

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LES POLLUANTS ORGANOHALOGÉNÉS D'INTÉRÊT ÉMERGENT :
BIOTRANSFORMATION CHEZ UNE ESPÈCE BIOINDICATRICE DU FLEUVE
SAINT-LAURENT, LE GOÉLAND À BEC CERCLÉ (*LARUS DELAWARENSIS*)

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
BERNICE CHABOT-GIGUÈRE

FÉVRIER 2013

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.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Ce travail de recherche présente, dans son intégralité, le mémoire de maîtrise déposé en février 2013 au département des sciences biologiques de l'Université du Québec à Montréal comme exigence partielle de la maîtrise en biologie.

Le but du présent mémoire fut d'élucider le potentiel de biotransformation de deux retardateurs de flamme organohalogénés d'utilisation courante, mais d'intérêt grandissant, soit le BDE-209 et le Déchlorane Plus. Le choix du sujet reflète bien l'intérêt et l'actualité scientifique entourant la présence de contaminants de synthèse dans les milieux naturels et plus précisément, dans les écosystèmes aquatiques qui, historiquement, représentent des puits invariables à la pollution d'origine anthropique. Ainsi, pour illustrer le potentiel de biotransformation de ces produits au sein d'un organisme vivant, nous avons eu recours au Goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant à l'île Deslauriers, située à la pointe est de l'île de Montréal dans le fleuve Saint-Laurent. En effet, l'état de la situation entourant la présence de ces produits et leur devenir dans le fleuve Saint-Laurent, mais surtout au sein d'espèces y habitant ou y nichant était encore à parfaire. Également, le goéland à bec cerclé s'avère être une espèce particulièrement intéressante en raison des concentrations remarquables de ces composés qui ont été récemment relevées dans leurs tissus. Nous espérons ainsi avoir contribué à mettre en lumière une partie du casse-tête scientifique relevant de la susceptibilité métabolique du BDE-209 et des isomères du Déchlorane Plus (*syn-* et *anti-DP*) chez une espèce aviaire bioindicatrice du milieu.

Ce mémoire se divise donc en quatre parties 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 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 a été soumis à la revue *Environment International*. Ce projet fait partie intégrante de la Chaire de recherche du Canada en toxicologie comparée des espèces aviaires dirigée également par Jonathan Verreault.

Je tiens donc à remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Jonathan Verreault, pour ses nombreux conseils avisés, pour ses encouragements lors de périodes difficiles et pour son aide de façon générale. Il aura su diriger, mettre ses connaissances et son expérience scientifique et professionnelle au service de son groupe de recherche afin de nous faire avancer plus loin dans nos démarches académiques et dans notre réflexion scientifique. Je le remercie également de m'avoir offert ma première expérience de recherche et de m'avoir permis de participer à un tout nouveau projet ainsi qu'au démarrage d'une équipe de recherche.

Je tiens également à remercier mes collègues qui ont participé avec moi à la collecte d'échantillons sur le terrain pour la période 2010 soit, Marie-Line Gentes et Élyse Caron-Beaudoin. Marie-Line aura su nous démontrer son expérience sur le terrain et aura partagé ici et là, nombreux savoirs et anecdotes qui feront désormais partie de mon bagage. Quant à Élyse, ma complice depuis le début du baccalauréat, sa présence, son soutien et son amitié auront marqué et enrichi cette période d'activités intenses. On ne peut aussi passer sous silence la contribution des deux techniciens de terrain, Francis St-Pierre et Mathieu Tremblay, pour l'organisation logistique du terrain et pour leur aide à la collecte des spécimens.

Un remerciement tout spécial à Vicky Doré, technicienne au laboratoire de Jonathan Verreault, pour ses connaissances précieuses en chimie ainsi qu'à tout ce qui a trait au bon fonctionnement et à l'organisation au laboratoire. Mais surtout, Vicky aura été une complice, un sourire et une oreille au laboratoire dans un moment où j'étais la seule à occuper l'endroit et où l'on pouvait vite s'y sentir seule. Je tiens aussi à souligner le plaisir que j'aurai eu à côtoyer Stéphanie Pellerin, Cynthia Franci et Veronica Aponte, collègues au sein du groupe de recherche.

Il est également important de souligner le travail effectué par Shaogang Chu, technicien au *Centre national de la recherche faunique* (CNRF) d'Ottawa ainsi que la contribution de Robert J. Letcher, chercheur scientifique au CNRF, pour la réalisation, dans

leur laboratoire, des analyses de contaminants dans les foies de goéland à bec cerclé et de l'analyse des fractions résultant de l'essai de biotransformation *in vitro*.

Finalement, il n'est pas à sous-estimer le soutien tous azimuts et les nombreux encouragements de ma famille et de mes amis qui m'auront insufflé la force et la persévérance requise pour mener à bien ce projet. Je suis aussi très reconnaissante envers Tristan Ouimet Savard, mon amoureux, pour m'avoir accompagnée dans cette démarche, m'ayant soutenue et encouragée tout au long de cette aventure. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	II
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	IX
RESUME	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ETAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Les retardateurs de flamme: généralités	4
1.2 Les PBDE	5
1.3 Déchlorane Plus	10
1.4 Biotransformation des contaminants organohalogénés	13
1.4.1 Biotransformation des PBDE et du DP.....	14
1.5. Goéland à bec cerclé: justification de l'espèce à l'étude.....	19
CHAPITRE II	
IN VITRO BIOTRANSFORMATION OF DECA-BROMODIPHENYL 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.....	22
Abstract.....	23
2.1 Introduction	24
2.2 Materials and methods.....	27
2.2.1 Sample collection.....	27
2.2.2 Hepatic microsome preparation	27
2.2.3 Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity measurement	28
2.2.4 Preparation of BDE-209 and Dechlorane-Plus mixtures	29
2.2.5 In vitro biotransformation assay	30
2.2.6 Chemicals analysis.....	30

2.2.7	Data treatment.....	31
2.3	Results	33
2.3.1	Concentrations of PBDEs and DPs in liver	33
2.3.2	Hepatic EROD activity	35
2.3.3	In vitro depletion of PBDEs.....	36
2.3.4	In vitro depletion of DPs.....	38
2.4	Discussion.....	39
2.4.1	BDE-209 and DP concentrations in liver.....	39
2.4.2	BDE-209 debromination products in liver.....	39
2.4.3	In vitro biotransformation of BDE-209	40
2.4.4	In vitro biotransformation of DP.....	43
2.5	Conclusion and future work	45
	Acknowledgements.....	46
	CONCLUSION.....	47
	REFERENCES.....	51

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1. Structure chimique comparée des PBDE et BPC.....	5
1.2. Réaction Diels-Alder du 1,5-cyclooctadiène avec l'hexachlorocyclopentadiène (2:1) générant les isomères <i>syn</i> - et <i>anti</i> -DP. Tiré de Sverko et al. (2011).	10
2.1. Relationship between concentrations (log-transformed ng/g ww) of BDE-209 and the sum of hepta-, octa- and nona-brominated PBDEs in liver of male RBGUs (n=9) ($y = 0.73x + 0.75$; $r^2 = 0.86$; $p = 0.0003$).	34
2.2. Concentrations ratios (ng \pm S.E.) of BDE-15, -153 and -209 determined in test and control tubes (in triplicates) in the hepatic microsomal <i>in vitro</i> assay of male RBGUs (n=9). RBGUs were randomly selected within each of the three EROD activity groups (low, medium and high; section 2.2.3).	36
2.3. Mean depletion of BDE-15 (\pm S.E.) based on a hepatic microsomal <i>in vitro</i> biotransformation assay with male RBGU (n=9). RBGUs were randomly selected within each of the three EROD activity groups (low, medium and high).	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Composition générale des principales formulations commerciales de PBDE. Tiré de : de Wit. (2002)	6
II. Mean (\pm S.E.) and data range of lipid content and concentrations (ng/g ww) of PBDE congeners (sums or individual congeners) and DP isomers determined in liver of male RBGUs (n=9) nesting on Deslauriers Island in the St-Lawrence River, downstream from Montreal (QC, Canada). Partial data from Gentes <i>et al.</i> (2012)	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

BFR	Retardateur de flamme bromé (<i>Brominated flame retardant</i>)
BPC	Biphényle polychloré
CYP	Cytochrome P450
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
Déca-BDE	Décabromodiphényléther
DP	Déchlorane Plus
EROD	Éthoxyrésorufin-O-dééthylase
FR	Retardateur de flamme (<i>Flame retardant</i>)
GBC	Goéland à bec cerclé
K _{oe}	Coefficient de partition octanol-eau
Octa-BDE	Octabromodiphényléther
PBDE	Polybromodiphényléther
Penta-BDE	Pentabromodiphényléther
POP	Polluant organique persistant
RBGU	Ring-billed gull (Goéland à bec cerclé)
UV	Ultra-violet

RÉSUMÉ

L'utilisation massive des retardateurs de flamme organohalogénés dans les produits manufacturés se solde, à ce jour, par une dispersion importante de ces composés dans l'environnement et par leur accumulation au sein des espèces aviaires notamment. À cet effet, il fut mesuré les plus fortes concentrations du congénère BDE-209 (composante principale du mélange Déca-BDE) couplé à une forte détection des isomères du Déchlorane Plus (*syn*- et *anti*-DP) dans les tissus de goéland à bec cerclé (GBC) nichant dans le fleuve Saint-Laurent, en aval de Montréal. En raison de leur forte charge en halogène et leur poids moléculaire important, le BDE-209 et le DP ont été considérés comme étant peu biodisponibles et très stables d'un point de vue physicochimique. Or, en ce qui a trait au BDE-209, plusieurs produits de débromination ont également été quantifiés dans ces mêmes tissus, mais leurs sources restent encore ambiguës. Par ce travail de recherche, nous avons donc tenté de vérifier l'hypothèse proposant que le BDE-209 et les isomères du DP représentent de bons substrats à l'action des enzymes de biotransformation isolées des microsomes hépatiques de GBC, résultant ainsi en une série de produits déhalogénés. Cette étude a donc pour but d'élucider le potentiel de biotransformation du BDE-209 et des deux isomères du DP à l'aide d'un essai de biotransformation *in vitro* (90 min) utilisant des microsomes hépatiques de GBC naturellement exposés, et ce, en les comparant à un congénère métabolisable (BDE-15) et à un autre étant résistant à la dégradation enzymatique (BDE-153). Basé sur un gradient d'activité EROD hépatique (faible, moyen et élevé), les oiseaux ayant une activité EROD moyenne ont démontré une diminution significative d'environ 20 % du BDE-15 alors qu'aucune dégradation significative n'a été obtenue pour le BDE-153, -209 et pour les isomères du DP. Également, le pourcentage de dégradation du BDE-15 entre les groupes d'activité EROD « faible » et « moyen » a varié d'un peu plus de 10 % laissant entrevoir qu'une certaine induction enzymatique serait favorable aux fins de la biotransformation de ce congénère. En somme, le présent travail ne permet pas d'expliquer la présence des produits de débromination du BDE-209 dans les tissus du GBC étant donné l'absence de biotransformation observée lors de l'essai *in vitro*. Ces produits pourraient toutefois avoir été absorbés par leur alimentation et/ou leur environnement quoique l'on ne puisse exclure que des processus métaboliques affectant l'intégrité moléculaire du BDE-209 aient véritablement lieu chez le GBC. Quant aux isomères du DP, il semble qu'ils ne soient pas susceptibles à la biotransformation dans le cadre du design expérimental réalisé.

Mots-clés : Retardateur de flamme halogéné, polybromodiphényléther (PBDE), Déchlorane Plus (DP), oiseau, biotransformation *in vitro*, microsomes hépatiques

INTRODUCTION

La présence dans la biosphère de produits chimiques persistants produits par l'Homme n'est pas un problème nouveau en 2012. En effet, dû à une industrialisation marquée et une croissance de l'industrie chimique florissante, plusieurs substances chimiques ont été commercialisées dans le monde sans toutefois que des études sérieuses et indépendantes aient pu garantir l'innocuité de leur utilisation. Plusieurs d'entre eux ont depuis pénétré dans l'environnement et leur détection dans les écosystèmes aquatiques abonde. Mentionnons, par exemple, le cas de certains produits tristement célèbres comme les biphényles polychlorés (BPC) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) qui soulevèrent, dans les années 1970-1980, de nombreux mouvements écologistes et citoyens à la suite de recherches scientifiques qui démontrèrent que ces substances étaient persistantes dans l'environnement et qu'elles avaient un potentiel de bioaccumulation et de toxicité pour la faune et les humains.

Depuis, de nombreuses études de biosurveillance des milieux aquatiques (faune, eau, sédiments, etc.) ont été entreprises et sont encore en vigueur aujourd'hui dans le but de vérifier l'évolution des niveaux de ces substances dans l'écosystème aquicole. Ainsi, on observe une tendance à la baisse des niveaux de ces contaminants, mais on observe également l'apparition d'une nouvelle classe de polluants environnementaux encore jusqu'à récemment non réglementés : les retardateurs de flammes organohalogénés (FR). Bien que leur dessein originel respectable soit de diminuer les points d'ignition de produits manufacturiers tels les produits électriques, électroniques et les biens domestiques, on les décèle aujourd'hui dans les différentes sphères de l'environnement, notamment dans les biomes aquatiques (Costa *et al.*, 2008; de Wit, 2002; Hites, 2004).

À cet égard, les polybromodiphényléthers (PBDE) appartenant à la classe des retardateurs de flamme bromés (BFR) suscitent l'intérêt des chercheurs en raison de similitudes importantes (structure moléculaire) avec les BPC et de leur concentration grandissante dans l'environnement ainsi qu'au sein des organismes vivants, dont les humains (présent notamment dans le lait maternel des femmes nord-américaines et européennes)

(Santé Canada, 2009). Néanmoins, deux formulations commerciales des PBDE soient le Penta-BDE et l'Octa-BDE sont désormais bannis et inscrit à la liste des polluants organiques persistants (POP) de la Convention de Stockholm, à Genève (Convention de Stockholm, 2009). En effet, un nombre croissant d'études ayant mis à jour leur dispersion généralisée dans la biosphère en plus de démontrer le potentiel toxique de certains congénères présents dans ces mélanges techniques a mené à ces mesures législatives (Darnerud *et al.*, 2001; Hakk et Letcher, 2003).

Au moment de l'écriture de ce mémoire, le statut du dernier mélange technique des PBDE, le Déca-BDE, avait été révisé. En 2006, le premier dépôt de règlement n'englobait pas le Déca-BDE, le plus bromé et le plus utilisé des mélanges des BFR sur le marché. En raison de ses propriétés physicochimiques, le principal congénère de ce mélange technique, le BDE-209, avait été qualifié de stable dans l'environnement, insoluble dans l'eau et peu susceptible à l'absorption par les organismes vivants entre autres en raison de son poids moléculaire important. Or, une fois de plus, il fut démontré le contraire. Le BDE-209 serait sensible à la dégradation par des processus naturels (rayons ultra-violet [UV] et action microbienne dans les sols) favorisant l'apparition de molécules de plus faible poids moléculaire dérivées de la molécule mère (débromination) (He, Robrock et Alvarez-Cohen, 2006; Soderstrom *et al.*, 2004). D'autres ont aussi démontré que le BDE-209 pouvait être absorbé par le tractus gastro-intestinal d'organismes vivants malgré son large poids moléculaire et qu'il pouvait même y être débrominé par des processus métaboliques encore à déterminer (Stapleton *et al.*, 2004; Van den Steen *et al.*, 2007). De plus, bien qu'il soit qualifié d'insoluble dans l'eau, cela n'a pas empêché le BDE-209 de s'accumuler et de former de larges réservoirs dans les milieux aquatiques, principalement adsorbé aux particules organiques en suspension et dans les sédiments. Le gouvernement fédéral canadien a donc récemment revu sa position sur le Déca-BDE et a proposé d'arrêter toute utilisation et importation de ce produit d'ici la fin de 2013.

En parallèle, le Déchlorane Plus (DP) est produit depuis les années 1960, mais sa production s'est récemment accélérée et est à ce jour, encore non réglementée. En effet, l'industrie chimique pressant les futures réglementations à l'égard du Déca-BDE s'est

rapidement retournée vers cette alternative. Le DP a même été suggéré comme remplacement du Déca-BDE par la Commission européenne. Toutefois, un nombre restreint d'études ont examiné le potentiel de bioaccumulation, de biotransformation et de toxicité de ce retardateur de flamme chloré bien qu'il soit présent depuis plusieurs années sur le marché. Avec les mesures restrictives affectant le Déca-BDE d'ici 2013, cette production verra vraisemblablement son tonnage augmenter davantage.

Compte tenu de ce qui précède, il est alors impératif d'acquérir de l'information sur divers plans reliés à la présence établie du Déca-BDE et du DP dans l'environnement (sources, toxicocinétique, toxicité, etc.) afin de cerner leur devenir au sein d'organismes vivants chez qui des effets délétères pourraient se manifester. Cette étude s'inscrit donc dans cette démarche en tentant de mettre au clair le potentiel de biotransformation de ces deux retardateurs de flamme, et ce, pour une espèce représentative des milieux aquatiques québécois : le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*). En effet, la problématique qui nous apparaît est double puisque d'une part, peu d'information existe globalement sur la biotransformation des composés organohalogénés chez les oiseaux et d'autre part, que peu d'études ont examiné la situation des FR dans le fleuve Saint-Laurent contrairement à la situation dans les Grands Lacs. Il est à noter que le fleuve Saint-Laurent et ses tributaires accueillent à eux seuls 80 % de la population québécoise dont 50 % tirent leur eau potable de ces cours d'eau (MDDEP, 2002). Les réservoirs terrestres et aquatiques grandissants de BDE-209 et l'utilisation croissante d'un composé alternatif au Déca-BDE, le DP, doivent donc être examinés et suivis de près étant donné l'importance économique, récréative, mais surtout de santé publique que représentent ces plans d'eaux. En définitive, le projet mis de l'avant est d'importance environnementale puisqu'il apportera des informations judicieuses et encore inédites sur le potentiel de biotransformation du BDE-209 et du DP chez l'avifaune.

