE made up the greatest percent contribution (97.0%) to Σ_{40} HFRs concentrations (ng.g⁻¹ ww) in combined ring-billed gull male and female liver samples, while Dec-604 (co-elution with BDE-183) and Dec-604 CB made up 2.7% and 0.2% of Σ_{40} HFRs concentrations, respectively. The concentrations of Σ_{40} HFRs ($F_{1,16} = 0.10$; $p = 0.75$), Σ_{35} PBDE ($F_{1,16} = 0.07$; $p = 0.80$), Dec-604/BDE-183 ($F_{1,16} = 0.23$; $p = 0.63$), and Dec-604 CB ($F_{1,16} = 0.02$; $p = 0.89$) in ring-billed gull liver were not different between sexes (Table S1), and thus all subsequent statistical analyses were performed using combined males and females. However, the effect of sex was tested as explanatory variable in all models (section 2.4.2 and 2.4.3). *Anti*- and *syn*-DP were detected in 89% and 68%, respectively, in gull liver samples, whereas Dec-601, -602 and -603 were not detected in any samples.

2.4.2 *In vitro* D1 activity in gull liver microsomes

¹²⁵I-T₂ and ¹²⁵I-T₃ were quantified in all ring-billed gull and Japanese quail liver microsome samples incubated with ¹²⁵I-T₄ and Dec-604 at the five concentrations tested (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM). Total D1 activity calculated in ring-billed gull liver microsomes ranged from 743 to 4,162 pmol.min⁻¹.g⁻¹ (mean ± SEM: 2,527 ± 63.4 pmol.min⁻¹.g⁻¹). Total D1 activity in Japanese quails was within a similar range to those of ring-billed gulls (1,976 to 2,883 pmol.min⁻¹.g⁻¹) and its variations also were comparable for the five Dec-604 concentrations tested. Similar to liver HFR concentrations (section 2.4.1), no difference in total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates was found between ring-billed gull males and females (Fig. S1). Moreover, no difference in total D1 activity was found in ring-billed gull liver microsomes between the vehicle control (¹²⁵I-T₄ +

acetone 0.5%) and the control (^{125}I -T₄ only) ($F_{1,19} = 0.21$, $p = 0.65$). Therefore, the vehicle control, which represented the closest conditions to the experiment assay, was used for comparisons with the five assay Dec-604 concentrations in subsequent statistical analyses.

Among the 16 linear mixed effect models that were considered, the most parsimonious models differed between total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates (Table 1). Top-ranked models explaining total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates obtained between 33 and 66% of support (BICwt) and all included liver microsome assay Dec-604 concentrations.

Table 2.1. Results of model selection ($\Delta\text{BIC} < 2$) among linear mixed effect models explaining total D1 activity and T₃ and T₂ formation rates determined in liver microsomes of male and female ring-billed gulls ($n = 18$) from the Montreal area (QC, Canada). All models included bird ID as a random effect. Explanatory variables included assay concentrations of Dec-604, liver concentrations of $\Sigma_{40}\text{HFRs}$, Dec-604 CB and Dec-604, body condition, total D1 activity in vehicle control samples, and sex.

Model	K	BIC	ΔBIC	BICwt
Total D1 activity				
Total D1 activity ~ assay Dec-604 concentrations	8	1,645.14	0.00	0.63
T₃ formation rate				
T ₃ formation rate ~ assay Dec-604 concentrations	8	1,633.81	0.00	0.66
T₂ formation rate				
T ₂ formation rate ~ assay Dec-604 concentrations	8	1,289.20	0.00	0.35
T ₂ formation rate ~ assay Dec-604 concentrations + $\Sigma_{40}\text{HFRs}$	9	1,289.32	0.12	0.33

The mixed model (marginal R squared (R²m) of 3.2%) revealed a significant effect of assay Dec-604 concentrations on total D1 activity ($F_{5,85} = 3.13$, $p = 0.01$) in combined ring-billed gull males and females. A subsequent estimated marginal mean (EMM) comparison showed no difference

in total D1 activity between the vehicle control and the lowest (0.86 nM) ($p = 0.8$) and highest (86.21 nM) ($p = 0.2$) assay Dec-604 concentrations. In contrast, total D1 activity was significantly greater compared to the vehicle control in the two intermediate assay Dec-604 concentrations (1.72 and 8.62 nM) ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively), and also tended to be greater in the fourth (43.10 nM) concentration ($p = 0.07$) (Figure 2.1; Table S2.2).

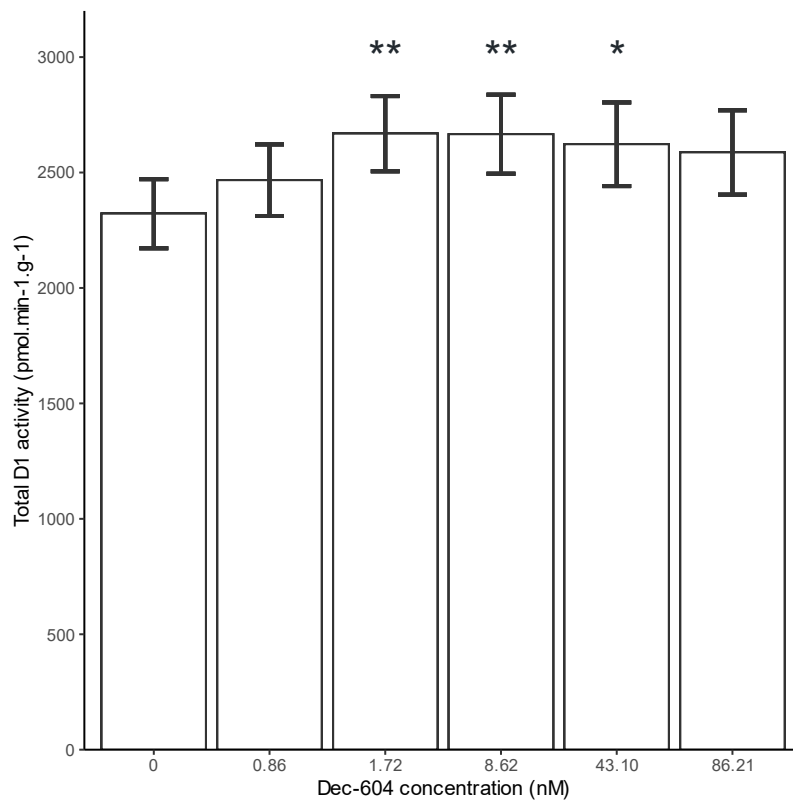


Figure 2.1. Mean (\pm SEM) total D1 activity ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) determined in liver microsomes of combined ring-billed gull males and females ($n = 18$) from the Montreal area (QC, Canada) incubated with $^{125}\text{I}\text{-T}_4$ for the vehicle control (0.5% acetone) of five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone). The asterisks represent a significant difference from the vehicle control (**) or a tendency to be significant (*).

The linear mixed effect models further revealed (R^2_m of 2.7%) a significant effect of the Dec-604 concentrations on T_3 formation rates ($F_{5,85} = 2.33$, $p = 0.05$). A subsequent EMM comparison

showed no difference in T₃ formation rates between the vehicle control and the lowest (0.86 nM; $p = 0.8$) and three highest (8.62 nM; $p = 0.1$, 43.10 nM; $p = 0.2$ and 86.21 nM; $p = 0.4$) Dec-604 concentrations. In contrast, T₃ formation rates were significantly greater in the second concentration compared to the vehicle control (1.72 nM; $p = 0.05$) (Table S2).

Also, the mixed models (R²_m of 22.3%) revealed a significant effect of the Dec-604 concentrations on T₂ formation rates ($F_{5,85} = 4.30$, $p = 0.001$). A subsequent EMM comparison showed no difference in T₂ formation rates between the vehicle control and the lowest (0.86 nM; $p = 0.2$) Dec-604 concentration. In contrast, T₂ formation rates were significantly greater in all four highest concentrations (1.72 nM; $p = 0.03$, 8.62 nM; $p = 0.05$, 43.10 nM; $p < 0.001$, 86.21 nM; $p = 0.006$) compared to the vehicle control (Table S2). Moreover, liver Σ_{40} HFRs concentrations were found to have a significant effect on T₂ formation rates ($F_{1,16} = 4.86$, $p = 0.04$). A significant regression obtained from the mixed model showed that T₂ formation rates decreased with liver Σ_{40} HFRs concentrations ($\beta = -0.66$, $t = -2.2$, $p = 0.04$).

