

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS DE POLYBROMODIPHÉNYLES
ÉTHERS ET LA TRANSCRIPTION ET L'ACTIVITÉ DES DÉIODINASES CHEZ
UNE ESPÈCE DE GOÉLAND FORTEMENT EXPOSÉE AUX RETARDATEURS
DE FLAMME

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

ANTHONY FRANÇOIS

JANVIER 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT PROPOS

Ce mémoire s'inscrit dans une démarche d'identification des relations existantes entre la contamination aux PBDE, la transcription et l'activité des déiodinases. Ces informations permettront d'appuyer les hypothèses de débromination du BDE-209 par les déiodinases. Bien que le nombre d'études portant sur les impacts du BDE-209 sur la faune augmente, peu d'informations concernant sa métabolisation existent pour la faune aviaire, et plus généralement sur les enzymes impliquées dans ce processus. Le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant sur l'île Deslauriers, située à quelques kilomètres de l'île de Montréal, constitue un modèle d'étude de choix à cause des concentrations en PBDE, notamment BDE-209, retrouvées chez ces oiseaux mais aussi à cause de leur mode de vie (habitats, régime alimentaire).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps mon directeur de recherche Jonathan Verreault pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire de recherche sur ce sujet. Ces deux années de maîtrise sont passées rapidement, elles m'ont permis de me mettre au défi et d'en apprendre plus sur moi-même. Merci pour tes conseils, ta disponibilité, ta patience, et la bonne humeur que tu inspires à toute notre équipe.

Je tiens également à remercier spécialement, Romy Técher dans un premier temps, pour les expériences réalisées dans le cadre de mon projet, mais aussi pour ton soutien et ton aide même dans les périodes les plus difficiles. Je ne peux évidemment omettre pas toute l'équipe de laboratoire : Marie-Line Gentes, qui m'a donné l'occasion de m'impliquer à plusieurs niveaux dans le RECSSS (Réseaux des étudiants aux cycles supérieurs du secteur des sciences). Julie Reinling, qui a su amener de la vie dans le bureau que j'ai si longtemps occupé seul; mais aussi pour les heures passées à m'aider pour la mise en page de mon mémoire. Manon Josianne Sorais, Chloé F. Desjardins et Antoine Simond pour cette ambiance de travail merveilleuse, les rires, et les mots de motivation dans les périodes difficiles.

Un grand merci à Ling Wang, technicienne de laboratoire de Jonathan Verreault pour ses précieux conseils et encouragements.

Je pense également à Philip Spear, qui m'a transmis ses connaissances, sa passion pour le HPLC et qui m'a aidé dans la mise au point de la méthodologie de mes essais. Je suis vraiment heureux d'avoir pu travailler avec toi.

Je n'oublie pas de remercier Francis St-Pierre technicien de la faune, ainsi que Anthony Schmutz, Jonathan Côté et Tina Lévesque pour ces merveilleux moments passés sur l'île Deslauriers au milieu de tous ces goélands et de tout ce guano.

Pour finir, le meilleur pour la fin, je remercie ma mère, Michele François, et ma soeur ,Auriane François, d'avoir toujours été la pour moi malgré la distance qui nous sépare. Mais aussi ma tante Raymonde Gilot pour ses encouragements, son aide. Tu as toujours cru en moi, sans toi je ne sais pas si je serais arrivé si loin.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	i
RÉSUMÉ	iii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
1.1 Revue de littérature.....	3
1.1.1 Généralités.....	3
1.1.2 Toxicité des mélanges penta- et octa-BDE	4
1.1.3 Le cas du BDE-209	7
1.1.4 Le BDE-209 dans la faune aviaire	8
1.1.5 Métabolisme du BDE-209.....	10
1.1.6 Les déiodinases	13
1.1.7 Modèle d'étude : Le goéland à bec cerclé.....	15
1.2 Hypothèses et objectifs	17
1.2.1 Objectif spécifique	17
1.2.2 Hypothèses	17
CHAPITRE II	
RELATIONSHIPS BETWEEN POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS, TRANSCRIPTION AND ACTIVITY OF TYPE 1 DEIODINASE IN A GULL HIGHLY EXPOSED TO FLAME RETARDANTS	19
ABSTRACT	20
2.1 Introduction.....	21

2.2	Materials and methods	24
2.2.1	Sample collection.....	24
2.2.2	PBDE analysis	24
2.2.3	Hepatic D1 mRNA transcription analysis	25
2.2.4	Hepatic microsomal deiodinase activity determination.....	27
2.2.5	Statistical analysis.....	29
2.3	Results	31
2.3.1	Hepatic PBDEs concentrations.....	31
2.3.2	Hepatic D1 transcription.....	33
2.3.3	Hepatic D1 activity	34
2.3.4	Relationships between hepatic PBDE concentrations, and D1 transcription and activity	34
2.4	Discussion	37
2.4.1	PBDE concentrations.....	37
2.4.2	Hepatic deiodinase type I transcription and activity.....	38
2.4.3	Relationships between PBDEs, and D1 transcription and activity.....	41
2.5	Conclusions	42
2.6	References	43
2.7	Supplemental data	49
	CONCLUSIONS GÉNÉRALES	55
	BIBLIOGRAPHIE	57

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Comparaison des structures chimiques des polybromodiphényles éthers (PBDE) et des biphényles polychlorés (fr: BPC / eng: PCB) (Tiré de Clark Williams-Derry et Abbotts, 2004) 4
1.2	Structure de la a) thyroxine, b) d'un hydroxy (-OH) PBDE (4'-OH-BDE-49) et du c) BDE-209 6
1.3	Prédiction des voies de débromination du BDE-209 chez le Tête de boule (<i>Pimephales promelas</i>) (tirée de Noyes et <i>al.</i> , 2011) 12
1.4	Conversion de T ₄ en T ₃ actif (Outer-Ring Deiodination) ou rT ₃ ou T ₂ inactif (Inner-Ring Deiodination) 15
2.1	Correlations between total D1 activity (pmol/min/g) and concentration ratios of BDE-209 to A) Σ octa-BDE, B) Σ hepta-BDE, and C) Σ nona+octa+hepta-BDE in liver of combined ring-billed gull male and female. 36
2.2	Mean (\pm SEM) total deiodinase (D1) activity (pmol.min ⁻¹ .g ⁻¹) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls (n = 5) for 6 reaction times (min). The reaction using 1 mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins was found to be linear up to 75 min. 49
2.3	Relationships between unlabelled-thyroxine (T ₄) concentrations (μ M) and total deiodinase (D1) activity (pmol.min ⁻¹ .g ⁻¹) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls (n = 5) represented using A) Michaelis-Menten and B) Lineweaver-Burk plots. A T ₄ level of 0.65 μ M was selected for the reaction using 1 mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins. 50
2.4	Relationship between concentrations of propyl-n-thiouracil (PTU) (mM) and total deiodinase (D1) activity (pmol.min ⁻¹ .g ⁻¹) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls (n = 5). A PTU level of 2.5 mM resulted in 100% inhibition of D1 activity in ring-billed gull liver microsomes. 51
2.5	HPLC chromatograms showing peaks of iodine-labelled thyroxine ([¹²⁵ I]T ₄) and its deiodinated products diiodothyronine ([¹²⁵ I]T ₂) and triiodothyronine ([¹²⁵ I]T ₃) in ring-billed gull liver microsomes incubated A) without propyl-n-

	thiouracil (PTU; negative control) and B) with 2.5 mM of PTU. SF: Solvent front.	52
2.6	Relative contributions (%; mean \pm SEM) of the 15 major PBDE congeners (or co-elution) to \sum_{31} PBDE concentrations (ng/g wet weight) determined in liver of male (M) (n = 8) and female (F) (n = 14) ring-billed gulls breeding in Montreal area (QC, Canada).	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Composition des trois principales formulations commerciales de PBDE (Tiré de: de Wit, 2002) 3
2.1	Mean (\pm SEM) relative contributions (%) to \sum 31PBDE concentrations and mean and range concentrations (ng.g-1 wet weight) of PBDE congener classesa determined in liver of combined ring-billed gull males and females (n = 22) breeding in Montreal area (QC, Canada). 31
2.2	Comparisons (Wilcoxon test) of mean (\pm SEM) total D1 activity (pmol.min-1.g-1), concentrations (ng.g-1 wet weight) of PBDE congener classes (see Table 1 for details on congener composition) and their sums as well as selected PBDE concentration ratios between the two D1 transcription groups (i.e., high and low; see section 2.5.) in combined male and female ring-billed gulls breeding in Montreal area (QC, Canada). 33

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

BPC	Biphényle polychloré
Log K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
PBDE	Polybromodiphényle éther
POP	Polluant Organique Persistant
RF	Retardateur de flamme
CYP	Cytochrome P450
D1	Déiodinase type I
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
IRD	Inner Ring Deiodination
ORD	Outer Ring Deiodination
PTU	6-n-propyl-2-thiouracil
T ₃	Triiodothyronine
T ₄	Thyroxine
TH	Thyroid Hormone /Hormone thyroïdienne
TTR	Transthyréline
GC/MS-ECNI	Gas Chromatography/Mass Spectroscopy- Electron-Capture Negative-Ion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MLOD	Limite de détection
MLOQ	Limite de quantification
BSEF	Bromine Science and Environmental Forum
UNEP	United Nations Environment Programme
US EPA	US Environmental Protection Agency

RÉSUMÉ

Les PBDE sont des retardateurs de flamme halogénés utilisés depuis le début des années 70. Depuis plusieurs décennies, il est fait état de la présence de ces composés dans l'environnement, dans la faune et chez les êtres humains. Parmi les trois mélanges PBDE commercialisés, seuls les mélanges de penta- et octa-BDE sont soumis à une restriction de production et d'usage au niveau mondial. Le mélange décabromodiphényl éther (deca-BDE), composé majoritairement de BDE-209 (97%) est soumis à une restriction de son usage en Amérique du nord. Cependant, aucune réglementation au niveau international n'a été adoptée pour le moment. Ce manque de régulation et l'usage persistant du BDE-209 dans certains grands pays exportateurs de produit manufacturés provoquent une augmentation des quantités de BDE-209 présentes dans l'environnement. De fortes concentrations de PBDE, notamment de BDE-209 et d'autres congénères fortement bromés, ont été détectées au cours des dernières années dans le foie des goélands à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant près de Montréal QC, Canada. La débromination *in vivo* du BDE-209, observée chez quelques oiseaux, provoque la formation de congénères faiblement bromés, plus persistants et toxiques que la molécule mère. Cependant, le système enzymatique responsable de cette réaction n'a pas encore été identifié. Comme les PBDE et les hormones thyroïdiennes partagent d'importantes similarités structurales, il a été suggéré que les déiodinases soient impliquées dans les réactions de débromination du BDE-209 chez les oiseaux. Les déiodinases (type 1, 2 et 3) sont des sélénoprotéines catalysant la conversion des hormones thyroïdiennes. Le but de ce mémoire est d'établir des relations entre les concentrations hépatiques de PBDE accumulées, la transcription et l'activité des déiodinases hépatiques de type 1 (D1) ainsi que de déterminer si les hypothèses de débromination par les D1 sont plausibles pour une espèce fortement exposée au PBDE, le goéland à bec cerclé de la région de Montréal QC, Canada. Les résultats de cette étude ont révélé que l'activité de D1 chez les mâles est significativement plus élevée que chez les femelles, alors que celles-ci ont tendance à avoir une transcription de D1 plus élevée que les mâles. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les niveaux de transcription de D1 et l'activité de D1. Les concentrations hépatiques les plus élevées d'hepta- et octa-BDE ont été détectées chez les oiseaux ayant les plus fortes activités de D1.

Mots clés: PBDE; deca-BDE; retardateurs de flamme halogénés; biotransformation; déiodinase; essais *in vitro*; oiseaux

INTRODUCTION

Les retardateurs de flamme (RF) sont des composés synthétisés dans le but de réduire la propagation de la flamme pour les matériaux auxquels ils sont ajoutés afin d'offrir un plus haut niveau de sécurité lors d'incendie. Initialement employés pour l'ajout aux résines de plastique et aux appareils électroniques/électriques, leur usage s'est étendu aux textiles, peintures, matériaux de construction, voitures et avions (Siddiqi *et al.*, 2003).

les polybromodiphényléthers (PBDE) sont une famille de retardateurs de flamme halogénés largement répandus dans l'environnement, et ce, aussi bien en milieu terrestre qu'en milieu aquatique (Chen *et al.*, 2012; de Wit, C. A. *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). Il a été démontré que les PBDE sont responsables de plusieurs effets toxiques observés dans la faune. En effet, le penta-BDE affecte le développement neurocomportemental et le développement du système thyroïdien chez des oiseaux juvéniles (Karlsson *et al.*, 2006). Dans le cas du mélange octa-BDE, des perturbations de la thyroïde, des tumeurs sur le foie, ou encore des effets tératogènes chez les rats, les poissons, les oiseaux et les lapins, ont été constatés (Costa et Giordano, 2011; Karlsson *et al.*, 2006).

La biotransformation du BDE-209 (97% du mélange deca-BDE) a été étudiée chez quelques espèces de mammifères et chez les poissons, mais peu d'informations sont disponibles concernant la faune aviaire. Quelques études ont rapporté que la débromination du BDE-209 en congénères du groupe des penta- et octa-BDE a lieu chez le rat « Sprague-Dawley » (US.EPA, 2008; Huwe et Smith, 2007), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) (Noyes *et al.*, 2010), l'étourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) (Van den Steen *et al.*, 2007) et plus récemment chez la crécerelle

d'Amérique (*Falco sparverius*) (Letcher *et al.*, 2014), mais les mécanismes liés à ces observations sont inconnus. De plus, les données recueillies par Chabot-Giguère *et al.* (2013) suggèrent que la voie des cytochromes P450 ne semble pas être impliquée dans le métabolisme du BDE-209 chez les goélands à bec cerclé (*Larus delawarensis*). La débromination séquentielle des composés fortement bromés (BDE-209) a été proposée comme une des voies métaboliques possibles chez les espèces aviaires et chez les poissons (Chabot-Giguère *et al.*, 2013; Noyes *et al.*, 2011, 2013). Les hypothèses actuelles ciblent la déiodinase comme enzyme potentiellement responsable de la débromination du BDE-209 compte-tenu des similarités structurales des PBDE avec les hormones thyroïdiennes.

Au niveau de la région de Montréal, le goéland à bec cerclé s'est établi dans une zone fortement touchée par la pollution et, de ce fait, est exposé à plusieurs familles de polluants, dont les RF. Parmi ceux-ci, le BDE-209 se démarque par sa capacité d'accumulation chez cette espèce par rapport aux autres PBDE retrouvés dans cette espèce. Par exemple, les concentrations de BDE-209 mesurées dans les oeufs des goélands à bec cerclé de l'île Deslauriers sont entre 1,5 et 8 fois plus élevées que celle d'autres goéland répartis dans la région des grands lacs au Canada (Chen *et al.*, 2012) et sont jusqu'à 32 fois plus élevées que celles mesurées dans d'autres espèces aviaires d'Europe (Gentes *et al.*, 2012).

Ce projet a pour but l'étude de l'association des concentrations de PBDE sur l'activité et la transcription des déiodinases hépatiques de type 1 chez le Goéland à bec cerclé. Cette espèce a été sélectionnée notamment à cause de l'accumulation élevée de BDE-209 au niveau hépatique ainsi que pour son abondance dans la région de Montréal. De plus, elle se retrouve à un niveau élevé de la chaîne trophique et se nourrit dans des environnements diversifiés aussi bien urbains que périurbains. Le goéland à bec cerclé est par conséquent une espèce fortement exposée aux PBDE et notamment au BDE-209.

CHAPITRE I

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Généralités

Les PBDE sont des retardateurs de flamme halogénés utilisés depuis le début des années 70. Ils connaissent de nombreuses utilisations, notamment dans les produits de la vie quotidienne tels que les appareils électroniques, les matériaux de construction, etc. (Siddiqi *et al.*, 2003). Les PBDE sont des composés synthétiques ajoutés à la matrice, mais ne forment pas de liens covalents avec celle-ci. De ce fait, ils ont tendance à diffuser hors des produits manufacturés, lors de l'usure ou du recyclage, et à se retrouver dans l'environnement. Il existe trois principaux mélanges de PBDE ayant été commercialisés sur le marché : le penta-BDE, octa-BDE et deca-BDE (Darnerud *et al.*, 2001). Ces formulations diffèrent par les classes de congénères qui les composent (tableau 1.1).