Le présent travail se décline donc en deux chapitres. Le premier chapitre fait la revue de l'information et des connaissances relatives au sujet de l'étude afin de permettre une compréhension globale du phénomène et de justifier la recherche proposée. Le deuxième chapitre se présente sous la forme d'un article scientifique et renferme les principaux résultats, la discussion et les conclusions tirées de cet exercice scientifique.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LES RETARDATEURS DE FLAMME: GÉNÉRALITÉS

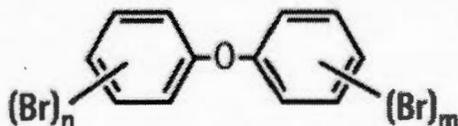
En moyenne, huit Canadiens périssent chaque semaine dans un incendie. Les incendies d'immeubles résidentiels représentent 40 % de tous les incendies et 73 % de tous les décès par le feu (PIC, 2012). Au Québec, l'année 2011 aura compté 21 487 incendies déclarés représentant des pertes matérielles s'élevant à près de 460 millions de dollars (Gouvernement du Québec, 2012). Afin de prévenir, d'amoinrir, voir, de sauver des pertes matérielles et humaines, diverses stratégies ont été mises de l'avant depuis déjà plusieurs années regroupant entre autres l'éducation populaire et les campagnes de sensibilisation à grande échelle. En parallèle, l'instauration de normes de sécurité strictes entourant la production des produits manufacturés a contribué grandement à cette cause en veillant à ce que les matériaux entrant dans la composition de divers articles d'usage domestique répondent à des critères pointus d'inflammabilité. Pour ce faire, l'usage des retardateurs de flamme (FR) est dorénavant la norme en ce qui concerne l'atteinte de ces règles.

Les composés utilisés dans la formulation de ces produits chimiques varient beaucoup et interviennent à différents moments du cycle du feu selon la molécule active à la base du retardateur de flamme. De façon générale, sous l'effet de la chaleur, ces produits se décomposent et relâchent des radicaux dans l'environnement du feu qui étouffent les flammes et ralentissent ainsi la combustion et la propagation du feu. Il existe plus de 175 types de FR sur le marché regroupés en cinq différentes classes selon la molécule chimique composant le produit. On répertorie donc les retardateurs de flammes bromés (BFR), phosphorés, azotés, chlorés et inorganiques. Actuellement, en raison de leur faible coût de production et de leur rendement haute performance, les BFR représentent la plus grande part du marché mondial dominé notamment par le tétrabromobisphénol A (TBBPA), l'hexabromocyclododécane (HBCD) et les polybromodiphényléthers (PBDE) (Birnbaum et Staskal, 2004).

1.2 LES PBDE

Les PBDE sont des composés synthétiques organobromés dont la production a vu le jour dans les années 1970, au même moment où s'éteignait celle des biphényles polychlorés (BPC) (Sjodin, Patterson et Bergman, 2003). D'un point de vue structurel, la ressemblance est frappante entre ces deux molécules si ce n'est que du lien éther entre les deux cycles aromatiques qui les différencie (*figure 1*) et du fait que l'atome de brome est un halogène plus gros que celui du chlore. En effet, les PBDE possèdent deux cycles aromatiques sur lesquels peuvent s'insérer jusqu'à dix atomes de brome produisant une suite de 209 congénères possibles. Sur le marché industriel, les PBDE se divisent en trois types de formulations commerciales : le pentabromodiphényléther (Penta-BDE), l'octabromodiphényléther (Octa-BDE) et le décabromodiphényléther (Déca-BDE) (Lorber, 2008) qui réfèrent typiquement au nombre d'atomes de brome présent sur chacun des congénères présents dans le mélange et selon leur position sur les cycles diphenyles.

PBDE



PCB

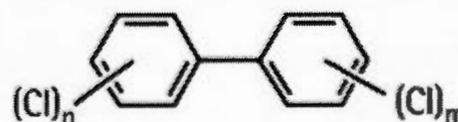


Figure 1.1. Structure chimique comparée des PBDE et BPC (PCB).

D'un point de vue pratique, les BFR sont utilisés massivement depuis les années 1980 comme ignifugeants dans de nombreux textiles, matières plastiques, matériaux de construction, fournitures de maison, pièces automobiles et dans les produits électriques et électroniques. Certaines mousses de polyuréthane, particulièrement utilisées dans l'ameublement (sièges et canapés) ainsi que dans le bâtiment et l'électroménager, peuvent même contenir jusqu'à 30 % de leur poids en PBDE afin qu'ils puissent respecter les normes de sécurité reliées à une utilisation domestique (Hites, 2004).

La composition des formulations techniques varie également d'un mélange à l'autre (*tableau I*) et répond à diverses applications. Par exemple, le mélange Penta-BDE est composé principalement des congénères BDE-47, -99 et -100 (tétra- et penta-BDE) et est utilisé principalement dans les mousses de polyuréthane ainsi que dans le textile. Le mélange Octa-BDE est composé plutôt du congénère BDE-183 (hepta-BDE) et est ajouté principalement dans les résines ABS (Acrylonitrile, Butadiène et Styrène). Ce type de résine est reconnu pour ses propriétés de ténacité, de résistance aux chocs et de dureté superficielle, et est donc utilisé surtout dans l'industrie automobile, les téléviseurs, les radios et les meubles. Finalement, le mélange Déca-BDE se compose presque à majorité (> 97 %) du congénère le plus bromé, le BDE-209, avec des traces de congénères appartenant au groupe des nona-BDE également. Le Déca-BDE est d'usage général et est utilisé dans pratiquement n'importe quel type de polymères, mais son utilisation réfère souvent aux produits électriques et électroniques (Alaee *et al.*, 2003). Ces mélanges commerciaux utilisés à grande échelle ont la particularité d'être simplement ajoutés (c.-à-d. des additifs) aux mélanges de polymères composant le bien matériel en question plutôt que liés chimiquement (lien covalent) à ces derniers, comme c'est le cas pour les ignifugeants réactifs. Les ignifugeants additifs ont donc le potentiel d'être plus facilement expulsés hors du produit de consommation suite à l'usure normale reliée à l'utilisation du bien ainsi que lors de leur disposition dans les sites d'enfouissement techniques ou centres de recyclage (Sjodin, Patterson et Bergman, 2003). En somme, les principales sources de PBDE dans l'environnement peuvent survenir dès le moment de leur synthèse et de leur incorporation dans les polymères jusqu'à leur disposition dans les installations associées.

Tableau I. Composition générale des principales formulations commerciales de PBDE. Tiré de : de Wit. (2002).

Formulation commerciale	Congénères (%)						
	Tétra-BDE	Penta-BDE	Hexa-BDE	Hepta-BDE	Octa-BDE	Nona-BDE	Déca-BDE
Penta-BDE	24-38	50-60	4-8				
Octa-BDE			10-12	44	31-35	10-11	<1
Déca-BDE						<3	97-98

À cet effet, la première mention faisant état de la présence des PBDE dans l'environnement date de 1979 où la formulation Déca-BDE fut retrouvée dans des échantillons de sols et de boues entourant des installations industrielles aux États-Unis où étaient produits les mélanges techniques PBDE (DeCarlo, 1979). Par la suite, la première observation de la présence de PBDE au sein d'un organisme vivant remonte au début des années 1980 où Andersson et Blomkvist (1981) ont démontré leur présence chez des poissons de la rivière Viskan en Suède. Les PBDE sont aujourd'hui omniprésents comme le démontre le nombre important d'études faisant mention de leur présence et de leur concentration grandissante dans les divers compartiments biotiques et abiotiques de l'environnement tel que revu par de nombreux auteurs (Costa *et al.*, 2008; de Wit, 2002; Hites, 2004; Law *et al.*, 2003). Ces composés sont même détectés jusque dans l'Arctique loin des sources premières d'émissions (de Wit, Alae et Muir, 2006; Ikonou, Rayne et Addison, 2002). Également, plusieurs études ont rapporté la présence d'une variété de congénères PBDE dans les tissus et/ou œufs d'espèces d'oiseaux tel qu'observé chez le goéland bourgmestre (*Larus hyperboreus*) (Verreault *et al.*, 2005), le goéland argenté (*Larus argentatus*) (Gauthier *et al.*, 2008), le faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) (Lindberg *et al.*, 2004), l'épervier (*Accipiter sp.*) (Leslie *et al.*, 2011) ainsi que plus récemment chez le goéland à bec cerclé (Gentes *et al.*, 2012). Cette dernière étude a notamment mis à jour des concentrations étonnamment élevées de BDE-209, excédant même les niveaux rapportés chez plusieurs espèces de rapaces, dont le faucon pèlerin qui occupe une position plus élevée dans la chaîne alimentaire que le goéland à bec cerclé. De plus, la contribution relative de ce congénère à la somme des PBDE (~25 %) est en contraste avec les profils habituellement rapportés pour les autres espèces de goélands piscivores, c'est-à-dire, dépassant ceux du BDE-47 et du BDE-99 (Gentes *et al.*, 2012).

Cela traduit donc de la capacité de ces congénères à voyager sur de longues distances, à être persistant dans l'environnement et de leur potentiel à se bioaccumuler, voir se bioamplifier dans certains cas tout au long de la chaîne trophique. Les caractéristiques des PBDE responsables de ces propriétés se résument en une bonne résistance à la dégradation chimique, physique et biologique, une faible pression de vapeur à température ambiante, une forte affinité pour les lipides (lipophiles) et une faible solubilité dans l'eau. Finalement, le coefficient de partition $\log K_{ow}$ (octanol-eau) est compris entre 4,3 et 9,9 ce qui explique la

forte affinité des PBDE pour la matière organique (sols, sédiments, poussières, etc.) (Darnerud *et al.*, 2001).

De nombreuses recherches témoignant de la toxicité de certaines formulations commerciales se sont par la suite ajoutées à ces études de surveillance environnementale et ont souligné le développement de divers effets indésirables. Les plus régulièrement cités sont des effets de perturbation endocrine affectant notamment, la concentration circulante de thyroxine (T_4) par compétition avec sa protéine de transport, la transthyrétine (Ucan-Marin *et al.*, 2009). Des dysfonctions du système reproducteur ainsi que des troubles du développement neurocomportemental sont également mentionnés (Costa *et al.*, 2008; Eriksson *et al.*, 2002; Viberg, Fredriksson et Eriksson, 2002). Plus particulièrement chez les oiseaux, les effets toxiques répertoriés comprennent des changements au niveau de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes, du rétinol (vitamine A) et du glutathion en plus de générer un stress oxydatif localisé au foie. Des changements de comportements ont aussi été observés lors des rituels reproductifs chez les crécerelles d'Amérique (Fernie *et al.*, 2008, 2005). Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence le rôle du DE-71, un type de mélange Penta-BDE, dans l'amincissement des coquilles d'œufs et dans la diminution du succès lors de l'éclosion des oisillons chez les crécerelles (Fernie *et al.*, 2009; McKernan *et al.*, 2009).

À ce jour, en raison de leur persistance, de leur bioaccumulation et de la toxicité potentielle de certains congénères, des mesures législatives régulant la production, l'utilisation et l'importation de PBDE ont été appliquées en Europe et en Amérique du Nord. Ainsi, deux des trois formulations commerciales (c.-à-d. le Penta-BDE et l'Octa-BDE) ont été bannies en Europe dès 2004 (Union européenne, 2003) et plus récemment, en 2008, le mélange Déca-BDE ne peut plus être utilisé dans l'électronique et dans les produits électriques tels que décidé par la Cour européenne de justice (EBFRIP, 2008). Les mélanges Penta-BDE et Octa-BDE ont aussi été bannis dans plusieurs états américains ainsi qu'au Canada avec le retrait complet de ces formulations du marché nord-américain en 2008 (UNEP, 2010). En effet, le *Règlement sur les polybromodiphényléthers* du gouvernement canadien interdit la fabrication de PBDE au Canada et limite l'importation, l'utilisation ainsi

que la vente de PBDE que l'on trouve dans les mélanges commerciaux Penta- et Octa-BDE ainsi que des polymères et résines contenant ces substances (Canada gazette, 2008). Au Canada, l'utilisation du Déca-BDE n'est pas encore restreinte bien que les membres de la *Bromine Science and Environmental Forum* (BSEF) aient récemment convenu d'éliminer progressivement la production et l'utilisation du Déca-BDE des marchés américains et canadiens d'ici la fin de 2013 (BSEF, 2012). Cette décision a été prise afin de se conformer à la « *deca-BDE phase-Out Initiative* » de l'Agence de protection environnementale américaine ainsi qu'à la stratégie canadienne de la gestion des risques liée au Déca-BDE d'Environnement Canada (Environnement Canada, 2011; USEPA, 2012).

Le mélange Déca-BDE est le plus bromé et le plus utilisé des mélanges PBDE avec 80 % de la demande mondiale estimée en 2001 (BSEF, 2003). Cependant, certaines appréhensions ont été émises dans la communauté scientifique sur les risques environnementaux que représentent les congénères les plus bromés, particulièrement le BDE-209. Bien que sa présence dans l'environnement n'est plus à démontrer, la molécule de BDE-209 avait été jugée jusqu'à récemment trop volumineuse pour être bioaccumulable au sein des organismes vivants et ne représentait donc pas de risques pour la santé humaine et environnementale (Hardy, 2002; IPCS, 1994).

Or, de nombreuses études ont démontré non seulement la présence du BDE-209 chez les organismes aquatiques (Ross *et al.*, 2009) et terrestres (Voorspoels *et al.*, 2007) incluant les espèces aviaires (Chen et Hale, 2010), mais également la présence de produits de débromination connus ou potentiels du BDE-209 dans diverses matrices (Gentes *et al.*, 2012; Holden *et al.*, 2009; La Guardia, Hale et Harvey, 2007; Stapleton *et al.*, 2006; Tokarz *et al.*, 2008). L'utilisation intensive du Déca-BDE en Amérique du Nord se résulte aujourd'hui par la formation de larges réservoirs de BDE-209, en particulier dans l'environnement aquatique où le BDE-209 provenant des eaux usées et du transport atmosphérique s'adsorbe aux particules en suspension et s'accumule dans les sédiments. Ces réservoirs de BDE-209 représentent certainement une source d'exposition à long terme pour la faune et pose un second risque quant au potentiel du BDE-209 à se débrominer et à engendrer des congénères qui sont eux, plus bioaccumulables, persistants, mobiles et toxiques que la molécule mère. De

ce fait, il est donc primordial d'acquérir de l'information et d'établir le potentiel réel de biotransformation que représente le BDE-209 chez un représentant de la faune aviaire et la présente recherche vise précisément à contribuer à l'état des connaissances relativement à ce sujet.

1.3 DÉCHLORANE PLUS

Le Déchlorane Plus (DP) est un composé chimique chloré agissant, entre autres, à titre de retardateur de flamme et qui fut développé en remplacement de l'insecticide mirex (Dechlorane) banni dans les années 1970 en raison de ses impacts environnementaux néfastes. Le DP est couramment utilisé dans de nombreux polymères entrants dans la fabrication de biens domestiques tels que dans les câbles et fils électriques, dans les écrans de télévision et d'ordinateurs ainsi que dans diverses fournitures de maison (Sverko *et al.*, 2011). La seule installation de production fabriquant le DP en Amérique du Nord, OxyChem, se trouve à Niagara Falls (New York, É.-U.) aux abords du bassin des Grands Lacs. Le DP est le résultat d'une réaction de type Diels-Alder entre deux moles d'hexachlorocyclopentadiène et une mole de 1,5-cyclooctadiène ce qui génère un produit composé de deux isomères : *syn*-DP et *anti*-DP dont le dernier compte pour environ 75 % du mélange final (*figure 2*).

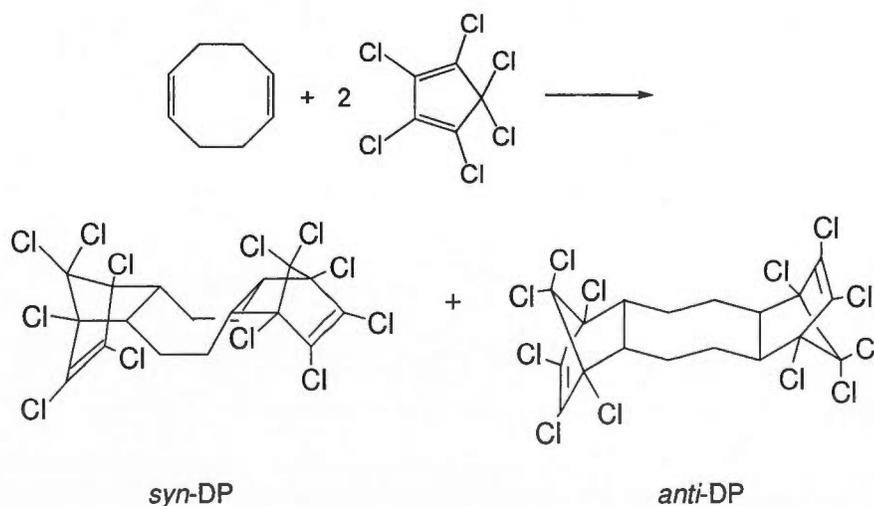


Figure 1.2. Réaction Diels-Alder du 1,5-cyclooctadiène avec l'hexachlorocyclopentadiène (2:1) générant les isomères *syn*- et *anti*-DP. Tiré de Sverko *et al.* (2011).