2.4.3 *In vitro* biotransformation of Dec-604 in gull liver microsomes

This *in vitro* biotransformation assay was designed to monitor for the depletion of Dec-604 and formation of debrominated dechloranes (i.e., Dec-604 CB, Br-Dec-604, and Br₂-Dec-604) in ring-billed gull ($n = 5$ males) liver microsomes incubated with the cofactor DTT (activated) or not (vehicle control). Two debrominated products of Dec-604 (Br-Dec-604 and Br₂-Dec-604) were not detected in any ring-billed gull liver microsome samples over the 75 min timeframe of the assay. In contrast, Dec-604 CB was quantified in all assay microsomal suspensions including in controls, vehicle controls, and blanks. No difference in Dec-604 and Dec-604 CB concentrations was

observed between liver microsomes incubated with the cofactor DTT (activated) or not (vehicle control) (Table S3). However, a significant difference in Dec-604 CB to Dec-604 concentration ratios (Dec-604 CB: Dec-604) between microsomes incubated with and without the cofactor was found ($F_{1,4} = 15.2$, $p = 0.02$) (Figure 2.2). A significant regression showed that activation of microsomes with the cofactor led to a significant increase in Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios ($\beta = 0.0066$, $t = 3.9$, $p = 0.02$).

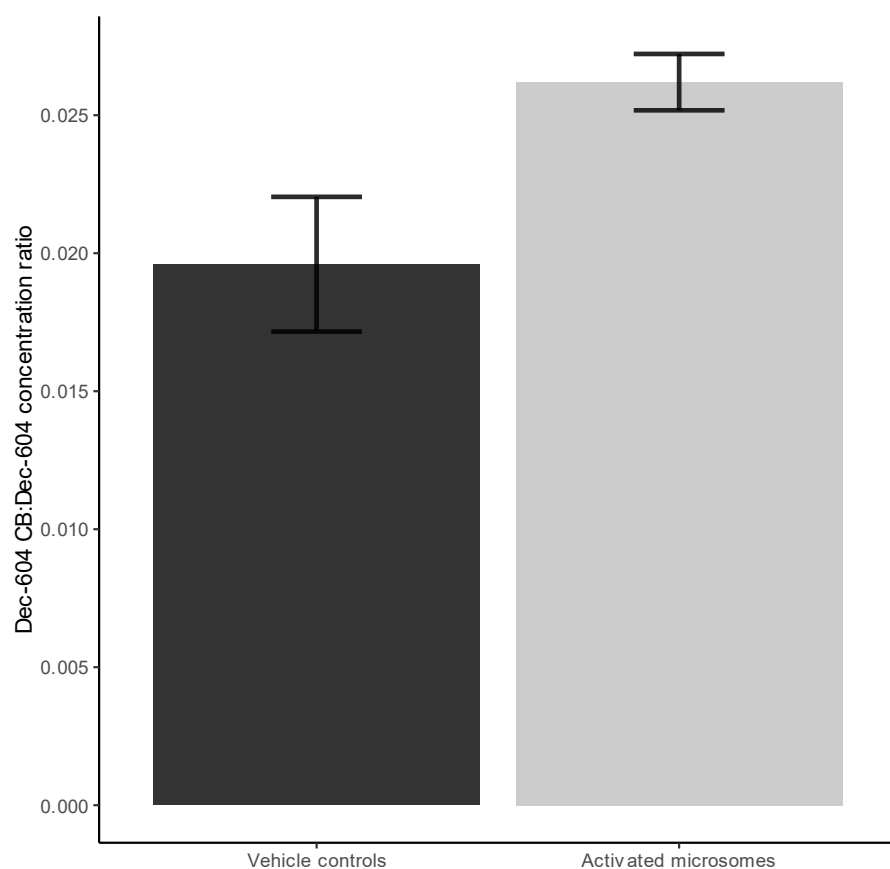


Figure 2.2 Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios in the *in vitro* biotransformation assay with male ring-billed gull liver microsomes ($n = 5$) incubated with the cofactor DTT (activated) or not (vehicle control).

2.5 Discussion

The present study showed that the incubation of ring-billed gull liver microsomes with Dec-604 in a 75 min *in vitro* assay resulted in a significant increase in D1 activity at several of the five Dec-604 concentrations tested. In contrast, no effect of the liver Σ_{40} HFRs concentrations in gulls on liver microsome D1 activity was observed, with the exception of T₂ formation rates that were lowest for the highest liver Σ_{40} HFRs concentrations. No difference in Dec-604 and Dec-604 CB (or other debrominated products) concentrations was found between activated (with co-factor DTT) gull liver microsomes and vehicle controls (without co-factor) in the *in vitro* biotransformation assay. However, significantly greater Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios were found in the activated gull liver microsomes.

2.5.1 HFR concentrations

Σ_{35} PBDE concentrations determined in the liver of present ring-billed gulls collected in 2019 were consistent with those reported by Sorais et al. (Sorais *et al.*, 2021) for samples collected from the same breeding colony between 2015 and 2017. Consistently, liver concentrations of Dec-604 (coelution with BDE-183) in present ring-billed gulls (mean \pm SEM: 3.77 ± 0.98 ng.g⁻¹ ww) were also within a similar range compared to those previously reported by Sorais et al. (2021) (4.92 ± 0.98 ng.g⁻¹ ww). In contrast, the debrominated product of Dec-604, Dec-604 CB, was found at generally lower concentrations in present ring-billed gull liver samples (0.35 ± 0.1 ng.g⁻¹ ww) than those reported previously by our group (Sorais *et al.*, 2021), and much lower compared to the liver of pipping ring-billed gulls from this same colony sampled in 2016 (1.68 ± 0.38 ng g⁻¹ ww; (Técher *et al.*, 2018)). Very few reports of Dec-604 CB concentrations can be found in the literature and nearly all are for aquatic species such as in the liver of both northern pike and muskellunge

from the St. Lawrence River (QC, Canada) (Houde *et al.*, 2014), in the dorsal muscle of lake trout and whitefish from Lake Ontario (North America) (Shen *et al.*, 2014), and in the blubber of belugas and minke whales from the St. Lawrence estuary (QC, Canada) (Simond *et al.*, 2017). For instance, in the Houde *et al.* (2014) study, liver Dec-604 CB concentrations were reported to be significantly greater in northern pike collected at a site in the St. Lawrence river receiving effluent from Montreal's primary wastewater treatment plant compared to another site located upstream (mean combined sites: $5.9 \pm 2.5 \text{ ng.g}^{-1}$ lipid weight). The differences observed between samples from the two sites in this study confirmed that the main source of exposure to Dec-604 CB for northern pike and muskellunge originated from the effluent of Montreal's wastewater treatment plant. These results suggest that Dec-604 or Dec-604 CB sources is greater in a densely populated area, thus the importance to study their effect a possible endocrine disruptor in present and future studies.

2.5.2 Factors influencing *in vitro* D1 activity

We investigated the effect of several Dec-604 concentrations on the D1 activity in microsomes isolated from the liver of Montreal-breeding ring-billed gulls using a 75 min *in vitro* assay optimized for D1 activity determination following previous work from our laboratory (François *et al.*, 2016). No difference was observed in liver microsome activity for D1 between ring-billed gulls and Japanese quail, suggesting that both these species responded similarly (*in vitro*) to this exposure, which could presumably be observed for other avian species as well. We showed in the present study that exposure of ring-billed gull liver microsomes to 1.72 nM and 8.62 nM Dec-604 led to a significant increase in total D1 activity (sum of T₂ and T₃ formation rates), and a tendency to an increase in total D1 activity was also observed at 43.10 nM Dec-604.

