UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CONTAMINANTS ORGANOHALOGÉNÉS CHEZ LE BÉLUGA ET LE PETIT RORQUAL DE L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT : TENDANCES TEMPORELLES ET EFFETS POTENTIELS SUR LE SYSTÈME ENDOCRINIEN ET LE MÉTABOLOME

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

ANTOINE SIMOND

AOÛT 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse 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.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Cinq ans déjà. Quelle aventure! Si vous pouvez lire cette thèse, sachez que c'est grâce à la qualité de mon entourage qui m'a guidé, accompagné et supporté pendant toutes ces années. Bien que je sois l'unique auteur de cette thèse, toutes ces personnes-là devraient également apparaître à côté de mon nom... L'exercice des remerciements est difficile, car les mots semblent bien souvent insuffisants pour exprimer toute la gratitude que je peux ressentir.

En premier lieu, je tiens à souligner mon immense gratitude envers mes deux directeurs, de doctorat, Jonathan Verreault et Magali Houde, pour avoir eu confiance en moi depuis le début dans cette folle aventure, et pour votre soutien sans failles. Vous formez un duo de superviseur de choc, et je me considère extrêmement chanceux d'avoir pu être guidé par deux aussi bons chercheurs. Tels mes parents de thèse, vous avez toujours su me recadrer avec justesse, tact et douceur. Merci d'avoir été si patient avec moi, car je sais que je n'ai pas souvent réussi à respecter mes échéanciers... J'admire votre rigueur scientifique, votre intégrité et je suis extrêmement reconnaissant de la disponibilité dont vous m'avez fait part malgré des agendas bien remplis. Je n'aurais pas pu accomplir tout cela sans vous. Du plus profond de mon âme, MERCI!

Parfois, il m'arrive de me demander dans quel état j'aurais fini sans ma famille... Famille de sang, famille de cœur, merci pour votre support moral inconditionnel et votre confiance en moi, car cela m'a permis garder le cap. Papa, merci pour ton amour, ton soutien moral dans ce cheminement, tes relectures, tes encouragements permanents, mais aussi tes bons conseils de l'astrologue aguerri que tu es devenu. Tu as grandement contribué à ma réussite, en sachant trouver les bons mots pour que je continue à garder ma confiance, à rester motivé et à aller jusqu'au bout des choses, et à savoir lorsque mercure rétrograde pointait le bout de son nez... Tu m'as également enlevé un énorme stress financier quand les temps étaient plus difficiles, et cela n'a pas de prix... Claire, Tom et Théo, vous avoir à mes côtés à Montréal a été un vrai cadeau et cela m'a été précieux. Merci pour tous ces moments qui ont égaillé ces cinq dernières années, pour toutes ces fois où vous m'avez accueilli, nourri et accepté malgré mes humeurs de thésard. Vous m'avez permis de m'évader à travers la musique, les fous rires, les jeux et les bons repas. Auré, mon frère d'amour, tu as eu une importance capitale malgré la distance. Nos appels presque hebdomadaires étaient très importants pour moi. Merci pour ton écoute, tes mots justes afin de ne pas me laisser happer par mes démons intérieurs. Un des grands sacrifices de cette thèse a été de ne pas partager un quotidien à tes côtés. Plus grand est le sacrifice, et plus grande est la récompense, paraît-il...

Maïna, t'avoir à mes côtés pendant toutes ces années a été un cadeau tombé du ciel. Je n'aurais pas pu me rendre jusqu'au bout sans toi. Merci pour toutes les fois où tu m'as aidé à me relever, et d'avoir toujours su me montrer et me rappeler la personne que j'étais réellement. Merci également de m'avoir supporté pendant toutes les années que l'on a partagé ensemble qui n'ont pas toujours été faciles. Bien que nos plans de vie aient quelque peu changé depuis les débuts de cette thèse, je te remercie du fond du cœur pour ta belle écoute, tes conseils toujours au top et ton soutien qui restent inchangés.

Manon... mon âme sœur de doctorat, ma coloc de bureau, ma buddy, qu'aurions-nous fait l'un sans l'autre pendant tout ce périple! On y serait parvenu, mais cela aurait été moins l'fun... Comment résumer 5 années en 1 petit paragraphe! Quel bonheur de partager ce bureau avec toi. Merci pour ton écoute, ta folie, nos fous rires, les bières, les hugs d'encouragement, ton support moral, et j'en passe... Tu m'as beaucoup inspiré, et cela a fait une grosse différence dans la réussite de mon doctorat. Alors encore une

fois, MERCI! J'en profite aussi pour remercier les nombreuses personnes du Toxen que j'ai pu croiser et qui ont égaillé mon quotidien soit lors de repas du midi ou lors d'activité de groupe bien divertissantes. Merci à vous Antho, Julie, Ludo, Anaïs, Alex, Alice, Daphnée, Carla, Max, etc.

Elliott, Rémi, Sarah, Marine, Louis, Julien, et bien d'autres, votre amitié a été très précieuse pour moi tout au long de mon doctorat. Votre présence et les activités que l'on a faites ensemble m'ont beaucoup aidé à prendre de la distance par rapport à ma thèse, à m'évader et me rappeler qu'avant tout, la vie c'est tout simplement rire, bien manger et avoir du fun.

Merci à toi Dany, sans qui la thèse n'aurait pas pu exister! Notre amitié est un des beaux cadeaux que je vais retirer de cette thèse. Merci pour ton soutien pendant toutes ses années, pour ton amitié et tous ces bons moments que l'on a partagés ensemble sur la Côte-Nord.

Emma, MERCI pour ton soutien durant les derniers mois de mon doctorat. Ta présence a vraiment fait une différence pour moi et tous les petits moments passés ensemble ont amené de la lumière dans les pénombres de mon sprint final de rédaction. Avec tout ce stress à gérer, je sais que cela n'a pas été facile, alors merci pour l'immense patience que tu as eue envers moi et pour m'avoir supporté.

Maëva, merci de m'avoir formé à la biologie moléculaire, mais aussi pour tes encouragements et tes excellents conseils surtout à la fin du doctorat. J'ai adoré déguster de bons cafés avec toi.

Au terme de ce parcours, j'ai pu également compter sur le soutien du professeur Maikel Rosabal, sans qui il aurait été plus difficile de m'en tirer financièrement durant les derniers mois de mon doctorat. Merci énormément pour cela. Je tiens également à remercier chaleureusement les équipes du GREMM et du Mériscope, sans qui tout ce projet n'aurait pu avoir lieu. Michel et Tim, merci pour votre bonne humeur, les bons cafés et les bonnes rigolades à bord du Bleuvet. Merci également à tous les membres du Mériscope et aux stagiaires (Gessica, Urs, Diandra, etc.) qui m'ont aidé à récolter toutes les biopsies de petit rorqual pendant toute la saison.

Enfin, je tiens également à remercier les sources de financement qui m'ont permis d'alléger mon stress financier, mais aussi de participer à des conférences internationales. Merci à l'Institut Santé et Société de l'UQÀM, à la fondation Anne Vallée, à EcotoQ, et à la fondation de l'UQÀM.

DÉDICACE

À ma maman, qui m'épaule depuis toutes ces années depuis là-haut, à mon papa pour son soutien infini, sa confiance et son admiration, et à ma grand-mère maternelle, qui m'a transmis sa passion pour le vivant et l'importance du lien à notre chère Terre-Mère.

AVANT-PROPOS

Bien qu'étant originaire d'une des villes françaises les plus éloignées de la mer, Dijon, j'ai développé très jeune, un grand intérêt pour le milieu marin et surtout les cétacés. Cette passion, qui naquit grâce à mon père lorsqu'il nous emmenait en vacances au bord de la Méditerranée, n'a cessé de se développer tout au long de mon adolescence. Je pouvais dévorer n'importe quel ouvrage traitant des cétacés, et de fait, je devins rapidement un petit expert du sujet. Ceci a donc influencé le choix de mes études supérieures, en les centrant exclusivement sur le milieu marin. Mes deux années au CNAM-Intechmer à Cherbourg (France) ont été décisives dans mon parcours. En effet, j'y ai appris toutes les connaissances de base sur le milieu marin, puis j'ai commencé à y développer un intérêt pour l'écotoxicologie, et plus spécifiquement l'étude des contaminants qui menacent tous ces écosystèmes. Dès lors, c'est de là que je décidai que si un jour je devais faire un doctorat, il ne pourrait que porter sur les cétacés et l'impact des contaminants.

Ensuite, je ne peux commencer cette thèse sans souligner le parcours atypique qui a mené jusqu'à la création de celle-ci. De manière générale, il faut savoir qu'un étudiant souhaitant faire un doctorat doit trouver un sujet devant à la fois susciter un intérêt pour le candidat, mais également être en adéquation avec les compétences de ce dernier. Cependant, l'intérêt est difficilement comblé à 100%. En 2014, j'étais dans cette démarche, avec comme unique objectif de trouver un sujet de doctorat en écotoxicologie avec comme modèle d'étude une ou plusieurs espèces de cétacés. Après plusieurs heures de recherche, je me rendis vite à l'évidence que le nombre de projets de doctorat sur des baleines était (à l'époque) quasiment inexistant aussi bien au

Québec qu'en France. Malgré cela, je restai plus que motivé et déterminé, et décidai de changer de stratégie. Je choisis donc de démarcher directement auprès de chercheurs, biologistes et professeurs français et québécois qui travaillaient de proche ou de loin sur les mammifères marins. Tel un spam, je me mis à la conquête de toutes ses personnes, en espérant que mon profil et ma motivation de faire un doctorat avec eux retiennent leur attention. Quelques semaines plus tard, après 95% de non-réponses et 5% de réponses négatives, je reçus le 25 mars 2014 un courriel d'un certain Dany Zbinden, m'expliquant qu'il ne pouvait pas me superviser directement, mais qu'il pourrait travailler en partenariat avec moi si je trouvais un superviseur. En plus de me redonner espoir dans ma démarche, Dany proposa trois sujets de thèse, dont un portant sur mon domaine d'intérêt, l'écotoxicologie. Je m'empressai alors de renvoyer un courriel aux 95% des personnes ne m'ayant pas répondu, afin de leur proposer ma candidature pour faire un doctorat, mais aussi leur présenter le sujet sur lequel porterait la thèse. Ce petit détail fit toute la différence, puisque six jours plus tard, je me retrouvai dans le bureau d'une certaine Magali Houde, chercheure à Environnement et Changement Climatique Canada, qui m'avait convoqué en entretien pour discuter de ma démarche. Lors de cette rencontre, j'entendis pour la première fois le nom du professeur Jonathan Verreault de l'UQÀM, qui lui aussi était intéressé par ma démarche, le sujet et était prêt, avec Magali à me donner une chance. Par la suite, les étoiles s'alignèrent en ma faveur, puisqu'au printemps 2014, le groupe national consultatif sur les contaminants du Ministère Pêches et Océans Canada décida de collaborer avec des chercheurs académiques en finançant tout projet permettant de mieux comprendre les effets biologiques des contaminants sur les espèces aquatiques au Canada. Mon sujet étant en plein dans ce que recherchait le ministère, Magali et Jonathan travaillèrent sur la demande de financement en bonifiant et ajustant aux critères le sujet de ce doctorat. Le 1er août 2014, nous reçûmes la confirmation que le financement du ministère Pêches et Océans nous avait été approuvé. Mon projet de doctorat venait officiellement de naître...

En acceptant de faire ce doctorat, je savais que je m'engageais dans un processus long ambitieux, et qui allait avoir un impact significatif sur ma vie professionnelle, mais aussi personnelle. D'un point de vue professionnel, j'ai développé mon sens critique, mon esprit de synthèse, et mon expertise en écotoxicologie, notamment en génomique, en métabolomique et en analyse de données. J'ai également développé une aptitude à présenter des résultats scientifiques en conférence (en français et en anglais), ainsi qu'un réseau d'experts canadiens de mon domaine. Je me suis également découvert d'un point de vue personnel, comme étant une personne déterminée, persévérante, perfectionniste, ambitieuse, résiliente, bien que parfois têtue, et une tendance à procrastiner face à une impasse. Cette thèse m'a repoussé dans mes plus profonds retranchements et m'a poussé à bout. Cela m'a permis de travailler sur mon humilité, de développer ma confiance en toute circonstance et surtout mon endurance. Ce défi de vie m'a transformé, et je suis fier de ce qui en est ressorti. Je n'aurais jamais pu accomplir cela sans la présence essentielle de mon précieux entourage, qui m'a soutenu tout le long. C'était un vrai travail d'équipe.

À travers cet avant-propos, je tenais à démontrer que la persévérance finit toujours par payer. J'espère que ces quelques lignes inspireront et encourageront ceux et celles qui auront pris le temps de lire cet avant-propos, à aller jusqu'au bout de leurs rêves, de leurs idées ou de leurs projets, et ce, malgré les nombreux obstacles humains et logistiques qui subviennent lors de la concrétisation de ceux-ci.

« La persévérance et la ténacité viennent à bout de tout. »

Proverbe français (1821)

TABLE DES MATIÈRES

AV	ANT-PI	ROPOSvi
LIS	TE DES	S FIGURESxiv
LIS	TE DES	S TABLEAUXxvii
RÉS	SUMÉ	xix
AB	STRAC	Тхх
INT	RODU	CTION
0.1	Conte	exte de la thèse
	0.1.1 0.1.2 0.1.3 0.1.4	Pollution du Saint-Laurent et de son estuaire
	0.1.5	Contaminants chez le beluga et le petit rorqual du Saint-Laurent
0.2	Probl	ématique
0.3	Objec	tifs de recherche
0.4	Princi	paux outils utilisés
	0.4.1 0.4.2 0.4.3 0.4.4	Échantillonnage des baleines
0.5	Plan o	le thèse42
CH fror Car	APITRI n the S adian A	E I Temporal trends of PBDEs and emerging flame retardants in belugat t. Lawrence Estuary (Canada) and comparisons with minke whales and rctic belugas
1.1	Résur	né46

1.2	Abstr	act	47
1.3	Intro	luction	48
1.4	Mate	rials and methods	52
	1.4.1 1.4.2 1.4.3 1.4.4	Study area and sampling Chemical analysis Stable isotope analysis Statistical analyses	52 53 55 56
1.5	Resu	lts	57
	1.5.1 1.5.2 1.5.3	Biological variables and stable isotopes HFR concentrations Temporal trends of HFRs in SLE belugas	57 58 62
1.6	Discu	ission	63
	1.6.1 1.6.2	HFR concentrations Temporal trends of HFRs in SLE beluga males	63 69
1.7	Conc	lusions	72
1.8	Ackn	owledgments	73
1.9	Supp	lementary material	74
CH ster	APITRI oid-rela	E II Associations between organohalogen exposure and thyroid ted gene responses in St. Lawrence Estuary belugas and minke what	- and s75
2.1	Résu	mé	76
2.2	Abstr	act	76
2.3	Intro	luction	77
2.4	Mate	rials and methods	81
	2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 2.4.5 2.4.6	Field sampling PCR-based sex determination Chemical analysis Total RNA isolation and cDNA synthesis Quantitative real-time PCR Statistical analysis	81 83 83 85 86 87
2.5	Resu	lts	88
	2.5.1 2.5.2	Contaminant concentrations Correlations between gene transcription and contaminant levels	88 90
2.6	Discu	ssion	93

	2.6.1	Contaminants in SLE belugas and minke whales	93
	2.6.2	Correlations between contaminant levels and gene transcripts	95
2.7	Conc	lusions	103
2.8	Ackn	owledgments	104
2.9	Supp	lementary material	104
CH pop	APITRI oulation	E III Metabolomic profiles of the endangered St. Lawrence estu and associations with organohalogen contaminants	ary beluga 105
3.1	Résu	mé	106
3.2	Abstı	act	
3.3	Intro	duction	
3.4	Mate	rials and Methods	112
	3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4	Field sampling Chemical analyses Metabolomic analysis Statistical analysis	
3.5	Resu	lts	118
	3.5.1 3.5.2 3.5.3	Metabolite concentrations in SLE male belugas Organohalogens in blubber of SLE male belugas Relationships between metabolites and contaminants	
3.6	Discu	ıssion	126
	3.6.1 3.6.2 the SL 3.6.3	Organohalogen concentrations in male SLE belugas Differences in metabolites and contaminants in belugas between E Correlations between contaminants and metabolites in belugas.	
3.7	Conc	lusions	
3.8	Ackn	owledgments	
3.9	Supp	lementary material	134
СО	NCLUS	SION	
4.1	Résu	ltats principaux	135
4.2	Impo	rtance et originalité de la thèse	139
4.3	Les li	imites de cette thèse	141

4.4 Recommandations et perspectives de recherche145
 4.4.1 Investigation sur les disparités au sein de la population des bélugas145 4.4.2 Identification de l'âge des cétacés à partir de biopsies
ANNEXE A SUPPLEMENTARY MATERIAL - Temporal trends of PBDEs and emerging flame retardants in belugas from the St. Lawrence Estuary (Canada) and comparisons with minke whales and Canadian Arctic belugas
ANNEXE B SUPPLEMENTARY MATERIAL – Associations between organohalogen exposure and thyroid- and steroid-related gene responses in St. Lawrence Estuary belugas and minke whales
ANNEXE C SUPPLEMENTARY MATERIAL – Metabolomic profiles of the endangered St. Lawrence Estuary beluga population and associations with organohalogen contaminants
APPENDICE A L'estuaire du Saint-Laurent
APPENDICE B Description détaillée des principaux contaminants étudiés
RÉFÉRENCES

xiii

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
0.1	Le système hydrographique du Saint-Laurent (Source: Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014)	3
0.2	Distribution estivale des bélugas du Saint-Laurent et composition des types de troupeaux selon les aires de fréquentations principales (Michaud, 2014)	8
0.3	Évolution de la taille de la population des bélugas de l'estuaire du Saint- Laurent estimée à l'aide d'un modèle de dynamique de population pour la période 1912-2012. Les valeurs médianes du modèle sont représentées par des points blancs, et les lignes tiretées et pointillées représentent respectivement les intervalles de confiance de 50 et 95%. L'encadré en haut à droite indique le nombre de bélugas nouveau-nés morts chaque année (points noirs) répertoriés de 1983 à 2012. Les points blancs indiquent la médiane issue du modèle et les intervalles de confiance (IC) sont indiqués par les lignes tiretées (IC 25–75%) et pointillées (IC 2,5 à 97,5%). Adaptée de Mosnier <i>et al.</i> (2010)	11
0.4	Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (Source: Khetan, 2014). La thyroxine (T4) est convertie en sa forme active T3 par les déiodinases (Dio), qui se lie ensuite à son récepteur correspondant (Thr) avant de se diriger dans le noyau de la cellule cible	16
0.5	Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Source: Khetan, 2014)	18
0.6	Diagramme indiquant la localisation cellulaire, les enzymes, les substrats et les produits des voies de la stéroïdogenèse humaine (Source: Häggström et Richfield, 2014)	19

0.7	Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Source: Khetan, 2014)	21
0.8	Voies génomique (A) et non génomique (B) des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Dans la voie génomique, les récepteurs nucléaires se lient aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes et agissent directement pour réguler l'expression des gènes, et dans la voie non génomique, les récepteurs membranaires se lient aux hormones protéiques et amines et produisent des effets à l'intérieur de la cellule par un second système messager (Source: WHO, 2012)	22
0.9	Principales caractéristiques des produits chimiques perturbateurs endocriniens. Le symbole \pm indique qu'un composé perturbateur endocrinien peut augmenter ou diminuer les processus et les effets biologiques et les abréviations Ac et Me correspondent respectivement aux groupements acétyle et méthyle (Source: La Merrill et al., 2020)	24
0.10	Technologies omiques classées en fonction des composés ciblés, et identification des principales méthodes d'analyse. L'ADN (<i>genomics</i>) est d'abord transcrit en ARN messager (<i>transcriptomics</i>) et traduit en protéine (<i>proteomics</i>), qui peut catalyser des réactions agissant sur des métabolites (<i>metabolomics</i>), des glycoprotéines et des glucides (<i>glycomics</i>) et divers lipides (<i>lipidomics</i>) (Source: Wu <i>et al.</i> , 2011b)	40
1.1	Map of Eastern Canada showing sites where samples were collected from belugas from the St. Lawrence Estuary (\Box) and the Canadian Arctic (\bullet) as well as from minke whales from the St. Lawrence (\bigstar). A minke whale carcass carried over a long distance by a ship (bow) was found near Montreal.	53
1.2	Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g lw) of A) Σ_{35} PBDE, B) HBB, C) CPlus, and D) Σ DP in blubber of St. Lawrence belugas ($n = 4$) and minke whales ($n = 3$), and Canadian Arctic belugas ($n = 3$) collected in 2013. <i>n.d.</i> : Not detected	61
1.3	Concentrations (ng/g lw) of A) Σ_{35} PBDE, B) HBB, C) CPlus, and D) Σ DP in blubber of male St. Lawrence Estuary belugas sampled between 1997 and 2013 (actual sampling dates were used). Significant linear and spline trends, and credibility intervals (95%) of trends estimated with GAMs are represented by a solid and a dashed line, respectively. Raw data are shown	

XV

	on the graphs while trend lines are fitted to log-transformed concentrations	62
2.1	Sampling area (hatched) for belugas and minke whales in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada)	82
2.2	Correlations between biopsy skin mRNA levels of $Dio2$ (a) and $Esra$ (b), and blubber PCB concentrations (ng/g ww) in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary	91
2.3	Correlations between biopsy skin mRNA levels of $Esra(a)$, $Nr3c1(b)$, $Hsd11\beta2(c, d)$, and blubber HFR concentrations (ng/g ww) in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary	92
2.4	Correlations between biopsy skin mRNA levels of $Esr\beta$ (<i>a</i>) and $Nr3c1$ (<i>b</i>), and blubber HFR concentrations (ng/g ww) in female minke whales sampled in the St. Lawrence Estuary	93
3.1	Hierarchical tree (A) and score plot with 95% confidence ellipses from the HCPC and PCA analyses (B) generated based on skin metabolite concentrations of male St. Lawrence Estuary belugas. Following clusters were identified: cluster 1 (red; $n = 17$), cluster 2 (green; $n = 5$), and cluster 3 (blue; $n = 18$)	119
3.2	Biopsy sampling sites of male belugas in the St. Lawrence Estuary (SLE; $n = 40$) categorized using hierarchical cluster analysis on principal components analysis of skin metabolite concentrations. Clusters generated from this analysis are identified using different colors and corresponded to specific sectors in the SLE: upstream (blue dots) and downstream (red dots) of the Saguenay River mouth, and in or off the Saguenay River mouth (green dots)	120
3.3	Volcano plots showing concentrations of metabolites (A) and organohalogens (B) that significantly differed (fold-change > 1.5; $p \leq 0.05$) between upstream ($n = 18$) and downstream ($n = 17$) SLE male belugas. Fold-changes are expressed relative to individuals sampled in the upstream sector, i.e., a positive fold-change indicates higher concentrations in downstream belugas, while a negative fold-change indicates higher concentrations in upstream belugas. Concentrations that differed significantly between male belugas sampled upstream and	

downstream of the Saguenay River are identified in green and those that	
significantly differed although with a lower magnitude (fold-change < 1.5)	
are identified in red	121

3.4 Correlations between log-transformed blubber concentrations (ng/g ww) of Σ_{18} SCCP and skin concentrations (ng/g ww) of A) acetylornithine, B) C16:1 ω 7, C) C22:5 ω 3c1, D) C22:5 ω 3c2, and E) C22:6 ω 3 in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary. Only correlations with raw *p*-values that remained significant after applying the false discovery rate criterion are presented. Adjusted *p*-values (*q*-values) are listed in Table C12 125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
0.1 Valeurs seuil d'effets pour les BPC (μg/g poids lipidique) et les PBE (ng/g poids lipidique) rapportées dans la littérature	Е 14
1.1 Mean \pm SEM (range) of biological variables and δ^{13} C and δ^{15} N in SLE as Canadian Arctic belugas as well as minke whales from the St. Lawrence	nd 2 58
1.2 Mean ± SEM (range) concentrations (ng/g lw) of PBDEs and maj emerging HFRs determined in blubber of belugas and minke whales fro the St. Lawrence Estuary and Canadian Arctic belugas collected in 20 (i.e., the only common sampling year for the three populations)	or m .3 60
2.1 Mean concentrations (± SEM) and ranges (ng/g ww) of PCBs/OCs at PBDEs/HFRs determined in biopsy blubber of belugas and minke what from the St. Lawrence Estuary (Canada). Means were calculated who compounds/congeners were quantified in > 65% of samples	id es en 89
3.1 Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g ww) and ranges of SCCPs, PCBs at OC pesticides, and HFRs determined in the blubber of male St. Lawren Estuary belugas ($n = 40$). Means were calculated only when concentratio exceeded the method limit of detection (MLOD) or quantification in mothan 65% of the beluga samples	nd ce ns re 122
3.2 Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g ww) of the three main organohalog classes determined in the blubber of male belugas sampled in the S Lawrence Estuary upstream ($n = 18$) and downstream ($n = 17$) of the Saguenay River.	en St. ne 124

RÉSUMÉ

Depuis les 40 dernières années, des concentrations élevées en polluants organiques persistants (POP) ont été signalées dans les tissus de la population en voie de disparition des bélugas (Delphinapterus leucas) de l'estuaire du Saint-Laurent (Canada). Il a été postulé que l'exposition à des concentrations élevées de POP, comme les biphényles polychlorés (BPC), des pesticides chlorés et les polybromodiphényléthers (PBDE) pourraient jouer un rôle dans le non-rétablissement de cette population menacée. Une augmentation exponentielle du niveau des PBDE, une classe de retardateur de flamme halogéné (RFH), a été documentée au cours des années 1990 dans cette population. Les récentes interdictions et réglementations mondiales à l'encontre des mélanges de PBDE ont conduit à leur remplacement par des RFH alternatifs (appelés RFH émergents), qui sont de plus en plus rapportés dans divers compartiments environnementaux. Les connaissances sur les tendances spatiales et temporelles des RFH émergents chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent sont limitées, et très peu d'informations sont connues sur les organohalogénés qui s'accumulent dans les tissus des autres espèces de baleines qui vivent dans le même habitat. En parallèle, plusieurs études in vitro et in vivo ont montré que les BPC, les PBDE et les pesticides chlorés pouvaient perturber l'homéostasie des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes circulantes, altérer l'expression des gènes impliqués dans la régulation de ces hormones et induire également des troubles métaboliques chez les mammifères. Cependant, aucune étude n'a encore évalué l'impact potentiel de ces composés sur les bélugas ou toute autre espèce de cétacés de l'estuaire du Saint-Laurent.

Le premier objectif de cette thèse était d'étudier la présence de RFH (35 congénères PBDE et 10 composés émergents) dans la graisse de bélugas et de petits rorquals (*Balænoptera acutorostrata*) trouvés morts dans l'estuaire ou le golfe du Saint-Laurent, ainsi que les tendances temporelles entre 1997 et 2013 des concentrations de RFH chez les bélugas. Le deuxième objectif était d'examiner, à partir de biopsies de bélugas et de petits rorquals du Saint-Laurent, les liens entre les concentrations dans le gras de POP (BPC et pesticides chlorés) et de RFH, et les niveaux de transcription d'une sélection de transcrits de gènes mesurés dans la peau impliqués dans la régulation des axes thyroïdiens et stéroïdiens. Enfin, le dernier objectif était d'étudier, à partir des

mêmes biopsies de bélugas, les relations entre les concentrations de la même sélection d'organohalogénés et de paraffines chlorées à chaîne courte (PCCC), et les concentrations dans la peau de plusieurs métabolites (c.-à-d., 21 acides aminés, 22 amines biogéniques, 18 acides gras et 17 métabolites énergétiques).

Tout d'abord, il a été observé que les concentrations en PBDE et RFH émergents étaient plus élevées chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent en comparaison à celles des petits rorquals, puis que les concentrations de PBDE chez les bélugas ne présentaient aucunes tendances significatives durant la période de 17 années investiguée. En revanche, les concentrations d'hexabromobenzène (HBB) et de chlordène plus chez les bélugas diminuaient légèrement de 1997 à 2013, tandis que celles de déchlorane plus (DP) augmentaient jusqu'en 2000, suivies d'une légère diminution par la suite. Ensuite, les concentrations de plusieurs (c.-à-d., BPC, pesticides organochlorés et HBB et Dec-604 CB) chez les bélugas étaient corrélées avec la transcription des gènes liés à la régulation des hormones stéroïdiennes et/ou thyroïdiennes et les concentrations de PCCC étaient corrélées avec les profils de plusieurs acides gras. Chez les petits rorquals, les concentrations de PBDE corrélaient positivement avec les niveaux de transcrits du récepteur des œstrogènes β et les concentrations d'HBB étaient négativement corrélées avec les transcrits du récepteur des glucocorticoïdes. Ces résultats indiquent que plusieurs fonctions biologiques, telles que la croissance, le développement, la reproduction et le métabolisme énergétique, pourraient être des cibles potentielles des organohalogénés accumulés chez ces baleines.

Cette thèse apporte une multitude de nouvelles informations sur la composition en composés organohalogénés hérités et émergents, auxquels sont exposés les bélugas et les petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent. Plusieurs contaminants organohalogénés sont également suspectés de représenter un risque pour la santé de ces populations, notamment au niveau des axes endocriniens et des voies métaboliques. Nos résultats suggèrent une potentielle perturbation au niveau de la régulation des hormones thyroïdiennes, des œstrogènes, du cortisol et du métabolisme des lipides, ce qui pourrait avoir des conséquences sur le métabolisme énergétique, la reproduction et le développement pour ces populations de cétacés. Toutes ces données sont particulièrement importantes pour les bélugas du Saint-Laurent, qui sont considérés en voie de disparition. Enfin, cette thèse démontre que l'utilisation d'outils « *omiques* » est maintenant possible en utilisant des biopsies de cétacés, et que ceux-ci ont la capacité de faire avancer significativement la compréhension des mécanismes potentiels de toxicité des contaminants accumulés par les cétacés.

Mots clés : Polluant organique persistant ; retardateur de flamme halogéné ; Cétacés ; perturbation endocrinienne ; transcription de gènes ; métabolomique.

ABSTRACT

Since the last 40 years, elevated concentrations of persistent organic pollutants (POPs) have been reported in tissues of belugas (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary (Canada). In 2014, the status of the St. Lawrence Estuary beluga population was changed from threatened to endangered by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. It has been postulated that exposure to elevated concentrations of POPs, such as polychlorinated biphenyls (PCBs), chlorinated pesticides and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), might play a role in the nonrecovery of this endangered population. An exponential level increase of the ubiquitous halogenated flame retardant (HFR) class PBDE has been documented during the 1990s in this population. The recent worldwide bans and regulations of PBDE mixtures, led to their replacement by alternative HFRs (so-called emerging HFRs) that are increasingly being reported in various environmental compartments. However, there is limited knowledge on the spatial and temporal trends of emerging HFRs in belugas from the St. Lawrence Estuary, and very little information is known on organohalogens that accumulate in tissues of other whale species that live in the same habitat. In vitro and in vivo studies of mammals have shown that PCBs, PBDEs and chlorinated pesticides can perturb the homeostasis of circulating thyroid and steroid hormones, alter the expression of genes involved in their regulation, and also induce metabolic disorders. However, no study has yet assessed the potential impact of these compounds on belugas or any other cetacean species from the St. Lawrence Estuary.

The first objective of this thesis was to investigate the occurrence of HFRs (35 PBDE congeners and 10 emerging compounds) in the blubber of belugas and Minke whales (*Balænoptera acutorostrata*) found dead in the Estuary or Gulf of St. Lawrence as well as the temporal trends of HFR concentrations in belugas between 1997 and 2013. The second objective was to examine the linkages between blubber concentrations of POPs (PCBs and chlorinated pesticides) and emerging HFRs, and skin gene transcripts involved in the regulation of thyroid and steroid axes, using biopsies of St. Lawrence belugas and Minke whales. Finally, the last objective of this thesis was to investigate, in the same beluga biopsies, the relationships between concentrations of the same selection of organohalogens and short-chain chlorinated paraffins (SCCPs), with skin concentrations of a suite of metabolites (i.e., 21 amino acids, 22 biogenic amines, 18 fatty acids, and 17 energy metabolites).

The first results of this thesis showed that concentrations of PBDEs and emerging HFRs were notably greater in St. Lawrence estuary belugas compared to Minke whales, and that no significant trend in PBDE blubber concentrations was found in belugas the 17-year period investigated. In contrast, concentrations of during hexabromobenzene (HBB) and chlordene plus in belugas decreased slightly from 1997 to 2013, while dechlorane plus (DP) increased up until 2000 and decreased slightly thereafter. In belugas, concentrations of several contaminants (PCBs, organochlorine pesticides and HBB and Dec-604 CB) correlated with the transcription of steroidand/or thyroid-related genes, and SCCP concentrations also correlated with fatty acid profiles. In Minke whales, PBDE concentrations changed positively with transcript levels of the estrogen receptor β and HBB concentrations negatively with glucocorticoid receptor transcripts. These results indicate that several biological functions including growth, development, reproduction, and energetic metabolism may represent potential targets for organohalogens in these whales.

This thesis provides new information on the composition of legacy and emerging organohalogen compounds, to which belugas and Minke whales in the St. Lawrence estuary are exposed. Several organohalogenated contaminants are also suspected at risk to the health of these populations, particularly to endocrine axes and metabolic pathways. Our results suggest that the regulation of thyroid, estrogen and cortisol hormones, as well as lipid metabolism may be potentially disturbed, which could have consequences on the energy metabolism, reproduction and development of these cetacean populations. All of these data are particularly of importance for the St. Lawrence Estuary belugas, as they are endangered. Finally, this thesis demonstrates that the use of omics represents a valuable screening tool to assess the impacts of environmental contaminants in cetaceans, and significantly improve the understanding of their potential mechanisms of toxicity.

Keywords : Persistent organic pollutant; halogenated flame retardant; Cetaceans; endocrine disruption; gene transcription; metabolomics.

INTRODUCTION

Cette thèse de doctorat s'inscrit au cœur du programme de financement lancé au printemps 2014 par le Groupe National Consultatif sur les Contaminants de Pêches et Océans Canada dans le but de financer des projets visant à mieux comprendre les effets biologiques des contaminants sur les espèces aquatiques du Canada. Les travaux réalisés dans cette thèse visent à mieux comprendre les effets d'une sélection de contaminants organiques sur la santé de deux populations de baleines : le béluga (*Delphinapterus leucas*) et le petit rorqual (*Balænoptera acutorostrata*) de l'Estuaire du Saint-Laurent. Ces deux espèces sont exposées à une multitude de contaminants transitant à travers le fleuve Saint-Laurent et qui s'accumulent dans leurs organismes à des concentrations susceptibles d'affecter leur santé.

Cette introduction sera divisée en deux grandes parties, l'une permettant de contextualiser les objectifs de cette thèse, et l'autre décrivant les principaux objectifs et les moyens qui ont été utilisés pour y parvenir. Le premier volet de cette introduction présentera les particularités et les menaces de l'estuaire du Saint-Laurent, l'écologie des deux espèces étudiées, le système endocrinien des mammifères, puis les principales caractéristiques des contaminants ciblés. Dans la seconde partie de l'introduction, les objectifs et hypothèses détaillés seront présentés et les principales techniques utilisées lors de ce doctorat seront décrites, à savoir l'échantillonnage de baleines et les analyses d'isotopes stables, de transcription de gènes et du métabolome. Enfin, un plan de thèse viendra conclure cette introduction.

0.1 Contexte de la thèse

0.1.1 Pollution du Saint-Laurent et de son estuaire

Le plus important fleuve du Canada, le Saint-Laurent (Figure 0.1), prend sa source dans le lac Ontario dans les Grands Lacs, faisant partie d'un des plus importants systèmes hydrographiques d'Amérique du Nord, en drainant plus de 25 % des réserves mondiales en eau douce (Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014). Ce fleuve est constitué de trois portions distinctes : un tronçon fluvial constitué d'eau douce et comprenant trois lacs fluviaux (c.-à-d. : lacs Saint-François, Saint-Louis et Saint-Pierre), un grand estuaire qui débute au lac Saint-Pierre et se termine à Pointedes-monts et un golfe. L'estuaire du Saint-Laurent, qui représente la zone de contact entre le fleuve et le golfe peut également être subdivisé en trois secteurs en fonction du changement des conditions physico-chimiques (Plan Saint-Laurent, 2012) : l'estuaire d'eau douce (du lac Saint-Pierre à la pointe est de l'île d'Orléans), l'estuaire moyen (de la pointe est de l'île d'Orléans à l'embouchure du Saguenay) et l'estuaire maritime (de l'embouchure du Saguenay jusqu'à Pointe-des-monts). La situation géographique ainsi que la diversité et la richesse écosystémique du Saint-Laurent font de ce fleuve un atout socio-économique à la fois précieux et fragile. Il est devenu à travers le temps un corridor maritime commercial majeur permettant de relier le Canada et les États-Unis au reste du monde, et contribue fortement à l'économie de l'Amérique du Nord (Shaw et Kaczkowski, 2015). Plus de 30 millions d'États-Uniens et 15 millions de Canadiens vivent dans l'immense bassin versant du Saint-Laurent (Comité de Concertation Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2008), et 80% de la population québécoise vit le long des berges et des affluents de ce majestueux fleuve (Gouvernement du Québec, 2019). La forte densité de population associée à une forte activité économique centrée sur le transport maritime, la pêche, l'agriculture et l'industrie ont produit d'énormes quantités de rejets, entraînant des répercussions environnementales importantes dans le fleuve (Gouvernement du Québec, 2019; ISQ, 2013). Dès lors, une grande diversité et quantité de contaminants transitent par l'estuaire du Saint-Laurent, et représentent une menace potentielle pour la faune qui y réside.



Figure 0.1 Le système hydrographique du Saint-Laurent (Source: Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014).

Jusqu'au début des années 1970, l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent étaient considérés comme une ressource inépuisable et un dépotoir sans limites (Costa, 1990). En 1972, Trites (1972) publia une revue de littérature intitulée « *The gulf of St. Lawrence from a pollution point of view* » qui dressait un inventaire des sources potentielles de contaminants chimiques et des mécanismes physiques susceptibles de régir leur distribution (dilution, dispersion, temps de transit) dans l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent. Cet ouvrage fut l'un des premiers à pointer les problèmes de pollution dans ces écosystèmes, ce qui poussa la communauté scientifique à s'intéresser de plus près à cette problématique. Les principaux contaminants qui ont été suivis sont des

métaux (p. ex., mercure, cadmium, plomb) et des composés organiques, tels que les biphényles polychlorés (BPC), le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le mirex ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Costa, 1990). Depuis les années 1970, plusieurs mesures prises par les gouvernements canadiens et américains ont favorisé la diminution de près de 50% des apports de pesticides vers l'estuaire du Saint-Laurent, et les concentrations environnementales de mercure, des BPC ou encore des HAP ne représentent plus une menace réelle, sauf dans certains secteurs des lacs fluviaux du Saint-Laurent ou en aval de Montréal (Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014). À partir de carottes de sédiments prélevées en 1993 dans l'estuaire du Saint-Laurent, Lebeuf et Nunes (2005) ont rapporté des baisses significatives des concentrations de plusieurs composés organiques (c.-à-d., BPC, mirex, hexachlorobenzène (HCB) et DDT) depuis la fin des années 1970. D'autres baisses des concentrations de ces composés ont été observées dans la faune de l'estuaire du Saint-Laurent, comme chez le béluga du Saint-Laurent (Lebeuf et al., 2014a). Cependant, une augmentation des concentrations d'un groupe de contaminants appelés polybromodiphényléthers (PBDE) a été observée depuis la fin des années 1990 dans les sédiments (Pelletier et Rondeau, 2013), ainsi que chez le béluga du Saint-Laurent (Lebeuf et al., 2014a). Malgré la baisse des concentrations de contaminants organiques comme les BPC et plusieurs pesticides organochlorés (DDT, HCB et mirex) dans le gras des bélugas du Saint-Laurent, leur présence continue d'être préoccupante pour le béluga, car leurs concentrations sont encore autant, voire plus élevées que celles des PBDE (Lebeuf et al., 2014a). Enfin, l'apparition de plusieurs retardateurs de flamme halogénés émergents¹ dont les propriétés et toxicités restent peu documentées, ont été

¹ Le terme émergent regroupe plusieurs composés dont l'apparition ou la détection dans l'environnement sont récentes, leurs concentrations sont en préoccupante augmentation, et leur toxicité est peu, voire non documentée.

rapportés dans des brochets aux alentours de Montréal (Houde *et al.*, 2014), laissant présager que certains puissent déjà s'être accumulés dans la faune située plus en aval, au niveau de l'estuaire du Saint-Laurent.

La zone d'échantillonnage de cette thèse est située au niveau de Tadoussac, à cheval entre la fin de l'estuaire moyen et le début de l'estuaire maritime. C'est un point de rencontre entre les eaux du Saint-Laurent, de la rivière Saguenay, ainsi que des eaux de fond riches en nutriments qui remontent à cause de la tête du chenal laurentien. Cette configuration particulière fait de ce secteur une région importante pour plusieurs espèces de cétacés compte tenu de la diversité et de l'abondance des proies qui s'y retrouvent (plus de détails en Appendice A). Une population de bélugas y réside toute l'année (MPO, 2014), et d'autres espèces de baleines, comme le petit rorqual, le visitent de façon saisonnière principalement pour s'y alimenter. Le béluga et le petit rorqual de l'estuaire du Saint-Laurent sont deux cétacés, l'une à dents et l'autre à fanons. Leur longue espérance de vie, leur position au sommet de leur chaîne alimentaire respective, ainsi que leurs grandes quantités de graisse sous-cutanée font d'eux de véritables éponges à contaminants lipophiles². Ce sont donc des modèles d'études idéaux pour mesurer la présence de polluants émergents, et aussi pour faire le suivi temporel de contaminants provenant de leur habitat (Law, 2014; Lebeuf et al., 2014a). L'accumulation des contaminants organiques dans les tissus des baleines du Saint-Laurent a principalement été étudiée chez les bélugas du Saint-Laurent. Pour les petits rorquals du Saint-Laurent, seule une étude a rapporté des concentrations de BPC, DDT et HCB dans 21 échantillons de gras de petits rorquals récoltés par biopsie en 1991 dans le golfe du Saint-Laurent (Gauthier et al., 1997), alors que pour les bélugas du

² Substance qui a une affinité pour les solvants apolaires comme les lipides (corps gras). Ces composés sont donc solubles dans les corps gras, mais insolubles dans les solvants polaires comme l'eau.

Saint-Laurent, il y a un suivi temporel des concentrations des BPC et de plusieurs pesticides organochlorés depuis les années 1980 (Lebeuf *et al.*, 2014a). En comparaison aux bélugas du Saint-Laurent, les concentrations en BCP, DDT et HCB dans les petits rorquals étaient respectivement 7, 11 et 2 fois plus faibles (Lebeuf *et al.*, 2014a). Plusieurs des contaminants organiques étant considérés perturbateurs endocriniens (**Section 0.1.5**), ils représentent une menace potentielle pour la santé de ces espèces.

0.1.2 Écologie du béluga et du petit rorqual du Saint-Laurent

0.1.2.1 Les petits rorquals de l'Atlantique Nord

Le petit rorqual, rorqual à museau pointu ou encore baleine de Minke, est une espèce de cétacé à répartition mondiale, qui se distingue par sa petite taille estimée en moyenne à 8,7 m pour les femelles et 8 m pour les mâles (Horwood, 1990). Ce mammifère marin qui peut vivre jusqu'à 50 ans est parmi les baleines à fanon les plus abondantes au monde (Perrin et Brownell Jr, 2009). La population de petit rorqual fréquentant l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent n'étant pas menacée, elle n'est pas considérée en péril au Canada (COSEPAC, 2006) et aucun suivi régulier de l'état de la population n'a été mis en place.

Contrairement au béluga, le petit rorqual de l'Atlantique Nord effectue des migrations saisonnières sur de larges échelles entre les aires de reproduction et d'alimentation (Fontaine, 2005 ; Perrin et Brownell Jr, 2009). Ces baleines accumulent des graisses l'été dans les eaux plus froides et riches du nord de l'Atlantique afin de l'utiliser l'hiver (décembre à mars) dans les eaux tropicales jusqu'aux Antilles, pour la reproduction, la mise bas et l'allaitement (Bartha *et al.*, 2011 ; Dam *et al.*, 2011 ; Fontaine, 2005). En période d'alimentation, les petits rorquals fréquentent les zones côtières et estuariennes riches en nourriture et se nourrissent essentiellement de crustacés comme le krill et de petits poissons (Shirihai et Zucca, 2007). Les populations qui s'alimentent dans les

zones du nord-ouest de l'Atlantique consommeraient principalement du lançon, du capelan, de la morue et du hareng (Born *et al.*, 2003 ; Dam *et al.*, 2011 ; Fontaine, 2005). Les études de suivi par photo-identification opérées par le groupe de recherche et d'éducation sur les mammifères marins (GREMM, Tadoussac, QC) et le Mériscope (Portneuf-sur-mer, QC) indiquent que de nombreux petits rorquals viennent chaque année s'alimenter dans l'estuaire du Saint-Laurent en saison estivale avec une certaine fidélité.