Similairement aux PBDE, les caractéristiques physicochimiques du DP lui confèrent une bonne stabilité chimique et thermique, affiche un coefficient de partition $\log K_{oc}$ élevé (9,3) se traduisant par une grande liposolubilité en plus d'avoir une très faible pression de vapeur (OxyChem, 2007). La production du DP est actuellement qualifiée de « volume élevé » (*High Production Volume*) par l'Agence de protection environnementale américaine, étiquette qui désigne une production ou une importation de DP s'élevant à 450 tonnes ou plus par année aux États-Unis. Cette production est également présumée être grandissante puisque la Commission européenne a pressenti le DP comme alternative probable au Déca-BDE afin de pallier aux prochaines mesures restrictives et législatives visant ce mélange (Xian *et al.*, 2011).

Ainsi, malgré une présence établie depuis plusieurs décennies sur le marché des FR, le DP n'a reçu que récemment l'attention des chercheurs avec sa première mention dans le bassin des Grands Lacs en 2006 (Hoh, Zhu et Hites, 2006). Depuis, plusieurs autres mentions de sa présence dans les divers compartiments abiotiques et biotiques de l'environnement ont été rapportées par différents groupes de recherche et le DP est rapidement devenu un contaminant omniprésent et d'intérêt scientifique. Les isomères du DP furent jusqu'à présent rapportés dans l'air, l'eau, les sédiments et au sein d'une variété d'espèces fauniques à travers le monde tel que revue par Sverko *et al.* (2011) et Xian *et al.* (2011). Les données de détection du DP chez les espèces aviaires sont moins nombreuses, mais il fut tout de même détecté dans les tissus et/ou œufs de quatre espèces de goélands répartis dans diverses aires de nidification au Canada soit : le goéland argenté (Chen *et al.*, 2012; Gauthier *et al.*, 2007; Gauthier et Letcher, 2009), le goéland à bec cerclé (Chen *et al.*, 2012; Gentes *et al.*, 2012), le goéland à ailes grises (*Larus glaucescens*) (Chen *et al.*, 2012) ainsi que chez le goéland de Californie (*Larus californicus*). Le DP fut aussi mesuré chez diverses espèces d'oiseaux aquatiques de Chine (Zhang *et al.*, 2011), chez le pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*) des Grands Lacs (Venier *et al.*, 2010), chez le faucon pèlerin au Canada et en Espagne (Guerra *et al.*, 2011) ainsi que chez la cigogne blanche (*Ciconia ciconia*) en Espagne également (Munoz-Arnanz *et al.*, 2011). Toutes ces études témoignent donc que le DP est maintenant largement répandu dans l'environnement bien que les connaissances sur son devenir (c.-à-d. bioaccumulation et biotransformation) dans l'environnement et la faune

soient encore très réduites et que peu d'information sur sa toxicité relative a été investiguée jusqu'à maintenant.

En effet, au présent de l'écriture de ce mémoire, aucune étude traitant de la biotransformation du DP chez les oiseaux n'était publiée et une seule étude traitant de la toxicité du DP chez une espèce aviaire était parue. Or, récemment, Sverko *et al.* (2008) ont démontré la présence de métabolites déchlorés (c.-à-d. DP-1CL et DP-2CL) dans des échantillons de sédiments de la rivière Niagara (New York, É-U.) soulevant la possibilité que le mélange commercial DP puisse subir une déhalogénéation réductive dans l'environnement par des processus encore inconnus. Depuis la parution de cet article, de nombreux autres suivirent et relevèrent la présence de ces métabolites dans une variété d'échantillons environnementaux et humains. Or, bien que la parution d'articles relevant de la détection de ces métabolites soit en pleine croissance, peu d'auteurs ont abordé le potentiel métabolique des isomères du DP au sein d'une espèce vivante.

Tomy *et al.* (2008) sont, à la connaissance de l'auteure, le seul groupe de recherche ayant investigué le devenir des isomères *syn*-DP et *anti*-DP dans un design *in vivo* chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). À la suite de cette expérimentation, aucun métabolite hydroxylé, méthoxylé ou déchloré ne fut dépisté dans les échantillons de foie et ils conclurent que la présence de métabolites chez les poissons serait vraisemblablement le reflet de leur accumulation au travers de la chaîne alimentaire plutôt que généré *in vivo* à partir de la molécule mère (Tomy *et al.*, 2008). Du point de vue de la toxicité potentielle du DP, mis à part les études obligatoires demandées par l'Agence de protection environnementale américaine (*High Production Volume Test Challenge Report*) ou celle parrainée par OxyChem, une seule autre étude portant sur le sujet fut publiée. Crump *et al.* (2011), dans une approche combinée *in vitro/in ovo*, déterminèrent que le mélange DP n'est pas cytotoxique dans les hépatocytes embryonnaires de poulet (jusqu'à un maximum de 3 μ M) et qu'aucun effet délétère influençant le succès du bêcheage n'a été observé (jusqu'à la dose la plus élevée du groupe : 500 ng/g par œuf). Ainsi, au regard des niveaux d'expositions environnementaux actuels, le DP n'aurait pas d'effets indésirables sur la viabilité embryonnaire, mais le groupe de recherche n'écarte pas que le DP puisse manifester son

potentiel toxique par d'autres modes d'action (Crump *et al.*, 2011). En somme, la recherche proposée concernant le mélange DP est d'intérêt scientifique et environnemental puisqu'elle permettra de combler les lacunes importantes sur le potentiel métabolique des isomères *syn*- et *anti*-DP chez une espèce aviaire, le goéland à bec cerclé.

1.4 BIOTRANSFORMATION DES CONTAMINANTS ORGANOHALOGÉNÉS

Chez les organismes exposés à divers contaminants environnementaux, le métabolisme est certainement un facteur déterminant qui influence le devenir des xénobiotiques dans l'organisme (toxicocinétique) et ultimement, leur toxicité. En effet, selon la voie empruntée par le xénobiotique pour atteindre la circulation sanguine, il se partagera ensuite entre les différentes structures de l'organisme comme les reins, le foie, les os, le cerveau ou le cœur par exemple. De là, des transformations métaboliques (biotransformation) pourront avoir lieu afin de modifier l'aspect initial de la molécule mère en vue de son élimination prochaine. La biotransformation est donc un processus qui convertit la molécule mère en métabolites qui eux, sont généralement plus polaires et hydrosolubles que le composé parent, ce qui facilite leur élimination de l'organisme (par l'urine et les fèces) (Casarett et Doull, 2008). Toutefois, bien que cette action puisse être vue comme un processus de détoxification, il arrive parfois que les métabolites produits soient plus toxiques que la molécule mère. Ce phénomène de bioactivation a d'ailleurs été démontré pour les PBDE dont les métabolites hydroxylés (OH-BDE) agissent à titre de perturbateur endocrinien affectant notamment la fonction thyroïdienne, le système reproducteur et neurodéveloppemental (Costa *et al.*, 2008; Darnerud, 2003; McDonald, 2002).

Les réactions de biotransformation gouvernant les xénobiotiques tout comme les composés endogènes sont de deux types (phase I et II) et peuvent avoir lieu de façon successive ou indépendante. La phase I de la biotransformation réfère généralement à une phase de fonctionnalisation qui, par oxydation, réduction ou hydrolyse, va diriger l'ajout d'un groupement fonctionnel sur la molécule dans le but de la rendre plus réactive, c'est-à-dire plus polaire, en vue des réactions de la phase II. La phase II de la biotransformation réfère quant à elle à la conjugaison des xénobiotiques ou des métabolites produits à la phase I à des

molécules endogènes dans le but de les rendre plus hydrosolubles et donc, de faciliter leur élimination hors de l'organisme (Casarett et Doull, 2008).

Les enzymes responsables de ces réactions de biotransformation forment un groupe large et varié, mais la plupart se retrouvent dans la même structure cellulaire : le réticulum endoplasmique lisse (Kintz, 1998). Toutefois, parmi le lot de ces enzymes, certaines retiennent davantage l'attention que d'autres et c'est spécialement le cas des cytochromes P450 (CYP). Les CYP sont sans contredit un des systèmes enzymatiques parmi les plus diversifiés et polyvalents connus. En effet, il en existe plusieurs familles, sous-familles et isoformes, et tous ont une spécificité de substrat plus ou moins restreinte. Ce dernier point est notamment mis en cause lors des phénomènes de bioactivation des xénobiotiques par les CYP étant donné qu'ils sont en mesure d'oxyder une variété de substrats endogènes comme exogènes (Casarett et Doull, 2008). En fait, ces enzymes sont plutôt un complexe multienzymatique dont chacune des sous-unités est primordiale pour le fonctionnement global de l'enzyme. Les CYP sont constitués de quatre éléments essentiels, qui sont : 1) une hémoprotéine : l'hème est une ferroporphyrine IX et porte un atome de fer généralement à l'état ferrique (Fe^{3+}); 2) une apoprotéine : sur laquelle est fixé l'hème et responsable entre autres, de leur polymorphisme; 3) NADPH-cytochrome-P450-réductase : une enzyme réductrice qui donne les électrons et 4) un phospholipide : pour s'assurer de la cohésion du complexe enzymatique (Kintz, 1998). La majorité de ces CYP ont pour fonction de catalyser la monooxygénation (phase I) de substances endogènes ou de xénobiotiques bien que certaines isoenzymes interviennent aussi dans la déhalogénéation réductive de ces molécules. Ce processus de détoxification est notamment proposé dans la biotransformation du BDE-209 et fut également démontré pour le DDT (en DDE), un pesticide organochloré.

1.4.1 BIOTRANSFORMATION DES PBDE ET DU DP

La biotransformation des PBDE, qu'elle résulte de processus abiotiques dans l'environnement ou de l'action enzymatique chez les organismes vivants est un sujet qui ne cesse de s'enrichir, bien que plusieurs facettes restent encore à être explorées. De façon générale, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont signalé la formation d'hydroxyle-BDE (OH-

BDE) à partir de différents congénères des PBDE chez les vertébrés. Par exemple, des métabolites hydroxylés mono- et di-OH-BDE ont été détectés dans les tissus de rats et de souris exposés au BDE-99 et au BDE-100 (Hakk, Larsen et Klasson-Wehler, 2002; Staskal *et al.*, 2006). Également, ces mêmes métabolites furent observés suite à l'exposition de rats mâles (Sprague-Dawley) au congénère BDE-154 en plus de la formation de traces du métabolite tri-OH-BDE (Hakk, Huwe et Larsen, 2009). Également chez les rats, la biotransformation du BDE-47 a produit une série de métabolites mono-OH-PBDE et, chez la souris, la biotransformation du DE-71 (un mélange Penta-BDE regroupant le BDE-47, -85, -99, -100, -153 et -154) à quant à elle produit six métabolites mono-OH-BDE (Qiu *et al.*, 2007). Chez les poissons, la formation de métabolites hydroxylés suivant l'exposition alimentaire au ^{14}C -BDE-47 fut rapportée dans différents tissus incluant le sang chez le grand brochet (*Esox lucius*) (Kierkegaard *et al.*, 2001). Les expérimentations *in vitro* conduites jusqu'à présent corroborent également ces études *in vivo*. Par exemple, chez le rat, il fut démontré la formation de trois mono-OH-BDE à la suite de l'exposition de microsomes hépatiques au BDE-99 (Erratico, Szeitz et Bandiera, 2010). Également, la formation d'un métabolite mono-OH BDE fut rapportée chez le béluga (*Delphinapterus leucas*) en réponse à l'exposition de microsomes hépatiques au congénère BDE-15 (McKinney *et al.*, 2006). Une étude chez l'humain a même signalé la formation de deux mono-OH-BDE suivant l'exposition d'hépatocytes au congénère BDE-99 (Staskal *et al.*, 2006).

Or, la biotransformation du BDE-209 semble échapper à ce processus d'oxydation, du moins en partie. En effet, différentes études réalisées chez les poissons et certains organismes terrestres au regard de la biotransformation du BDE-209 semblent proposer un processus de débromination réductive de la molécule comme première ligne de détoxification. Par exemple, Stapleton *et al.* (2004) ont observé l'apparition de métabolites débrominés du BDE-209 chez la truite arc-en-ciel suivant une exposition alimentaire de 60 jours suivie de 40 jours de dépuration. Ces produits de débromination furent identifiés allant des Penta-BDE jusqu'aux Octa-BDE. Subséquemment, Stapleton *et al.* (2006) poussèrent plus loin leur investigation dans une étude de biotransformation *in vitro* toujours chez la truite arc-en-ciel dans laquelle les microsomes hépatiques furent exposés au BDE-209. Ils observèrent que le BDE-209 fut biotransformé jusqu'à 22 % de sa concentration initiale.

L'analyse de la structure moléculaire des métabolites obtenus montre que la perte des atomes de brome se retrouve principalement sur les positions *mé*ta et *para* et que l'hypothèse de l'implication des déodinasés, enzymes impliqués dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, pourrait être en cause.

Tomy *et al.* (2004) ont également examiné le devenir du BDE-209 chez la truite grise (*Salvelinus namaycush*) et ont observé la formation de trois congénères moins bromés soit, deux congénères non identifiés et le BDE-140. Ils ont avancé comme hypothèse une débromination du BDE-209 puisque ces congénères n'avaient pas été administrés dans la nourriture des poissons. Ils suggérèrent également, qu'étant donné la similitude entre les PBDE et la thyroxine (T₄), qu'il serait plausible que la débromination du BDE-209 ait été catalysée par les déodinasés.

Chez les rats Sprague-Dawley ayant reçus une dose unitaire de Déca-BDE, il fut rapporté la formation de trois nona-BDE et de 13 métabolites phénoliques dans le plasma des rats. Les principaux métabolites étaient : un octa-BDE hydroxylé, un nona-BDE hydroxylé et un hexa-BDE hydroxy-méthoxylé de type guaiacol (Sandholm, Emanuelsson et Wehler, 2003). Les auteurs ont ainsi proposé comme séquence de transformations métaboliques du Déca-BDE, une débromination réductive du BDE-209 dont les métabolites produits pourraient ensuite être oxydés en métabolites phénolés.

Kierkegaard *et al.* (2007) ont pour leur part étudié le devenir et les effets de congénères fortement bromés (hepta- jusqu'à Déca-BDE) dans l'alimentation de deux vaches laitières. Ils notèrent une augmentation marquée dans le tissu adipeux et les organes des congénères BDE-207, -197, -196 et -182 contrastant avec le profil mesuré dans l'alimentation des vaches. Par conséquent, ils conclurent que ce profil particulier serait attribuable à une débromination réductive du Déca-BDE. La séquence proposée serait premièrement, une débromination en position *ortho* générant du BDE-206 qui lui, pourrait ultérieurement être débrominé en position *mé*ta, formant ainsi du BDE-196 et finalement, une débromination du BDE-196 en position *para* pour obtenir du BDE-182. Le BDE-197 proviendrait plutôt de la débromination du BDE-209 en position *mé*ta suivie d'une seconde débromination en position

méta. Le groupe de recherche n'avance toutefois pas de pistes sur les enzymes catalysant ces réactions.

Cependant, les données de biotransformation des PBDE, et plus précisément du BDE-209 chez les espèces aviaires, sont plutôt rares. McKernan *et al.* (2009) sont arrivés à la conclusion que des processus métaboliques avaient eu lieu suite à l'injection du mélange DE-71 dans les chambres à air d'œufs de diverses espèces aviaires puisque six congénères non présents dans le mélange initial y ont été formés. Les auteurs ont suggéré une débromination des composés parents pour expliquer la présence des métabolites formés plutôt qu'étant le résultat d'une hydroxylation comme rapporté précédemment chez certaines espèces de vertébrés. Pirard et De Pauw (2007) abondent également dans cette direction suite à une étude conduite chez des poulets ayant été exposés oralement au DE-71. En effet, ils suggérèrent que le fort pourcentage de BDE-47 retrouvés dans les fientes (62 % lors de la deuxième semaine d'exposition) proviendrait de la débromination de congénères plus bromés comme le BDE-99 et -100, plutôt que dérivé de la fraction non absorbée. Chen *et al.* (2008) ont quant à eux mesuré la présence de PBDE, dont le BDE-209, dans plus d'une centaine d'œufs de faucon pèlerin de la région du Nord-Est des États-Unis. Malgré le fort poids moléculaire et son caractère hydrophobe, le BDE-209 fut mesuré dans tous les œufs de cette étude. De plus, il fut observé de pair avec la présence du BDE-209, huit nona-BDE et octa-BDE particulièrement présents dans ces œufs dont le BDE-201 et -202. La concentration de BDE-201 n'étant pas proportionnelle à ce qui se trouve dans le mélange commercial Octa-BDE combiné à la présence du BDE-202, qui lui, n'est pas connu d'aucun mélange PBDE, a conduit les auteurs vers l'hypothèse que ces congénères moins bromés proviendraient de la débromination du BDE-209.

Au moment de la rédaction de ce mémoire, la seule étude de biotransformation *in vivo* réalisée chez une espèce aviaire étudiant précisément le devenir du BDE-209 revient à Van den Steen *et al.* (2007). Dans cette étude, des étourneaux sansonnets mâles furent exposés, à l'aide d'un implant sous-cutané, au BDE-209. Il s'en suivit une série de métabolites qualifiés de produits de débromination (allant des tétra-BDE jusqu'aux nona-BDE) dans les muscles et le foie de ces oiseaux avec une prédominance pour les nona-BDE

(BDE-207 > BDE-208 > BDE-206) dans ces deux tissus. Ces congénères n'étant pas présents dans le produit initial laissent entrevoir que des processus de biotransformation auraient vraisemblablement altéré la molécule initiale, générant cette suite de produits de débromination.