A previous *in vitro* study from our laboratory on Montreal-breeding ring-billed gulls showed similar results for the fully brominated PBDE congener, BDE-209 (François and Verreault, 2018). In this study, *in vitro* exposure to an intermediate concentration of BDE-209 (1.0 nM) resulted in a significant increase (42%) in total D1 activity in gull liver microsomes, which was not observed at the lowest (0.5 nM) or highest concentrations (2.5 nM). The authors suggested these results represented a potential non-dose-related effect of the Dec-604 on D1 activity (François and Verreault, 2018), which could also be postulated in the present study. Moreover, in another study from our laboratory on this species, it was reported that liver concentrations of Σ_6 Dec (sum of Dec-602, chlordane plus, Dec-604 CB, Dec-603, and *syn*- and *anti*-DP) in ring-billed gull chicks positively correlated with liver mRNA levels of D1 (Técher *et al.*, 2018). The results from our study suggest that Dec-604 could interfere *in vitro* with the activity of D1 in the liver of gulls, thereby perturbing the regulation of the thyroid axis in this highly HFR-exposed gull population for which several thyroid-related effects have been reported. To our knowledge, these results are the first indications of an effect of Dec-604 on D1 (or other thyroid deiodinases) in any tissues and bird species.

A recent study using a rat pituitary tumor cell line (GH3) reported that four dechloranes, including Dec-604, disrupted the signaling pathways of thyroid hormone receptors (TR α and TR β) (Zhu *et al.*, 2022). These authors showed that although the binding affinity of Dec-604 to both TR α and TR β was significantly weaker compared to other dechloranes (DP, Dec-602, and Dec-603), its ability to inhibit TR-mediated luciferase reporter gene expression and GH3 cell proliferation was superior to Dec-602 and -603, but similar to DP (Zhu *et al.*, 2022). DP has also been reported to be a potential thyroid hormone disrupter in a study on zebrafish (*Danio rerio*) in which DP

exposure altered the regulatory pathways in the brain (Kang *et al.*, 2016). More specifically, up-regulation of estrogen receptor and aromatase genes was observed following DP exposure through gavage of adult male zebrafish, suggesting that regulation of steroid hormones was disrupted (Kang *et al.*, 2016). Therefore, Dec-604 should be included in the identification of thyroid disruption endpoints in future studies.

We found no evidence that Σ_{40} HFRs concentrations determined in the liver of ring-billed gulls (i.e., natural exposure) influenced their liver microsome total D1 activity or T_3 formation rates. In contrast, T_2 formation rates were significantly lower at greater liver Σ_{40} HFRs concentrations in gulls. The regulation of the active thyroid hormone, T_3 , depends mainly on its deactivation to T_2 by type III iodothyronine deiodinase (D3) (McNabb, 2006, 2007), but D1 can also remove iodine on both rings (Moreno *et al.*, 1994), therefore D1 can also carry out the functions of D3, i.e. T_3 deiodination (Litwack, 2018; Sagar *et al.*, 2008).

Few studies have reported the effects of chlorinated aromatic compounds on D3 or any other deiodinases. Specifically, out of the three isoforms investigated, only liver D3 mRNA levels were found to significantly decrease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following exposure of fertilized eggs in tanks containing 10 and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (water) semicarbazide (a decomposition product of azodicarbonamide used in food packaging) solution (Yue *et al.*, 2017). Furthermore, pentachlorophenol (PCP, used as pesticide and biocide) exposure at 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in 0.01% DMSO of zebrafish embryos resulted in a significant increase in whole-body T_3 levels and decreased T_4 levels. PCP exposure at 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ also resulted in increased mRNA expression of D3, which potentially explained the observed changes in thyroid hormone levels in these fish (Cheng *et al.*,

2015). Moreover, a previous study from our laboratory found that D3 mRNA levels in ring-billed gull chick liver negatively correlated with liver concentrations of lower-brominated PBDE congeners (e.g., di-, tri-, and tetra-BDEs) (Técher et al., 2018). Further investigation would be required to elucidate the relationships between chronic exposure to HFRs and perturbation of deiodinase activity such as D1 and D3 by the combination of specific activity assays and mRNA expression analysis for each isoform in ring-billed gulls. Recently, another enzyme was also reported as a potential thyroid-relevant target for chemical disruption, the iodotyrosine deiodinase (IYD). This enzyme is responsible for iodine recycling and has an important role in the homeostasis of thyroid hormone levels (Olker *et al.*, 2021). In the Olker et al., (2021) study, 84 chemicals including the flame retardant 3,3',5,5'-tetrabromobisphenol A inhibited IYD activity by more than 50% at 200 μ M using an *in vitro* assay. It cannot be disregarded that Dec-604 (or other HFRs) effect on IYD could also contribute to impair thyroid axis regulation in animals (Olker *et al.*, 2018) potentially including ring-billed gulls, and should be the subject of further investigation. However, several contaminants other than HFRs were shown to accumulate in the tissues of ring-billed gulls such as metals, rare earth elements and organophosphate esters (Brown, L. *et al.*, 2019; Kerric *et al.*, 2021), suggesting exposure to a complex mixture of compounds..

2.5.3 Biotransformation of Dec-604

In light of the D1 activity stimulation observed in ring-billed gull liver microsomes in the presence of several Dec-604 concentrations, the biotransformation of Dec-604 was further investigated using an *in vitro* biotransformation assay. Two putative debrominated products of Dec-604, BrDec-604, and Br₂Dec-604, were not detected in any liver microsome samples in the present *in vitro* assay. In the Shen et al. (2014) study, BrDec-604 (range: 430-3900 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ lipid weight) was

determined in the dorsal muscle lake trout and whitefish from Lake Ontario at lower concentrations than Dec-604 CB (10 000-60 000 pg.g⁻¹ lipid weight); yet, higher than for Dec-604 (63-1300 pg.g⁻¹ lipid weight). The authors concluded that these analogues were photodebromination products of both Dec-604 and Dec-604 CB when exposed to UV light (Shen *et al.*, 2014). Nevertheless, we found that Dec-604 CB: Dec-604 concentration ratios were greater in *activated* gull liver microsomes (with the cofactor DTT), suggesting potential enzyme-mediated depletion of Dec-604. However, these results were not corroborated by the levels of Dec-604 and Dec-604 CB that were not different between activated gull microsomes (9.94 ng.g⁻¹ and 0.26 ng.g⁻¹, respectively) and vehicle controls (10.40 ng.g⁻¹ and 0.21 ng.g⁻¹, respectively). However, because of our low small sample size ($n = 5$ males) and the absence of female samples from the assays, interpretation of these results should be made with caution. Furthermore, the levels of Dec-604 CB measured in miniature passive air samplers attached to the back of ring-billed gull were comparable to the minor PBDE congeners (Sorais *et al.*, 2020) and could be good evidence of the photodegradation of Dec-604 in air.

Enzyme-mediated debromination of PBDEs (e.g. BDE-99, BDE-203, BDE-209) in liver microsomes has been reported in selected fish species (Mizukawa *et al.*, 2021; Noyes, P. *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2011), including a few targeting deiodinases (Stapleton *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2006). A few avian studies have also reported debromination of PBDEs, mainly with BDE-209 (Leslie *et al.*, 2021; Van den Steen *et al.*, 2007). These studies found additional evidence that highly brominated PBDE debromination in the environment, such as BDE-209, leads to lower brominated congeners that are more toxic. Moreover, previous studies on Montreal-breeding ring-billed gulls showed no depletion of BDE-209 using similar *in vitro* biotransformation assays

based on liver microsomes that specifically targeted CYP using NADPH as a cofactor (Chabot-Giguère *et al.*, 2013) and D1 using DTT as a cofactor (François et Verreault, 2018). Collectively, these previous results on avian species as well as present results suggest that D1-mediated debromination of HFRs is compound- and/or species-specific.