Tableau 1.1 Composition des trois principales formulations commerciales de PBDE (Tiré de: de Wit, 2002)

Mélanges commerciaux	tetra-BDE	penta-BDE	hexa-BDE	hepta-BDE	octa-BDE	nona-BDE	BDE-209
Penta-BDE	24-38%	50-62%	4-12%	Trace	-	-	-
Octa-BDE	-	0,50%	12%	45%	33%	10%	0,70%
Deca-BDE	-	-	-	-	Trace	0,3-3%	97-98%

Depuis 2002, le nombre croissant de résultats démontrant les effets négatifs et la diffusion des PBDE dans l'environnement a mené à une suppression graduelle de la production et de l'utilisation des deux principaux mélanges (penta- et octa- BDE) au niveau international. En Europe, une législation concernant le cas du mélange

deca-BDE a été adoptée au courant de l'année 2008 tandis qu'aux États-Unis et au Canada, le BSEF (Bromine Science and Environmental Forum), une organisation regroupant plusieurs producteurs de retardateurs de flamme bromés, a consenti à l'élimination volontaire de l'usage et de la production du deca-BDE d'ici la fin de l'année 2014 (Ni *et al.*, 2013). Le deca-BDE a également été proposé d'être listé en annexe de la convention de stockholm sur les polluants organiques persistants (POP). La nomenclature utilisée pour les PBDE est similaire à celle mise en place pour les PCB (Siddiqi *et al.*, 2003). Les congénères sont numérotés en fonction du nombre d'atomes de brome sur la molécule, et de leurs positions sur les anneaux aromatiques. Il existe de ce fait 209 congénères de PBDE possibles, le BDE-209 étant la molécule complètement bromée (Figure 1.1).

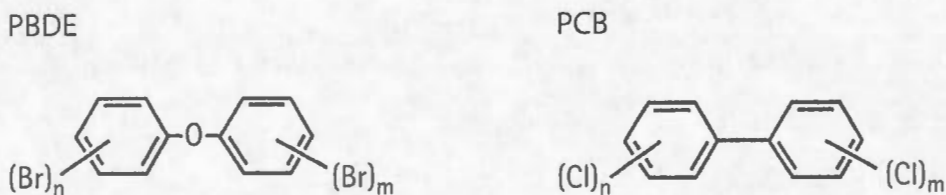


Figure 1.1 Comparaison des structures chimiques des polybromodiphényles éthers (PBDE) et des biphényles polychlorés (fr: BPC / eng: PCB) (Tiré de Clark Williams-Derry et Abbotts, 2004)

1.1.2 Toxicité des mélanges penta- et octa-BDE

Dû à l'omniprésence des PBDE dans l'environnement, le nombre de recherches sur les effets toxiques de ces composés a significativement augmenté durant les dernières années. Le mélange penta-BDE est connu pour affecter le développement neurocomportemental, l'homéostasie des hormones thyroïdiennes, et l'octa-BDE comme étant tératogène chez le rat et le lapin à une concentration de 2mg/kg (Darnerud, P., 2003). Chez l'humain, l'octa-BDE a été déclaré comme étant toxique

et classifié selon ces deux règlements : R61; Repro. Cat. 2 Peut provoquer un danger pour le fœtus et R62; Repro. Cat. 3 Risque possible d'altération de la fertilité (Commission EU, 2005). De plus, la présence de congénères plus faiblement bromés (penta- et hepta- BDE) dans le mélange ainsi que la formation possible de dibenzo-p-dioxine et dibenzofuran poly-bromés durant la combustion à des températures très élevées de produit contenant de l'octa-BDE augmentent les risques liés à la toxicité de groupe de PBDE (Commission EU, 2005). Fernie *et al.* (2005) ont conduit une étude *in vivo* sur les effets des PBDE chez une espèce aviaire, la crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*). Les résultats obtenus dans cette étude comprennent un changement de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes, du rétinol (ou vitamine A), et du glutathion. En 2009, dans une seconde étude, Fernie *et al.* a démontré qu'une contamination environnementale au DE-71 (mélange de penta-BDE et d'HBCD), était liée à un amincissement de la coquille et du succès de l'éclosion chez la crécerelle d'Amérique. Plusieurs autres études, chez les poissons tête de boule (*Pimephales promelas*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont lié la présence de PBDE à des perturbations du système thyroïdien (modification de l'homéostasie des TH, de l'activité des déiodinases, compétition pour les récepteurs cellulaires des TH) compte tenu de la ressemblance structurale entre certains congénères des PBDE et les hormones thyroïdiennes (Feng *et al.*, 2012; Noyes *et al.*, 2011, 2013) (Figure 1.2).

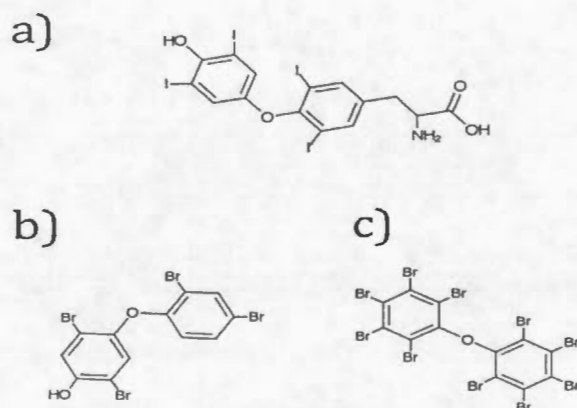


Figure 1.2 Structure de la a) thyroxine, b) d'un hydroxy (-OH) PBDE (4'-OH-BDE-49) et du c) BDE-209

Ces similarités au niveau de la structure chimique sont accrues dans le cas des OH-PBDE qui possèdent un groupe -OH tout comme les hormones thyroïdiennes. Ils peuvent donc entrer en compétition avec la Thyroxine (T_4) pour ses transporteurs, la transthyrétine (TTR) et l'albumine, provoquant alors une augmentation de la concentration de T_4 non liée, suivie d'une perturbation générale de l'homéostasie des TH circulantes (Stapleton *et al.*, 2006; Ucan-Marín *et al.*, 2009). L'accumulation de T_4 non liée stimule également le catabolisme hépatique des T_4 , ce qui se traduit par une diminution des concentrations de T_4 circulante. De plus, une étude récente de Técher *et al.* (2016) a observé une association positive entre les concentrations en PBDE chez le goéland à bec cerclé et les ratios de T_4 totale sur T_3 totale dans le plasma, ainsi qu'avec la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien (synthèse, métabolisme, action et transport).

1.1.3 Le cas du BDE-209

Depuis la découverte de la propagation et l'omniprésence des PBDE dans l'environnement, plusieurs études se sont penchées sur les paramètres d'exposition, et sur le destin des PBDE au sein de différents organismes vivants. Ces recherches se sont essentiellement focalisées sur l'exposition, la bioaccumulation et la toxicité des congénères faiblement bromés (i.e BDE-15, -47, -99, -100, -153) à cause des fortes concentrations détectées chez les espèces aquatiques (Ross *et al.*, 2009). À cause de sa forte hydrophobicité ($\log K_{ow} = 9$), le BDE-209 s'adsorbe facilement aux particules dans l'eau et les sédiments. Il se bioaccumule alors dans les organismes aquatiques retrouvés au niveau des sédiments mais aussi chez les organismes filtreurs (les moules et les crustacées.) (La Guardia *et al.* 2012). En effet, Vigano *et al.* (2011) s'est intéressé à la biodisponibilité du BDE-209 chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) résidant dans la rivière Po (Italie). Malgré les fortes concentrations de BDE-209 présentes dans les sédiments et chez les espèces invertébrées de cette rivière, le BDE-209 n'a pas pu être détecté dans les échantillons de carpes collectés. Cependant, la présence de faibles concentrations de congénères identifiées comme produit de débromination (BDE-154 et BDE-202) suggère que le BDE-209 est biodisponible et qu'il subit une débromination chez cette espèce (Vigano *et al.*, 2011). Au niveau du fleuve St-Laurent, de fortes concentrations de BDE-209 ont été détectées en aval du site de traitement des eaux de Montréal, des résultats similaires ont été observés. De faibles concentrations de BDE-209 ont été retrouvées chez 60% des maskinongés (*Esox masquinongy*), 36% des brochets (*Esox lucius*) et 21% des perchaudes (*Perca flavescens*) échantillonnés comparé aux PBDE faiblement bromé (e.g BDE-47, -99, -100, -49, et 153) retrouvé dans 100% des échantillons à de fortes concentrations (Houde *et al.*, 2014). En effet le BDE-209 est faiblement biodisponible pour les espèces aquatiques en comparaison au BDE-47, -99 ou -153 que l'on retrouve quasi systématiquement chez ces même espèces (Houde *et al.*, 2014). Il est difficile d'extrapoler ces résultats pour établir un scénario fiable sur les impacts de ce

contaminant sur des espèces terrestres qui, à l'inverse, accumulent de fortes concentrations de BDE-209 (Yu et al. 2011 ; Mo et al. 2012). Les informations relatives aux BDE-209 deviennent de plus en plus abondantes en ce qui concerne la surveillance des concentrations dans la faune terrestre et aviaire, mais il est important d'obtenir plus de données sur sa toxicité et son métabolisme pour pouvoir établir des réglementations appropriées en réponse aux risques liés au BDE-209.

Des études de toxicité mesurant l'effet du BDE-209 sur la prise de poids, la consommation de nourriture, ou d'autres signes cliniques ont démontré une faible toxicité du BDE-209 chez des rats nourris avec une nourriture fortement contaminée (jusqu'à 10 000 mg/kg/jour) et chez des lapins exposés par voie dermique (8000 mg/kg) (EPA, 2008). Les études de toxicité subchroniques ont démontré un impact du BDE-209 sur la glande thyroïde et le foie, au niveau histologique, ainsi qu'une diminution du taux de triiodothyronine (T_3) circulante à des doses comprises entre 300 et 600 mg/kg (Lee *et al.*, 2010). Chez les oiseaux, l'exposition d'œufs de poulet à 80µg/œuf de BDE-209 a induit une mortalité embryonnaire allant jusqu'à 98% (Sifleet *et al.*, 2009). Plourde et al (2013) a démontré qu'il existait une corrélation entre l'exposition à de fortes concentrations de PBDE et la déminéralisation du tarse chez les mâles goéland à bec cerné. Les conclusions de cette étude soulignaient la possibilité que la perturbation de l'homéostasie des hormones thyroïdiennes fasse partie des facteurs provoquant ce phénomène (Plourde *et al.*, 2013).

1.1.4 Le BDE-209 dans la faune aviaire

À travers le monde, de nombreuses études font l'état des concentrations de PBDE retrouvées dans les tissus d'espèces aviaires. Le BDE-209 est retrouvé de façon ubiquitaire dans le monde, avec des niveaux de concentrations variant d'un continent à l'autre dû aux historiques d'utilisation et de production.

En Europe, le BDE-209 a été retrouvé dans les œufs de faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) du nord (4,63 ng/g p.h.) et du sud (4,79 ng/g p.h.) de la Suède (Lindberg

et al., 2004) et dans les œufs (0,76 ng/g p.h.) d'épervier d'Europe (*Accipiter nisus*) du Royaume-Uni (Leslie et Boer, 2006).

En Amérique du nord, de fortes concentrations en BDE-209 ont été retrouvées dans les oeufs de faucon pèlerin de Californie (moyenne: 136 ng/g p.h.) (Holden *et al.*, 2009), Chesapeake Bay (VA, US) (moyenne: 6,3 ng/g p.h.) (Chen *et al.*, 2010) et du nord est (Connecticut, Massachusetts, Maine, New Hampshire, Rhode Island, and Vermont) des États-Unis (moyenne: 50,0 ng/g p.h.) (Chen *et al.*, 2008).

En Asie, les tourterelles des bois (*Streptopelia turtur*) nichant aux alentours d'un site de recyclage de produits électroniques de Quingyuan dans la province du Guangdong dans le sud de la Chine étaient fortement contaminés au BDE-209 (moyenne: 54,9 ng/g p.h.) (Nie *et al.*, 2015). De même, les échantillons de foie du faucon crécerelle nichant dans la région de Beijing dans le nord de la Chine décelait des concentrations moyennes de BDE-209 de 367 ng/g p.h. (Chen *et al.*, 2007). Une étude conduite par Luo *et al* en 2009, sur des poules en liberté collectées près de sites de recyclage de produits électroniques, a révélé la présence de fortes concentrations de BDE-209 (moyenne: 5.20 ng/g p.h. ; range: 0.92 - 292 ng/g p.h.) et de ses produits de débromination (i.e. BDE-207 (mean: 2 ng/g p.h. ; range: 0.26 - 632 ng/g p.h.), BDE-196 (mean: 0.38 ng/g p.h. ; range: 0.06 - 118 ng/g p.h.)) (Luo *et al.*, 2009).

Deslauriers dans la région de Montréal, le BDE-209 représente un des congénères les plus abondants détecté dans le foie de cette espèce (moyenne: 57,2 ng/g ww) avec une contribution relative par rapport à la somme des concentrations de tous les PBDE allant de 10 à 20% (Gentes *et al.*, 2012). Dans les travaux de Gentes *et al* (2012), tout comme dans la présente étude, plusieurs produits de débromination du BDE-209 ont été détectés dans les tissus de goéland à bec cerclé (e.g. BDE-196, -197, -201, -202, -203, -204, -207, -208). Pour cette raison, il est important de déterminer le destin du BDE-209 dans l'organisme des espèces aviaires.

1.1.5 Métabolisme du BDE-209

Il existe peu d'informations concernant les mécanismes régissant le métabolisme des PBDE. Les hydroxy-PBDE (OH-PBDE) ont été identifiés dans quelques études portant sur le métabolisme, *in vivo* et *in vitro*, comme étant des métabolites de certains congénères des PBDE faiblement bromés (Wiseman *et al.*, 2011). Cependant, ils ne peuvent pas être générés directement à partir d'un congénère fortement bromé tel que le BDE-209, qui est saturé en éléments brome, ce qui rend la molécule indisponible pour une oxydation (Chabot-Giguère *et al.*, 2013). Dans certains cas, les taux de formation des OH-BDE sont très faibles malgré la disponibilité de congénères PBDE faiblement bromés, notamment pour les microsomes de rats traités au phénobarbitol - un inducteur des cytochromes P450 2b (CYP2b) (Wiseman *et al.*, 2011). Parallèlement, une étude sur la biotransformation *in vitro* et *in vivo* sur le poulet (*Gallus gallus*) n'a pas identifié d'OH-BDE comme métabolites du BDE-209 (Stapleton *et al.*, 2006).

Les résultats de Van den Steen (2007), obtenus dans le cadre d'une étude *in vivo* chez l'étourneau sansonnet ont été parmi les premières données qui ont permis de confirmer la débromination du BDE-209 en composés moins bromés chez les oiseaux. Pour ce faire, ces auteurs ont utilisé un implant sous-cutané à base de silicone, installé au niveau de la cage thoracique de l'oiseau, et qui libère continuellement du BDE-209 de façon à simuler une contamination environnementale. Suite à la période d'exposition, des composés du groupe des nona- (BDE-206, -207, -208) et octa-BDE (BDE-196, et -197) ont été identifiés, dans les muscles et le foie, comme issus du métabolisme du BDE-209, car ils n'apparaissent pas dans le patron de contamination du groupe contrôle.

En Espagne chez deux populations de cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) urbaines et rurales, les fortes fréquences de détection (83% et 100% respectivement) et la prédominance du BDE-209 (44,1% et 38,6% de contribution relative à l'ensemble des PBDE respectivement) et des BDE-207, -208, -206 et -202 dans leurs

œufs suggèrent la débromination du BDE-209 chez ces oiseaux (Munoz-Arnanz J. *et al.*, 2011).

Les observations faites par Van den Steen sont appuyées par les récents résultats de Letcher *et al.* (2014) qui ont étudié chez la crécerelle d'Amérique (*Falco sparverius*) *in vivo*, l'accumulation, la débromination et l'induction des cytochromes P450 après exposition par la diète au BDE-209. Suite à la période d'exposition et de dépuración, plusieurs PBDE ont été mesurés dans le foie des oiseaux exposés, dont le BDE-196, -197, -203, -206, -207, -208 et -209. Il est à noter que les BDE-203, -207 et -208 n'ont pas été détectés chez les oiseaux du groupe contrôle. Ces résultats sont en accord avec les conclusions faites par Van den Steen (2007) et soutiennent la thèse de la débromination du BDE-209 chez les espèces aviaires. Cependant, ces deux études n'ont pas fourni de résultats concernant le complexe enzymatique impliqué dans la réaction de biotransformation.

Une autre étude menée par Chabot-Giguère *et al.* (2013) sur la biotransformation *in vitro* du BDE-209 chez le goéland à bec cerclé, a démontré que le BDE-209, incubé avec des microsomes hépatiques accompagnés du cofacteur NADPH, n'était pas biotransformé. Ces résultats suggèrent que les enzymes appartenant à la famille des CYP ne sont vraisemblablement pas impliqués dans les réactions de débromination des PBDE fortement bromés. De plus, les travaux de McKinney *et al.* (2011), ont démontré une très faible déplétion du BDE-209 dans les microsomes hépatiques de mammifères marins incubés avec du NADPH comme unique cofacteur suggérant que les CYP seraient peu ou pas impliqués à cette étape de la biotransformation du BDE-209.