En résumé, selon le degré de bromination des PBDE, différents mécanismes interviennent dans le devenir de ces congénères au sein des organismes vivants. Généralement, la biotransformation des congénères moins bromés serait médiée par les CYP comme démontré précédemment. Par exemple, la formation de métabolites OH-BDE par les microsomes de béluga était dépendante de la présence du NADPH, cofacteur nécessaire aux réactions catalysées par les CYP (McKinney *et al.*, 2006). Quant à la biotransformation de congénères plus bromés, comme le BDE-209, la séquence proposée ferait intervenir des réactions de débromination réductive, potentiellement catalysée par les CYP et/ou déodinasés. Les congénères résultant de cette réaction étant de plus faible poids moléculaire et avec un arrangement des halogènes autour des anneaux phényles modifié, ils seraient alors susceptibles de traverser les mêmes voies métaboliques que les congénères moins bromés et de former des métabolites hydroxylés et/ou méthoxylés. L'implication de pareils résultats sur le devenir du BDE-209 dans l'environnement et la faune est donc déterminante compte tenu des larges réservoirs de ce congénère formés dans les milieux aquatiques et terrestres. En effet, ces réservoirs ne constituent ni plus ni moins que des sources importantes et continues de congénères qui sont présentement sous le joug de législations strictes (ex. congénères des mélanges commerciaux Penta- et Octa-BDE). Ces molécules étant plus mobiles, persistantes et bioaccumulables, elles risquent fort de se bioamplifier dans les réseaux trophiques, représentant un risque potentiel pour les espèces de niveau trophique supérieur. Mais, également, cette situation pourrait bien faire échouer les efforts mis de l'avant par le gouvernement canadien et la communauté scientifique vis-à-vis du Penta- et Octa-BDE récemment bannis.

Finalement, en ce qui a trait à la biotransformation des isomères du DP, le présent travail de recherche prend tout son intérêt étant donné l'absence d'informations relativement à ce sujet. En effet, bien que le DP soit produit depuis plusieurs décennies déjà, une seule

étude portant son attention sur la biotransformation *in vivo* des isomères du DP a été réalisée chez la truite arc-en-ciel (Tomy *et al.*, 2008). Bien que les isomères du DP aient un potentiel de bioaccumulation tel qu'observé par ce groupe de recherche, les auteurs n'ont pu démontrer la présence de métabolites hydroxylés, méthoxylés ou déchlorés qui traduirait de la biotransformation *in vivo* des isomères *syn*- et *anti*-DP. Ainsi, mis à part cette étude, il n'existe aucune étude s'intéressant au devenir du DP chez les espèces aviaires et justifie l'intérêt porté au travail de recherche proposé.

1.5. GOÉLAND À BEC CERCLÉ: JUSTIFICATION DE L'ESPÈCE À L'ÉTUDE

Le goéland à bec cerclé (GBC) est un goéland de taille moyenne facilement reconnaissable à son plumage blanc et gris et à l'anneau noir qui lui ceinture le bec. Actuellement, il représente l'espèce de Laridés la plus abondante au Québec et dans la région des Grands Lacs (Morris *et al.*, 2011). Toutefois, cette situation a déjà été tout autre en Amérique du Nord au début du 20^e siècle. Les populations de GBC étaient menacées en raison de l'exploitation de leurs œufs et de leur plumage en plus d'être victime de la destruction de leur habitat suite à l'empiètement de leur territoire par la colonisation dans les années 1850 à 1920 (Pollet *et al.*, 2012). En 1917 (Canada) et 1918 (États-Unis), un règlement visant la protection des oiseaux migrateurs a stoppé ce déclin et depuis, leurs populations ont connu un immense succès avec un développement démographique exponentiel qui a même atteint, au début des années 1990, 125 000 couples nicheurs dans la région de Montréal (Brousseau, P., 1995).

Aujourd'hui, ces populations se sont stabilisées dans la région métropolitaine, mais affichent tout de même une forte densité. De surcroît, l'île Deslauriers, située à 3 km de la pointe est de l'île de Montréal dans le fleuve Saint-Laurent, accueille environ 48 000 couples nicheurs et représente une des plus importantes colonies de GBC dans l'est du Canada (Brousseau, P., 2009. Communication personnelle). De nombreux facteurs ont été reconnus comme étant favorables au développement du GBC, dont le faible impact des prédateurs de cette espèce combiné à un fort succès reproducteur. Mais leur présence importante dans les milieux urbains, périurbains et agricoles traduit également d'une grande flexibilité

alimentaire. Le GBC est considéré comme une espèce omnivore et opportuniste et ils sont, à cet effet, régulièrement aperçus dans les lieux d'enfouissement technique (LET) et près des poubelles domestiques et de restauration. Ce point traduit aussi de la facilité d'accès que représente cette source d'alimentation anthropique pour le GBC.

Bien que cette espèce ne soit pas qualifiée de résidente des milieux aquatiques de l'Est canadien, elle niche en colonies parfois importantes tout le long du fleuve Saint-Laurent ainsi que dans la région des Grands Lacs. Le GBC choisit habituellement de nicher sur des îles ou des berges où la végétation est plutôt éparse, bien qu'il puisse également nicher en ville ou dans des milieux agricoles (Brousseau, 1995). Cette facette témoigne aussi de la flexibilité et de l'adaptabilité du GBC à nicher en périphérie ou à même des zones qui sont fortement peuplées et industrialisées (site « hotspot » de pollution).

Ainsi, compte tenu de certains traits énumérés précédemment, le GBC représente une espèce d'intérêt pour cette recherche. Tout d'abord, sa grande disponibilité, sa facilité d'accès et de repérage en raison de la formation de colonies insulaires permettent un échantillonnage rapide et facile d'un point de vue pratique. Mais le plus significatif est le fait que cette espèce occupe une place relativement élevée dans les maillons de sa chaîne alimentaire et qu'elle niche en périphérie de nombreux sites/zones fortement pollués des milieux urbains, agricoles et riverains. Cette proximité de sites pollués expose alors les GBC à un éventail de polluants, dont les présents FR. En effet, l'île Deslauriers où s'est effectué l'échantillonnage des GBC se trouve à proximité d'un noyau urbain fortement peuplé (c.-à-d., communauté urbaine de Montréal) et est à proximité également du plus grand site d'enfouissement du Québec (environ 30 km de Montréal). De plus, l'île Deslauriers se trouve directement dans le panache de l'effluent en provenance de la plus importante station d'épuration des eaux du Canada, la station Jean-R. Marcotte (1 km en amont de l'île Deslauriers). Ces facteurs furent de surcroît dernièrement soulignés comme influençant la charge en FR des GBC par les travaux de Gentes *et al.* (2012). En effet, une variété de FR, dont le BDE-209 et les isomères du DP, furent quantifiés dans le foie et le plasma des GBC nichant sur l'île Deslauriers avec un profil de contamination inhabituel pour une espèce de Laridés.

Par conséquent, le GBC nichant sur l'île Deslauriers représente un modèle d'intérêt afin de cerner le devenir métabolique de ces FR chez une espèce d'oiseau naturellement exposée de par son mode de vie et son habitat. De plus, la présente étude permettra de combler d'importantes lacunes vis-à-vis des connaissances reliées à la biotransformation de ces composés chez les oiseaux nichant dans l'écosystème du fleuve Saint-Laurent.

Les objectifs poursuivis par ce travail de recherche sont donc :

- i. Étudier le potentiel de biotransformation *in vitro* du BDE-209 et des deux isomères du DP par les microsomes hépatiques de goélands à bec cerclé naturellement exposés.
- ii. Comparer le potentiel de biotransformation *in vitro* du BDE-209 et des deux isomères du DP à des congénères des PBDE dont le potentiel de biotransformation est plus largement connu (c.-à-d. BDE-15 et -153).

CHAPITRE II

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

Bernice Chabot-Giguère¹, Robert J. Letcher², Jonathan Verreault¹

¹ Centre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN), Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

² Wildlife and Landscape Science Directorate, Science and Technology Branch, Environment Canada, National Wildlife Research Centre, Carleton University, Ottawa, ON, CANADA

Article soumis à *Environment International*

ABSTRACT

Decabromodiphenyl ether (deca-BDE) mixture (composed > 97% of BDE-209) is now facing usage restrictions worldwide, which is leading to increased utilisation of a series of alternative, replacement flame retardant (FR) products. Among these, Dechlorane Plus (DP, *syn*- and *anti*- isomers) is receiving growing attention as it has been detected in wildlife samples, including in birds from North America, Europe and Asia. Recent investigation conducted in the St-Lawrence River has revealed unexpectedly high concentrations of BDE-209 and high detection frequency of both DP isomers in liver ring-billed gulls (RBGUs). However, despite the global distribution of these FRs, there is to date no study that has addressed the *in vitro* biotransformation of BDE-209 and DP in birds. Hence, this study aimed at understanding the potential of *in vitro* biotransformation of current-use BDE-209 and DP isomers (*syn*- and *anti*-DP) using liver microsomes of RBGUs breeding in a known FR hotspot in the St-Lawrence River basin (Quebec, Canada). Despite positive depletion of BDE-15 (positive control), present results showed no depletion of BDE-209 or DP isomers over the 90-min time frame of the assay. Moreover, based on a gradient of EROD activities (i.e., low, medium and high EROD activity), BDE-15 showed consistent depletion with significant difference for the medium group only ($p = 0.04$), even though no correlative linkage was found between EROD activities and $\sum_{18}\text{PBDE}$, $\sum\text{DP}$ and individual congeners/isomers. Because no biotransformation of BDE-209 was observed in present *in vitro* assay, high levels of BDE-209 determined in the liver of RBGUs that correlated with those of known or suggested BDE-209 debromination products, may be indicative of concomitant dietary (e.g., fish) and environmental exposure in the Greater Montreal area, and subsequent bioaccumulation of these higher-brominated congeners. Also the non-degradation of DP isomers in present *in vitro* assay suggested that this compound is highly recalcitrant to any hepatic microsomal enzyme-mediated degradation in RBGUs.

Keywords : BDE-209, Dechlorane Plus, biotransformation, *in vitro*, hepatic microsome, gull

2.1 INTRODUCTION

Flame retardants (FRs) are chemicals that are routinely added to consumer products to reduce the flammability of combustible materials, and thus were deemed necessary to meet strict fire safety standards. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), a well known group of additive brominated FRs, have been used massively over the past decades because of their low production costs and highly efficient fire-retardant properties (Birnbaum et Staskal, 2004). PBDEs are now widely dispersed in ecosystems and the growing evidences on persistence, bioaccumulation and toxicity potential of some PBDE congeners have led to an international phase out of two commercial mixtures: penta-BDE and octa-BDE (UNEP, 2010). At present, the last commercial mixture still allowed for use is the deca-BDE (<97% of 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209)). However, company's members of the Bromine Science and Environmental Forum (BSEF) have recently agreed to phase-out the production and use of deca-BDE from the U.S. and Canadian market by the end of 2013 to comply with the U.S. Environmental Protection Agency "Deca-BDE Phase-Out Initiative" and the "Risk Management Strategy for PBDEs" from Environment Canada (BSEF, 2012).

Several avian studies have reported on the presence of PBDE congeners of high environmental concern in tissues and/or eggs of a wide range of terrestrial and aquatic (or marine) species including glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian Arctic (Verreault *et al.*, 2005), herring gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes region (Gauthier *et al.*, 2008), peregrine falcon (*Falco peregrinus*) from Sweden (Lindberg *et al.*, 2004), sparrowhawks (*Accipiter sp.*) from the United Kingdom (Leslie *et al.*, 2011) and very recently in ring-billed gull (*Larus delawarensis*) (RBGUs) from the greater Montreal area (Quebec, Canada) (Gentes *et al.*, 2012). Also, PBDEs have been reported in the eggs of four species of gulls from sites across Canada (Chen *et al.*, 2012), as well as in American kestrels (*Falco sparverius*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*) from southern Lake Ontario (Canada) regions (Chen, Letcher and Martin, 2012). In the study by Gentes *et al.* (2012), unexpectedly high concentrations (mean 57.2 ± 12.2 ng/g ww; range 2.74-283 ng/g ww) of BDE-209 and several of its known or suggested hepta- through octa-BDE debromination

products were reported in liver of this medium size gull species. In this study, the relative contribution of BDE-209 to \sum_{45} PBDE (~25%) in liver and plasma exceeded those of BDE-47 and BDE-99, which typically represent the most abundant congeners detected in tissues and eggs of aquatic bird species (Chen and Hale, 2010).

The present state of knowledge on the organismal fate of PBDEs (toxicokinetics) is mainly limited to rodents and fish, and has focused principally on lower-brominated congeners such as those found in the penta-BDE and octa-BDE mixtures. Stapleton *et al.* (2006) and Morck *et al.* (2003) have shown that fish (rainbow trout and common carp) and rats, respectively, bioaccumulated BDE-209 following a dietary exposure, and generated *in vivo* a range of lower-brominated debromination products (e.g., BDE-153, -183, -206, -207 and -208). To our knowledge, the only bird study that has addressed metabolic fate of BDE-209 was carried out by Van den Steen *et al.* (2007) who showed that BDE-209 was debrominated down to congeners found in the penta- and octa-BDE commercial formulations following exposure to BDE-209 via silastic implants. Moreover, BDE-209 has been demonstrated to be susceptible to photolytic (La Guardia, Hale and Harvey, 2007; Soderstrom *et al.*, 2004) and microbial debromination (He, Robrock and Alvarez-Cohen, 2006) under representative environmental conditions, which was associated with the formation of a suite of lower-brominated congener. Consequently, BDE-209 is of major environmental concern taking into account its potentially underestimated reservoir and its capacity to generate lower brominated congeners that can exhibit greater bioavailability, bioaccumulation propensity and toxicity.

Dechlorane Plus (DP), a chlorinated cycloaliphatic FR, is a chemical commercialized as a replacement for mirex, which was banned in the 1970s. DP is synthesized via a Diels-Alder reaction producing two isomers: *syn*- and *anti*-DP, with the latter isomer accounting for ~75% of total DP, and is commonly used in many polymer products like cables, electric wires, computer monitors, televisions and furniture (Sverko *et al.*, 2011). DP is currently unregulated, is classified as a high production volume chemical in the U.S. (USEPA, 2011) and listed as an alternative to deca-BDE (Xian *et al.*, 2011). Based on its particular physicochemical properties, DP was long considered to have a low mobility potential from an

environmental perspective and to be poorly bioavailable to wildlife and fish, but as recently reviewed, recent reports of its presence in various biotic and abiotic samples now suggest the opposite (Sverko *et al.*, 2011; Xian *et al.*, 2011). DP detection has also been reported for some bird species including in RBGU liver from the greater Montreal area (Gentes *et al.*, 2012), herring gulls eggs and bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) plasma from the Great Lakes (Gauthier *et al.*, 2007; Gauthier and Letcher, 2009; Venier *et al.*, 2010), peregrine falcon eggs from Canada and Spain (Guerra *et al.*, 2011) and aquatic birds from China (Zhang *et al.*, 2011). All this indicates that DP is now widely spread in the environment, although knowledge on its fate in the organism is still very scarce. There is to date no information on the biotransformation potential of any DP isomers in birds (Sverko *et al.*, 2011; Xian *et al.*, 2011) and only limited information in fish (Tomy *et al.*, 2008).

The RBGU has an opportunistic and omnivorous diet, occupies a relatively high trophic level in the food chain and is exposed to numerous point sources of current-use and legacy FRs (Chen *et al.*, 2012; Gentes *et al.*, 2012). Therefore, this makes the RBGU breeding on Deslauriers Island a valuable model to understand the metabolic fate of current-use PBDEs (deca-BDE) and DP in a naturally exposed avian species, and to fill knowledge gaps on the biotransformation capability towards these emerging or lesser-studied contaminants in birds. The aim of the present study was to investigate the *in vitro* biotransformation BDE-209 and DP (*anti*- and *syn*- isomers) using hepatic microsomes isolated from naturally exposed RBGUs breeding in a known FR hotspot in the St-Lawrence River, Canada.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 SAMPLE COLLECTION

Fieldwork was carried out from April through June 2010 on Deslauriers Island in the St-Lawrence River. Deslauriers Island is located near the densely populated urban core of the greater Montreal area, Quebec's largest landfill (~30 km from Montreal) and the discharge, in the St-Lawrence River, of effluent from the Canada's largest wastewater treatment plant (1 km upstream from Deslauriers Island). Moreover, this colony hosts approximately 48,000 breeding pairs, which currently represents one of the largest RBGU colony in Eastern Canada (2009 survey, Brousseau P., personal communication). Male (n=19) and female (n=6) RBGUs were randomly selected and live-captured within all sections of the colony during the incubation period. Capture on the nest was accomplished using a nest trap controlled from a distance by a remote system (Bustnes *et al.*, 2001). Shortly after capture, the birds were euthanized by cervical dislocation and the left lobe of the liver was collected within 5 min after euthanasia. This portion of the liver was transferred immediately onto a cryotube and kept in a liquid nitrogen container. The right liver lobe sample was kept on ice in a cooler during fieldwork. In the laboratory, liver samples stored in the liquid nitrogen container were transferred onto a -80°C freezer for microsome preparation (section 2.2), while liver samples stored in the cooler were transferred onto a -20°C freezer until chemically analyzed (section 2.6). Capture and handling methods were approved by the Institutional Committee on Animal Care (CIPA) of the Université du Québec à Montréal, and comply with the guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care (CCAC).