0.1.2.2 La population des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent

Le béluga est une espèce grégaire vivant majoritairement dans les zones arctiques et subarctiques, à l'exception de la population des bélugas du Saint-Laurent qui vit plus au sud en région boréale (Gosselin et al., 2014 ; O'Corry-Crowe, 2018). La population mondiale de bélugas peut être subdivisée en 29 sous-populations réparties autour des côtes canadiennes, russes, norvégiennes, de l'Alaska et du Groenland (DFO, 2012; Martin et Reeves, 2000). Les adultes peuvent peser jusqu'à 1500 kg, atteindre des tailles de 3,5 à 5,5 mètres de long et vivre plus de 50 ans (O'Corry-Crowe, 2018). Ces cétacés se sont parfaitement adaptés à leur environnement d'abord avec leur couleur blanche, puis la présence d'une épaisse couche de graisse sous-cutanée (jusqu'à 15 cm), d'un imposant melon, d'un dos robuste et l'absence de nageoire dorsale qui leur permet de briser la glace en hiver (DFO, 2012; Fontaine, 2005). Une fois matures sexuellement (5 à 8 ans), les bélugas s'accouplent tous les 3 ans au printemps, entre avril et juin, puis donnent naissance à un veau 14 mois plus tard (Fontaine, 2005; O'Corry-Crowe, 2018). Une particularité des bélugas est la différence de couleur entre les adultes et les jeunes individus. En effet, à la naissance les veaux (0 à 1 an) naissent de couleur café au lait, puis les juvéniles (à partir de 1 an) deviennent gris jusqu'à un âge estimé entre 12 et 24 ans, où ils deviennent blancs et sont dès lors considérés adultes (Michaud, 2014).

La population du Saint-Laurent occupe un territoire de plus de 8000 km², avec une zone de fréquentation estivale actuelle se concentrant surtout autour de l'embouchure du Saguenay depuis Baie-Saint-Paul, jusqu'à Rimouski et Forestville (**Figure 0.2**), alors qu'en hiver l'aire peut s'étendre plus au large, au niveau du golfe du Saint-Laurent (Gosselin *et al.*, 2014 ; MPO, 2012). Dans le Saint-Laurent, le régime alimentaire de ce prédateur supérieur opportuniste est très varié. Il se nourrit majoritairement d'espèces de poissons (p. ex., sébaste, anguille, lançon, chabot, morue et capelan) et d'invertébrés (p. ex., vers polychètes, céphalopodes, bivalves ou crustacés), autant benthiques que pélagiques (Lesage, 2014 ; Vladykov, 1944 ; Wyrzykowski, 2005).



Figure 0.2 Distribution estivale des bélugas du Saint-Laurent et composition des types de troupeaux selon les aires de fréquentations principales (Michaud, 2014).

En saison estivale, il existe une ségrégation spatiale au sein de la population des bélugas du Saint-Laurent qui est subdivisée en trois secteurs (c.-à-d., amont, intermédiaire et aval) en fonction de la composition des troupeaux de bélugas observés (**Figure 0.2**). Selon Michaud (1993), le secteur amont est principalement fréquenté par de petits troupeaux (< 30 individus) composés d'adultes et de juvéniles/nouveau-nés, le secteur intermédiaire par une composition mixte de petits groupes d'adultes seulement, ou d'adultes et juvéniles/nouveau-nés, et le secteur aval est fréquenté essentiellement par des troupeaux de grande taille (30 à plus de 100 individus), composés majoritairement d'adultes (< 10% juvéniles/nouveau-nés). La particularité de cette distribution est que chacun des secteurs possède des spécificités écologiques qui pourraient faire varier la composition de la diète des bélugas du Saint-Laurent selon l'aire principalement fréquentée (**Appendice A**).

0.1.3 Les bélugas du Saint-Laurent : une population en voie de disparition

0.1.3.1 Déclin de la population

Estimée à l'origine aux environs de 8 000 individus (**Figure 0.3**), la population de béluga de Saint-Laurent a subi un très fort déclin à cause d'une surchasse³, pour atteindre dans les années 1980 seulement 1000 individus (Gosselin *et al.*, 2014 ; Hammill *et al.*, 2007). Face à ce constat alarmant, la chasse commerciale a pris fin dans les années 1960 (Mosnier *et al.*, 2014), puis cette population reconnue comme menacée par le gouvernement canadien, a été mise définitivement sous protection en 1979 (MPO, 2014). Bien que cette espèce emblématique du Saint-Laurent soit protégée depuis près de 40 ans, celle-ci ne montre aucun signe de recouvrement. Sa population serait même

³ Les bélugas du Saint-Laurent ont été chassés de manière intensive à partir des années 1880 pour leur huile, leur peau et leur viande, puis dans les années 1930 la population étant accusée à tort d'être responsable des baisses des stocks de saumon et de morue, le Département des Pêcheries du Québec encouragea leur chasse en accordant une prime de 15\$ par nageoire caudale (Ferchiou, 2019; Vladykov, 1944). La chasse commerciale des bélugas du Saint-Laurent s'est poursuivie jusqu'en 1955 et leur chasse sportive a été autorisée jusque dans les années 1970.

en déclin, comme le montre par exemple l'accroissement inquiétant d'échouages de nouveau-nés depuis 2008 (Gosselin *et al.*, 2014 ; Hammill *et al.*, 2007 ; Lair *et al.*, 2014). Les taux de croissance attendus pour une population inexploitée de bélugas devraient être supérieurs à 2,5% avec un maximum de 4% (DFO, 2005), or la croissance actuelle de la population est estimée inférieure à 1% (DFO, 2012). Selon le modèle utilisé par Mosnier *et al.* (2015), la population des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent était stable ou légèrement croissante de la fin de la chasse dans les années 1960 jusqu'au début des années 2000 en atteignant environ 1000 individus, puis serait en déclin depuis 2002 pour atteindre 889 individus (IC 95% : 672-1167) en 2012. La pollution sonore provoquée par le trafic des navires commerciaux et récréotouristiques, les changements climatiques (c.-à-d., augmentation de la température des eaux, déclin du couvert de glace), la réduction de certains stocks de poissons et la pollution chimique du Saint-Laurent représentent des facteurs potentiels expliquant le manque de recouvrement de cette population (Lesage *et al.*, 2017 ; MPO, 2014).

Face à ce constat, un programme de récupération de la population des bélugas du Saint-Laurent a été mis en place en 2012, avec comme objectif à long terme un recouvrement de la population à 70% de sa taille d'origine, correspondant à 7070 individus (DFO, 2012). En 2014, le conseil canadien pour la conservation des espèces en péril a modifié le statut de la population des bélugas du Saint-Laurent de menacé à en voie de disparition (COSEWIC, 2014a), un statut mis à jour dans la *Loi sur les espèces en péril* en 2017 (DFO, 2017).



Figure 0.3 Évolution de la taille de la population des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent estimée à l'aide d'un modèle de dynamique de population pour la période 1912-2012. Les valeurs médianes du modèle sont représentées par des points blancs, et les lignes tiretées et pointillées représentent respectivement les intervalles de confiance de 50 et 95%. L'encadré en haut à droite indique le nombre de bélugas nouveau-nés morts chaque année (points noirs) répertoriés de 1983 à 2012. Les points blancs indiquent la médiane issue du modèle et les intervalles de confiance (IC) sont indiqués par les lignes tiretées (IC 25–75%) et pointillées (IC 2,5 à 97,5%). Adaptée de Mosnier *et al.* (2010).

0.1.3.2 Contamination des bélugas du Saint-Laurent

La population des bélugas du Saint-Laurent est considérée depuis plusieurs décennies comme étant l'une des plus contaminées au monde comparativement à d'autres populations de mammifères marins. Les contaminants accumulés dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent sont suivis depuis plus de 40 ans. Cependant, ce suivi a été effectué de manière inconstante et seulement pour certains composés organohalogénés. Le premier signalement de contaminants chez des bélugas du Saint-Laurent provient de carcasses récupérées dans les années 1970 (Sergeant, 1980), où des concentrations très élevées de BPC (800 µg/g poids humide) et de DDT (827 µg/g poids humide) y avaient été détectées dans le gras de ces individus. Par la suite, des concentrations élevées d'une gamme plus large de contaminants incluant des BPC, des pesticides organochlorés et leurs produits dérivés (c.-à-d., DDT, HCB, mirex et trans-nonachlor) et des paraffines chlorées à chaîne courte (PCCC), ont également été rapportées dans le gras de carcasses de bélugas du Saint-Laurent (Lebeuf et al., 2014a; Muir et al., 1996; Tomy et al., 1998b). Bien que les concentrations de BPC et de DDT aient nettement diminué dans le gras des bélugas entre 1987 et 2007 (Lebeuf et al., 2014a), ces produits chimiques étaient toujours à des niveaux préoccupants à la fin de cette période. En parallèle, les niveaux d'une grande classe de retardateurs de flamme halogénés, les PBDE, ont augmenté de 1987 jusqu'à la fin des années 1990 dans le gras des bélugas du Saint-Laurent (Lebeuf et al., 2014a). Depuis, les concentrations de PBDE semblent avoir atteint un plateau et sont restées stables jusqu'en 2007. En plus des nombreux composés organohalogénés qui ont été suivis chez cette population de béluga, il existe de nombreux autres contaminants qui n'ont fait l'objet d'aucun suivi depuis les 20 dernières années et qui pourraient également représenter une menace pour la santé des bélugas du Saint-Laurent. C'est le cas notamment des PCCC ou des métaux traces, pour lesquels aucune donnée n'a été rapportée depuis Tomy et al. (1998b) ou Wagemann et al. (1990). Enfin, il n'existe aucun suivi à ce jour pour étudier la présence de contaminants émergents au sein de cette population.

0.1.3.3 Suivi des bélugas du Saint-Laurent

Un programme de récupération et de collecte d'échantillons des carcasses de béluga retrouvées échouées le long du Saint-Laurent a été mis en place depuis 1982, ce qui a permis de constituer une banque d'échantillons provenant de différents tissus (p. ex., dent, gras, peau et foie) de 1983 jusqu'à nos jours. Lorsque l'état des carcasses le permet, elles sont transportées jusqu'à la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal à Saint-Hyacinthe pour faire un examen post mortem et déterminer la cause de mortalité de l'animal. Entre 1983 et 2012, un total de 472 bélugas du Saint-Laurent ont été retrouvés échoués ou à la dérive (Lesage et al., 2014b), et une nécropsie complète a été réalisée sur 222 (47%) des carcasses signalées (Lair et al., 2016). Cela a permis de faire un suivi temporel du nombre et des causes de mortalité des bélugas du Saint-Laurent. Par exemple, le nombre de carcasses de nouveau-nés retrouvées échouées a augmenté de manière inquiétante depuis 2008 (Figure 0.3), passant de 0 à 3 par an à 5 à 8 selon les années et une année record en 2012 où 16 carcasses ont été recensées (MPO, 2014). Parallèlement à ce constat, la proportion mâle/femelle de carcasses de bélugas depuis les 10 dernières années indique que de plus en plus de femelles sont retrouvées comparativement aux mâles (communication personnelle de S. Lair, 2018). De plus, une augmentation du nombre de cas de mortalité causé en partie ou en totalité par des dystocies⁴ a augmenté chez les femelles béluga retrouvées échouées, et plusieurs cas d'hyperplasie adénomateuse de la glande thyroïdienne (27% des femelles nécropsiées) ont été observés avec une prédominance pour les femelles (Lair et al., 2014, 2016). Face à ces observations, il a été supposé que des contaminants organiques perturbateurs endocriniens tels que les PBDE puissent être à l'origine de l'augmentation de ces mortalités (Lair et al., 2016). Plusieurs

⁴ Accouchement difficile, soit en raison de la configuration du fœtus, soit à cause d'une anomalie maternelle.
carcasses de bélugas du Saint-Laurent mâles et femelles présentaient des concentrations en BPC (0,4-238 μ g/g poids lipidique) et PBDE (18,4-1875 ng/g poids lipidique; Lebeuf *et al.*, 2014a) supérieures à plusieurs valeurs seuil d'effet toxique rapportées dans la littérature (**Tableau 0.1**).

Tableau 0.1 Valeurs seuil d'effets pour les BPC ($\mu g/g$ poids lipidique) et les PBDE (ng/g poids lipidique) rapportées dans la littérature.

Valeur seuil	Effets observés	Espèce	Référence
BPC			
10,2	Prolifération de lymphocytes	Béluga	Desforges <i>et al.</i> (2016)
10,0	Effets sur la reproduction	Grand dauphin (Tursiops truncatus)	Hall <i>et al.</i> (2006)
10,0	Systèmes immunitaire et hormonal	Cétacés sp.	Dietz <i>et al.</i> (2019)
9,0	Perturbation du système immunitaire et de la reproduction	Cétacés sp	Jepson <i>et al.</i> (2016)
1,4 à 2,5	Perturbation des niveaux de transcrits de gènes impliqués dans la régulation des hormones stéroïdiennes dans le foie	Phoque commun (Phoca vitulina)	Brown <i>et al.</i> (2014)
1,7	Perturbation du profil des vitamines A et E (foie et gras)	Béluga	Desforges <i>et al.</i> (2013)
PBDE			
1 200	Perturbation des niveaux d'hormones thyroïdiennes	Vison (Mustela vison)	Zhang <i>et al.</i> (2014)

0.1.4 Le système endocrinien

Dans l'ensemble, le système endocrinien des mammifères se compose de glandes et d'organes qui produisent et sécrètent des hormones se propageant dans le sang vers des organes cibles, dans lesquels elles vont se lier à des récepteurs spécifiques et induire une réponse. Les glandes endocrines incluent la glande pinéale (ou épiphyse), l'hypophyse (ou glande pituitaire), la glande thyroïde, les glandes parathyroïdes, le thymus et les glandes surrénales. Il existe également d'autres organes capables de sécréter des hormones, tels que le cœur, l'estomac, le pancréas, les ovaires chez les femelles et les testicules chez les mâles (Johnstone *et al.*, 2014). Chez les vertébrés, le système endocrinien est constitué de trois axes principaux qui agissent comme des entités distinctes : l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien, l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Khetan, 2014). Ces derniers permettent de réguler diverses fonctions biologiques telles que l'homéostasie (capacité du corps à maintenir un état d'équilibre), la croissance, le développement, les réponses du corps aux stimuli externes (en particulier le stress), la différenciation sexuelle et la reproduction (Norris et Carr, 2005). Face à la complexité du système endocrinien, seuls ces trois axes seront traités par la suite dans cette thèse. De plus, ce sont les axes hormonaux les plus susceptibles d'être impactés par les contaminants perturbateurs endocriniens accumulés dans les tissus des bélugas et petits rorquals du Saint-Laurent (**Section 0.1.5**).

0.1.4.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien

La glande thyroïde synthétise trois hormones lipophiles : la thyroxine (T4), la triiodothyronine (T3) et la calcitonine. Lorsque les taux sanguins de T3 et de T4 sont faibles ou que le taux métabolique est ralenti, l'hypothalamus est stimulé pour produire l'hormone thyréotrope (TRH) qui va stimuler la production de thyréostimuline (TSH) au niveau de l'antéhypophyse (**Figure 0.4**). La TSH stimule à son tour les follicules thyroïdiens dans la glande thyroïde, ce qui va induire une sécrétion de T3 et T4 dans le sang jusqu'à ce que le taux métabolique redevienne normal. Dès lors, la production de TRH et de TSH est stoppée (Johnstone *et al.*, 2014).



Figure 0.4 Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (Source: Khetan, 2014). La thyroxine (T4) est convertie en sa forme active T3 par les déiodinases (Dio), qui se lie ensuite à son récepteur correspondant (Thr) avant de se diriger dans le noyau de la cellule cible.

La plupart des effets des hormones thyroïdiennes proviennent de la T3, qui est sécrétée en quantités inférieures à la T4 (Köhrle, 2002). Dès lors, lorsque la T4 entre dans une cellule, elle est convertie en T3 par des enzymes appelées déiodinases. Ces enzymes catalysent l'activation de la T4 en T3 en lui retirant un atome d'iode, mais peuvent également inactiver la T3 également par désiodation (Soldin *et al.*, 2008). Il existe trois types de déiodinase (c.-à-d., Dio1, Dio2 et Dio3) réparties dans différents tissus du corps et qui contribuent à la régulation de l'axe thyroïdien (Köhrle, 2002). Une fois dans les cellules et activées, les hormones thyroïdiennes vont se lier à des récepteurs nucléaires (c.-à-d., dans le noyau des cellules) spécifiques. Cela va alors induire un ensemble de réactions en chaîne, allant de la synthèse de transcrits de gènes à la production de protéines et/ou métabolites dont le corps à besoin. Les hormones thyroïdiennes n'ont pas d'organes cibles distincts, mais affectent presque tous les tissus du corps, car elles jouent un rôle important dans le métabolisme et dans la régulation de l'homéostasie du corps (Johnstone *et al.*, 2014). Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires à de nombreuses fonctions, notamment la régulation du métabolisme (production de chaleur, synthèse des protéines, lipolyse et sécrétion de cholestérol), la régulation du taux de consommation d'oxygène et de dépense énergétique et le développement normal des systèmes nerveux et musculo-squelettique (Jenkins et Tortora, 2013).

0.1.4.2 L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

L'activité reproductrice est contrôlée en premier lieu par l'hypothalamus, qui sécrète de façon pulsatile de la gonadolibérine (GnRH) dans le sang (Figure 0.5). Une fois dans l'antéhypophyse, la GnRH diffuse vers ses cellules cibles, appelées gonadotropes, qui vont permettre la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). Par la suite, les gonadotrophines sont rapidement libérées dans le système circulatoire et ciblent les gonades (ovaires ou testicules), où elles vont réguler la synthèse des hormones stéroïdiennes sexuelles via la stéroïdogenèse et la production de spermatozoïdes ou d'ovules via la gamétogenèse. Plus spécifiquement, la LH stimule la production de testostérone à partir de cellules de Leydig et la sécrétion par le follicule. La FSH stimule les cellules de Sertoli, ce qui amène les testicules à produire une hormone qui régule la production de sperme. La LH et la FSH jouent également un rôle très important dans le cycle menstruel. Enfin, les hormones stéroïdes régulent à leur tour par rétroaction négative la production de GnRH, LH et FSH (Khetan, 2014). Une fois produits et émis, les stéroïdes sexuels vont agir sur leurs récepteurs hormonaux correspondants, qui sont largement exprimés dans les tissus cibles.



Figure 0.5 Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Source: Khetan, 2014).

Le maintien d'une fonction de reproduction normale et de l'homéostasie corporelle dépend des hormones stéroïdiennes synthétisées majoritairement dans les cellules stéroïdogènes des surrénales, des ovaires, des testicules, du placenta et du cerveau, mais aussi plus localement comme dans la peau, le cœur ou l'intestin (Slominski *et al.*, 2013). Les stéroïdes sexuels peuvent être regroupés selon le type de récepteur hormonal (c.à-d., récepteurs des androgènes, des œstrogènes ou de la progestérone) avec lesquels ils interagissent. Les cinq hormones sexuelles principales sont l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2), l'œstriol (E3), la progestérone (P4) et la testostérone (T). Ces hormones lipophiles sont toutes synthétisées dans les cellules stéroïdogènes à partir de cholestérol provenant des granulocytes. Plusieurs enzymes jouent un rôle majeur dans la synthèse des hormones sexuelles (**Figure 0.6**). C'est le cas notamment de la protéine régulatrice stéroïdogène aiguë (StAR), qui transporte le cholestérol jusqu'à la membrane mitochondriale interne, mais aussi des cytochromes P450 (CYP) -17, -19 (aromatase) et -20, la 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), et la 17 β -HSD qui sont impliqués dans les différentes réactions d'hydroxylations et/ou de déshydrogénation du cholestérol (Häggström et Richfield, 2014 ; Hu *et al.*, 2010 ; Miller et Auchus, 2011).



Figure 0.6 Diagramme indiquant la localisation cellulaire, les enzymes, les substrats et les produits des voies de la stéroïdogenèse humaine (Source: Häggström et Richfield, 2014).

0.1.4.3 L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Cet axe joue un rôle clé dans l'adaptation d'un organisme aux contraintes environnementales ou face à un stress. Lorsqu'un stress physique et/ou émotionnel intervient, l'hypothalamus sécrète la corticolibérine (CRH), une hormone qui provoque la libération de l'hormone corticotrope (ACTH) au niveau de l'hypophyse (**Figure 0.7**).

L'ACTH est alors transportée par la circulation sanguine jusqu'aux glandes surrénales, où elle vient stimuler la sécrétion des hormones glucocorticoïdes (c.-à-d., cortisol et corticostérone). La sécrétion des glucocorticoïdes est alors arrêtée lorsque le cortisol atteint le cerveau. Les glandes surrénales peuvent également sécréter d'autres hormones importantes, notamment les minéralocorticoïdes (p. ex., aldostérone). Le cortisol joue un rôle important dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides, dans le but de maintenir la glycémie, de réguler la pression artérielle et de moduler les réponses au stress (Khetan, 2014). L'aldostérone, quant à lui, régule l'équilibre hydrique et électrolytique dans le corps en réduisant l'excrétion des ions sodium, principalement en stimulant leur réabsorption dans les reins (Khetan, 2014). Tout comme les stéroïdes sexuels, les glucocorticoïdes sont issus de la stéroïdogenèse à partir de cholestérol. Les enzymes responsables de la formation de ces hormones lors de la stéroïdogenèse sont les CYP-11B1, -17 et -21 et la 3β -HSD (Figure 0.6). L'enzyme 11 β -HSD joue un rôle très important dans la régulation du cortisol. La 11 β -HSD de type 1 permet de transformer la cortisone (inactive) en cortisol (actif), et la 11 β -HSD de type 2 permet la destruction du cortisol au niveau du foie et des reins (Hu et al., 2008; Ohshima et al., 2005). L'action du cortisol au niveau cellulaire s'effectue lorsque celui-ci est reconnu par le récepteur des glucocorticoïdes dans le noyau.



Figure 0.7 Boucle de rétroaction de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Source: Khetan, 2014).

Lorsqu'un niveau de stress est chronique, il peut y avoir une surcharge des glucocorticoïdes pendant des jours, voire des semaines, ce qui peut avoir un impact préjudiciable sur la santé et la *fitness*⁵ des individus. L'hypersécrétion de cortisol peut entraîner une série de perturbations métaboliques, notamment une glycémie élevée (hyperglycémie), une redistribution de la graisse corporelle, une augmentation du catabolisme protéique et une hypertrophie grossière du cortex surrénal (Khetan, 2014). À long terme, un affaiblissement du système immunitaire, de la croissance, ainsi que des changements comportementaux liés à la reproduction et à une perte de mémoire peuvent également subvenir (Busch et Hayward, 2009).

⁵ En biologie, la *fitness* désigne l'aptitude à la survie des êtres vivants, y compris dans un environnement non favorable qui demande des efforts ou des adaptations.

0.1.4.4 Mécanismes d'action génomique et non génomique des hormones

Une fois émises, les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes vont générer une variété d'effets physiologiques en se liant à des récepteurs de leurs cellules cibles. La voie classique s'effectue à partir de récepteurs nucléaires spécifiques aux hormones (**Figure 0.8A**), tels que les récepteurs des œstrogènes, de la progestérone, des androgènes, des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes. Lorsqu'une hormone est reconnue par son récepteur nucléaire correspondant, une séquence de réactions régulant l'expression de gènes spécifiques va s'opérer dans le noyau des cellules. Cette voie de signalisation est considérée comme génomique, car elle agit via la régulation de la transcription des gènes. C'est un processus considéré relativement long puisque cela peut prendre quelques heures entre la liaison entre l'hormone et son récepteur, la transcription, la traduction et l'accumulation de quantités suffisantes de protéines nouvellement formées (Khetan, 2014).



Figure 0.8 Voies génomique (A) et non génomique (B) des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Dans la voie génomique, les récepteurs nucléaires se lient aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes et agissent directement pour réguler l'expression des gènes, et dans la voie non génomique, les récepteurs membranaires se lient aux hormones protéiques et amines et produisent des effets à l'intérieur de la cellule par un second système messager (Source: WHO, 2012).

Il existe également une autre voie dite non génomique (**Figure 0.8B**) pour les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes (Cheskis *et al.*, 2007 ; Davis *et al.*, 2008). Celle-ci est beaucoup plus rapide que la voie génomique, et agit *via* des récepteurs de la membrane cellulaire (Khetan, 2014). Ces récepteurs activent ensuite d'autres voies de signalisation cellulaires (p. ex., adénosine monophosphate cyclique, kinases et flux de Ca^{2+}) pouvant entraîner des changements rapides de comportement cellulaire en quelques secondes ou minutes (Lodish *et al.*, 2000 ; Lösel et Wehling, 2003).

0.1.4.5 Perturbateurs endocriniens

Un perturbateur endocrinien peut être défini comme un agent exogène qui interfère chez l'adulte et le fœtus avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, l'action de liaison ou l'élimination des hormones sanguines naturellement présentes dans le corps qui sont responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du processus de développement (Crisp et al., 1998). Ces contaminants peuvent être soit d'origine naturelle (p. ex., phyto-œstrogènes de soja, extraits de plantes ou de champignons) ou anthropique. Cette dernière catégorie comprend un large éventail de produits industriels tels que des biocides (p. ex., pesticides, fongicides, insecticides), des plastifiants, des médicaments dérivés d'hormones naturelles (p. ex., contraceptifs) et un large éventail de métaux et de produits chimiques utilisés dans des matériaux de construction, de peintures ou d'isolation (Hampl et al., 2016). Les perturbateurs endocriniens présentent des effets spécifiques aux tissus et produisent des courbes dose-réponse non linéaires (WHO, 2012). Étant donné que les mécanismes de toxicité des perturbateurs endocriniens sont complexes et variés, La Merrill et al. (2020) ont défini 10 caractéristiques clés qui leurs sont propres (Figure 0.9), afin de faciliter l'identification et la classification de ces contaminants.



Figure 0.9 Principales caractéristiques des produits chimiques perturbateurs endocriniens. Le symbole \pm indique qu'un composé perturbateur endocrinien peut augmenter ou diminuer les processus et les effets biologiques et les abréviations Ac et Me correspondent respectivement aux groupements acétyle et méthyle (Source: La Merrill *et al.*, 2020).

De manière générale, il existe deux voies par lesquelles ces composés peuvent perturber le système endocrinien : une action directe agoniste ou antagoniste avec les récepteurs nucléaires ou de la membrane cellulaire, ou une action directe sur des protéines spécifiques qui contrôlent le transport, la biosynthèse ou l'action hormonale (Hampl *et al.*, 2016; Pelch *et al.*, 2011). Comme la plupart des perturbateurs endocriniens sont de petites molécules lipophiles, ils vont principalement interagir

directement avec les récepteurs nucléaires, entraînant des perturbations en aval au niveau de l'expression des gènes. Les effets reliés à une exposition à ces composés sont variés, nombreux et difficiles à prédire. Par exemple, les perturbateurs endocriniens peuvent entraîner une augmentation ou une diminution des taux sanguins des hormones, mais aussi altérer les niveaux d'expression de gènes nécessaire à la régulation des axes thyroïdiens et stéroïdiens (Pelch et al., 2011). En plus des effets que ces perturbateurs peuvent générer au niveau du développement et de la reproduction chez les mammifères, ils sont également capables de causer des troubles métaboliques. En effet, plusieurs études ont indiqué que certains perturbateurs endocriniens détectés chez les bélugas du Saint-Laurent (c.-à-d., DDT, BPC et PBDE) pouvaient induire une augmentation de la lipolyse, de l'oxydation du glucose et/ou du poids corporel chez l'homme et les rongeurs (Casals-Casas et Desvergne, 2011 ; WHO, 2012). Les effets des perturbateurs endocriniens sont donc variés et très complexes, ce qui rend l'évaluation de leur toxicité et l'identification de leurs mécanismes d'action difficiles, notamment chez des espèces sauvages comme les bélugas et les petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent qui sont exposés à un cocktail de perturbateurs endocriniens.

0.1.5 Contaminants chez le béluga et le petit rorqual du Saint-Laurent

Les contaminants étudiés dans cette thèse ont été sélectionnés selon plusieurs critères : 1) des concentrations ont déjà été rapportées dans les tissus de la population des bélugas et des petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent, 2) leur toxicité représente un risque potentiel pour la santé des mammifères, et 3) leur présence dans l'environnement est récente ou préoccupante. Les composés retenus peuvent être classés en deux grandes catégories :

1. <u>Les polluants organiques persistants :</u> composés qui ont été retrouvés à des concentrations très élevées dans le gras des baleines du Saint-Laurent et dont

leur présence dans l'environnement et leur toxicité sont déjà documentées (Section 0.1.5.1) ;

 Les contaminants d'intérêt émergent : composés d'origine anthropique ou naturels dont leur toxicité est peu, voire non documentée et dont l'apparition ou la détection dans l'environnement sont récentes et/ou leurs concentrations sont en préoccupante augmentation (Section 0.1.5.2).

Afin de rester concis, seuls les contaminants qui ont été détectés et quantifiés dans les différentes études de cette thèse seront décrits dans les sections suivantes. De plus, les descriptions détaillées (p. ex., historique, production et principales utilisations) des composés qui ont été ciblés sont disponibles en **Appendice B**.

0.1.5.1 Les polluants organiques persistants

Le terme « *polluants organiques persistants* » ou POP désigne une catégorie de contaminants organiques qui, de par leurs propriétés physico-chimiques, représentent une menace pour la santé des écosystèmes et des humains. Les POP sont caractérisés par quatre critères spécifiques : persistant, bioaccumulable, transporté sur de longues distances et toxique. En raison des nombreux rejets dans l'environnement au cours des dernières décennies, dus en particulier aux activités humaines, les POP se sont largement répandus dans l'environnement (sols, eau et air) à l'échelle mondiale, y compris dans des régions où ils n'ont jamais été utilisés comme en Arctique (Muir et de Wit, 2010) et en Antarctique (Corsolini, 2009). Ces substances lipophiles se bioaccumulent dans les tissus adipeux (La Merrill *et al.*, 2013), et les organismes exposés situés en haut des chaînes alimentaires, tels que les hommes, les oiseaux prédateurs ou les mammifères marins, accumulent des quantités bien plus importantes à cause d'un phénomène de bioamplification. Les doses accumulées peuvent alors générer des effets toxiques aigus et chroniques (Daley *et al.*, 2014). Afin de protéger la santé humaine et les écosystèmes de ces composés, 183 pays (incluant le Canada) ont

adopté le 22 mai 2001 à Stockholm un traité international visant à limiter, interdire et/ou éliminer la production, l'utilisation, l'importation et l'exportation des produits chimiques considérés comme POP (Stockholm Convention, 2008). À l'origine, 12 contaminants, incluant des pesticides organochlorés (p. ex., aldrin, chlordane, DDT, mirex) et des produits et sous-produits chimiques industriels (p. ex., HCB, BPC), étaient visés par cette convention. Ces composés sont classés parmi trois principales annexes; A (élimination), B (restriction) et C (production non intentionnelle); en fonction des menaces qu'ils représentent pour l'environnement et les humains. Depuis 2001, d'autres composés ont été évalués par un comité d'experts et ajoutés dans les différentes annexes. Parmi ces « nouveaux POP », il y a les mélanges commerciaux de PBDE (Penta- et Octa-BDE) qui ont été ajoutés en 2009 dans l'annexe A, et de même avec le Deca-BDE et les PCCC en 2017.

Au Canada, l'importation, la fabrication et la vente des BPC sont interdites depuis 1977 (Santé Canada, 2005). Par la suite, le Canada a mis en place la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999) (LCPE), qui vise à prévenir la pollution et protéger l'environnement et la santé humaine (Gouvernement du Canada, 2019a). Résultant de la LCPE, un nouveau *Règlement sur les BPC* est entré en vigueur en 2008, afin d'accélérer l'élimination de ces substances considérées toxiques aux yeux de la loi. Ce nouveau règlement continue de contrôler la fabrication, l'exportation, l'importation, la mise en vente, la vente, l'utilisation, le traitement, l'entreposage et les rejets des BPC (Gouvernement du Canada, 2019b). D'autres POP tels que l'HCB, le DDT, les PBDE et les PCCC sont également considérés toxiques selon la LCPE, et font l'objet de réglementation au Canada. Des mesures d'interdiction ont été mises en place à l'encontre du HCB dès 2003 au Canada. Le pesticide DDT est banni du Canada depuis 1990 et qui est interdit de vente et d'utilisation par la *Loi sur les produits antiparasitaires* (2002) (Gouvernement du Canada, 2013). Pour les PBDE, leur interdiction de fabrication, utilisation, vente et importation a été mise en place depuis

2008 pour les Penta- et Octa-BDE (Canada Gazette, 2008) et depuis 2015 pour le Déca-BDE (Canada Gazette, 2015). En 2012, le *Règlement sur certaines substances toxiques interdites* interdit la fabrication, l'utilisation, la vente, la mise en vente ou l'importation de produits contenant des PCCC (Gouvernement du Canada, 2012), mais aussi d'autres substances comme l'HCB et les DDT (Gouvernement du Canada, 2017). Enfin, le chlordane (somme des α - et γ -chlordane et *cis*- et *trans*-nonachlor) est également interdit d'utilisation au Canada depuis 1998, à la suite d'un accord passé entre le Canada, les États-Unis et le Mexique (le *North American Regional Action Plan on Chlordane*, 1997) pour bannir ce pesticide (CEC, 2003).

Bien que l'utilisation des POP précédemment mentionnés ait été interdite ou restreinte depuis plusieurs années au Canada, ces substances sont toujours présentes à des concentrations susceptibles de porter atteinte aux prédateurs de niveau trophique supérieur comme le béluga du Saint-Laurent (Section 0.1.2.2). De manière générale, l'exposition aux POP peut causer divers problèmes de santé, tels que des perturbations endocriniennes, des maladies cardiovasculaires, des cancers, du diabète, des anomalies congénitales et des dysfonctionnements du système immunitaire et de la reproduction (Alharbi et al., 2018). La particularité des principaux POP accumulés dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent (c.-à-d., BPC, HCB, DDT, chlordanes, PBDE et PCCC) est leur capacité à perturber la régulation des systèmes endocriniens (p. ex., axes thyroïdiens et stéroïdiens) et reproducteurs des mammifères (Okoro et al., 2017; Pelch et al., 2011; Reijnders et al., 2009; Zhang et al., 2016b, 2016a). De par leur structure chimique très proche des hormones thyroïdiennes, certains BPC et PBDE peuvent imiter ou bloquer leur action, induisant chez les mammifères exposés une toxicité ainsi que divers changements dans les taux d'hormones thyroïdiennes (ATSDR, 2000, 2017). Certains congénères de PBDE comme le BDE-47, ont déjà montré des effets antiandrogéniques et anti-œstrogéniques, provoquant une baisse des niveaux d'œstradiol et de testostérone (effet démasculinisant) chez le rat (Darnerud, 2008 ; Talsness, 2008).

Chez l'homme et le rongeur, il a été démontré que les BPC pouvaient également avoir un effet anti-æstrogénique et anti-androgénique, en impactant les liaisons des hormones avec leurs récepteurs respectifs (ATSDR, 2000 ; Pelch et al., 2011). Du côté des mammifères marins, les concentrations d'HCB et de plusieurs congénères de PBDE et de BPC étaient négativement corrélées à celles des hormones thyroïdiennes T4 et T3 dans le sang de bélugas de Svalbard (Villanger et al., 2011). Ces composés pourraient également interagir soit au niveau des récepteurs hormonaux thyroïdiens, de l'activation des enzymes impliquées dans le métabolisme et l'élimination des hormones thyroïdiennes ou en compétitionnant avec les protéines de transport de ces hormones (Costa et al., 2014; Darnerud, 2008). En effet, chez des orques (Orcinus orca), des bélugas, des phoques communs et annelés (Pusa hispida) de l'ouest et de l'Arctique Canadien, les concentrations de BPC et/ou de PBDE dans leur gras étaient corrélées avec les transcrits de gènes des récepteurs nucléaires hormonaux (c.-à-d., récepteurs des hormones thyroïdiennes α et β , des œstrogènes α et des glucocorticoïdes α) et d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (c.-à-d., récepteur d'aryl d'hydrocarbone et CYP1A1) (Brown et al., 2014 ; Buckman et al., 2011 ; Noël et al., 2014, 2017).

Plusieurs autres POP qui s'accumulent dans les tissus des baleines du Saint-Laurent sont également susceptibles de perturber le système hormonal des mammifères. L'HCB a provoqué une perturbation des glucocorticoïdes (diminution de la corticostérone plasmatique, du nombre de récepteurs glucocorticoïdes hépatiques et de la production de corticostérone surrénalienne) chez des rats dosés par voie orale (Lelli *et al.*, 2007). Une diminution des concentrations sériques de la thyroxine et des récepteurs de la thyroïde (Liu *et al.*, 2011), et un effet antagoniste du récepteur des androgènes (Kelce *et al.*, 1995) ont été observés chez des rats dosés oralement à du *p,p*'-DDE (produit de décomposition du DDT). Seules quelques études semblent indiquer que les PCCC aient un effet perturbateur endocrinien chez les mammifères. Des rats exposés à des

concentrations de 1 g/kg/jour d'un mélange de PCCC ont vu leurs concentrations de T4 baisser dans le sang et celles de TSH augmenter (Wyatt *et al.*, 1993). Plus récemment, des rats dosés à 100 mg/kg/jour d'un mélange de PCCC ont subi une altération des concentrations de TSH, T4 et T3 libres dans le sang et dans le foie (sauf pour la TSH) (Gong *et al.*, 2018). Une étude d'exposition *in vitro* exposant des PCCC à des cellules H295R a également indiqué que certains congénères de PCCC pouvaient induire une perturbation des niveaux d'œstrogènes et de cortisol en induisant l'expression de gènes directement impliqués dans la synthèse des stéroïdes (c.-à-d., *StAR*, *17β-HSD*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP19* et *CYP21*; Zhang *et al.*, 2016b).

En plus de causer des perturbations hormonales, les POP peuvent également provoquer d'autres dérèglements métaboliques comme la modification des profils de certains métabolites⁶ qui sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, les mécanismes d'action associés à ces perturbations restent incertains, et pourraient aussi résulter soit d'une perturbation endocrinienne ou bien d'une autre voie d'action toxique. Plusieurs études montrent que les BPC, HCB et DDE pourraient provoquer une altération des métabolismes du cholestérol, des stéroïdes, de l'acide biliaire et des lipides chez l'humain (Carrizo *et al.*, 2017 ; Eguchi *et al.*, 2017 ; Salihovic *et al.*, 2016). De plus, les BPC pourraient également impacter directement le métabolisme des acides aminés et provoquer un stress oxydatif, induisant une réponse inflammatoire chez l'homme (Eguchi *et al.*, 2017). Similairement, les métabolismes des acides gras, des glucides et des acides aminés ont été perturbés chez des souris exposées 84 jours à 25 $\mu g/kg/jour$ de BDE-209, ce qui selon les auteurs, pourrait être lié à une altération de la

⁶ De manière générale, un métabolite est un composé organique issu du métabolisme qui est directement impliqué dans les processus du développement et de reproduction cellulaire. Des exemples de métabolites sont les acides aminés, les lipides, les sucres et les acides nucléiques.

spermatogenèse par ce contaminant (Eguchi *et al.*, 2016). Enfin, des études *in vivo* (rats) et *in vitro* (cellules HepG2) ont montré qu'une exposition à des PCCC pouvait entraîner des lésions hépatiques, perturber la glycolyse, le métabolisme des acides aminés, le cycle de l'urée et affecter directement le métabolisme des lipides en induisant une dégradation anormale des acides gras (c.-à-d., stimulation de la β -oxydation) (Geng *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017, 2019b ; Wyatt *et al.*, 1993).

0.1.5.2 Les contaminants d'intérêt émergent

Les contaminants d'intérêt émergent sont des produits chimiques, naturels ou fabriqués par l'homme, qui ont déjà été détectés dans divers compartiments environnementaux (ou sont suspectés de l'être), et dont leur toxicité ou leur persistance sont susceptibles de modifier de manière significative le métabolisme d'un être vivant. Bien souvent, le devenir dans l'environnement et la toxicité de ces composés émergents est peu documentée, ce qui rend difficile l'évaluation des problèmes potentiels associés qu'ils pourraient causer. Les interdictions à l'encontre des PBDE à l'international et au Canada ont entraîné l'utilisation de composés alternatifs, communément appelés retardateurs de flamme émergents. Ces derniers englobent des retardateurs de flamme halogénés (RFH) soit récemment mis sur le marché, soit produits depuis plusieurs décennies, mais dont les concentrations dans l'environnement sont devenues préoccupantes à cause d'un accroissement de leur utilisation (Bergman et al., 2012; Covaci et al., 2011; Sverko et al., 2011). Dans cette thèse, une sélection de 10 RFH émergents a été retenue, à savoir : le Chlordène plus (CP), le décabromodiphényléthane (DBDPE), le Déchlorane plus (DP; isomères syn- et anti-DP), les Déchloranes (Dec) 602, 603 et 604, l'hexachlorocyclopentadiène-tribromostyrène (Dec-604 CB), l'hexabromobenzène (HBB) et le pentabromoéthyle benzène (PBEB). Tout comme les POP, ces retardateurs de flamme émergents partagent plusieurs points communs comme leur faculté à être assimilé et à se bioaccumuler dans différents compartiments biologiques, leur persistance et leur prédisposition à être transportés sur de longues distances. Bien qu'aucun de ces composés n'ait déjà été rapporté dans les tissus des baleines de l'estuaire du Saint-Laurent, plusieurs études ont démontré leur faculté à se bioaccumuler dans les organismes. Tous ces contaminants émergents ont déjà été détectés chez des espèces de poissons en Europe, en Amérique du Nord et en Arctique (de Wit *et al.*, 2011 ; Houde *et al.*, 2014 ; Munschy *et al.*, 2011 ; Shen *et al.*, 2014) et des mammifères marins de l'océan Atlantique (Barón *et al.*, 2015a ; Dam *et al.*, 2011 ; de la Torre *et al.*, 2012 ; Law *et al.*, 2013 ; Montie *et al.*, 2010 ; Tomy *et al.*, 2000 ; von der Recke et Vetter, 2007). Pour les deux espèces de mammifères marins étudiées, seul le HBB a été retrouvé chez des petits rorquals du nord de l'Atlantique (Dam *et al.*, 2011) et le Dec-602 chez le béluga de l'Arctique canadien (Shen *et al.*, 2012). Au Canada, ces RFH émergents ont déjà été détectés dans le fleuve Saint-Laurent, suggérant la présence possible de ces composés dans les tissus des bélugas et des petits rorquals du Saint-Laurent. En effet, les BEHTBP, CP, DP, Dec-602, -604 et -604 CB, DBDPE, HBB et PBEB ont été retrouvés dans du foie de brochet et/ou de maskinongé à proximité de Montréal (Houde *et al.*, 2014).

Parmi les composés d'intérêt émergents retenus dans cette thèse, seul le PBEB fait l'objet de restrictions. Le PBEB a été ajouté sur la liste de la convention OSPAR⁷ en 2001, le classant comme persistant, potentiellement bioaccumulable et toxique, obligeant les états membres à arrêter toute production ou tout rejet de ce composé (Covaci *et al.*, 2011). Globalement, il n'existe que très peu d'informations toxicologiques sur les composés émergents sélectionnés, et à notre connaissance, il n'y en a aucune pour les CP, Dec-602, -603 et -604 CB et DBDPE. Pour le DP, des lapins

⁷ Convention ratifiée par 15 états de l'Europe occidentale, ayant pour but de protéger l'environnement marin du Nord-Est de l'océan Atlantique, issue de l'unification de deux autres conventions en 1992, à l'origine de son nom : celles d'Oslo (1972) et de Paris (1974).

exposés à ce composé auraient subi une perte de masse de leurs ovaires (EHSI, 2004). Bien que le HBB ne semble pas perturber le système endocrinien des mammifères (Harju *et al.*, 2008), il pourrait provoquer des effets similaires à son analogue chloré, le HCB, qui peut induire une perturbation des glucocorticoïdes (**Section 0.1.5.1**).

0.2 Problématique

Les baleines de l'estuaire du Saint-Laurent vivent dans un écosystème complexe impacté par l'activité humaine. Ce milieu les expose à une multitude de contaminants organiques et inorganiques, qui, pour la plupart, sont susceptibles de perturber leur système endocrinien et leur métabolisme. Cependant, il n'existe aucune donnée fiable qui permet d'affirmer ce risque potentiel. Afin d'aller plus loin dans l'évaluation des risques associés aux contaminants chez les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent, il est important d'identifier les faits marquants et les lacunes à combler :

- Depuis 2007, aucune nouvelle donnée n'a été publiée sur les tendances temporelles des concentrations des principaux POP (p. ex., BPC, HCB, DDT, PBDE) rapportés chez le béluga du Saint-Laurent
- Les concentrations des composés émergents dans les tissus des baleines du Saint-Laurent sont inconnues
- Récemment, une augmentation de la cause du décès associée à un problème à l'accouchement est en augmentation chez les individus femelles des bélugas du Saint-Laurent, ce qui pourrait être un indicateur de perturbation de leur système endocrinien
- L'impact potentiel des POP perturbateurs endocriniens présents dans les tissus des cétacés du Saint-Laurent n'a jamais été étudié

L'évaluation de l'impact potentiel des POP sur la santé des cétacés contient plusieurs défis à la fois logistiques et analytiques. En effet, l'accessibilité aux échantillons de cétacés sauvages est limitée, et les quantités sont minimes (quelques milligrammes). Cela vient donc limiter le type et le nombre d'analyses qui peuvent être faites. Pour cela, l'utilisation de la métabolomique (**Section 0.4.2**) et d'outils génomiques (**Section 0.4.3**) a été privilégiée, car ils permettent l'acquisition de nombreuses variables biologiques en utilisant seulement une petite quantité de matrices.