2.6 Conclusions

Present findings showed an effect of Dec-604 on D1 in an *in vitro* assay at 1.72 and 8.62 nM of Dec-604, resulting in an increase in total D1 activity in ring-billed gull liver microsomes at these Dec-604 concentrations. However, the specific mechanism of action behind this D1 activity increase remains to be elucidated. Furthermore, a negative regression was found between T_2 formation rates and liver concentrations of Σ_{40} HFRs in ring-billed gulls. This suggests that chronic (natural) exposure to HFRs could play a role in the perturbation of thyroid functions through activity alteration of deiodinases including D1, but also potentially other deiodinases (e.g., D3). Moreover, enhanced formation of Dec-604 CB in ring-billed gull liver microsomes (as inferred from greater Dec-604 CB:Dec-604 concentration ratios) following a 75-min *in vitro* biotransformation assay optimized for D1 activity determination suggested that debromination of Dec-604 possibly took place, although to a minor extent. These results are consistent with a previous study from our laboratory showing that dechlorane concentrations (sum of *syn*- and *anti*-DP, chlordane plus, and Dec-602, -603, and -604 CB) were positively correlated with the mRNA levels of D1 in the liver of ring-billed gulls from this particular colony. However, the real exposure of these birds corresponds rather to a complex mixture of compounds. It is important to note that this element which is beyond our control is a confounding factor for our study which is focused on the effect of a single compound. Overall, the results of our study suggest a possible

disruption of thyroid hormone homeostasis mediated by Dec-604 exposure through perturbation of T₃ and T₂ formation by D1 using an *in vitro* assay. Hence, more research should be conducted on deiodinase-mediated (i.e., D1 but also D2, D3, and IYD) biotransformation capacity towards Dec-604 using environmentally relevant Dec-604 doses. Considering the growing number of reports of dechloranes in various environmental samples, the potentially disruptive effects of Dec-604 and other dechlorane-related compounds on the thyroid axis in birds should deserve greater scrutiny.

2.7 Acknowledgments

This study was funded primarily by the Canada Research Chair in Comparative Avian Toxicology (to J.V.). The scholarship of M.L. was partially funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) PURE CREATE network. We acknowledge the assistance of A. Kerric (Université du Québec à Montréal) for fieldwork, A. François (Université du Québec à Montréal) for assistance with HPLC analyses, J. Head (McGill Ecotoxicology Laboratory, McGill University) for donation of Japanese quail samples as well as L. Wang (Université du Québec à Montréal) for HFR analysis. The authors declare no conflict of interest.

2.8 Supporting information

Table 2.2. Mean (\pm standard error of the mean (SEM)) concentrations (ng.g^{-1} ww) of HFRs in liver of ring-billed gull female ($n = 9$) and males ($n = 9$) breeding in the Montreal area (QC, Canada) and their liver microsome D1 activity (T_3 and T_2 formation rate and total D1 activity) ($\text{pmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$) in control samples (no Dec-604 or vehicle added).

	Mean \pm SEM Female	Mean \pm SEM Male
$\Sigma_{35}\text{PBDE}^{\text{a}}$	149 \pm (45.8)	122 \pm (28.2)
Dec-604/BDE-183 ^b	4.22 \pm (1.71)	3.31 \pm (1.06)
Dec-604 CB	0.40 \pm (0.20)	0.29 \pm 0.07
$\Sigma_{40}\text{HFRs}^{\text{c}}$	154 \pm (46.09)	126 \pm (28.7)
D1 activity		
T_3 formation rate	2,112 \pm 248	2,021 \pm 223
T_2 formation rate	249 \pm 59.3	178 \pm 30.5
Total D1 activity ^d	2,401 \pm 281	2,314 \pm 231

^a Sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28/PBT, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, -138, -139, -140, -153, -154/BB-153, -171, -180, -183/Dec-604, -184, -191, -196, -197/-204, -201, -203, -205, -206, -207, -208, and -209.

^b Dechlorane-604 (Dec-604) co-eluted with BDE-183.

^c Sum of $\Sigma_{35}\text{PBDE}^{\text{a}}$, pentabromoethyl benzene (PBEB), hexabromobenzene (HBB), Dechlorane 604 Component B (Dec-604 CB), *syn*- and *anti*-Dechlorane plus (*syn*-DP and *anti*-DP).

^d Sum of T_3 and T_2 formation rates.

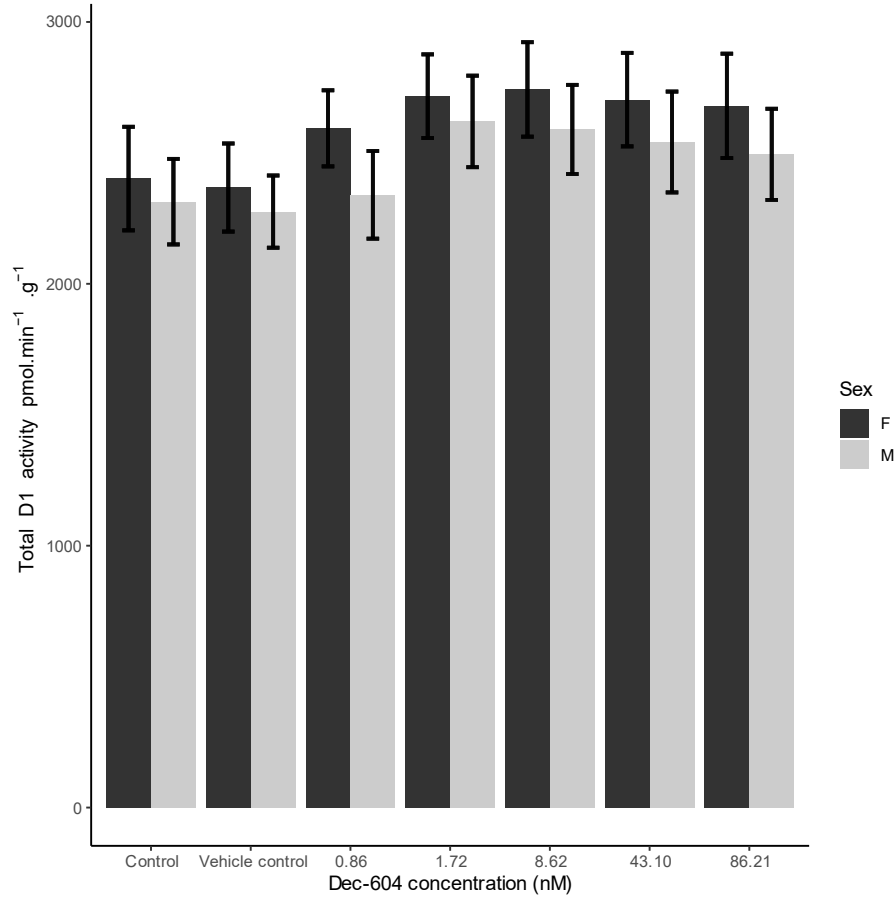


Figure 2.3. Total D1 activity (mean \pm SEM; pmol.min⁻¹.g⁻¹) determined in liver microsomes of female (F) ($n = 9$) and male (M) ($n = 9$) ring-billed gulls from Montreal area (QC, Canada) incubated with ¹²⁵I-T₄ for controls (0 nM of Dec-604), vehicle control (0 nM of Dec-604, 0.5% acetone) and five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone).

Table 2.3. Estimated Marginal Means (EMMs) (standard error (SE), degree of freedom (df), t statistic (*t*), p-value (*p*)) assessing differences between total D1 activity in liver microsomes of combined ring-billed gull males and females (*n* = 18) from the Montreal area (QC, Canada) incubated with ¹²⁵I-T₄ to five Dec-604 concentrations (0.86, 1.72, 8.62, 43.10, and 86.21 nM; 0.5% acetone) with the vehicle control (0 nM Dec-604; 0.5% acetone). EMMs were obtained from linear mixed models including bird ID as a random effect and assay concentrations of Dec-604 as explanatory variables (Model effect).

Parameter	Model effect	Comparison	Estimate	SE	df	<i>t</i>	<i>p</i>
Total D1 activity	Dec-604 concentrations (nM)	0 – 0.86	-145	109	85	-1.33	0.8
		0 – 1.72	-347	109	85	-3.18	0.02
		0 – 8.62	-344	109	85	-3.16	0.03
		0 – 43.10	-301	109	85	-2.76	0.07
		0 – 86.21	-265	109	85	-2.43	0.17
T ₃ formation rate	Dec-604 concentrations (nM)	0 – 0.86	-119	105	85	-1.14	0.9
		0 – 1.72	-303	105	85	-2.90	0.05
		0 – 8.62	-277	105	85	-2.65	0.1
		0 – 43.10	-236	105	85	-2.25	0.2
		0 – 86.21	-207	105	85	-1.98	0.4
T ₂ formation rate	Dec-604 concentrations (nM)	0 – 0.86	-45.1	20	85	-2.25	0.2
		0 – 1.72	-62.5	20	85	-3.12	0.03
		0 – 8.62	-58.9	20	85	-2.94	0.05
		0 – 43.10	-84.1	20	85	-4.20	0.001
		0 – 86.21	-73.0	20	85	-3.64	0.006

Table 2.4. Mean (\pm standard error of the means (SEM)) concentrations ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ww) of Dec-604 and Dec-604 CB in the *in vitro* biotransformation assay with male ring-billed gull liver microsomes (n = 5) incubated with cofactor DTT (activated) or not (vehicle control).