Noyes *et al.* (2011, 2013) ont étudié la débromination du BDE-209 chez les poissons Tête de boule (*Pimephales promelas*), et son impact sur le système thyroïdien. Les résultats ont confirmé la débromination du BDE-209 chez le poisson tête de boule. La figure 1.3 présente les voies de débromination et souligne un retrait préférentiel des bromes au niveau des positions méta- et para- des cycles aromatiques. De plus, les perturbations sur les taux d'hormones thyroïdiennes ont été reliées à une

augmentation transitoire de l'expression des gènes des déiodinases suivis d'une diminution de leur expression au terme de la période d'exposition. Cette enzyme a pour fonction la déiodination de l'hormone thyroïdienne T₄, au niveau de la thyroïde, du foie, et du cerveau, pour former un isomère actif de la T₃-ORD (Outer-Ring Deiodination) ou inactif T₃ IRD (Inner-Ring Deiodination) (Figure 1.4) (Köhrle, 2002).

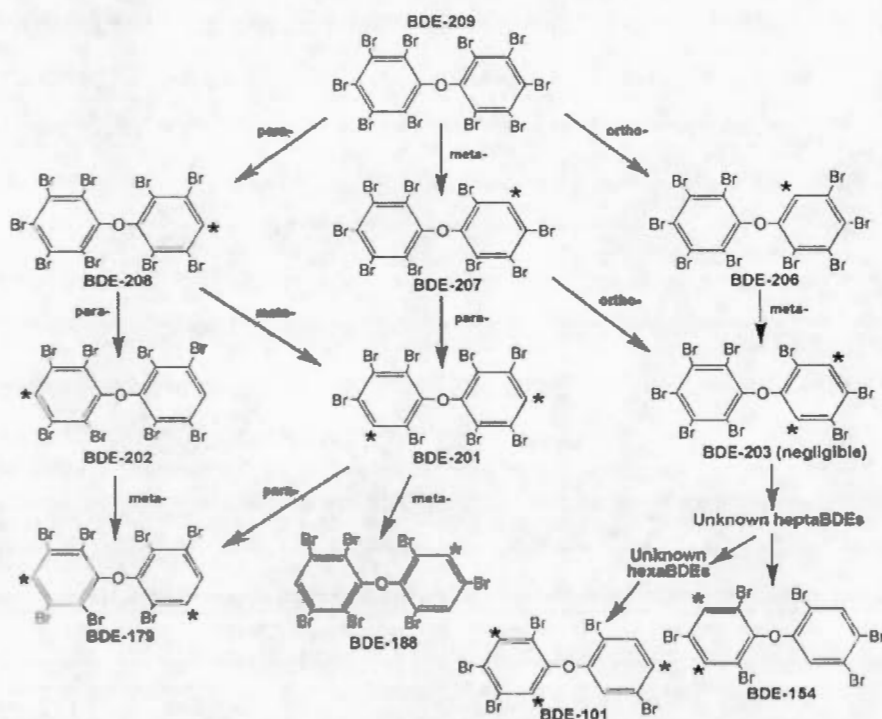


Figure 1.3 Prédiction des voies de débromination du BDE-209 chez le Tête de boule (*Pimephales promelas*) (tirée de Noyes *et al.*, 2011)

Les PBDE étant structurellement proches des hormones thyroïdiennes (cf Figure 1.2), il a été proposé que les déiodinases hépatiques de type I soient impliquées dans le mécanisme de débromination du BDE-209 (Noyes *et al.*, 2013, 2011). L'exposition au BDE-209 constitue donc un risque car 1) cette molécule possède un potentiel de perturbation du système thyroïdien et 2) ses métabolites, des PBDE faiblement

bromés pouvant à leur tour générer des OH-PBDE, sont reconnus pour être plus toxiques, bioaccumulables et plus persistants que la molécule mère (Cf 1.1.2 Toxicité des mélanges penta- et octa-BDE)

1.1.6 Les déiodinases

Les déiodinases sont une famille de sélénoprotéines, mesurant approximativement 29 à 33 kDa, retrouvées majoritairement à la membrane du réticulum endoplasmique. Il existe trois isoformes de l'enzyme (D1, D2 et D3) qui diffèrent par les réactions qu'ils peuvent catalyser, et par leur distribution dans les tissus périphériques. Ces enzymes sont très bien conservées à travers les vertébrés et les mammifères (Darras *et al.*, 2006). Elles se caractérisent par la présence d'une sélénocystéine et de deux résidus d'histidines au niveau du site actif. La sélénocystéine qui est responsable de l'activité des déiodinases est insérée grâce à l'ajout de l'élément SECIS en aval d'un codon stop UGA au niveau de l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm des déiodinases (Dentice *et al.*, 2013). Le cycle catalytique de l'enzyme est composé de deux réactions. Dans un premier temps, il y a un transfert d'un I^+ au niveau du groupement selenoate (Se^-) pour former le complexe : enzyme-Se-I. Dans un second temps, la réduction du complexe E-Se-I par un cofacteur comportant un groupe -thiol. Les cofacteurs utilisés généralement en laboratoire pour les essais *in vitro* sont le dithiothreitol (DTT) ou le dithioerythritol (DTE) (Köhrle, 2002; Sanders *et al.*, 1997). Les déiodinases sont responsables de la régulation de l'activité des hormones thyroïdiennes. En effet, chez les oiseaux, la thyroïde produit majoritairement la prohormone inactive thyroxine (T_4) qui est ensuite métabolisée par les déiodinases au niveau des tissus périphériques (Köhrle, 2002). Pour obtenir une version active de l'hormone, les déiodinases vont catalyser la conversion de la thyroxine (T_4), en 3-3' triiodothyronine (T_3), par déiodination de l'anneau aromatique externe, Outer ring

deiodination (ORD) (Figure 1.4). Elles peuvent également produire une version inactive 3-3' reversed-triiodothyronine (rT_3) et diiodothyronine (T_2) par déiodination de l'anneau aromatique interne ou Inner ring deiodination (IRD) (Darras *et al.*, 2000) (Figure 1.4).

Les déiodinase de type I sont exprimées majoritairement au niveau du foie chez les oiseaux, mais on en retrouve également au niveau des reins, des intestins et des poumons (Darras *et al.*, 2000). Les D1 sont les seules déiodinases capables d'effectuer la désiodation au niveau interne et externe (IRD et ORD) et donc de produire de la T_3 , rT_3 et T_2 à partir de la prohormone T_4 (McNabb et al, 1992). Chez le poulet, la D1 possède une très longue demi-vie (8 h), comparée à la D2 (27 min) et la D3 (24 min) (Darras *et al.*, 2000). Les D1 ne présentent pas la même affinité pour toutes les hormones thyroïdiennes. Le substrat préférentiel de la D1 sera la rT_3 comparé à la T_4 et la T_3 . Toutes les déiodinases peuvent être inhibées par des molécules telles que l'iodoacétate ou l'acide iopanoïque (Darras *et al.*, 2000). Contrairement aux autres déiodinases, la D1 peut être également inhibée irréversiblement par le 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) avec laquelle il forme un complexe : enzyme-Se-S-PTU (Köhrle, 2002). Cependant, chez certains vertébrés, le PTU ne provoque qu'une faible, (*Tilapia*) voir aucune (*Xenopus*) inhibition de la D1 (Sanders *et al.*, 1997).

Les déiodinases ont été étudiées sur quelques modèles aviaires fréquemment utilisés en laboratoire (e.g. poulet, canard, caille), mais il existe peu d'information sur le fonctionnement de ces enzymes chez les oiseaux à l'état sauvage (Darras *et al.*, 2006).

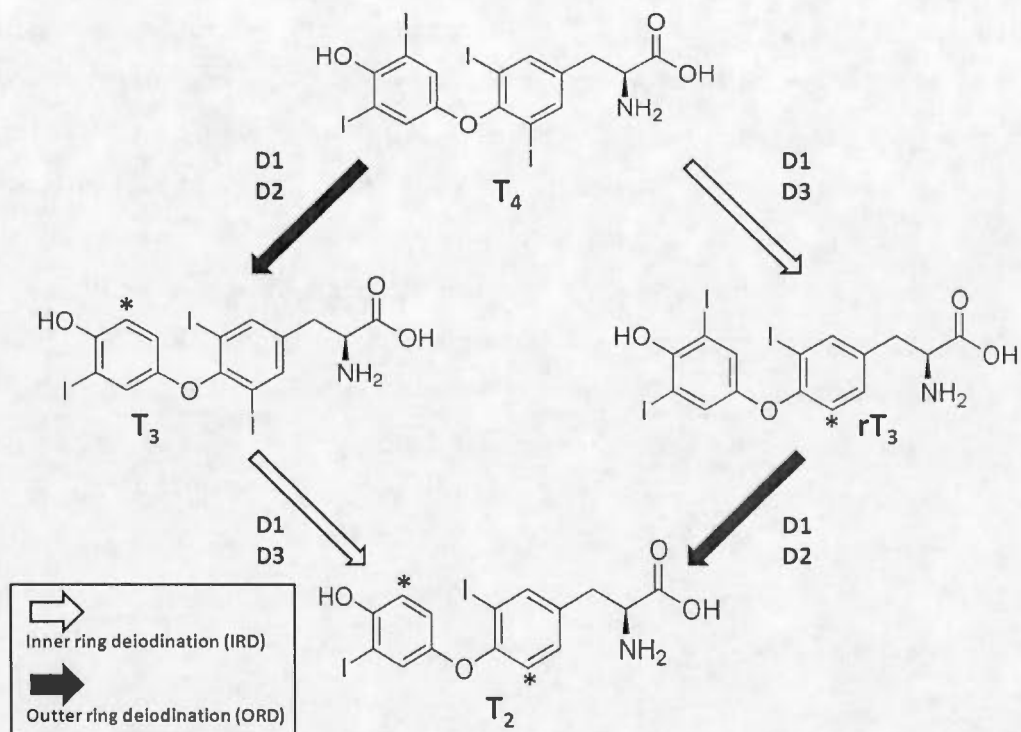


Figure 1.4 Conversion de T₄ en T₃ actif (Outer-Ring Deiodination) ou rT₃ ou T₂ inactif (Inner-Ring Deiodination)

1.1.7 Modèle d'étude : Le goéland à bec cerclé

Le goéland à bec cerclé est une espèce de la famille des laridés assez répandue au Québec avec une population d'environ 123 500 couples nicheurs dénombrés au début du 20^{ième} siècle (Brousseau, 1995). À partir des côtes orientales de l'Amérique et du golfe du Mexique, ils migrent vers le nord dès le mois de mars et s'établissent en colonie (Gauthier et Aubry, 1995 ; Gabrey, 1996). On les retrouve généralement le long du fleuve St-Laurent où ils sélectionnent des petits îlots ou berges où la végétation est peu dense (Brousseau, 1995). En milieu urbain, on peut les observer sur les aires de remblayage, et sur les toits d'immeuble ou d'usine où certains oiseaux établissent leurs nids. Le goéland à bec cerclé est un oiseau opportuniste, se nourrissant de ce qu'il trouve : poissons, déchets, insectes, vers de terre, et petits

mammifères (CEAEQ, 2005). Son aire d'alimentation peut être située à plusieurs kilomètres du lieu de nidification, mais il est rare de le voir se déplacer à plus de 15km de sa colonie pour se nourrir (Nellis, 2001). Il fréquente souvent les lieux d'enfouissement technique et les zones urbaines aux abords des places publiques, des restaurants et des poubelles à la recherche de nourriture (Caron-Beaudoin *et al.*, 2013). De plus, des études récentes ont montré des corrélations entre les niveaux de BDE-209 des goélands à bec cerclé de l'île Deslauriers et la fréquentation des lieux d'enfouissement technique des régions avoisinantes (Gentes *et al.*, 2015). Bien qu'il y ait peu d'informations sur l'accumulation des PBDE au cours de sa période de migratoire, le goéland à bec cerclé représente un modèle d'étude idéal pour étudier la contamination aux PBDE dans la région de Montréal et les zones environnantes, mais aussi afin de déterminer comment l'organisme de cette espèce aviaire sauvage réagit à cette contamination.

1.2 Hypothèses et objectifs

Les goélands à bec cerclé nichent sur l'île Deslauriers à proximité d'une zone fortement touchée par la pollution d'origine anthropique (région de Montréal). De ce fait, ils sont exposés à une large gamme de polluants, dont les retardateurs de flamme halogénés tel que les PBDE. L'objectif principal de ce projet est de déterminer les relations entre les **concentrations de PBDEs accumulées** et la **transcription** et l'**activité des déiodinases hépatiques** chez le goéland à bec cerclé du fleuve St-Laurent. Les résultats de cette étude indiqueront les relations entre la contamination de l'espèce et les déiodinases hépatiques de type I, tant au niveau de l'activité que de sa transcription et pourront stimuler de nouvelles pistes de recherches dans le cadre d'études futures. Ce projet s'inscrit donc dans une démarche d'élucidation quant aux hypothèses de débromination du BDE-209 par les D1 chez un modèle aviaire tel que le goéland à bec cerclé.

1.2.1 Objectif spécifique

1. Déterminer s'il existe des relations entre les concentrations hépatiques des PBDE fortement bromés (hepta-, octa-, nona- et deca-BDE), la transcription et l'activité des déiodinases hépatiques de type I chez le goéland à bec cerclé nichant dans la région de Montréal, QC

1.2.2 Hypothèses

1. La transcription et l'activité des déiodinases hépatiques de type I varient en fonction des concentrations de PBDE accumulées dans le foie du goéland à bec cerclé du fleuve St-Laurent

Considérant le potentiel de perturbation du système thyroïdien par les PBDE ainsi que leur similarité structurale avec les TH, les concentrations de PBDE accumulées dans le foie provoqueraient une induction ou une réduction de la

transcription des D1 hépatiques qui se traduirait par une augmentation ou une diminution de l'activité des D1 hépatiques chez le goéland à bec cerclé.

2. Les individus ayant de fortes activités de D1 possèdent de plus fortes concentrations de hepta-, octa- et nona-BDE

Considérant la débromination du BDE-209 en congénères du groupe des hepta-, octa- et nona-BDE mise en évidence chez les oiseaux dans des études *in vivo* (Letcher *et al.*, 2014; Van den Steen *et al.*, 2007), ainsi que la possible implication des déiodinases dans cette réaction de biotransformation, il est prévu d'observer de plus fortes concentrations d'hepta-, octa- et nona-BDE chez les goélands à bec cerclé ayant de fortes activités de D1 en comparaison aux individus ayant de faibles activités de D1.

CHAPITRE II

RELATIONSHIPS BETWEEN POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS, TRANSCRIPTION AND ACTIVITY OF TYPE 1 DEIODINASE IN A GULL HIGHLY EXPOSED TO FLAME RETARDANTS

Anthony François^a, Romy Técher^a, Magali Houde^b, Philip Spear^a and
Jonathan Verreault^{a,*}

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

^b Environment Canada, Centre Saint-Laurent, 105 McGill Street, Montreal,
QC, H2Y 2E7, Canada

Accepted manuscript online: 14 January 2016, in Journal of environmental
toxicology and chemistry

ABSTRACT

Deca-brominated diphenyl ether (deca-BDE) mixture, composed mainly of BDE-209, is subject to usage restrictions in North America and Europe, although global action on its continued use has yet to be undertaken. Relatively large concentrations of PBDEs, especially BDE-209 and its higher-brominated degradation products, have been reported in tissues of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) breeding near the densely-populated city of Montreal (QC, Canada). There is limited knowledge of BDE-209 biotransformation and toxicokinetics in birds. Deiodinases, a class of enzymes catalyzing thyroid hormone conversion, have been suggested to be involved in BDE-209 debromination in birds. The objective of this study was to investigate the relationships between PBDE concentrations and type 1 deiodinase (D1) transcription and *in vitro* activity (microsomes) in liver of Montreal-breeding ring-billed gulls. Ring-billed gulls exhibiting highest D1 activity in liver microsomes accumulated the greatest liver concentrations of hepta- and octa-BDEs. Activity of D1 was inversely related to concentration ratios of BDE-209 to \square octa- and \square hepta-BDE. An even stronger inverse relation was found between D1 activity and BDE-209 to Σ nona+octa+hepta-BDE concentration ratios. The mRNA levels of D1 in liver of gulls were inversely associated with liver concentrations of Σ octa-BDE. The present findings suggest that D1 is potentially involved in BDE-209 biotransformation and accumulation of higher-brominated PBDEs in liver of ring-billed gulls.