0.3 Objectifs de recherche

Le premier objectif de cette thèse était de comparer les concentrations de 35 congénères des PBDE et de 10 RFH émergents mesurés dans le gras de bélugas et petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent, puis dans un second temps d'étudier les tendances temporelles de ces mêmes composés entre 1997 et 2013 dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent. Des échantillons archivés de peau et gras issus de carcasses ont été utilisés pour répondre à cet objectif. Les contaminants ont été extraits du gras et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), puis, à partir de la peau, des analyses d'isotopes stables (δ^{13} C et δ^{15} N) ont été réalisées afin d'étudier l'influence du régime alimentaire et du niveau trophique sur les concentrations adipeuses de RFH.

- Hypothèse A : Les concentrations des RFH sélectionnés sont plus élevées chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent comparativement aux petits rorquals dus à des différences de régime alimentaire et de comportement.
- Hypothèse B : Dues aux récentes interdictions de production et d'utilisation des PBDE au Canada et ailleurs, les concentrations de PBDE suivent une tendance temporelle décroissante dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent, alors que celles des RFH émergents augmentent dans le temps.

Dans un second temps, l'objectif était d'évaluer à partir de biopsies de bélugas mâles et de petits rorquals femelles du Saint-Laurent, les liens entre les concentrations dans le gras de plusieurs organohalogénés (PCB, pesticides organochlorés, PBDE, RFH émergents) et les niveaux dans la peau de transcrits de gènes associés aux principaux systèmes de régulation hormonaux de la stéroïdogenèse (récepteurs des œstrogènes et des glucocorticoïdes, déshydrogénases) et du système thyroïdien (déiodinase, récepteurs thyroïdiens). Pour répondre à cet objectif, des biopsies fraîches de peau et de gras de bélugas et petits rorquals du Saint-Laurent ont été prélevées en 2015, 2016 et 2017. Les contaminants ont été extraits du gras et quantifiés par GC-MS, et les niveaux de transcrits ont été déterminés dans la peau par réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (RT-qPCR).

- Hypothèse C : Les niveaux des transcrits de gènes impliqués dans la régulation du système thyroïdien, des stéroïdes sexuels et du cortisol sont corrélés aux concentrations des organohalogénés aussi bien chez les bélugas que les petits rorquals.
- Hypothèse D : Les corrélations entre les niveaux des transcrits de gènes et des organohalogénés diffèrent entre les bélugas et les petits rorquals dus aux différences de concentrations en organohalogénés dans les tissus de chaque espèce.

Enfin, le troisième objectif était d'examiner les mécanismes de perturbation métabolique d'une sélection de plusieurs contaminants organiques (PCB, organochlorés, PBDE, RFH émergents et PCCC) accumulés dans les tissus de bélugas mâles de l'estuaire du Saint-Laurent. À partir de biopsies de bélugas, les contaminants ont été quantifiés par GC-MS dans le gras, et dans la peau une sélection de métabolites (acides aminés, acides gras, amines biogènes et métabolites énergétiques) a été extraite

et quantifiée par chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS).

- Hypothèse E: Les concentrations des contaminants organiques sont principalement corrélées avec celles des acides gras et des acides aminés d'origine alimentaire, puisque le vecteur de contamination principal des cétacés s'effectue par l'alimentation.
- 0.4 Principaux outils utilisés

0.4.1 Échantillonnage des baleines

Les carcasses échouées représentent un des meilleurs moyens d'accéder à une multitude d'informations biologiques pour les cétacés. Lorsque l'état de décomposition n'est pas trop avancé, les carcasses permettent d'obtenir plusieurs types d'échantillons (p. ex., gras, foie, cerveau, dent et sang), des informations morphologiques et anatomiques (p. ex., longueur, poids et épaisseur du tissu adipeux), le sexe de l'animal, la cause du décès, mais aussi de déterminer précisément l'âge grâce au cristallin de l'œil, aux dents ou aux bouchons de cire du conduit auditif (Godard-Codding et Fossi, 2018). Les échantillons de baleines échouées sont souvent utilisés pour suivre l'évolution temporelle des causes de mortalité (Lair et al., 2016), des concentrations des contaminants dans les tissus adipeux (Lebeuf et al., 2014a) ou de la diète (Lesage, 2014). Cependant, l'accès à des carcasses de baleines est aléatoire et par conséquent, il n'est pas possible d'avoir un contrôle sur le nombre, l'uniformité et la fraîcheur des échantillons. Il faut tout de même souligner que le suivi des carcasses de baleine et plus particulièrement de bélugas au Québec est exceptionnel de par sa durée (c.-à-d., plus de 30 ans) et aussi la quantité de carcasses qui ont pu être échantillonnées. Cela a été rendu possible grâce à un réseau de bénévoles très bien organisé (Réseau d'Urgence Québécois des Mammifères Marins, ainsi qu'à la configuration particulière de l'estuaire qui facilite l'échouage des carcasses le long de ses berges.

L'étude de l'impact des contaminants chez les cétacés requiert l'analyse de marqueurs biologiques (p. ex., hormones, transcrits de gènes, protéines, métabolites) capables de rendre compte des effets toxiques qui peuvent être induits. Cependant, la plupart de ces marqueurs ne peuvent être déterminés qu'à partir d'échantillons frais prélevés sur des animaux vivants. Par exemple, comme les niveaux de transcrits gènes se dégradent rapidement après le décès des animaux, ces derniers ne peuvent être déterminés de manière fiable à partir de carcasses. En écotoxicologie, l'échantillonnage de peau et de gras par biopsie est la technique non létale la moins invasive pour les cétacés. Le principe général consiste à s'approcher entre 5 à 10 m de l'animal lorsqu'il remonte à la surface pour respirer, afin de tirer un projectile à l'aide d'un fusil ou d'une arbalète, qui va permettre l'obtention de quelques grammes de peau et de gras. Par convention, les échantillons sont prélevés sur le flanc émergé de l'animal entre la nageoire dorsale et le pédoncule caudal. L'extrémité de la flèche ou du projectile est équipée d'une pointe cylindrique aiguisée en acier inoxydable (8 x 25 ou 8 x 35 mm dans notre cas), qui va s'enfoncer dans le derme de l'animal et retenir une petite « carotte » de peau et de gras. Plusieurs études ont indiqué que cette technique n'occasionnait aucune perturbation comportementale à court ou à long terme chez les animaux échantillonnés (Noren et Mocklin, 2012). De plus, la blessure occasionnée par la prise de biopsie guérit rapidement (2 à 6 semaines) et aucune complication physiologique lors de la cicatrisation des plaies n'a été rapportée (Noren et Mocklin, 2012). Cette technique d'échantillonnage possède toutefois quelques inconvénients qu'il reste à surmonter. Tout d'abord, selon l'angle d'arrivée du projectile à cause du comportement de l'animal et/ou des conditions météorologiques (p. ex., vent, vagues, pluie), il peut y avoir une certaine irrégularité quant à la quantité de tissu prélevé et la profondeur à laquelle la pointe en acier va s'enfoncer dans le derme. Aussi, les quelques grammes

d'échantillon prélevés à chaque biopsie limitent le nombre d'analyses qui peut être fait pour un même individu. Cela empêche souvent les chercheurs à faire toutes les analyses dans un même tissu, comme dans cette thèse, où les contaminants ont été déterminés dans la couche de gras des biopsies, et les paramètres biologiques (c.-à-d., transcrits de gènes, isotopes stables et métabolites) dans la peau. Le dernier inconvénient de cette technique d'échantillonnage est la difficulté, voire l'impossibilité de déterminer des variables qui peuvent influencer les données écotoxicologiques (p. ex., l'âge, la morphologie et l'état nutritionnel). Par exemple, l'âge est un paramètre essentiel à prendre en considération dans les études écotoxicologiques chez les cétacés, puisque plusieurs variables telles que les concentrations de contaminants ou de marqueurs biologiques peuvent varier selon celui-ci. Enfin, il est important de garder à l'esprit que les analyses faites à partir de biopsies de peau et de gras partent du principe que, les paramètres biologiques mesurés dans ces tissus reflètent en partie l'état de santé global des animaux, ce qui n'a pas encore été démontré.

Lorsque la carcasse est en bon état, le foie, la peau et le gras sont les principaux tissus utilisés. Généralement, les concentrations des contaminants organiques et des hormones sont déterminées à partir du gras, et les autres paramètres biologiques tels que les isotopes stables ou les transcrits de gènes à partir de la peau et/ou du foie. Dans le cas des biopsies, la quantité de tissu étant limitée, les approches omiques sont de plus en plus utilisées puisqu'elles permettent de quantifier plusieurs centaines de marqueurs biochimiques avec seulement quelques milligrammes d'échantillon.

0.4.2 La métabolomique

Les technologies dites « omiques » font référence à un groupe d'outils analytiques de haut débit qui visent à obtenir un maximum d'informations biologiques à un temps donné, pour permettre de déchiffrer la complexité des systèmes étudiés et de mieux prédire leur devenir dans le temps face aux différentes conditions extérieures auxquels

ils sont exposés (Mancia, 2018). Les approches omiques sont nommées selon les composés qui sont analysés (Figure 0.10) et permettent de quantifier avec précision la totalité de celles-ci qui sont présentes dans un échantillon donné (approche non-ciblée). Par exemple, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique permettent de mesurer respectivement les niveaux de transcription de gènes, de protéines et de métabolites. Cependant, les approches omiques non-ciblées requièrent une connaissance approfondie des systèmes biologiques de l'espèce étudiée afin de mieux comprendre et interpréter les résultats générés. Dans certains cas, une approche omique ciblée (c.-à-d., quantification d'une sélection connue de molécules) peut être plus pertinente, soit lorsqu'une hypothèse précise doit être validée ou lorsque les connaissances des processus biologiques de l'espèce étudiée sont limitées. Dans l'ensemble, l'utilisation des technologies omiques est caractérisée par la génération d'une énorme quantité de données qui ne peuvent être interprétées que par l'implication nombreuses disciplines scientifiques (p. ex., biologie, biostatistique, de bioinformatique, biochimie) (Chen et al., 2010a). Bien que les quantités récoltées d'échantillons biologiques de cétacés soient limitées (~1 g), ces outils innovants rendent possible l'acquisition d'une multitude d'informations avec seulement quelques milligrammes de matrice et en une seule analyse. De plus, cela permet de faciliter la compréhension et l'évaluation des modes d'action et des impacts potentiels des contaminants chez ces espèces, en dépit du manque de connaissance sur le fonctionnement du métabolisme des cétacés en général.



Figure. 0.10 Technologies *omiques* classées en fonction des composés ciblés, et identification des principales méthodes d'analyse. L'ADN (*genomics*) est d'abord transcrit en ARN messager (*transcriptomics*) et traduit en protéine (*proteomics*), qui peut catalyser des réactions agissant sur des métabolites (*metabolomics*), des glycoprotéines et des glucides (*glycomics*) et divers lipides (*lipidomics*) (Source: Wu *et al.*, 2011b).

La métabolomique est un domaine de recherche consistant à caractériser la composition en métabolites (molécules polaires endogènes de taille inférieure à 1 kDA) de différents organismes lors de leur interaction avec un environnement, afin d'évaluer les réponses physiologiques associées, par exemple, à l'action de médicaments, aux effets toxiques et aux troubles métaboliques (Bundy *et al.*, 2009 ; Peng *et al.*, 2015). Bien que le métabolome contienne le plus petit nombre de molécules (5 000 métabolites) comparativement au protéome (100 000 protéines) et au génome (20 000 gènes exprimés), les métabolites sont plus diversifiés de par leur structure moléculaire et leurs fonctions biologiques, ce qui rend l'interprétation et la compréhension des résultats générés plus complexe (Mancia, 2018). Il existe deux principales approches (ciblée *vs* non-ciblée) pour déterminer les profils métabolomiques. L'approche ciblée consiste à mesurer un nombre précis de métabolites connus, alors que l'approche non ciblée détermine l'ensemble des métabolites, connus et inconnus, d'un échantillon donné.

0.4.3 Les transcrits de gènes

Les transcrits de gènes ou acides ribonucléiques messagers (ARNm) sont les intermédiaires des gènes pour synthétiser les protéines dont un organisme ou une cellule a besoin. Bien qu'il existe d'autres types d'ARN (p. ex., ribozyme, de transfert, guide non-codant) qui peuvent également être mesurés, ce sont les ARNm qui sont généralement ciblés, car ce sont eux qui contiennent l'information génétique et dont leur expression peut générer des protéines spécifiques. Comme le transcriptome (c.-à-d., ensemble des transcrits de gènes) peut varier avec les conditions environnementales externes, la mesure du niveau de transcription des ARNm est utilisée en écotoxicologie comme potentiel indicateur d'effets liés à une exposition (p. ex., milieu contaminé *vs.* non contaminé).

Comme l'ARN se dégrade très rapidement (en quelques minutes), il est nécessaire d'obtenir des échantillons d'animaux vivants ou fraîchement morts. La détermination des niveaux de transcription des gènes peut s'effectuer, soit d'une manière globale en ayant recourt à des outils transcriptomiques (c.-à-d., puces à ADN, *RNAseq*) qui vont quantifier le transcriptome (ensemble des transcrits de gènes) d'un échantillon, soit en utilisant une approche plus ciblée avec la technique de réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (RT-qPCR). Alors que notre deuxième objectif était d'étudier les effets potentiels des organohalogénés spécifiquement au niveau du système endocrinien, la RT-qPCR était plus adéquate pour mesurer les niveaux de transcription de quelques gènes seulement. De plus, comme cette approche ciblée est communément utilisée en écotoxicologie des mammifères marins depuis quelques

années (Buckman *et al.*, 2011 ; Godard-Codding et Fossi, 2018 ; Noël *et al.*, 2014, 2017), nos résultats étaient plus comparables avec les données similaires précédemment publiées. Les approches non ciblées n'ont pas été utilisées, car pour les puces à ADN, cette technique est de moins en moins utilisée et les séquences des gènes voulus n'étaient pas connues au préalable chez le béluga. Pour le *RNAseq*, le coût analytique était été plus élevé que la RT-qPCR, puis nous n'avions pas la puissance informatique nécessaire ou l'expertise bio-informatique suffisante pour analyser les résultats.

Brièvement, l'approche par RT-qPCR consiste à extraire la quantité totale d'ARN d'un échantillon, à le transformer en ADN complémentaire (ADNc), puis à quantifier le nombre d'amplicons (portion amplifiée d'ADNc définie par un couple d'amorces spécifiques) du gène recherché. Cependant, il faut garder à l'esprit que chaque ARNm produit n'aboutira pas forcément à la formation d'une protéine, et que les niveaux de transcrits de gènes ne sont pas dans tous les cas corrélés au niveau des protéines associées à ce gène (Vogel et Marcotte, 2012). Il est donc idéal de mesurer d'autres marqueurs tels que des protéines ou des métabolites afin de confirmer les résultats des niveaux de transcription obtenus.

0.4.4 Les isotopes stables

Parmi tous les éléments chimiques présents sur terre, plusieurs possèdent des isotopes⁸ qui peuvent être soit instables, c'est-à-dire radioactifs, ou stables. Par exemple, le carbone naturel (C) possède deux isotopes stables : le ¹²C qui représente 98,89% de l'abondance totale de carbone, et 1,11% pour le ¹³C (Fry, 2006). La proportion en

⁸ Des isotopes sont des éléments chimiques homologues qui possèdent un même nombre de protons, mais un nombre différent de neutrons.

isotopes stables d'un animal est principalement déterminée par la composition isotopique de sa nourriture, de l'eau et des gaz qui entrent dans son corps (Newsome *et al.*, 2010). Par conséquent, sa composition alimentaire et son habitat influencent directement sa composition isotopique. De plus, les processus biochimiques et physicochimiques d'un organisme (p. ex., digestion, respiration) peuvent également faire varier ces ratios (Newsome *et al.*, 2010).

En écologie des mammifères marins, les isotopes stables du carbone et de l'azote (N) sont les plus couramment utilisés. Dans le cas de l'azote, les processus de digestion favorisent l'accumulation de l'isotope ¹⁵N. Par conséquent, les proies potentielles des mammifères marins auront un ratio ${}^{15}N/{}^{14}N$ ($\delta^{15}N$) plus faibles. Pour ce qui est du carbone. le ratio ${}^{13}C/{}^{12}C$ ($\delta^{13}C$) varie bien moins que pour celui de l'azote à travers le réseau trophique, mais dépend davantage du type de proie ingéré et/ou du type de producteur primaire qui est à la base du réseau trophique (Michener et Kaufman, 2008). Ainsi, la valeur du δ^{15} N des mammifères marins est utilisée pour déterminer leur position trophique et celle du δ^{13} C permet de déterminer la source et la diversité des proies ingérées ou bien à étudier les changements de régime alimentaire à travers le temps (Dehn et al., 2006; Lesage, 2014). D'autres isotopes comme ceux du soufre (S) sont plus rarement utilisés dans les études impliquant des mammifères marins. Le ratio ${}^{34}S/{}^{32}S$ ($\delta^{34}S$) peut être utilisé en complément à ceux du carbone et de l'azote pour permettre de discriminer si la diète d'un mammifère marin est davantage pélagique/benthique ou terrestre/marine (Connolly et al., 2004; Fry et Chumchal, 2011).

0.5 Plan de thèse

En plus de l'introduction générale, cette thèse par article comprend trois chapitres publiés et une conclusion générale. Chaque chapitre correspond à chacun des trois objectifs énoncés précédemment. Dans le premier chapitre, nous présentons un article publié en 2017 dans la revue Environmental Research, dans lequel nous avons comparé les concentrations dans le gras de PBDE et de RFH émergents entre des carcasses de bélugas et de petits rorquals du Saint-Laurent et de bélugas du Nunavik. Aussi, nous avons analysé les tendances temporelles des mêmes composés dans les carcasses bélugas et petits rorquals du Saint-Laurent entre 1997 et 2013. Le second chapitre correspond à un article publié en 2019 dans la revue Marine Pollution Bulletin et qui rapporte à partir d'échantillons de peau et de gras (biopsies) de bélugas et de petits rorquals du Saint-Laurent des corrélations entre les concentrations de plusieurs contaminants organohalogénés (PCB, pesticides organochlorés et RFH émergents) et les niveaux de transcription de gènes impliqués dans la régulation de plusieurs systèmes hormonaux (thyroïde, œstrogène et cortisol). Le troisième chapitre s'inscrit dans la continuité du second, puisqu'il vise à évaluer l'impact des mêmes contaminants au niveau métabolique chez les bélugas du Saint-Laurent. Cet article publié en 2020 dans la revue Science of the Total Environment, indique notamment que les PCCC, qui représentent la plus grande fraction des POP accumulés dans cette population, étaient corrélés avec plusieurs acides gras, ce qui pourrait résulter d'une perturbation du métabolisme des acides gras par ces contaminants. Les métabolites analysés dans ce chapitre ont également permis de mettre en évidence les disparités abiotiques et écologiques au sein de l'habitat des bélugas du Saint-Laurent.

Pour finir, nous reviendrons brièvement sous forme d'une conclusion générale, sur les principaux résultats issus de cette thèse, et les analyserons en fonction de nos hypothèses initiales. Nous discuterons également des limites des résultats de cette thèse, et terminerons par une énumération de recommandations et pistes de recherche permettant de poursuivre l'évaluation de l'impact de contaminants organohalogénés sur la santé des baleines du Saint-Laurent.

CHAPITRE I

TEMPORAL TRENDS OF PBDES AND EMERGING FLAME RETARDANTS IN BELUGAS FROM THE ST. LAWRENCE ESTUARY (CANADA) AND COMPARISONS WITH MINKE WHALES AND CANADIAN ARCTIC BELUGAS

Antoine E. Simond, Magali Houde, Véronique Lesage, Jonathan Verreault

Manuscrit publié

<u>Année :</u> 2017

Journal : Environmental Research

<u>N° DOI :</u> 10.1016/j.envres.2017.03.058

<u>Conférences :</u> 4 nationales et 2 internationales (2 présentations orales et 4 par affiche)

1.1 Résumé

Une augmentation exponentielle des niveaux d'une classe de retardateurs de flamme halogénés (RFH), les polybromodiphényléthers (PBDE), a été documentée au cours des années 1990 chez des bélugas (Delphinapterus leucas) en voie de disparition de l'estuaire du Saint-Laurent (ESL), dans l'est du Canada. Les récentes interdictions et réglementations mondiales concernant les mélanges de PBDE ont conduit à leur remplacement par des RFH alternatifs (appelés RFH émergents), qui sont de plus en plus fréquemment signalés dans divers compartiments environnementaux. Cependant, les connaissances sur les tendances spatiales et temporelles des PBDE et des RFH émergents chez les cétacés sont limitées, en particulier après les restrictions imposées à l'utilisation de PBDE. Le premier objectif de cette étude était d'étudier la présence de RFH (35 congénères de PBDE et 13 composés émergents) dans le gras de bélugas et de petits rorquals (*Balænoptera acutorostrata*) retrouvés morts dans l'estuaire ou le golfe du Saint-Laurent, ainsi que des bélugas du Nunavik (Arctique canadien) collectés dans le cadre de la chasse de subsistance des Inuits. Un deuxième objectif consistait à étudier les tendances des concentrations de RFH chez les mâles bélugas de l'ESL entre 1997 et 2013. Les PBDE étaient les RFH les plus abondants chez les trois populations de baleines, puis l'hexabromobenzène (HBB), le Chlordène plus (Cplus), le Déchlorane plus (DP) et le Déchlorane 604 Composant B (Dec-604 CB) ont été quantifiés dans la majorité des échantillons de gras. Dans l'ensemble, les concentrations de RFH émergents étaient nettement plus élevées chez les bélugas de l'ESL que chez les deux autres populations de baleines, à l'exception des DP et Dec-604 CB qui étaient à des plus grandes concentrations chez les bélugas de l'Arctique canadien. Aucune tendance significative des concentrations de PBDE dans le gras n'a été observée chez les bélugas de l'ESL au cours de cette période de 17 ans. Cela suggère que les réglementations mondiales sur les PBDE sont trop récentes et que les émissions en continu (p. ex., produits encore en circulation, dépotoirs, effluents municipaux) sont encore trop importantes pour observer des changements de concentrations en PBDE dans l'environnement de ces bélugas. En revanche, les concentrations de HBB et de CPlus chez les bélugas de l'ESL ont légèrement diminué de 1997 à 2013, tandis que les DP ont augmenté jusqu'en 2000 et ont légèrement diminué par la suite. La présence et les variations temporelles des PBDE et de leurs produits de remplacement chez ces cétacés méritent une surveillance continue.

Mots-clés: polybromodiphényléthers; retardateur de flamme halogéné; tendance temporelle; Arctique canadien; baleine à dents; baleine à fanons; Saint-Laurent.

1.2 Abstract

An exponential level increase of the ubiquitous halogenated flame retardant (HFR) class polybrominated diphenyl ether (PBDE) has been documented during the 1990s in endangered belugas (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary (SLE), Eastern Canada. The recent worldwide bans and regulations of PBDE mixtures led to their replacement by alternative HFRs (so-called emerging HFRs) that are increasingly being reported in various environmental compartments. There are, however, limited knowledge on the spatial and temporal trends of PBDEs and emerging HFRs in cetaceans, especially after restrictions on PBDE usage. The first objective of this study was to investigate the occurrence of HFRs (35 PBDE congeners and 13 emerging compounds) in the blubber of belugas and minke whales (*Balænoptera acutorostrata*) found dead in the Estuary or Gulf of St. Lawrence as well as belugas from Nunavik (Canadian Arctic) collected as part of the Inuit subsistence hunt. A second objective was to investigate the trends of HFR concentrations in SLE beluga males between 1997 and 2013. PBDEs were the most abundant HFRs in all three whale populations, while hexabromobenzene (HBB), Chlordene Plus (CPlus), Dechlorane Plus (DP), and Dechlorane 604 Component B (Dec-604 CB) were quantified in the majority of blubber samples. Overall, concentrations of emerging HFRs were notably greater in SLE belugas compared to the two other whale populations, with the exception of DP and Dec-604 CB that were found in greater concentrations in Canadian Arctic belugas. No significant trend in blubber PBDE concentrations was found in SLE belugas during this 17-year period. This suggests that global PBDE regulations are too recent and that continuous emissions (e.g., in-use products, landfills, municipal effluents) are still too important to observe changes in PBDE concentrations in the environment of these belugas. In contrast, concentrations of HBB and CPlus in SLE belugas decreased slightly from 1997 to 2013, while DP increased up until 2000 and decreased slightly thereafter. The occurrence and temporal variations of PBDEs and their replacement products in these cetaceans warrant continuous monitoring.

Keywords: Polybrominated diphenyl ether; halogenated flame retardant; temporal trend; Canadian Arctic; toothed whale; baleen whale; St. Lawrence.

1.3 Introduction

Halogenated flame retardants (HFRs) are industrial chemicals widely used in a range of consumer products (e.g., upholstered furniture, electric and electronic devices, vehicles, *etc.*) to comply with fire safety standards (Mack, 2004). A large number of HFRs are additives (not chemically bound to polymers), and thus can migrate out of polymeric materials to the environment. As a result, some of the most heavily used HFRs, including the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) used in three technical mixtures (i.e., Penta-, Octa-, and Deca-BDE), have become ubiquitous pollutants in ecosystems worldwide. This is of major environmental concern given the bioaccumulative and biomagnifying properties of PBDEs in food webs and their adverse health effects documented in a range of wildlife species (e.g., Kelly *et al.*, 2008 ; Law *et al.*, 2014 ; Mizukawa *et al.*, 2009 ; Toms *et al.*, 2009). Specifically, *in vitro* and

in vivo studies have shown that exposure to PBDEs may be associated with deleterious effects on the endocrine and nervous systems, reproduction, and development in a range of species (e.g., Costa et al., 2014; Yu et al., 2015a). As a result, PBDEs were added to the annex A of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) in 2009 for the Penta- and Octa-BDE technical mixtures (Stockholm Convention, 2009) and in 2017 for Deca-BDE (Stockholm Convention, 2017). Deca-BDE was also regulated in Canada (Canada Gazette, 2015) and in the European Union (European Chemicals Agency, 2014). These global PBDE bans and regulations led to their replacement by alternative HFRs including pentabromoethylbenzene (PBEB), hexabromobenzene (HBB), bis(2-ethylhexyl)-tetrabromophthalate (BEHTBP), octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindan (OBIND), and decabromodiphenylethane (DBDPE). Highly halogenated norbornenes such as syn- and anti-Dechlorane Plus isomers (DP), Dechlorane-602 (Dec-602), Dec-603 and Dec-604 were also suggested as putative alternatives to Deca-BDE (Pakalin et al., 2007). Moreover, two other structurally-related Dechlorane compounds, Chlordene Plus (CPlus) and Dec-604 Component B (Dec-604 CB), have been detected in aquatic organisms (de la Torre et al., 2012; Houde et al., 2014; Shen et al., 2014). To date, no global restriction exists on the production or use of these emerging HFRs. However, DP is currently being evaluated for annexation to the Stockholm Convention (Stockholm Convention, 2020).

A number of studies have reported the environmental occurrence of PBDEs and selected emerging HFRs (e.g., HBB, PBEB, and DP) from the Laurentian Great Lakes and St. Lawrence River basin (Gentes *et al.*, 2012 ; Houde *et al.*, 2014 ; Su *et al.*, 2015 ; Venier *et al.*, 2015), and Arctic regions (de Wit *et al.*, 2010 ; Muir and de Wit, 2010 ; NCP, 2013 ; Vorkamp and Rigét, 2014). Specifically, elevated concentrations of PBDEs were determined between 2004 and 2008 in suspended matters and sediments collected from the St. Lawrence River, with an increase in levels downstream to major urban outfalls (Pelletier and Rondeau, 2013). Elevated tissue concentrations of PBDEs
and selected emerging HFRs (e.g., Dec-604 CB, Dec-602, and CPlus) were also reported in two predatory fish species (Houde *et al.*, 2014) and two gull species occupying high trophic levels (Chen et al., 2012; Gentes *et al.*, 2012) in the St. Lawrence River near the city of Montreal (QC, Canada). Moreover, the St. Lawrence Estuary (SLE) belugas (*Delphinapterus leucas*) were found to exhibit blubber concentrations of PBDEs that were among the greatest documented worldwide (males: 421 ng/g lw; females: 419 ng/g lw) (Lebeuf *et al.*, 2014a). By comparison, notably lower PBDE concentrations (53 ng/g lw) were reported in the liver of Canadian Arctic belugas (McKinney *et al.*, 2006) and blubber of a baleen whale species, the minke whale (*Balænoptera acutorostrata*) (range: 71-126 ng/g lw) from Norway, Greenland, and Iceland (Rotander *et al.*, 2012).

Despite a nearly 40-year hunting ban, the SLE beluga population, comprised of approximately 900 individuals (Mosnier et al., 2015), is not recovering and was listed in 2014 as endangered by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (COSEWIC, 2014b), a status that echoed under the Species at Risk Act in 2017 (DFO, 2017). The lack of recovery of this population may be explained by a number of factors including climate variability and change in prey availability (Plourde *et al.*, 2014), episodic toxic algal blooms (Scarratt et al., 2014), vessel traffic (Lesage et al., 2014a; Ménard et al., 2014), and chronic exposure to environmental contaminants (e.g., PBDEs, PCBs, DDTs, polycyclic aromatic hydrocarbons, mercury, and butyltin) (Lebeuf et al., 2014b; Martineau, 2010; O'Hara et al., 2003). The concentrations of several POPs (i.e., PCBs, DDTs, and HCHs) have decreased significantly in the blubber of SLE belugas over the last 30 years (Lebeuf et al., 2007; Muir et al., 1996). In contrast, blubber PBDE concentrations in SLE belugas increased markedly from 1987 to the late 1990s, and remained stable up until 2007 (Lebeuf et al., 2014a). Similar temporal trends in PBDE concentrations were documented in Great Lakes lake trout (Salvelinus namaycush) in which an increase was observed between 1980 and 2000

(Venier *et al.*, 2015), although followed by a decrease from 2000 up to 2009 (Crimmins *et al.*, 2012). A limited number of studies have investigated the temporal trends of emerging HFRs in the Great Lakes. For instance, levels of several Dechlorane-related compounds were reported to slowly decrease from the 1980s to 2010 in sediments and lake trout from the Great Lakes (Ismail *et al.*, 2009 ; Shen *et al.*, 2011a). Furthermore, HBB, PBEB and DP concentrations were found to decrease steadily in Great Lakes air samples between 2005 and 2013 (Liu et al., 2016b). To our knowledge, temporal trends of emerging HFRs have as yet not been investigated in aquatic species other than fish from the Great Lakes and St. Lawrence River basin - a known hotspot region for these chemicals of high environmental concern.

The objectives of the present study were two-fold. First, the blubber concentrations of HFRs (35 PBDE congeners and 13 emerging compounds) were compared between belugas found dead in the SLE and those of belugas from the eastern Canadian Arctic and minke whales (*Balænoptera acutorostrata*), a baleen whale occurring seasonally in the SLE and Gulf of St. Lawrence and occupying lower trophic levels than belugas (Gavrilchuk *et al.*, 2014 ; Lesage *et al.*, 2001). Second, the temporal trends of HFRs were investigated in the blubber of SLE belugas between 1997 and 2013 (pre- and post-PBDE restriction periods). Ecological factors such as trophic position (determined from stable carbon and nitrogen isotope signature), age and body length were considered in the analyses as these are known to influence the bioaccumulation dynamics of POPs in marine mammals (e.g., Hebert and Weseloh 2006 ; Krahn *et al.*, 2007 ; Lebeuf *et al.*, 2014a ; Reijnders *et al.*, 2009).

1.4 Materials and methods

1.4.1 Study area and sampling

Skin and blubber samples archived by Fisheries and Oceans Canada (DFO) were made available for 51 male belugas and 11 minke whales (six females, one male, and four unsexed individuals) found dead in the SLE and northwestern Gulf of St. Lawrence between 1997 and 2013 (belugas) and 2002 and 2013 (minke whales) (Figure 1.1). In addition, blubber samples from six male belugas harvested in Nunavik waters (Canadian Arctic) in 2011 and 2013 as part of the Inuit subsistence hunt were provided by DFO (Figure 1.1). Because concentrations of POPs in marine mammals differ between males and females due essentially to maternal transfer (e.g., Martineau *et al.*, 1987; Ross et al., 2000), only male SLE belugas were selected to investigate temporal trends. For SLE belugas and minke whales, the skin and blubber samples $(10 \times 10 \text{ cm})$ were collected mid-dorsally at approximately 70% of the body length from the rostrum, on the opposite side to that exposed to the sun in order to minimize the effects related to tissue oxidation (e.g., chemical degradation). Blubber and skin samples of Canadian Arctic belugas were collected from the back. Samples were wrapped in solvent-rinsed aluminum foil and kept in hermetic plastic bags at -20°C until chemical and stable isotope analyses (Sections 1.4.2 and 1.4.3).

The body length of each whale was measured from the rostrum to the notch of the tail fluke, and the carcass state of preservation was classified as good, fair or poor (i.e., codes 2 to 4) according to a scale described by Geraci and Lounsbury (2005). Age was estimated for belugas only by counting the annual growth layers in longitudinal tooth sections according to methods described by Stewart *et al.* (2006). Sex was confirmed genetically for SLE belugas (Bérubé and Palsbøll, 1996) or visually for Canadian Arctic belugas and minke whales based on external morphology of the genitalia region.



Figure 1.1 Map of Eastern Canada showing sites where samples were collected from belugas from the St. Lawrence Estuary (\Box) and the Canadian Arctic (\bullet) as well as from minke whales from the St. Lawrence (\star). A minke whale carcass carried over a long distance by a ship (bow) was found near Montreal.

1.4.2 Chemical analysis

Blubber samples were analyzed for 35 PBDE congeners (**Table A1**) and 13 emerging HFRs (**Table A2**). For each sample, 0.1-0.15 g of blubber was aliquoted from an area corresponding to the core of the blubber layer, equidistant between the skin and the muscle to avoid the most oxidized outer layer of the blubber. Sample extraction and

clean-up was accomplished following methods described by Houde *et al.* (2014). Briefly, blubber aliquots were homogenized with diatomaceous earth (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and spiked with 100 μ L of a 200 ng/mL internal standard solution (BDE-30, BDE-156, ¹³C-BDE-209, and ¹³C-*syn*-DP). Samples were extracted using n-hexane and dichloromethane (50:50 volume ratio) using a pressurized liquid extraction system (Fluid Management Systems, Watertown, MA, USA), and cleaned-up using a PBDE-free acid-basic-neutral silica column followed by a PBDE-free neutral alumina column (Fluid Management Systems). The lipid percentages of each sample were determined gravimetrically. Identification and quantification of target analytes was 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) based on methods described by Gentes *et al.* (2012). The analytical column (15 m × 0.25 mm × 0.10 mm) was a fused-silica DB-5 HT capillary column (J & W Scientific, Brockville, ON, Canada).

Quality control and assurance procedures included analyses of procedural method blanks, duplicate blubber samples and standard reference materials (SRM; NIST 1945 Whale Blubber) for each batch of ten samples. Mean (\pm SEM) recoveries of spiked internal standards in samples were as follows: BDE-30 (70.4 \pm 21.5%), BDE-156 (96.1 \pm 10.5%), ¹³C-BDE-209 (55.4 \pm 20.2%) and ¹³C-syn-DP (96.8 \pm 11.7%). Concentrations of the five PBDE congeners in SRM (n = 4) showed less than 16.4% variation from the certified values. Method limits of detection (MLODs; defined as signal to noise ratio S/N = 3) and method limits of quantification (MLOQs; minimum amount of analyte producing a peak with S/N = 10) were based on replicate analyses (n = 8) of matrix samples spiked at a concentrations are reported in ng/g lipid weight (lw).

1.4.3 Stable isotope analysis

Skin samples were analyzed for stable carbon (C) and nitrogen (N) isotopes. Two different laboratories conducted the analyses as 40% of samples have been previously analyzed as part of a previous study. Specifically, a series of samples (n = 25) was analyzed using a continuous-flow stable isotope MS coupled to a Carlo Erba elemental analyzer (CHNS-O EA-1108) at the Environmental Isotope Laboratory, University of Waterloo (Waterloo, ON, Canada) (Lesage *et al.*, 2010). The remaining samples (n = 38) were analyzed at the Research Centre for Geochemistry and Geodynamics (GEOTOP) laboratory, Université du Québec à Montréal (see below).

For each sample analyzed in the GEOTOP laboratory, a longitudinal section of the skin (1 g) was aliquoted and the oxidized outer layers were removed using a scalpel. Skin samples were then freeze-dried, cut in small pieces, and homogenized using an agate mortar. The skin homogenate sample was divided into two aliquots in which one was lipid-extracted. Lipid extraction was performed using methanol and chloroform (50:50 volume ratio) following methods by Post and Parkinson (2001) with minor changes. The modification to this method consisted of a 10 min sonication of the skin homogenate sample immersed in pre-heated methanol-chloroform solution. Each sample was passed through a Whatman[®] glass microfiber filter (1.2 μ m) and rinsed with 10 mL of 0.9% saline solution. Filters were dried overnight in an aluminum cup at room temperature under a fume hood. This procedure was repeated twice for the most lipid-rich samples. Bulk and lipid-extracted samples $(0.9 \pm 0.1 \text{ mg})$ were weighted in tin cups and analyzed using a continuous flow isotope ratio MS (IsoprimeTM, Isoprime 100, Cheadle, UK) coupled to an elementary analyzer (Vario MicroCube, Elementar, Hanu, Germany). Isotope ratios were expressed in delta notation (δ) in per mil (‰) relative to international reference materials (i.e., VPDB for δ^{13} C and AIR for δ^{15} N) according to the equation: $\delta X = [(Rsample / Rstandard) - 1] \times 1000$, where X denoted either ¹³C or ¹⁵N, and R represented the isotope ratio of the heavier over the lighter isotope (i.e., ${}^{13}C/{}^{12}C$ or ${}^{15}N/{}^{14}N$). For each batch, two internal reference materials (i.e., urea and dogfish muscle DORM-2; normalized using the NBS19-LSVEC and IAEA-N1, N2 and N3 scales, respectively) were used to normalize the data ($\delta^{13}C = -42.16\%$ and -11.85%; $\delta^{15}N = -0.22\%$ and +14.36%). Calibration accuracy was further assured using a third internal reference material (i.e., leucine) ($\delta^{13}C = -28.75\%$; $\delta^{15}N = -0.06\%$). Quality assurance and control data for samples analyzed at the University of Waterloo can be found in Lesage *et al.* (2010).

The reproducibility of methods between the two laboratories was verified using two skin samples (lipid-extracted and bulk) previously analyzed by Lesage *et al.* (2010) that were reanalyzed in the GEOTOP laboratory. Bulk and lipid-extracted δ^{13} C and δ^{15} N values obtained from these two laboratories were highly similar (**Table A3**). Specifically, mean deviation between the two laboratories was $0.2 \pm 0.1\%$ and $0.2 \pm 0.2\%$ for δ^{13} C and δ^{15} N, respectively, and thus within the analytical error observed for replicate samples. Due to the depletion of lipids in ¹³C and inter-individual variations in extractable lipid contents (**Table 1.1**), the δ^{13} C values were used from the lipid-extracted skin samples (Yurkowski *et al.*, 2014), while bulk samples were used for δ^{15} N.

1.4.4 Statistical analyses

The Shapiro-Wilk and Bartlett's tests were used to test the normality and homogeneity of variances for each variable (i.e., age, stable isotope ratio, body length, and HFR concentration). Variables that deviated from the normal distribution even after transformation (e.g., log) were analyzed using non-parametric tests (see below). Outliers were identified using the Bonferroni Outlier test, and were excluded from all analyses. Differences in stable isotope ratios were tested using the analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's honest significant difference (HSD) post-hoc test for pairwise comparisons.

Temporal trends in ages, stable isotope ratios, body lengths, and HFR concentrations were examined using Spearman's rank correlations for SLE beluga males only. Generalized Additive Models (GAMs) using a linear time trend and a spline effect with five degrees of freedom for HFRs and four degrees of freedom for other variables (i.e., age, body length and stable isotope ratio) were also used to detect non-linear trends. GAMs are flexible predictor functions that may contribute to uncover hidden patterns in the dataset while avoiding over-fitting through predictor function regularization (Larsen, 2015). HFR concentrations that were below the MLOQs were replaced in the GAMs with a median MLOQ of 0.01 ng/g lw All statistical analyses were carried out using R version 3.2 (R Core Team, 2015, Vienna, Austria), with the exception of GAMs, which were fitted using SAS/STAT 13.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Results were considered significant when p was ≤ 0.05 and tendencies to be significant when 0.05 .

1.5 Results

1.5.1 Biological variables and stable isotopes

There were no young individual in the SLE and Canadian Arctic beluga sample, with all individuals being 8 years or older (**Table 1.1**). Body length was unavailable for five Canadian Arctic belugas and four minke whales (**Table 1.1**). The three whale populations exhibited different $\delta^{15}N$ (F(2,60) = 27.5, p < 0.001) and $\delta^{13}C$ values (F(2,60) = 63.6, p < 0.001). Post-hoc comparisons showed that belugas from the SLE and the Canadian Arctic had similar skin $\delta^{15}N$ values (p = 0.14), and were enriched in ¹⁵N compared to minke whales by 3.3‰ and 2.4‰, respectively (both p < 0.001) (**Figure A1 and Table 1.1**). While Canadian Arctic belugas and minke whales had similar skin $\delta^{13}C$ (p = 0.74), they showed depletion in ¹³C relative to SLE belugas corresponding to 3.1‰ and 2.7‰, respectively. No correlation was found between skin δ^{13} C or δ^{15} N values, and ages or body lengths in SLE belugas ($0.12 \le p \le 0.90$), and these variables were not correlated with years (1997-2013) in this population ($0.59 \le p \le 0.95$).

Table 1.1 Mean \pm SEM (range) of biological variables and δ^{13} C and δ^{15} N in SLE and Canadian Arctic belugas as well as minke whales from the St. Lawrence.

	SLE belugas	Minke whales	Canadian Arctic belugas
	n = 51 1997-2013	n = 11 2002-2013	n = 6 2011-2013
Age (year)	38.4 ± 2.0 (8 - 65)	n.a.	26.3 ± 5.2 (10 - 48)
Body length (cm)	$\begin{array}{c} 412 \pm 3.92 \\ (300 - 460) \end{array}$	632 ± 26.8 $(487 - 780)^{b}$	376°
Carcass status ^a	3.0 ± 0.1 $(2 - 4)^{c}$	$3.0 \pm 0.2 \ (2-4)^d$	2.0 ± 0.0 (2)
Blubber lipid content (%)	86.2 ± 2.74 (3.50 - 100)	81.7 ± 1.76 (72.0 - 92.0)	97.3 ± 1.78 (89.0 - 100)
$\delta^{15}N_{bulk}$ (‰)	$\begin{array}{c} 16.7 \pm 0.2 \\ (15.0 - 19.5) \end{array}$	$\begin{array}{c} 13.3\pm 0.4 \\ (11.3-14.7)^{b} \end{array}$	$\begin{array}{c} 15.7\pm 0.4 \\ (15.0-17.5) \end{array}$
$\delta^{13}C_{lipid-extracted}$ (‰)	-15.8 ± 0.1 (-18.013.8)	-18.4 ± 0.2 $(-19.118.0)^{b}$	-18.9 ± 0.2 (-19.518.1)

n.a.: Not available

^a Classified as good (2), fair (3) or poor (4) according to a scale described by Geraci and Lounsbury (2005).

^b Not determined for four individuals.

^c Not determined for five individuals.

^d Not determined for one individual.

1.5.2 HFR concentrations

The preservation state of SLE beluga and minke whale carcasses (**Table 1.1**) was not correlated with blubber concentrations of any HFRs ($0.06 \le p \le 0.87$). For the three whale populations, Σ_{35} PBDE contributed to approximately 97% of the sum of all HFRs

screened in this study. Penta-BDE represented the greatest percent contribution to Σ_{35} PBDE concentrations (i.e., 68.3-94.5%), followed by Octa-BDE (1.2-14.5%) and Deca-BDE (0-3.8%) (**Table A4**). The five most abundant PBDE congeners quantified in blubber of all whale populations were in decreasing order: BDE-47, -99, 100, -119 and -154, which are all major components in Penta-BDE (La Guardia *et al.*, 2006).

Among the 11 targeted emerging HFRs, BEHTBP, OBIND, DBDPE, PBT, Dec-603 and Dec-604 were not detected in any blubber samples. CPlus was the most abundant emerging HFRs in SLE beluga blubber, followed in decreasing order by HBB, Dec-602, PBEB, Dec-604 CB, and DP (**Table A5**). Comparatively, the most dominant HFRs were HBB followed by CPlus in minke whales (**Table A6**), and DP in Canadian Arctic belugas (**Table A7**). The accumulation patterns of *syn-* and *anti-DP* isomers were examined in the three populations using ratios of *anti-DP* to ΣDP concentrations (*f*_{anti}), and are provided in Supplementary Material (**Tables A5** through A7).