2.2.2 HEPATIC MICROSOME PREPARATION

RBGU liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation following methods described elsewhere (Verreault *et al.*, 2009a) with minor modifications. Briefly, 200-300 mg of liver aliquots was thawed on ice and homogenized using a Potter-Elvehjem tissue grinder in a phosphate buffer (0.1M KH_2PO_4 and 0.1M Na_2HPO_4 ; pH 7.4). The homogenized liver was then transferred onto a cool (approximately 4°C) Eppendorf tube and

centrifuged at 9,000 x g for 15 min. The supernatant (S-9 fraction) was then centrifuged at 100,000 x g for 60 min, and the resulting pellets were re-suspended in a phosphate-sucrose buffer (0.1M KH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄ and 0.25M sucrose; pH 7.0) using the Potter-Elvehjem tissue grinder. The final microsomal suspensions were aliquoted in 250 µl cryovials and stored in the -80°C freezer for subsequent analyses (section 2.2.3). The hepatic microsomal protein content was determined following an absorbance-based method against a BSA standard curve as detailed by Kennedy et Jones (1994).

2.2.3 ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE (EROD) ACTIVITY MEASUREMENT

EROD activity measurement was used to verify the general hepatic microsomal CYP1A-like enzyme viability and to select individuals for the *in vitro* biotransformation assays (section 2.5) such that selected birds would cover a gradient of EROD activities (i.e., low, medium and high EROD activity). Hepatic microsomal enzymes including those of CYP1A and more importantly CYP2B and 3A subfamilies have been demonstrated in mammalian models to be involved to various degrees in the metabolism of PBDEs (Erratico, Moffatt and Bandiera, 2011; Hakk and Letcher, 2003; Pacyniak *et al.*, 2007; Wiseman *et al.*, 2011). Hence, because hepatic microsomal activities of CYP1A, 2B and 3A-like isoenzymes have been reported to somewhat co-vary (e.g., dogs: Verreault *et al.*, 2009a), EROD was judged to be a good general marker of hepatic microsomal CYP activity. Measurement of EROD activity was performed according to methods previously described by Kennedy and Jones (1994) with following minor modifications. First, the incubation temperature was set to 41°C as this represents the physiological temperature of avian species (i.e., medium size gulls). Secondly, the incubation time was adjusted to 3 min to allow the reaction to proceed linearly and finally, 5 µL of microsomal suspension was added to the wells instead of 10 µL to ensure that fluorescence values would fall within the mid-portion of the resorufin-based standard curve.

2.2.4 PREPARATION OF BDE-209 AND DECHLORANE-PLUS MIXTURES

Enzymatically-active hepatic microsomes from RBGUs were used in an *in vitro* incubation assay with BDE-209 along with two PBDE congeners, BDE-15 and -153. It was hypothesized that the enzymes that were active, including CYP, catalyze the degradation of BDE-209. BDE-15 and BDE-153 were hypothesized to act as positive and negative control, respectively, with respect to PBDE congener degradation in the assay. BDE-15 is characterized by a bromine substitution pattern that confers more or less planar configuration with four pairs of *ortho-meta* vicinal H-atoms facilitating enzyme-mediated attack, and has been shown to be readily metabolized in *in vitro* biotransformation assays using beluga whale (*Delphinapterus leucas*) liver microsomes (McKinney *et al.*, 2006) and Crucian carp (*Carassius auratus*) liver subcellular fractions (Shen *et al.*, 2012). Conversely, BDE-153 was assumed to be essentially metabolically-resistant based on its bromine substitution pattern that is identical to its chlorine homologue, 2,2',4,4',5,5' hexachlorobiphenyl (CB-153), which has been shown to be recalcitrant to any *in vivo* and *in vitro* metabolism in mammalian and avian models (Boon *et al.*, 1997; Borlakoglu and Wilkins, 1993; Kannan *et al.*, 1995). Due to the lack of DP-like assay control compound, the *in vitro* biotransformation assay of DP isomers (*anti*- and *syn*-DP) also included BDE-15, but not BDE-153. All PBDE congeners (BDE-15, -153 and -209) and DP isomers (*anti* and *syn*) were obtained from Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada).

Briefly, for the PBDE incubation mixture, 100 μL of BDE-15, -153 and -209 (stock concentration for each congener of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were combined in 1.5 mL amber certain vial and diluted using isooctane to a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This mixture was then evaporated to dryness under a gentle stream of ultrapure nitrogen (99.999%) and reconstituted in 100 μL of analytical grade acetone. The final concentration of each PBDE congener in the reconstituted acetone-based mixture was 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The same procedure was repeated for the preparation of the DP mixture that included *anti*- and *syn*-DP as well as BDE-15 (final concentration of each congener/isomers: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as well).

2.2.5 IN VITRO BIOTRANSFORMATION ASSAY

The *in vitro* biotransformation assay of BDE-209 and DP isomers using RBGU liver microsomes were performed in triplicates based on methods previously described by Verreault *et al.* (2009b) with minor modifications. The assay was carried out using three adult male RBGU randomly selected from each of the three EROD activity groups (low, medium and high activity) (section 2.3) for a total of nine individuals. Briefly, the test and control samples that consisted of a phosphate buffer (80 mM Na₂HPO₄, 80 mM NaH₂PO₄•H₂O, 6 mM MgCl₂•6H₂O, 1 mM Na₂EDTA; pH 8.0), 3 µL of the reconstituted PBDE or DP mixture in analytical grade acetone (10 µg/mL for each congeners/isomers) and 1 mg of RBGU hepatic microsomal protein suspension were combined on ice for a final volume of 1 mL. This PBDE and DP concentration was estimated, based on previous study conduct on higher vertebrates, to facilitate approximate zero-order with respect to the CYP protein content (McKinney *et al.*, 2006; Verreault *et al.*, 2009b). Thus, the rate of any observed PBDE congener or DP isomers depletion would be independent of the enzyme substrate concentration. The blank samples consisted of phosphate buffer and 1 mg of hepatic microsomal protein suspension. All tubes were then covered with hexane-washed aluminum foil and pre-incubated at 41°C for 5 min before the sequential addition, to all test tubes only, of a NADPH regenerating solution (50 µl of Solution A and 10µl of Solution B; BD Biosciences, Woburn, MA, U.S.). For the control and blank tubes, 60 µl of phosphate buffer was added instead of the NADPH regenerating solution. The assay was allowed to proceed for 90 min in a 41°C shaking (90 rpm) dry bath. The incubation reaction was stopped by the sequential addition of 1 ml of ice-cold 0.5M NaOH to all tubes and these were stored at 4°C until chemical analyses (section 2.6).

2.2.6 CHEMICALS ANALYSIS

The detailed analytical procedure (i.e., sample preparation, extraction, partitioning and clean-up as well as analyte identification and QA/QC results) for the determination of a comprehensive suite of PBDE congeners and *anti*- and *syn*-DP isomers in liver samples of present RBGUs can be found in a companion investigation (Gentes *et al.*, 2012). Chemical

analysis of the *in vitro* liver microsomal incubates was based on procedure described by Gauthier *et al.* (2007) with minor modifications detailed here. In brief, incubates from the *in vitro* biotransformation assays were accurately weighted and spiked with 100 μ l of a 200 ppb internal standard (IS) spiking solution consisting of the following compounds: BDE-30, BDE-156, ^{13}C -BDE-209, ^{13}C -*anti*-DP and ^{13}C -*syn*-DP. Native and mass-labeled PBDE congeners were purchased from Wellington Laboratories, while mass-labeled DP isomers were obtained from Cambridge Isotope Laboratories (MA, U.S.). Extraction was performed on the whole incubates using MtBE:hexane (1:1) and the resulting organic phase was deprotonated by the addition of KCl 1% (w/v) and passed through Na_2SO_4 . Clean-up process for neutral fractions was accomplished using LC-Si SPE cartridges (500 mg X 6 mL; 6 gram; J.T. Baker, U.S.). After conditioning the LC-Si SPE cartridges by successive washes of 6 mL 10% methanol/DCM (v/v) and 8 mL of 5% DCM/hexane (v/v), the samples were loaded onto the cartridge and eluted using 6 mL of 5% DCM/hexane (v/v). The eluant was then concentrated under a gentle stream of ultrapure nitrogen (99.999%) and reconstituted in isooctane to a final volume of 200 μ L. The identification and quantification of target PBDE congeners and DP isomers was performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5890, Palo Alto, CA, U.S.) operating in the electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI) as described in Gentes *et al.* (2012). Lipid determination of liver samples was accomplished by gravimetry followed by a subsequent cleaned-up by gel-permeation chromatography (GPC; O.I. Analytical, College Station, TX, USA).

2.2.7 DATA TREATMENT

The *in vitro* depletion of PBDE congeners (BDE-15, -153 and -209) and DP isomers (*syn*- and *anti*-DP) in RBGU hepatic microsomal incubates was calculated based on differences between the mean triplicate test and control samples (in ng per sample tube), and expressed as the concentration ratio of tests over controls. Student *t*-test was performed to test the differences between test and control tubes within each EROD activity groups. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test differences between EROD-based groups for the depletion of PBDEs and DP isomers. Kruskal-Wallis *post hoc* test was

performed to further investigate differences between each EROD activity groups for the depletion of compounds. Moreover, simple regressions were used to test the associations between hepatic EROD activities, *in vitro* PBDE/DP depletion ratios and percentages as well as PBDE/DP concentrations determined in liver of RBGUs (concentration of sums and individual compounds). The concentrations of PBDEs and DPs were log-transformed to achieve the normal distribution as all other variables were normally distributed based on the Shapiro-Wilk test. The statistical package utilized was JMP® 9.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.), and relationships were considered to be significant when $p \leq 0.05$, and were considered as trends when $0.05 < p \leq 0.1$.

2.3 RESULTS

2.3.1 CONCENTRATIONS OF PBDEs AND DPs IN LIVER

Table II. Mean (\pm S.E.) and data range of lipid content (%) and concentrations (ng/g ww) of selected higher-brominated PBDE congeners and DP isomers determined in liver of male RBGUs (n=9) nesting on Deslauriers Island in the St-Lawrence River, downstream from Montreal (QC, Canada). Partial data from Gentes *et al.* (2012)

	Samples >MLOD (%)	Mean \pm S.E.	Range
Lipid (%)		3.15 \pm 0.29	2.02-5.18
PBDEs			
Σ_3 heptaBDE	100 %	8.72 \pm 2.79	0.68-26.6
Σ_5 octaBDE	100 %	17.7 \pm 5.95	1.57-46.7
Σ_2 nonaBDE	100 %	17.6 \pm 6.34	1.15-49.2
BDE-209	100 %	69.3 \pm 29.7	2.74-283
Σ_{18} PBDE ^a	100 %	240 \pm 81.2	25.5-674
DP isomers			
<i>anti</i> -DP	100 %	6.61 \pm 3.13	0.72-29.8
<i>syn</i> -DP	100 %	2.77 \pm 1.36	0.02-12.7

^a $\Sigma_{(18)}$ PBDE : Sum of following congeners : 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), 2,2',3,4,4'-pentabromodiphenyl ether (BDE-85), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100), 2,2',3,4,4',5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-138), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-153), 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether/2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyle (BDE-154/BB153), 2,2',3,3',4,4',5-heptabromodiphenyl ether (BDE-170), 2,2',3,3',5,6,6'-heptabromodiphenyl ether (BDE-179), 2,2',3,4,4',5',6-heptabromodiphenyl ether (BDE-183), 2,2',3,3',4,4',5',6-octabromodiphenyl ether (BDE-196), 2,2',3,3',4,4',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-197), 2,2',3,3',4,5',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-201), 2,2',3,3',5,5',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-202), 2,2',3,4,4',5,5',6-octabromodiphenyl ether (BDE-203), 2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nonabromodiphenyl ether (BDE-207), 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonabromodiphenyl ether (BDE-208) et 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209).

Levels of PBDEs determined in liver of the nine male RBGUs for which EROD activity and *in vitro* biotransformation assays were performed (sections 2.3.2 and 2.3.3) revealed remarkably high percent detection and concentrations of BDE-209 (*Table II*). This fully brominated congener accounted for approximately 30% of Σ_{18} PBDE in that particular

sample subset. Moreover, a large number of known or suggested hepta- through nona-brominated debromination products of BDE-209 were measured at relatively high levels in RBGU liver (range: 3-7% of \sum_{18} PBDEs). The liver concentrations of BDE-209 were found to positively correlate with those of the summed hepta-, octa- and nona-BDE congeners (Figure 2.1). Moreover, congener-specific analyses revealed that BDE-207 concentrations exhibited the strongest positive correlation with those of BDE-209 ($r = 0.95$; $p < 0.0001$), followed by BDE-197 ($r = 0.94$; $p < 0.0001$) and BDE-183 ($r = 0.94$; $p < 0.0001$). The *syn*- and *anti*-DP isomers were detected in all nine RBGU liver samples, although the contribution of each isomer was unequal with preference for *anti*-DP accumulation (Table II). More specifically, concentrations of *anti*-DP represented 70% of the summed DP isomers measured in RBGU liver. Details on concentrations and profiles of the full suite of PBDE congeners and current-use FRs (including DP) determined in liver sample of all RBGUs examined in 2010 ($n = 25$) can be found in a companion investigation (Gentes *et al.*, 2012).

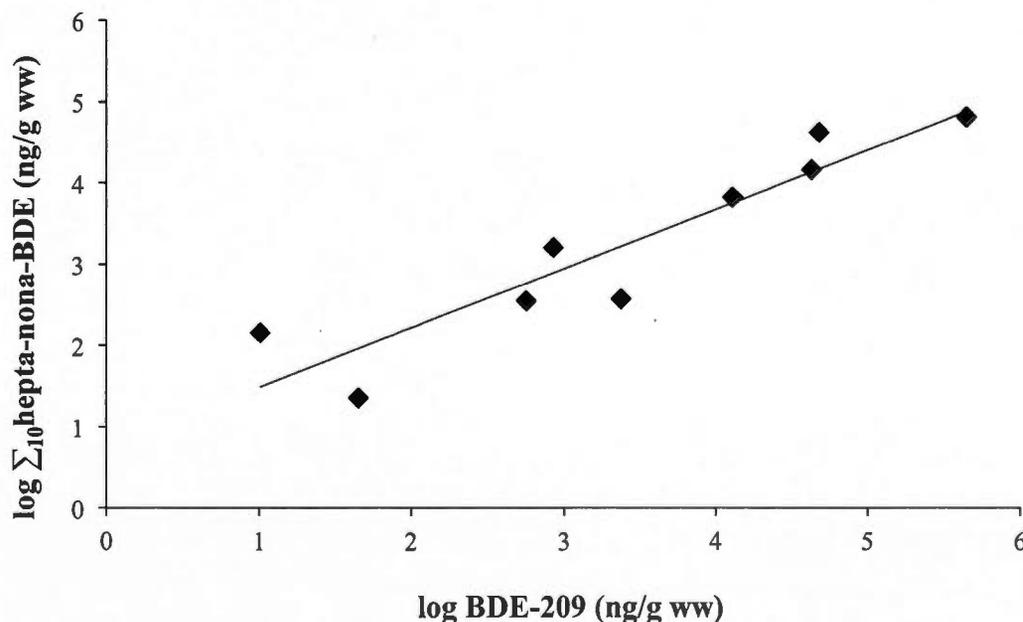


Figure 2.1. Relationship between concentrations (log-transformed ng/g ww) of BDE-209 and the sum of hepta-, octa- and nona-brominated PBDEs in liver of male RBGUs ($n=9$) ($y = 0.73x + 0.75$; $r^2 = 0.86$; $p = 0.0003$).

2.3.2 HEPATIC EROD ACTIVITY

Mean hepatic EROD activity determined in all RBGUs (n = 25) was 451 ± 33.7 pmol/min/mg, with activities ranging between 237 and 786 pmol/min/mg. This relatively wide range of EROD activities allowed for categorization of individual birds onto three arbitrary EROD activity groups: low (n = 9), medium (n = 8) and high (n = 8) EROD activity groups. The mean EROD activity for the low, medium and high EROD activity groups were 268 ± 15.0 pmol/min/mg (range: 237-379 pmol/min/mg), 469 ± 18.0 pmol/min/mg (range: 400-526 pmol/min/mg) and 639 ± 33.0 (range: 531-786 pmol/min/mg), respectively. Because females (n = 6) were overrepresented in the low EROD activity group and absent in the medium group, three male RBGUs were randomly-selected within each of the EROD activity groups for the *in vitro* biotransformation assays (n = 9 in total) (section 2.3.3). For this particular sample subset as well as for all combined RBGUs, no significant relationship was found between liver concentration of \sum_{18} PBDE, \sum DP or individual congeners/isomers, and hepatic EROD activity (data not shown).

2.3.3 IN VITRO DEPLETION OF PBDES

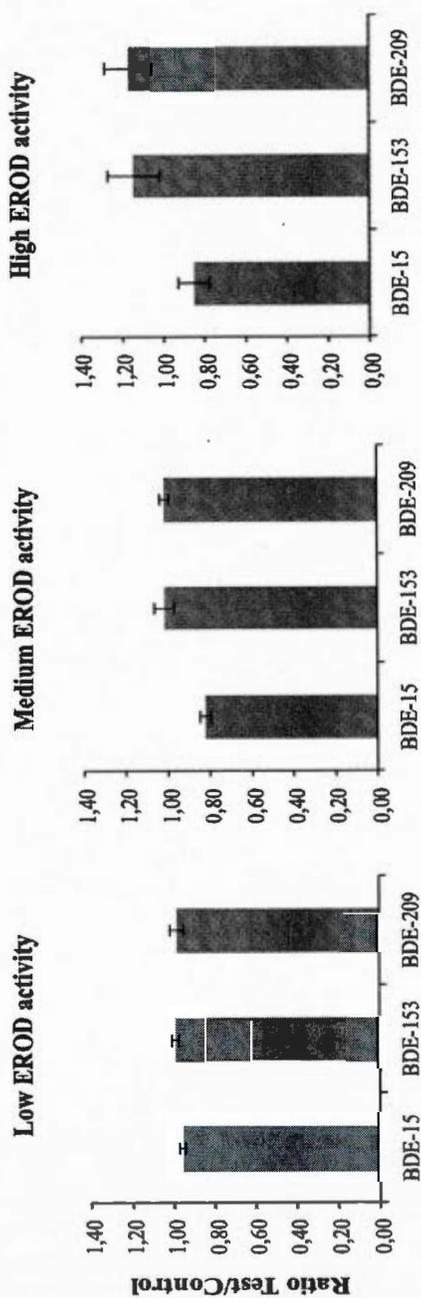


Figure 2.2. Concentrations ratios (ng; \pm S.E.) of BDE-15, -153 and -209 determined in test and control tubes (in triplicates) in the hepatic microsomal *in vitro* assay of male RBGUs (n=9). RBGUs were randomly selected within each of the three EROD activity groups (low, medium and high; section 2.2.3).