Keywords: PBDE; deca-BDE; halogenated flame retardants; biotransformation; deiodinase; *in vitro* assay; bird

2.1 Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of halogenated flame retardants (HFRs) used in a range of consumer products (e.g., plastics, upholstered furniture, textiles, electronics, and insulation materials) to delay ignition, and thus comply with international fire safety standards. In 2009, the production and use of two commercial PBDE formulations (i.e., penta- and octa-BDE) were banned under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POP) [1]. The use of Deca-BDE, consisting of >97% of the fully brominated congener BDE-209, was recently phased-out in North America and Europe (2014), although it is still used today in many countries in Asia [2].

Bioaccumulation of BDE-209 and several higher-brominated PBDE congeners have been reported in tissues of birds worldwide. For instance, in Europe, BDE-209 was determined in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from north (mean: 4.63 ng/g wet weight) and south (mean: 4.79 ng/g wet weight) Sweden [3]. Even greater BDE-209 concentrations have been reported in peregrine falcon eggs from North America (up to 136 ng/g wet weight in California [4] and 50.0 ng/g wet weight in Northeast USA [5]). In Asia, liver tissue of common kestrels (*Falco tinnunculus*) from northern China (Beijing area) contained unusually large BDE-209 concentrations (mean: 367 ng/g wet weight) [6]. A study of free-ranging chickens (*Gallus domesticus*) sampled near an e-waste recycling site in China [7] also reported moderate liver concentrations of BDE-209 (mean: 5.20 ng/g wet weight) and two of its potential debromination products (BDE-207, mean: 2.0 ng/g wet weight and BDE-196, mean: 0.38 ng/g wet weight). In ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) breeding near the densely-populated city of Montreal (QC, Canada), BDE-209 represented one of the major PBDE congeners found in liver (mean: 57.2 ng/g wet weight), making up between 10 and 20% of \sum_{45} PBDE congeners [8]. Several higher-brominated PBDE congeners that are known or putative degradation products of BDE-209 (e.g.,

BDE-196, -197, -201, -202, -203, -204, -207, and -208) were also detected in liver of these ring-billed gulls [8,9] as well as in other species of birds from different regions [4,6,7].

Sequential debromination was suggested as the main biotransformation pathway for BDE-209 in birds [9-11]. For instance, Van den Steen et al. [10] demonstrated that European starlings (*Sturnus vulgaris*) exposed to BDE-209 released from silastic implants accumulated octa- and nona-BDE congeners (e.g., BDE-197, -206, -207, and -208), which suggested that *in vivo* debromination of BDE-209 occurred in these birds. In another study conducted by Letcher et al. [11], greater concentrations of BDE-196, -197, -203, -206, -207, and -208 were found in American kestrels (*Falco sparverius*) fed cockerels (*Gallus domesticus*) injected with BDE-209. However, to our knowledge, no information is available on the enzyme system involved in the debromination of BDE-209 in birds. Nonetheless, a study by Chabot-Giguère et al. [9] showed that BDE-209 incubated with ring-billed gull liver microsomes (NADPH was used as cofactor) for 90 min did not yield higher-brominated PBDE congeners, suggesting that cytochrome P450 (CYP) isoenzymes are unlikely to be involved in the biotransformation of BDE-209 in liver of this species. It was postulated in this study, and another conducted on fish [16], that deiodinases may catalyze bromine removal from BDE-209 in vertebrates.

Deiodinases are membrane-bound selenocystein enzymes associated with the endoplasmic reticulum in vertebrates [12]. The three isoforms of this enzyme (D1, D2, and D3) differ in their activity and distribution in peripheral tissues. Deiodinases catalyze iodine removal from the prohormone thyroxine (T_4) to yield the active thyroid hormone triiodothyronine (T_3) by outer ring deiodination (ORD) or its inactive forms, reverse- T_3 (rT_3) and diiodothyronine (T_2), by inner ring deiodination (IRD) [13,14]. D1 has been shown to maintain equilibrium of thyroid hormone levels during altered thyroid events (e.g., thyrotoxicosis and iodine deficiency) [15]. D1

may also play a role in thyroid hormone clearance via formation of T_2 through both ORD and IRD. Because PBDE congeners share some structural similarities with thyroid hormones, a growing number of studies suggest that deiodinase-mediated debromination of PBDEs may take place in vertebrates. For example, Noyes et al. [16] fed BDE-209 to fathead minnows (*Pimephales promelas*) for up to 28 days, followed by a 14-day depuration period, and observed changes in deiodinase (D1 and D2) mRNA levels in liver. It was suggested that D1 mRNA expression levels were up-regulated during the depuration period, while D2 mRNA showed a transient up-regulation at day 14 and 42, and control-like mRNA levels at day 28 [16]. To our knowledge, no study has explored the linkages between tissue PBDE accumulation and deiodinase expression and activity in birds.

The objective of the present study was to investigate the relationships between liver PBDE concentrations, and transcription and *in vitro* activity of D1 (a major deiodinase in bird liver) in ring-billed gulls breeding near the metropolis of Montreal. The ring-billed gull is the most abundant gull species breeding in this area of the St. Lawrence River [17]. This urban-adapted omnivorous bird is known to benefit from a wide array of anthropogenic-related habitats to forage (e.g., waste management facilities and urban areas), and was shown to be exposed to high concentrations of PBDEs, and especially BDE-209 [18]. Moreover, high PBDE exposure in male ring-billed gulls from Montreal area has been suggested to adversely affect bone (tarsus) mineral density (i.e., bone tissue demineralization) [19], which could be linked, among other factors, to thyroid hormone disruption. Recent findings from our laboratory further showed that PBDE concentrations in ring-billed gulls were positively associated with the ratio of total T_4 to T_3 levels in plasma, and transcription of several genes involved in hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis (i.e., synthesis, metabolism, transport, and action) [20]. We hypothesized that D1 transcription and *in vitro* activity in liver of ring-billed gulls are related to liver concentrations of BDE-209 and its potential debromination products.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Sample collection

Fieldwork was carried out in May 2013 on Deslauriers Island located in the St. Lawrence River, 3.25 km downstream of Montreal. Approximately 44,000 pairs of ring-billed gulls nest on this island annually [21], which makes it the largest colony in Eastern Canada. Adult males ($n = 8$) and females ($n = 14$) were randomly selected in all areas of the colony and live-captured while incubating using a nest trap triggered from a distance by a remote control. Birds were euthanized by cervical dislocation. The left lobe of the liver was collected within 5 min of euthanasia, and aliquots were stored immediately in liquid nitrogen and RNALater (Qiagen, Toronto, ON, Canada). The right lobe of the liver was kept on ice in a cooler while in the field. In the laboratory, the left lobe of the liver stored in liquid nitrogen was transferred to a -80°C freezer until microsome preparation (section 2.4.1) and the right lobe was kept in a -20°C freezer until chemical analysis (section 2.2). The liver (left lobe) aliquot kept in RNALater was stored at -80°C until D1 RNA extraction (section 2.3).

Permission to collect ring-billed gulls was granted by the Canadian Wildlife Service (permit no. SC-23), while capture and handling methods were approved by the Institutional Committee on Animal Care of the Université du Québec à Montréal (permit no. 768), and complied with the guidelines issued by the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada).

2.2.2 PBDE analysis

Liver samples were analyzed for 31 PBDE congeners. The sample preparation procedures, which included lipid content determination, extraction, and clean-up employed for the analysis of PBDEs in tissues of ring-billed gulls have been previously described [18], and were applied without modification. Identification and

quantification of target analytes were performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA, USA) operating in the electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI) [18]. The analytical column (15 m x 0.25 mm x 0.10 μ m) was a fused-silica DB-5 HT capillary column (J & W Scientific, Brockville, ON, Canada). Quality control and assurance procedures included procedural method blanks and standard reference material (SRM 1947; Lake Michigan fish tissue) for each batch of ten samples. Blank correction of all samples was performed for the following PBDE congeners: BDE-47, -197/204, -206, and -209. Mean (\pm SEM) internal standard recoveries from ring-billed gull liver, blank and SRM 1947 samples were as follows: BDE-30 ($90.7 \pm 2.4\%$), BDE-156 ($92.9 \pm 3.6\%$), and [^{13}C]BDE-209 ($57.9 \pm 3.7\%$). Concentrations of PBDEs were quantified using an internal standard approach, and thus all analyte concentrations were recovery-corrected. Method limits of detection (MLODs; defined as signal to noise ratio (S/N) = 3) and method limits of quantification (MLOQs; minimum amount of analyte producing a peak with S/N = 10) were based on replicate analyses (n = 8) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit [8].

2.2.3 Hepatic D1 mRNA transcription analysis

Total RNA was extracted from 10-20 mg of ring-billed gull liver stored in RNALater (kept at -80°C) using the RNeasy plus mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Each sample was first disrupted in 50 μL of chilled RLT Plus buffer (Qiagen) using a sterile plastic pestle and 550 μL of RLT Plus buffer was added, and further homogenized. A genomic DNA elimination step was included using a gDNA eliminator spin column (Qiagen) at $12,000 \times g$ for 30 s at room temperature. RNA concentration and purity were estimated using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada). The absorbance ratios (A₂₆₀/A₂₈₀) were between 1.9 and 2.1. RNA integrity was

checked against the Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) using the Experion RNA StdSens Analysis kit (Bio-Rad). The RNA Quality Indicator values were between 9 and 10. A total volume of 20 μ L complementary DNA (cDNA) was prepared using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, and stored at -20°C until real-time quantitative PCR analysis (qPCR).

Gene sequences were not available for D1 or the 3 reference genes (see below) for ring-billed gulls. A primer pair designed by Crump et al. [22] for chicken (*Gallus gallus*) D1 (access number: NM_001097614.1; 5'-TCTTTGTGCTGAAGGTGAAGTGG-3' (forward) and 3'-AGGTTCGTTATCTCGCATGAAAC-5' (reverse); amplicon length 133 bp) and manufactured by IDT (Coralville, IA, USA) was validated for ring-billed gulls as part of a companion study [20]. Primer pairs for the 3 reference genes were designed based on chicken mRNA sequences available on NCBI with Primer-BLAST from NCBI (Primer3 with Blast [23]). The primer pairs used to amplify the selected reference genes (analysis by geNorm and Normfinder in GenEx) were as follows: 5'-ACGGAGAATGTCGTGGTGT-3' (forward) and 5'-GCAGTGCCATCACCTGTACT-3' (reverse) (amplicon length 151 bp) for succinate dehydrogenase complex subunit A (SDHA), 5'-ACTACAACCACCTGATGCCC-3' (forward) and 5'-CTTCACGTCTTGCTTTGCGT-3' (reverse) (amplicon length 101 bp) for TATA box binding protein (TBP), and 5'-CATCACAGCAAGCGACACAG-3' (forward) and 5'-GTACAGAGGTGTGGTCCCG-3' (reverse) (amplicon length 114 bp) for ribosomal protein L27 (RPL27). A calibration curve was performed for each primer pair (starting cDNA concentration: 500 ng, 8 serial dilutions) to estimate PCR efficiencies (values were between 90-110%) and limits of detection. The qPCR amplifications were run in 96-wells plate, and each reaction was performed in triplicate. Each well consisted of 5 μ L cDNA template diluted at 50 ng/ μ L, 6.5 μ L iQ™ SYBR Green supermix (SYBR Green I dye, 25 units/mL iTaq™ DNA

polymerase, 0.2 mM of each dNTPs, 3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.4, 10 nM fluorescein and stabilizers), 0.26 μL forward and reverse primers (200 nM each), and 0.98 μL DEPC-treated water. Cycling parameters were 95°C for 2 min, then 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 5 s. Amplification specificity was verified with a melting curve. No-template control (NTC) was included on each plate. Data acquisition was performed by CFX Manager software (Bio-Rad). Quantification cycle (Cq) values were then imported into GenEx 5.31 Enterprise software (MultiD Analyses AB, Santa Clara, CA, USA), and fold change values were calculated after efficiency correction and normalization applying the comparative threshold method ($\Delta\Delta C_t$) [24] and Cq geometrical mean as reference.

2.2.4 Hepatic microsomal deiodinase activity determination

2.2.4.1 Hepatic microsome preparation

Ring-billed gull liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation based on previous work [9]. Briefly, 400 mg of liver was thawed on ice and homogenized using a Potter-Elvehjem tissue grinder in a phosphate buffer (0.1M KH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄; pH 7.4). The homogenized liver was then transferred to a cool (approximately 4°C) polyallomer 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 - 0.25M sucrose; pH 7.0). The final microsomal suspension was aliquoted in 2 mL cryovials that were kept at -80°C until the D1 *in vitro* activity assay (section 2.4.2.). The hepatic microsomal protein content was determined following the Lowry method [25].

2.0.4.2 D1 activity assay

Measurement of hepatic microsomal D1 activity was performed using an *in vitro* assay adapted from Noyes et al. [26]. Preliminary tests were conducted to determine the optimal reaction time (30, 45, 60, 75, 90, or 120 min) (Supplemental Data, Figure S1) and substrate (unlabelled-T₄) concentration (0.25, 0.5, 0.65, 0.75, 1.0, or 2.0 μM) (Supplemental Data, Figure S2). The reaction using 1 mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins was found to be linear up to 75 min with a T₄ concentration of 0.65 μM. All conditions, including reaction, blank, and control tubes were tested in duplicate. Briefly, reaction and control (A and B) tubes consisted of ring-billed gull liver microsomes (1 mg proteins) in a potassium phosphate buffer (0.1M KH₂PO₄, 0.1M Na₂HPO₄; pH 7.4) spiked with 0.5 μCi L-[¹²⁵I]T₄ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and 0.65 μM of T₄. Control A tubes, in which no cofactor was added, were used to monitor for any non-microsomal biotic or abiotic transformation, while in control B tubes (i.e., negative controls), propyl-n-thiouracil (PTU) (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) was used as specific D1 inhibitor [12,13,16] at concentration of 2.5 mM (100% inhibition in gull liver microsomes; see section 2.5.3. and Supplemental Data, Figure S3) with the cofactor. Blank tubes consisted of ring-billed gull hepatic microsomes (1 mg proteins) in potassium phosphate buffer only. The final volume of the reaction was 500 μL for all tubes. The tubes were first preincubated for 5 min at 41°C (bird body temperature) in a water bath, and the reaction was started by adding 10 mM of the cofactor dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich) to all tubes (except for control A) with a 5 μL syringe, and incubated for 75 min. The reaction was terminated by the addition of 500 μL ice-cold methanol (Sigma Aldrich), and the solution was centrifuged (9,000 x g; 10 min).

The concentrations of ¹²⁵I-labeled T₄ and its deiodinated products [¹²⁵I]T₂ and [¹²⁵I]T₃ (Sigma Aldrich) were determined using a narrow-bore high-performance liquid chromatograph (HPLC) (1200 series; Agilent Technologies, Toronto, ON, Canada) comprised of a degasser, binary pump, and automatic injector. The injection volume was 15 μL. The mobile phase (0.4 mL/min flow rate) was changed along a

linear gradient between 0 and 9 min from 48% methanol:52% water (0.1% phosphoric acid) to 58% methanol:42% water (0.1% phosphoric acid), and the final conditions were held until 14 min. A Zorbax Eclipse Plus C-18 column (Solvent Saver HT; 3 x 50 mm; 1.8 μ m particle size) was used to separate [125 I]T₄, [125 I]T₂, and [125 I]T₃ (Supplemental Data, Figure S4), which were quantified using a Perkin-Elmer flow scintillation detector (Radiomatics model 610TR; 125 μ L volume; Gamma C-Flow counting cell; Boston, MA, USA) with a ProFSA data acquisition package. Continuous peak monitoring was conducted at 230 nm using 400 nm as reference (series 1100 diode-array detector; Agilent Technologies) and a UV detector was used to determine retention times for authentic T₄, rT₃, T₃, and T₂ standards.

The hepatic microsomal D1 *in vitro* activity in ring-billed gull hepatic microsomes was determined using the following equation:

$$[T_3] = [^{125}\text{I}]T_3 \text{ area (CPM)} \times [T_4]_i (\mu\text{M}) / [^{125}\text{I}]T_4 \text{ area (CPM)}$$

Where [125 I]T₃ area (CPM) corresponds to mean [125 I]T₃ peak area in reaction tubes, [T₄]_i (μ M) to initial spiked T₄ concentration, and [125 I]T₄ area (CPM) to mean [125 I]T₄ peak area in control A tubes. Microsomal T₂ activity was calculated by substituting [125 I]T₂ area (CPM) in the first term of the equation. This result was divided by the time of reaction (in min) and protein quantity (in g). D1 activity was calculated using the individual T₃ and T₂ peak areas, however, since T₂ can be formed through both ORD and IRD, the present assay did not allow discriminating between the relative contributions of ORD and IRD. For this reason, total D1 activity was calculated by summing [125 I]T₃ and [125 I]T₂ formation rates (in pmol/min/g of proteins), and used to express overall D1 activity in ring-billed gull liver microsomes.