Blubber Σ_{35} PBDE concentrations were positively correlated with age in SLE belugas (*rho* = 0.28, *p* = 0.05), a pattern also observed for concentrations of CPlus (*rho* = 0.53, *p* < 0.001), PBEB (*rho* = 0.34, *p* = 0.02), HBB (*rho* = 0.29, *p* = 0.05), and Dec-602 (*rho* = 0.34, *p* = 0.02). Σ_{35} PBDE concentrations also positively correlated with age in belugas from the Canadian Arctic (*rho* = 0.94, *p* = 0.005). Additionally, skin δ^{15} N values were positively associated with concentrations of Σ_{35} PBDE (*rho* = 0.34, *p* = 0.02), PBEB (*rho* = 0.30, *p* = 0.03), CPlus (*rho* = 0.37, *p* = 0.01), Dec-602 (*rho* = 0.30, *p* = 0.03), and Dec-604 CB (*rho* = 0.30, *p* = 0.04) in SLE belugas, but not in belugas from the Canadian Arctic nor in minke whales ($0.06 \le p \le 0.96$). HFR concentrations did not vary according to body length or δ^{13} C in any whale populations ($0.10 \le p \le 0.98$).

Table 1.2 Mean \pm SEM (range) concentrations (ng/g lw) of PBDEs and major emerging HFRs determined in blubber of belugas and minke whales from the St. Lawrence Estuary and Canadian Arctic belugas collected in 2013 (i.e., the only common sampling year for the three populations).

	SLE belugas	Minke whales	Canadian Arctic belugas	
	n = 4 (males)	n = 3 (unsexed individuals)	n = 3 (males)	
Blubber lipid content (%)	93.3 ± 3.07 (87 – 99)	88.0 ± 2.31 (84 – 92)	96.3 ± 3.67 (89 – 100)	
Σ_{35} PBDE ^{<i>a</i>}	1,068 ± 138 (666 – 1,287)	257 ± 11.6 (244 – 280)	$276 \pm 14.4 \ (247 - 293)$	
HBB	$12.3 \pm 2.28 (8.91 - 18.6)$	$8.03 \pm 1.98 (5.87 - 12.0)$	$2.63 \pm 0.64 (1.84 - 3.90)$	
PBEB	$3.09 \pm 1.29(0.94 - 6.58)$	$0.34 \pm 0.06 (0.22 - 0.43)$	$0.69 \pm 0.20 (0.40 - 1.07)$	
CPlus	$7.61 \pm 5.09 \ (0.28 - 22.1)$	$2.00 \pm 1.62 \ (0.27 - 5.23)$	< MLOD	
Dec-602	$3.58 \pm 1.83 \ (0.22 - 7.87)$	$0.62 \pm 0.51 \ (0.11 - 1.65)$	< MLOD	
Dec-604 CB	$0.39 \pm 0.17 (< MLOD -$	0.06 ± 0.06 (< MLOD –	$1.06 \pm 0.12 \ (0.83 - 1.23)$	
	0.70)	0.17)		
ΣDP^b	$0.44 \pm 0.12 \; (0.24 - 0.74)$	$0.31 \pm 0.06 \ (0.22 - 0.42)$	$1.28\pm 0.15\;(0.97-1.45)$	
^a Sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, 138, -139, -				

140, -153, -154, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -205, -206, -207, -208, and -209. Following congeners were not detected in any samples: BDE-15, -71, -171, -180, -191, and -205.

^b Sum of *syn*- and *anti*-DP.

HFR concentrations were compared between the three whale populations using samples from 2013, which was the only common sampling year in our sample. However, due to low sample sizes for that particular year, no statistical comparison was conducted and thus a qualitative description is provided. Σ_{35} PBDE concentrations in SLE belugas were approximately 4-fold greater compared to those of minke whales and Canadian Arctic belugas (**Table 1.2 and Figure 1.2**). Penta- and Octa-BDE concentrations were also greater in SLE belugas compared to the other two populations (**Table A4**). Interestingly, Deca-BDE concentrations and their percent contributions to Σ_{35} PBDE were more elevated (i.e., up to 80% greater) in Canadian Arctic belugas than those of the other two populations (**Table A4**). Overall, concentrations of emerging HFRs were greater in SLE belugas compared to belugas from the Canadian Arctic and minke whales from the St. Lawrence, with the exception of Dec-604 CB and DP that were comparatively more abundant in Canadian Arctic belugas (**Figure 1.2 and Table 1.2**). This latter population exhibited the lowest f_{anti} (0.25 ± 0.03), followed by SLE belugas (0.43 ± 0.02) and minke whales (0.50 ± 0.18).



Figure 1.2 Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g lw) of A) Σ_{35} PBDE, B) HBB, C) CPlus, and D) Σ DP in blubber of St. Lawrence belugas (n = 4) and minke whales (n = 3), and Canadian Arctic belugas (n = 3) collected in 2013. *n.d.*: Not detected.

1.5.3 Temporal trends of HFRs in SLE belugas

Blubber concentrations of Σ_{35} PBDE (**Figure 1.3**) as well as Penta-, Octa- and Deca-BDE mixtures did not vary significantly over the 1997-2013 period in SLE belugas ($0.25 \le p \le 0.92$). In contrast, concentrations of CPlus (non-linear trend; p = 0.001) and HBB (rho = -0.29, p = 0.04) decreased significantly over this same period (**Figure 1.3**). Moreover, blubber Σ DP concentrations increased significantly (p < 0.001) from 1997 to 2003, and declined weakly thereafter (**Figure 1.3**). No significant trend was observed for other HFRs in SLE belugas ($0.12 \le p \le 0.60$).



Figure 1.3 Concentrations (ng/g lw) of A) Σ_{35} PBDE, B) HBB, C) CPlus, and D) Σ DP in blubber of male St. Lawrence Estuary belugas sampled between 1997 and 2013 (actual sampling dates were

used). Significant linear and spline trends, and credibility intervals (95%) of trends estimated with GAMs are represented by a solid and a dashed line, respectively. Raw data are shown on the graphs while trend lines are fitted to log-transformed concentrations.

1.6 Discussion

This study confirmed higher exposure of SLE belugas to PBDEs compared to St. Lawrence minke whales and Canadian Arctic belugas, and further showed for the first time that a series of emerging HFRs of potential health concern are bioaccumulative in blubber of this endangered population. Moreover, the present study showed that blubber concentrations of PBDEs have remained stable in SLE belugas between 1997 and 2013, a period during which concentrations of HBB, CPlus and DP exhibited overall declines.

1.6.1 HFR concentrations

 Σ_{35} PBDE concentrations in the blubber of SLE belugas were within the same range as those reported previously in this population for samples collected between 1987 and 2007 (Lebeuf *et al.*, 2014a ; McKinney *et al.*, 2006). SLE belugas are to our knowledge the second most exposed Canadian marine mammal population to PBDEs after southern resident killer whales (*Orcinus orca*) residing in waters off British Columbia (range: 680-15,000 ng/g lw; Krahn *et al.*, 2007, 2009). Greater Σ PBDE concentrations have also been reported in blubber of other toothed whales living close to denselypopulated areas, for example, Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Hong-Kong area (range: 691-41,900 ng/g lw; Zhu *et al.*, 2014) and bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Charleston region (South Carolina, USA) (range: 1,711-13,200 ng/g lw; Fair *et al.*, 2010).

Blubber concentrations of Σ PBDE reported in this study for Canadian Arctic belugas were comparable to those reported for belugas from Svalbard (Norwegian Arctic) (range: 161-314 ng/g lw; Wolkers et al., 2004) and were in general greater than those found in other beluga populations from the Canadian Arctic (i.e., Eastern Hudson Bay, Ungava Bay, Cumberland Sound, and Beaufort Sea) (range: 1.29-160 ng/g lw; Alaee et al., 1999; NCP, 2013; Stern and Ikonomou, 2000b, 2000a, 2001; Tomy, 2014) and Alaska (range: 4.33-45.6 ng/g lw; Hoguet et al., 2013), or in other marine mammals from the Canadian Arctic including ringed seals (Pusa hispida) (range: 6-28.8 ng/g lw; Houde et al., 2017) and narwhals (Monodon monoceros) (18 ng/g lw; Tomy et al., 2008b). The greater blubber concentrations of PBDEs that accumulated in Canadian Arctic belugas from the present study relative to previous Arctic beluga studies suggest continuous inputs of PBDEs to the Arctic, and further support marked geographical differences within circumpolar regions. As such, a recent study on ringed seal populations across the Canadian Arctic indicated that blubber PBDE concentrations were greater in more southern populations (e.g., Hudson Bay and Northern Newfoundland) compared to those from the high Arctic (Houde et al., 2017). McKinney et al. (2011) observed similar patterns for Canadian Arctic polar bear (Ursus maritimus) populations and suggested that the greater PBDE concentrations determined in individuals from Hudson Bay were likely associated with closer proximity to North American sources. These findings were suggestive of important atmospheric influxes of PBDEs through prevailing westerly winds from southern industrialized areas such as the Great Lakes region (Schichtel and Husar, 2001). However, Tomy (2014) reported PBDE concentrations (26.9 ng/g lw) in the blubber of belugas harvested near Sanikiluaq (Belcher Islands, SE Hudson Bay; 2013) that were nearly 7-fold lower than levels from the Canadian Arctic belugas collected as part of the present study along the coast of eastern Hudson Bay. Nevertheless, genetic and satellite telemetry studies indicated that belugas in these areas may not be exposed to the same prey communities as they probably belong to different stocks (Turgeon *et al.*,

2012), and exhibit different migratory patterns (Bailleul *et al.*, 2012; Luque and Ferguson, 2010).

Only a few studies have reported the occurrence of PBDEs in mysticetes. Overall, the blubber PBDE concentrations in St. Lawrence minke whales were approximately 1.5to 7-fold greater than those reported for minke whale populations from Korea (Moon et al., 2010), Japan (Marsh et al., 2005), United-Kingdom (Law et al., 2005), and Greenland, Iceland and Norway (Rotander et al., 2012; Sonne et al., 2014). Minke and humpback whales (Megaptera novaeangliae) were reported to be the most PBDEexposed baleen whales in the North Atlantic (Alonso *et al.*, 2014), which is most likely due to a greater contribution of higher-trophic level prey species in their diet (e.g., pelagic fish) compared to other baleen whale species or populations that may rely more heavily on zooplankton (Folkow et al., 2014; Gavrilchuk et al., 2014; Perrin and Brownell Jr, 2009; Todd, 1997). Differences in blubber PBDE concentrations between minke whales and SLE belugas were likely explained by the higher trophic position of belugas. SLE belugas exhibited δ^{15} N values 3.4‰ higher than minke whales, which represent more than a full trophic level (Lesage et al., 2001; Newsome et al., 2010). Moreover, SLE belugas are year-round residents to the St. Lawrence system as opposed to minke whales that are seasonal migrants to this region (Lesage et al., 2007). Indeed, it has been observed that the winter breeding ground of Northwest Atlantic minke whales is located in Caribbean waters (Risch *et al.*, 2014). As a result, over a year, minke whales are not exposed to the same prey communities as SLE belugas.

The large predominance of BDE-47, -99, -100, -154 and -153 determined in belugas and minke whales in this study is consistent with general PBDE profiles reported for other marine mammals (Elfes *et al.*, 2010 ; Shaw *et al.*, 2012 ; Tomy *et al.*, 2008b) and the extensive use of Penta- and Octa-BDE mixtures in North America during the last four decades (Kefeni *et al.*, 2011 ; Ma *et al.*, 2013). In contrast, BDE-209 is less

frequently detected in cetacean samples, a pattern also observed in the present study for the three whale populations. For instance, BDE-209 was not previously detected in the liver of SLE belugas (Raach *et al.*, 2011) or in the brain of five dolphin species from the Mediterranean Sea (Barón *et al.*, 2015b), which adds further support to the very low bioavailability of BDE-209 for cetaceans and other aquatic organisms in general. By comparison, this fully-brominated congener is commonly reported at elevated concentrations in sediments across North America (range: 19-242 ng/g dw; Hale *et al.*, 2003 ; Song et al., 2005), including the St. Lawrence River (range: 2.40-4.05 ng/g dw; Pelletier and Rondeau, 2013).

Limited information is available on PBDE-replacement products in the Canadian environment, including cetaceans (Shen et al., 2012; Tomy et al., 2008a). Dechloranerelated compounds (i.e., Dec-602, Dec-604 CB, CPlus, and DP) represented the bulk of emerging HFR concentrations documented in this study for the three whale populations. To date, only four studies have reported the occurrence of dechloranes in the blubber of cetaceans (Barón et al., 2015a; de la Torre et al., 2012; Shen et al., 2012 ; Zhu et al., 2014). **DP** concentrations in present whale populations were lower than those reported in delphinid species during the same period (2000s) from Spain (range: 2.67-13.5 ng/g lw; Barón et al., 2015a) and China (range: 1.74-63.7 ng/g lw; Zhu et al., 2014). The occurrence of DP in present Canadian Arctic belugas is consistent with studies that reported high detection frequencies and concentrations of DP in Arctic air and seawater (Möller et al., 2010; Xiao et al., 2012). Nevertheless, the greater DP concentrations determined in Canadian Arctic belugas relative to St. Lawrence whales could not be explained by atmospheric concentrations, which were reported to be far greater in the Great Lakes region (ΣDP : 34 pg/m³; Hoh *et al.*, 2006) compared to the Canadian sub-Arctic (ΣDP : 0.25 pg/m³; Yu *et al.*, 2015b) or Eastern Greenland (ΣDP : 0.50 pg/m³; Möller *et al.*, 2010). Calculation of DP isomer ratios to their sums (f_{anti}) in environmental matrices may provide information on the metabolism

and bioaccumulation behavior of this isomeric mixture. The f_{anti} typically ranges between 0.65 and 0.75 in technical mixtures (Qi et al., 2010; Qiu et al., 2007; Sverko et al., 2011; Gagné and Verreault, unpublished data); however, several studies have reported that this ratio is species- and tissue-specific. It has been suggested that *syn*-DP has a greater potential for bioaccumulation, or is metabolized more slowly than the anti isomer (Sverko et al., 2011; Xian et al., 2011). Values of fanti in present St. Lawrence and Canadian Arctic whale blubber were in general lower than those determined in technical mixtures; a result similar to what was reported in the blubber of three dolphin species from Southern European waters (Barón et al., 2015a). However, in the liver of Brazilian Franciscana dolphins (Pontoporia blainvillei), fanti levels were found to be comparable to those of the DP technical mixture (de la Torre et al., 2012). Zhu et al. (2014) suggested that the differences in f_{anti} observed between cetacean species from a similar trophic level may be attributed to diet or differences in habitat and metabolism, making any interpretations cumbersome. As such, the higher f_{anti} values in minke whales compared to belugas were consistent with reports suggesting that f_{anti} decreases with increasing trophic levels (Wu et al., 2010). Stereoselection during atmospheric transport may also result in geographical differences in f_{anti} values that were found to be more comparable in technical mixtures to air of industrial regions and much lower in Arctic regions (Möller et al., 2010, 2011; Xiao et al., 2012). This could also explain why f_{anti} values were greater in belugas and minke whales from the St. Lawrence compared to Canadian Arctic belugas.

CPlus was the most abundant dechlorane-related compound in the two whale populations from the St. Lawrence with the greatest levels determined in SLE belugas. This compound was also quantifiable at very low level in one Canadian Arctic beluga (0.49 ng/g lw). To our knowledge, this is the first report of CPlus in Arctic biota, suggesting that this compound may be prone to long-range transport. Previous studies have reported the occurrence of CPlus in lake trout from the Great Lakes (Shen *et al.*,

2011a), two predatory fish species from the St. Lawrence river (Houde *et al.*, 2014) and liver of Franciscana dolphins from Brazil (de la Torre *et al.*, 2012). CPlus was reported to be patented by OxyChem as a flame retardant and was detected as an impurity (<1%) in Chlordane and Chlordene technical mixtures, suggesting that emissions of CPlus may also be related to the use of these now banned organochlorine pesticide mixtures (Shen *et al.*, 2011b). Moreover, North American sources of dechloranes might originate from manufacturing plants along the Niagara River, upstream of Lake Ontario (Shen *et al.*, 2011b).

Dec-602 was also frequently detected in SLE belugas and was within the concentration range reported in blubber of bottlenose dolphins from the Mediterranean Sea (Barón *et al.*, 2015a). Furthermore, concentrations of Dec-602 were lower in St. Lawrence minke whales, but comparable to those reported in the liver of Franciscana dolphins from Brazil (de la Torre *et al.*, 2012). Although no Dec-602 was detected in Canadian Arctic belugas from the present study, low concentrations (8-300 pg/g lw) were documented in the blubber of Beaufort Sea belugas (Hendrickson Island) (Shen *et al.*, 2012), demonstrating its potential for bioaccumulation in Canadian Arctic wildlife.

Dec-604 CB was one of the least abundant halogenated norbornenes determined in SLE belugas and minke whales from the present study. This compound was recently detected in Great Lakes fish and was suggested as a putative debrominated product (via photodegradation) of Dec-604 (Shen *et al.*, 2014). These authors also suggested that this compound might have areas of applications other than a flame retardant. Surprisingly, and consistently with blubber DP concentrations, Dec-604 CB was found at greater concentrations in Canadian Arctic belugas than in St. Lawrence whale species. Nevertheless, the detection frequency of Dec-604 CB was low in minke whales (four out of 11 individuals), making any level comparisons difficult to interpret.

HBB and PBEB were the only brominated emerging compounds detected in belugas and minke whales from the present study, largely dominated by HBB. In a polar bear study, these two HFRs were detected in a few fat samples, although below the limits for quantification (McKinney *et al.*, 2011). To our knowledge, the present study is the first report of HBB and PBEB in an Arctic cetacean. HBB has previously been reported in the blubber of minke and pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*) from the Eastern Atlantic as well as in five dolphin species from the Alboran Sea at concentrations (1.56-13.9 ng/g lw) (Barón *et al.*, 2015a; Dam *et al.*, 2011) that were within the same range as those reported in present St. Lawrence whale populations. In general, concentrations of PBEB in Canadian Arctic belugas and minke whales were low compared to those of SLE belugas. These findings were consistent with blubber levels in right whales (*Eubalaena glacialis*) from the Gulf of Maine (range: 0.11-6.68 ng/g lw; Montie *et al.*, 2010) and harbour porpoises (*Phocæna phocæna*) from the U.K. (range: 0.34-36.5 ng/g lw; Law *et al.*, 2013).

1.6.2 Temporal trends of HFRs in SLE beluga males

Because it has been widely demonstrated that age and sex may influence temporal trends of POPs in marine mammals (e.g., Reijnders *et al.*, 2009), only adult male SLE belugas were selected to examine the temporal variations of HFRs. In this population, no association was found between blubber HFR concentrations and age, body length, carcass state, and trophic position (i.e., δ^{13} C and δ^{15} N) between 1997 and 2013. This suggests that these variables had limited (if any) influence on blubber HFR concentrations in SLE belugas.

No significant temporal trend in blubber Σ_{35} PBDE concentrations was found in SLE belugas over this 17-year period. In a previous study where SLE belugas found dead also were investigated, Lebeuf *et al.* (2014a) reported a significant increase in blubber Σ PBDE concentrations between 1987 and 1997, followed by a plateau up to 2007.

Results from the present study concur with those of Lebeuf et al. (2014a) and indicate that the plateau observed for PBDEs between 1997 and 2007 prevailed up until at least 2013. A study on lake trout collected from the Great Lakes between 1980 and 2009 showed that Σ PBDE concentrations decreased slowly since the early 2000s (Crimmins et al., 2012; Ismail et al., 2009). Because belugas are long-lived animals with relatively low metabolic and excretory capabilities for xenobiotics in general (Letcher et al., 2000; Tanabe, 2002), potential decrease in tissue PBDE concentrations might take longer than other organisms such as fish. In addition, blubber has a lower metabolic activity compared to, for example, perfused tissues such as liver. By comparison, Muir et al. (1996) observed a significant decline in blubber PCB concentrations in SLE belugas between 1982 and 1994, i.e., less than 10 years after the first Canadian regulations on this POP (1977). Since this first report, PCB concentrations have shown continuous decline in SLE beluga blubber, although they still remain at elevated levels (Lebeuf et al., 2014a). Hickie et al. (2000) estimated that it would require a minimum of seven years before statistically significant changes in PCB concentrations are detected in adult male SLE belugas. Despite worldwide restrictions on PBDE mixtures over the last decade, these findings suggest that SLE belugas are exposed to continuous inputs of these chemicals from PBDE-containing products that are in use or have entered the waste phase (Abbasi et al., 2015). In fact, Abbasi et al. (2015) estimated that the stock of commercial in-use products containing Penta- and Octa-BDE mixtures peaked in 2004 and might still be in the market by 2020. Moreover, approximately 60% of the stock of PBDEs in 2014 (~70,000 tons), of which 95% is composed of Deca-BDE, will remain in the use phase up to 2020. Recycling plastics or electronic products that contain PBDEs may also represent a significant continuous source of PBDEs to the environment in the years to come (Chen et al., 2010b). In this context, present results suggest that it might take several more years before a significant decline in PBDE concentrations is observed in SLE belugas.

Blubber concentrations of Dec-602, Dec-604 CB, and PBEB did not vary over the 17year study period in SLE belugas. This is consistent with the absence of trends between 1979 and 2004 for PBEB in lake trout from Lake Ontario (Ismail *et al.*, 2009). PBEB was used as HFR during the 1970s and 1980s, and its production decreased by 1986 (Hoh *et al.*, 2005). No recent information on the production volume of PBEB is available (OSPAR Commission, 2013). Concentrations of Dec-604 CB in sediments from the Great Lakes showed a strong increase from the 1950s to the 1970s, and then remained unchanged until 2009 (Shen *et al.*, 2014). Shen *et al.* (2011a) further reported a significant decrease in Dec-602 concentrations in sediments and lake trout from the Great Lakes between 1980 and 2006. The lack of changes in Dec-602, Dec-604 CB and PBEB concentrations in SLE belugas imply that these chemicals are still in use and/or that there are continuous inputs to the environment via the waste phase.

DP concentrations in SLE belugas significantly increased from 1997 to approximately 2003, and declined weakly up until 2013. Temporal trends of this high production volume HFR (US EPA, 2015) originally introduced in the 1960s (Hoh *et al.*, 2006) have been reported in air, sediments, and lake trout from the Great Lakes. Overall, DP concentrations increased significantly in a sediment core from the 1940s until the 1980s. A subsequent decline up to 2004 was further reported in tissues of lake trout from Lake Ontario (Ismail *et al.*, 2009 ; Shen *et al.*, 2011a). Similar observations were made in suspended sediments from Niagara River collected between 1980 and 2006, with the strongest decline observed between the late-1990s and 2006 (Shen *et al.*, 2011a; Sverko *et al.*, 2008). Moreover, a study of air DP concentrations around the Great Lakes reported no significant change between 2005 and 2009 (Salamova and Hites, 2011). Sverko *et al.* (2008) suggested that the production and/or use of DP may have decreased in recent years, or that modern manufacturing processes currently release less DP into the environment. The last production volumes of DP in North America was estimated to several thousand tons in 2002 (National Center for Biotechnology Information, s.

d.). DP concentrations documented in SLE beluga provide additional support to the observed declines in DP concentrations in other species of (Eastern) North America.

CPlus concentrations decreased slightly in SLE belugas between 1997 and 2013. There is, to our knowledge, no temporal trend available for CPlus in marine mammals. Shen *et al.* (2011a) observed a decrease in CPlus levels from 1980 to 2006 in suspended particulate matter from the Niagara River. These authors also observed peak concentrations of this compound in Lake Ontario trout in the early 1980s, with subsequent declines up to 2004. These decreasing trends in sediments and fish were consistent with findings for SLE beluga blubber reported in present study.

HBB concentrations also significantly decreased in SLE belugas during this 17-year timeframe. A previous study on herring gull (*Larus argentatus*) eggs from the Great Lakes found no significant temporal trend of HBB between 1982 and 2006 (Gauthier et al., 2009). Buser (1986) reported that HBB is likely a major product derived from pyrolysis of Octa- and Deca-BDE technical mixtures. This finding is not consistent with the increasing use of Deca-BDE in North America over the last decade (Abbasi *et al.*, 2015), and results from the present study suggest that the occurrence of HBB in blubber of SLE belugas and St. Lawrence minke whales would likely originate from its industrial use. HBB was widely used in Japan with a production volume estimated to 350 tons/year in 2001 (Watanabe and Sakai, 2003). Recent production volumes for HBB are to our knowledge not publicly available.

1.7 Conclusions

The present study provided information on the occurrence of established and emerging HFRs of high environmental concern in three Canadian cetacean populations, including the now endangered SLE beluga population. Overall, blubber HFR concentrations were

greater in SLE belugas compared to minke whales from the St. Lawrence and belugas from the Canadian Arctic. These results can be explained by the higher trophic position of SLE belugas and well as their proximity to local HFR sources originating from major cities upstream in the St. Lawrence River and the Great Lakes, combined to their limited seasonal movements outside the St. Lawrence region. Unexpectedly, Dec-604 CB and DP were found at greater concentrations in Canadian Arctic belugas than in St. Lawrence whale species, suggesting that these compounds might have areas of applications other than flame retardant and/or originate from different sources outside the St. Lawrence River-Great Lakes basin. However, these inter-population comparisons must be interpreted with caution since sample sizes were low, thus preventing robust statistical comparisons. Temporal trend examination in SLE belugas showed for the first time in marine mammals significant trends (declines) for HBB, CPlus and DP concentrations, although no significant change was observed for PBDEs. This suggests that North American PBDE regulations (and outside North America) are too recent to observe changes in PBDE concentrations in beluga blubber. Emissions from HFR-containing products that are still in use or in waste phase likely played a role in influencing these temporal trends in belugas; a long-lived marine mammal (40-60 years). These findings warrant further investigation on the environmental fate, biomagnification, and toxicological effects of PBDEs and emerging HFRs in these whale populations, and is subject of ongoing work in our laboratory.

1.8 Acknowledgments

This study was funded primarily through a grant from the Department of Fisheries and Oceans Canada (National Contaminants Advisory Group). Supplemental funding was provided by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (to J. Verreault) and Environment and Climate Change Canada (to M. Houde). We would like to thank C. Guimont, R. Plante, L. Measures, S. Lair, R. Michaud, C. Girard, I. Mikaelian, A. Dallaire, Y. Morin as well as many volunteers for sample collection and preparation. We would also like to thank L. Wang for assistance with chemical analyses, J.-F. Hélie and A. Adamowicz-Walczak for stable isotope analyses, P. Gagnon for statistical analyses, and F. Boudreault for the map.

1.9 Supplementary material

Supplementary material can be found in Annexe A.

CHAPITRE II

ASSOCIATIONS BETWEEN ORGANOHALOGEN EXPOSURE AND THYROID- AND STEROID-RELATED GENE RESPONSES IN ST. LAWRENCE ESTUARY BELUGAS AND MINKE WHALES

Antoine E. Simond, Magali Houde, Véronique Lesage, Robert Michaud, Dany Zbinden, Jonathan Verreault

Manuscrit publié

Année : 2019

Journal : Marine Pollution Bulletin

<u>N° DOI :</u> 10.1016/j.marpolbul.2019.05.029

<u>Conférences</u>: 5 nationales et 1 internationale (3 présentations orales et 3 par affiche)

2.1 Résumé

Des concentrations élevées de polluants organiques persistants (POP) et de retardateurs de flamme halogénés (RFH) émergents ont été rapportés dans les tissus de la population menacée des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent (Canada), ainsi que chez les petits rorquals fréquentant la même aire d'alimentation. Cette étude a examiné les liens entre les concentrations de POP et de RFH émergents (dans le tissu adipeux), et la transcription de gènes impliqués dans la régulation des axes thyroïdien et stéroïdien (dans la peau) chez les bélugas et les petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent. Chez les bélugas, les concentrations de BPC, de pesticides organochhlorés et d'hexabromobenzène (HBB) étaient positivement corrélées à la transcription des gènes liés à la thyroïde et/ou aux stéroïdes, tandis que les concentrations de Dec-604 CB étaient associées négativement à la transcription des gènes des glucocorticoïdes et de la thyroïde. Chez les petits rorquals, les concentrations de PBDE ont changé positivement avec les niveaux de transcription du récepteur des œstrogènes β et les concentrations de HBB négativement avec les transcrits du récepteur des glucocorticoïdes. Les résultats actuels suggèrent que plusieurs fonctions biologiques, telles que la reproduction et le métabolisme énergétique, pourraient représenter des cibles potentielles des organohalogénés détectés chez ces baleines.

Mots clés : Organochlorés; retardateurs de flamme; transcription de gènes; thyroïde; stéroïde; Cétacé.

2.2 Abstract

Elevated concentrations of persistent organic pollutants (POPs) and emerging halogenated flame retardants (HFRs) have been reported in tissues of the endangered St. Lawrence Estuary (Canada) beluga population as well as in minke whales visiting

that same feeding area. This study examined the linkages between blubber concentrations of POPs and emerging HFRs, and transcription in skin of genes involved in the regulation of thyroid and steroid axes in belugas and minke whales from the St. Lawrence Estuary. In belugas, concentrations of PCBs, OCs and hexabromobenzene (HBB) were positively correlated with the transcription of thyroid-and/or steroid-related genes, while Dec-604 CB concentrations were negatively associated with the transcription of glucocorticoid and thyroid genes. In minke whales, PBDE concentrations changed positively with estrogen receptor β transcript levels and HBB concentrations negatively with glucocorticoid receptor transcripts. Present results suggest that several biological functions including reproduction and energetic metabolism may represent potential targets for organohalogens in these whales.

Keywords : Organochlorine; flame retardant; gene transcription; thyroid; steroid; Cetacean.

2.3 Introduction

Marine mammals are exposed to a variety of organic contaminants that can accumulate in their tissues at occasionally elevated concentrations (Law, 2014). Among these, persistent organic pollutants (POPs) generally accumulate at the greatest concentrations in marine mammal species residing in coastal regions that are characterized by dense human populations and intensive industrial and agricultural activities (Evans, 2009). Cetaceans and pinnipeds from the Estuary and Gulf of St. Lawrence (Canada), which are located downstream of large American and Canadian cities along the Great Lakes and St. Lawrence River, were shown to accumulate elevated concentrations of POPs (Bernt *et al.*, 1999; Lebeuf *et al.*, 2014a). The St. Lawrence Estuary (SLE) is home to the St. Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*) population and represents an important summer feeding ground for the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). The hunting ban in 1979 has brought some stability to the SLE beluga population, although an increase was expected following the elimination of this threat. However, since the early 2000s, the population has been declining at a rate of approximately 1% per year (Mosnier *et al.*, 2015). While contaminant exposure, noise and disturbance are still among the main stressors potentially acting on this population, others such as sporadic exposure to algal toxins, food scarcity and climate warming have been added to the list to explain the decline of the SLE beluga population, which is now considered at risk of extinction under the Species at Risk Act (DFO, 2012; Lair *et al.*, 2016). Although minke whales are currently not considered at risk in the Western North Atlantic, exposure to environmental contaminants could also be a concern as relatively elevated concentrations of halogenated flame retardants (HFRs) relative to other minke whale populations were recently reported in the blubber of minke whale carcasses collected in the Estuary and Gulf of St. Lawrence (Simond *et al.*, 2017).

The first report of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and related compounds in SLE belugas came from a carcass recovered in 1971, which showed very high blubber concentrations of these compounds (i.e., 800 and 827 μ g/g for PCBs and DDTs, respectively) (Sergeant, 1980). Since then, elevated blubber concentrations of a broader suite of PCBs and organochlorine (OC) pesticides and by-products (i.e., DDTs, hexachlorobenzene (HCB), mirex, and *trans*-nonachlor) were also reported in SLE beluga carcasses (Lebeuf *et al.*, 2014a ; Muir et al., 1996). Although concentrations of PCBs and DDTs have declined markedly in SLE beluga blubber between 1987 and 2007 (Lebeuf *et al.*, 2014a), these chemicals were still at elevated levels at the end of this period (i.e., 2.4-243 μ g/g lw for PCBs and 0.6-85 μ g/g lw for DDTs). By comparison, sharp increases in other toxic chemicals including the halogenated flame retardant (HFR) polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been documented from the late 1980s to 1990s in their blubber. PBDEs reached their maximum concentrations in beluga tissues in 1997, followed by a plateau up until at least 2013 (Lebeuf *et al.*, 2014a ; Simond *et al.*, 2017). All PBDE commercial mixtures (i.e., Penta-, Octa- and Deca-BDE) have now been added to the annex A of the Stockholm Convention on POPs. As a consequence, alternative chemicals to PBDE mixtures are increasingly being used in consumer products (Covaci *et al.*, 2011). Recently, Simond *et al.* (2017) reported low (relative to PBDEs) concentrations of several emerging HFRs including hexabromobenzene (HBB), pentabromoethylbenzene (PBEB), and Dechlorane-related compounds in the blubber of SLE belugas and minke whales.

The biological effects of contaminants are likely to be greater when mobilized in blood as opposed to being stored in adipose tissue. Periods of highest vulnerability for marine mammals include mating in the case of species such as pinnipeds in which fasting may occur in males during this period, pregnancy and lactation for reproducing females, and starvation when food supplies becomes limited. The enhanced release of POPs into the blood during these periods may thus affect calf and adult health of marine mammals (Reijnders et al., 2009). An increase of mortality related to dystocia (i.e., difficult labour) and postpartum complications has been reported over the last decade in SLE beluga females (Lair *et al.*, 2016). These authors suggested that female exposure early in life to elevated concentrations of endocrine disruptors including PBDEs, might lead to parturition-related problems. This hypothesis was based on studies of other mammals (e.g., rats, rodent and human cells) showing that a number of POPs reported in SLE beluga and minke whale blubber such as PCBs, PBDEs and OC pesticides, can elicit adverse developmental, neurological, reproductive and immune abnormalities, including perturbation of the circulating thyroid and steroid hormone homeostasis (see reviews by Kefeni et al., 2011; Mrema et al., 2013; Pelch et al., 2011). Moreover, PCBs, PBDEs and DDTs have the potential to interfere with nuclear thyroid and/or steroid hormone receptors (Kojima et al., 2009; Pelch et al., 2011). It has been shown

that the activity of nuclear hormone receptors represents a good indicator of endocrine disruptor exposure in wildlife as they were documented to interact with these POPs, and play a major role in the endocrine transcriptional response in target cells (McKenna *et al.*, 1999).

Skin/blubber biopsy sampling has become one of the most common non-destructive technique used for studying free-ranging cetaceans as the tissues collected can be used to examine a variety of biological and ecological questions. The collection of the two tissues allows for quantifying both POP concentrations and biological markers including the expression of specific genes or hormone levels (Godard-Codding and Fossi, 2018). Several studies have reported interactions between PCBs and/or PBDEs, and steroid and thyroid hormone receptors using biopsies of marine mammals. For example, PCB and/or PBDE concentrations have been correlated for several cetacean (including belugas) and pinniped species with transcript levels of several nuclear hormone receptors (i.e., thyroid hormone receptor α (*Thra*) and β (*Thrb*), estrogen receptor α (*Esra*), and glucocorticoid receptor (*Nr3c1*) transcripts), and enzymes involved in the metabolism of xenobiotics (i.e., aryl hydrocarbon receptor (Ahr)) in their blubber (Brown et al., 2014; Buckman et al., 2011; Noël et al., 2014, 2017). Concentrations of DDTs, trans-nonachlor and HCB have also been shown to interfere with the steroid or thyroid axes in humans and laboratory animals (e.g., Cocco, 2002; Starek-Świechowicz et al., 2017). Currently, information on the effects of emerging HFRs is scarce, and it remains unclear whether these replacement products to the banned PBDEs can disrupt endocrine systems of mammals (Ezechiáš et al., 2014).

The present study aimed at investigating the relationships between blubber concentrations of a suite of POPs and emerging HFRs, and the transcription of genes related to the regulation of thyroid and steroid hormones, and metabolism of xenobiotics in free-ranging SLE belugas and minke whales. POPs (i.e., PCBs and other

OCs, and PBDEs) and emerging HFRs were selected because of their known endocrine disruptive potential or the lack of knowledge on their toxicity in mammals. Results from this study will provide valuable information on the potential of POPs and emerging HFRs to elicit endocrine disrupting effects in highly exposed whales, including the endangered SLE beluga population for which contaminant exposure has been identified as a potential cause of decline.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Field sampling

A skin/blubber biopsy was collected from the flank of adult belugas (n = 45) and minke whales (n = 11) in the SLE (Figure 2.1) during the summers of 2015, 2016 and 2017 using sharpened 8 x 25 mm to 8 x 35 mm stainless steel tips cleaned with oxygen peroxide or HPLC grade acetone and 95% ethanol. Biopsies were processed immediately after sampling using disposable DNAse and RNAse-free scalpels as well as cleaned forceps. As the biopsy dart often hits with an oblique angle, more epidermis and connective tissues are often collected. Therefore, the intermediate fibrous layer between the epidermis and blubber (i.e., dermis) and the blubber (when available) were used for chemical analysis, and is referred to as "blubber" hereafter. Blubber samples were wrapped in solvent-rinsed aluminum foil, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C in the laboratory until chemical analysis (Section 2.4.3). The skin of all minke whales and four belugas was separated from the blubber, immersed in RNAlater[®] and kept in a cooler before being stored at -80°C in the laboratory. The remaining beluga skin samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in the laboratory until sexing (Section 2.4.2) and gene transcription analyses (Sections **2.4.4 and 2.4.5**). Both these sample handling methods were shown to be optimal for RNA preservation (Camacho-Sanchez et al., 2013).

This research was conducted under permits granted by Parks Canada (SAGMP-2013-14734 and SAGMP-2017-25339) and Fisheries and Oceans Canada (IML-2015-13, IML-2016-021, and QUE-SCIENTIFIQUE-048-2017). Sampling methods were approved by animal care committees of the Université du Québec à Montréal and Fisheries and Oceans Canada, two entities recognized by the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada) and complying with their guidelines.



Figure 2.1 Sampling area (hatched) for belugas and minke whales in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada).

2.4.2 PCR-based sex determination

Sex of whales was determined by a PCR amplification-based method at Saint Mary's University (Halifax, NS, Canada) for belugas and Environment and Climate Change Canada (Montreal, QC, Canada) for minke whales using skin DNA extracts. The methods were based on Gilson *et al.* (1998) for belugas and on Jayasankar *et al.* (2008) with minor modifications for minke whales (see **Annexe B**). Only male belugas were included in this study. For minke whales, there is a strong bias toward females visiting the SLE for feeding (Ursula Tscherter, personal observations), and thus as expected, minke whales in present study were all confirmed to be females.

2.4.3 Chemical analysis

Blubber samples (30-100 mg) were analyzed for 41 PCBs, 23 OCs (pesticides and industrial by-products), 35 PBDEs, and 11 emerging HFRs. Sample extraction and clean-up followed methods described in Simond *et al.* (2017) without modification. Briefly, blubber samples were homogenized with diatomaceous earth, and spiked with 100 µL of a 200 ng/mL internal standard solution (BDE-30, BDE-156, ¹³C-BDE-209, and ¹³C-*anti*-DP). The total lipid content of samples was determined gravimetrically. Identification and quantification of PBDEs and emerging HFRs was performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA, USA) operating in electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI). An internal standard approach was used for HFR quantification, and thus all analytes were inherently recovery-corrected.

Extracted blubber fractions generated for PBDE/HFR analysis were reanalyzed for PCBs and other OCs by AGAT Laboratories (Montreal, QC, Canada) for belugas only. Briefly, extracted fractions were spiked with performance standards consisting of neutral PCBs (PCB-9, -136, and -204) and polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene-d8, phenanthrene-d10, and chrysene-d12). Identification and

quantification of PCBs was performed using a 6890N GC coupled to an 5975B Inert mass selective detector (MSD) (Agilent Technologies) operating in selected ion monitoring mode (GC/MSD-SIM). For OCs, a 7890A GC coupled to a 5975C MSD (Agilent Technologies) operating in SIM mode was used. The analytical column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 µm) was a fused silica RXI-5SIL MS capillary column (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). Concentrations of PCBs and OCs were corrected using recovery percentages of the internal standard ¹³C-*anti*-DP.

Quality control and assurance procedures included analyses of procedural method blanks, duplicate blubber samples and standard reference materials (SRM; NIST 1945 Whale Blubber, Gaithersburg, MD, USA) for each batch of ten samples. Analyte concentrations in whale samples were blank-corrected when necessary. Mean (\pm SEM) recoveries of internal standards in samples were as follows: BDE-30 ($95.3 \pm 1.08\%$), BDE-156 (96.0 \pm 1.94%), ¹³C-BDE-209 (64.0 \pm 3.41%), and ¹³C-anti-DP (104 \pm 1.82%). Performance standard recoveries for PCB/OC analyses were: PCB-9 (75.3 \pm 1.05%), PCB-136 (91.0 \pm 1.65%), PCB-204 (91.2 \pm 0.94%), naphthalene-d12 (91.6 \pm 0.84%), phenanthrene-d10 (103 \pm 1.04%), and chrysene-d12 (77.9 \pm 1.73%). Mean percent variation from SRM certified values were $33.6 \pm 3.2\%$ for PCBs (n = 32), 37.0 \pm 5.3% for OCs (n = 5), and 40.2 \pm 10.7% for PBDEs (n = 4). 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 for HFRs and 10 for OCs) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit. All contaminant concentrations were reported in ng/g wet weight (ww). Lipid-corrected contaminant concentrations can be found in Table B1.

2.4.4 Total RNA isolation and cDNA synthesis

Different protocols and kits were used depending on whether samples were stored in RNA*later*[®] prior to freezing or directly flash-frozen in liquid nitrogen. The RNeasy[®] fibrous tissue mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) was used to isolate total RNA from skin stored in RNA*later*[®] following the manufacturer's instructions. Briefly, 10-20 mg of skin was disrupted on ice in 100 μ L of RLT buffer using a sterile plastic pestle. Then, 200 μ L of RLT buffer, 590 μ L of RNase-free water and 10 μ L of proteinase K were added to the homogenate. The mixture was incubated at 55°C for 10 min in a ThermoMixer[®] R Comfort (Eppendorf, Mississauga, ON, Canada) without agitation, and centrifuged at 10,000 × *g* for 3 min at room temperature. The supernatant was transferred into a new tube, and centrifuged again at the same speed for 3 min to settle the remaining particles. RNA was precipitated from the supernatant with ethanol (70%), and cleaned with RW1 and RPE buffers on a RNeasy[®] spin column (Qiagen).

For flash-frozen beluga skin samples, total RNA was extracted using the RNeasy® mini kit (Qiagen) as per manufacturer's instructions with minor modifications. Briefly, for each sample, 15-30 mg of skin was cut into small pieces on ice with a sterile scalpel, disrupted in 100 μ L of RLT buffer using a sterile plastic pestle. Then, 500 μ L of RLT and 290 μ L RNAse-free water were added to the homogenate. To optimize homogenization, 10 μ L of proteinase K was added to the mixture, and the solution was incubated without agitation at 55°C for 10 min. Homogenates were transferred into QIAshredderTM spin columns and centrifuged at 21,000 × *g* for 2 min at room temperature. Supernatants were then transferred into a new tube, and total RNA was precipitated with 70% ethanol, and cleaned on a RNeasy[®] spin column using RW1 and RPE buffers.

In both methods, RNA was resuspended in 30 µL RNase-free water, quantified using a NanoDrop[™] 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON,
Canada), and RNA integrity was assessed on an agarose gel stained with SYBR[™] green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Total RNA (500 ng) was retro-transcribed using the QuantiTect[®] Reverse Transcription kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, and stored at -20°C until further analysis (**Section 2.4.5**).

2.4.5 Quantitative real-time PCR

2.4.5.1 Primer design

A total of 12 genes were selected based on their key roles in endocrine functions and xenobiotic metabolism in mammals in addition to five reference genes (Table B2). Primers for minke whales were designed from predicted gene sequences obtained from whole-genome sequencing of this species (Yim et al., 2014). For belugas, primers were designed based on available sequences in GenBank, and on conserved regions of genes of interest obtained after the alignment of sequences from other cetacean species (e.g., Tursiops truncatus, Orcinus orca, Balaenoptera acutorostrata, Lipotes vexillifer, and *Physeter catodon*). Multiple sequence alignments were performed using the Clustal Omega program (http://www.ebi.ac.uk/). All primers were designed by the authors Primer-BLAST **NCBI** (Primer3 using from with Blast: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), except for the beluga ribosomal protein L8 (Rpl8), which was designed by Chen et al. (2016). Primers all respected the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines (Taylor *et al.*, 2010), with an amplicon size from 75 to 150 bp, GC contents between 50 and 60%, and a melting temperature comprised between 55 and 65°C. Primers were manufactured by IDT (Coralville, IA, USA). Amplification efficiencies were measured using an 8-points standard curve, and only genes with efficiency between 90 and 110% were measured. Name and symbol of transcripts as well as primer-specific efficiencies and sequences are listed in Table B3 and B4.

2.4.5.2 qRT-PCR measurements and normalization

All qRT-PCR analyses were performed using the SsoFastTM EvaGreen® Supermix and the CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Each reaction was run in duplicate in a total reaction volume of 13 μ L using 5 and 7.5 ng of cDNA template for minke whales and belugas, respectively, and a final concentration of 400 nM for each primer. Cycling parameters were 95°C for 30 s, followed by 45 cycles at 95°C for 5 s and 60°C for 15 s. Amplification specificity was verified with a melting curve. Quality control procedures included a no-template control in order to monitor for random or reagent contamination as well as a primer dimer formation.

Data acquisition was performed by the CFX ManagerTM software (Bio-Rad). Cq values were imported into Qbase+ 3.1 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium). The $\Delta\Delta C_t$ approach (Livak and Schmittgen, 2001) was used for relative quantification, and results were converted to calibrated normalized relative quantity values (CNRQ). The relative gene transcription was calculated and normalized using reference genes selected using the geNorm algorithm: *Dio1*, *Hsd17β2*, *Sdha* and *Thra* for belugas, and *Ahr*, *Rpl8*, and *Thra* for minke whales.