	Dec-604	Dec-604 CB
Vehicle controls	10.4 \pm (0.68)	0.21 \pm (0.03)
Activated microsomes	9.94 \pm (0.52)	0.26 \pm (0.02)

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce mémoire avait pour objectif de faire un premier pas dans l'étude des effets du Dec-604 sur l'activité de la déiodinase hépatique de type 1 chez le goéland à bec cerclé nichant dans la région de Montréal et qui est fortement exposé aux RFB. La présence du Dec-604 CB, un produit de débromation du Dec-604, dans les échantillons de foie, de plasma et de guano de goéland à bec cerclé est à éclaircir puisque l'alimentation et l'exposition par l'air ne semblent pas être à eux seuls responsables de celle-ci. Bien que très peu d'études se soient intéressées à la biotransformation du Dec-604, certaines ont mis en évidence une potentielle interaction avec la fonction thyroïdienne. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il pourrait exister une implication des déiodinases dans un processus de débromation, en raison des ressemblances entre sa structure et celle des hormones thyroïdiennes.

Dans un premier temps, ce projet avait pour but d'évaluer l'effet du Dec-604 sur l'activité de la D1. La quantification des produits de deiodination, T_3 et T_2 , a permis de mesurer l'activité enzymatique de la D1 en présence de cinq concentrations de Dec-604 et d'une concentration préalablement établie de T_4 . Tel qu'attendu, la présence du Dec-604 influençait significativement l'activité de la D1 en comparaison avec les contrôles. Cependant, contrairement aux attentes, un effet de stimulation de l'activité a été observé plutôt qu'une inhibition. Si ces résultats suggèrent que le Dec-604 peut perturber l'activité de la D1 *in vitro*, d'autres résultats précédents axés sur l'expression de gènes suggèrent qu'une exposition *in vivo* pourrait avoir des effets tels qu'une altération des niveaux de l'expression des gènes (niveaux d'ARNm) des deiodinases. Ces résultats sont en accord avec le potentiel de perturbation du système thyroïdien par les dechloranes suggérés par d'autres études portant sur des interactions avec les récepteurs à hormones thyroïdiennes. Ces résultats nous ont aussi permis d'établir un lien entre les données de biotransformation *in vitro* et les concentrations *in vivo* de retardateurs de flamme halogénés dans le foie des goélands à bec cerclé. Notre hypothèse était que les niveaux d'activité de la D1 mesurés au cours des essais d'exposition *in vitro* s'accorderaient avec les concentrations dans le foie des goélands à bec cerclé exposés naturellement dans leur habitat. Pour ce faire, les concentrations de retardateurs de flamme halogénés ont été utilisées comme variables dans des

modèles à effet mixtes pour évaluer leurs effets sur l'activité de la D1. Les modèles n'ont montré aucun effet des concentrations du Dec-604 sur l'activité de la D1 et les taux de formation de la T₃. À l'inverse, les taux de formation de la T₂ étaient significativement diminués par les concentrations hépatiques de retardateurs de flamme halogénés. Ce résultat suggère une relation entre l'exposition chronique dans l'environnement à ces derniers et la formation de la T₂. Les mécanismes derrière cette relation restent à élucider puisque d'autres enzymes de la famille des déiodinases telles que D2 et D3 peuvent être impliquées dans la déiodination de T₃ et rT₃ menant à la formation de T₂. Toutefois, dans la présente étude, le détail de l'exposition aux différents polluants reste sans aucun doute une sous-estimation de la réalité. En effet, de récentes études, incluant des données non publiées, sur cette même colonie ont montré une variété de polluants accumulés dans les tissus suggérant une forte exposition à un mélange complexe de composés (Brown, L. *et al.*, 2019; Kerric *et al.*, 2021).

Ensuite, le second objectif du projet était de vérifier si le Dec-604 subit le retrait de brome par la D1 pour former des produits de débromation tels que le Dec-604 CB à l'aide des essais de biotransformation *in vitro* avec des microsomes de foie de goéland à bec cerclé de la région de Montréal. La quantification des deux composés en présence et en absence du cofacteur de la D1 (DTT) a permis de comparer leurs concentrations et les ratios des concentrations du Dec-604 CB : Dec-604 en présence de microsomes activés ou non. La quantification des concentrations individuelles du Dec-604 et du Dec-604 CB dans les essais en comparaison au contrôle n'a pas indiqué de débromation significative. Toutefois, les ratios du Dec-604 CB : Dec-604 calculés pour chacun des cinq individus utilisés pour ce volet de l'étude ont montré des différences significatives. En effet, les ratios du Dec-604 CB : Dec-604 étaient significativement plus élevés en présence de microsomes activés comparativement aux contrôles. Une activité plus élevée semble donc permettre une plus grande débromation du Dec-604 en Dec-604 CB. Ce résultat pourrait confirmer notre hypothèse selon laquelle la D1 pourrait être associée à la débromation. Ce résultat s'ajoute à ceux de travaux précédents de notre laboratoire ayant montré que la présence du Dec-604 CB dans les échantillons de goéland à bec cerclé ne pouvait s'expliquer uniquement par l'alimentation ou l'exposition par l'air. Il est donc suggéré que la biotransformation du Dec-604 par l'organisme pourrait être responsable des concentrations de Dec-604 CB chez le goéland

à bec cerclé, du moins en partie puisque les résultats d'une autre étude de notre laboratoire suggèrent une photodégradation du Dec-604 dans l'air. D'autres travaux devront toutefois être menés afin de confirmer notre hypothèse puisque la taille de l'échantillon n'était pas suffisante (n=5, mâles seulement) pour affirmer que la débromation a bien eu lieu.

Ce projet a permis d'ouvrir la porte sur un polluant encore très peu étudié, mais omniprésent chez les goélands à bec cerclé de la région densément peuplée de Montréal. Toutefois, l'exposition réelle des oiseaux correspond plutôt à un mélange complexe de composés, il est important de noter que cet élément qui est hors de notre contrôle est un facteur confondant pour notre étude qui s'est concentré sur l'effet d'un seul composé. Le Dec-604 CB semble avoir le potentiel d'être un produit de débromation du Dec-604 catalysé par une deiodinase du foie chez cette espèce. Un tel effet de ce xénobiotique sur la D1, joueur clé dans la fonction thyroïdienne, pourrait en faire un perturbateur endocrinien important. La régulation des hormones thyroïdiennes est essentielle, car elles régulent la thermorégulation, le métabolisme, la croissance, le développement, le comportement et, chez les oiseaux, le moment de l'éclosion et de la mue des plumes (McNabb, 2007). La dérégulation des hormones thyroïdiennes causant des altérations des niveaux d'hormones T_4 , T_3 et T_2 pourrait provoquer différentes pathologies chez l'animal telles qu'un métabolisme de l'os altéré menant à une déminéralisation chez le goéland exposé ou encore une perturbation de sa reproduction mettant en péril la survie de cette espèce.