2.2.5 Statistical analysis

Normal distribution of the data was verified using the Shapiro-Wilk test. Because a normal distribution could not be achieved for most variables and because of low sample size, non-parametric tests were used. Wilcoxon tests were performed to determine potential differences in hepatic D1 transcription and activity as well as PBDE concentrations between male and female ring-billed gulls. Spearman rank correlation was used to examine the strength of the relationships between D1 transcription and activity, and PBDE concentrations. For these correlation analyses, combined males and females were used. D1 relative quantities (D1 RQ) were log₂-transformed in order to discriminate “higher” and “lower” D1 mRNA levels between individuals (males and females combined) compared to this sub-population geometric mean D1 RQ. This analysis yielded two separate groups, a high (n = 11) and a low (n = 11) D1 mRNA transcription group, for which differences in D1 activity and PBDE concentrations were analyzed using the Wilcoxon test. The low D1 mRNA transcription group contained more males (n = 6) than females (n = 5), while the high D1 mRNA transcription group contained more females (n = 9) than males (n = 2). Liver concentration (ng/g wet weight) ratios of BDE-209 to Σ nona-, Σ octa-, and Σ hepta-BDE and their combined sums (Σ nona+octa+hepta-BDE) were used as markers of sequential BDE-209 debromination as these were shown to be the most abundant congener classes in *in vivo* studies of birds dosed with BDE-209 [10,11] and to correct for differences in liver PBDE concentrations between males and females (Supplemental Data, Figure S5). The statistical package used was JMP 10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), and tests were considered to be significant when $p \leq 0.05$ or tendencies when $0.05 < p \leq 0.1$.

2.3 Results

2.3.1 Hepatic PBDEs concentrations

Tableau 2.1 Mean (\pm SEM) relative contributions (%) to Σ 31PBDE concentrations and mean and range concentrations (ng.g-1 wet weight) of PBDE congener classes^a determined in liver of combined ring-billed gull males and females (n = 22) breeding in Montreal area (QC, Canada).

	Relative Contribution	Mean \pm SEM	Range
Σ ₃ Di-BDE	0.1	0.16 \pm 0.03	<MLOQ - 0.41
Tri-BDE	0.1	0.11 \pm 0.02	0.02 - 0.39
Σ ₅ Tetra-BDE	20.6	26.3 \pm 3.81	9.36 - 68.6
Σ ₅ Penta-BDE	39.5	50.4 \pm 7.75	11.1 - 132
Σ ₄ Hexa-BDE	12.3	15.8 \pm 3.13	3.76 - 59.3
Σ ₄ Hepta-BDE	0.5	0.62 \pm 0.15	<MLOQ - 2.34
Σ ₅ Octa-BDE	7.4	9.49 \pm 1.85	1.50 - 32.5
Σ ₃ Nona-BDE	6.9	8.81 \pm 1.63	2.29 - 28.9
Deca-BDE	12.5	15.9 \pm 1.90	2.98 - 32.5
Σ ₃₁ PBDE	-	128 \pm 18.6	39.8 - 334

^a Σ ₃Di-BDE: BDE-7, -10, and -15; Tri-BDE: BDE-17; Σ ₅Tetra-BDE: BDE-47, -49, -66, -71, and -77; Σ ₅Penta-BDE: BDE-85, -99, -100, -119, and -126; Σ ₄Hexa-BDE: BDE-153, -139, -140, and -138; Σ ₄Hepta-BDE: BDE-171, -180, -184, and -191; Σ ₅Octa-BDE: BDE-196, -197/-204, -201, -203, and -205; Σ ₃Nona-BDE: BDE-206, -207, and -208; Deca-BDE: BDE-209.

MLOQ: Method limit of quantification.

Tetra-, penta- and deca-BDE (BDE-209) were the major congener classes found in ring-billed gull liver (Table 1). The 6 major PBDE congeners detected in both male and female ring-billed gull liver were (in decreasing order) BDE-99, -47, -209, -153, -100, and -207 (Supplemental Data, Figure S5). There was no difference in

concentrations of the sum of all 31 PBDE congeners (i.e., $\sum_{31}\text{PBDE}$), $\sum\text{di-BDE}$ through $\sum\text{penta-BDE}$, $\sum\text{hepta-BDE}$, and $\sum\text{nona-BDE}$ between sexes. However, females tended to have lower $\sum\text{hexa-BDE}$ ($X^2 = 3.40$; $p = 0.07$) and $\sum\text{octa-BDE}$ ($X^2 = 3.15$; $p = 0.08$) concentrations compared to males. Liver BDE-209 concentrations directly associated with those of $\sum\text{hepta-BDE}$ ($r = 0.66$; $p = 0.0007$), $\sum\text{octa-BDE}$ ($r = 0.72$; $p = 0.0002$), $\sum\text{nona-BDE}$ ($r = 0.98$; $p < 0.0001$), and $\sum\text{nona+octa+hepta-BDE}$ ($r = 0.95$; $p < 0.0001$) in combined male and female ring-billed gulls. Concentration ratios of BDE-209 to $\sum\text{nona-BDE}$ ($X^2 = 4.48$; $p = 0.03$), $\sum\text{octa-BDE}$ ($X^2 = 7.45$; $p = 0.006$), $\sum\text{hepta-BDE}$ ($X^2 = 5.07$; $p = 0.02$), and $\sum\text{nona+octa+hepta-BDE}$ ($X^2 = 6.73$; $p = 0.01$) were significantly lower in males compared to females. One male exhibited unusually high concentrations of PBDEs, and thus this bird was excluded from further analyses as it was identified as an outlier based on the Jackknife test.

2.3.2 Hepatic D1 transcription

Tableau 2.2 Comparisons (Wilcoxon test) of mean (\pm SEM) total D1 activity (pmol.min⁻¹.g⁻¹), concentrations (ng.g⁻¹ wet weight) of PBDE congener classes (see Table 1 for details on congener composition) and their sums as well as selected PBDE concentration ratios between the two D1 transcription groups (i.e., high and low; see section 2.5.) in combined male and female ring-billed gulls breeding in Montreal area (QC, Canada).

Variables	Transcription groups		<i>p</i> value
	Low (<i>n</i> = 11)	High (<i>n</i> = 11)	
Total D1 activity	351 \pm 19.6	278 \pm 19.1	0.1
Tri-BDE	0.25 \pm 0.05	0.18 \pm 0.03	0.9
\sum_5 Tetra-BDE	28.2 \pm 4.48	24.3 \pm 3.15	1.0
\sum_5 Penta-BDE	53.6 \pm 8.73	47.2 \pm 7.00	1.0
\sum_4 Hexa-BDE	25.3 \pm 4.92	14.7 \pm 2.25	0.4
\sum_4 Hepta-BDE	4.56 \pm 0.78	2.35 \pm 0.40	0.07
\sum_5 Octa-BDE	13.7 \pm 2.11	5.26 \pm 0.97	0.006
\sum_3 Nona-BDE	29.8 \pm 3.36	18.8 \pm 2.81	0.1
BDE-209	18.1 \pm 1.69	13.7 \pm 2.06	0.2
\sum_{31} PBDE	157 \pm 23.1	114 \pm 15.5	0.4
BDE-209: \sum_4 hepta-BDE	5.46 \pm 0.77	7.56 \pm 0.94	0.3
BDE-209: \sum_5 octa-BDE	1.64 \pm 0.21	3.25 \pm 0.35	0.01
BDE-209: \sum_3 nona-BDE	0.63 \pm 0.02	0.72 \pm 0.01	0.02
BDE-209: \sum nona+octa+hepta-BDE	0.40 \pm 0.02	0.52 \pm 0.03	0.03

The D1 gene transcripts were significantly greater in female (1.4-fold) compared to male ring-billed gulls ($X^2 = 4.19$; $p = 0.04$). No relation was found between D1 mRNA levels and total D1 activity (see section 2.5.3.) in combined males and females. In ring-billed gulls for which D1 mRNA levels were categorized in the “low” D1 transcription group relative to this sub-population geometric mean, total D1

activity tended to be greater (1.3-fold) compared to gulls that were categorized in the “high” D1 transcription group ($X^2 = 2.18$; $p = 0.1$) (Table 2).

2.3.3 Hepatic D1 activity

Radiolabelled [^{125}I]T₃ and [^{125}I]T₂ were both quantified in liver microsomes (1 mg proteins) of ring-billed gulls incubated during 75 min with [^{125}I]T₄ (Supplemental Data, Figure S4). The addition of PTU in the assay resulted in the non-detection of neither [^{125}I]T₃ nor [^{125}I]T₂ (Supplemental Data, Figure S4). Formation rates of [^{125}I]T₃ ($X^2 = 5.07$; $p = 0.02$) and [^{125}I]T₂ ($X^2 = 2.91$; $p = 0.09$) were significantly (or tended to be) lower in female ring-billed gulls compared to males. Total D1 ([^{125}I]T₃ + [^{125}I]T₂ formation rates) activity in male ring-billed gulls (mean: 377 ± 35.8 pmol/min/g; range: 213-568 pmol/min/g) was significantly higher (1.4-fold) ($X^2 = 5.70$; $p = 0.02$) compared to females (mean: 279 ± 20.1 pmol/min/g; range: 129-491 pmol/min/g).

2.3.4 Relationships between hepatic PBDE concentrations, and D1 transcription and activity

The D1 mRNA levels in liver of combined ring-billed gull males and females were negatively associated with liver concentrations of \sum octa-BDE ($r = -0.45$; $p = 0.03$) and individual octa-BDE congeners: BDE-201 ($r = -0.49$; $p = 0.02$), BDE-197/-204 ($r = -0.45$; $p = 0.03$), although it was not significant for BDE-196 ($r = -0.37$; $p = 0.08$). No relation was found between liver D1 mRNA levels and concentrations of other PBDE congener classes or individual congeners. Combined males and females in the “low” D1 transcription group accumulated significantly greater (2.5-fold) liver concentrations of \sum octa-BDE ($X^2 = 7.43$; $p = 0.006$); a trend that was also observed for \sum hepta-BDE concentrations in this same group (2-fold greater; $X^2 = 3.27$; $p = 0.07$) (Table 2). Moreover, gulls in the “high” D1 transcription group exhibited significantly greater BDE-209: \sum nona+octa+hepta-BDE concentration ratios (1.3-

fold) ($X^2 = 4.84$; $p = 0.03$), which was consistent with BDE-209: Σ nona-BDE (1.2-fold greater) ($X^2 = 5.13$; $p = 0.02$) and BDE-209: Σ octa-BDE (2-fold greater) concentration ratios ($X^2 = 6.39$; $p = 0.01$) (Table 2).

Total D1 activity in liver microsomes of gulls (males and females combined) was inversely related to the ratios of BDE-209: Σ nona+octa+hepta-BDE concentrations ($r = -0.55$, $p = 0.008$; Figure 1). Consistent inverse relationships were observed for the following concentration ratios: BDE-209: Σ octa-BDE ($r = -0.48$; $p = 0.02$; Figure 1), BDE-209: Σ hepta-BDE ($r = -0.47$; $p = 0.03$; Figure 1), and BDE-209: Σ nona-BDE ($r = -0.35$; $p = 0.1$). A positive relationship, although not significant, was found between total D1 activity and concentrations of Σ hepta-BDE ($r = 0.40$; $p = 0.06$) and Σ octa-BDE ($r = 0.38$; $p = 0.08$). Moreover, total D1 activity tended to be positively associated with concentrations of individual hepta- and octa-BDE congeners: BDE-180 ($r = 0.41$; $p = 0.06$) and BDE-197/-204 ($r = 0.39$; $p = 0.07$). No relation was found between total D1 activity, and BDE-209 and Σ 31PBDE liver concentrations.

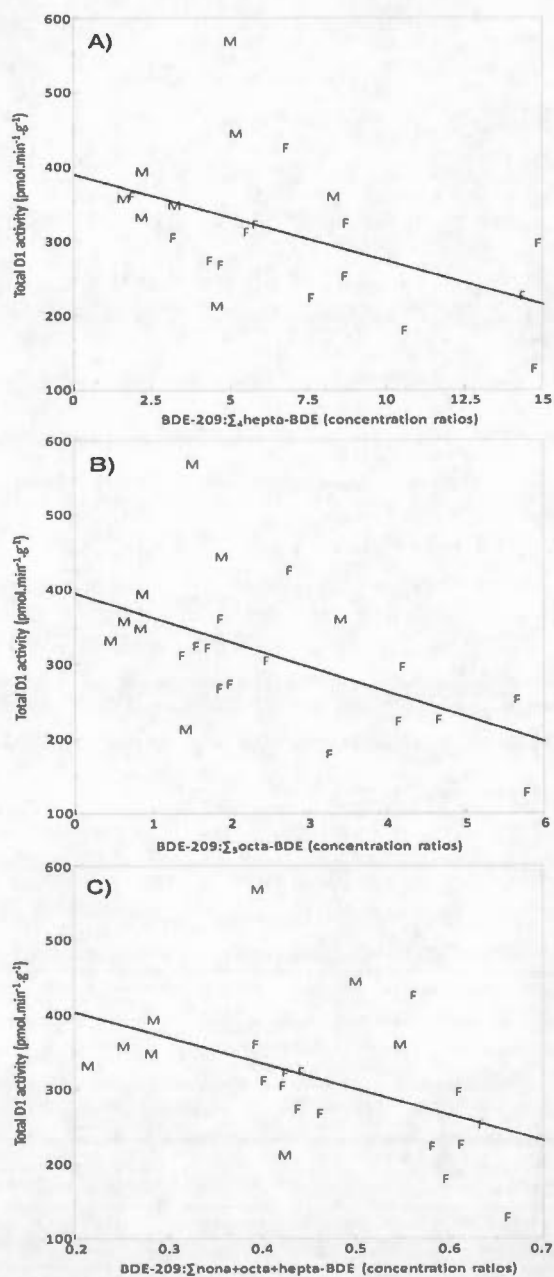


Figure 2.1 Correlations between total D1 activity (pmol/min/g) and concentration ratios of BDE-209 to A) \sum octa-BDE, B) \sum hepta-BDE, and C) \sum nona+octa+hepta-BDE in liver of combined ring-billed gull male sand females.

2.4 Discussion

2.4.1 PBDE concentrations

Hepatic BDE-209 concentrations in Montreal-breeding ring-billed gulls generally were greater relative to those reported for several species of birds from Europe [3,27], but were within the same concentration range as reported for birds of prey, e.g., peregrine falcons in North America [5]. However, BDE-209 concentrations in ring-billed gulls were lower than several avian species from Asia [4,6,7] where no usage restriction on deca-BDE has thus far been undertaken [2]. Moreover, PBDE concentrations and congener patterns found in liver of ring-billed gulls collected in 2013 differed slightly from those collected by Gentes et al. [8] from the same breeding colony in 2010. More specifically, mean BDE-209 concentrations in gulls in the present study were lower and contributed less to \sum_{31} PBDE concentrations (13.7%) compared to 2010 (25%) [8]. One potential explanation would be that these differences are attributed to the overrepresentation of males in the 2010 sample (6 females and 22 males; no sex-specific means were reported) relative to the present study (14 females and 8 males). In fact, because ring-billed gull sample collection was carried out between 1 and 28 days post egg-laying in both these years, females may have transferred a significant PBDE burden to their eggs [28]. Interestingly, liver concentrations of higher-brominated congeners (\sum hepta- and \sum nona-BDE, and BDE-209) in female ring-billed gulls did not differ from those of males, while \sum hexa- and \sum octa-BDE concentrations tended to be lower in females compared to males. This general PBDE pattern difference between sexes was consistent with the in ovo transfer dynamics for PBDEs reported elsewhere that showed preferential deposition of lower-brominated PBDEs into eggs compared to higher-brominated congeners (e.g., [28,29]). Furthermore, in a recent study [18], differences in foraging site preferences (i.e., time spent in waste management facilities) led to greater BDE-209 concentrations in plasma of male ring-billed gulls breeding in Montreal area, but not

in females, which suggest that foraging behavior may in part explain these sex-specific differences in liver PBDE profiles.

Concentrations of hexa-, octa- and nona-BDE congeners that accumulate in ring-billed gull liver can be influenced by environmental exposure to BDE-209 degradation products originating from abiotic (e.g., UV light and heat) and biotic processes (e.g., bacterial activity and metabolism in vertebrates) [30,31]. For example, exposure of BDE-209 to UV light was shown to yield hexa-BDEs and traces of other lower-brominated congeners by photolytic debromination [30]. Nonetheless, hexa-, octa- and nona-BDE congeners are also found in trace amounts in octa-BDE and deca-BDE commercial mixtures [32]. Hence, a portion of the higher-brominated PBDE burden in ring-billed gull liver resulting from dietary and/or atmospheric exposure can originate, at least in part, from these sources. However, because ring-billed gulls accumulate a series of potential BDE-209 debromination products (e.g., BDE-196, -197, -201, -206, -207, and -208) (e.g., [8,9, present study]) that are rarely detected in tissues of aquatic organisms such as fish collected from the St. Lawrence River near Montreal [33], further suggests that non-dietary exposure may be more important than dietary exposure in explaining the bioaccumulation of these higher-brominated congeners in this species [18]. This is partly supported by a study of Gentes et al. [18] who found positive associations between the time spent foraging (determined using miniature GPS data loggers) in waste management facilities where large amounts of PBDE-containing products are discarded, and BDE-209 concentrations in plasma of male ring-billed gulls. Alternatively, *in vivo* biotransformation of BDE-209 could also have occurred in ring-billed gull (e.g., debromination pathways mediated by hepatic deiodinases).