2.4.6 Statistical analysis

For correlation analyses, concentrations of compounds/congeners that were below the MLODs or MLOQs were substituted by a random value comprised between 0 and the compound/congener-specific MLOD, and randomly sampled from a normal distribution. Only those compounds/congeners above the MLODs or MLOQs in at least 65% of the samples were included in correlation analyses (**Table B5 to B8**).

Normality and homogeneity of variances were tested using the Shapiro-Wilk and Bartlett's tests, respectively. Contaminant concentrations in most belugas did not meet the assumptions of normality and homogeneity of variances even after logtransformation. Therefore, and due to the low sample size for minke whales, the nonparametric Spearman's rank correlation test was used to test the strength of the relationships between contaminant concentrations and mRNA levels of target genes. Differences in compound/congener concentrations between species were evaluated using the Kruskal-Wallis test. Significant differences were discriminated using the Dunn post-hoc test with a Bonferroni-type adjustment. All statistical analyses were carried out using R version 3.2 (R Core Team, 2015, Vienna, Austria). Level for statistical significance was set to $\alpha = 0.05$.

2.5 Results

2.5.1 Contaminant concentrations

Blubber Σ_{29} PBDE concentrations were 1.8-fold greater in male belugas compared to female minke whales (H (2) = 6.38; p = 0.01) (**Table 2.1**). Σ_{29} PBDE concentrations made up 96% of total HFRs in belugas, and were 10 times lower than Σ_{37} PCB. The six most abundant PBDE congeners determined in blubber of both species were BDE-47, -49, -99, -100, -154/BB-153 and -209 (**Figure B1**), which are all major components of Penta-BDE and Deca-BDE mixtures (La Guardia *et al.*, 2006). Σ_{13} Penta-BDE in belugas and minke whales accounted for the largest part (92% and 80%, respectively) of Σ_{29} PBDE concentrations (H (2) = 89.7 and 21.4, respectively; both p < 0.001), whereas percent contributions of Σ_{11} Octa- (3% and 8%, respectively) and Deca-BDE (BDE-209; 4% and 8%, respectively) were lower and roughly similar in both species (0.53 $\leq p \leq 0.95$). Interestingly, Σ_{11} Octa- and Deca-BDE percent contributions were greater in minke whales than in belugas (9.38 \leq H (2) \leq 18.3; both p = 0.01).

Among the 11 emerging HFRs (**Table B6**), only Dec-604 CB, *syn-* and *anti-DP*, HBB and PBEB could be quantified in the two species (**Table 2.1**). The most abundant

emerging HFR in SLE beluga and minke whale blubber was *anti*-DP, followed in decreasing order by Dec-604 CB, HBB, and PBEB (**Table 2.1**). Concentrations of PBEB and Dec-604 CB were significantly greater in minke whales than in SLE belugas (H (2) = 4.25 and 17.8, p = 0.04 and < 0.001, respectively), whereas the reverse was observed for *syn*-DP (H (2) = 4.30; p = 0.04).

Table 2.1 Mean concentrations (\pm SEM) and ranges (ng/g ww) of PCBs/OCs and PBDEs/HFRs determined in biopsy blubber of belugas and minke whales from the St. Lawrence Estuary (Canada). Means were calculated when compounds/congeners were quantified in > 65% of samples.

	Belugas	Minke whales
	n = 45	n = 11
Blubber lipid content (%)	12.9 ± 1.11 (1.50 - 39.6)	22.3 ± 1.85 (13.5 - 32.3)
OCs ^a		
$\Sigma_{37}PCB^b$	$1,356 \pm 153 \ (150 - 4,171)$	n.a.
HCB	26.9 ± 2.80 (<mlod -="" 88.5)<="" td=""><td><i>n.a.</i></td></mlod>	<i>n.a.</i>
<i>p,p</i> '-DDE	561 ± 79.5 (55.8 - 2,456)	n.a.
Mirex	(<mlod -="" 37.6)<="" td=""><td>n.a.</td></mlod>	n.a.
trans-nonachlor	116 ± 13.2 (<mlod -="" 395)<="" td=""><td><i>n.a.</i></td></mlod>	<i>n.a.</i>
HFRs ^c		
$\Sigma_{29} PBDE^d$	$144 \pm 12.0 (28.9 - 386)$	81.8 ± 11.4 (29.4 - 155)
PBEB	0.23 ± 0.05 (< MLOD - 1.66)	$0.28 \pm 0.06 \ (< MLOD - 0.75)$
HBB	0.93 ± 0.13 (< MLOD - 3.70)	$0.56 \pm 0.07 \; (0.24 - 0.99)$
Dec-604 CB	0.99 ± 0.12 (< MLOD - 3.50)	$2.56 \pm 0.30 \ (1.29 - 4.99)$
syn-DP	$0.49 \pm 0.16 \ (< MLOD - 6.50)$	$0.09 \pm 0.05 \ (< MLOD - 0.50)$
anti-DP	$1.84 \pm 0.41 \ (0.27 - 12.8)$	$1.00 \pm 0.15 \ (0.35 - 1.95)$
ΣDP^e	2.33 ± 0.54 (0.36 - 19.3)	$1.10 \pm 0.15 \ (0.35 - 1.95)$

^a OCs that were not detected in any blubber samples: Aldrin, *p*,*p*'-DDD, *p*,*p*'-DDT, Dieldrin, Endosulfan I, Endosulfan II, Endosulfan sulfate, Endrin, Endrin aldehyde, Endrin ketone, Heptachlor epoxyde, HCHs, Heptachlor, Methoxychlor, OCS, and Oxychlordane.

^b Sum of CB-17, -18, -28, -31, -33, -44, -49, -52, -70, -74, -82, -87, -95, -99, -101, -105, -110, -118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -156, -158, -170, -171, -177, -180, -183, -187, -191, -194, -195, -199, and -209. Congeners that were not detected in any blubber samples: CB-169, -205, -206, and -208. ^c HFRs that were not detected in any blubber samples: DBDPE, CPlus, Dec-602, Dec-603, and OBIND. ^d Sum of BDE-7, -10, -17, -28, -47, -49, -66, -77, -85, -99, -100, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -207, -208, and -209. Congeners that were not detected in any blubber samples: BDE-15, -71, -119, -171, -205, and -206 ^e Sum of *syn*- and *anti*-DP.

Sulli of syn- and anti-

 Σ_{37} PCB concentrations contributed to $61 \pm 0.7\%$ of the sum of all organohalogens quantified in the blubber of SLE belugas. CB-153, 138/158, -99, -149, -101 and -95 were, in decreasing order, the most abundant congeners (**Figure B2**). Four OCs ($30 \pm 0.9\%$ of total organohalogens) were quantified in the blubber of belugas (**Table 2.1**) of which the most abundant was *p*,*p*'-DDE, followed by *trans*-nonachlor and HCB.

2.5.2 Correlations between gene transcription and contaminant levels

The mRNA levels of 13 gene transcripts (i.e., *Actβ*, *Ahr*, *Dio2*, *Esra*, *Gapdh*, *Hsd17β2*, *Nr3c1*, *Rpl8*, *Sdha*, *Star*, *Thra*, *Thrβ*, and *Tub*) were quantified in the skin of belugas and minke whales (**Table B3 and B4**). The transcription of several of these genes was significantly correlated with POP concentrations in SLE beluga blubber. Briefly, Σ_{37} PCB, *p,p*'-DDE, *trans*-nonachlor and HCB concentrations were positively correlated with the transcription of *Dio2* ($0.34 \le rho \le 0.41$; $0.01 \le p \le 0.03$) and *Esra* ($0.31 \le rho \le 0.42$; $0.01 \le p \le 0.05$) (**Figure 2.2 and B3**). HBB concentrations were positively correlated with *Ahr*, *Esra*, *Hsd11β2*, *Nr3c1* and *Star* ($0.32 \le rho \le 0.71$; 0.001) transcript levels, while Dec-604 CB concentrations were negatively correlated with transcript levels of*Hsd11β2*,*Nr3c1*,*Star*and*Thrβ*(-0.47 ≤*rho* $≤ -0.31; <math>0.002 \le p \le 0.04$) (**Figure 2.3 and B4**). Transcripts of *Actb* (*rho* = -0.39; *p* = 0.01) and *Tub* (*rho* = -0.30; *p* = 0.04), two genes initially selected as reference genes, were negatively correlated with concentrations of Dec-604 CB (**Figure B5**).

The concentrations of several HFRs were also correlated with skin gene transcripts in female minke whales. Blubber concentrations of Σ_{29} PBDE were positively correlated with transcript levels of *Esr* β , whereas HBB concentrations were negatively correlated with *Nr3c1* mRNA levels (**Figure 2.4**).



Figure 2.2 Correlations between skin mRNA levels of *Dio2* (*a*) and *Esra* (*b*), and blubber PCB concentrations (ng/g ww) in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary.



Figure 2.3 Correlations between skin mRNA levels of $Esr\alpha$ (*a*), Nr3c1 (*b*), $Hsd11\beta2$ (*c*, *d*), and blubber HFR concentrations (ng/g ww) in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary.



Figure 2.4 Correlations between biopsy skin mRNA levels of $Esr\beta$ (*a*) and Nr3c1 (*b*), and blubber HFR concentrations (ng/g ww) in female minke whales sampled in the St. Lawrence Estuary.

2.6 Discussion

Present results suggest that elevated concentrations of POPs but also selected emerging HFRs in SLE belugas and minke whales may be associated with perturbation in the transcription of genes (in skin) involved in the regulation of thyroid, gonadal steroid, and glucocorticoid hormones. To our knowledge, this is the first study investigating the linkages between concentrations of any contaminants and genomic markers of endocrine control in these two cetacean populations.

2.6.1 Contaminants in SLE belugas and minke whales

2.6.1.1 PCBs and other OCs

Despite their ban in the late 1970s in Canada and internationally, PCBs remain the most abundant POPs in the blubber of SLE belugas. High concentrations of other legacy OCs were also determined, which exceeded by 3.6-fold the sum of all quantified HFRs (Σ_{34} HFR). Concentrations in our recent samples of male SLE belugas were lower (i.e., 7-, 2-, 14- and 5-fold for PCBs, HCB, *p,p* '-DDE and *trans*-nonachlor, respectively) than the previous report of OC concentrations measured in this segment of the population (Lebeuf *et al.*, 2014a). Moreover, only four OC pesticides and by-products were detected in the present study compared to 16 in that of Lebeuf *et al.* (2014a). These differences are consistent with the significant declines in concentrations of PCBs, DDTs, *trans*-nonachlor, and HCB (i.e., 4-11% decline per year) that were calculated by Lebeuf *et al.* (2014a) for female and/or male beluga carcasses sampled between 1987 and 2007. Concentrations of PCBs have considerably declined since the 1970s in St. Lawrence River sediments (e.g., up to 95% between 1986 and 2003; Pelletier, 2002, 2005) and fish (e.g., 65-96% between 1976 and 2007; Painchaud and Laliberté 2010). Results from the present study suggest that concentrations of PCBs and other OCs continue to decline, at least in male SLE belugas.

2.6.1.2 HFRs

The Σ_{29} PBDE concentrations made by far the largest contributions to the sum of all targeted HFRs measured in the blubber of male SLE belugas. Levels in biopsy blubber were within the same range as those obtained from carcasses sampled between 1997 and 2013 (Simond *et al.*, 2017). PBDE concentrations in female SLE minke whale biopsy blubber were also within the range of those obtained from blubber of stranded females sampled between 2002 and 2005 (i.e., 355 ± 61.2 ng/g lw; Simond *et al.*, 2017). The leveling off of PBDEs in SLE belugas is likely due to the continuous release of these chemicals via effluents from wastewater treatment plants, which represent one of the most important source of PBDEs in aquatic environments (Kim *et al.*, 2013). Because PBDEs released from wastewater treatment plant effluents mainly originate from domestic usage, the inputs of these chemicals into the environment are expected to continue as long as HFR-containing consumer goods will be in use (Abbasi *et al.*, 2015).

Four non-PBDE HFRs (DP, Dec-604 CB, HBB, and PBEB) were quantified in the blubber of SLE belugas and minke whales. Concentrations from the present study were greater in both species for ΣDP and Dec-604 CB (i.e., 11- to 51-fold), lower for HBB (i.e., 2-fold), while PBEB concentrations were greater in minke whales (i.e., 4-fold) and lower in belugas (i.e., 1.4-fold) compared to levels reported in blubber of carcasses sampled between 1997 and 2013 from the same two populations (Simond et al., 2017). The latter study was based on tissues collected from whale carcasses that used deeper blubber layers than those that are typically obtained through biopsy sampling. These differences in sampling might explain concentration discrepancies between studies, although these could also be due to differences in sample freshness (e.g., oxidation) and the heterogeneous vertical distribution of these chemicals within the blubber layer. The inner blubber layer is considered metabolically more active than the outer layer, which has structural properties and is often used for long-term lipid storage (Iverson et al., 2004). Moreover, significant differences between blubber layers in composition and quantity of fatty acids have been shown in both belugas and minke whales (Budge et al., 2006; Iverson et al., 2004; Olsen and Grahl-Nielsen, 2003).

2.6.2 Correlations between contaminant levels and gene transcripts

2.6.2.1 Thyroid-related genes

Transcript levels of the gene encoding for deiodinase 2 (*Dio2*) were positively correlated with concentrations of several OCs (i.e., PCBs, *p,p*'-DDE, HCB, and *trans*-nonachlor) in male SLE belugas, suggesting that these POPs could interfere with thyroid axis regulation. Similar trends were observed using the liver of ringed seals (*Pusa hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea for which positive correlations were reported between mRNA levels of *Dio1* and concentrations of organohalogens (sum of PCBs, PBDEs, HCB, *trans*-nonachlor, and *p,p*'-DDE) (Routti *et al.*, 2010). Moreover, the activity of Dio1 and Dio2 in muscle, liver and kidney was positively correlated with plasma concentrations of PCB, OH-PCB and PBDE congeners in polar bears (*Ursus*)

maritimus) from Greenland (Gabrielsen *et al.*, 2015). Dio1 and Dio2 are key enzymes involved in thyroid metabolism in mammals. These enzymes catalyze thyroid hormone activation through outer ring deiodination of thyroxine (T_4) to the active form 3,3',5triiodothyronine (T_3) , and/or the inactivation of T_3 (inner ring deiodination) to reverse T₃ and 3,3'-diiodothyronine (T₂) (Soldin *et al.*, 2008). Dio2 was documented to be the only type of deiodinase found in skin and blubber of mammals (Köhrle, 2002). Disturbance of deiodinase functioning may alter the circulating thyroid hormone status, and subsequently impact processes in which thyroid hormones are involved including thermoregulation, energetic metabolism, reproduction, growth, and development of the nervous system in fetuses, neonates and juveniles (McNabb, 1992). In Svalbard belugas (Villanger et al., 2011) and polar bears (Braathen et al., 2004; Skaare et al., 2001), plasma or blubber concentrations of HCB and PCBs were negatively correlated with circulating thyroid hormone levels. Similar findings were reported for rats chronically exposed to PCBs (Byrne et al., 1987), p,p'-DDE (Liu et al., 2011), transnonachlor (Bondy et al., 2000) as well as HCB (de Pisarev et al., 1989). Based on these observations and the fact that a marked increase in Dio2 activity can be indicative of hypothyroidism in mammals (St. Germain and Hernandez, 2016), the positive correlations observed between OCs and Dio2 may represent an indirect evidence of altered thyroid hormone status in SLE belugas. Nevertheless, it has been shown in polar bears that although organohalogen concentrations were related to the activity of Diol and Dio2, these were not associated with changes in plasma thyroid hormone levels (Gabrielsen et al., 2015). In recent years, the number of fatal dystocia and postpartum complications have increased in adult female SLE belugas (Lair et al., 2016), conditions that can be influenced or triggered by altered thyroid hormone status (e.g., hypothyroidism) in mammals (Grant, 2015). Considering that other factors such as nutritional stress or disturbance during parturition might also increase the probability of parturition-associated complications in reproductive females (Lair et al., 2016), the latter hypothesis remains to be verified through, for example, measurement of circulating thyroid hormone levels, although this could not be performed in the present study due to ethical reasons.

Another gene involved in thyroid regulation (action), *Thr* β , was negatively related to blubber Dec-604 CB concentrations. Thyroid hormone receptors are essential for normal development and energy homeostasis (Pelch *et al.*, 2011). The interpretation of this negative correlation is cumbersome as no toxicological information is currently available for this emerging HFR. However, the molecular structure of Dec-604 CB contains a brominated aromatic ring similar to PBDEs, which have been associated with changes in thyroid hormone receptor mRNA levels (Ibhazehiebo and Koibuchi, 2014). By comparison, PBDEs and PCBs exhibit highly similar structures to thyroid hormones. As such, PCB concentrations have been positively correlated with several thyroid hormone receptor gene transcripts in pinnipeds (Noël *et al.*, 2017; Routti *et al.*, 2010) and killer whales (Buckman *et al.*, 2011). However, Noël *et al.* (2014) did not report any significant relationships between *Thr* α or *Thr* β transcript levels, and PCBs in Arctic beluga blubber.

The present interpretations must be considered with caution as potential effects of POP exposure could not be dissociated from biological and ecological factors (e.g., age, nutritional status, seasonal variations, etc.) regulating *Dio2* and *Thr* β (Bianco *et al.*, 2002). Also, as transcript levels of enzymes might not necessarily reflect their activity (Greenbaum *et al.*, 2003), the measurement of mRNA/protein levels should be considered to complement these results. The measurement of other thyroid-related gene transcripts such as the thyroid hormone response element (*Tre*), retinoid X receptor (*Rxr*) as well as deiodinase 3 (*Dio3*) might also contribute to better understand potential organohalogen-exposure mediated mechanisms of disruption in SLE belugas.

2.6.2.2 Gonadal steroid-related genes

Positive correlations were found in male SLE belugas between transcription levels of *Esra* and concentrations of five organohalogens (PCBs, p,p'-DDE, *trans*-nonachlor, HCB, and HBB). Moreover, in female SLE minke whales, PBDE concentrations were positively related to $Esr\beta$ transcripts. Similar correlations were found in liver of ringed seals (Brown et al., 2014) and blubber of harbor seals (Noël et al., 2017) and killer whales (Buckman *et al.*, 2011), where PCBs were all positively correlated with *Esra* transcript levels. However, no such correlation was reported in Beaufort Sea belugas (Noël et al., 2014), although blubber PCB concentrations in this population were three times lower than in those measured in SLE belugas in our study. PBDE concentrations and Esra transcripts were positively correlated in blubber of harbor seals (Noël et al., 2017) and Beaufort Sea belugas (Noël et al., 2014). PCBs and PBDEs were shown to bind to estrogen receptors, with congeners of low molecular weight eliciting generally stronger estrogenic activity (Kojima et al., 2009; Soto et al., 1995). Estrogenic effects were also reported for *p*,*p*'-DDE, *trans*-nonachlor and HCB in bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) (Yordy et al., 2010) and/or rats (Kelce et al., 1995; Peña et al., 2012). Yordy et al. (2010) performed an E-screen assay with a mixture of organohalogens (e.g., PCBs, chlordanes, DDTs, HCB, and PBDEs) extracted from the blubber of male bottlenose dolphins and showed that this mixture induced a global estrogenic effect.

To our knowledge, toxicity of HBB has been little studied (Ezechiáš *et al.*, 2014). Since HBB is the brominated analogue of HCB, these two chemicals are likely to elicit similar effects. As such, similarly to HCB, HBB might not have a strong affinity for estrogen receptors, suggesting that other intracellular pathways may be involved in the perturbation of estrogen metabolism (Mrema *et al.*, 2013). This might also explain the positive correlation between HBB concentrations and *Esra* transcripts. Rats exposed to HCB showed a significant increase in Esra and plasma concentrations of 17β -estradiol

(Peña *et al.*, 2012). Another potential mechanism of HBB-mediated disruption could be via the interaction between *Ahr* and *Esra* since transcript levels of both genes were positively correlated with HBB concentrations as well as with each other (rho = 0.34; p = 0.03; data not shown) in male SLE belugas. *In vitro* and *in vivo* studies have provided extensive evidence that crosstalk between Esr and Ahr could lead to activation of *Esra* in the absence of estrogens (Marlowe and Puga, 2010).

Although α and β estrogen receptor transcripts increased with increasing concentrations of several organohalogens in male SLE belugas and female minke whales, the present study design did not allow confirming if these contaminants caused estrogenic or antiestrogenic effects. In both cases, imbalance could alter reproduction and other physiological functions such as fertility, energetic metabolism, growth or development (Kumar *et al.*, 2018). It should be noted that correlations between organohalogens and Esr α transcripts could also be related with age in males. Indeed, POP concentrations have been positively correlated with age in male SLE belugas (Lebeuf *et al.*, 2014a; Simond *et al.*, 2017), and estrogen levels could possibly also increase with age as reported in elderly men (Bjørnerem *et al.*, 2004). Unfortunately, age of present freeranging whales could not be determined.

2.6.2.3 Glucocorticoid-related genes

Concentrations of HBB and Dec-604 CB in blubber of male SLE belugas were positively and negatively correlated to levels of $Hsd11\beta2$ gene transcripts, respectively. Since it is, to our knowledge, the first time that this gene is quantified in marine mammals, no comparable results could be found in the literature. This gene encodes for hydroxysteroid-11- β -dehydrogenase 2 (Hsd11 β 2), an enzyme that unidirectionally catalyzes the conversion of cortisol to cortisone, its inactive form, and has a protective role for kidney and testicular Leydig cells (Hampl *et al.*, 2016 ; Krozowski *et al.*, 1999). A reduced activity of Hsd11 β 2 may result in severe forms of renal sodium retention and hypertension in humans (White *et al.*, 1997), and in alteration of testosterone production in rat Leydig cells (Ge *et al.*, 2005). In humans, *Hsd11β2* is known to play an important role in pregnancy maintenance and fetal maturation, and in protecting the fetus from overexposure to maternal cortisol (Krozowski *et al.*, 1999). An abnormal increase of cortisol in plasma and fetus could induce delayed fetal growth, and cause disturbance in intrauterine development including cardiovascular and metabolic disorders (Odermatt, 2004; Seckl and Holmes, 2007). Although our results cannot establish a clear mechanistic linkage between HBB or Dec-604 CB exposure and *Hsd11β2* activity, they suggest that this enzyme can potentially be the target of a organohalogen-mediated toxicity.

Concentrations of HBB and Dec-604 CB were oppositely correlated with Nr3c1 transcript levels (i.e., positively and negatively, respectively) in male SLE belugas, while HBB was negatively correlated with this gene in female minke whales. Nr3c1 encodes for glucocorticoid receptor, which once activated by cortisol, is directly involved in the regulation of physiological processes such as immune function, antiinflammatory response or blood pressure (Katsu and Iguchi, 2016). As a consequence, variations in mRNA levels of this gene are in general closely linked to circulating cortisol levels in mammals. Comparable to Dec-604 CB results in male SLE belugas and HBB in female minke whales, PCB concentrations were negatively correlated with Nr3c1 transcripts in skin of North American harbor seals (Noël et al., 2017) and brain of Arctic chars (Salvelinus alpinus) (Aluru et al., 2004). However, no significant relationship was found between PCB concentrations and Nr3c1 mRNA or cortisol levels in the blubber of Arctic belugas (Loseto et al., 2018; Noël et al., 2014), suggesting that different mechanisms of disruption are involved or that PCBs do not affect corticosteroid regulation in belugas. Interestingly, HBB concentrations in SLE belugas were also positively correlated with Ahr, as was Ahr with Nr3c1 (rho = 0.83; p < 0.001; data not shown). Several studies have documented crosstalk between Ahr and Nr3c1 in human cells, but molecular mechanisms behind these interactions have as yet to be clarified (Sato *et al.*, 2013). HBB might bind and activate Ahr (Brown et al., 2004), which is actively involved in xenobiotic detoxification (Marlowe and Puga, 2010). HBB concentrations were shown to increase with age in male SLE belugas (Simond *et al.*, 2017), and so did cortisol blubber concentrations in male belugas from the Beaufort Sea (Loseto *et al.*, 2018). These observations suggest that the correlation described between Nr3c1 and HBB levels in present study may indirectly or directly be linked to age of male SLE belugas. Age could also be a confounding factor for the correlation between HBB concentrations and Nr3c1 transcripts in SLE minke whale females as burdens of POPs are eliminated during gestation and lactation (Reijnders *et al.*, 2009).

The opposite direction of correlations observed in SLE belugas between HBB and Dec-604 CB concentrations with Nr3c1 and Hsd11 β 2 transcripts remains difficult to interpret, especially since these two HFRs were not correlated with each other (p =0.26). Regardless, these results indicate that a link may exist between exposure to these contaminants and glucocorticoid metabolism. Thus, HBB and Dec-604 CB may be associated with modulation of the stress response of this endangered population, which may also be affected by noise pollution, a warmer environment, sporadic toxic algal blooms, and lesser availability of prey (DFO, 2012; Plourde et al., 2014). Individuals undergoing chronic stress can exhibit higher baseline levels of circulating cortisol (Dickens and Romero, 2013) that may alter physiological processes including stress response, immune functions, electrolyte homeostasis, growth, development, and reproductive success (Katsu and Iguchi, 2016; Rolland et al., 2012). Despite that cortisol levels have not been measured in this population, pathological observations may suggest that this population is under chronic stress. For instance, a high prevalence of adrenal lesions (i.e., cortical hyperplasia, cortical and medullary nodular hyperplasia, and serous cysts) was noted in necropsied male SLE belugas (Lair et al., 1997).

Moreover, the death of 19% of adult females necropsied between 1983 and 2012 was attributed to complications occurring during or shortly after birth (i.e., dystocia, presence of full-term fetus in the uterus or its engagement in the birth canal with signs of active labor, and intra-uterine infection or traumas) (Lair *et al.*, 2016).

2.6.2.4 Other metabolic axes

Star, a key gene involved in steroidogenesis, was positively correlated with concentrations of HBB, and negatively associated with Dec-604 CB in male SLE belugas. As observed with Hsd11\beta2 and Nr3c1 transcripts, HBB and Dec-604 CB concentrations were oppositely correlated to *Star*. The role of the steroidogenic acute regulatory protein (Star) is to transport cholesterol across the inner mitochondrial membrane for conversion to pregnenolone (Stocco, 2001), and subsequently to a variety of steroid hormones (e.g., cortisol, progesterone, androgens, and estrogens). The Star protein represents an important rate-limiting step in steroidogenesis; an alteration of its expression could impact homeostasis of circulating steroid hormones. A few in vitro studies in human and rodent cells have reported negative effects of PCBs (Xu et al., 2006) and biocides (e.g., lindane and glyphosate; Harvey et al., 2007) on the expression of Star. In male rodents, alteration of *Star* transcription may lead to a reduction of hormonal signaling or responsiveness of the testis at both the fetal and adult stages, and a decrease in testosterone synthesis (Clark and Cochrum, 2007). Although results may be indicative of a potential disruption of the Star protein by HBB and/or Dec-604 CB in male SLE belugas, more information needs to be obtained (e.g., steroid hormone and Star protein levels) in order to confirm whether organohalogens exert steroid disruption in SLE belugas through alteration of Star activity.

Finally, the two genes that encode for the proteins β -Actin (*Actb*) and α -Tubulin (*Tub*) were negatively correlated with Dec-604 CB concentrations in blubber of male SLE belugas. β -Actin is a monomer of microfilaments and α -Tubulin of microtubules, two

structural constituents of the cytoskeletal system (Goodman and Zimmer, 2008). Thus, in addition to being potentially involved in the disruption of the corticosteroid axis, Dec-604 CB might interfere with cellular mechanisms in SLE male belugas. Disruption of the cellular cytoskeleton, responsible for essential cell functions, may result in perturbed embryonic and nervous system development during which movement, motility, and division of cells are essential (Hargreaves *et al.*, 2014). *In vitro* studies involving neurotoxic compounds such as PCBs and PBDEs suggest that these toxic substances may act by altering cytoskeletal functions (Alm *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2007). However, no significant correlations were found between PBDE or PCB concentrations, and *Actb* and *Tub* transcript levels in male SLE belugas.

2.7 Conclusions

This study presents multiple evidences that several POPs as well as selected emerging HFRs that accumulate in the blubber of male SLE belugas and female minke whales may affect the regulation of the thyroid and/or steroid axes, although no cause-effect linkages could be established between organohalogen exposure and endocrine perturbation. In fact, a number of potentially confounding variables (e.g., age, nutritional status, other unmeasured contaminants, etc.) may have influenced these correlations. The analysis of genomic markers alone is insufficient to predict or diagnose effects related to contaminant exposure. Markers at other levels of the biological organization such as hormone titers and/or measurement of proteins and metabolites are essential to improve our understanding of the mechanisms of action of these toxic chemicals. Biopsy sampling represents a valuable technique in ecotoxicological studies on large marine mammals, especially for populations of conservation concern. However, the collection of sufficient tissue to conduct multiple analyses remains a major challenge for free-ranging cetaceans. While a uniform sample in terms of sex or age composition may represent an asset for clarifying trends or

eliminating some confounding factors, sampling only a fraction of a population may also add complexity to result interpretation and extrapolation at the population level. Toxicological effects of HBB and Dec-604 CB also need to be better understood. Moreover, attention should be directed to degradation products of certain POPs (e.g., hydroxylated PCBs and PBDEs) as these metabolites that have been shown to disrupt the activity of thyroid or estrogen receptors (Kitamura *et al.*, 2005 ; Kojima *et al.*, 2009) and induce endocrine disrupting effects (Dhakal *et al.*, 2018 ; Song et al., 2008), have been detected in some populations of cetaceans including SLE belugas (McKinney *et al.*, 2006).

2.8 Acknowledgments

This study was funded primarily by the National Contaminants Advisory Group, Fisheries and Oceans Canada. Supplemental funding was provided by Environment and Climate Change Canada. We thank M. Moisan, T. Perrero, G. Gambaro, D. Duengen, J. Brantschen, and Y. Morin as well as Meriscope volunteers for sample collection and/or handling. We would also like to thank C. Guimond, R. Plante and P. Béland, and Dr S. Lair for sampling carcasses over the years. We extend our appreciation to L. Wang for chemical analyses, M. Giraudo for assistance with genomic analyses, and P. Gagnon for advices with statistics.

2.9 Supplementary material

Supplementary material can be found in Annexe B.

CHAPITRE III

METABOLOMIC PROFILES OF THE ENDANGERED ST. LAWRENCE ESTUARY BELUGA POPULATION AND ASSOCIATIONS WITH ORGANOHALOGEN CONTAMINANTS

Antoine E. Simond, Magali Houde, Véronique Lesage, Robert Michaud, Jonathan Verreault

Manuscrit publié

<u>Année :</u> 2020

Journal : Science of the Total Environment

<u>N° DOI :</u> 10.1016/j.scitotenv.2020.137204

Conférences : 2 nationales et 1 internationale (3 présentations orales)

3.1 Résumé

La population de béluga (Delphinapterus leucas) qui réside dans l'estuaire du Saint-Laurent (ESL ; Est du Canada) est en déclin. Les concentrations élevées d'une vaste gamme de contaminants organohalogénés dans leurs tissus pourraient jouer un rôle dans le non-rétablissement de cette population qui est en voie de disparition. Il a été rapporté que les organohalogénés pouvaient entraver la régulation de plusieurs métabolites issus de réactions cellulaires chez les mammifères, tels que les acides aminés et les acides gras. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'étudier, à partir de 40 biopsies (peau/gras) de bélugas mâles de l'ESL, les relations entre les concentrations dans le gras d'une sélection de composés organohalogénés (biphényles polychlorés, pesticides organochlorés, paraffines chlorées à chaîne courte (PCCC), polybromodiphényléthers et certains retardateurs de flamme émergents), et les concentrations cutanées de métabolites cibles (21 acides aminés, 22 amines biogènes, 18 acides gras et 17 métabolites énergétiques). Une analyse de partitionnement de données basée sur les profils métabolomiques a permis de distinguer deux principaux sous-groupes de bélugas ; l'un constitué d'une majorité d'individus échantillonnés dans le secteur amont de leur habitat estival et l'autre en provenance majoritairement du secteur aval. Ces résultats indiquent que des facteurs écologiques tels que la disponibilité des proies et la composition du régime alimentaire peuvent influencer les profils des métabolites du béluga. De plus, les concentrations de PCCC chez les bélugas mâles de l'ESL étaient également corrélées négativement avec celles de quatre acides gras insaturés (C16:1 ω 7, C22:5 ω 3c1, C22:5 ω 3c2, et C22:6 ω 3), et positivement avec celles de l'acétylornithine (amine biogène). Ces résultats suggèrent que dans cette population de bélugas, plusieurs fonctions biologiques telles que le métabolisme des lipides pourraient être des cibles potentielles des organohalogénés accumulés. Ceci renforce également notre compréhension des risques d'une exposition élevée à des organohalogénés sur la santé des cétacés. Nos résultats soulignent également la nécessité de prendre en compte des facteurs écologiques (p. ex., régime alimentaire et utilisation de l'habitat) dans les études métabolomiques.

Mots-clés: mammifère marin; métabolomique; retardateur de flamme halogéné; organochloré; paraffine chlorée à chaîne courte; métabolisme des lipides.

3.2 Abstract

The small endangered beluga (Delphinapterus leucas) population residing in the St. Lawrence Estuary (SLE; Eastern Canada) is declining. The elevated tissue concentrations of a wide range of organohalogen contaminants might play a role in the non-recovery of this whale population. Organohalogens have been reported to impair the regulation of several metabolic products from cellular reactions in mammals such as amino acids and fatty acids. The objective of this study was to investigate a suite of organohalogens including polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, shortchain chlorinated paraffins (SCCPs), polybrominated diphenyl ethers, and selected emerging flame retardants in blubber (biopsy) collected from 40 SLE male belugas, and their relationships to skin concentrations of targeted metabolites (i.e., 21 amino acids, 22 biogenic amines, 18 fatty acids, and 17 energy metabolites). A cluster analysis based on metabolomic profiles distinguished two main subgroups of belugas in the upper and lower sector of their summer habitat in the SLE. These results indicate that ecological factors such as local prey availability and diet composition played a role in shaping the metabolite profiles of belugas. Moreover, SCCP concentrations in SLE male belugas also correlated negatively with those of four unsaturated fatty acids $(C16:1\omega7, C22:5\omega3c1, C22:5\omega3c2, and C22:6\omega3)$, and positively with those of acetylornithine (biogenic amine). These findings suggest that biological functions such as lipid metabolism represent potential targets for organohalogens in this population, and further our understanding on the health risks associated with elevated

organohalogen exposure in cetaceans. Our results also underscore the need to consider ecological factors (e.g., diet and habitat use) in metabolomic studies.

Keywords: marine mammal; metabolomic; halogenated flame retardant; organochlorine; short-chain chlorinated paraffin; lipid metabolism.

3.3 Introduction

The St. Lawrence Estuary (SLE; Eastern Canada) is known to be an important feeding ground for many marine mammal species, including a small resident population of belugas (Delphinapterus leucas) (Lesage et al., 2007; Mosnier et al., 2010). A decline in population size of approximately 1% per year has been documented from the early 2000s to 2012 at a time when it was estimated at 889 individuals (Mosnier et al., 2015). This declining trend has likely continued since this last census given the abnormally elevated number of calves found dead since 2008 (DFO, 2017). As a result, the status of this population was changed from threatened to endangered in 2014 by the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada (COSEWIC, 2014a), a status echoed under the Species at Risk Act in 2017 (DFO, 2017). Contaminant exposure, noise pollution, disturbance from recreational and whale-watching vessels, toxic algal blooms, food scarcity, and climate warming have been identified as factors potentially contributing to the non-recovery of this population (DFO, 2014). The SLE is part of the St. Lawrence Seaway and is located downstream of the Laurentian Great Lakes and St. Lawrence River in Canada and the USA where several large cities and agricultural regions are found, thus chronically exposing SLE belugas to multiple organic and inorganic contaminants that may accumulate in their tissues.

Since the 1980s, elevated concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine (OC) pesticides and industrial by-products have been reported in the

blubber of SLE belugas (Lebeuf *et al.*, 2014a ; Sergeant, 1980). However, since their ban in Canada more than four decades ago, PCB and OC pesticide concentrations have declined markedly in SLE beluga blubber (Lebeuf *et al.*, 2014a). In contrast, levels of a widely used halogenated flame retardant (HFR) class, the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), increased exponentially during this period in SLE beluga blubber, reaching a peak in the mid-1990s (Lebeuf *et al.*, 2014a ; Simond *et al.*, 2017). PBDE levels have remained stable in blubber of this population up until the last assessment that included samples from 2013 (Simond *et al.*, 2017). The addition of PBDE commercial mixtures (i.e., Penta-, Octa-, and Deca-BDE) to the Annex A of the Stockholm Convention, 2009, 2017) led to market usage of alternative chemicals known as emerging HFRs (Covaci *et al.*, 2011). Several of these chemicals (e.g., chlordene plus, dechlorane-602 and -604 Component B, and hexabromobenzene) were recently quantified in the blubber of SLE beluga carcasses (Simond *et al.*, 2017).

Despite the marked temporal decline of PCB and OC pesticide concentrations in SLE beluga blubber, concentrations of these legacy organohalogens remain several-fold greater than PBDEs or any other HFRs (Simond *et al.*, 2019). Other chemicals such as short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) were quantified in SLE beluga blubber at concentrations 100-fold lower than PCBs in the late 1980s (Tomy *et al.*, 2000). SCCPs are complex mixtures of alkanes of varying chain length (i.e., C₁₀ to C₁₃) and chlorine content (30-70% by mass) that have been used mainly as lubricant, metal-cutting fluid, plasticizer, and flame retardant (Feo *et al.*, 2009). SCCPs are listed as toxic substances under the Canadian Environmental Protection Act, and their manufacture, use, sale or import are prohibited in Canada since 2012 (Canada Gazette, 2013). SCCPs are also listed under Annex A of the Stockholm Convention on POPs since 2017 (Stockholm Convention, 2017). These compounds have decreased significantly in lake trout (whole homogenate) from lake Ontario in the Laurentian Great Lakes between 2001 and 2011

(Saborido Basconcillo *et al.*, 2015). However, SCCP trends in belugas or any other species from the SLE have not been investigated.

Several of the organohalogens reported in SLE beluga blubber (i.e., PCBs, OC pesticides, PBDEs, emerging HFRs, and SCCPs) may represent a threat to their health as many of these chemicals are known to disrupt the regulation of thyroid and steroid axes in human, rodents, and marine mammals (e.g., Liu et al., 2016a; Okoro et al., 2017; Reijnders et al., 2009; Zhang et al., 2016b). As such, plasma concentrations of PCBs, PBDEs and OC pesticides have been correlated with several endocrine variables (i.e., plasma steroid and thyroid hormone levels and/or liver thyroid-related gene transcripts) in Fennoscandian and Norwegian Arctic ringed seals (Phoca hipsida) (Routti et al., 2010) and Norwegian Arctic polar bears (Ursus maritimus) (Ciesielski et al., 2017). Recently, concentrations of PCBs, OC pesticides and emerging HFRs in SLE male beluga blubber (biopsy) were shown to correlate with skin transcript levels of genes coding for nuclear receptors and proteins involved in the regulation of thyroid (*Dio2*) and steroid hormones (*Esra*, *Hsd11\beta2*, and *Nr3c1*) as well as the metabolism of xenobiotics (Ahr) (Simond et al., 2019). Consistent findings have been reported in studies of transient and northern resident killer whales (Orcinus orca) from British Columbia (Canada) and belugas from the Canadian Arctic, which showed correlations between PCB concentrations and transcripts of genes involved in the regulation of thyroid and estrogen axes as well as xenobiotic responses (Buckman et al., 2011; Noël et al., 2014).

Several studies suggest that metabolomic profiles in mammals may be impacted by exposure to organohalogen contaminants. For instance, correlations between blubber concentrations of PCBs, OC pesticides and PBDEs, and lipid metabolism-related compounds (e.g., phosphatidylcholines and arachidonic acid) were reported in two Canadian Arctic polar bear sub-populations (Morris *et al.*, 2019). Similarly, serum

levels of amino acids involved in energy, lipid, amino acid or immune pathways were altered in humans exposed to PCBs and mice dosed with BDE-209 (>97% of Deca-BDE mixture) (Eguchi *et al.*, 2016, 2017). Additionally, *in vitro* studies in rodent have shown that SCCP dosage induced liver damage and fatty acid degradation, and affected several lipid metabolic pathways (Geng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Wyatt *et al.*, 1993). Lipids play an essential role in energy storage, buoyancy and temperature regulation in cetaceans, while fatty acids are involved in the regulation of multiple biological processes including membrane structure and functions, intracellular signaling pathways, gene expression, and production of bioactive lipid mediators (Calder, 2015). Therefore, whale populations that are highly exposed to organohalogens might experience lipid metabolism disorders that may in turn impact energetic metabolism, and ultimately the animal's health and reproductive success (Iverson and Koopman, 2018).

Investigating the mechanisms of toxicity associated with environmental contaminant exposure in free-ranging cetaceans is challenging as it requires access to fresh tissue via biopsy sampling. These samples are generally limited in size (few grams per biopsy) and number of individuals they can be collected from. As a result, a growing number of studies investigating contaminant exposure-related effects in cetaceans rely on "omics" methods (Mancia, 2018). These approaches require small amounts of tissue and are amenable to multiple analyses, yielding a maximum of biological information to further our understanding on the mechanisms of toxicity and related metabolic pathways (Godard-Codding and Fossi, 2018). As such, metabolomic profiling allows for screening a large suite of low-molecular weight (< 1000 Da) metabolites (e.g., amino acids, fatty acids, amines, and sugars) produced by cells that are specific to certain metabolic pathways (Burgess *et al.*, 2014). Given that diet is the main uptake pathway for contaminants in marine mammals, and that it can also influence concentrations of certain metabolites such as amino acids or fatty acids (Arab, 2003 ;

Poesen *et al.*, 2015), feeding ecology must therefore be considered when assessing metabolomic profiles. The summer habitat of SLE belugas is highly heterogeneous in terms of bathymetry, salinity, and temperature (Therriault *et al.*, 1990). These characteristics may influence the structure of prey communities, including their relative abundance and diversity. This is expected to influence metabolomic and contaminant profiles of SLE belugas depending on their prey selection, degree of dietary specialization, and preferred habitat for foraging.

The objective of this study was to examine the potential mechanisms of toxicity and metabolic disruption in the highly organohalogen-exposed SLE beluga population. A targeted metabolomic approach was used to characterize profiles of amino acids, biogenic amines, fatty acids, sugars and energy metabolites in skin of SLE beluga males, and to examine their relationships with blubber concentrations of selected organohalogens (PCBs, OC pesticides, PBDEs, emerging HFRs, and SCCPs), while accounting for ecological factors such as habitat use.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Field sampling

Given the known effect of sex on plasma biochemistry (e.g., triglyceride, glucose, and cholesterol levels) and organohalogen concentrations in beluga tissues (Lebeuf *et al.*, 2014a; Norman *et al.*, 2013; St. Aubin *et al.*, 2001), only male SLE belugas were included in this study. A total of 40 males were biopsied (skin and blubber) in September 2015 and 2016 using sharpened 8 x 25 or 8 x 35 mm stainless steel tips precleaned with acetone, 95% ethanol and Virkon, and fired from a MK24C Paxarms dart projector with .22 caliber blank charges (Domett, New Zealand). Epidermis and connective tissues were generally predominant relative to blubber in biopsies due to skin thickness and occasional oblique hit angle of the dart; "blubber" therefore refers

hereafter to the hypodermis and the intermediate fibrous layer between the epidermis and blubber (i.e., dermis). Immediately after sampling, blubber was separated from the epidermis using disposable DNAse/RNAse-free scalpels and forceps pre-cleaned with acetone and 70% ethanol, wrapped in solvent-rinsed aluminum foil, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored in a Cryovial at -80°C in the laboratory until chemical analysis (**Section 3.4.2**). The epidermis was flash-frozen in liquid nitrogen in a Cryovial and stored at -80°C in the laboratory until sexing according to published methods (Simond *et al.*, 2019) as well as metabolomic analysis (**Section 3.4.3**). The GPS coordinates of the biopsy sampling location were recorded for each beluga. Age of the animals was not determined.

This study was conducted under permits granted by Parks Canada (SAGMP-2013-14734) and Fisheries and Oceans Canada (IML-2015-13 and IML-2016-021). Sampling methods were approved by the animal care committee of Fisheries and Oceans Canada, which is accredited by the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada).

3.4.2 Chemical analyses

Blubber samples (30-100 mg) were analyzed for 41 PCBs, 23 OC pesticides and industrial by-products, 35 PBDEs, 11 emerging HFRs, and 24 C_{10} to C_{13} SCCPs (**Tables C1 to C5**). Sample extraction and clean-up was performed according to methods described by Simond *et al.* (2017) without modification. Briefly, blubber samples were homogenized with diatomaceous earth and spiked with 100 µL of a 200 ng/mL internal standard solution (BDE-30, BDE-156, ¹³C-BDE-209, and ¹³C-*anti*-DP). The total lipid content of samples was determined gravimetrically. Identification and quantification of PBDEs and emerging HFRs was performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent

Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA, USA) operating in electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI).