Noticeable depletion of BDE-15 occurred in each of the three EROD activity groups with 6%, 18% and 15% depletion in the low, medium and high EROD activity group, respectively (Figure 2.2). However, significant difference between test and control tubes (analyzed in triplicates) was found for the medium EROD activity group only ($p = 0.04$), while weak or no tendency was found for the low and high EROD activity groups ($p = 0.12$ and 0.23 , respectively). No significant depletion was observed for both BDE-153 and -209 over the 90-min time frame of the assay in any birds.

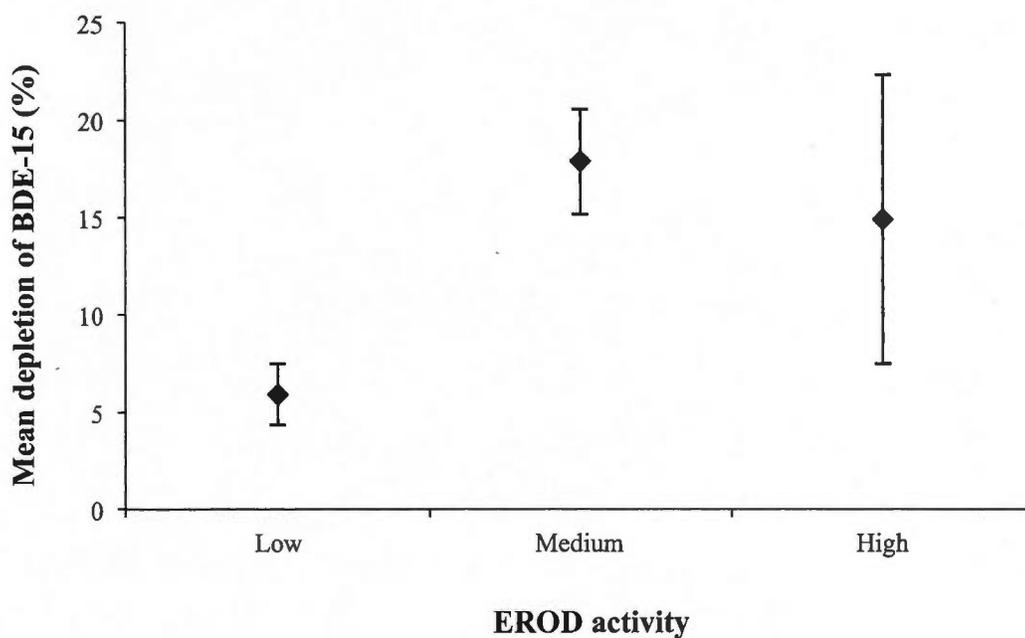


Figure 2.3. Mean percentage depletion of BDE-15 (\pm S.E.) based on a hepatic microsomal *in vitro* biotransformation assay with male RBGUs ($n=9$). RBGUs were randomly selected within each of the three EROD activity groups (low, medium and high).

The overall difference in the depletion of BDE-15 revealed a tendency between RBGUs categorized in the low, medium and high EROD activity groups ($p = 0.07$) (Figure 2.3). Post-hoc analysis (Kruskal Wallis test) further showed that BDE-15 tended to be more depleted in the medium relative to the low EROD activity group ($p = 0.08$). No significant

BDE-15 depletion difference ($p = 0.19$) was found between the low and high EROD activity groups and the medium and high EROD activity groups due to high data spread in the latter group.

2.3.4 IN VITRO DEPLETION OF DPS

The DP *in vitro* biotransformation assay was carried out for three male RBGUs, one from each of the three EROD activity group, and showed no significant depletion for both isomers over the 90-min time frame of the assay (results not shown). In contrast, BDE-15 included as positive control in the DP assay was consistently and significantly depleted among birds with 13%, 31% and 6% depletion for the low, medium and high EROD activity groups, respectively. Moreover, significant difference between concentrations of the test and control tubes for the depletion of BDE-15 was achieved in this assay (prob. $< t$ 0.04). Based on these results, the DP *in vitro* biotransformation assays was not performed for the remaining six males used in the PBDE *in vitro* assay.

2.4 DISCUSSION

2.4.1 BDE-209 AND DP CONCENTRATIONS IN LIVER

Concentrations and congener pattern of PBDEs determined in liver of RBGUs nesting on Deslauriers Island generally stood out from what has been usually reported for aquatic birds, including the predominantly fish-eating Larid family. More specifically, as recently reported in a companion investigation (Gentes *et al.*, 2012) that included the present subset of nine male RBGUs, the relative contribution of BDE-209 in liver of combined males and females accounted for approximately 25% of Σ_{18} PBDE concentrations. It was suggested by these authors that such high BDE-209 relative contribution and concentrations in RBGU tissues and eggs could be associated with exposure of RBGUs to multiple and significant sources of historical and current-use deca-BDE in the greater Montreal area, combined to potentially low biotransformation capacity toward this compound. Comparatively, as also reported by Gentes *et al.* (2012) who screened for the presence of *anti*- and *syn*-DP isomers in RBGU liver, the detection frequencies and concentrations of both these DP isomers were noticeably high. Mean levels of Σ DP reported in this work were comparable to those reported in herring gull eggs from the Great Lakes region where the only known production facility of DP in North America is located (OxyChem, Niagara Falls, NY, U.S.). Even though level data on DP isomers in birds is still very limited, mean Σ DP levels measured in liver of present RBGUs supported that birds inhabiting North America generally exhibit a greater DP body burden in comparison with European birds, which may be explained by the relative proximity to the DP production facility and its greater use in North America (Guerra *et al.*, 2011). A more comprehensive discussion on PBDE and DP levels and profiles in RBGU liver and plasma can be found in Gentes *et al.* (2012).

2.4.2 BDE-209 DEBROMINATION PRODUCTS IN LIVER

Present investigation revealed the occurrence of a large suite of known or suspected debromination products of BDE-209 in RBGU liver including three hepta-BDEs (BDE-183 > -170 > -179), five octa-BDEs (BDE-197 > -196 \approx -201 > -203 > -202) and two nona-BDEs

(BDE-207 > -208). This higher brominated PBDE congener pattern in RBGUs was fairly identical to that reported in herring gulls from the Laurentian Great Lakes (Gauthier *et al.*, 2008), with the only exception being for the octa-BDEs in which BDE-179 was more abundant than BDE-170. Furthermore, the mean relative contribution of combined hepta-through nona-BDE concentrations to \sum_{18} PBDEs in RBGU liver (18%) was slightly higher with that reported (10%) by Chen *et al.* (2010) in birds of prey from the Chesapeake Bay (U.S.). Conversely, median concentration ratio of BDE-207 to BDE-209 in liver of RBGUs was approximately 1:5, which was substantially smaller than the same ratio reported in peregrine falcon eggs (1:1.5) (Chen *et al.*, 2010). Results of both these studies highly contrasted with BDE-207 to BDE-209 concentration ratio measured in the commercial deca-BDE mixture (1:400) (Saytex 102E, Albermale Corp., Louisiana) (La Guardia, Hale and Harvey, 2006). The study by Chen *et al.* (2010) further reported strong positive correlation between combined concentrations of hepta-, octa- and nona-BDEs and those of BDE-209, which was in accordance with present RBGU study in which BDE-207 concentrations also exhibited the strongest positive correlation with BDE-209, followed by BDE-197 and BDE-183.

2.4.3 IN VITRO BIOTRANSFORMATION OF BDE-209

This study revealed no *in vitro* biotransformation of BDE-209 and BDE-153 using hepatic microsomes of male RBGUs over the 90-min time frame of the assay, whereas noticeable depletion of the dibrominated congener, BDE-15, was achieved. To our knowledge Van den Steen *et al.* (2007) is the only previous study that has addressed the metabolic fate of BDE-209 in a bird species. This research group showed that BDE-209 accumulated in muscle and liver of European starlings (*Sturnus vulgaris*) using subcutaneous silastic implant and was debrominated down to hexa-BDEs, with the most pronounced difference observed between the control group and exposed group for the nona- (BDE-206, -207 and -208) and octa-BDEs (BDE-196 and -197). These results strongly suggested that BDE-209 accumulated in starling tissues and further underwent *in vivo* biotransformation. However, since no *in vitro* biotransformation assay was performed by Van den Steen *et al.* (2007), the results of the present RBGU investigation could not be corroborated with this

avian study, although general tissue profiles of nona- and octa-brominated BDEs were comparable in both these investigations.

Nevertheless, the bulk of *in vitro* BDE-209 biotransformation studies have been undertaken in fish. For example, Kierkegaard *et al.* (1999) observed the accumulation of several hexa- to nona-BDEs following experimental dosage with deca-BDE-treated food in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In this study, concentrations of these higher-brominated PBDE congeners increased with exposure duration in liver and muscle, although the authors could not positively confirm whether these were the result of BDE-209 metabolism and/or selective uptake of minor components or impurities present in the technical deca-BDE mixture. Moreover, Stapleton *et al.* (2004) reported on the formation of seven unknown compounds (penta- to octa-BDEs) in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) following a 60-day dietary exposure to BDE-209-spiked food pellets. Subsequently, this same research group explored the debromination of BDE-209 in an *in vitro* experiment with microsome preparation of rainbow trout and common carp (Stapleton *et al.*, 2006). In this work, rainbow trout liver microsomes biotransformed 22% of BDE-209 after a 24h incubation period, which resulted in the accumulation of nona- and octa-BDE congeners, while carp liver microsomes were able to biotransform up to 65% of BDE-209 and generate congeners down to hexa-BDEs. However, in this same study, outcomes from the 1h incubation period showed a limited 2% and 5% degradation of BDE-209 in rainbow trout and common carp, respectively.

More recently, *in vitro* biotransformation of BDE-209 has also been examined in arctic marine-feeding mammals. Hepatic microsome of polar bear (*Ursus maritimus*), beluga whale, ringed seal (*Pusa hispida*) and laboratory rat (as a mammalian model species) significantly depleted BDE-209 over the 90-min time frame of the assay reaching up to 25% depletion. Depletion of BDE-209 was also greater relative to lower brominated congener (e.g., BDE-99, -100 and -154), which is in contrast with present findings. However, no clear evidence of debrominated BDE-209 metabolites was observed from that study (McKinney *et al.*, 2011).

The present RBGU study uncovered no correlative linkage between hepatic EROD activity and liver concentrations of Σ_{18} PBDE, Σ DP and individual congeners/isomers. These findings were consistent with other studies that indicated that PBDEs generally are poor inducers of hepatic microsomal EROD activity resulting from gene expression via the aryl hydrocarbon receptor (AhR) since their conformation is more bulky and globular (Chen and Bunce, 2003; Wang *et al.*, 2005). Interestingly, an influence of EROD activity categorization was found on the *in vitro* depletion percentages of BDE-15, with a nearly significant difference noted between the low and medium EROD activity group. However, such observation has not been achieved between the low and high EROD activity groups or between the medium and high EROD activity groups most likely due to high data spread in the latter group. The association between CYP1A-like enzyme activity and BDE-15 *in vitro* depletion suggested potential link between induction of hepatic microsomal CYP enzyme subfamilies and degradation of this dibrominated congener. In fact, a study by Boon, Lewis and Goksoyr (2001) that examined the catalytic potencies of hepatic microsomal CYP isoenzymes of a set of organic pollutants showed that CYP1A1 and/or 1A2 isoenzymes both played a key role in the biotransformation of the planar CB-15 (homologue to BDE-15). It has been shown that CYP1A1/2 enzyme-mediated attack is facilitated for planar or near planar molecules (i.e., *ortho* positions on the aromatic ring being halogen-unsubstituted) and for smaller molecule, as some authors have noted an inverse relationship between metabolic rates and the degree of bromination of the phenyl rings that comprise the diphenyl ether molecular backbone (McKinney *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2012).

To the contrary, a bromine substitution on the diphenyl ether backbone in the four *ortho* positions (2,2',6,6') results in much steric hindrance of ring rotation, and thus the phenyl rings are highly non-planar and orthogonal with respect to the ether linkage. This orthogonal conformation and restricted rotation around the ether linkage is expected for the fully brominated BDE-209 (Hardy, 2002). Hence, the bulky and globular structure of BDE-209 would render this congener a poor substrate for CYP1A1/2-like isoenzyme-mediated catalysis. Nonetheless, BDE-209 could be a better substrate for CYP3A-like enzyme-mediated transformation. CYP3A-like isoenzymes have been described to be very versatile with low substrate specificity and affinity to more bulky and globular molecules (Liu *et al.*,

2007). Supportive evidence was reported by Pacyniak *et al.* (2007) who observed induction of CYP3A11 in mice liver following injection of BDE-209, suggesting that this PBDE congener is a potent PXR activator. McKinney *et al.* (2011) also has suggested that the higher brominated congeners like BDE-209 and the lower brominated PBDEs would not be substrates for the same isoenzymes. They reported that hepatic microsomes of various marine mammals incubated only with NADPH as cofactor yielded no detectable depletion of BDE-209, thus proposing that CYPs may not be involved at least, in the first steps of BDE-209 biotransformation. Therefore, taking together with present findings, that could explain the lack of depletion observed from the current study in regards of the biotransformation of BDE-209 by RBGU microsomes.

Regardless, it has been suggested elsewhere that BDE-209 likely undergo debromination first, thus paving the way for subsequent oxidative reactions (e.g., hydroxylation) with the implication of possibly deodinase-mediated debromination. Deodinase catalyze the selective removal of iodine atom from the meta positions of thyroid hormones (Morck *et al.*, 2003; Sandholm, Emanuelsson and Wehler, 2003; Stapleton *et al.*, 2004; Stapleton *et al.*, 2006; Tomy *et al.*, 2004). *Meta*-debromination of BDE-209 may theoretically lead to the formation of BDE-207, which can further be *meta*-debrominated to form BDE-197 (Gauthier *et al.*, 2008). Both these congeners were measured at higher concentrations in present RBGU liver relative to other higher-brominated PBDEs.

2.4.4 IN VITRO BIOTRANSFORMATION OF DP

To our knowledge, this RBGU study was the first addressing the biotransformation of DP in any bird species. Results from the *in vitro* assay indicated that no degradation of both DP isomers occurred over the 90-min time frame of the assay. Because of the structural conformation of *anti*-DP that is characterized by four chlorine-unsubstituted carbons on the cyclooctane moiety (i.e., limited chlorine-atom hindrance), it would have been expected that this particular DP isomer have been prone to enhanced microsomal enzyme-mediated depletion relative to the *syn*-DP, although this was not witnessed in present study. Nonetheless, dechlorinated metabolites (e.g., DP-1Cl and DP-2Cl) have been identified in

sediments of Niagara River (NY, U.S.) (Sverko *et al.*, 2008). Since this work, a growing number of studies have reported on the presence of dechlorinated DP products in various environmental samples and in humans, including eggs of white storks (*Ciconia ciconia*) from Spain (DP-1Cl) (Munoz-Armanz *et al.*, 2011), serum from workers in an e-waste recycling plant (DP-1Cl) (Ren *et al.*, 2009) and human hair and dust collected from an e-waste recycling region in South China (Zheng *et al.*, 2010). Tomy *et al.* (2008), on the other hand, investigated the presence of potential *in vivo* hepatic metabolites of *syn*- and *anti*-DP in juvenile rainbow trout. Despite the purposely-high DP dose used in the uptake phase of the experiment, these authors were not able to detect any dechlorinated, hydroxylated, methoxylated or methyl sulfone DP degradates in liver extracts, and hence suggested that the occurrence of DP metabolites in fish from the environment would rather be accumulated through the food web than being generated *in vivo* via metabolism of the parent compound. Similarly, Ren *et al.* (2009) did not detect hydroxylated DP metabolites in human serum. These two studies seem to abound in the same direction as the present RBGU *in vitro* study proposing that enzyme-mediated metabolism of DP isomers in wildlife (e.g., RBGU) might be very low, if only it does occur.

2.5 CONCLUSION AND FUTURE WORK

Because no biotransformation of BDE-209 was observed in present *in vitro* assay using hepatic microsomes of naturally-exposed RBGUs, high levels of BDE-209 that correlated with those of hepta-, octa- and nona-BDEs congeners in liver of this species may be indicative of concomitant dietary (e.g., fish) and environmental exposure in the Greater Montreal area, and subsequent bioaccumulation of these higher-brominated congeners (Gentes *et al.*, 2012). These findings also supported the idea that the presence of these known or suggested BDE-209 debromination products in RBGU may have arisen, at least in part, from natural degradation processes including UV radiation (La Guardia, Hale and Harvey, 2007; Soderstrom *et al.*, 2004) or microbial degradation (He, Robrock and Alvarez-Cohen, 2006). Similarly, the non-degradation of DP isomers in present *in vitro* assay highly suggested that RBGUs possess no biotransformation capacity toward these isomers. However, present experimental design did not allow excluding that biotransformation of BDE-209 or DP does not take place in RBGUs. First, a longer time frame than 90 min for the *in vitro* biotransformation assays could potentially have yielded positive degradation of BDE-209 as seen in the Stapleton *et al.* (2006) study where greater percentage depletion of this congener was achieved in fish (liver microsome) over a 24h incubation period relative to 1h. Therefore, the 90-min time frame of the *in vitro* assay in present study could have been too short to capture any depletion of this fully brominated congener (or DP). Second, degradation of BDE-209 in RBGU liver might not have been a CYP-mediated process. For instance, deodinase (e.g., in liver) have been proposed to be involved in the biotransformation of higher brominated PBDE congeners in rats and fish, and should be considered in future bird studies.