2.4.2 Hepatic deiodinase type I transcription and activity

Type 1 deiodinase in liver of vertebrates is implicated in both ORD and IRD of thyroid hormones, which leads to the formation of the 3 main deiodinated products: T_3 , rT_3 , and T_2 . The D1 possesses greater substrate affinity for rT_3 and T_3 relative to T_4 [15]. The HPLC chromatograms of ring-billed gull hepatic microsomes incubated with T_4 (and DTT as cofactor) showed that 2 peaks corresponding to T_3 and T_2 were formed in the 75 min *in vitro* assay. A rT_3 peak was identified in a few samples, although values were below the method detection limit for quantification in all samples. This suggests that both ORD and IRD took place in this *in vitro* assay, however, no information on the relative contributions of these 2 iodine-removal pathways could be obtained. The PTU was used as a specific inhibitor of D1 [12], which has been shown to be the major deiodinase type present in bird liver, followed by much smaller activities of D2 and D3 [13,34]. Because D3 is also capable of IRD (formation of rT_3 from T_4 , and T_2 from T_3) [12,13], and because no T_3 , rT_3 or T_2 peaks were detected in liver microsome incubates in which PTU was added, this confirms that both ORD and IRD were catalyzed by D1 in the present assay, but not D2 or D3. The absence of a rT_3 peak above quantification limit in all samples may be explained by the greater affinity of rT_3 to deiodinases relative to T_4 [15], which would have resulted in its nearly complete degradation during the 75 min assay.

Both hepatic D1 activity and mRNA levels differed between male and female ring-billed gulls. Differences in hepatic D1 activity and mRNA expression between sexes have been observed in some mammalian models. For example, Miyashita et al. [35] showed that after orchidectomy, male rats exhibited significantly lower D1 mRNA levels and activity. The D1 activity and mRNA concentrations reached control levels in the orchidectomized rats after testosterone injection. However, no difference in D1 mRNA levels and activity was observed after β -estradiol (E2) administration or ovariectomy in female rats. A more recent study by Šošić-Jurjević et al. [36] also showed that orchidectomy of young rats resulted in a decrease in D1 activity and TSH levels, and that testosterone administration resulted in a recovery of

D1 activity and TSH levels to control levels. However, there is to our knowledge no information available on the underlying mechanisms that link testosterone levels, D1 activity, and the regulation of the HPT axis in rats or any other vertebrates. Regardless, these studies suggest that sex hormones, and more specifically testosterone, may play a role in the regulation of D1 in liver of rats, which may also be the case for birds.

No relationship was found in present ring-billed gulls between hepatic D1 activity and its transcription. Riese et al. [37] suggested that the absence of relation between D1 mRNA expression and activity in female mice could be attributed to a reduced translational efficiency for D1 (and other selenoproteins) in females due to E2 action because ovariectomized females presented male-like hepatic D1 mRNA transcription levels associated with increased hepatic D1 activity. Since the thyroid axis is well-conserved among vertebrates, it could be suggested that similar mechanisms leading to a mismatch in D1 transcription and activity levels in ring-billed gull liver may be at play. Moreover, there are a number of post-transcriptional and post-translational events identified for D2 in human and chicken. For example, alternative splicing, presence of specific sequence motifs (selenocystein insertion sequence: SECIS) and 5' or 3' untranslated regions regulating the expression of D2, could also occur for D1 [38]. Since the regulation of deiodinase mRNA levels and activity are dynamic, those events could lead to a mismatch between transcription and translation [39], which may partially explain the lack of association between D1 activity and mRNA transcription levels in ring-billed gulls. Alternatively, the absence of a relationship could be attributed to the different matrices used for their determination. Hepatic microsomes were used to determine D1 *in vitro* activity, while whole (homogenized) liver was used for D1 mRNA quantification. Although D1 is primarily located in the endoplasmic reticulum membrane, a small amount of D1 can also be found in the cell membrane as demonstrated for example in rats [40].

2.4.3 Relationships between PBDEs, and D1 transcription and activity

Hepatic Σ nona-, Σ octa- and Σ hepta-BDE concentrations were greater in combined ring-billed gull males and females in which liver D1 transcription was lower as well as in individuals that exhibited greater hepatic microsomal total D1 activity. Furthermore, concentration ratios of BDE-209 to Σ nona- and Σ octa-BDE were greater in individuals in which D1 mRNA transcription levels were larger. Moreover, total D1 activity was inversely related to concentration ratios of BDE-209 to Σ hepta-, Σ octa- and Σ nona-BDE. However, no relation was found between liver concentrations of BDE-209 and D1 mRNA transcription and total D1 activity in ring-billed gulls. As suggested by Noyes et al. [16] in a fish study, compensatory mechanisms can modulate deiodinase expression following long term exposure to BDE-209 in response to decreased plasma thyroid hormone levels. However, in this study, changes in deiodinase mRNA levels did not translate into changes in deiodinase activity [16]. Because the ring-billed gulls have been chronically exposed in their environment to high concentrations of BDE-209 and other PBDEs [8,18], this may have elicited perturbations of their HPT axis. In fact, a study from our research group on Montreal-breeding ring-billed gulls from the same colony uncovered multiple relationships between circulating thyroid hormone levels, mRNA levels of several thyroid-related genes, and PBDE concentrations [20]. Hence, compensatory mechanisms of the HPT axis could explain, at least in part, the absence of an association between total D1 activity and liver BDE-209 concentrations in ring-billed gulls.

2.5 Conclusions

The present ring-billed gull study confirmed that D1 is the major deiodinase involved in thyroid hormone deiodination in bird hepatic microsomes. Major putative BDE-209 degradation products (e.g., BDE-196, -197, -201, -206, -207, and -208) were detected in ring-billed gull liver, and a number of relationships were found between their concentrations (and ratios to BDE-209 concentrations) and liver D1 transcription and activity. However, despite these significant relationships, the present study design could not confirm that D1-mediated debromination of BDE-209 took place in ring-billed gull liver. Moreover, despite that D1 is the main deiodinase expressed in bird liver (microsomes), it should also be considered that D2 and D3 may play similar role as D1 with respect to BDE-209 biotransformation in the non-microsomal fraction of hepatocytes or in other peripheral tissues. Ongoing work in our laboratory is aiming to investigate the biotransformation capacity of ring-billed gull hepatic microsomes toward BDE-209 using an *in vitro* assay targeting deiodinases, and the potential effects the co-incubation of hepatic microsomes with BDE-209 may have on T₄ deiodination rate in this assay.

2.6 References

- [1] United Nations Environment Programme (UNEP). 2013. Proposal to list decabromodiphenyl ether (commercial mixture, c-decaBDE) in Annexes A, B and/or C to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. UNEP/POPS/POPRC.9/2. Report. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Rome, Italy.
- [2] Ni K, Lu Y, Wang T, Shi Y, Kannan K, Xu L, Li Q, Liu S. 2013. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in China: Policies and recommendations for sound management of plastics from electronic wastes. *J Environ Manage.* 115:114-123.
- [3] Lindberg P, Sellström U, Hågberg L, de Wit CA. 2004. Higher brominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane found in eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) breeding in Sweden. *Environ Sci Technol.* 38:93-96.
- [4] Holden A, Park JS, Chu V, Kim M, Choi G, Shi Y, Chin T, Chun C, Linthicum J, Walton BJ, Hooper K. 2009. Unusual hepta- and octabrominated diphenyl ethers and nonabrominated diphenyl ether profile in California, USA, peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Environ Toxicol Chem.* 28:1906-1911.
- [5] Chen D, La Guardia MJ, Harvey E, Amaral M, Wohlfort K, Hale RC. 2008. Polybrominated diphenyl ethers in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the Northeastern U.S. *Environ Sci Technol.* 42:7594-7600.
- [6] Chen D, Mai B, Song J, Sun Q, Luo Y, Luo X, Zeng EY, Hale RC. 2007. Polybrominated diphenyl ethers in birds of prey from northern China. *Environ Sci Technol.* 41:1826-1833.

[7] Luo XJ, Liu J, Luo Y, Zhang XL, Wu JP, Lin Z, Chen SJ, Mai BX, Yang ZY. 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in free-range domestic fowl from an e-waste recycling site in South China: Levels, profile and human dietary exposure. *Environ Sci Technol.* 43:306-311.

[8] Gentes ML, Letcher RJ, Caron-Beaudoin E, Verreault J. 2012. Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence River, Canada. *Environ Sci Technol.* 35: 253-258.

[9] Chabot-Giguère B, Letcher RJ, Verreault J. 2013. In vitro biotransformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and Dechlorane Plus flame retardants: a case study of ring-billed gull breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada. *Environ Int.* 55:101-108.

[10] Van den Steen E, Covaci A, Jaspers VL, Dauwe T, Voorspoels S, Eens M, Pinxten R. 2007. Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environ Poll.* 148:648-653.

[11] Letcher RJ, Martinson SC, Fernie KJ. 2014. Dietary exposure of American kestrels (*Falco sparverius*) to decabromodiphenyl ether (BDE-209) flame retardant: Uptake, distribution, debromination and cytochrome P450 enzyme induction. *Environ Int.* 63:182-190.

[12] McNabb, F. M. 1992. Thyroid hormone. Prentice Hall. Englewood Cliffs. N.J., USA.

[13] Darras VM, Kühn ER, Van der Geyten S. 2000. Thyroid hormone metabolism in poultry. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 4:13-20.

[14] Köhrle J. 2002. Iodothyronine deiodinases. *347:125-167.*

[15] Gereben B, Zeold A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. 2008. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci.* 65:570-590.

[16] Noyes PD, Lema SC, Macaulay LJ, Douglas NK, Stapleton HM. 2013. Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environ Sci Technol.* 47:10012-10021.

[17] Caron-Beaudoin É, Gentes ML, Patenaude-Monette M, Hélie JF, Giroux JF, Verreault J. 2013. Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the ring-billed gull (*Larus delawarensis*). *Can J Zool.* 91:689-697.

[18] Gentes ML, Mazerolle MJ, Giroux JF, Patenaude-Monette M, Verreault J. 2015. Tracking the sources of polybrominated diphenyl ethers in birds: foraging in waste management facilities results in higher DecaBDE exposure in males. *Environ Res.* 138:361-371.

[19] Plourde Pellerin S, Moreau R, Letcher RJ, Verreault J. 2013. Is the bone tissue of ring-billed gulls breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada, impacted by halogenated flame retardant exposure? *Chemosphere.* 93:2333-2340.

[20] Técher R, Houde M, Verreault J. 2016. Associations between organohalogen concentrations and transcription of thyroid-related genes in a highly contaminated gull population. *Sci Total Environ.* 545-546:289-298.

[21] Giroux JF, Patenaude-Monette M, Lagarde F, Thiériot E, Brousseau P, Molina P. 2015. The rise and fall of ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) in eastern North America. *Waterbirds.* 38. In press.

[22] Crump D, Chiu S, Egloff C, Kennedy SW. 2008. Effects of hexabromocyclododecane and polybrominated diphenyl ethers on mRNA expression in chicken (*Gallus domesticus*) hepatocytes. *Toxicol Sci.* 106:479-487.

[23] Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinfo Met Prot: Met Molec Biol.* Humana Press, Totowa, N.J., USA. pp. 365-386.

[24] Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* 25:402-408.

[25] Lowry HO, Rosebrough N, Farr AL, Randall JR. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.

[26] Noyes PD, Hinton DE, Stapleton HM. 2011. Accumulation and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) induces thyroid disruption and liver alterations. *Toxicol Sci.* 122:265-274.

[27] Leslie HA, Leonards PE, Shore RF, Walker LA, Bersuder PR, Morris S, Allchin CR, Boer J. 2011. Decabromodiphenylether and hexabromocyclododecane

in wild birds from the United Kingdom, Sweden and The Netherlands: Screening and time trends. *Chemosphere*. 82:88-95.

[28] Verreault J, Villa RA, Gabrielsen GW, Skaare JU, Letcher RJ. 2006. Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls. *Environ Poll*. 144:1053-1060.

[29] Van den Steen E, Jaspers VL, Covaci A, Neels H, Eens M, Pinxten R. 2009. Maternal transfer of organochlorines and brominated flame retardants in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Environ Int*. 35:69-75.

[30] Söderström G, Sellström U, De Wit CA, Tysklind M. 2004. Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209). *Environ Sci Technol*. 38:127-132.

[31] Huang HW, Chang BV, Lee CC. 2014. Reductive debromination of decabromodiphenyl ether by anaerobic microbes from river sediment. *Intern Biodeter Biodegr*. 87:60-65.

[32] La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E. 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ Sci Technol*. 40:6247-6254.

[33] Houde M, Berryman D, de Lafontaine Y, Verreault J. 2014. Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Sci Total Environ*. 479-480:48-56.

[34] Darras VM, Verhoelst CHJ, Reyns GE, Kühn ER, Van der Geyten S. 2006. Thyroid hormone deiodination in birds. *Thyroid*. 16:25-35.

[35] Miyashita K, Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M. 1995. Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endo.* 115:161-167.

[36] Šošić-Jurjević B, Filipović B, Renko K, Miler M, Trifunović S, Ajdžanović, Khörle J, Milošević V. 2015. Testosterone and estradiol treatments differently affect pituitary-thyroid axis and liver deiodinase 1 activity in orchidectomized middle-aged rats. 2015. *Exp Geront.* 72:85-98.

[37] Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Gotz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. 2006. Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology.* 147:5883-5892.

[38] Bianco AC, Kim BW. 2006. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 116:2571-2579.

[39] Gereben B, Kollár A, Harney JW, Larsen PR. 2002. The mRNA structure has potent regulatory effects on type 2 iodothyronine deiodinase expression. *Mol Endocrinol.* 16:1667-1679.

[40] Maciel RM, Ozawa Y, Chopra IJ. 1979. Subcellular localization of thyroxine and reverse triiodothyronine outer ring monodeiodinating activities. *Endocrinology.* 104:365-371.

2.7 Supplemental data

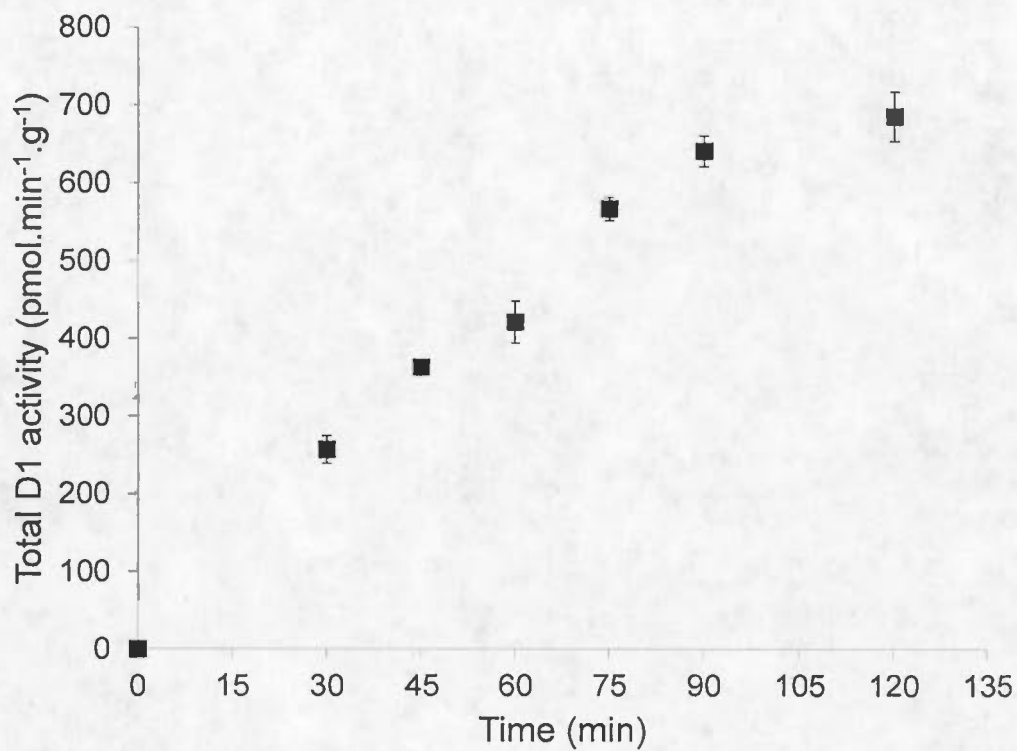


Figure 2.2 Mean (\pm SEM) total deiodinase (D1) activity ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls ($n = 5$) for 6 reaction times (min). The reaction using 1 mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins was found to be linear up to 75 min.