BIBLIOGRAPHIE

- Akortia, E., Okonkwo, J. O., Lupankwa, M., Osa, S. D., Daso, A. P., Olukunle, O. I. et Chaudhary, A. (2016). A review of sources, levels, and toxicity of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their transformation and transport in various environmental compartments. *Environmental reviews*, 24(3), 253-273.
- Ayala-Cabrera, J. F., Lacorte, S., Moyano, E. et Santos, F. J. (2021). Analysis of Dechlorane Plus and related compounds in gull eggs by GC-HRMS using a novel atmospheric pressure photoionization source. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-11.
- Bassett, J. D. et Williams, G. R. (2003). The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(8), 356-364.
- Bergman, Å., Rydén, A., Law, R. J., de Boer, J., Covaci, A., Alae, M., . . . Sakai, S. (2012). A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals. *Environment international*, 49, 57-82.
- Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J. et Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine reviews*, 23(1), 38-89.
- Bientinesi, M. et Petarca, L. (2009). Comparative environmental analysis of waste brominated plastic thermal treatments. *Waste Management*, 29(3), 1095-1102.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebæk, N. E. et Main, K. M. (2006). Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology*, 154(5), 599-611.
- Brousseau, P., Lefebvre, J. et Giroux, J.-F. (1996). Diet of ring-billed gull chicks in urban and non-urban colonies in Quebec. *Colonial Waterbirds*, 22-30.
- Brown, F. R., Whitehead, T. P., Park, J.-S., Metayer, C. et Petreas, M. X. (2014). Levels of non-polybrominated diphenyl ether brominated flame retardants in residential house dust samples and fire station dust samples in California. *Environmental research*, 135, 9-14.
- Brown, L., Rosabal, M., Sorais, M., Poirier, A., Widory, D. et Verreault, J. (2019). Habitat use strategy influences the tissue signature of trace elements including rare earth elements in an urban-adapted omnivorous bird. *Environmental research*, 168, 261-269.
- Burnham, K. P. et Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference : A practical information-theoretic approach* (Second éd.). New York : Springer.

- Caron-Beaudoin, É., Gentes, M.-L., Patenaude-Monette, M., Hélie, J.-F., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2013). Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the Ring-billed Gull (*Larus delawarensis*). *Canadian Journal of Zoology*, *91*(10), 689-697.
- Chabot-Giguère, B., Letcher, R. J. et Verreault, J. (2013). In vitro biotransformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and Dechlorane Plus flame retardants: a case study of ring-billed gull breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada. *Environment international*, *55*, 101-108.
- Chen, D., Letcher, R. J., Burgess, N. M., Champoux, L., Elliott, J. E., Hebert, C. E., . . . Wilson, L. (2012). Flame retardants in eggs of four gull species (*Laridae*) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada. *Environ Pollut*, *168*, 1-9. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.040
- Cheng, Y., Ekker, M. et Chan, H. M. (2015). Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, *112*, 7-14.
- Costa, L. G. et Giordano, G. (2011). Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology*, *32*(1), 9-24.
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M. A.-E., Ali, N., Law, R. J., Herzke, D. et de Wit, C. A. (2011). Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment international*, *37*(2), 532-556.
- Darnerud, P. O. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment international*, *29*(6), 841-853.
- Darnerud, P. O., Eriksen, G. S., Jóhannesson, T., Larsen, P. B. et Viluksela, M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental health perspectives*, *109*(suppl 1), 49-68.
- De La Torre, A., Alonso, M., Martínez, M., Sanz, P., Shen, L., Reiner, E., . . . Marigo, J. (2012). Dechlorane-related compounds in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from southeastern and southern coast of Brazil. *Environmental science & technology*, *46*(22), 12364-12372.
- de Wit, C., Herzke, D. et Vorkamp, K. (2010). Brominated flame retardants in the Arctic environment—trends and new candidates. *Science of the Total Environment*, *408*(15), 2885-2918.
- de Wit, C., Kierkegaard, A., Ricklund, N. et Sellström, U. (2010). Emerging brominated flame retardants in the environment. Dans *Brominated flame retardants* (p. 241-286). Springer.
- Desjardins, C. F., Mazerolle, M. J. et Verreault, J. (2019). Is the urban-adapted ring-billed gull a biovector for flame retardants? *Environmental pollution*, *244*, 109-117.

- Environment and Climate Change Canada. (2021). Non-Domestic Substances List. <http://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/default.asp?lang=En&n=8BD37498-1> (accessed february 2021).
- Environnement et Changement climatique Canada. (2021). Liste extérieure des substances. <http://www.ec.gc.ca/lcpe-cepa/default.asp?lang=En&n=8BD37498-1> (accès février 2021).
- Erratico, C. A., Moffatt, S. C. et Bandiera, S. M. (2011). Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes. *Toxicological Sciences*, 123(1), 37-47.
- Feiteiro, J., Mariana, M. et Cairrão, E. (2021). Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure. *Environmental Pollution*, 117475.
- Feng, C., Xu, Y., Zhao, G., Zha, J., Wu, F. et Wang, Z. (2012). Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 122, 28-35.
- Feo, M., Barón, E., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2012). Dechlorane Plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(9), 2625-2637.
- Fernie, K. J., Shutt, J. L., Letcher, R. J., Ritchie, I. J. et Bird, D. M. (2009). Environmentally relevant concentrations of DE-71 and HBCD alter eggshell thickness and reproductive success of American kestrels. *Environmental science & technology*, 43(6), 2124-2130.
- Fernie, K. J., Shutt, J. L., Letcher, R. J., Ritchie, J. I., Sullivan, K. et Bird, D. M. (2007). Changes in reproductive courtship behaviors of adult American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to environmentally relevant levels of the polybrominated diphenyl ether mixture, DE-71. *Toxicological sciences*, 102(1), 171-178.
- François, A., Técher, R., Houde, M., Spear, P. et Verreault, J. (2016). Relationships between polybrominated diphenyl ethers and transcription and activity of type 1 deiodinase in a gull highly exposed to flame retardants. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(9), 2215-2222.
- François, A. et Verreault, J. (2018). Interaction between deca-BDE and hepatic deiodinase in a highly PBDE-exposed bird. *Environmental research*, 163, 108-114.
- Friesema, E. C., Grueters, A., Biebermann, H., Krude, H., Von Moers, A., Reeser, M., . . . Kester, M. H. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *The Lancet*, 364(9443), 1435-1437.
- Gauthier, J. et Aubry, Y. (1995). *Les oiseaux nicheurs du Québec: Atlas des oiseaux nicheurs du Québec méridional*. Association québécoise des groupes d'ornithologues, Société québécoise de protection des oiseaux et le Service canadien de la faune, Environnement Canada, région du Québec.

- Gentes, M.-L., Letcher, R. J., Caron-Beaudoin, E. I. et Verreault, J. (2012). Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence River, Canada. *Environmental science & technology*, 46(17), 9735-9744.
- Gentes, M.-L., Mazerolle, M. J., Giroux, J.-F., Patenaude-Monette, M. et Verreault, J. (2015). Tracking the sources of polybrominated diphenyl ethers in birds: Foraging in waste management facilities results in higher DecaBDE exposure in males. *Environmental research*, 138, 361-371.
- Gereben, B. z., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., . . . Bianco, A. C. (2008). Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews*, 29(7), 898-938. doi: 10.1210/er.2008-0019
- Giroux, J.-F., Patenaude-Monette, M., Lagarde, F., Mousseau, P. et Racine, F. (2016). Changes in spring arrival date and timing of breeding of Ring-billed Gulls in southern Québec over four decades. *Avian Conservation and Ecology*, 11(1).
- Guerra, P., Fernie, K., Jiménez, B., Pacepavicius, G., Shen, L., Reiner, E., . . . Alaei, M. (2011). Dechlorane Plus and related compounds in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from Canada and Spain. *Environmental science & technology*, 45(4), 1284-1290.
- Guigueno, M. F. et Fernie, K. J. (2017). Birds and flame retardants: A review of the toxic effects on birds of historical and novel flame retardants. *Environmental research*, 154, 398-424.
- Guo, J., Simon, K., Romanak, K., Bowerman, W. et Venier, M. (2018). Accumulation of flame retardants in paired eggs and plasma of bald eagles. *Environmental Pollution*, 237, 499-507.
- Hou, R., Lin, L., Li, H., Liu, S., Xu, X., Xu, Y., . . . Wang, Z. (2021). Occurrence, bioaccumulation, fate, and risk assessment of novel brominated flame retardants (NBFRs) in aquatic environments—A critical review. *Water Research*, 198, 117168.
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y. et Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, 479, 48-56.
- Hsu, Y.-C., Arcega, R. A. D., Gou, Y.-Y., Tayo, L. L., Lin, Y.-H., Lin, S.-L. et Chao, H.-R. (2018). Levels of non-PBDE halogenated fire retardants and brominated dioxins and their toxicological effects in indoor environments—a review. *Aerosol and Air Quality Research*, 18(8), 2047-2063.
- Jia, H., Sun, Y., Liu, X., Yang, M., Wang, D., Qi, H., . . . Li, Y.-F. (2011). Concentration and bioaccumulation of dechlorane compounds in coastal environment of Northern China. *Environmental science & technology*, 45(7), 2613-2618.