Extracted blubber fractions generated for PBDE/HFR analysis (1st aliquot) were spiked with performance standards consisting of neutral PCBs (CB-9, -136, and -204) and polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene-d8, phenanthrene-d10, and chrysene-d12), and reanalyzed for PCBs and OC pesticides by AGAT Laboratories (Montreal, QC, Canada). Identification and quantification of PCBs was performed using a 6890N GC coupled to an 5975B Inert mass selective detector (GC/MSD) (Agilent Technologies) operating in selected ion monitoring mode (SIM), while for OC pesticides this was performed using a 7890A GC coupled to a 5975C MSD (Agilent Technologies) operating in SIM mode. The analytical column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m) was a fused silica RXI-5SIL MS capillary column (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA).

Blubber extracts generated for PBDE/HFR analysis (2nd aliquot) were also analyzed for C₁₀-C₁₃ SCCPs by the National Laboratory for Environmental Testing, Environment and Climate Change Canada (Burlington, ON, Canada). Analytical method was adapted from Tomy *et al.* (1997), and quantification was performed using a Q ExactiveTM GC OrbitrapTM GC-MS/MS system (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada) with a TraceGOLD TG-5SilMS GC column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada). The instrument operated in negative chemical ionization mode at a mass resolution of 60,000. A total of 24 SCCP mass-to-charge ratio (*m/z*) M-CL ions were extracted from total ion chromatograms (**Table C5**). Specific *m/z* values corresponding to the molecular formulas of [M – Cl]⁻ ions of all major C₁₀-C₁₃ formula groups were monitored concurrently. Corrections were made for the fractional abundance of specific *m/z* values and number of Cl atoms. Quantification was performed by comparing the response for specific m/z values in the sample to that of an authentic standard, which was a C₁₀-C₁₃ technical mixture containing 55.5% Cl (DRE-X23105500CY, LGC Standards, Augsburg, Germany).

Quality control and assurance procedures included analysis of procedural method blanks, duplicate blubber samples and standard reference material (SRM; NIST 1945 Whale Blubber, Gaithersburg, MD, USA) for each batch of ten samples. Internal standards (BDE-30, BDE-156, ¹³C-BDE-209, and ¹³C-*anti*-DP) were used for PBDE/HFR quantification, and thus all analytes were inherently recovery-corrected. Concentrations of PCBs and OC pesticides were corrected using recovery percentages of the internal standard ¹³C-*anti*-DP. Internal and performance standard recoveries can be found in **Table C6**. The percentages of variation from certified concentrations in SRM are available in **Table C7**. Information on methods limits of detection (MLODs) and quantification (MLOQs) for SCCP, PCB/OC and PBDE/HFR compounds can be found in Supplementary Materials. Blank contribution in samples for SCCPs required a blank correction for all congeners. All contaminant concentrations are reported in **Table C8**.

3.4.3 Metabolomic analysis

A total of 21 amino acids, 22 biogenic amines, total hexose, 18 fatty acids (FAs), and 17 energy metabolites were analyzed in skin (**Table C9**) by SGS AXYS (Sidney, BC, Canada) following a targeted metabolomic approach described in Benskin *et al.* (2014) without modification. Briefly, metabolites were extracted from skin samples ground in methanol using a bead blender. Amino acids and biogenic amines were derivatized prior to analysis. All metabolites were quantified using an Agilent 1100 high performance liquid chromatography (HPLC) system coupled to an API4000 triple quadrupole MS (Applied Biosystems/Sciex, Concord, ON, Canada). Quantification was made by isotope dilution using authentic standards and identical (or homologous)

isotopically-labeled internal standards (**Table C9**), and a quadratic metabolite-specific calibration curve. Specifically, at the start of a MS analysis, eight calibration samples containing internal and authentic standards were run. Ratios of the authentic standard peak areas and the surrogate peak areas were used to create a calibration curve specific to each metabolite. MLODs and MLOQs were based on the calibration samples containing the lowest metabolite concentrations, and were specific to both the metabolite and the sample itself.

Quality control and assurance procedures comprised triplicate analyses of procedural method blanks and SRM (Oncorhynchus nerka liver; SC6106). Recovery percentages of internal standard in the SRM varied between 88% and 105% for biogenic amines and amino acids (acetylornithine, alanine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, methionine, serine, and taurine), between 77% and 108% for fatty acids (C20:4 ω 6, C20:5 ω 3 and C22:6 ω 3), and between 29% and 84% for energy metabolites (hexosephosphate and succinic acid). Metabolites that were detected in one or more blank samples at concentrations >30% of the mean sample concentration (i.e., FA C16:0, FA C18:2, spermine, phosphoenolpyruvate, and kynurenine) or that showed > 30%variation in concentrations between triplicates in the SRM (i.e., succinic acid, hexose phosphate, tetrose-phosphate, spermidine, and cAMP) were excluded from further analyses. Analytes that could not be quantified reliably based on the calibration curve from the standards were also excluded from further analyses (i.e., hexose-phosphate and lactic acid). The final dataset therefore included 46 metabolites (21 amino acids, eight biogenic amines, total hexose, 10 fatty acids, and six energy metabolites), which were all blank-corrected (Table C10).

3.4.4 Statistical analysis

Because the distribution of most variables did not meet the assumption of normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Bartlett's test) even after log-

transformation, non-parametric tests were used unless stated otherwise. Only organohalogen compounds and congeners for which at least 65% of the SLE beluga samples had values above the MLOQs (PBDEs/HFRs) or MLODs (SCCPs and PCBs/OC pesticides) were included in statistical analyses (**Tables C1 to C5, and C10**). Concentrations of Σ_{18} SCCP, the six major PBDE and PCB congeners and all emerging HFRs and OC pesticides that were detected in $\geq 65\%$ of SLE male beluga blubber samples were used for comparisons between SLE beluga groups (see below). In addition to the 46 metabolites, the ratios of omega-3 to omega-6 fatty acids ($\omega 3:\omega 6$) were also compared between individuals as it can be indicative of health and/or dietary changes (Käkelä and Hyvärinen, 1998 ; Simopoulos, 2016). The statistical effect of sampling year was not taken into account given the low annual sample size and consistency in sampling period (September) between the two sampling years.

A series of multivariate analyses using log-transformed metabolite concentrations were used to examine similarity patterns among SLE male belugas. A principal component analysis (PCA) and a hierarchical cluster analysis on principal components (HCPC) were performed using the package *FactoMineR* (Lê *et al.*, 2008). HCPC is an unsupervised classification method that emphasizes the similarities between individuals. A hierarchical tree was generated using Euclidian distances, and the optimal number of clusters was determined based on the highest relative loss of inertia $(i_{(cluster n)} - i_{(cluster n+1)})$. Differences in organohalogen and metabolite concentrations between clusters were examined only for the two clusters (groups) showing the highest number of individuals using a Mann-Whitney-Wilcoxon U test. Volcano plots were then used to highlight variables that significantly differed (i.e., fold-change > 1.5; $p \le$ 0.05) between these two main clusters.

The strength of the relationships between contaminant and metabolite concentrations was also examined using Spearman's rank correlation. To limit the number of simultaneous hypothesis testing and family-wise error rate, organohalogens were grouped into three chemical classes for this specific analysis: Σ_{34} HFR (sum of PBDEs, HBB, Dec-604 CB, DP, and PBEB), Σ_{18} SCCP and Σ_{41} PCB/OC (sum of PCBs, HCB, *p*,*p*'-DDE, and *trans*-nonachlor).

To reduce risks of Type I errors, *p*-values were adjusted using the classical one-stage false discovery rate (FDR) method following Pike (2011) and using a FDR of 0.05. Raw *p*-values were considered significant only if they remained significant after FDR adjustment. Adjusted *p*-values were referred to as *q*-values to avoid confusion with raw *p*-values. All statistical analyses were carried out using R version 3.2 (R Core Team, Vienna, Austria) and a level of significance set to $\alpha = 0.05$.

3.5 Results

3.5.1 Metabolite concentrations in SLE male belugas

Among all metabolite classes determined in SLE male beluga skin, total hexose was the most abundant ($41 \pm 1.9\%$), followed by amino acids ($34 \pm 0.7\%$), biogenic amines ($13 \pm 0.3\%$; mean ± SEM), fatty acids ($10 \pm 0.7\%$), and energy metabolites ($2.5 \pm 0.1\%$). The five individual metabolites that had the greatest concentrations, accounting for 67% of the sum of all metabolites, were in decreasing order: total hexose ($3,963 \pm 182 \ \mu g/g$ ww; mean \pm SEM), taurine ($1,078 \pm 26.0 \ \mu g/g$ ww), alanine ($533 \pm 13.2 \ \mu g/g$ ww), valine ($447 \pm 11.9 \ \mu g/g$ ww), and oleic acid ($418 \pm 34.2 \ \mu g/g$ ww).

The HPCP analysis based on all metabolite concentrations determined in SLE male beluga skin yielded three clusters (**Figure 3.1**). Mapping biopsy sampling locations revealed that male belugas categorized in cluster 1 were sampled mainly downstream of the Saguenay River in the Lower Estuary (referred hereafter to "downstream belugas"; n = 17). Belugas in cluster 2 were sampled mainly in the sector of the SLE

located just off the Saguenay River mouth ("intermediary belugas"; n = 5), while those in cluster 3 were sampled mainly in the Upper Estuary upstream of the Saguenay River, or in or off the Saguenay River mouth ("upstream belugas"; n = 18) (**Figure 3.2**).



Figure 3.1 Hierarchical tree (A) and score plot with 95% confidence ellipses from the HCPC and PCA analyses (B) generated based on skin metabolite concentrations of male St. Lawrence Estuary belugas. Following clusters were identified: cluster 1 (red; n = 17), cluster 2 (green; n = 5), and cluster 3 (blue; n = 18).

Each SLE male beluga cluster generated through HPCP analysis was characterized by concentrations of certain metabolites that differed significantly from the overall mean (**Table C11**). Specifically, male belugas sampled downstream of the Saguenay River generally exhibited greater concentrations of fatty acids (except stearic acid), whereas those sampled in the upstream sector had lower concentrations of these same fatty acids. In contrast, male belugas in the intermediary sector exhibited distinct amino acid profiles, with lower concentrations of nine amino acids. Given that the intermediary group of male belugas was constituted of only five individuals, this group was not used further in statistical analyses.



Figure 3.2 Biopsy sampling sites of male belugas in the St. Lawrence Estuary (SLE; n = 40) categorized using hierarchical cluster analysis on principal components analysis of skin metabolite concentrations. Clusters generated from this analysis are identified using different colors and corresponded to specific sectors in the SLE: upstream (blue dots) and downstream (red dots) of the Saguenay River mouth, and in or off the Saguenay River mouth (green dots).

Beluga males sampled in the sectors of the SLE located upstream and downstream of the Saguenay River mouth differed in concentrations of several metabolites (**Figure 3.3A**). With the exception of stearic (C18:0) and osbond acids (C22:5 ω 6), concentrations of fatty acids (1.7- to 3.4-fold) and the two energy metabolites α -

ketoglutaric and oxaloacetic acids (1.6-fold) were significantly greater ($252 \le U \le 306$; p < 0.001) in male belugas sampled downstream compared to upstream of the Saguenay River mouth. In contrast, concentrations of the biogenic amine acetylornithine (Ac-Orn) were 1.8-fold greater in upstream belugas (U = 12; p < 0.001). The $\omega 3:\omega 6$ fatty acid ratios did not differ between the upstream and downstream male belugas (p = 0.48).



Figure 3.3 Volcano plots showing concentrations of metabolites (A) and organohalogens (B) that significantly differed (fold-change > 1.5; $p \le 0.05$) between upstream (n = 18) and downstream (n = 17) SLE male belugas. Fold-changes are expressed relative to individuals sampled in the upstream sector, i.e., a positive fold-change indicates higher concentrations in downstream belugas, while a negative fold-change indicates higher concentrations in upstream belugas. Concentrations that differed significantly between male belugas sampled upstream and downstream of the Saguenay River are identified in green and those that significantly differed although with a lower magnitude (fold-change < 1.5) are identified in red.
3.5.2 Organohalogens in blubber of SLE male belugas

Blubber concentrations of Σ_{18} SCCP and major PCB/OC pesticide and HFR compounds are listed in **Table 3.1**. Σ_{18} SCCP represented 74 ± 15% (mean ± SEM) of the sum concentrations of all organohalogens, followed by Σ_{41} PCB/OC (24 ± 3.1%) and Σ_{34} HFR (1.7 ± 0.1%). A total of 18 SCCP congeners were detected in all but two individuals. Σ_5C_{11} Cl₅₋₉ (60 ± 1.9%) contributed largely to Σ_{18} SCCP concentrations, followed by Σ_5C_{12} Cl₅₋₉ (18 ± 1.0%), Σ_5C_{10} Cl₅₋₉ (13 ± 2.0%) and Σ_3C_{13} Cl₅₋₇ (2.8 ± 2.9%). The five most abundant SCCP congeners were in decreasing order: C₁₁Cl₆ (1,372 ± 334 ng/g ww), C₁₁Cl₅ (1,049 ± 165 ng/g ww), C₁₁Cl₇ (1,022 ± 428 ng/g ww), C₁₀Cl₆ (824 ± 224 ng/g ww), and C₁₀Cl₇ (660 ± 173 ng/g ww).

Table 3.1 Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g ww) and ranges of SCCPs, PCBs and OC pesticides, and HFRs determined in the blubber of male St. Lawrence Estuary belugas (n = 40). Means were calculated only when concentrations exceeded the method limit of detection (MLOD) or quantification in more than 65% of the beluga samples.

	Mean ± SEM
Blubber lipid content (%)	13.5 ± 1.17 (1.50 - 39.6)
Short-chain chlorinated paraffins	
$\Sigma_{18} SCCP^a$	6,545 ± 1,325 (<mlod -="" 30,745)<="" td=""></mlod>
PCBs and OC pesticides ^b	
$\Sigma_{37}PCB^{c}$	$1,386 \pm 162 (150 - 4,171)$
НСВ	27.0 ± 2.93 (<mlod -="" 88.5)<="" td=""></mlod>
<i>p,p</i> '-DDE	586 ± 86.3 (55.8 - 2,456)
Mirex	(<mlod -="" 249)<="" td=""></mlod>
trans-nonachlor	119 ± 13.9 (<mlod -="" 395)<="" td=""></mlod>
Σ_{41} PCB/OC	2,154 ± 273 (254 - 6,961)
HFRs ^b	
Σ_{29} PBDE ^d	$149 \pm 12.6 (28.9 - 386)$
PBEB	0.20 ± 0.04 (< MLOD - 1.60)

HBB	$0.92 \pm 0.14 \ (< MLOD - 3.70)$
Dec-604 CB	$1.02 \pm 0.12 (< MLOD - 3.50)$
syn-DP	0.53 ± 0.18 (< MLOD - 6.50)
anti-DP	$1.93 \pm 0.46 \ (0.27 - 12.8)$
ΣDP ^e	$2.46 \pm 0.59 \; (0.36 - 19.3)$
Σ ₃₄ HFR	$154 \pm 13.0 (30.6 - 395)$

^a Sum of C₁₀Cl₅, C₁₀Cl₆, C₁₀Cl₇ C₁₀Cl₈, C₁₀Cl₉, C₁₁Cl₅, C₁₁Cl₆, C₁₁Cl₇, C₁₁Cl₈, C₁₁Cl₉, C₁₂Cl₅, C₁₂Cl₆, C₁₂Cl₇, C₁₂Cl₈, C₁₂Cl₉, C₁₃Cl₅, C₁₃Cl₆ and C₁₃Cl₇. Congeners that were not detected in any samples: C₁₀Cl₁₀, C₁₁Cl₁₀, C₁₂Cl₁₀, C₁₃Cl₈, C₁₃Cl₉, and C₁₃Cl₁₀.

Concentrations of PCBs, OC pesticides and industrial by-products, PBDEs and emerging HFRs have been reported in a companion investigation that included the majority of the present SLE male beluga samples (Simond *et al.*, 2019), and thus will not be described in details here. Briefly, concentrations of Σ_{37} PCB accounted for the greatest proportions ($64 \pm 7.6\%$; mean \pm SEM) of Σ_{41} PCB/OC, followed by *p*,*p*'-DDE ($27 \pm 4.1\%$), *trans*-nonachlor ($5.5 \pm 0.7\%$), and HCB ($1.2 \pm 0.1\%$). While Σ_{29} PBDE concentrations accounted for 97% of all HFRs, PBDEs were 14- and 43-fold lower than Σ_{37} PCB and Σ_{18} SCCP, respectively. The most abundant emerging HFR was Σ DP (sum of *syn*- and *anti*-DP), followed in decreasing order by Dec-604 CB, HBB, and PBEB.

Concentrations of two organohalogens significantly differed between male belugas sampled downstream and upstream of the Saguenay River mouth (Figure 3.3B and Table 3.2). Specifically, Σ_{18} SCCP concentrations were four-fold greater (U = 38; *p* < 0.001) in upstream relative to downstream male belugas. PBEB concentrations were 2.6-fold greater in male belugas sampled downstream compared to upstream (U = 161;

^b Partial data from Simond et al. (2019).

^c Sum of CB-17, -18, -28, -31, -33, -44, -49, -52, -70, -74, -82, -87, -95, -99, -101, -105, -110, -118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -156, -158, -170, -171, -177, -180, -183, -187, -191, -194, -195, -199, and -209. Congeners that were not detected in any samples: CB-169, -205, -206, and -208.

^d Sum of BDE-7, -10, -17, -28, -47, -49, -66, -77, -85, -99, -100, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -207, -208, and -209. Congeners that were not detected in any samples: BDE-15, -71, -119, -171, -205, and -206. ^e Sum of *svn*- and *anti*-DP.

p = 0.002). Σ_{34} HFR and Σ_{41} PCB/OC concentrations did not differ between these two beluga groups (p = 0.42 and 0.55, respectively).

Table 3.2 Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g ww) of the three main organohalogen classes determined in the blubber of male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary upstream (n = 18) and downstream (n = 17) of the Saguenay River.

	Upstream belugas	Downstream belugas
Σ_{34} HFR	146 ± 23.6	161 ± 17.7
$\Sigma_{41}PCB/OC$	$2,\!344\pm454$	$1,749\pm293$
$\Sigma_{18}SCCP$	$10,363 \pm 2,234$	$2,509 \pm 812$

3.5.3 Relationships between metabolites and contaminants

Blubber concentrations of Σ_{34} HFR, Σ_{41} PCB/OC and Σ_{18} SCCP in SLE male belugas were correlated with skin concentrations of several amino acids, hexose, biogenic amines, and fatty acids. However, only a few of these relationships remained significant after FDR adjustment (**Table C12**). Specifically, blubber Σ_{18} SCCP concentrations correlated positively with those of acetylornithine (biogenic amine) and negatively with those of four unsaturated fatty acids (C16:1 ω 7, C22:5 ω 3c1, C22:5 ω 3c2, and C22:6 ω 3) (**Figure 3.4**). The ω 3: ω 6 fatty acid ratios did not correlate with any contaminants (**Table C12**).



Figure 3.4 Correlations between log-transformed blubber concentrations (ng/g ww) of Σ_{18} SCCP and skin concentrations (ng/g ww) of A) acetylornithine, B) C16:1 ω 7, C) C22:5 ω 3c1, D) C22:5 ω 3c2, and E) C22:6 ω 3 in male belugas sampled in the St. Lawrence Estuary. Only correlations with raw *p*-values that remained significant after applying the false discovery rate criterion are presented. Adjusted *p*-values (*q*-values) are listed in **Table C12**.

3.6 Discussion

3.6.1 Organohalogen concentrations in male SLE belugas

Contaminant research and monitoring on the SLE beluga population over the last decades has focused primarily on PCBs, OC pesticides, and PBDEs (Lebeuf et al., 2014a; Simond et al., 2017). PCB concentrations have consistently dominated contaminant profiles in SLE beluga blubber despite their marked decline over the past 30 years. However, our results show that blubber concentrations of a previously investigated class of plasticizer and flame retardant, the SCCPs, largely surpass those of PCBs in this population. In fact, a previous study on SLE belugas reported SCCP concentrations in males found dead in 1988 (493 to 915 ng/g lw; Tomy et al., 2000) that were more than 65-fold lower than those reported in the present study. Assuming that blubber concentrations determined in beluga carcasses and biopsy samples are comparable on a lipid weight basis, this suggests a strong increase in SCCP concentrations over the past three decades in this population. Also, because the maximum lifespan of belugas is around 80 years (Lesage et al., 2014b; Stewart et al., 2006), SCCP exposure in certain older individuals may go back as far as the 1950s. Interestingly, Σ_{18} SCCP concentrations in SLE belugas from the present study were among the greatest reported in marine mammals worldwide: 3- to 1,800-fold greater than those reported in Indo-Pacific humpback dolphins (Sousa chinensis) and finless porpoises (Neophocaena phocaenoides) from the South China Sea (570 to 24,000 ng/g lw; Zeng et al., 2015), seals and harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Baltic Sea (34 to 300 ng/g lw; Yuan et al., 2019), polar bears and ringed seals from Greenland (370 to 2,700 ng/g ww; Vorkamp et al., 2017), polar bears from the Canadian Arctic (75 to 207 ng/g ww; Letcher et al., 2018), or humpback whales (Megaptera novæangliæ) foraging in Antarctic waters (10-46 ng/g lw; Casà et al., 2019). Moreover, present Σ_{18} SCCP concentrations were more than 300-fold greater than those documented during the 2000s in Canadian Arctic and Greenland beluga populations (Vorkamp *et al.*, 2019). Fish from lake Ontario and the St. Lawrence River also exhibit much lower SCCP concentrations (5 to 34 ng/g ww; Houde *et al.*, 2008; Saborido Basconcillo *et al.*, 2015) than SLE male belugas.

There is currently no information available on the temporal trends of SCCP concentrations in the St. Lawrence basin nor on recent production volumes and use of SCCPs in North America. Nevertheless, considering that the production and use of SCCPs have been regulated in Canada since 2012 (Canada Gazette, 2013) and in the USA since 2014 (US EPA, 2017), it can be predicted that SCCP concentrations will eventually decline in SLE beluga tissues. However, consumer goods imported to North America or in the waste-phase represent a non-negligible source of SCCPs (van Mourik *et al.*, 2016) that may significantly delay their decline in the environment. Given the toxicity of these compounds (e.g., oxidative stress, endocrine disruption, metabolism disturbance) (Wang *et al.*, 2019b), current elevated SCCP concentrations in male SLE beluga blubber can be regarded as preoccupying. Therefore, a continued attention should be paid on the temporal and spatial variations of these compounds in addition to the medium- and long-chain chlorinated paraffins that were not determined in the present study.

3.6.2 Differences in metabolites and contaminants in belugas between sectors of the SLE

Concentrations of metabolites that were significantly different between male belugas sampled upstream and downstream of the Saguenay River mouth in the SLE were mainly fatty acids, which were documented to originate primarily from dietary intake (Iverson *et al.*, 2004). This suggests the existence of ecological and/or hydrographic factors within this system that influence local prey availability and diet composition. The sector upstream of the Saguenay River in the SLE is characterized by shallow water (depth from 20 to 50 m), salinity ranging from 10 to 25‰ and high turbidity

(euphotic zone < 5 m), whereas the sector downstream of the Saguenay River exhibits more contrasting features: in its northern portion, the deep (> 300 m) Laurentian Channel ending abruptly at the mouth of the Saguenay river causes an upwelling of more saline (> 25%) and cold water near the surface, while the southern portion of the Lower Estuary is shallower and receives water flowing out of the Saguenay River and the Upper Estuary, and thus is warmer and less salty than water from the Laurentian Channel (Mosnier et al., 2010; Therriault et al., 1990). These characteristics likely lead to differences in community structure, although these are currently poorly described (but see de Lafontaine, 1990; Therriault et al., 1990). It was reported that the primary production is higher in the Lower Estuary compared to the Upper Estuary due to the intense tidally-induced mixing (upwelling) of surface freshwater and deep saltwater at the head of the Laurentian Channel, resulting in higher levels of nutrients (Simard, 2009). This productivity cascades through the trophic web, and attracts large marine predators such as whales (Lacroix-Lepage, 2018; Lavoie et al., 2000; Lesage et al., 2007; Marchand et al., 1999). The lower concentrations of acetylornithine in male belugas sampled downstream of the Saguenay River also suggest that these individuals rely on different prey, as it has been shown that levels of this biogenic amine could vary in serum of mammals depending on their diet (Ghaffari et al., 2019). While belugas are likely to move around between the different sectors of the SLE, differences in metabolite profiles between males sampled upstream and downstream suggest a certain level of fidelity to these sectors for foraging and relatively similar diet within these.

Diet and hydrographic differences between upstream and downstream sectors could also influence foraging behavior (e.g., deeper dives, feeding frequency, and amount of food ingested) of belugas, and consequently their metabolic activity. Several metabolites that had greater concentrations in belugas sampled in the downstream sector are involved in various energy metabolic pathways. For instance, oxaloacetic and α -ketoglutaric acids are involved in urea and citric cycles and the biosynthesis of amino acids, fatty acids, and proteins. Furthermore, the fatty acids C14:0, C16:1 ω 7, C18:1 ω 9, C22:5 ω 3c1 and C22:5 ω 3c2 can be synthesized both from biosynthesis of amino acids as well as diet (Iverson *et al.*, 2004; Iverson and Koopman, 2018). Consequently, differences in concentrations of these metabolites may reflect dietary sources exhibiting different contents of these fatty acids, and/or a differential biosynthesis or metabolic activity among groups of belugas from these two sectors. It has been shown in human that diet composition or physical activity can both affect plasma lipid and amino acid levels (Suárez *et al.*, 2017).

Differences in PBEB and Σ_{18} SCCP concentrations between upstream and downstream SLE male belugas could also be related to dietary differences. Moreover, co-ingestion of sediments while foraging on benthic organisms (e.g., polychaetes, plaice, and rattail) (Lesage et al., 2017) could represent a non-negligible source of exposure to these chemicals. Although PBEB and SCCPs have not been monitored in sediments or preys of belugas in the SLE, these contaminants are known to accumulate in sediments at occasionally elevated concentrations (Chen et al., 2011; Ganci et al., 2019) and biomagnify in aquatic food webs (Huang et al., 2019; Tao et al., 2019). Several studies have shown that sediments is a significant sink for SCCPs, and thereby exposure source for benthic and bottom-dwelling organisms (Ma et al., 2014b, 2014a; Sun et al., 2017). It can be suggested that male belugas using the Upper Estuary were exposed to greater levels of these contaminants given the higher proximity of the Upper Estuary to the Great Lakes compared to the Lower Estuary. Another hypothesis would be that benthic or demersal prey are more important in the diet of male belugas feeding primarily in the Upper Estuary. A better understanding of these differences within the SLE beluga population would require more data on the concentrations of these contaminants in sediments and prey.

Age could also influence metabolite and contaminant concentrations in SLE male belugas. Tsai et al. (2016) showed that serum biochemistry profiles changed with age in captive belugas in Taiwan. Similarly, hepatic levels of amino acids, fatty acids and energy metabolites varied depending on age class (i.e., adults vs. subadults) in American black bears (Ursus americanus) (Niemuth and Stoskopf, 2014). Organohalogen bioaccumulation is strongly related to age in male belugas as their excretion may be limited compared to females that can eliminate these via placental transfer and lactation (Cadieux et al., 2015; Desforges et al., 2012; Reijnders et al., 2018). Moreover, according to Michaud (1993), the sectors identified in the present study (i.e., upstream and downstream) generally are visited by herds of belugas with different gender composition and age structure during the summer. The sector upstream of the mouth of the Saguenay River is mostly frequented by small herds of adult females, juveniles and/or calves. Groups downstream of the Saguenay River mouth vary in size and are mainly composed of large adults (likely males) in the Laurentian Channel area, while in the southern portion the two types of herds are observed. As a result, male belugas sampled in the upstream sector of the SLE were likely younger than those sampled downstream given the higher occurrence of large adults in the downstream portion of the SLE. The greater concentrations of SCCPs quantified in male belugas (potentially younger) sampled in the upstream sector may indicate that these individuals likely were born from female belugas that had been more exposed to these chemicals compared to downstream belugas that may belong to younger generations. Conversely, PBEB concentrations may be greater in downstream male belugas (potentially older individuals) as there has been a decline in the production of this chemical in North America since 1986 (Hoh et al., 2005). Differences between belugas from the two sectors may therefore be at least partly age-related.

3.6.3 Correlations between contaminants and metabolites in belugas

Among all organohalogens quantified in SLE male beluga blubber, only SCCPs significantly correlated with skin metabolite concentrations. The correlations between SCCP and fatty acid concentrations in these belugas might indicate a disruption of lipid metabolism. Recently, rats orally dosed with SCCPs showed an increase in liver fatty acid oxidation leading to a decrease in their concentrations (mostly unsaturated and long-chain fatty acids), which was associated with an up-regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) (Gong *et al.*, 2019). PPAR α is a liganddependent transcription factor known to be involved in the β -oxidation of lipids (Kersten, 2014) that could be activated by SCCPs due to their efficient binding affinity to PPAR α (Gong *et al.*, 2019). Similarly, an up-regulation of fatty acid degradation also occurred in a human cell line (HepG2) and in liver of rats and mice dosed with SCCPs (Geng et al., 2015; Wyatt et al., 1993). A change in blubber fatty acid composition might alter their thermoregulatory capacity and ultimately survival. In addition of being a source of energy, fatty acids are also involved in other physiological processes such as the inflammatory response, insulation and buoyancy (Fritsche, 2015; Iverson and Koopman, 2018). For example, an increase in saturated fatty acid content may impact the health of belugas as these fatty acids are able to trigger hepatic lipotoxicity by inducing hepatocyte lipoapoptosis (Chen et al., 2018). In adult mice dosed with SCCPs via gavage, an up-regulation in fatty acid β -oxidation induced immunotoxic effects including an increase of white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte, and blood serum pro-inflammatory cytokine levels (Wang et al., 2019a). Moreover, as $C22:6\omega 3$ is known to have health benefits in relation to inflammatory conditions in mammals (Muhlhausler, 2018), a decrease of its bioavailability might affect the inflammatory response. Although mechanisms of toxicity of SCCPs in male belugas cannot be identified using the present correlative approach, results from the present study suggest that SCCP exposure could alter their fatty acid profiles. As described previously, all fatty acids (C16:1 ω 7, C22:5 ω 3c1, C22:5 ω 3c2, and C22:6 ω 3) that correlated with SCCP concentrations in male SLE beluga blubber can be acquired through diet (Iverson *et al.*, 2004 ; Iverson and Koopman, 2018). Due to a high degree of similarity in molecular structures between fatty acids and SCCPs, the correlations observed between these compounds may also indicate that SCCPs somewhat behaved similarly to fatty acids in belugas and/or their prey (bioaccumulation and biomagnification) and/or during sample extraction (i.e., pressurized liquid extraction; see **Section 3.4.2**). In the event where our hypothesis of a difference in diet depending on sectors is verified, the correlations observed between fatty acids and SCCPs could be related to these ecological differences rather than to a deleterious effect of SCCPs on fatty acids.

Acetylornithine, for which the concentrations correlated positively with those of Σ_{18} SCCP in SLE male belugas, is an intermediate compound in the biosynthesis of arginine from glutamate, and is involved in arginine and proline metabolism (Morizono *et al.*, 2006). Significant disorders in arginine and proline metabolism were documented following exposure of the human liver cells HepG2 to SCCPs (Geng *et al.*, 2015), which was suggested by these authors to be a possible adaptive response to oxidative stress. SCCPs might change the fatty acid profiles of SLE belugas as well as induce oxidative stress that could, in turn, impact amino acid metabolism.

3.7 Conclusions

This study showed that metabolomic profiles of beluga skin varied depending on sampling sectors in the SLE. Moreover, elevated concentrations of organohalogen contaminants, largely dominated by SCCPs, were quantified in blubber samples of male belugas. Significant correlations between SCCP concentrations and those of four fatty acids and acetylornithine suggested potential impacts of SCCP exposure on lipid or amino acid metabolic pathways in SLE belugas. In addition, concentrations of

several organohalogens and metabolites significantly differed between belugas sampled upstream and downstream of the Saguenay River mouth. These geographical differences in metabolite and contaminant profiles could be related to the unique environmental characteristic of these sectors, including prey availability and diet composition. Organohalogens should therefore be monitored in the SLE beluga food web and environment (e.g., sediments and water) to verify this assumption, and will be the subject of an upcoming study. Also, it cannot be completely disregarded that these results could have been influenced by age, which is a known confounding factor to contaminant concentrations and/or metabolite profiles in belugas (Lebeuf *et al.*, 2014a; Norman *et al.*, 2013; Stern *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2016).

The markedly elevated SCCP concentrations in male SLE belugas, which are among the greatest reported in marine mammals worldwide, raise concerns about the potential toxicity of these chemicals in this endangered population. Future research is warranted to investigate environmental concentrations and mechanisms of toxicity of SCCPs in apex predators from the marine food web. Further investigations should also deepen our knowledge on the potential effects of organohalogens on the fatty acid metabolism of marine mammals. Finally, a more holistic approach is critically needed to better understand the health implications of highly-exposed cetacean populations to organohalogens. As such, there is a strong need to develop new tools capable of providing simultaneously a maximum of biological and chemical information (e.g., age, "omics" profiles, contaminant concentrations, nutritional status, etc.) from cetacean biopsy samples.

3.8 Acknowledgments

Funding for this research was provided in part by the National Contaminants Advisory Group of Fisheries and Oceans Canada. Supplemental funding was provided by the Species at Risk program of Fisheries and Oceans Canada (biopsy sample collection) and Environment and Climate Change Canada (SCCP analysis). We thank M. Moisan (GREMM) and Y. Morin (Fisheries and Oceans Canada) for sample collection and/or handling. We also wish to thank H. Steer (Environment and Climate Change Canada) and H. Butler (SGS AXYS) as well as their technical personnel for SCCP and metabolomic analyses, respectively. We extend our appreciation to L. Wang (Université du Québec à Montréal) for HFR analyses and P. Gagnon (Environment and Climate Change Canada) for advice on statistics, and M. Desrochers (Université du Québec à Montréal) for guidance with ArcGIS. The authors declare no conflict of interest.

3.9 Supplementary material

Supplementary material can be found in Annexe C.

CONCLUSION

4.1 Résultats principaux

Les résultats issus de cette thèse apportent de précieuses informations sur le devenir et les risques potentiels de toxicité d'une sélection de contaminants organohalogénés établis et émergents chez les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent. Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons constaté que six retardateurs de flamme émergents (c.-à-d., HBB, PBEB, Cplus, Dec-602, Dec-604 CB et DP) étaient présents à la fois dans les tissus des bélugas et des petits rorquals du Saint-Laurent. Nous avons vu ensuite que le comportement migratoire et la position trophique pouvaient expliquer les différences de concentrations des organohalogénés entre les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent. Puisque les concentrations des contaminants chez les bélugas étaient plus élevées en comparaison aux petits rorquals, nous pouvons donc accepter notre première hypothèse (A). Aussi, alors que nous nous attendions à avoir une baisse des concentrations de PBDE chez les bélugas du Saint-Laurent (hypothèse B), celles-ci sont restées stables de 1997 à 2013. Cela vient confirmer les observations faites par Lebeuf et al. (2014a) qui indiquaient que les concentrations de PBDE chez les bélugas du Saint-Laurent avaient atteint un seuil élevé (plateau) depuis la fin des années 1990 jusqu'en 2007. Ce résultat rappelle également que, malgré des interdictions mises en place à l'encontre d'une molécule ou d'une famille de composés, ceux-ci continuent d'être diffusés dans l'environnement pendant des années via les sites d'enfouissement par exemple, ou encore les effluents urbains dus à l'utilisation de produits de consommation courants ou recyclés qui en contiennent. Aussi, le transfert des contaminants des femelles à leur progéniture favorise également la

persistance de ces composés dans les tissus de ces espèces longévives. Pour les composés émergents, ceux-ci n'ont pas augmenté à travers le temps chez le béluga du Saint-Laurent comme nous l'avions prédit (hypothèse B). Au contraire, les concentrations du HBB, du Cplus et des DP semblaient diminuer, et il n'y avait aucune tendance temporelle pour les autres composés émergents. Cela semble suggérer que l'utilisation du HBB, du Cplus et du DP aurait soit diminué ou arrêté depuis plusieurs années en Amérique du Nord. Dans le premier chapitre, nous rapportons également pour la première fois, la présence de retardateurs de flamme émergents (c.-à-d., HBB, PBEB, Dec-604 CB et DP) dans des bélugas du Nunavik. Comparativement aux baleines du Saint-Laurent, les concentrations pour le Dec-604 CB et les DP étaient plus élevées chez les bélugas de l'Arctique, ce qui reste difficile à expliquer étant donné le peu d'information disponible sur leur utilisation, les sources d'exposition possibles et leur présence dans l'environnement. Cependant, ces résultats indiquent que ces composés émergents posséderaient la capacité à être transporté sur de longues distances et à se bioaccumuler à travers les réseaux trophiques, qui sont des caractéristiques propres à celle des POP.

Dans un second temps, nous voulions voir si les contaminants organohalogénés dans les tissus des bélugas et des petits rorquals du Saint-Laurent étaient corrélées à des niveaux de transcrits de gènes impliqués dans la régulation de leur système endocrinien. D'après nos résultats, plusieurs POP et retardateurs de flamme émergents retrouvés chez ces deux espèces, semblaient affecter la régulation de leurs axes thyroïdiens et stéroïdiens (sexuel et glucocorticoïdes), ce qui correspond à notre hypothèse C, que nous acceptons. En effet, les concentrations des composés organochlorés (BPC, *trans*nonachlor, HCB et p,p'-DDE) dans les graisses des bélugas étaient corrélées avec les niveaux de transcription dans la peau de gènes impliqués dans la régulation de l'axe thyroïdien (*Dio2*) et des œstrogènes (*Esra*), puis celles de l'HBB étaient corrélées avec les transcrits du gène *Esra* et de deux gènes qui régulent les glucocorticoïdes (*Nr3c1* et *Hsd11β2*), et celles du Dec-604 CB avec les transcrits du gène *Hsd11β2*. Chez les petits rorquals, les concentrations des PBDE étaient corrélées avec les transcrits du récepteur β des œstrogènes (*Esr* β), et celles du HBB l'étaient avec les transcrits *Nr3c1*. Nous acceptons également notre hypothèse D, puisque les corrélations entre les contaminants et les transcrits n'étaient pas les mêmes entre les deux espèces. Cela pourrait provenir des différences liées à l'espèce, au sexe et à l'exposition aux contaminants. En effet, nos échantillons étaient composés que de femelles pour les petits rorquals, et que de mâles pour les bélugas, puis les concentrations en organohalogénés étaient plus élevées chez les bélugas. Néanmoins, tous ces résultats ne peuvent pas être considérés comme des relations de cause à effet, car une mesure des niveaux de transcription de gènes seule n'est pas suffisante pour témoigner d'un effet direct sur le métabolisme, puis de nombreuses variables confondantes qui auraient pu avoir influencé nos résultats n'ont pas pu être déterminées (p. ex., âge, état nutritionnel, autres contaminants, exposition variée aux stresseurs environnants). Il n'est donc pas possible de déterminer de relations de cause à effet, et de démontrer si ces composés représentent un risque pour la santé globale de ces espèces. De plus, les résultats de ce chapitre permettent également de faire un suivi de l'évolution temporelle des concentrations d'organochlorés chez le béluga du Saint-Laurent. Comparativement aux concentrations entre 1987 et 2007 de BPC, HCB, p,p'-DDE et trans-nonachlore rapportées par Lebeuf et al. (2014a), celles issues de nos échantillons de bélugas récoltés en 2015 et 2016 étaient de 2 à 14 fois plus faibles, ce qui confirme les tendances à la baisse qui avaient été rapportées dans cette étude.

Enfin, notre dernier objectif était d'examiner les mécanismes potentiels de perturbations métaboliques des contaminants organohalogénés (c.-à-d., PCCC, POP, PBDE et retardateurs de flamme émergents) accumulés chez les bélugas mâles du Saint-Laurent. Dans un premier temps, en analysant les données de concentrations de métabolites, nous nous sommes aperçus qu'il y avait une ségrégation entre nos

échantillons. Les bélugas échantillonnés en aval de la rivière Saguenay présentaient des profils en acides gras et en acides aminés différents comparativement aux individus échantillonnés en amont, ce qui pourrait provenir d'une différence dans la composition du régime alimentaire, elle-même influencée par les différences de conditions abiotiques (p. ex., profondeur, salinité, température) entre les deux secteurs. C'est la première fois que des paramètres biologiques semblent corroborer avec des observations faites sur le terrain par Michaud (1993), qui indiquaient que des sousgroupes de bélugas du Saint-Laurent restaient fidèles à des secteurs spécifiques de leur habitat. Un autre résultat marquant de cet objectif a été de constater que les concentrations en PCCC dans le gras des bélugas du Saint-Laurent surpassaient largement celles rapportées précédemment dans cette population (Tomy et al., 2000) et d'autres espèces et populations de mammifères marins à travers le monde. Enfin, les résultats principaux de cet objectif indiquaient des corrélations entre les concentrations en PCCC et celles de quatre acides gras et de l'acétylornithine, indiquant que les PCCC pourraient impacter le métabolisme des lipides ou des acides aminés des bélugas mâles du Saint-Laurent. Cependant, les métabolites qui corrélaient avec les PCCC n'étaient pas exclusivement d'origine alimentaire comme nous l'avions suggéré (hypothèse E), puisque les acides gras concernés pourraient soit provenir de l'alimentation ou avoir été synthétisés par l'organisme (Iverson et al., 2004), et l'acétylornithine est un produit intermédiaire de la biosynthèse de l'acide aminé arginine à partir du glutamate (Morizono et al., 2006). Une perturbation du métabolisme des lipides pourrait avoir des conséquences pour la fitness des bélugas du Saint-Laurent, car ces métabolites jouent un rôle essentiel dans le stockage de l'énergie, la flottabilité et la régulation de la température chez les cétacés (Iverson et Koopman, 2018).

4.2 Importance et originalité de la thèse

Dans un premier temps, les résultats issus de cette thèse apportent une multitude de nouvelles informations sur la composition en composés organohalogénés auxquels sont exposés les bélugas et les petits rorquals de l'estuaire du Saint-Laurent, mais aussi les bélugas du Nunavik. En effet, c'est la première fois que des données de retardateurs de flamme halogénés émergents sont rapportées dans les tissus de ces populations de cétacés. Étant donné qu'il existe que très peu d'information sur ces composés, nos données permettent donc d'en apprendre plus sur leur répartition et leur devenir dans l'environnement. Les concentrations des organohalogénés ont également été utiles pour identifier des composés préoccupants qui devraient être mis plus en avant. C'est le cas par exemple des PCCC, dont les concentrations ont fortement augmenté dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent en comparaison avec les dernières rapportées par Tomy et al. (2000). De plus, les données de production (tonnage) et sur les concentrations environnementales des PCCC étaient insuffisantes pour expliquer une telle augmentation, ce qui indique que la répartition historique des PCCC dans l'environnement devrait être davantage étudiée. C'était également le cas des composés émergents Dec-604 CB et des DP, qui avaient des concentrations environ trois fois plus élevées chez les bélugas du Nunavik comparativement aux bélugas du Saint-Laurent.

Les résultats de cette thèse sont particulièrement importants pour les bélugas du Saint-Laurent. En effet, ils sont considérés en voie de disparition depuis 2014 au Canada (COSEWIC, 2014a), et l'exposition aux contaminants est considérée comme un des facteurs contribuant à leur déclin. Nos résultats nous ont permis d'identifier 1) des contaminants organohalogénés qui pourraient présenter des effets sur la biologie des bélugas (c.-à-d., BPC, HCB, *p,p*'-DDE, *trans*-nonachlor, HBB, Dec-604 CB et les PCCC), et 2) les axes endocriniens et les voies métaboliques qui sont susceptibles d'être affectées par ces composés (c.-à-d., régulation des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes et métabolisme des lipides). D'après Lair et al. (2016), des perturbateurs endocriniens comme les PBDE pourraient être à l'origine d'une augmentation de la mortalité liée à un accouchement difficile (p. ex., dystocie et complications postpartum) pour les femelles bélugas. Bien que seuls des bélugas mâles aient été utilisés dans cette thèse, nos résultats soutiennent cette hypothèse et seront utiles pour de futures recherches avec les femelles bélugas. Étant donné que nos résultats suggèrent une potentielle perturbation au niveau de la régulation des hormones thyroïdiennes, des œstrogènes, du cortisol et du métabolisme des lipides, cela pourrait avoir des conséquences sur le métabolisme énergétique et la reproduction des femelles bélugas. Aussi, il a été démontré chez les animaux domestiques femelles qu'une altération du niveau des hormones thyroïdiennes, le stress ou encore des niveaux anormaux de cortisol pourraient interrompre ou retarder la parturition (Grant, 2015; Lair et al., 2016; Nagel *et al.*, 2019). Il serait donc d'intérêt d'examiner en priorité les liens potentiels entre les organohalogénés et des marqueurs biologiques impliqués directement dans la régulation des axes thyroïdiens et corticostéroïdiens des femelles bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent.