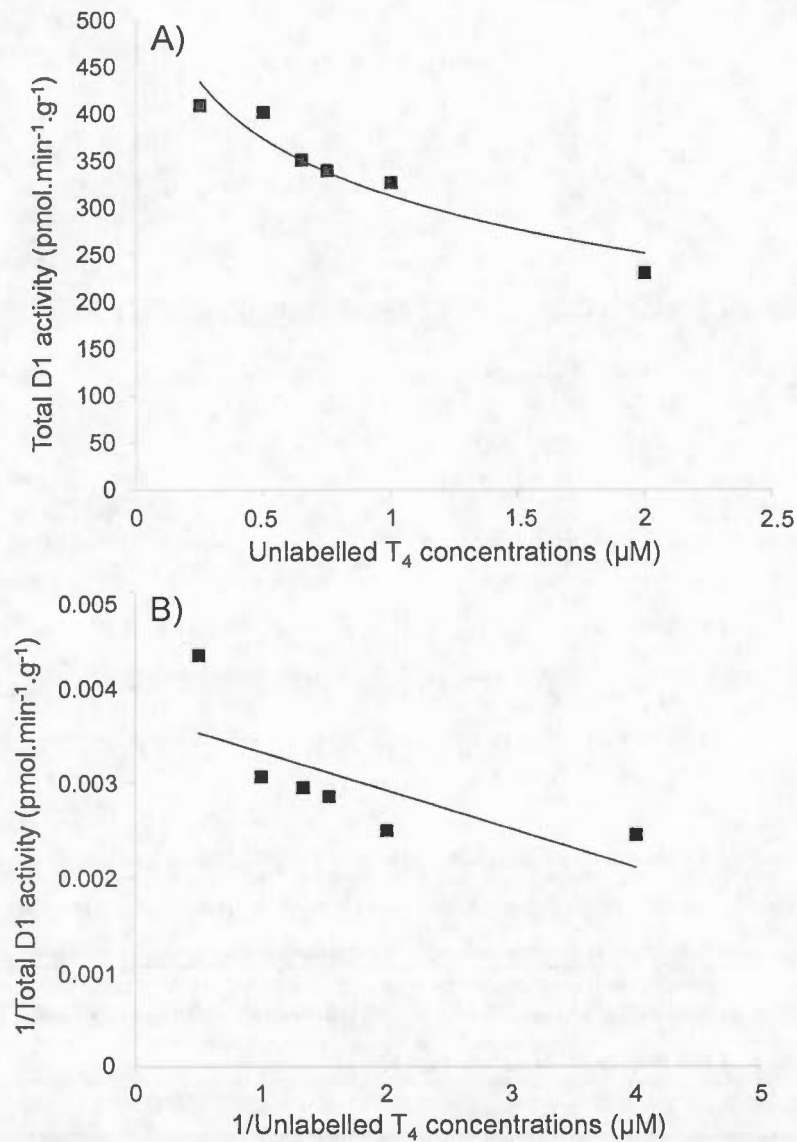


Figure 2.3 Relationships between unlabelled-thyroxine (T_4) concentrations (μM) and total deiodinase (D1) activity ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls ($n = 5$) represented using A) Michaelis-Menten and B) Lineweaver-Burk plots. A T_4 level of $0.65 \mu\text{M}$ was selected for the reaction using 1 mg of ring-billed gull hepatic microsomal proteins.

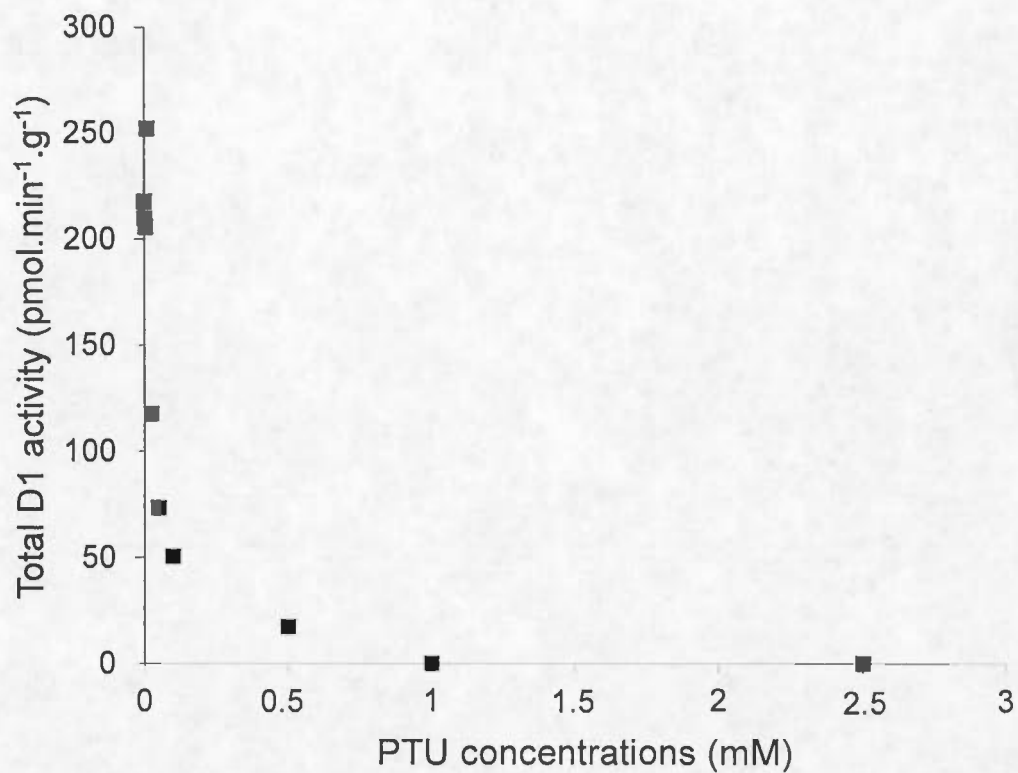


Figure 2.4 Relationship between concentrations of propyl-n-thiouracil (PTU) (mM) and total deiodinase (D1) activity (pmol.min⁻¹.g⁻¹) in pooled liver microsomes of ring-billed gulls (n = 5). A PTU level of 2.5 mM resulted in 100% inhibition of D1 activity in ring-billed gull liver microsomes.

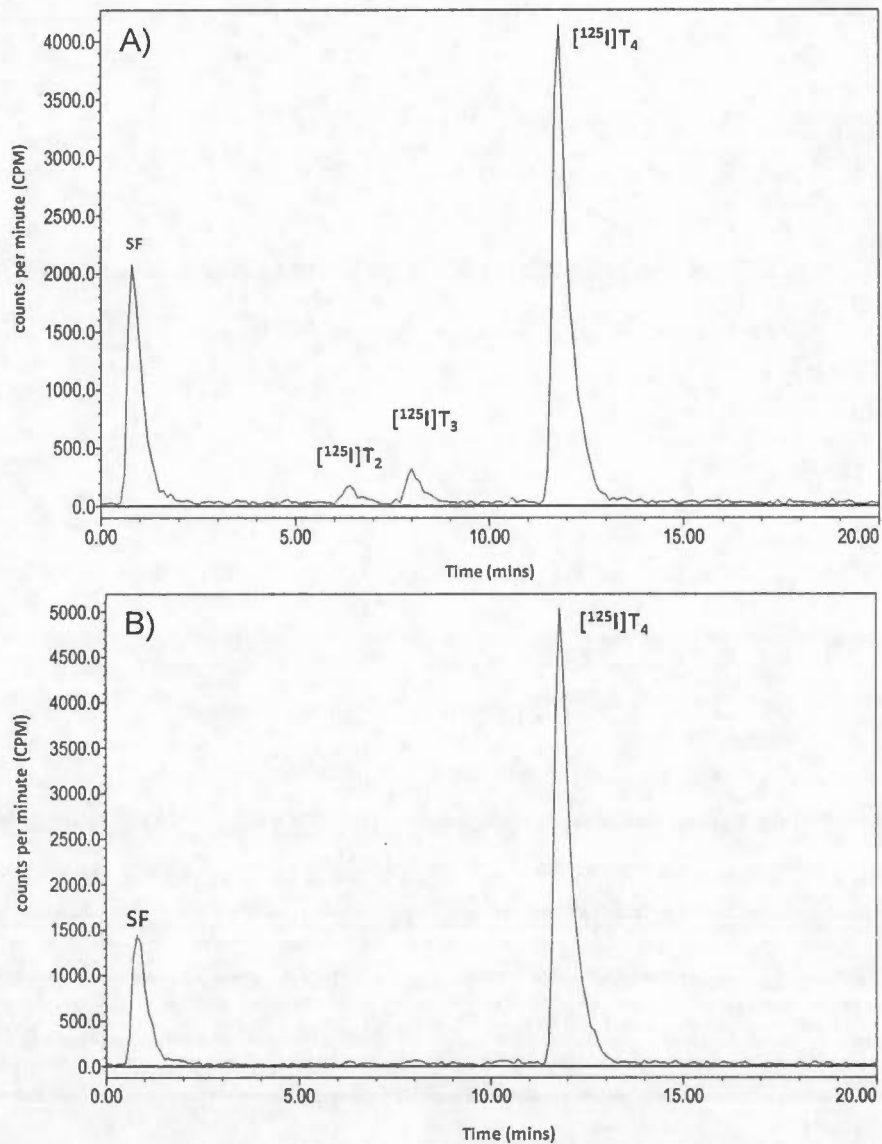


Figure 2.5 HPLC chromatograms showing peaks of iodine-labelled thyroxine ($[^{125}\text{I}]\text{T}_4$) and its deiodinated products diiodothyronine ($[^{125}\text{I}]\text{T}_2$) and triiodothyronine ($[^{125}\text{I}]\text{T}_3$) in ring-billed gull liver microsomes incubated A) without propyl-n-thiouracil (PTU; negative control) and B) with 2.5 mM of PTU. SF: Solvent front.

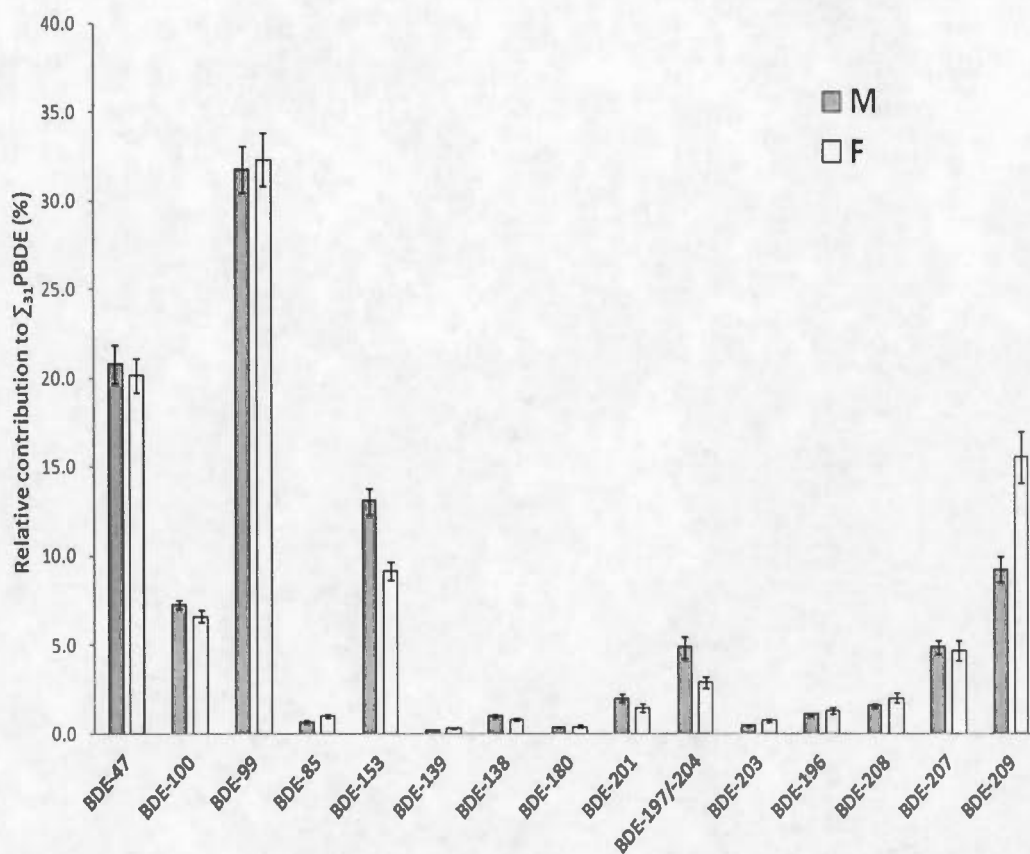


Figure 2.6 Relative contributions (%; mean \pm SEM) of the 15 major PBDE congeners (or co-elution) to Σ_{31} PBDE concentrations (ng/g wet weight) determined in liver of male (M) (n = 8) and female (F) (n = 14) ring-billed gulls breeding in Montreal area (QC, Canada).

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En conclusion, ce mémoire a eu pour but de mettre en relief les relations existantes entre les concentrations de PBDE, la transcription et l'activité des déiodinases hépatiques de type I. Bien que plusieurs études se soient intéressées à la biotransformation du BDE-209, ces travaux ont mis l'accent sur les produits de la réaction, ce qui a permis de déterminer que la débromination séquentielle du BDE-209 était la voie majeure de biotransformation de ce composé chez les oiseaux et les poissons. Cependant, il existe peu d'information sur le système enzymatique responsable de cette réaction, ce qui laisse comme hypothèse l'implication des déiodinases à cause des ressemblances structurales des PBDE avec les hormones thyroïdiennes. Plusieurs indices témoignant de la débromination du BDE-209 ont pu être soulignés.

Dans un premier temps, l'essai d'activité des déiodinases a permis de déterminer que la D1 était la déiodinase majoritairement impliquée dans la conversion des hormones thyroïdiennes dans les microsomes de foie de goélands à bec cerclé. L'analyse des échantillons de foie a révélé la présence de congénères de la classe des nona-, octa- et hepta-BDE (e.g., BDE-196, -197, -201, -206, -207, et -208) identifiés comme produits de débromination du BDE-209 chez les oiseaux. Bien que certains de ces composés puissent être générés par la dégradation photolytique (UV) ou bactérienne du BDE-209, ils sont retrouvés à de très faible concentration dans l'environnement. Cependant, les corrélations retrouvées entre l'activité de D1 et les concentrations et ratio de PBDE ne permettent pas de confirmer présentement que la débromination *in vivo* du BDE-209 s'effectue chez le goéland à bec cerclé. Il est également important de mentionner que, bien que cette étude porte sur la D1

majoritairement exprimé dans le foie des oiseaux (ici au niveau des microsomes), il est possible de considérer que la D2 et la D3 puissent agir de façon similaire à la D1 vis à vis de la biotransformation du BDE-209 dans d'autres tissus périphériques.

Afin de confirmer l'implication des D1 dans la débromination du BDE-209, d'autres expériences sont présentement en cours dans notre laboratoire. Dans un premier temps, il serait important de réaliser des essais de biotransformation du BDE-209 avec les microsomes de goéland à bec cerclé et d'observer après incubation l'apparition de produits de débromination par rapport aux contrôles. Dans un second temps, il serait intéressant d'observer l'impact du BDE-209 sur la réaction de conversion des hormones thyroïdiennes par la D1 en réalisant un essai d'activité avec co-incubation du BDE-209 en plus du substrat naturel de la D1 (T_4 ou rT_3). Cette manipulation permettra d'observer s'il y a une diminution de l'activité de la D1 en présence du BDE-209 tandis que l'essai de biotransformation permettra de déterminer si ces interactions sont dues à la biotransformation du BDE-209 par la D1.

Bien que des mesures aient déjà été prises en Amérique du Nord, le maintien de l'utilisation ainsi que l'exportation de produits manufacturés contenant du BDE-209 dans certains pays, conduit à renforcer le "réservoir" de BDE-209 dans l'environnement. De plus, la formation de congénères plus faiblement bromés suite à la débromination du BDE-209 atténue les efforts de régulation déjà menés pour les mélanges de penta- et octa- BDE. L'importance d'une étude comme celle-ci est l'apport de nouvelles informations permettant d'aider dans des processus décisionnels de régulation plus appropriés pour l'ensemble des PBDE, mais aussi d'aider à la compréhension du devenir du BDE-209 dans l'organisme d'espèces aviaires et de son impact sur le système thyroïdien.