- Jing, L., Sun, Y., Wang, Y., Liang, B., Chen, T., Zheng, D., . . . Shi, Z. (2019). Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Chemosphere*, *223*, 675-685.
- Kang, H., Moon, H.-B. et Choi, K. (2016). Toxicological responses following short-term exposure through gavage feeding or water-borne exposure to Dechlorane Plus in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *146*, 226-232.
- Kelly, B. C., Ikononou, M. G., Blair, J. D. et Gobas, F. A. (2008). Bioaccumulation behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Canadian Arctic marine food web. *Sci Total Environ*, *401*(1-3), 60-72. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.045
- Kerric, A., Okeme, J., Jantunen, L., Giroux, J.-F., Diamond, M. L. et Verreault, J. (2021). Spatial and temporal variations of halogenated flame retardants and organophosphate esters in landfill air: Potential linkages with gull exposure. *Environmental Pollution*, *271*, 116396.
- Klosterhaus, S. L., Stapleton, H. M., La Guardia, M. J. et Greig, D. J. (2012). Brominated and chlorinated flame retardants in San Francisco Bay sediments and wildlife. *Environment international*, *47*, 56-65.
- Köhrle, J. (2002). Iodothyronine deiodinases. *Methods in enzymology*, *347*, 125-167.
- Lavoué, J., Joseph, L., Knott, P., Davies, H., Labrèche, F., Clerc, F., . . . Kirkham, T. (2019). Expostats: a Bayesian toolkit to aid the interpretation of occupational exposure measurements. *Annals of work exposures and health*, *63*(3), 267-279.
- Law, R. J., Covaci, A., Harrad, S., Herzke, D., Abdallah, M. A.-E., Fernie, K., . . . Takigami, H. (2014). Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: status at the end of 2012. *Environment International*, *65*, 147-158.
- Leslie, H. A., Brandsma, S. H., Barber, J. L., Gabrielsen, G. W., Bersuder, P., Barry, J., . . . de Boer, J. (2021). Decabromodiphenylether trends in the European environment: bird eggs, sewage sludge and surficial sediments. *Science of the Total Environment*, *774*, 145174.
- Letcher, R. J., Martinson, S. C. et Fernie, K. J. (2014). Dietary exposure of American kestrels (*Falco sparverius*) to decabromodiphenyl ether (BDE-209) flame retardant: Uptake, distribution, debromination and cytochrome P450 enzyme induction. *Environment international*, *63*, 182-190.
- Li, W.-L., Ma, W.-L., Jia, H.-L., Hong, W.-J., Moon, H.-B., Nakata, H., . . . Kannan, K. (2016). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in surface soils across five Asian countries: levels, spatial distribution, and source contribution. *Environmental science & technology*, *50*(23), 12779-12788.
- Litwack, G. (2018). Micronutrients (Metals and Iodine). *Academic Press: Cambridge, MA, USA*, 591-643.

- Lorber, M. (2008). Exposure of Americans to polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 18(1), 2.
- Marteinson, S. C., Bird, D. M., Shutt, J. L., Letcher, R. J., Ritchie, I. J. et Fernie, K. J. (2010). Multi - generational effects of polybrominated diphenylethers exposure: Embryonic exposure of male American kestrels (*Falco sparverius*) to DE - 71 alters reproductive success and behaviors. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(8), 1740-1747.
- Marteinson, S. C., Drouillard, K. G. et Verreault, J. (2016). Short-term fasts increase levels of halogenated flame retardants in tissues of a wild incubating bird. *Environmental research*, 146, 73-84.
- MatWeb. (2009). *Material safety data sheet: Molykote® AS-810 grease*. Midland, MI : Dow Corning Corporation.
- Mazerolle, M. J. (2020). *AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c)*. Récupéré de <https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg>
- McDonald, T. A. (2002). A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere*, 46(5), 745-755.
- McKernan, M. A., Rattner, B. A., Hale, R. C. et Ottinger, M. A. (2009). Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (de - 71) in chicken (*Gallus gallus*), mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchlings. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(5), 1007-1017.
- McNabb, F. A. (2006). Avian thyroid development and adaptive plasticity. *General and comparative endocrinology*, 147(2), 93-101.
- McNabb, F. A. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in birds and its role in bird development and reproduction. *Critical reviews in toxicology*, 37(1-2), 163-193.
- Mizukawa, K., Yamada, T., Hirai, Y. et Takada, H. (2021). Environmental factors in debromination activity of polybrominated diphenyl ethers by hepatic microsomes of freshwater fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(1), 326-335.
- Moreno, M., Berry, M. J., Horst, C., Thoma, R., Goglia, F., Harney, J. W., . . . Visser, T. J. (1994). Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS letters*, 344(2-3), 143-146.
- Mortensen, Å.-K., Verreault, J., François, A., Houde, M., Giraud, M., Dam, M. et Jenssen, B. M. (2021). Flame retardants and their associations with thyroid hormone-related variables in northern fulmars from the Faroe Islands. *Science of The Total Environment*, 150506.

- Noyes, P., Kelly, S., Mitchelmore, C. et Stapleton, H. (2010). Characterizing the in vitro hepatic biotransformation of the flame retardant BDE 99 by common carp. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 142-150.
- Noyes, P. D., Lema, S. C., Macaulay, L. J., Douglas, N. K. et Stapleton, H. M. (2013). Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environ Sci Technol*, 47(17), 10012-10021. doi: 10.1021/es402650x
- Olker, J. H., Haselman, J. T., Kosian, P. A., Donnay, K. G., Korte, J. J., Blanksma, C., . . . Degitz, S. J. (2018). Evaluating iodide recycling inhibition as a novel molecular initiating event for thyroid axis disruption in amphibians. *Toxicological Sciences*, 166(2), 318-331.
- Olker, J. H., Korte, J. J., Denny, J. S., Haselman, J. T., Hartig, P. C., Cardon, M. C., . . . Degitz, S. J. (2021). In vitro screening for chemical inhibition of the iodide recycling enzyme, iodotyrosine deiodinase. *Toxicology in Vitro*, 71, 105073.
- OxyChem. (2007). *Dechlorane Plus manual: Disponible en ligne* (http://www.oxy.com/OurBusinesses/Chemicals/Products/Documents/dechloraneplus/dechlorane_plus.pdf) (Consultée le 16 juillet 2019). Récupéré de http://www.oxy.com/OurBusinesses/Chemicals/Products/Documents/dechloraneplus/dechlorane_plus.pdf
- Peig, J. et Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. et R Core Team. (2021). *{nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. Récupéré de <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Plourde Pellerin, S., Moreau, R., Letcher, R. J. et Verreault, J. (2013). Is the bone tissue of ring-billed gulls breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada, impacted by halogenated flame retardant exposure? *Chemosphere*, 93(10), 2333-2340.
- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. Récupéré de <https://www.R-project.org/>
- Ren, N., Sverko, E., Li, Y.-F., Zhang, Z., Harner, T., Wang, D., . . . McCarry, B. E. (2008). Levels and Isomer Profiles of Dechlorane Plus in Chinese Air. *Environmental Science & Technology*, 42(17), 6476-6480. doi: 10.1021/es800479c
- Roberts, S. C., Noyes, P. D., Gallagher, E. P. et Stapleton, H. M. (2011). Species-specific differences and structure– activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species. *Environmental science & technology*, 45(5), 1999-2005.