Globally, present study prompted the need for more studies on the toxicokinetics of current-use deca-BDE and DP in birds as large environmental reservoirs of these compounds are building up in aquatic and terrestrial ecosystems. Furthermore, DP is at present time still unregulated chemical worldwide and a suggested candidate for replacement of the deca-BDE commercial mixture (to be banned by 2013 in Canada and U.S.), which may lead to increased usage of this chlorinated FR in years to come.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this project was provided by a Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant (to J.V. and R.J.L.) and the Canada Research Chair in Comparative Avian Toxicology (to J.V.). Special thanks to Dr. Robert J. Letcher's laboratory personnel (Dr. Shaogang Chu) at Environment Canada (National Wildlife Research Centre, Ottawa, Canada) as well as Ms. Vicky Doré (Université du Québec à Montréal, Montreal, Canada) for assistance with the chemical analysis.

CONCLUSION

En somme, le présent travail de recherche a eu pour objectif d'éclaircir le potentiel de biotransformation de deux FR d'utilisation courante sur le marché mondial, et ce, dans une perspective plus large d'acquisition de connaissances sur la biotransformation des ignifuges organohalogénés chez les oiseaux étant donné le peu d'informations disponibles.

À cet effet, la présente recherche a porté son attention sur la situation actuelle de la contamination du fleuve Saint-Laurent par les FR en choisissant comme modèle d'étude, le goéland à bec cerclé. Plusieurs raisons ont justifié ce choix d'espèce dont son style de vie urbain à périurbain, son abondance, son alimentation très diversifiée, sa position dans les sommets de la chaîne trophique en plus de la présence de la colonie à proximité de nombreuses sources locales de pollution (FR). Par ailleurs, la présente recherche a démontré que le goéland à bec cerclé est fortement exposé et de façon chronique à une multitude de FR issus de son environnement, dont le BDE-209 et le DP investigués par le présent travail de recherche et a, au final, justifié son utilisation à titre d'espèce-modèle pour cette recherche.

La méthodologie employée sur le terrain et au laboratoire se compare favorablement aux travaux effectués par d'autres groupes de recherche et a permis de cerner pour la première fois, à l'aide d'un essai de biotransformation *in vitro*, le devenir du BDE-209 et des isomères du DP au sein d'une espèce aviaire naturellement exposée. L'émergence de littérature scientifique faisant état du potentiel de débromination au sein d'espèces animales telles que chez les poissons et les rats nous a d'abord suggéré que le BDE-209 serait vraisemblablement biotransformé suivant le design expérimental proposé. Toutefois, aucune déplétion de ce congénère n'a pu être mesurée lors des différents essais de biotransformation *in vitro* effectués. Plusieurs raisons ont été proposées pour expliquer ce résultat, dont la durée de l'essai lui-même. Tout d'abord, la période d'incubation de cet essai est d'une durée de 90 minutes pendant laquelle les microsomes isolés du foie des GBC sont en contact avec les congénères ciblés des PBDE. Ce temps de réaction pourrait s'être avéré trop court pour obtenir une dégradation significative du BDE-209. Par ailleurs, la structure moléculaire particulière de ce congénère pourrait aussi avoir contribué à ce résultat en ne représentant pas

un substrat idéal à l'attaque enzymatique médiée par les CYP. La position orthogonale des deux cycles diphényles en plus de l'insertion complète d'atomes de brome sur le squelette de la molécule pourrait prévenir les mécanismes d'oxydation normalement catalysés par ces enzymes.

La prévalence des produits de débromination observée chez le GBC ne peut donc pas être expliquée par les présents résultats au regard de l'absence de biotransformation du BDE-209. Bien que l'on ne puisse pas exclure que des processus de biotransformation affectant l'intégrité moléculaire du BDE-209 aient véritablement lieu chez le GBC, on ne peut qu'expliquer la présence de ces produits de débromination par leur présence dans l'environnement immédiat du GBC. Effectivement, il a été démontré que le BDE-209 pouvait être sujet à une dégradation par des processus naturels (rayons UV et dégradation microbienne) générant des congénères moins bromés. Étant plus mobiles et bioaccumulables, une absorption préférentielle de ces congénères pourrait avoir lieu et expliquerait, en partie, le profil observé de ces produits de débromination chez le GBC. De plus, comme précisé ultérieurement, il est possible que le BDE-209 soit dégradé par les poissons, source de nourriture occasionnelle pour les GBC, et que cela puisse se refléter dans le profil de contamination observé dans ses tissus.

Similairement au BDE-209, aucune biotransformation des isomères *syn*- et *anti*-DP n'a été mesurée lors des essais de biotransformation *in vitro*. Malgré le caractère plus exploratoire de ce volet, il avait tout de même été présagé qu'une déplétion mesurable des deux isomères aurait pu être observée, particulièrement en ce qui a trait à l'isomère *anti*-DP en raison de sa structure moléculaire. Or, les deux isomères n'ont pas été biotransformés et cela semble indiquer que les isomères du DP seraient apparemment réfractaires au métabolisme médié par les enzymes microsomiales hépatiques. Toutefois, comme pour le BDE-209, la durée de l'essai pourrait être prolongée afin de vérifier si ce résultat est attribuable à un temps de réaction trop court ou si le DP est simplement non métabolisé au sein du GBC. Une étude conduite chez la truite nous fait penser qu'effectivement, les isomères du DP ne seraient pas susceptibles à l'attaque enzymatique bien que des métabolites déchlorés fussent répertoriés récemment dans l'environnement.

Ainsi, comme précisés préalablement, les résultats obtenus de cette recherche n'étaient pas ceux auxquels nous nous attendions, mais contribuent tout de même à l'amélioration et à l'essor de l'état des connaissances relativement à la biotransformation de ces composés au sein d'un organisme vivant. De plus, certaines recommandations peuvent en être tirées ainsi que des pistes de recherche à envisager afin d'amener ce projet plus loin. Du point de vue méthodologique, il pourrait être envisagé un temps d'incubation supérieur à 90 minutes afin d'observer une déplétion du BDE-209 et peut-être même, des isomères du DP, chez le GBC. Également, il pourrait être possible d'augmenter les concentrations de microsomes dans les essais de biotransformation *in vitro*. Il serait aussi intéressant d'effectuer d'autres essais d'activité enzymatique que celui d'EROD qui pourraient refléter davantage l'activité d'isoenzymes potentiellement impliquées dans les réactions de biotransformation de congénères plus globuleux et volumineux. Par exemple le biomarqueur d'exposition ÉCOD (éthoxycoumarin-o-dééthylase) reflétant notamment l'activité de plusieurs cytochromes dont les CYP2A et 2B, le biomarqueur PROD (pentoxyrésorufine O-déalkylase) traduisant globalement de l'activité de la sous-famille CYP2B ou le biomarqueur T6H (testostérone 6-hydroxylase) reflétant l'activité des CYP3A pourrait révéler des corrélations non observées par le présent travail de recherche entre l'activité enzymatique des microsomes et les différents paramètres de l'étude. Comme piste de recherche également, l'implication des déodinasés dans la biotransformation de FR fortement bromés comme le BDE-209 serait une avenue judicieuse à explorer.

En somme, l'utilisation de retardateurs de flammes halogénés représente certes une assurance du point de vue des normes d'inflammabilité des produits domestiques et manufacturiers, mais se solde à ce jour par leur présence ubiquitaire dans l'environnement avec comme conséquence, des effets potentiellement néfastes pour la faune et les humains. La production et l'utilisation massive du BDE-209 ont provoqué l'apparition d'importants réservoirs dans les milieux aquatiques et terrestres pour les générations à venir en plus des milieux urbains qui s'avèrent également être une source d'exposition significative au BDE-209. De plus, la présence de produits de débromination du BDE-209 mesurés dans diverses matrices biotiques et abiotiques de l'environnement soulève des questionnements sur ladite stabilité physicochimique de cette molécule et pourrait rendre caduque, tous les efforts et

législations entourant les mélanges PBDE précédemment bannis. En effet, ces puits de BDE-209 pourraient représenter des sources à long terme de molécules débrominées se retrouvant notamment, dans les mélanges techniques Penta- et Octa-BDE présentement bannis. En parallèle, la production grandissante d'un composé alternatif important, le DP, ainsi que le peu d'information relative à sa toxicocinétique chez les espèces fauniques commande que l'on porte notre attention sur cette situation qui aura transformé un produit ignifuge d'usage courant en un polluant d'intérêt émergent. L'importance d'études comme celle-ci apparaît donc cruciale afin de comprendre le devenir de ces substances au sein des organismes vivants et des écosystèmes, surtout lorsqu'il est pris en compte la propension des industries chimiques à renouveler sans cesse leur contribution au cocktail toxique environnemental actuel.

RÉFÉRENCES

- Alaee, M., P. Arias, A. Sjodin et A. Bergman. 2003. « An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release ». *Environ Int*, vol. 29, no 6, p. 683-689.
- Andersson, Ö., et G. Blomkvist. 1981. « Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden ». *Chemosphere*, vol. 10, no 9, p. 1051-1060.
- Birnbaum, L. S., et D. F. Staskal. 2004. « Brominated flame retardants: cause for concern? ». *Environ Health Perspect*, vol. 112, no 1, p. 9-17.
- Boon, J. P., W. E. Lewis et A. Goksoyr. 2001. « Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) ». *Aquat Toxicol*, vol. 52, no 3-4, p. 297-309.
- Boon, J. P., J. van der Meer, C. R. Allchin, R. J. Law, J. Klungsoyr, P. E. Leonards, H. Spliid, E. Storr-Hansen, C. McKenzie et D. E. Wells. 1997. « Concentration-dependent changes of PCB patterns in fish-eating mammals: structural evidence for induction of cytochrome P450 ». *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 33, no 3, p. 298-311.
- Borlakoglu, J. T., et J. P. Wilkins. 1993. « Correlations between the molecular structures of polyhalogenated biphenyls and their metabolism by hepatic microsomal monooxygenases ». *Comp Biochem Physiol C*, vol. 105, no 1, p. 113-117.
- Brousseau, P. 1995. « Goéland à bec cerclé ». In *Les oiseaux nicheurs du Québec : atlas des oiseaux nicheurs du Québec méridional.*, p. 514-517 : Service canadien de la faune, Environnement Canada (région du Québec).
- BSEF, Bromine Science and Environmental Forum. 2003. « Major brominated flame retardants volume estimates: Total market demand by region in 2001 ». En ligne. http://www.bsef-site.com/docs/BFR_vols_2001.doc.
- BSEF, Bromine Science and Environmental Forum. 2012. « About Deca-BDE ». En ligne. <http://www.bsef.com/our-substances/deca-BDE/about-deca-BDE/>. Consulté le 06, 2012.
- Bustnes, J. O., J. U. Skaare, K. E. Erikstad, V. Bakken et F. Mehlum. 2001. « Whole blood concentrations of organochlorines as a dose metric for studies of the glaucous gull (*Larus hyperboreus*) ». *Environ Toxicol Chem*, vol. 20, no 5, p. 1046-1052.
- Canada gazette, 2. 2008. « Règlement sur les polybromodiphényléthers ». *Gazette du Canada Partie II*, vol. 142, no 14, p. 1663-1682.

- Casarett, L. J., et J. Doull (2008). Casarett & Doull's toxicology : The basic science of poisons. , McGraw-Hill Professional : 1310 p
- Chen, D., et R. C. Hale. 2010. « A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds ». *Environ Int*, vol. 36, no 7, p. 800-811.
- Chen, D., R. C. Hale, B. D. Watts, M. J. La Guardia, E. Harvey et E. K. Mojica. 2010. « Species-specific accumulation of polybrominated diphenyl ether flame retardants in birds of prey from the Chesapeake Bay region, USA ». *Environ Pollut*, vol. 158, no 5, p. 1883-1889.
- Chen, D., M. J. La Guardia, E. Harvey, M. Amaral, K. Wohlfort et R. C. Hale. 2008. « Polybrominated diphenyl ethers in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the northeastern U.S ». *Environ Sci Technol*, vol. 42, no 20, p. 7594-7600.
- Chen, D., R. J. Letcher, N. M. Burgess, L. Champoux, J. E. Elliott, C. E. Hebert, P. Martin, M. Wayland, D. V. Chip Weseloh et L. Wilson. 2012. « Flame retardants in eggs of four gull species (*Laridae*) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada ». *Environ Pollut*, vol. 168, p. 1-9.
- Chen, D., R. J. Letcher et P. Martin. 2012. « Flame retardants in eggs of American kestrels and European starlings from southern Lake Ontario region (North America) ». *J Environ Monit*.
- Chen, G., et N. J. Bunce. 2003. « Polybrominated diphenyl ethers as Ah receptor agonists and antagonists ». *Toxicol Sci*, vol. 76, no 2, p. 310-320.
- Convention de Stockholm, Genève. 2009. « The new POPs under the Stockholm Convention ». En ligne.
<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>.
- Costa, L. G., G. Giordano, S. Tagliaferri, A. Caglieri et A. Mutti. 2008. « Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects ». *Acta Biomed*, vol. 79, no 3, p. 172-183.
- Crump, D., S. Chiu, L. T. Gauthier, N. J. Hickey, R. J. Letcher et S. W. Kennedy. 2011. « The effects of Dechlorane Plus on toxicity and mRNA expression in chicken embryos: a comparison of in vitro and in ovo approaches ». *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, vol. 154, no 2, p. 129-134.
- Darnerud, P. O. 2003. « Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife ». *Environ Int*, vol. 29, no 6, p. 841-853.

- Darnerud, P. O., G. S. Eriksen, T. Johannesson, P. B. Larsen et M. Viluksela. 2001. « Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology ». *Environ Health Perspect*, vol. 109 Suppl 1, p. 49-68.
- de Wit, C. A. 2002. « An overview of brominated flame retardants in the environment ». *Chemosphere*, vol. 46, no 5, p. 583-624.
- de Wit, C. A., M. Alaee et D. C. Muir. 2006. « Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic ». *Chemosphere*, vol. 64, no 2, p. 209-233.
- DeCarlo, V. J. 1979. « Studies on brominated chemicals in the environment ». *Ann NY Acad Sci*, vol. 320, p. 678-681.
- EBFRIP, European Brominated Flame Retardant Industry Panel. 2008. « The RoHS Directive and Deca-BDE ». En ligne. <http://www.ebfrip.org/main-nav/european-regulatory-centre/rohs-directive-restriction-of-the-use-of-certain-hazardous-substances-in-electrical-and-electronic-equipment/the-rohs-directive-and-deca-bde>. Consulté le 24 juillet 2012.
- Environnement Canada, EC. 2011. « Gestion des risques liés au décabromodiphényléther (décaBDE) : engagement volontaire envers l'élimination progressive des exportations au Canada ». En ligne. <http://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/default.asp?lang=Fr&n=F64D6E3B-1&xml=F64D6E3B-0328-4C11-A9E4-790D053E42A1>. Consulté le 24 juillet 2012.
- Eriksson, P., H. Viberg, E. Jakobsson, U. Orn et A. Fredriksson. 2002. « À brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether : uptake, retention, and induction of neurobehavioral alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development ». *Toxicol Sci*, vol. 67, no 1, p. 98-103.
- Erratico, C. A., S. C. Moffatt et S. M. Bandiera. 2011. « Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes ». *Toxicol Sci*, vol. 123, no 1, p. 37-47.
- Erratico, C. A., A. Szeitz et S. M. Bandiera. 2010. « Validation of a novel in vitro assay using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC/MS) to detect and quantify hydroxylated metabolites of BDE-99 in rat liver microsomes ». *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 878, no 19, p. 1562-1568.
- Fernie, K. J., J. L. Shutt, R. J. Letcher, I. J. Ritchie et D. M. Bird. 2009. « Environmentally relevant concentrations of DE-71 and HBCD alter eggshell thickness and reproductive success of American kestrels ». *Environ Sci Technol*, vol. 43, no 6, p. 2124-2130.
- Fernie, K. J., J. L. Shutt, R. J. Letcher, J. I. Ritchie, K. Sullivan et D. M. Bird. 2008. « Changes in reproductive courtship behaviors of adult American kestrels (*Falco*

- sparverius) exposed to environmentally relevant levels of the polybrominated diphenyl ether mixture, DE-71 ». *Toxicol Sci*, vol. 102, no 1, p. 171-178.
- Fernie, K. J., J. L. Shutt, G. Mayne, D. Hoffman, R. J. Letcher, K. G. Drouillard et I. J. Ritchie. 2005. « Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (*Falco sparverius*) ». *Toxicol Sci*, vol. 88, no 2, p. 375-383.
- Gauthier, L. T., C. E. Hebert, D. V. Weseloh et R. J. Letcher. 2007. « Current-use flame retardants in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes ». *Environ Sci Technol*, vol. 41, no 13, p. 4561-4567.
- Gauthier, L. T., C. E. Hebert, D. V. Weseloh et R. J. Letcher. 2008. « Dramatic changes in the temporal trends of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in herring gull eggs from the Laurentian Great Lakes : 1982-2006 ». *Environ Sci Technol*, vol. 42, no 5, p. 1524-1530.
- Gauthier, L. T., et R. J. Letcher. 2009. « Isomers of Dechlorane Plus flame retardant in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes of North America: temporal changes and spatial distribution ». *Chemosphere*, vol. 75, no 1, p. 115-120.
- Gentes, M. L., R. J. Letcher, É. Caron-Beaudoin et J. Verreault. 2012. « Novel Flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St-Lawrence River, Canada ». *Environ Sci Technol*.
- Gouvernement du Québec, Sécurité publique. 2012. « La sécurité incendie au Québec - Statistiques sur les incendies déclarés en 2011 ».
- Guerra, P., K. Fernie, B. Jimenez, G. Pacepavicius, L. Shen, E. Reiner, E. Eljarrat, D. Barcelo et M. Alae. 2011. « Dechlorane Plus and Related Compounds in Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) Eggs from Canada and Spain ». *Environ Sci Technol*.
- Hakk, H., J. K. Huwe et G. L. Larsen. 2009. « Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats ». *Xenobiotica*, vol. 39, no 1, p. 46-56.
- Hakk, H., G. Larsen et E. Klasson-Wehler. 2002. « Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat ». *Xenobiotica*, vol. 32, no 5, p. 369-382.
- Hakk, H., et R. J. Letcher. 2003. « Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review ». *Environ Int*, vol. 29, no 6, p. 801-828.