Toutes les données sur les contaminants qui ont été rapportées dans cette thèse viennent alimenter les objectifs de différents ministères québécois et canadiens. Par exemple, le Plan de Gestion des Produits Chimiques du Canada se base sur des données externes comme les nôtres, pour permettre d'évaluer et d'identifier quelles sont les substances qui présentent des risques pour l'environnement et la santé humaine. Nos données sont d'autant plus importantes pour les contaminants qui n'ont pas fait l'objet de suivi sur leur répartition dans l'environnement (c.-à-d., RFH émergents et PCCC). Nos données vont également permettre d'aider le Plan d'Action Saint-Laurent à identifier les substances chimiques les plus préoccupantes pour la santé du fleuve. Enfin, il y a le programme de rétablissement des bélugas du Saint-Laurent (Pêches et Océans Canada) qui grâce en partie à nos données, lui permettra d'identifier les substances chimiques qui menacent le plus le rétablissement de cette population en voie de disparition. Dès lors, des mesures de régulation pourront être mises en place afin de réduire la présence des composés les plus préoccupants chez le béluga, ses proies et son habitat.

L'originalité de cette thèse se situe avant tout dans la variété des données obtenues à partir de biopsies de cétacés. En effet, l'accessibilité à des échantillons d'espèces sauvages de cétacés est difficile, mais surtout, la quantité d'échantillons disponible se limite bien souvent à quelques milligrammes. Ainsi, le nombre d'analyses qui peut être fait est souvent limité. Cependant, grâce à l'utilisation combinée d'outils de biologie moléculaire et métabolomique, nous sommes parvenus à extraire de nombreuses variables biologiques en utilisant une quantité raisonnable d'échantillons. Cette thèse indique que l'utilisation d'outils omiques est maintenant possible en utilisant des biopsies de cétacés, et que ceux-ci peuvent aider à identifier quelles sont les cibles métaboliques potentielles qui peuvent être impactées par les contaminants accumulés par les cétacés. Enfin, l'originalité de cette thèse provient également de la comparaison qui a été faite entre les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent au niveau des concentrations d'organohalogénés, mais aussi des mécanismes potentiels de toxicité associés. En effet, il est rare en écotoxicologie de pouvoir comparer deux espèces de cétacés fréquentant un même habitat, tant l'accessibilité aux échantillons est logistiquement difficile et coûteuse.

4.3 Les limites de cette thèse

Les limites du premier chapitre de cette thèse se situaient au niveau de l'accessibilité et de l'uniformité des échantillons. En effet, les concentrations de contaminants des trois populations de cétacés dans le premier chapitre ont été comparées avec seulement 3 à 4 individus de chaque population échantillonnés une même année (2013), ce qui est peu étant donné la forte variabilité observée entre les individus. Cependant, l'accessibilité à des échantillons de carcasses de baleines est aléatoire et il est impossible d'avoir un contrôle sur le sexe et l'âge des individus qui sont retrouvés. Aussi, il aurait été important d'avoir ces informations chez les petits rorquals, puisque ce sont deux variables qui sont fortement reliées au niveau de contaminants accumulés chez les cétacés (Binnington et Wania, 2014). Pour les tendances temporelles dans les carcasses de bélugas, un nombre supérieur d'individus aurait également permis d'atténuer l'influence des variabilités interindividuelles sur nos résultats. De plus, il aurait pertinent d'intégrer les PCCC pour lesquels aucune donnée des concentrations temporelles n'a été rapportée dans cette population. Enfin, nous aurions pu considérer d'autres variables pour corriger les concentrations des contaminants. Selon la cause du décès (soudain ou issu d'une maladie) de l'animal, les conditions physiologiques et nutritionnelles peuvent varier, ce qui peut venir influencer les concentrations dans le gras des cétacés. Par exemple, l'épaisseur de la couche de gras des carcasses pourrait permettre de faire la distinction entre un animal en pleine santé ou en mauvaise condition nutritionnelle.

Dans le second chapitre, les points limites qui ressortent sont principalement inhérents à toute étude travaillant sur des espèces sauvages de cétacés. Premièrement, le nombre d'échantillons utilisés n'était pas suffisant chez les deux espèces pour pouvoir les comparer. Dans notre cas, c'était surtout le cas des petits rorquals pour lesquels seules 11 biopsies ont pu être récoltées pendant ce doctorat. À l'inverse pour les bélugas, nos 45 biopsies ont été sélectionnées parmi plus de 150 échantillons qui ont été récoltés pendant deux années consécutives (2015 et 2016) lors de campagnes d'échantillonnage de 1 mois seulement. Cette différence marquée provient du fait que les petits rorquals se déplacent seuls et sont plus farouches lorsqu'ils sont approchés par une embarcation, ce qui rend la récolte de biopsie plus difficile. Les résultats obtenus à partir des biopsies de petits rorquals étaient donc moins robustes à cause du petit nombre d'échantillons. Aussi, comme les échantillons de petit rorqual ont été prélevés entre juin et octobre pendant les 3 années d'échantillonnage (2015 à 2017), cela a pu ajouter de la variabilité dans nos résultats. En effet, il a été démontré chez des dauphins sauvages que le transcriptome et les concentrations des contaminants organiques dans le gras pouvaient varier selon les saisons (Van Dolah *et al.*, 2015). Comme les petits rorquals sont des espèces migratrices qui migrent l'été dans l'estuaire du Saint-Laurent pour s'y alimenter, un individu prélevé en début de saison estivale (mai-juin) n'aura pas la même quantité de gras, et fort probablement les mêmes proportions de contaminants, comparativement à un animal échantillonné en fin de saison (septembre-octobre).

Un autre point limite associé à la prise de biopsies de cétacés était l'impossibilité de déterminer un certain nombre de variables pouvant influencer nos résultats. Premièrement, l'âge est un facteur essentiel à considérer chez les cétacés, puisque selon celui-ci, les niveaux d'hormones (cortisol, hormones thyroïdiennes) et de POP peuvent varier (Flower et al., 2015; Lebeuf et al., 2014a; Loseto et al., 2018). Cependant, comme il n'existe pas encore d'outils fiables permettant de déterminer l'âge des cétacés à partir d'une biopsie de peau et de gras, il n'était pas possible de vérifier l'influence de ce facteur sur nos données. Il est donc possible que nos résultats de corrélation entre les contaminants et les transcrits et les métabolites aient été davantage influencés par l'âge plutôt qu'à un effet réel des contaminants. Enfin, l'analyse des niveaux de transcription de gènes seule est insuffisante pour prédire ou diagnostiquer les effets liés à l'exposition aux contaminants, puisque le lien entre expression de gènes et synthèse de protéines n'est pas direct (Liu et al., 2016c). L'analyse de marqueurs situés à d'autres niveaux de l'organisation biologique, tel que la mesure de niveaux de protéines associées aux gènes que nous avons étudiés ou encore le dosage des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes dans le gras des individus nous auraient permis d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action de ces produits chimiques toxiques. Plusieurs études chez des mammifères marins ont rapporté des corrélations entre les niveaux hormonaux sériques thyroïdiens et stéroïdiens et les concentrations dans le gras de plusieurs POP (Ciesielski *et al.*, 2017 ; Gabrielsen *et al.*, 2015 ; Tabuchi *et al.*, 2006 ; Villanger *et al.*, 2011). L'utilisation combinée des niveaux hormonaux et des transcrits de gènes pourrait alors permettre de renforcer la présence d'une perturbation endocrinienne.

Plusieurs points limites du chapitre 2 pourraient s'appliquer également au chapitre 3. C'est le cas notamment pour l'âge des bélugas qui n'a pas pu être déterminé à partir des biopsies. Similairement à ce qui a été discuté précédemment, plusieurs études montrent que les niveaux de métabolites et de contaminants peuvent varier selon cette variable chez les bélugas (Lebeuf *et al.*, 2014a ; Norman *et al.*, 2013 ; Tsai *et al.*, 2016). Il est donc possible que les résultats observés avec les métabolites aient davantage été reliés à l'âge des bélugas plutôt qu'à un effet des contaminants. Ensuite, un plus grand nombre d'échantillons aurait été nécessaire pour nous permettre de renforcer certains de nos résultats. Alors que nos données suggèrent qu'il y a des ségrégations au sein de la population des bélugas du Saint-Laurent, un plus grand nombre d'échantillons nous aurait permis de regarder les corrélations entre contaminants et métabolites pour chaque sous-groupe échantillonné. Il n'est pas impossible que selon les groupes de bélugas, les corrélations auraient pu être différentes, puisque nous supposons que leur diète et potentiellement leur exposition aux contaminants diffèrent.

D'une manière plus générale, il faut garder en tête que nous avons seulement analysé une petite partie de tous les contaminants accumulés qui sont susceptibles d'induire des perturbations endocrines ou métaboliques chez les bélugas et petits rorquals du Saint-Laurent. Par exemple, des produits de dégradation de certains POP (p. ex., formes hydroxylées de BPC et PBDE) ou les métaux (c.-à-d., plomb, mercure et cadmium) qui ont déjà été détectés dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent (McKinney *et al.*, 2006 ; Wagemann *et al.*, 1990), peuvent aussi induire des effets de perturbation de la régulation des hormones thyroïdiennes et des œstrogènes chez les mammifères (Dhakal et al., 2018; Gabrielsen et al., 2011, 2015; Gustavson et al., 2015; He et al., 2008; Pelch et al., 2011). Par conséquent, nos résultats indiquent parmi la suite des composés organohalogénés analysés, lesquels pourraient avoir le potentiel de perturber le système endocrinien ou le métabolome chez les bélugas et petits rorquals du Saint-Laurent. De plus, notre design d'étude ne nous permettait pas de prendre en compte l'effet cumulatif de tous les composés organiques et inorganiques qui se sont accumulés dans ces deux cétacés du Saint-Laurent. Face aux mélanges complexes de contaminants organiques auxquels sont exposés les petits rorquals et les bélugas du Saint-Laurent, il serait intéressant de considérer les contaminants comme un ensemble. En effet, ces combinaisons de composés sont capables d'entraîner de nombreux effets synergiques, additifs ou antagonistes sur diverses réactions biologiques (Altenburger et al., 2012 ; Beyer et al., 2014; Panizzi et al., 2017). Un autre point important commun aux objectifs 2 et 3 est que les contaminants et les marqueurs biologiques (transcrits de gènes et niveaux de métabolites) n'ont pas été analysés dans les mêmes tissus, car il n'y avait pas assez d'échantillons de gras restant après les analyses chimiques. Nous ne pouvons ignorer la possibilité que les données biologiques obtenues dans le gras puissent différer de celles mesurées dans d'autres tissus comme la peau, à cause des différences de fonction biologique et de taux de renouvellement cellulaire.

4.4 Recommandations et perspectives de recherche

4.4.1 Investigation sur les disparités au sein de la population des bélugas

Un des faits marquants de cette thèse est la différence au niveau métabolomique entre les bélugas échantillonnés en amont et en aval de l'embouchure du Saguenay. En nous appuyant sur la littérature, nous avons supposé que ces disparités pourraient être reliées à des différences de diversité des proies des bélugas entre chaque secteur dû à des particularités abiotiques (c.-à-d., salinité, température et profondeur). Cependant, cela n'a pas pu être vérifié par manque de données sur l'abondance et la diversité des proies potentielles de bélugas (p. ex., lançon, capelan, polychètes, décapodes, bivalves) dans l'estuaire du Saint-Laurent. De plus, comme nous avons aussi observé une différence au niveau des concentrations de PCCC entre les bélugas en amont et en aval, il se pourrait que ces différences soient dues à des différences en composition alimentaire. Pour cela, il serait donc intéressant de quantifier chacun des contaminants ciblés dans cette thèse dans les réseaux alimentaires de bélugas, en amont et en aval de l'embouchure du Saguenay, afin de voir si les proies en amont sont plus contaminées par les PCCC.

Comme les bélugas du Saint-Laurent dans cette thèse étaient exclusivement des mâles, il serait également pertinent d'évaluer l'impact des organohalogénés sur la santé des femelles bélugas, puisque plusieurs des contaminants qui ont été rapportés pourraient impacter le système hormonal des femelles et provoquer des perturbations au niveau de la reproduction. Selon Lair *et al.* (2016), le nombre de décès causés par des problèmes liés à l'accouchement (p. ex., dystocies) est en augmentation depuis les 10 dernières années, ce qui pourrait être provoqué par des perturbateurs endocriniens accumulés dans leurs tissus. De plus, le nombre de femelles et de nouveau-nés retrouvés morts est également en augmentation par rapport aux mâles (Lair, 2018). Il apparaît donc urgent d'étudier l'impact des contaminants organiques sur le système endocrinien des bélugas femelles du Saint-Laurent.

4.4.2 Identification de l'âge des cétacés à partir de biopsies

L'âge des cétacés est un élément très important à considérer, particulièrement en écotoxicologie. En effet, nous avons vu à plusieurs reprises dans cette conclusion, que les contaminants et plusieurs variables biologiques (p. ex., hormones, métabolites) pouvaient varier avec l'âge chez les cétacés. Cependant, les seules techniques permettant d'évaluer précisément l'âge des grands cétacés nécessitent que l'animal soit mort. En effet, les principales techniques pour estimer l'âge des cétacés utilisent les

dents (Read *et al.*, 2018), le noyau de la lentille oculaire (Watt *et al.*, 2019) ou les bouchons d'oreille (Yasunaga *et al.*, 2017). Durant ce doctorat, il n'existait pas de technique fiable permettant d'estimer précisément l'âge des cétacés à partir de biopsies de peau et de gras. Toutefois, Polanowski *et al.* (2014) a montré pour la première fois qu'il était possible d'estimer l'âge des cétacés en utilisant la méthylation de l'ADN de certains gènes. Les auteurs ont également indiqué que cette technique pouvait être appliquée à partir d'ADN extraits de biopsies de cétacés. Depuis, cette méthode a été développée pour les petits rorquals (Tanabe *et al.*, 2019) et est en train d'être adaptée aux bélugas (Pr Scott Baker, Oregon State University). À l'avenir, il serait donc plus qu'essentiel de tester et d'utiliser cette technique, afin de pouvoir évaluer l'influence de l'âge sur les concentrations de contaminants et le dosage de marqueurs biologiques déterminés à partir de biopsies de cétacés.

4.4.3 Des contaminants à prioriser

À travers cette thèse, plusieurs composés pouvant représenter une menace potentielle pour les cétacés du Saint-Laurent ont été mis en avant. Cependant, pour plusieurs d'entre eux, la littérature n'était pas suffisamment étoffée sur leur toxicologie et leur devenir dans l'environnement (utilisation actuelle ou historique). C'est le cas notamment des HBB et Dec-604 CB qui selon nos résultats pourraient affecter la régulation de l'axe des glucocorticoïdes des bélugas du Saint-Laurent. Face au manque de connaissances entourant la toxicologie de ces composés, il faudrait approfondir les recherches sur leur toxicologie chez les mammifères, et plus spécifiquement chez les cétacés. Ceci permettrait de mieux comprendre la menace qu'ils représentent pour les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent. Il en est de même pour les PCCC, pour lesquels il n'existe aucun résultat similaire aux nôtres qui démontre une toxicité de ces composés chez les mammifères marins. La majorité des données toxicologiques des PCCC proviennent d'études *in vitro* ou chez les rongeurs, ce qui rend toute extrapolation plus difficile. Il serait donc nécessaire d'acquérir des connaissances plus approfondies notamment sur les effets que les PCCC sont susceptibles d'avoir sur le métabolisme des lipides chez les cétacés.

En complétant le troisième chapitre de cette thèse, nous nous sommes également rendu compte qu'il n'y avait que très peu de données sur la répartition environnementale actuelle et historique des PCCC au Québec et au Canada. Alors que nos données indiquent une importante augmentation des PCCC dans les tissus des bélugas en comparaison aux dernières données rapportées plus de 15 ans auparavant par Tomy et al. (2000), nous n'avons pas pu nous baser sur des données actualisées pour expliquer ce résultat. À l'avenir, il serait donc intéressant de regarder les tendances temporelles des PCCC à partir de carottes de sédiments ou d'échantillons archivés de bélugas ou de poissons de l'estuaire du Saint-Laurent. Il en est de même pour les Dec-604 CB et le DP qui étaient plus concentrés dans le gras des bélugas du Nunavik comparativement à ceux du Saint-Laurent. Ces deux composés émergents n'ont pas beaucoup été étudiés, et il est nécessaire de continuer à engranger des informations à leur sujet pour mieux comprendre leurs sources d'exposition, surtout dans des endroits reculés comme dans l'Arctique. Enfin, les effets de contaminants inorganiques (c.-à-d., plomb, mercure et cadmium) devraient également être étudiés chez cette population de bélugas étant donné qu'ils peuvent aussi induire des effets de perturbation de la régulation des hormones thyroïdiennes et des œstrogènes chez les mammifères (Pelch et al., 2011). De plus, les données de concentrations des métaux dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent n'ont pas fait l'objet d'un suivi régulier, puisqu'à notre connaissance, seule une étude a rapporté des concentrations de métaux incluant le mercure $(1,42-756 \mu g/g)$ poids sec), le cadmium ($< 0,005-17,9 \mu g/g$ poids sec), le plomb ($0,004-2,13 \mu g/g$ poids sec) et le cuivre (0,34-162 μ g/g poids sec) dans des tissus (c.-à-d., foie, reins et muscle) issus de carcasses de bélugas du Saint-Laurent retrouvées échouées entre 1982 et 1987 (Wagemann et al., 1990).

4.4.4 Validation de l'approche par biopsie

Il est important de garder à l'esprit que les analyses faites à partir de biopsies de peau et de gras partent du principe que les variables biologiques mesurées dans ces tissus reflètent en partie l'état de santé global des animaux. En utilisant cette approche uniquement, il est donc difficile de savoir si les effets potentiels observés dans de la peau et du gras sont spécifiques aux tissus analysés ou si au contraire, ils indiquent un effet dans d'autres tissus ou organes de l'organisme. Une étude de Noël et al. (2014) semblerait indiquer que des corrélations entre transcrits de gènes et contaminants pourraient être spécifiques au tissu et au gène. En effet, ils ont observé que les concentrations de BPC dans le gras de bélugas de l'Arctique étaient corrélées avec les transcrits des gènes Ahr et Cyp1a1 dans le foie, mais pas avec les niveaux des mêmes gènes dans le gras. Il serait donc utile de comparer les relations entre des marqueurs biochimiques et les contaminants organiques dans plusieurs tissus d'un même individu (p. ex., sérum, peau, foie, muscle, gras, glande thyroïde, gonades). Une telle démarche ne pourrait pas être appliquée pour les bélugas du Saint-Laurent pour des raisons éthiques (population en voie de disparition et chasse interdite), puisque l'obtention de tissus frais ne pourrait se faire qu'en capturant ou en euthanasiant les animaux. Il serait donc nécessaire d'utiliser des bélugas arctiques issus de la chasse traditionnelle effectuée par les peuples autochtones.

4.4.5 Vers une approche plus holistique de l'écotoxicologie

Afin d'aller plus loin dans l'évaluation et la compréhension de la toxicité potentielle des organohalogénés chez les bélugas et les petits rorquals du Saint-Laurent, l'analyse d'une multitude d'autres variables chimiques (p. ex., POP, composés émergents, produits de biotransformation), biochimiques et biologiques serait nécessaire. Aussi, les cétacés étant des espèces longévives, opportunistes la plupart du temps, il est plus probable qu'il y ait des variabilités interindividuelles plus marquées au sein d'une même population à cause des habitats vastes et complexes dans lesquels ils vivent.

C'est pourquoi l'utilisation d'une approche plus holistique en écotoxicologie des cétacés permettrait de faire un bond en avant sur la compréhension des risques sur leur santé des organohalogénés, et ce, en dépit des nombreuses contraintes logistiques et financières qui sont propres à l'étude de ces espèces.

Tout d'abord, la technique d'échantillonnage de prise de biopsie, surtout pour les petits rorquals, devrait être optimisée afin de pouvoir récolter une quantité de gras suffisante et faire plus d'analyses. Par exemple, l'utilisation d'un barbillon à l'intérieur du dard à biopsie permettrait de récolter plus efficacement la couche de gras des petits rorquals. Étant donné la couche épaisse de tissu adipeux des bélugas (10-15 cm), l'utilisation d'un dard plus grand pour permettre l'acquisition d'une plus grande quantité de gras. Cela permettrait alors d'analyser en plus des contaminants, des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes à partir d'un échantillon de gras issu de biopsies de cétacés. Galligan et al. (2019) ont réussi à doser 11 hormones stéroïdiennes (p. ex., cortisol, œstradiol, testostérone) et plusieurs POP (c.-à-d., BPC, PBDE, pesticides organochlorés) à partir de gras issu de biopsies de dauphins, mais les quantités de gras utilisées (> 100 mg par analyse) ne permettraient pas encore leur application pour les bélugas du Saint-Laurent. En plus des informations obtenues à partir des biopsies, un projet en cours du Groupe de Recherche et d'Éducation des Mammifères Marins en collaboration avec notre groupe de recherche à l'UQÀM pourrait bientôt permettre d'estimer la morphologie et le statut nutritionnel des bélugas biopsiés grâce à l'utilisation d'un drone. Récemment, des méthodes ont été développées pour estimer la taille, le volume et la masse corporelle de baleines franches (Eubalaena sp.) à partir de photos prises d'un drone (Christiansen *et al.*, 2019), mais la méthode et les estimations doivent être adaptées pour les bélugas.

Aussi, il est nécessaire de continuer à développer des outils de haut débit qui permettent l'obtention de plusieurs centaines de données par individus, avec peu d'échantillons.

Des techniques « *omiques* » ont été utilisées avec succès à partir de biopsies de cétacés, comme la transcriptomique (Lunardi *et al.*, 2016) ou la métabolomique (Chapitre 3 de cette thèse), mais pour les autres techniques (p. ex., protéomique et lipidomique), il reste encore des optimisations à faire pour les appliquer à des biopsies de cétacés. Pour les contaminants, il existe des approches non ciblées qui ont été utilisées, entre autres, chez des dauphins (Shaul *et al.*, 2015) et qui permettent d'estimer la totalité des composés organiques connus et inconnus. Cependant, les quantités requises (~2 g) ne permettraient pas leur utilisation à partir des biopsies que nous avions dans cette thèse. Des développements de méthodes resteraient à faire afin d'arriver aux mêmes résultats avec une quantité moindre d'échantillon.

L'acquisition de toutes ces données (p. ex., âge, contaminants, morphologie, sexe, transcriptome et métabolome) devra nécessiter la collaboration entre des chercheurs spécialisés en endocrinologie, génomique ou métabolomique, mais surtout avec des biostatisticiens qui devront aider les chercheurs à gérer, analyser et interpréter toute cette information.

ANNEXE A

SUPPLEMENTARY MATERIAL - TEMPORAL TRENDS OF PBDES AND EMERGING FLAME RETARDANTS IN BELUGAS FROM THE ST. LAWRENCE ESTUARY (CANADA) AND COMPARISONS WITH MINKE WHALES AND CANADIAN ARCTIC BELUGAS



Figure A1 Skin δ^{15} N and δ^{13} C values (‰) in SLE belugas (●), minke whales (▲) and Canadian Arctic belugas (♦) sampled between 1997 and 2013. δ^{13} C and δ^{15} N values were significantly correlated ($r_s = 0.65$; p < 0.001).

MLODs MLOQs % samples < MLODs % samples < MLOQs BDE-7 0.01 0.01 1.4 5.8 **BDE-10** 0.01 0.01 _ 100 **BDE-15** 0.01 0.03 _ **BDE-17** 0.01 0.01 **BDE-28** 0.01 0.01 -**BDE-47** 0.01 0.02 -BDE-49 0.02 0.01 _ _ **BDE-66** 0.01 0.02 -100 **BDE-71** 0.01 0.01 **BDE-77** 0.01 0.02 1.4 **BDE-85** 0.01 0.02 1.4 **BDE-99** 0.01 0.04 -**BDE-100** 0.01 0.04 -**BDE-119** 0.01 0.03 --**BDE-126** 0.01 0.02 7.2 **BDE-138** 0.01 0.05 18.8 34.8 **BDE-139** 0.03 1.4 0.01 **BDE-140** 2.9 0.01 0.03 **BDE-153** 0.01 0.02 -_ **BDE-154** 0.01 0.01 _ **BDE-171** 0.05 100 0.01 -**BDE-180** 0.01 0.02 95.7 **BDE-183** 0.01 0.03 -**BDE-184** 0.01 0.04 11.6 1.4 **BDE-191** 0.01 98.6 0.01 **BDE-196** 0.01 0.03 31.9 -**BDE-197** 0.02 0.07 11.6 _ **BDE-201** 0.01 0.03 10.1 1.4 **BDE-203** 0.02 0.06 24.6 5.8 BDE-204^a 0.07 0.02 11.6 -2.9 **BDE-205** 0.13 97.1 0.04 2.9 95.7 **BDE-206** 0.23 0.76 **BDE-207** 0.03 0.1 36.2 43.5 **BDE-208** 0.04 0.14 59.4 36.2 0.09 0.29 8.7 **BDE-209** 10.1

Table A1 Method limits of detection (MLODs, ng/g lw) and method limits of quantification (MLOQs, ng/g lw) for PBDE congeners and percentages of samples that were below the MLODs and MLOQs. PBDE congeners were identified according to their BZ congener number.

^a BDE-204 co-eluted with BDE-197.

Table A2 Method limits of detection (MLODs, ng/g lw) and method limits of quantification (MLOQs, ng/g lw) for the determination of emerging HFRs as well as percentages of samples that were below the MLODs and MLOQs. Definition of abbreviations can be found in footnote *a*.

	MLODs	MLOQs	% samples < MLODs	% samples < MLOQs
PBEB	0.01	0.01	1.4	-
HBB	0.01	0.01	-	-
OBIND	0.06	0.19	100	-
DBDPE	0.36	1.21	100	-
CPlus	0.01	0.05	7.2	-
$BEHTBP^{b}$	0.04	0.12	10.1	8.7
PBT^b	0.01	0.01	-	-
Dec-602	0.02	0.08	8.7	5.8
Dec-603	0.14	0.47	97.1	2.9
$Dec-604^b$	0.01	0.03	-	-
Dec-604 CB	0.01	0.01	14.5	-
syn-DP	0.04	0.12	10.1	8.7
anti-DP	0.01	0.05	10.1	2.9

^{*a*} PBEB (pentabromoethyle benzene), HBB (hexabromobenzene), OBIND (octabromo-1.3.3trimethyl-1-phenylindane), DBDPE (decabromodiphenylethane), CPlus (Chlordene plus), BEHTBP (bis(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate), PBT (Pentabromotoluene), Dec-602 (Dechlorane 602), Dec-603 (Dechlorane 603), Dec-604 (Dechlorane 604), Dec-604 CB (Dechlorane 604 component B), *syn*-DP (*syn*-Dechlorane plus), *anti*-DP (*anti*-Dechlorane plus).

^b PBT, Dec-604 and BEHTBP are co-eluted with BDE-28, BDE-183 and syn-DP, respectively.

Table A3 Comparison between δ^{13} C and δ^{15} N (‰) in two skin samples of SLE belugas analyz	zed
using methods in the GEOTOP laboratory and Waterloo University (Lesage et al., 2010).	

	Bulk	κ.	Lipid-ext	racted
	$\delta^{13}C$	$\delta^{15}N$	δ^{13} C	$\delta^{15}N$
Sample A				
GEOTOP	-18.5 ± 0.08 ^a	16.3 ± 0.11 ^b	-16.7 ± 0.01 ^a	16.7 ± 0.05 ^b
Waterloo University ^b	-18.6 ± 0.53	16.7 ± 0.28	$\textbf{-16.8} \pm 0.27$	16.5 ± 0.06
Differences	0.1	0.4	0.1	0.2
Sample B				
GEOTOP	-18.3 ± 0.15 ^a	$15.3\pm0.03^{\text{ b}}$	-16.3 ± 0.10^{a}	$15.5\pm0.24^{\text{ b}}$
Waterloo University	$\textbf{-18.0}\pm0.19^{\text{c}}$	$15.3\pm0.21^{\text{ c}}$	-16.1 ± 0.14 ^b	$15.6\pm0.27^{\text{ b}}$
Differences	0.3	0.0	0.2	0.1
Waterloo University Differences	$-18.0 \pm 0.19^{\circ}$ 0.3	$15.3 \pm 0.21^{\circ}$ 0.0	-16.1 ± 0.14^{-0} 0.2	$15.6 \pm 0.27^{\circ}$ 0.1

^a Five replicates.

^b Two replicates.

^c Three replicates.

Table A4. Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g lw) of Σ_{35} PBDE, Penta-, Octa- and Deca-BDE mixtures as well as percent contributions (%) to Σ_{35} PBDE in blubber of SLE belugas, minke whales and Canadian Arctic belugas collected in 2013. Congener composition of PBDE mixtures are based on La Guardia *et al.* (2006).

	SLE belugas	Minke whales	Canadian Arctic belugas
	n = 4 (males)	n = 3 (unsexed individuals)	n = 3 (males)
$\Sigma_{35}PBDE^{a}$	$1,068 \pm 138$	257 ± 11.6	276 ± 14.4
Penta-BDE ^b	918 ± 121 76 7 + 28 0	205 ± 7.21 7 48 + 3 68	214 ± 14.8
Deca-BDE ^d	70.7 ± 28.0 0.82 ± 0.14	0.80 ± 0.20	5.05 ± 0.25 1.47 ± 0.14
% Penta-BDE	86.3 ± 3.63	80.0 ± 0.89	77.2 ± 1.45
% Octa-BDE	6.94 ± 2.11	2.80 ± 1.25	2.07 ± 0.21
% Deca-BDE	0.08 ± 0.02	0.31 ± 0.07	0.54 ± 0.07
^a Sum of BDE-7	-10 -15 -17 -28 -47 -4	9 -66 -71 -77 -85 -99 -1	00 -119 -126 138 -139 -140

-153, -154, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -205, -206, -207, -208 and -209. Congeners that were not detected in any blubber samples: BDE-15, -71, -171, -180, -191, and -205.

^b Sum of BDE-17, -28, -47, -49, -66, 85, -99, -100, -126, -138, -139, -140, and -154.

^c Sum of BDE-153, -180, -183, -184, -196, -197, -201, -203, -204 -206, -207, and -208.

^d BDE-209.

values (‰) in male SLE belugas sampled between	
ions of HFRs^a (ng/g lw) and skin $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N~v$	
Table A5 Mean (\pm SEM) blubber concentral	1997 and 2013.

	1997	1998	1999	2001	2002	2003	2004	2005
	n = 4	n = 4	n = 5	n = 3	n = 4	n = 4	n = 4	n = 3
$\Sigma_{35} PBDE^b$	$1,\!260\pm295$	$1,127 \pm 63.0$	$1,\!220\pm249$	$1,726\pm176$	989 ± 111	$1,180\pm142$	$1,315 \pm 174$	$1,606\pm697$
PBEB	5.05 ± 2.74	4.62 ± 0.49	4.77 ± 1.21	7.08 ± 1.57	3.29 ± 1.01	6.47 ± 0.34	6.21 ± 1.92	3.82 ± 2.94
HBB	19.9 ± 9.27	31.8 ± 7.19	10.7 ± 1.37	16.5 ± 1.39	8.51 ± 1.37	12.4 ± 0.45	16.1 ± 6.92	22.0 ± 10.3
Dec-602	7.18 ± 1.72	9.10 ± 3.35	5.93 ± 2.07	15.6 ± 4.57	7.58 ± 2.43	12.1 ± 1.87	12.8 ± 2.64	5.75 ± 2.79
CPlus	21.6 ± 13.1	27.5 ± 5.30	20.2 ± 7.57	28.8 ± 5.56	6.49 ± 1.84	33.7 ± 7.06	23.2 ± 5.82	9.63 ± 4.67
Dec-604 CB	0.44 ± 0.28	0.56 ± 0.07	0.75 ± 0.25	0.85 ± 0.14	0.48 ± 0.13	0.74 ± 0.09	0.75 ± 0.30	0.79 ± 0.38
syn-DP	0.33 ± 0.19	0.06 ± 0.04	0.66 ± 0.40	0.51 ± 0.27	0.77 ± 0.36	0.58 ± 0.07	0.92 ± 0.05	0.42 ± 0.22
anti-DP	0.15 ± 0.09	0.01 ± 0.01	0.52 ± 0.38	0.43 ± 0.14	0.86 ± 0.30	0.34 ± 0.06	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.14
fanti	0.25 ± 0.12	0.25 ± 0.25	0.18 ± 0.11	0.58 ± 0.19	0.55 ± 0.06	0.37 ± 0.07	0.26 ± 0.01	0.40 ± 0.04
$\Sigma \mathrm{DP}^c$	0.48 ± 0.28	0.07 ± 0.04	1.18 ± 0.78	0.95 ± 0.34	1.63 ± 0.65	0.92 ± 0.03	1.25 ± 0.07	0.70 ± 0.36
$\delta^{13}C_{lipid-extracted}$	-15.2 ± 0.38	-15.9 ± 0.46	-15.7 ± 0.50	-15.7 ± 0.31	-16.0 ± 0.32	-16.4 ± 0.19	-16.2 ± 0.08	-16.0 ± 0.31
$\delta^{15} N_{bulk}$	16.9 ± 0.52	17.0 ± 0.74	16.8 ± 0.75	17.3 ± 0.36	15.5 ± 0.32	16.6 ± 0.32	16.3 ± 0.42	16.6 ± 0.13
% lipids	58.1 ± 23.0	90.5 ± 0.87	68.4 ± 12.2	93.3 ± 2.60	73.3 ± 13.6	92.5 ± 1.19	93.5 ± 0.65	94.7 ± 2.73
	2006	2007	2008	2009	2011	2012	2013	
	n = 2	n = 4	n = 3	n = 2	n = 2	n = 3	n = 4	
Σ_{35} PBDE	980 ± 178	$1,029\pm36.5$	$1,222 \pm 272$	$1,026\pm44.0$	918 ± 128	$1,045\pm146$	$1,068\pm138$	
PBEB	5.53 ± 2.56	4.60 ± 0.44	2.26 ± 0.49	6.76 ± 0.50	4.72 ± 1.05	9.04 ± 4.85	3.09 ± 1.29	
HBB	9.70 ± 4.01	14.5 ± 3.07	8.24 ± 0.44	9.02 ± 0.94	6.47 ± 1.28	12.1 ± 4.97	12.3 ± 2.28	
Dec-602	6.16 ± 2.48	5.09 ± 0.75	1.51 ± 0.26	8.57 ± 4.01	3.26 ± 0.16	10.8 ± 1.47	3.58 ± 1.83	
CPlus	8.34 ± 4.85	8.25 ± 4.88	1.70 ± 0.34	12.6 ± 3.08	14.1 ± 10.5	11.8 ± 5.52	7.61 ± 5.09	
Dec-604 CB	0.50 ± 0.10	0.55 ± 0.05	0.26 ± 0.06	1.12 ± 0.37	0.50 ± 0.09	0.70 ± 0.22	0.39 ± 0.17	
syn-DP	0.67 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.33 ± 0.13	0.39 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.25 ± 0.07	
anti-DP	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.02	0.32 ± 0.05	0.28 ± 0.01	0.46 ± 0.29	0.30 ± 0.16	0.19 ± 0.05	
$f_{ m anti}$	0.29 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.42 ± 0.03	0.75 ± 0.09	0.41 ± 0.11	0.43 ± 0.02	
$\Sigma \mathrm{DP}^c$	0.95 ± 0.10	0.57 ± 0.04	0.64 ± 0.18	0.67 ± 0.06	0.57 ± 0.32	0.63 ± 0.18	0.44 ± 0.12	
--------------------------------	-------------------	------------------	------------------	---------------------------	------------------	------------------	------------------	
δ^{13} Clipid-extracted	-16.1 ± 0.39	-16.1 ± 0.86	-15.6 ± 0.81	-14.9 ± 0.43	-15.1 ± 0.54	-15.3 ± 0.43	-16.0 ± 0.30	
$\delta^{15} N_{bulk}$	16.6 ± 0.11	17.0 ± 0.89	17.2 ± 1.22	16.6 ± 0.27	15.5 ± 0.39	17.9 ± 0.35	16.3 ± 0.49	
% lipids	90.5 ± 0.50	93.8 ± 2.66	89.3 ± 0.67	91.0 ± 4.00	97.5 ± 0.50	94.7 ± 2.85	93.3 ± 3.07	
^a Compounds th	at were not deter	cted BEHTRP (JRIND DRDPF	¹ Dec-603 Dec-	604 and PRT			

^b Sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -205, -207, -208, and -209. Following congeners were not detected in any samples: BDE-15, -71, -171, -205, -206, and -208. ^c Sum of *syn*- and *anti*-DP.

158

	2002	2005	2013
	n=4	n=4	<i>n</i> = 3
Σ_{35} PBDE ^b	357 ± 50.7	371 ± 90.1	257 ± 11.6
PBEB	0.28 ± 0.10	0.48 ± 0.22	0.34 ± 0.06
HBB	3.26 ± 0.85	8.53 ± 4.26	8.03 ± 1.98
Dec-602	0.35 ± 0.17	0.33 ± 0.25	0.62 ± 0.51
CPlus	0.56 ± 0.21	0.68 ± 0.55	2.00 ± 1.62
Dec-604CB	0.48 ± 0.48	0.12 ± 0.08	0.06 ± 0.06
syn-DP	0.21 ± 0.08	0.20 ± 0.06	0.17 ± 0.07
anti-DP	0.20 ± 0.03	0.41 ± 0.22	0.14 ± 0.03
$f_{ m anti}$	0.56 ± 0.11	0.63 ± 0.11	0.50 ± 0.18
ΣDP	0.41 ± 0.11	0.61 ± 0.26	0.31 ± 0.06
$\delta^{13}C_{lipid-extracted}$	$\textbf{-18.4} \pm 0.26$	$\textbf{-18.4} \pm 0.28$	n.a.
$\delta^{15}N_{bulk}$	12.8 ± 0.60	14.0 ± 0.48	n.a.
% lipids	82.3 ± 1.93	76.5 ± 1.71	88.0 ± 2.31

Table A6 Mean (\pm SEM) blubber concentrations of HFRs^a (ng/g lw) and skin δ^{13} C and δ^{15} N values (‰) in male and female St. Lawrence minke whales sampled between 2002 and 2013.

^{*a*} Compounds that were not detected: OBIND, DBDPE, Dec-603, and Dec-604. ^{*b*} Sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -205, -206, -207, -208, and -209. Following congeners were not detected in any samples: BDE-15, -71, -171, -180, -191, and -205. *n.a.*: not analyzed.

	2011	2013
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3
Σ_{35} PBDE ^b	127 ± 50.4	276 ± 14.4
PBEB	0.42 ± 0.12	0.69 ± 0.20
HBB	2.68 ± 0.62	2.63 ± 0.64
Dec-602	< MLOD	< MLOD
CPlus	0.16 ± 0.16	< MLOD
Dec-604CB	0.92 ± 0.16	1.06 ± 0.12
syn-DP	0.74 ± 0.06	0.96 ± 0.14
anti-DP	0.28 ± 0.10	0.32 ± 0.04
$f_{ m anti}$	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.06
ΣDP	1.02 ± 0.16	1.28 ± 0.15
$\delta^{13}C_{lipid-extracted}$	-18.5 ± 0.37	-19.2 ± 0.17
$\delta^{15}N_{bulk}$	15.6 ± 0.29	15.9 ± 0.81
% lipids	98.3 ± 1.20	96.3 ± 3.67

Table A7 Mean (\pm SEM) blubber concentrations of HFRs^a (ng/g lw) and skin δ^{13} C and δ^{15} N values (‰) in male Canadian Arctic belugas sampled in 2011 and 2013.

^{*a*} Compounds that were not detected: OBIND, DBDPE, Dec-603, and Dec-604.

^b Sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -205, -206, - 207, -208, and -209. Following congeners were not detected in any samples: BDE-15, -71, -138, -171, -180, -191, -201, -205, -206, and -208.

n.d.: not detected.

ANNEXE B

SUPPLEMENTARY MATERIAL – ASSOCIATIONS BETWEEN ORGANOHALOGEN EXPOSURE AND THYROID- AND STEROID-RELATED GENE RESPONSES IN ST. LAWRENCE ESTUARY BELUGAS AND MINKE WHALES

2.4.2 PCR-based sex determination (additional information)

Sex identification of whales was based on methods by Jayasankar et al. (2008). Briefly, DNA of minke whales was isolated using the DNeasy® blood and tissue mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) using 10-30 mg of skin biopsy aliquot. DNA was quantified using a NanoDrop[™] 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada). Loci of the Y-chromosome-specific region (SRY or Sexdetermining Y-chromosome gene) and a fragment of the ZFX/ZFY region (zinc finger protein genes located both on the X and Y chromosomes, respectively) were simultaneously amplified using primers described by Jayasankar et al. (2008). PCR analyses were performed using the iProofTM High-Fidelity DNA Polymerase kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Each reaction was performed in duplicate (i.e., one reaction per gene) with a total reaction volume of 13 µL, and using 250 ng of DNA template and a final concentration of 10 µM for each primer. Cycling parameters were 98°C for 150 s, followed by 35 cycles at 98°C for 10 s, 58°C for 25 s, and 72°C for 15 s. Quality control procedures included a no-template control in order to monitor for potential random or reagent contamination as well as primer dimer formation. A 2% agarose gel was used to identify sex of each whale by looking at the number of genes amplified.

Table B1 Mean (\pm SEM) and range (in parenthesis) concentrations (ng/g lw) of organochlorines (OCs) and halogenated flame retardants (HFRs) as well as lipid content (%) determined in biopsy blubber of belugas and minke whales from the St. Lawrence Estuary (Canada). Means were generated when compounds were quantified in at least 65% of the samples.

	Belugas	Minke whales
	n = 45	n = 11
Blubber lipid content (%)	12.9 ± 1.11 (1.50 - 39.6)	22.3 ± 1.85 (13.5 - 32.3)
005		
$\Sigma_{37}PCB^{a}$	$11,432 \pm 973$ (1,140 - 28,570)	n.a.
HCB	251 ± 39.4 (<mlod -="" 1,767)<="" td=""><td><i>n.a.</i></td></mlod>	<i>n.a.</i>
<i>p,p</i> '-DDE	4,536 ± 523 (623 - 16,820)	п.а.
Mirex	(<mlod -="" 249)<="" td=""><td><i>n.a.</i></td></mlod>	<i>n.a.</i>
trans-nonachlor	936 ± 79.0 (<mlod -="" 2,216)<="" td=""><td><i>n.a.</i></td></mlod>	<i>n.a.</i>
HFRs		
Σ_{29} PBDE ^b	$1,277 \pm 109 (375 - 4,740)$	375 ± 49.2 (174 - 626)
PBEB	3.67 ± 1.69 (< MLOD - 76.5)	1.28 ± 0.22 (< MLOD - 2.51)
HBB	$9.36 \pm 1.46 \ (< MLOD - 45.5)$	$2.68 \pm 0.37 \ (0.73 - 4.63)$
Dec-604 CB	$10.6 \pm 1.85 (< MLOD - 69.1)$	$11.9 \pm 1.49 \ (6.19 - 23.6)$
syn-DP	$5.97 \pm 1.94 \ (< MLOD - 66.3)$	$0.36 \pm 0.19 (< MLOD - 1.55)$
anti-DP	21.2 ± 4.92 (1.64 - 131)	$4.82 \pm 0.96 \ (2.07 - 13.0)$
ΣDP^{c}	27.2 ± 6.58 (1.83 - 197)	$5.18 \pm 0.92 \ (2.07 - 13.0)$

^a Sum of PCB-17, -18, -28, -31, -33, -44, -49, -52, -70, -74, -82, -87, -95, -99, -101, -105, -110, -118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -156, -158, -170, -171, -177, -180, -183, -187, -191, -194, -195, -199, and -209. Congeners that were not detected in any samples: PCB-169, -205, -206, and -208.

^b Sum of BDE-7, -10, -17, -28, -47, -49, -66, -77, -85, -99, -100, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -207, -208, and -209. Congeners that were not detected in any samples: BDE-15, -71, -119, -171, -205, and -206.

^e Sum of *syn*- and *anti*-DP.

n.a.: Not analyzed.

Table B2 List of genes analyzed in biopsy skin samples of St. Lawrence Estuary belugas and minke whales.