- Ross, P. S., Couillard, C. M., Ikonomidou, M. G., Johannessen, S. C., Lebeuf, M., Macdonald, R. W. et Tomy, G. T. (2009). Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals. *Marine pollution bulletin*, 58(1), 7-10.
- Routti, H., Helgason, L. B., Arukwe, A., Wolkers, H., Heimstad, E. S., Harju, M., . . . Gabrielsen, G. W. (2013). Effect of reduced food intake on toxicokinetics of halogenated organic contaminants in herring gull (*Larus argentatus*) chicks. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(1), 156-164.
- Sagar, G. V., Gereben, B., Callebaut, I., Mornon, J.-P., Zeöld, A., Curcio-Morelli, C., . . . Larsen, P. R. (2008). The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Molecular endocrinology*, 22(6), 1382-1393.
- Sarkar, D., Chowdhury, J. P. et Singh, S. K. (2016). Effect of polybrominated diphenyl ether (BDE-209) on testicular steroidogenesis and spermatogenesis through altered thyroid status in adult mice. *Gen Comp Endocrinol*, 239, 50-61. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.11.009
- Schechter, A., Colacino, J., Patel, K., Kannan, K., Yun, S. H., Haffner, D., . . . Birnbaum, L. (2010). Polybrominated diphenyl ether levels in foodstuffs collected from three locations from the United States. *Toxicology and applied pharmacology*, 243(2), 217-224.
- Sheikh, I. A. et Beg, M. A. (2020). Structural studies on the endocrine-disrupting role of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in thyroid diseases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(30), 37866-37876.
- Shen, L., Jobst, K. J., Reiner, E. J., Helm, P. A., McCrindle, R., Taguchi, V. Y., . . . Brindle, I. D. (2014). Identification and occurrence of analogues of dechlorane 604 in Lake Ontario sediment and their accumulation in fish. *Environ Sci Technol*, 48(19), 11170-11177. doi: 10.1021/es503089c
- Shen, L., Reiner, E. J., Helm, P. A., Marvin, C. H., Hill, B., Zhang, X., . . . Brindle, I. D. (2011). Historic trends of Dechloranes 602, 603, 604, Dechlorane Plus and other norbornene derivatives and their bioaccumulation potential in Lake Ontario. *Environmental science & technology*, 45(8), 3333-3340.
- Shen, L., Reiner, E. J., MacPherson, K. A., Kolic, T. M., Sverko, E., Helm, P. A., . . . Marvin, C. H. (2010). Identification and screening analysis of halogenated norbornene flame retardants in the Laurentian Great Lakes: Dechloranes 602, 603, and 604. *Environmental science & technology*, 44(2), 760-766.
- Shunthirasingham, C., Alexandrou, N., Brice, K. A., Dryfhout-Clark, H., Su, K., Shin, C., . . . Hung, H. (2018). Temporal trends of halogenated flame retardants in the atmosphere of the Canadian Great Lakes Basin (2005–2014). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(3), 469-479.
- Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V., Michaud, R., Zbinden, D. et Verreault, J. (2019). Associations between organohalogen exposure and thyroid-and steroid-related gene responses in St. Lawrence Estuary belugas and minke whales. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 174-184.

- Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V. et Verreault, J. (2017). Temporal trends of PBDEs and emerging flame retardants in belugas from the St. Lawrence Estuary (Canada) and comparisons with minke whales and Canadian Arctic belugas. *Environmental research*, 156, 494-504.
- Söderström, G., Sellström, U., de Wit, C. A. et Tysklind, M. (2004). Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209). *Environmental science & technology*, 38(1), 127-132.
- Sorais, M., Mazerolle, M. J., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2020). Landfills represent significant atmospheric sources of exposure to halogenated flame retardants for urban-adapted gulls. *Environment international*, 135, 105387.
- Sorais, M., Spiegel, O., Mazerolle, M. J., Giroux, J.-F. et Verreault, J. (2021). Gulls foraging in landfills: Does atmospheric exposure to halogenated flame retardants result in bioaccumulation? *Environment International*, 147, 106369.
- Stapleton, H. M., Alaei, M., Letcher, R. J. et Baker, J. E. (2004). Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure. *Environmental Science & Technology*, 38(1), 112-119.
- Stapleton, H. M., Allen, J. G., Kelly, S. M., Konstantinov, A., Klosterhaus, S., Watkins, D., . . . Webster, T. F. (2008). Alternate and new brominated flame retardants detected in US house dust. *Environmental science & technology*, 42(18), 6910-6916.
- Stapleton, H. M., Brazil, B., Holbrook, R. D., Mitchelmore, C. L., Benedict, R., Konstantinov, A. et Potter, D. (2006). In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental science & technology*, 40(15), 4653-4658.
- Sverko, E., Tomy, G. T., Reiner, E. J., Li, Y.-F., McCarry, B. E., Arnot, J. A., . . . Hites, R. A. (2011). Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review. *Environmental Science & Technology*, 45(12), 5088-5098.
- Tao, W., Tian, J., Xu, T., Xu, L., Xie, H. Q., Zhou, Z., . . . Chen, Y. (2019). Metabolic profiling study on potential toxicity in male mice treated with Dechlorane 602 using UHPLC-ESI-IT-TOF-MS. *Environmental Pollution*, 246, 141-147.
- Técher, R., Houde, M. et Verreault, J. (2016). Associations between organohalogen concentrations and transcription of thyroid-related genes in a highly contaminated gull population. *Science of the Total Environment*, 545, 289-298.
- Técher, R., Houde, M. et Verreault, J. (2018). Changes in thyroid axis responses in two ring-billed gull sub-populations differentially exposed to halogenated flame retardants. *Chemosphere*, 211, 844-854.

- UNEP. (2017). *Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its In: Proceedings of the twelfth meeting Stockholm Convention.*
- UNEP. (2021). *Technical work: consideration of draft risk profiles: Dechlorane Plus of the Persistent Organic Pollutants Review Committee, Item 4 (b) (i) of the provisional agenda of the seventeenth meeting Stockholm Convention.*
- Van den Steen, E., Covaci, A., Jaspers, V., Dauwe, T., Voorspoels, S., Eens, M. et Pinxten, R. (2007). Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environmental Pollution*, 148(2), 648-653.
- Verreault, J., Letcher, R. J., Gentes, M.-L. et Braune, B. M. (2018). Unusually high Deca-BDE concentrations and new flame retardants in a Canadian Arctic top predator, the glaucous gull. *Science of the Total Environment*, 639, 977-987.
- Wang, P., Zhang, Q., Zhang, H., Wang, T., Sun, H., Zheng, S., . . . Jiang, G. (2016). Sources and environmental behaviors of dechlorane plus and related compounds—a review. *Environment international*, 88, 206-220.
- Wang, S., Romanak, K. A., Hendryx, M., Salamova, A. et Venier, M. (2019). Association between thyroid function and exposures to brominated and organophosphate flame retardants in rural central Appalachia. *Environmental science & technology*, 54(1), 325-334.
- Wang, S., Romanak, K. A., Hendryx, M., Salamova, A. et Venier, M. (2020). Association between thyroid function and exposures to brominated and organophosphate flame retardants in rural Central Appalachia. *Environmental science & technology*, 54(1), 325-334.
- Wingfield, J. (1990). Interrelationships of androgens, aggression, and mating systems. *Endocrinology of birds: molecular to behavioral. Japanese Scientific Societies Press, Tokyo*, 187-205.
- Wu, B., Liu, S., Guo, X., Zhang, Y., Zhang, X., Li, M. et Cheng, S. (2012). Responses of mouse liver to dechlorane plus exposure by integrative transcriptomic and metabonomic studies. *Environmental science & technology*, 46(19), 10758-10764.
- Yang, R., Wei, H., Guo, J., McLeod, C., Li, A. et Sturchio, N. C. (2011). Historically and currently used dechloranes in the sediments of the Great Lakes. *Environmental science & technology*, 45(12), 5156-5163.
- Yu, L., Han, Z. et Liu, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and comparative endocrinology*, 219, 64-73.
- Yue, Z., Yu, M., Zhang, X., Dong, Y., Tian, H., Wang, W. et Ru, S. (2017). Semicarbazide-induced thyroid disruption in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and its potential mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 131-140.

Zacs, D., Ikkere, L. et Bartkevics, V. (2018). Emerging brominated flame retardants and dechlorane-related compounds in European eels (*Anguilla anguilla*) from Latvian lakes. *Chemosphere*, 197, 680-690.

Zhu, J., Zhao, L. et Guo, L. (2022). Dechloranes exhibit binding potency and activity to thyroid hormone receptors. *Journal of Environmental Sciences*, 112, 16-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.030>

Zuiderveen, E. A., Slootweg, J. C. et de Boer, J. (2020). Novel brominated flame retardants-A review of their occurrence in indoor air, dust, consumer goods and food. *Chemosphere*, 255, 126816.