BIBLIOGRAPHIE

- Bendig, P. et Vetter, W. (2013). UV-induced formation of bromophenols from polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science & Technology*, 47(8), 3665-3670.
- Bianco, A.C. et Kim, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 116(10), 2571-2579.
- Brousseau, P. (1995). Goéland à bec cerclé. Dans *Les oiseaux nicheurs du Québec : atlas des oiseaux nicheurs du Québec méridional*. (p. 514-517) : Environnement Canada (région du Québec), Service canadien de la faune.
- Caron-Beaudoin, É., Gentes, M.L., Patenaude-Monette, M., Hélie, J.F., Giroux, J.F. et Verreault, J. (2013). Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the Ring-billed Gull (*Larusdelawarensis*). *Canadian Journal of Zoology*, 91(10), 689-697
- CEAEQ. (2005). *Paramètres d'exposition chez les oiseaux – Goéland à bec cerclé*.
- Chabot-Giguere, B., Letcher, R.J. et Verreault, J. (2013). In vitro biotransformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and Dechlorane Plus flame retardants: a case study of ring-billed gull breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada. *Environ Int*, 55, 101-108.

- Chen, D., Letcher, R.J., Burgess, N.M., Champoux, L., Elliott, J.E., Hebert, C.E., Martin, P., Wayland, M., Chip Weseloh, D.V. et Wilson, L. (2012). Flame retardants in eggs of four gull species (Laridae) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada. *Environmental Pollution*, 168, 1-9.
- Chen, D., Watts, B., La Guardia, M.J., Harvey, E., Mojica, E.K. et Hale, R.C. (2010). Species-specific accumulation of polybrominated diphenyl ether flame retardants in birds of prey from the Chesapeake Bay. *Environmental Pollution*, 158, 1883-1889.
- Chen, D., La Guardia, M.J., Harvey, E., Amaral, M., Wohlfort, K., et Hale, R.C. (2008). Polybrominated diphenyl ethers in peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the Northeastern U.S. *Environmental Science & Technology*, 42, 7594-7600.
- Chen, D., Mai, B., Song, J., Sun, Q., Luo, Y., Luo, X., Zeng, E.Y. et Hale, R.C. (2007). Polybrominated Diphenyl Ethers in birds of prey from northern china. *Environmental Science Technology*, 41, 1826-1833.
- Clark Williams-Derry et Abbotts, J. (2004). *Flame Retardants in the Bodies of Pacific Northwest Residents: A Study on Toxic Body Burdens*. : Northwest Environment Watch.
- Commission, E. (2005). *Risk Profile and Summary Report for Octabromodiphenyl ether (octaBDE)*.
- Costa, L.G. et Giordano, G. (2011). Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology*, 32(1), 9-24.

- Darnerud, P. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment International*, 29(6), 841-853.
- Darnerud, P.O., Eriksen, G.S., Johannesson, T., Larsen, P.B. et Viluksela, M. (2001). Polybrominated Diphenyl Ethers: Occurrence, Dietary Exposure, and Toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 109, 49.
- Darras, V.M., Kühn, E.R. et Van der Geyten, S. (2000). Thyroid hormone metabolism in poultry. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 4(1), 13-20.
- Darras, V.M., Verhoelst, C.H.J., Reyns, G.E., Kühn, E.R. et Van der Geyten, S. (2006). Thyroid Hormone Deiodination in Birds. *Thyroid*, 16(1), 25-35.
- de Wit, C.A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46(5), 583-624.
- de Wit, C.A., Herzke, D. et Vorkamp, K. (2010). Brominated flame retardants in the Arctic environment--trends and new candidates. *Sci Total Environ*, 408(15), 2885-2918.
- Dentice, M., Marsili, A., Zavacki, A., Larsen, P.R. et Salvatore, D. (2013). The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1830(7), 3937-3945.
- EPA. (2008). *Toxicological review of decabromodiphenyl ether (BDE-209)*. (635/R-07/008F).

- Feng, C., Xu, Y., Zhao, G., Zha, J., Wu, F. et Wang, Z. (2012). Relationship between BDE 209 metabolites and thyroid hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 122-123, 28-35.
- Gabrey, S.W. (1996). Migration and Dispersal in Great Lakes Ring-Billed and Herring Gulls (Migración y dispersión de *Larus delawarensis* y *L. argentatus* en los Grandes lagos). *Journal of Field Ornithology*, 67(2), 327-339
- Gauthier, J. et Aubry Y. (1995). Atlas des oiseaux nicheurs du Québec méridional. Association québécoise des groupes d'ornithologues. Société québécoise de protection des oiseaux and Service canadien de la faune, Environnement Canada (région du Québec).
- Gentes, M.L., Letcher, R.J., Caron-Beaudoin, E. et Verreault, J. (2012). Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence River, Canada. *Environmental Science & Technology*, 46(17), 9735-9744.
- Gentes, M.L., Mazerolle, M.J., Giroux, J.F., Patenaude-Monette, M. et Verreault, J. (2015). Tracking the sources of polybrominated diphenyl ethers in birds: foraging in waste management facilities results in higher DecaBDE exposure in males. *Environ Res*, 138, 361-371.
- Gereben, B., Bartha, T., Tu, H.M., Harney, J.W., Rudas, P. et Larsen, P.R. (1999). Cloning and Expression of the Chicken Type 2 Iodothyronine 5'-Deiodinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), 13768-13776.
- Gereben, B., Zeold, A., Dentice, M., Salvatore, D. et Bianco, A.C. (2008). Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*, 65(4), 570-590.

- Giroux, J.-F., Patenaude-Monette, M., Lagarde, F., Thiériot, E., Brousseau, P. et Molina, P. (2015). The rise and fall of Ring-billed Gulls (*Larus delawarensis*) in eastern North America. *Waterbirds*, 38.
- Hakk, H., Larsen, G., Bergman, A. et Orn, U. (2002). Binding of brominated diphenyl ethers to male rat carrier proteins. *Xenobiotica*, 32(12), 1079-1091.
- Holden, A., Park, J.S., Chu, V., Kim, M., Choi, G., Shi, Y., Chin, T., Chun, C., Linthicum, J., Walton, B.J. et Hooper, K. (2009). Unusual hepta- and octabrominated diphenyl ethers and nonabrominated diphenyl ether profile in California, USA, peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1906-1911.
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y. et Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Sci Total Environ*, 479-480, 48-56.
- Huang, H.-W., Chang, B.-V. et Lee, C.-C. (2014). Reductive debromination of decabromodiphenyl ether by anaerobic microbes from river sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 60-65.
- Huwe, J.K. et Smith, D.J. (2007). Accumulation, Whole-Body Depletion, and Debromination of Decabromodiphenyl Ether in Male Sprague–Dawley Rats Following Dietary Exposure. *Environmental Science & Technology*, 41(7), 2371-2377.
- Karlsson, M., Ericson, I., van Bavel, B., Jensen, J.K. et Dam, M. (2006). Levels of brominated flame retardants in Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*) eggs from the Faroe Islands. *Sci Total Environ*, 367(2-3), 840-846.

Köhrle, J. (2002). Iodothyronine Deiodinases. *347*, 125-167.

La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E. (2006). Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental Science & Technology*, *40*(20), 6247-6254.

La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., Mainor, T.M. et Ciparis, S. (2012). In Situ Accumulation of HBCD, PBDEs, and Several Alternative Flame-Retardants in the Bivalve (*Corbicula fluminea*) and Gastropod (*Elimia proxima*). *Environmental Science & Technology*, *46*(11), 5798-5805.

Lee, E., Kim, T.H., Choi, J.S., Nabanata, P., Kim, N.Y., Ahn, M.Y., Jung, K.K., Kang, I.H., Kim, T.S., Kwack, S.J., Park, K.L., Kim, S.H., Kang, T.S., Lee, J., Lee, B.M. et Kim, H.S. (2010). Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. *The Journal of Toxicological Sciences*, *35*(4), 535-545.

Letcher, R.J., Marteinson, S.C. et Fernie, K.J. (2014). Dietary exposure of American kestrels (*Falco sparverius*) to decabromodiphenyl ether (BDE-209) flame retardant: uptake, distribution, debromination and cytochrome P450 enzyme induction. *Environ Int*, *63*, 182-190.

Leslie, H.A., Leonards, P.E., Shore, R.F., Walker, L.A., Bersuder, P.R., Morris, S., Allchin, C.R. et Boer, J. (2011). Decabromodiphenylether and hexabromocyclododecane in wild birds from the United Kingdom, Sweden and The Netherlands: Screening and time trends. *Chemosphere*, *82*(1), 88-95.

- Lindberg, P., Sellström, U., Häggberg, L. et de Wit, C.A. (2004). Higher Brominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane Found in Eggs of Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) Breeding in Sweden. *Environmental Science & Technology*, 38(1), 93-96.
- Livak, K.J. et Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lowry, H.O., Rosebrough, N., Farr, A.L. et Randall, J.R. (1951). Potein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Luo, X.J., Zhang, X.L., Liu, J., Wu, J.P., Luo, Y., Chen, S.J., Mai, B.X. et Yang, Z.Y. (2009). Persistent halogenated compounds in waterbirds from an e-waste recycling region in south china. *Environmental Science & Technology*, 43, 306-311.
- Maciel, R.M., Ozawa, Y. et Chopra, I.J. (1979) Subcellular localization of thyroxine and reverse triiodothyronine outer ring monodeiodinating activities. *Endocrinology*, 104(2), 365-371.
- MacNabb, F. M. (1992) Thyroid Hormone. *Prentice Hall*
- McKinney, M.A., Dietz, R., Sonne, C., De Guise, S., Skirnisson, K., Karlsson, K., Steingrimsson E., et Letcher., R.J. (2011). Comparative hepatic microsomal biotransformation of selected PBDEs, including decabromodiphenyl ether, and decabromodiphenyl ethane flame retardants in Arctic marine-feeding mammals. *Environ Toxicol Chem*, 30(7), 1506-1514.

- Miyashita, K., Murakami, M., Iriuchijima, T., Takeuchi, T. et Mori, M. (1995). Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 115(2), 161-167.
- Mo, L., Wu, J.P., Luo, X.J., Zou, F.S. et Mai, B.X. (2013). Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers, decabromodiphenyl ethane, and 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy) ethane flame retardants in kingfishers (*Alcedo atthis*) from an electronic waste-recycling site in South China. *Environ Toxicol Chem*, 31(9), 2153-2158.
- Molnár, I., Balázs, C., Szegedi, G. et Sipka, S. (2002). Inhibition of type 2,5'-deiodinase by tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interferon gamma in human thyroid tissue. *Immunology Letters*, 80(1), 3-7.
- Muñoz-Arnanz, J., Sáez, M., Aguirre, J.L., Hiraldo, F., Baos, R., Pácepavicius, G., Alae, M. et Jiménez, B. (2011). Predominance of BDE-209 and other higher brominated diphenyl ethers in eggs of white stork (*Ciconia ciconia*) colonies from Spain. *Environment international*, 37(3), 572-576.
- Nellis, D.W. (2001). *Common coastal birds of Florida & the Caribbean*. Sarasota: Pineapple Press Inc, 311 p.
- Ni, K., Lu, Y., Wang, T., Shi, Y., Kannan, K., Xu, L., Li, Q., et Liu, S. (2013). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in China: Policies and recommendations for sound management of plastics from electronic wastes. *Journal of Environmental Management*, 115, 114-123
- Nie, Z., Tian, S., Tian, Y., Tang, Z., Tao, Y., Die, Q., Fang, Y., He, J., Wang, Q. et Huang, Q. (2015). The distribution and biomagnification of higher brominated

BDEs in terrestrial organisms affected by a typical e-waste burning site in South China. *Chemosphere*, 118, 301-308.

Noyes, P.D., Hinton, D.E. et Stapleton, H.M. (2011). Accumulation and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) induces thyroid disruption and liver alterations. *Toxicol Sci*, 122(2), 265-274.

Noyes, P.D., Kelly, S.M., Mitchelmore, C.L. et Stapleton, H.M. (2010). Characterizing the in vitro hepatic biotransformation of the flame retardant BDE 99 by common carp. *Aquat Toxicol*, 97(2), 142-150.

Noyes, P.D., Lema, S.C., Macaulay, L.J., Douglas, N.K. et Stapleton, H.M. (2013). Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environmental Science & Technology*, 47(17), 10012-10021.

Plourde, S.P., Moreau, R., Letcher, R.J. et Verreault, J. (2013). Is the bone tissue of ring-billed gulls breeding in a pollution hotspot in the St. Lawrence River, Canada, impacted by halogenated flame retardant exposure? *Chemosphere*, 93(10), 2333-2340.

Riese, C., Michaelis, M., Mentrup, B., Gotz, F., Kohrle, J., Schweizer, U. et Schomburg, L. (2006). Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*, 147(12), 5883-5892.

Ross, P.S., Couillard, C.M., Ikonomidou, M.G., Johannessen, S.C., Lebeuf, M., Macdonald, R.W. et Tomy, G.T. (2009). Large and growing environmental

reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals. *Mar Pollut Bull*, 58(1), 7-10.

Sanders, J.P., Van der Geyten, S., Kaptein, E., Darras, V.M., Kuhn, E.R., Leonard, J.L. et Visser, T.J. (1997). Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology*, 138(12), 5153-5160.

Siddiqi, M.A., Laessig, R.H. et Reed, K.D. (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases. *Clinical Medicine & Research*, 1(4), 281-290.

Sifleet, S.D. (2009). Toxicology of Decabromodiphenyl Ether in Avian Embryos. Disposition of the Flame Retardant BDE-209 in Yolk-injected Chicken Embryos (*Gallus gallus*). (Mémoire de maîtrise). Faculty of the School of Marine Science, The College of William and Mary in Virginia, USA. Récupéré de <https://digitalarchive.wm.edu/handle/10288/2081>.

Söderström, G., Sellström, U., De Wit, C.A. et Tysklind, M. (2004). Photolytic debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209). *Environmental Science & Technology*, 38(38), 127-132.

Stapleton, H.M., Brazil, B., Holbrook, R.D., Mitchelmore, C.L., Benedict, R., Konstantinov, A. et Potter, D. (2006). In Vivo and In Vitro Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209) by Juvenile Rainbow Trout and Common Carp. *Environmental Science & Technology*, 40(15), 4653-4658.

Técher R, Houde M, Verreault J. 2016. Associations between organohalogen concentrations and transcription of thyroid-related genes in a highly contaminated gull population. *Sci Total Environ*. 545-546:289-298.

- Ucan-Marin, F., Arukwe, A., Mortensen, A., Gabrielsen, G.W., Fox, G.A. et Letcher, R.J. (2009). Recombinant transthyretin purification and competitive binding with organohalogen compounds in two gull species (*Larus argentatus* and *Larus hyperboreus*). *Toxicol Sci*, 107(2), 440-450.
- United Nations Environment Programme (UNEP). (2013, 14-18 octobre). Étude des produits chimiques nouvellement proposés pour inscription aux Annexes A, B et/ou C de la Convention : le décabromodiphényléther (mélange commercial, décaBDE), 9^e réunion, récupéré le 16 Juillet 2015 de <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ChemicalsProposedforListing/tabid/2510/Default.aspx>
- Van den Steen, E., Covaci, A., Jaspers, V.L., Dauwe, T., Voorspoels, S., Eens, M. et Pinxten, R. (2007). Accumulation, tissue-specific distribution and debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Environmental Pollution*, 148(2), 648-653.
- Van den Steen, E., Jaspers, V.L., Covaci, A., Neels, H., Eens, M. et Pinxten, R. (2009). Maternal transfer of organochlorines and brominated flame retardants in blue tits (*Cyanistes caeruleus*). *Environ Int*, 35(1), 69-75.
- Verreault, J., Villa, R.A., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U. et Letcher, R.J. (2006). Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls. *Environmental Pollution*, 144(3), 1053-1060.
- Vigano, L., Roscioli, C. et Guzzella, L. (2011). Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enters the food web of the River Po and is metabolically debrominated in resident cyprinid fishes. *Sci Total Environ*, 409(23), 4966-4972.

- Wiseman, S.B., Wan, Y., Chang, H., Zhang, X., Hecker, M., Jones, P.D. et Giesy, J.P. (2011). Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated/methoxylated analogs: environmental sources, metabolic relationships, and relative toxicities. *Mar Pollut Bull*, 63(5-12), 179-188.
- Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., She, Y., Yu, L., Chen, S. et Mai, B. (2012). A review of polybrominated diphenyl ethers and alternative brominated flame retardants in wildlife from China: Levels, trends, and bioaccumulation characteristics. *Journal of Environmental Sciences*, 24(2), 183-194.
- Yang, C.W., Huang, H.W., Chao, W.L. et Chang, B.V. (2015). Bacterial communities associated with aerobic degradation of polybrominated diphenyl ethers from river sediments. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(5), 3810-3819.
- Yu, L.H., Luo, X.J., Wu, J.P., Liu, L.Y., Song, J., Sun, Q.H., Zhang, X.L., Chen, D. et Mai, B.X. (2011). Biomagnification of higher brominated PBDE congeners in an urban terrestrial food web in north China based on field observation of prey deliveries. *Environmental Sciences Technology*, 45(12), 5125-5131.