- Hardy, M. L. 2002. « A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products ». *Chemosphere*, vol. 46, no 5, p. 717-728.
- He, J., K. R. Robrock et L. Alvarez-Cohen. 2006. « Microbial reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) ». *Environ Sci Technol*, vol. 40, no 14, p. 4429-4434.
- Hites, R. A. 2004. « Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations ». *Environ Sci Technol*, vol. 38, no 4, p. 945-956.
- Hoh, E., L. Zhu et R. A. Hites. 2006. « Dechlorane plus, a chlorinated flame retardant, in the Great Lakes ». *Environ Sci Technol*, vol. 40, no 4, p. 1184-1189.
- Holden, A., J. S. Park, V. Chu, M. Kim, G. Choi, Y. Shi, T. Chin, C. Chun, J. Linthicum, B. J. Walton et K. Hooper. 2009. « Unusual hepta- and octabrominated diphenyl ethers and nonabrominated diphenyl ether profile in California, USA, peregrine falcons (*Falco peregrinus*): more evidence for brominated diphenyl ether-209 debromination ». *Environ Toxicol Chem*, vol. 28, no 9, p. 1906-1911.
- Ikonomou, M. G., S. Rayne et R. F. Addison. 2002. « Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000 ». *Environ Sci Technol*, vol. 36, no 9, p. 1886-1892.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety. (1994). Brominated diphenyl ether. In : Environmental Health Criteria 162. (WHO) World Health Organization. Geneva
- Kannan, N., T. B. Reusch, D. E. Schulz-Bull, G. Petrick et J. C. Duinker. 1995. « Chlorobiphenyls: model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept ». *Environ Sci Technol*, vol. 29, no 7, p. 1851-1859.
- Kennedy, S. W., et S. P. Jones. 1994. « Simultaneous Measurement of Cytochrome P4501A Catalytic Activity and Total Protein Concentration with a Fluorescence Plate Reader ». *Analytical Biochemistry*, vol. 222, no 1, p. 217-223.
- Kierkegaard, A., L. Asplund, C. A. de Wit, M. S. McLachlan, G. O. Thomas, A. J. Sweetman et K. C. Jones. 2007. « Fate of higher brominated PBDEs in lactating cows ». *Environ Sci Technol*, vol. 41, no 2, p. 417-423.
- Kierkegaard, A., L. Balk, U. Tjärnlund, C. A. de Wit et B. Jansson. 1999. « Dietary Uptake and Biological Effects of Decabromodiphenyl Ether in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». *Environ Sci Technol*, vol. 33, no 10, p. 1612-1617.
- Kierkegaard, A., S. Burreau, E. Marsh, E. Klasson Wehler, C. de Wit et L. Asplund. 2001. « Metabolism and distribution of 2,2',4,4'-tetrabromo[¹⁴C]diphenyl ether in pike

- (*Esox lucius*) after dietary exposure. ». *Organohalogen Compounds*, vol. 52, p. 58-61.
- Kintz, P. (1998). Toxicologie et pharmacologie médicolégales, Elsevier Masson : 719 p
- La Guardia, M. J., R. C. Hale et E. Harvey. 2006. « Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Congener Composition of the Widely Used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE Technical Flame-retardant Mixtures ». *Environ Sci Technol*, vol. 40, no 20, p. 6247-6254.
- La Guardia, M. J., R. C. Hale et E. Harvey. 2007. « Evidence of debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in biota from a wastewater receiving stream ». *Environ Sci Technol*, vol. 41, no 19, p. 6663-6670.
- Law, R. J., M. Alaei, C. R. Allchin, J. P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom et G. A. Stern. 2003. « Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife ». *Environ Int*, vol. 29, no 6, p. 757-770.
- Leslie, H. A., P. E. Leonards, R. F. Shore, L. A. Walker, P. R. Bersuder, S. Morris, C. R. Allchin et J. Boer. 2011. « Decabromodiphenylether and hexabromocyclododecane in wild birds from the United Kingdom, Sweden and The Netherlands: Screening and time trends ». *Chemosphere*, vol. 82, no 1, p. 88-95.
- Lindberg, P., U. Sellstrom, L. Haggberg et C. A. de Wit. 2004. « Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden ». *Environ Sci Technol*, vol. 38, no 1, p. 93-96.
- Liu, Y. T., H. P. Hao, C. X. Liu, G. J. Wang et H. G. Xie. 2007. « Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors ». *Drug Metab Rev*, vol. 39, no 4, p. 699-721.
- Lorber, M. 2008. « Exposure of Americans to polybrominated diphenyl ethers ». *J Expo Sci Environ Epidemiol*, vol. 18, no 1, p. 2-19.
- McDonald, T. A. 2002. « A perspective on the potential health risks of PBDEs ». *Chemosphere*, vol. 46, no 5, p. 745-755.
- McKernan, M. A., B. A. Rattner, R. C. Hale et M. A. Ottinger. 2009. « Toxicity of polybrominated diphenyl ethers (DE-71) in chicken (*Gallus gallus*), mallard (*Anas platyrhynchos*), and American kestrel (*Falco sparverius*) embryos and hatchlings ». *Environ Toxicol Chem*, vol. 28, no 5, p. 1007-1017.
- McKinney, M. A., S. De Guise, D. Martineau, P. Beland, A. Arukwe et R. J. Letcher. 2006. « Biotransformation of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and rat mammalian model using an in vitro hepatic microsomal assay ». *Aquat Toxicol*, vol. 77, no 1, p. 87-97.

- McKinney, M. A., R. Dietz, C. Sonne, S. De Guise, K. Skirnisson, K. Karlsson, E. Steingrímsson et R. J. Letcher. 2011. « Comparative hepatic microsomal biotransformation of selected PBDEs, including decabromodiphenyl ether, and decabromodiphenyl ethane flame retardants in Arctic marine-feeding mammals ». *Environ Toxicol Chem*, vol. 30, no 7, p. 1506-1514.
- MDDEP, Ministère du développement durable, environnement et parcs. 2002. « St. Lawrence River ». En ligne. http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/flrivlac/fleuve_en.htm.
- Morck, A., H. Hakk, U. Orn et E. Klasson Wehler. 2003. « Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion ». *Drug Metab Dispos*, vol. 31, no 7, p. 900-907.
- Morris, R.D., D. V. Weseloh, L.R. Wires, C. Pekarik, F.J. Cuthbert et D.J. Moore. 2011. « Population Trends of Ring-billed Gulls Breeding on the North American Great Lakes, 1976 to 2009 ». *Waterbirds*, vol. 34, no 2, p. 202-212.
- Munoz-Arnanz, J., M. Saez, F. Hiraldo, R. Baos, G. Pacepavicius, M. Alae et B. Jimenez. 2011. « Dechlorane plus and possible degradation products in white stork eggs from Spain ». *Environ Int*, vol. 37, no 7, p. 1164-1168.
- OxyChem, Occidental Chemical Corporation. 2007. « Déchlorane Plus manual ». En ligne. <http://www.oxy.com/OurBusinesses/Chemicals/Products/Documents/dechloraneplus/dechlorane_plus.pdf. Consulté le 27 juillet 2012.
- Pacyniak, E. K., X. Cheng, M. L. Cunningham, K. Crofton, C. D. Klaassen et G. L. Guo. 2007. « The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators ». *Toxicol Sci*, vol. 97, no 1, p. 94-102.
- PIC, Prévention des incendies du Canada. 2012. « Opération En Garde ». En ligne. http://fipreca.ca/index_fr.php?section=5. Consulté le 23 juillet 2012.
- Pirard, C., et E. De Pauw. 2007. « Absorption, disposition and excretion of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in chicken ». *Chemosphere*, vol. 66, no 2, p. 320-325.
- Pollet, I.L., D. Shutler, J. Chardine et J.P. Ryder. 2012. « Ring-billed Gull (*Larus delawarensis*) ». *The Birds of North America Online (A. Poole, Ed.) Ithaca: Cornell Lab of Ornithology*, no 33.
- Qiu, X., M. Mercado-Feliciano, R. M. Bigsby et R. A. Hites. 2007. « Measurement of polybrominated diphenyl ethers and metabolites in mouse plasma after exposure to a commercial pentabromodiphenyl ether mixture ». *Environ Health Perspect*, vol. 115, no 7, p. 1052-1058.

- Ren, G., Z. Yu, S. Ma, H. Li, P. Peng, G. Sheng et J. Fu. 2009. « Determination of Decchlorane Plus in serum from electronics dismantling workers in South China ». *Environ Sci Technol*, vol. 43, no 24, p. 9453-9457.
- Ross, P. S., C. M. Couillard, M. G. Ikonou, S. C. Johannessen, M. Lebeuf, R. W. Macdonald et G. T. Tomy. 2009. « Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals ». *Mar Pollut Bull*, vol. 58, no 1, p. 7-10.
- Sandholm, A., B. M. Emanuelsson et E. K. Wehler. 2003. « Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat ». *Xenobiotica*, vol. 33, no 11, p. 1149-1158.
- Santé Canada, Health Canada. 2009. « Produits ignifuges à base de PBDE et santé humaine ». En ligne. <http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/iyh-vsv/envIRON/pbde-fra.php>.
- Shen, M., J. Cheng, R. Wu, S. Zhang, L. Mao et S. Gao. 2012. « Metabolism of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A by fish liver subcellular fractions in vitro ». *Aquat Toxicol*, vol. 114-115, p. 73-79.
- Sjodin, A., D. G. Patterson, Jr. et A. Bergman. 2003. « A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers ». *Environ Int*, vol. 29, no 6, p. 829-839.
- Soderstrom, G., U. Sellstrom, C. A. de Wit et M. Tysklind. 2004. « Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) ». *Environ Sci Technol*, vol. 38, no 1, p. 127-132.
- Stapleton, H. M., M. Alaei, R. J. Letcher et J. E. Baker. 2004. « Debromination of the flame retardant decabromodiphenyl ether by juvenile carp (*Cyprinus carpio*) following dietary exposure ». *Environ Sci Technol*, vol. 38, no 1, p. 112-119.
- Stapleton, H. M., B. Brazil, R. D. Holbrook, C. L. Mitchelmore, R. Benedict, A. Konstantinov et D. Potter. 2006. « In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp ». *Environ Sci Technol*, vol. 40, no 15, p. 4653-4658.
- Staskal, D. F., H. Hakk, D. Bauer, J. J. Diliberto et L. S. Birnbaum. 2006. « Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice ». *Toxicol Sci*, vol. 94, no 1, p. 28-37.
- Sverko, E., G. T. Tomy, C. H. Marvin, D. Zaruk, E. Reiner, P. A. Helm, B. Hill et B. E. McCarry. 2008. « Decchlorane Plus Levels in Sediment of the Lower Great Lakes ». *Environ Sci Technol*, vol. 42, no 2, p. 361-366.

- Sverko, E., G. T. Tomy, E. J. Reiner, Y. F. Li, B. E. McCarry, J. A. Arnot, R. J. Law et R. A. Hites. 2011. « Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review ». *Environ Sci Technol*, vol. 45, no 12, p. 5088-5098.
- Tokarz, J. A., 3rd, M. Y. Ahn, J. Leng, T. R. Filley et L. Nies. 2008. « Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers in anaerobic sediment and a biomimetic system ». *Environ Sci Technol*, vol. 42, no 4, p. 1157-1164.
- Tomy, G. T., V. P. Palace, T. Halldorson, E. Braekevelt, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth et A. T. Fisk. 2004. « Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*) ». *Environ Sci Technol*, vol. 38, no 5, p. 1496-1504.
- Tomy, G. T., C. R. Thomas, T. M. Zidane, K. E. Murison, K. Pleskach, J. Hare, G. Arsenault, C. H. Marvin et E. Sverko. 2008. « Examination of isomer specific bioaccumulation parameters and potential in vivo hepatic metabolites of syn- and anti-Dechlorane Plus isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». *Environ Sci Technol*, vol. 42, no 15, p. 5562-5567.
- Ucan-Marin, F., A. Arukwe, A. Mortensen, G. W. Gabrielsen, G. A. Fox et R. J. Letcher. 2009. « Recombinant transthyretin purification and competitive binding with organohalogen compounds in two gull species (*Larus argentatus* and *Larus hyperboreus*) ». *Toxicol Sci*, vol. 107, no 2, p. 440-450.
- UNEP. 2010. « The 9 new POPs: An introduction to the nine chemicals added to the Stockholm Convention by the Conference of the Parties at its fourth meeting ». En ligne. <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/Publications/tabid/695/language/en-US/Default.aspx>.
- Union européenne, UE. 2003. « Directive 2003/11/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 février 2003 portant vingt-quatrième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil relative à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (pentabromodiphényléther, octabromodiphényléther) ». En ligne. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32003L0011:FR:NOT>. Consulté le 24 juillet 2012.
- USEPA, U.S. Environmental Protection Agency. 2012. « DecaBDE Phase-out Initiative ». En ligne. <http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/deccadbe.html>. Consulté le 22 juillet 2012.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2011. « High Production Volume Challenge Program ». En ligne. <http://www.epa.gov/HPV/whatsnew.htm>. Consulté le 2012-06-18.

- Van den Steen, E., A. Covaci, V. L. Jaspers, T. Dauwe, S. Voorspoels, M. Eens et R. Pinxten. 2007. « Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*) ». *Environ Pollut*, vol. 148, no 2, p. 648-653.
- Venier, M., M. Wierda, W. W. Bowerman et R. A. Hites. 2010. « Flame retardants and organochlorine pollutants in bald eagle plasma from the Great Lakes region ». *Chemosphere*, vol. 80, no 10, p. 1234-1240.
- Verreault, J., G. W. Gabrielsen, S. Chu, D. C. Muir, M. Andersen, A. Hamaed et R. J. Letcher. 2005. « Flame retardants and methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in two Norwegian Arctic top predators: glaucous gulls and polar bears ». *Environ Sci Technol*, vol. 39, no 16, p. 6021-6028.
- Verreault, J., F. Maisonneuve, R. Dietz, C. Sonne et R. J. Letcher. 2009a. « Comparative hepatic activity of xenobiotic-metabolizing enzymes and concentrations of organohalogenes and their hydroxylated analogues in captive Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*) ». *Environ Toxicol Chem*, vol. 28, no 1, p. 162-172.
- Verreault, Jonathan, Robert J. Letcher, Christian Sonne et Rune Dietz. 2009 b. « In vitro metabolism of polychlorinated biphenyls and cytochrome P450 monooxygenase activities in dietary-exposed Greenland sledge dogs ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 150, no 1, p. 91-100.
- Viberg, H., A. Fredriksson et P. Eriksson. 2002. « Neonatal exposure to the brominated flame retardant 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse ». *Toxicol Sci*, vol. 67, no 1, p. 104-107.
- Voorspoels, S., A. Covaci, V. L. Jaspers, H. Neels et P. Schepens. 2007. « Biomagnification of PBDEs in three small terrestrial food chains ». *Environ Sci Technol*, vol. 41, no 2, p. 411-416.
- Wang, Y., H. Liu, C. Zhao, H. Liu, Z. Cai et G. Jiang. 2005. « Quantitative structure-activity relationship models for prediction of the toxicity of polybrominated diphenyl ether congeners ». *Environ Sci Technol*, vol. 39, no 13, p. 4961-4966.
- Wiseman, S. B., Y. Wan, H. Chang, X. Zhang, M. Hecker, P. D. Jones et J. P. Giesy. 2011. « Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated/methoxylated analogs: environmental sources, metabolic relationships, and relative toxicities ». *Mar Pollut Bull*, vol. 63, no 5-12, p. 179-188.
- Xian, Q., S. Siddique, T. Li, Y. L. Feng, L. Takser et J. Zhu. 2011. « Sources and environmental behavior of dechlorane plus--a review ». *Environ Int*, vol. 37, no 7, p. 1273-1284.

Zhang, X. L., X. J. Luo, H. Y. Liu, L. H. Yu, S. J. Chen et B. X. Mai. 2011. « Bioaccumulation of several brominated flame retardants and dechlorane plus in waterbirds from an e-waste recycling region in South China: associated with trophic level and diet sources ». *Environ Sci Technol*, vol. 45, no 2, p. 400-405.

Zheng, J., J. Wang, X. J. Luo, M. Tian, L. Y. He, J. G. Yuan, B. X. Mai et Z. Y. Yang. 2010. « Dechlorane Plus in human hair from an e-waste recycling area in South China: comparison with dust ». *Environ Sci Technol*, vol. 44, no 24, p. 9298-9303.