Category	Gene name	Abbreviation
Steroid axis	Estrogen receptor a	Esra
	Estrogen receptor β	Esrβ
	Glucocorticoid receptor	Nr3c1
	Hydroxysteroid-11-β-dehydrogenase 2	<i>Hsd11β2</i>
	Hydroxysteroid-17-β-dehydrogenase 2	Hsd17β2
	Steroidogenic acute regulatory protein	Star
Thyroid axis	Deiodinase type 1	Diol
	Deiodinase type 2	Dio2
	Thyroid hormone receptor α	Thra
	Thyroid hormone receptor β	Threta
Xenobiotic response	Aryl hydrocarbon receptor	Ahr
	Cytochrome P450 1a1	Cyplal
Reference genes	Cytoplasmic β Actin	Actβ
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh
	Ribosomal protein L8	Rpl8
	Succinate dehydrogenase	Sdha
	α-Tubulin	Tub

as
60
lu
٥
2
È.
1a
E.
N I
T.
S.
ü
re
≥
ģ
ŗ.
01
of
ž
·Η
Š
>
Š.
dc
·Ĕ
<u> </u>
В.
S
G
Š.
1 e
</td
7
ЪЪ
_ H
J
ŭ
E .
g
E.
ŝ
se
ŝ
ō,
foi
R for
CR for
PCR for
I qPCR for
in qPCR for
d in qPCR for
sed in qPCR for
used in qPCR for
s used in qPCR for
ers used in qPCR for
ners used in qPCR for
rimers used in qPCR for
primers used in qPCR for
e primers used in qPCR foi
the primers used in qPCR for
gene primers used in qPCR for
e gene primers used in qPCR foi
ice gene primers used in qPCR for
ence gene primers used in qPCR for
srence gene primers used in qPCR for
ference gene primers used in qPCR for
reference gene primers used in qPCR for
d reference gene primers used in qPCR for
and reference gene primers used in qPCR for
and reference gene primers used in qPCR for
et and reference gene primers used in qPCR foi
rget and reference gene primers used in qPCR for
arget and reference gene primers used in qPCR for
Target and reference gene primers used in qPCR for
3 Target and reference gene primers used in qPCR for
B3 Target and reference gene primers used in qPCR for
le B3 Target and reference gene primers used in qPCR for
ble B3 Target and reference gene primers used in qPCR for
able B3 Target and reference gene primers used in qPCR for

Gene abbreviation	Accession number	Primer sequence (5' – 3')	Amplicon size (bp)	Efficiency (%)	R^{2}	Reference
$Act\beta$	<u>KC145564.1</u>	F-CTTCCAGCCTTCCTTGG	112	107	0.995	1
		R-CACCGTGTTGGCATAGAGGT				
Ahr	<u>AF332999.1</u>	F-TATGCTGCCACAGAGGAGTG	97	109	0.994	2
		R-ATGTCCCCCTAATGTCCCCC				
Diol	XM_019937759.1	F-TGGGCAAAGTGCTTCTGACA	79	109	066.0	4
		R-GCCATGCCAGTCTTCTCACT				
Dio2	XM 019919910.1	F-GAGGTGAAGAAGCACCGGAA	66	102	0.965	4
		R-GTCAGCCACAACTTGGCACT				
Esra	<u>XM_022559363.1</u>	F-GTCTTGTCCCTGACAGCCGA	98	109	0.966	1
		R-TCACTGAAGGGTCTGGTAGGAT				
Gapdh	<u>KC145563.1</u>	F-ATGACCACTTCGGCATCGTG	144	107	0.991	1
		R-CGCCAGTAGAAGCAGGGATG				
$H_{sd11\beta2}$	XM 004328480.2	F-CCCTTATGCCCTTGGTCCTC	70	104	0.970	4
		R-TCCTTTAGGCCAGGCTTTGG				
Hsd17β2	XM 019940508.1	F-CCGCAACAGATAAAAGATGCCCAC	78	104	0.988	4
		R-ATTGTTGACCACAGCCCACA				
Nr3c1	<u>KC145560.1</u>	F-TCAAGCCCTGGAATGAGACC	85	109	0.994	1
		R-CTAGGCAGAGTTTGGGAGGTG				
Rpl8	<u>KC145562.1</u>	F-CCATGAATCCTGTGGAGCAT	65	110	0.997	ę

		R-GGTAGAGGGTTTGCCCGATG				
Sdha	XM 019951056.1	F-TTTCAAGGAGCGGGTTGACG	134	105	0.992	4
		R-ATTCCAGGGGGGGGGCCTTCCCA				
Star	XM 019921216.1	F-CGAATGGGGGACGAAGTGTTG	147	107	0.981	5
		R-TGACATTCGGGTTCCACTCG				
$Thr\alpha$	KC145565.1	F-GCCTTGCGAAGACCAGATCA	93	101	066.0	1
		R-GTGTCGCTCTCGGGGGTCATA				
Threta	<u>KC145566.1</u>	F-CATCAAGACCGTCACCGAGG	66	108	0.981	1
		R-GGCGCTTGTCCAATGTCTTC				
Tub	XM 019926259.1	F-TTTGAGCCAGCCAACCAGAT	123	108	0.991	4
		R-CTTGATGGTGGCAATGGCAG				

Primers were designed by the authors based on mRNA sequences of belugas from Noël *et al.* (2014).
 Primers were designed by the authors based on mRNA sequences of belugas from Jensen and Hahn (2001).
 Primers were designed by the authors based on mRNA sequences of belugas from Chen *et al.* (2016).
 Primers were designed by the authors based on the common conserved region of multiple predicted cetacean mRNA sequences.
 Primers were designed by the authors based on the common conserved region of multiple predicted cetacean mRNA sequences.

Table B4. Target and reference gene primers used in qPCR for assessment of mRNA levels in biopsy skin of St. Lawrence Estuary Minke

Gene abbreviation	Accession number	Primer sequence	Amplicon size (bp)	Efficiency (%)	R^2	Reference
c.						
Actß	<u>XM_007186768.1</u>	F-CGCAAGTACTCCGTGTGGAT	128	103	0.997	1
		R-GCCTAGAAGCATTTGCGGTG				
Ahr	XM 007164875.1	F-GCCACCATCTGCCTTTCTTT	101	104	0.999	1
		R-CATTTCAGTGTGGGGGTTCCATC				
Cyplal	XM 007197706.1	F-GAGGGAAAGGGAAAGGCAGT	118	112	0.988	1
		R-GAGGAAGGCAATCTCCCAGG				
Dio2	XM 007188702.1	F-GATTGAGGGGGAAGAGACACG	145	101	0.980	1
		R-AGGGATGGAGAAGGATAGACCAG				
Esra	XM 007196927.1	F-GGAAGCTCCTGTTTGCTCCT	73	66	0.980	1
		R-ATCTCCACCATGCCCTCAAC				
Esreta	XM 007192983.1	F-CGGCAAGCTCATCTTTGCTC	92	103	0.970	1
		R-ACCCGGATTTTCCTCTCATCC				
Gapdh	XM 007170258.1	F-TTCCCTATAAATCCCGGCTGC	84	113	0.986	1
		R-GCACTGCACACAAGACACAG				
Hsd17β2	XM 007182587.1	F-TCCCTTCTTGCCTCTCCGTTC	132	105	0.991	1
		R-TCCTGGCTCAGAGAAGAAGTG				
Nr3cI	XM 007194163.1	F-CTTGGCATCACTTCGCTCCT	97	106	0.998	1
		R-CGCTTGTCAAAAATCGCAGC				
Rp18	<u>XM_007185512.1</u>	F-AAGACCAGAGTGAAGCTGCC	135	105	0.996	1

167

		R-ATACTTGTGGTAGGCACGGC				
Sdha	XM 007191666.1	F-GGTGGCACTTCTACGACACT	113	101	0.991	1
		R-GCCGTAATTCTCCAGCTCCA				
Star	XM 007178384.1	F-TACAAGGATTAGGGCCGCAT	131	107	0.965	1
		R-AGTTCTTGCCGTCTTGGTG				
$Thr\alpha$	XM 007177581.1	F-GAAACCAGGCACGGAGAGAA	121	108	0.988	-
		R-TCTGGCCAGCCTCAGTTAAT				
Threta	XM 007173858.1	F-GGTGTTCCTCAAACCCCGAG	131	106	0.992	1
		R-GACCTTTTCCGAACCCTCGT				
Tub	XM 007198387.1	F-GGAGCATTCTGACTGTGCCT	144	106	0.991	1
		R-CTCAGGGAAGCAGTGATGGA				
1 Derimonic monit	dociound by the outhour	hand an madiated mDNA commence of minite	oloc from Vim	4 ~1 (0014)		

1. Primers were designed by the authors based on predicted mRNA sequences of minke whales from Yim et al. (2014).

Table B5 Percentages of biopsy blubber samples (belugas and minke whales combined) that were above the method limits of quantification $(MLOQs)^a$ for PBDE congeners. Definition of abbreviations can be found in footnote *b*.

	% > MLOQs
BDE-7	92.9
BDE-10	75.0
BDE-15	0
BDE-17	96.4
BDE-28/PBT	100
BDE-47	100
BDE-49	100
BDE-66	89.3
BDE-71	0
BDE-77	33.9
BDE-85	50.0
BDE-99	100
BDE-100	100
BDE-119	0
BDE-126	96.4
BDE-138	16.1
BDE-139	23.2
BDE-140	21.4
BDE-153	94.6
BDE-154	100
BDE-171	0
BDE-180	1.79
BDE-183/Dec-604	57.1
BDE-184	26.8
BDE-191	1.79
BDE-196	46.4
BDE-197/-204	48.2
BDE-201	28.6
BDE-203	57.1
BDE-205	0
BDE-206	0
BDE-207	37.5
BDE-208	42.9
BDE-209	92.9

^a MLOQs can be found in Simond *et al.* (2017).

^b BDE (bromodiphenyl ether), Dec-604 (Dechlorane 604), PBT (Pentabromotoluene).

Table B6 Percentages of biopsy blubber samples (belugas and minke whales combined) that were above method limits of quantification (MLOQs)^a for emerging HFRs. Definition of abbreviations can be found in footnote b.

	% > MLOQs
PBEB	85.7
HBB	89.3
OBIND	0
DBDPE	0
Cplus	0
Dec-602	0
Dec-603	0
Dec-604 CB	92.9
syn-DP	55.4
anti-DP	100

^a MLOQs can be found in Simond et al. (2017).

^b PBEB (pentabromoethyl benzene), HBB (hexabromobenzene), OBIND (octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindane), DBDPE (decabromodiphenylethane), CPlus (Chlordene plus), Dec-602 (Dechlorane 602), Dec-603 (Dechlorane 603), Dec-604 CB (Dechlorane 604 component B), *syn*-DP (*syn*-Dechlorane plus), *anti*-DP (*anti*-Dechlorane plus).

Table B7 Percentages of beluga biopsy blubber sample that were above the method limits of detection (MLODs)^a for PCB congeners. PCB congeners were identified according to their BZ congener number.

	% > MLODs	
PCB-17/-18	57.8	
PCB-28/-31	95.6	
PCB-33	33.3	
PCB-44	77.8	
PCB-49	84.4	
PCB-52	82.2	
PCB-70	80.0	
PCB-74	80.0	
PCB-82	42.2	
PCB-87	93.3	
PCB-95	100	
PCB-99	97.8	
PCB-101	95.6	
PCB-105	84.4	
PCB-110	93.3	
PCB-118	86.7	
PCB-128	84.4	
PCB-132	97.8	
PCB-138 ^d	100	
PCB-149	100	
PCB-151	97.8	
PCB-153	100	
PCB-156	31.1	
PCB-158/-138	100	
PCB-169	0	
PCB-170	91.1	
PCB-171	62.2	
PCB-177	86.7	
PCB-180	97.8	
PCB-183	88.9	
PCB-187	100	
PCB-191	2.22	
PCB-194	35.6	
PCB-195	2.22	
PCB-199	64.4	
PCB-205	0	
PCB-206	0	

PCB-208	0
PCB-209	93.3

^a MLODs were set to 5.00 ng/g ww for all congeners.

Table B8 Percentages of beluga biopsy blubber samples that were above the method limits of detection $(MLODs)^a$ for OC pesticides and by-products. Definition of abbreviations can be found in footnote *b*.

	% > MLODs
Aldrin	0
<i>p,p'</i> -DDD	0
<i>p,p'</i> -DDE	100
<i>p,p'</i> -DDT	0
Dieldrin	0
Endosulfan I	0
Endosulfan II	0
Endosulfan sulfate	0
Endrin	0
Endrin aldehyde	0
Endrin ketone	0
Heptachlor epoxyde	0
α-HCH	0
β-HCH	0
γ-НСН	0
δ -HCH	0
Heptachlor	0
HCB	95.6
Methoxychlor	0
Mirex	8.89
trans-nonachlor	97.8
OCS	0
Oxychlordane	0

 $^{\rm a}$ MLODs varied between samples from 2.90 and 8.00 ng/g ww according to the dilutions applied for injection.

^b DDD (Dichlorodiphenyldichloroethane), DDE (Dichlorodiphenyldichloroethylene), DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane), HCB (Hexachlorobenzene), HCH (Hexachlorocyclohexane), γ-HCH (Lindane), OCS (Octachlorostyrene).

ANNEXE C

SUPPLEMENTARY MATERIAL – METABOLOMIC PROFILES OF THE ENDANGERED ST. LAWRENCE ESTUARY BELUGA POPULATION AND ASSOCIATIONS WITH ORGANOHALOGEN CONTAMINANTS

	% > MLOQs
BDE-7	90.0
BDE-10	70.0
BDE-15	2.50
BDE-17	95.0
BDE-28/PBT	100
BDE-47	100
BDE-49	100
BDE-66	87.5
BDE-71	0
BDE-77	25.0
BDE-85	40.0
BDE-99	100
BDE-100	100
BDE-119	0
BDE-126	95.0
BDE-138	17.5
BDE-139	27.5
BDE-140	25.0
BDE-153	92.5
BDE-154	100
BDE-171	0
BDE-180	2.50
BDE-183/Dec-604	57.5
BDE-184	20.0
BDE-191	0
BDE-196	47.5
BDE-197/-204	47.5
BDE-201	27.5
BDE-203	52.5
BDE-205	0
BDE-206	0
BDE-207	30.0
BDE-208	40.0
BDE-209	90.0

Table C1. Percentages of St. Lawrence Estuary (SLE) male beluga blubber samples that were above the method limits of quantification (MLOQs)^a for PBDE congeners.

^a MLOQs can be found in Simond *et al.* (2017).

BDE (bromodiphenyl ether); Dec-604 (Dechlorane 604); PBT (Pentabromotoluene).

Table C2. Percentages of SLE male beluga blubber samples that were above the method limits of quantification (MLOQs)^a for emerging HFRs.

	% > MLOQs	
PBEB	82.5	
HBB	87.5	
OBIND	0	
DBDPE	0	
Cplus	0	
Dec-602	0	
Dec-603	0	
Dec-604 CB	90.0	
syn-DP	62.5	
anti-DP	100	

^a MLOQs can be found in Simond *et al.* (2017).

PBEB (pentabromoethyl benzene); HBB (hexabromobenzene); OBIND (octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindane); DBDPE (decabromodiphenylethane); CPlus (Chlordene plus); Dec-602 (Dechlorane 602); Dec-603 (Dechlorane 603); Dec-604 CB (Dechlorane 604 component B); *syn*-DP (*syn*-Dechlorane plus); *anti*-DP (*anti*-Dechlorane plus).

	% > MLODs
CB-17/-18	55.0
CB-28/-31	95.0
CB-33	30.0
CB-44	75.0
CB-49	82.5
CB-52	82.5
CB-70	80.0
CB-74	80.0
CB-82	42.5
CB-87	92.5
CB-95	100
CB-99	97.5
CB-101	95.0
CB-105	82.5
CB-110	92.5
CB-118	85.0
CB-128	82.5
CB-132	97.5
CB-138 ^d	100
CB-149	100
CB-151	97.5
CB-153	100
CB-156	30.0
CB-158/-138	100
CB-169	0
CB-170	90.0
CB-171	65.0
CB-177	87.5
CB-180	97.5
CB-183	87.5
CB-187	100
CB-191	2.50
CB-194	37.5
CB-195	2.50
CB-199	67.5
CB-205	0
CB-206	0
CB-208	0

Table C3. Percentages of SLE male beluga blubber samples that were above the method limits of detection (MLODs)^a for polychlorinated biphenyls (PCBs).

^a MLODs were set to 5.00 ng/g for all congeners.

Table C4. Percentages of SLE male beluga blubber samples that were above the method limits of detection $(MLODs)^a$ for organochlorine pesticides and by-products.

	% > MLODs	
Aldrin	0	
<i>p,p'</i> -DDD	0	
<i>p</i> , <i>p</i> '-DDE	100	
<i>p,p'</i> -DDT	0	
Dieldrin	0	
Endosulfan I	0	
Endosulfan II	0	
Endosulfan sulfate	0	
Endrin	0	
Endrin aldehyde	0	
Endrin ketone	0	
Heptachlor epoxyde	0	
α-НСН	0	
β-HCH	0	
у-НСН	0	
δ -HCH	0	
Heptachlor	0	
HCB	95.0	
Methoxychlor	0	
Mirex	10.0	
trans-nonachlor	97.5	
OCS	0	
Oxychlordane	0	

^a MLODs varied between samples from 2.90 to 8.00 ng/g ww according to the dilutions applied during injection.

DDD (Dichlorodiphenyldichloroethane); DDE (Dichlorodiphenyldichloroethylene); DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane); HCB (Hexachlorobenzene); HCH (Hexachlorocyclohexane); γ -HCH (Lindane); OCS (Octachlorostyrene).

Table C5. Accurate mass-to-charge ratios (m/z) of SCCP $[M - Cl]^-$ ions monitored in blubber of male belugas from the St. Lawrence Estuary (Canada), and percentages of samples that were above the instrument detection limits (IDLs)^a.

SCCP isomers	m/z	% > IDL
C ₁₀ Cl ₅	279.00606	41.0
$C_{10}Cl_{6}$	312.96650	48.7
$C_{10}Cl_7$	346.92750	48.7
$C_{10}Cl_8$	380.88860	48.7
$C_{10}Cl_9$	416.84670	43.6
$C_{10}Cl_{10}$	450.80770	0
$C_{11}Cl_5$	293.02110	76.9
$C_{11}Cl_{6}$	326.98220	48.7
$C_{11}Cl_7$	360.94397	46.2
$C_{11}Cl_8$	394.90420	38.5
$C_{11}Cl_9$	430.86230	15.4
$C_{11}Cl_{10}$	464.82330	0
$C_{12}Cl_5$	307.03680	87.2
$C_{12}Cl_6$	340.99780	64.1
$C_{12}Cl_7$	374.95880	38.5
$C_{12}Cl_8$	408.91990	15.4
$C_{12}Cl_9$	444.87790	15.4
$C_{12}Cl_{10}$	478.83900	0
C ₁₃ Cl ₅	321.05240	20.5
$C_{13}Cl_6$	355.01350	59.0
$C_{13}Cl_7$	388.97450	48.5
$C_{13}Cl_8$	422.93550	0
$C_{13}Cl_9$	458.89360	0
$C_{13}Cl_{10}$	492.85460	0

^a IDLs were estimated from three technical mixtures from LGC Standards (DRE-X23105100CY, DRE-X23105500Y, and DRE-X23106300CY) analyzed at different average chlorination (C₁₀-C₁₃ 51.5% Cl, C₁₀-C₁₃ 55.5% Cl and C₁₀-C₁₃ 63% Cl, respectively). The IDLs for SCCPs were calculated according to EPA 40 CPR Part 136 (Clean Water Act Methods, part II, Vol 80 no. 33, 2015) and defined as 5-fold the instrument background noise. The combined average IDL was calculated as 0.294 ng/µL from individual IDLs: 500 pg/µL (51.5% Cl), 271 pg/µL (55.5% Cl) and 112 pg/µL (63% Cl). As standards for not every individual homologue isomer was available for purchase, it was not possible to calculate or estimate their specific detection limits.

3.4.2 Chemical analyses

Method limits of detection and quantification for HFRs, PCBs/OCs and SCCPs

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 for HFRs and 10 for OCs) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit. MLODs and MLOQs for OC and HFR compounds can be found in Simond *et al.* (2019), but those for SCCPs could not be calculated as authentic internal standards were not spiked prior to sample extraction. Tables C2 and C5 to C8 are generated from partial data in Simond *et al.* (2019).

Table C6. Mean (\pm SEM) recovery percentages of spiked internal standards for HFR, PCB and OC pesticide analyses in SLE male beluga blubber samples.

Internal standards	% recovery	
BDE-30	95.3 ± 1.1	
BDE-156	96.0 ± 1.9	
¹³ C-BDE-209	64.0 ± 3.4	
¹³ C-anti-DP	104 ± 1.8	
CB-9	75.3 ± 1.0	
CB-136	91.0 ± 1.6	
CB-204	91.0 ± 0.9	
Naphthalene-d ₁₂	91.6 ± 0.8	
Phenantrene-d ₁₀	103 ± 1.0	
Chrysene-d ₁₂	77.9 ± 1.7	

BDE (bromodiphenyl ether); DP (dechlorane plus); CB (chlorinated biphenyl).

Table C7. Mean (± SEM) percentages of variation from certified concentrations of standard reference materials (NIST 1945 Whale Blubber, Gaithersburg, MD, USA).

Standard reference materials	% variation
$PCBs^a$ ($n = 32$)	33.6 ± 3.2
OC pesticides ^b $(n = 5)$	37.0 ± 5.3
PBDEs ^c $(n = 4)$	40.2 ± 10.7
^a PCB (polychlorinated biphenyl): CB-28, -44, -4	49, -52, -70, -74, -82, -87, -95, -99, -101, -105, -110,

-118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -156, -170, -177, -180, -183, -187, -194, -195, -199, -206, -208, and -209.

^b OC (organochlorine): *p,p* '-DDE, hexachlorobenzene, *cis*-chlordane, *trans*-nonachlor, and mirex.

^c PBDE (polybrominated diphenyl ether): BDE-47, -99, -100, and -153.

Table C8. Mean (\pm SEM) concentrations (ng/g lw) and ranges of the five most abundant shortchained chlorinated paraffins (SCCPs), PCBs and OC pesticides, and HFRs determined in blubber of male belugas (n = 40) from the St. Lawrence Estuary (Canada). Means were calculated when compounds/congeners were quantified in more than 65% of samples.

	Mean ± SEM		
Blubber lipid content (%)	13.5 ± 1.17 (1.50 - 39.6)		
Short-chain chlorinated paraffins			
$C_{11}Cl_{6}$	13,006 ± 3,045 (<mlod -="" 60,465)<="" td=""></mlod>		
$C_{11}Cl_5$	11,031 ± 2,279 (<mlod -="" 49,786)<="" td=""></mlod>		
$C_{11}Cl_7$	8,167 ± 3,201 (<mlod -="" 65,386)<="" td=""></mlod>		
$C_{10}Cl_{6}$	7,626 ± 1,840 (<mlod -="" 39,654)<="" td=""></mlod>		
$C_{10}Cl_7$	5,870 ± 1,554 (<mlod -="" 31,170)<="" td=""></mlod>		
$\Sigma_{18}SCCP^{b}$	60,348 ± 11,740 (<mlod -="" 272,578)<="" td=""></mlod>		
PCBs and OC pesticides ^a			
$\Sigma_{37}PCB^{c}$	$11,049 \pm 1,028$ (1,140 - 28,570)		
НСВ	239 ± 42.4 (<mlod -="" 1,767)<="" td=""></mlod>		
<i>p,p</i> '-DDE	4,541 ± 578 (623 - 16,820)		
Mirex	(<mlod -="" 249)<="" td=""></mlod>		
trans-nonachlor	908 ± 85.5 (<mlod -="" 2,216)<="" td=""></mlod>		
HFRs ^a			
$\Sigma_{29} PBDE^d$	$1,243 \pm 114 \ (301 - 4,740)$		
PBEB	2.01 ± 0.38 (< MLOD - 10.9)		
HBB	8.38 ± 1.29 (< MLOD - 32.2)		
Dec-604 CB	$9.57 \pm 1.41 (< MLOD - 44.4)$		
syn-DP	6.01 ± 2.13 (< MLOD - 66.3)		
anti-DP	20.6 ± 5.27 (1.64 - 131)		
ΣDP^e	26.6 ± 7.08 (1.83 - 197)		

^a Partial data from Simond et al. (Simond *et al.*, 2019).

^b Sum of $C_{10}Cl_5$, $C_{10}Cl_6$, $C_{10}Cl_7$, $C_{10}Cl_8$, $C_{10}Cl_9$, $C_{11}Cl_5$, $C_{11}Cl_6$, $C_{11}Cl_7$, $C_{11}Cl_8$, $C_{11}Cl_9$, $C_{12}Cl_5$, $C_{12}Cl_5$, $C_{12}Cl_6$, $C_{12}Cl_7$, $C_{12}Cl_8$, $C_{12}Cl_9$, $C_{13}Cl_5$, $C_{13}Cl_6$ and $C_{13}Cl_7$. Congeners that were not detected in any samples: $C_{10}Cl_{10}$, $C_{11}Cl_{10}$, $C_{12}Cl_{10}$, $C_{13}Cl_8$, $C_{13}Cl_9$, and $C_{13}Cl_{10}$.

^c Sum of CB-17, -18, -28, -31, -33, -44, -49, -52, -70, -74, -82, -87, -95, -99, -101, -105, -110, -118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -156, -158, -170, -171, -177, -180, -183, -187, -191, -194, -195, -199, and -209. Congeners that were not detected in any samples: CB-169, -205, -206, and -208.

^e Sum of *syn*- and *anti*-DP.

^d Sum of BDE-7, -10, -17, -28, -47, -49, -66, -77, -85, -99, -100, -126, 138, -139, -140, -153, -154, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201, -203, -204, -207, -208, and -209. Congeners that were not detected in any samples: BDE-15, -71, -119, -171, -205, and -206.

Target	Abbreviation	PubChem	Internal standard
		CID	
Amino acids			
Alanine	Ala	5950	d4-Ala
Arginine	Arg	6322	¹⁵ N ₂ -Arg
Asparagine	Asn	6267	¹⁵ N ₂ -Asn
Aspartic acid	Asp	5960	d ₃ -Asp
Citrulline	Cit	9750	¹³ C-d ₄ -Cit
Glutamine	Gln	5961	d ₅ -Gln
Glutamic acid	Glu	33032	d ₃ -Glu
Glycine	Gly	750	¹³ C ₂ - ¹⁵ N-Gly
Histidine	His	6274	¹³ C ₆ -His
Isoleucine	Ile	6306	¹³ C ₆ -Ile
Leucine	Leu	6106	¹³ C ₆ -Ile
Lysine	Lys	5962	d ₆ -Orn
Methionine	Met	6137	d ₃ -Met
Ornithine	Orn	6262	d ₆ -Orn
Phenylalanine	Phe	6140	d ₅ -Phe
Proline	Pro	145742	d ₇ -Pro
Serine	Ser	5951	d ₃ -Ser
Threonine	Thr	6288	¹³ C ₄ -Thr
Tryptophan	Trp	6305	¹⁵ N ₂ -Trp
Tyrosine	Tyr	6057	d4-Tyr
Valine	Val	6287	d ₈ -Val
Biogenic amines			
Acetylornithine	Ac-Orn	439232	d ₆ -Orn
Asymmetric dimethylarginine	ADMA	123831	d7-ADMA
α -aminoadipic acid	α -AAA	469	d ₆ -Orn
Carnosine	Carnosine	439224	¹³ C ₆ -His
Creatinine	Creatinine	588	d ₃ -Creatinine
Dimethylamine	DMA	674	d7-ADMA
β -Hydroxytyrosine	DOPA	836	d ₃ -DOPA
Dopamine	Dopamine	681	d ₄ -Dopamine
γ-Aminobutyric acid	GABA	119	d ₈ -Val
Histamine	Histamine	774	¹³ C ₆ -His
Hydroxyproline	Нур	5810	d7-Pro
Kynurenine	Kynurenine	846	d4-Tyr
Methioninesulfoxide	Met-SO	847	d ₃ -Met
Nitrotyrosine	Nitro-Tyr	65124	d4-Tyr

Table C9. List of metabolites analyzed in male beluga skin samples as well as the corresponding abbreviations, PubChem compound identification numbers (CIDs), and matched internal standards.

Phenylethylamine	PEA	1001	d ₄ -Serotonin
Putrescine	Putrescine	1045	d ₄ -Putrescine
Sarcosine	Sarcosine	1088	d ₃ -Sarcosine
Symmetric dimethylarginine	SDMA	169148	d ₇ -ADMA
Serotonin	Serotonin	5202	d ₄ -Serotonin
Spermidine	Spermidine	1102	d ₄ -Putrescine
Spermine	Spermine	1103	d ₄ -Putrescine
Taurine	Taurine	1123	¹³ C ₂ -Taurine
Carbohydrates			
∑hexose	Hex	206	¹³ C ₆ -Glucose
Fatty acids			
Capric acid	C10:0	2969	d ₁₉ -C10:0
Myristic acid	C14:0	11005	d ₂₇ -C14:0
Palmitic acid	C16:0	985	d ₃₁ -C16:0
Palmitoleic acid	C16:1 <i>ω</i> 7	445638	d ₃₁ -C16:0
Stearic acid	C18:0	5281	d ₃₅ -C18:0
Oleic acid	C18:1 <i>ω</i> 9	445639	d ₃₁ -C16:0
Linoleic acid	C18:2 <i>ω</i> 6	5280450	d ₃₅ -C18:0
Linolenic acid	C18:3 <i>ω</i> 3	5280934	d ₅ -C22:6
Eicosadienoic acid	C20:2 <i>ω</i> 6	6439848	d ₅ -C22:6
Eicosatrienoic acid	C20:3 <i>ω</i> 3	5312529	d5-C22:6
Dihomo-y-linolenic acid	C20:3 <i>w</i> 6	5280581	d ₅ -C22:6
Arachidonic acid	C20:4 <i>w</i> 6	444899	d5-C22:6
Eicosapentaenoic acid	C20:5 <i>ω</i> 3	446284	d5-C20:5
Adrenic acid	C22:4 <i>w</i> 6	187287	d ₅ -C22:6
all-cis-4,8,12,15,19-	C22:5 <i>w</i> 3c1	5282849	d ₅ -C20:5
docosapentaenoic acid			
all-cis-7,10,13,16,19-	C22:5\u03c2	5497182	d5-C20:5
docosapentaenoic acid			
all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16-	C22:5 <i>w</i> 6	6441454	d5-C20:5
docosapentaenoic acid			
Docosahexaenoic acid	C22:6 <i>ω</i> 3	445580	d ₅ -C22:6
Energy metabolites			
Aconitic acid	Aconitic acid	309	¹³ C ₄ -fumaric acid
α -ketobutyric acid	Ketobutyric acid	58	$^{13}C_4$ -D ₂ - α -ketobutyric acid
α -ketoglutaric acid	Ketoglutaric acid	51	$^{13}C_5-\alpha$ -ketoglutaric acid
3',5'-Cyclic AMP	cAMP	6076	$^{13}C_5$ -cAMP
Dihydroxyacetone phosphate	DHAP	668	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate
Fumaric acid	Fumaric acid	444972	¹³ C ₄ -fumaric acid
Glutathione	GSH	124886	¹³ C ₅ -cAMP
Glutathione disulfide	GSSG	65359	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate
Hexose-1-phosphate	Hexose-phosphate	466	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate

Lactic acid	Lactic acid	612	¹³ C ₃ -lactic acid
Malic acid	Malic acid	525	¹³ C ₄ -fumaric acid
Oxaloacetic acid	Oxaloacetic acid	970	$^{13}C_4$ -D ₂ - α -ketobutyric acid
D-ribulose-5-phosphate	Pentose-	439184	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate
	phosphate		
Phosphoenolpyruvate	PEP	1005	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate
Pyruvic acid	Pyruvic acid	1060	¹³ C ₂ -pyruvic acid
Succinic acid	Succinic acid	1110	¹³ C ₄ -succinic acid
D-erythrose-4-phosphate	Tetrose-phosphate	122357	¹³ C ₆ -glucose-6-phosphate

Table C10. Percentages of samples that were outside the calibration curve (OCC) and above the method limits of detection (MLODs)^{*a*}, and mean (\pm SEM) and range concentrations (μ g/g ww) of metabolites determined in skin of male belugas (n = 40) from the St. Lawrence Estuary (Canada). Means were calculated when compounds were quantified in more than 65% of samples.

Target	% < OCC	% > MLODs	Mean ± SEM
Amino acids			
Alanine	0	100	533 ± 13.2 (338 - 726)
Arginine	0	100	$20.9 \pm 0.75 (12.3 - 30.1)$
Asparagine	0	100	47.5 ± 1.60 (21.8 - 70.1)
Aspartic acid	0	100	$18.5 \pm 0.98 (5.51 - 32.8)$
Citrulline	0	100	$163 \pm 5.67 (92.5 - 269)$
Glutamine	0	100	330 ± 14.6 (161 - 702)
Glutamic acid	0	100	208 ± 6.04 (151 - 311)
Glycine	0	100	325 ± 9.21 (213 - 493)
Histidine	0	100	107 ± 3.88 (42.4 - 171)
Isoleucine	0	100	157 ± 4.73 (106 - 225)
Leucine	0	100	249 ± 6.90 (178 - 353)
Lysine	0	100	32.1 ± 0.92 (18.4 - 45.5)
Methionine	0	100	61.4 ± 2.26 (30.4 - 86.2)
Ornithine	0	100	9.62 ± 0.34 (4.01 - 15.5)
Phenylalanine	0	100	$159 \pm 4.19 (90.6 - 237)$
Proline	0	100	139 ± 5.84 (69.2 - 254)
Serine	0	100	78.9 ± 1.94 (40.9 - 99.5)
Threonine	0	100	51.7 ± 2.01 (19.6 - 82.2)
Tryptophan	0	100	23.4 ± 0.89 (12.0 - 37.9)
Tyrosine	0	100	92.4 ± 2.82 (60.5 - 164)
Valine	0	100	447 ± 11.9 (297 - 634)
Biogenic amines			
Acetylornithine	0	100	1.83 ± 0.13 (0.81 - 5.47)
Asymmetric dimethylarginine	80.0	82.5	-
α -aminoadipic acid	0	100	$12.5 \pm 1.00 (5.04 - 42.4)$
Carnosine	75.0	100	-
Creatinine	2.50	0	14.6 ± 0.44 (8.11 - 20.8)
Dimethylamine	0	0	-
β -Hydroxytyrosine	0	0	-
Dopamine	0	0	-
γ -Aminobutyric acid	70.0	100	-
Histamine	0	0	-
Hydroxyproline	0	100	37.7 ± 1.49 (20.6 - 66.3)
Kynurenine	90.0	95.0	-

Methioninesulfoxide	0	100	$5.45 \pm 0.3 \ (2.44 - 11.5)$
Nitrotyrosine	0	0	-
Phenylethylamine	0	0	-
Putrescine	0	100	$2.05 \pm 0.22 \ (0.48 - 7.34)$
Sarcosine	0	100	$56.5 \pm 1.88 (30.5 - 93.2)$
Symmetric dimethylarginine	0	0	-
Serotonin	0	0	-
Spermidine	50.0	100	-
Spermine	5.00	97.5	-
Taurine	15.0	100	$1,078 \pm 26.0 \; (787 - 1,440)$
Carbohydrates			
∑hexose	0	100	3,963 ± 182 (2,290 - 7,390)
Fatty acids			
Capric acid	0	0	-
Myristic acid	0	100	21.6 ± 1.74 (5.22 - 50.8)
Palmitic acid	0	100	-
Palmitoleic acid	0	100	123 ± 11.9 (23.1 - 296)
Stearic acid	0	100	35.7 ± 1.81 (14.6 - 60.0)
Oleic acid	0	100	$418 \pm 34.2 (124 - 917)$
Linoleic acid	0	100	-
Linolenic acid	0	0	-
Eicosadienoic acid	60.0	100	-
Eicosatrienoic acid	0	0	-
Dihomo- <i>y</i> -linolenic acid	0	0	-
Arachidonic acid	0	100	33.9 ± 2.75 (9.18 - 77.6)
Eicosapentaenoic acid	0	100	$156 \pm 9.31(54.7 - 305)$
Adrenic acid	0	35.0	-
all-cis-4,8,12,15,19-	0	100	
docosapentaenoic acid			$12.9 \pm 0.69 \ (6.79 - 23.9)$
all-cis-7,10,13,16,19-	0	100	× , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
docosapentaenoic acid			84.7 ± 6.47 (22.6 - 214)
all-cis-4,7,10,13,16-	5.00	100	
docosapentaenoic acid			$8.19 \pm 0.34 \ (4.43 - 12.5)$
Docosahexaenoic acid	0	100	58.5 ± 4.24 (19.1 - 122)
Energy metabolites			
Aconitic acid	0	100	$0.61 \pm 0.06 \ (0.11 - 1.52)$
α -ketobutyric acid	0	0	-
α -ketoglutaric acid	0	100	$4.27 \pm 0.25 \ (1.63 - 7.38)$
3',5'-Cyclic AMP	92.5	92.5	-
Dihydroxyacetone phosphate	45.0	100	-
Fumaric acid	20.0	100	$14.4 \pm 0.74 (5.38 - 24.6)$
Glutathione	67.5	100	-

Glutathione disulfide	0	100	$125 \pm 8.27 (45.2 - 268)$
Hexose 1-phosphate	42.5	100	-
Lactic acid	100	100	-
Malic acid	0	100	$22.7 \pm 1.03 \ (7.88 - 39.4)$
Oxaloacetic acid	0	97.5	$71.1 \pm 5.03 \ (6.60 - 153)$
D-ribulose-5-phosphate	0	100	-
Phosphoenolpyruvate	22.5	100	-
Pyruvic acid	95.0	100	-
Succinic acid	0	100	-
D-erythrose-4-phosphate	0	100	-

^a MLODs varied between samples from 0.61 to 4,600 ng/g ww.

Table C11. Mean (\pm SEM) metabolite concentrations ($\mu g/g$ ww) in SLE male beluga skin determined for each cluster that differed significantly ($p \le 0.05$) with greatest fold changes from the overall mean concentrations for all individuals. Variations of each cluster were either greater (+) or lower (-) compared to the overall mean.

	Metabolite class	Cluster mean ± SEM	Overall mean ± SEM	Cluster variation
UPSTREAM BELUGAS				
C14:0	Fatty acid	30.7 ± 2.42	21.6 ± 1.74	+
C16:1 <i>ω</i> 7	Fatty acid	190 ± 13.2	123 ± 11.9	+
C18:1 <i>ω</i> 9	Fatty acid	610 ± 33.1	417 ± 34.2	+
C20:4ω3	Fatty acid	44.9 ± 4.12	33.9 ± 2.75	+
C20:5 <i>ω</i> 3	Fatty acid	201 ± 11.1	156 ± 9.31	+
C22:5\u03c1	Fatty acid	16.8 ± 0.82	12.9 ± 0.69	+
C22:5\u03c2	Fatty acid	118 ± 8.80	84.6 ± 6.47	+
C22:5ω6	Fatty acid	9.60 ± 0.43	8.19 ± 0.34	+
C22:6 <i>ω</i> 3	Fatty acid	81.8 ± 5.33	58.5 ± 4.24	+
Glutamic acid	Amino acid	236 ± 7.91	208 ± 6.04	+
Oxaloacetic acid	Energy metabolite	94.1 ± 7.69	72.7 ± 4.87	+
Serine	Amino acid	88.6 ± 1.66	78.9 ± 1.94	+
INTERMEDIARY BELUGAS				
Alanine	Amino acid	403 ± 28.2	533 ± 13.2	-
Citrulline	Amino acid	126 ± 13.3	163 ± 5.67	-
Fumaric acid	Energy metabolite	8.72 ± 1.23	14.4 ± 0.74	-
Glutamine	Amino acid	208 ± 18.6	330 ± 14.6	-
Histidine	Amino acid	68.5 ± 8.49	107 ± 3.88	-
Lysine	Amino acid	25.2 ± 2.50	32.1 ± 0.92	-
Malic acid	Energy metabolite	16.3 ± 2.93	22.7 ± 1.03	-
Phenylalanine	Amino acid	124 ± 10.8	159 ± 4.19	-
Sarcosine	Biogenic amine	43.6 ± 4.37	56.5 ± 1.88	-
Serine	Amino acid	63.3 ± 5.96	78.9 ± 1.94	-
Tryptophan	Amino acid	16.9 ± 1.92	23.4 ± 0.89	-
Valine	Amino acid	359 ± 23.4	447 ± 11.9	-

UPSTREAM BELUGAS

Acetylornithine	Biogenic amine	2.44 ± 0.21	1.83 ± 0.13	+
C14:0	Fatty acid	13.5 ± 1.06	21.6 ± 1.74	-
C16:1 <i>w</i> 7	Fatty acid	55.4 ± 4.43	123 ± 11.95	-
C18:1 <i>ω</i> 9	Fatty acid	219 ± 14.8	418 ± 34.2	-
C20:4 <i>w</i> 6	Fatty acid	23.2 ± 2.52	33.9 ± 2.75	-
C20:5 <i>w</i> 3	Fatty acid	115 ± 9.37	156 ± 9.31	-
C22:5 <i>w</i> 3c1	Fatty acid	9.22 ± 0.29	12.9 ± 0.69	-
C22:5 <i>w</i> 3c2	Fatty acid	53.6 ± 4.09	84.6 ± 6.47	-
C22:5 <i>w</i> 6	Fatty acid	$\boldsymbol{6.75\pm0.31}$	8.19 ± 0.34	-
C22:6 <i>w</i> 3	Fatty acid	37.1 ± 1.92	58.5 ± 4.24	-
Glutamic acid	Amino acid	189 ± 6.57	208 ± 6.04	-
α -ketoglutaric acid	Energy metabolite	3.35 ± 0.27	4.27 ± 0.25	-

Table C12. Spearman coefficient (r_s), raw p-values and corresponding adjusted p-values (q-values) for correlations between contaminant and metabolite concentrations in SLE male belugas (n = 40). Bold q-values denote significant (≤ 0.05) correlations after FDR adjustment.

	rs	<i>p</i> -value	<i>q</i> -value
Σ ₁₈ SCCCP			
Acetylornithine	0.51	< 0.001	0.030
Aconitic acid	0.37	0.023	0.134
C14:0	-0.31	0.050	0.230
C16:1 <i>ω</i> 7	-0.45	0.004	0.035
C18:1 <i>ω</i> 9	-0.42	0.007	0.060
C20:5 <i>ω</i> 3	-0.39	0.013	0.084
C22:5 <i>w</i> 3c1	-0.49	0.002	0.030
C22:5 <i>w</i> 3c2	-0.46	0.003	0.031
C22:6 <i>ω</i> 3	-0.47	0.002	0.030
Glutamic acid	-0.32	0.044	0.225
Σ_{34} HFR			
Glutamic acid	0.33	0.039	0.354
Glycine	0.43	0.005	0.101
ΣHexose	-0.39	0.014	0.159
Proline	0.42	0.007	0.101
Putrescine	0.46	0.003	0.101
Σ ₄₁ PCB/OC			
Proline	0.37	0.020	0.310
Putrescine	0.37	0.017	0.310
Sarcosine	-0.34	0.031	0.361
ω 3: ω 6 ratio	-0.46	0.003	0.124

APPENDICE A

L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT

1. Généralités

L'estuaire du Saint-Laurent peut être subdivisé en trois secteurs (Plan Saint-Laurent, 2012) :

- un *estuaire fluvial* : aussi appelé estuaire d'eau douce, il est majoritairement constitué d'eaux douces provenant des Grands Lacs et de nombreux tributaires.
- un *estuaire moyen* : aussi appelé estuaire d'eau saumâtre, il représente le lieu de rencontre des eaux douces du fleuve et des eaux salées du golfe.
- un *estuaire maritime* : il est caractérisé par une augmentation rapide de la profondeur et est composé de plusieurs masses d'eau aux propriétés physicochimiques différentes.

La colonne d'eau de l'estuaire maritime et du golfe du Saint-Laurent est particulière, car stratifiée (**Figure AP1**) presque toute l'année en trois couches distinctes (Dickie et Trites, 1983) :

une *couche superficielle* mince de 25 à 50 m de profondeur, à température variant avec la saison (0 à 14°C), de faible salinité (25 à 31 ‰) et s'écoulant vers le large,

- une *couche intermédiaire* froide (-1 à 2°C) et saline (32 à 33 ‰) issue des eaux du Golfe en hiver et s'étalant jusqu'à 150 m de profondeur et s'écoulant vers l'amont,
- une *couche profonde* (> 150 m) plus chaude (2 à 5°C) et plus salée (33 à 35 ‰) provenant d'un mélange d'eaux du courant du Labrador et de l'Atlantique Nord qui s'écoulent également vers l'amont.



Stratification et circulation des eaux du Saint-Laurent

Figure AP1 Stratification et circulation des eaux du Saint-Laurent (Source: GREMM, 2017).

Cette stratification est due à la présence du Chenal Laurentien (**Figure AP2**), une vallée sous-marine d'origine glaciaire longue de 1240 km et de 250 à 500 m de profondeur (Mucci *et al.*, 2017). Ce canal sous-marin s'achève au niveau de la ville de Tadoussac, où la présence de la tête du Chenal Laurentien provoque un changement drastique de profondeur, passant de -50 à -300 m en moins de 20 km. La configuration bathymétrique atypique de cette région, qui correspond au début de l'estuaire maritime,
induit une remontée vers la surface des eaux de fond. Cette remontée des eaux issues du courant du Labrador et de l'Atlantique créé un phénomène dit de « *upwelling* » car ces eaux sont riches en matière organique décomposée qui favorise la croissance de microalgues, augmentant ainsi la production biologique du milieu. Cette zone est donc particulièrement riche en organismes marins (p. ex., zooplanctons, crustacés, poissons,) et agit comme un véritable garde-manger pour de nombreuses espèces de baleines.



Figure AP2 Carte bathymétrique de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, illustrant le parcours du Chenal Laurentien (Source: Savenkoff *et al.*, 2017).

L'estuaire du Saint-Laurent est une région importante pour les cétacés compte tenu notamment de la diversité des espèces qui s'y retrouve. Une partie de la population de béluga y réside toute l'année (MPO, 2014), et au moins sept autres espèces de cétacés le visitent de façon saisonnière principalement pour s'y alimenter (**Figure AP3**). Le rorqual bleu (*Balaenoptera musculus*) et le béluga du Saint-Laurent ont un statut précaire au Canada, et sont considérés en voie de disparition en vertu de la Loi sur les espèces en péril (COSEPAC, 2002, 2014). Le gouvernement canadien a donc obligation de protéger leur habitat essentiel et d'établir une stratégie de rétablissement de ces populations.



Figure AP3 Principales espèces de cétacés fréquentant l'estuaire du Saint-Laurent : A) béluga (*Delphinapterus leucas*), B) rorqual bleu (*Balaenoptera musculus*), C) marsouin commun (*Phocoena phocoena*), D) petit rorqual (*Balaenoptera acutorostrata*), E) rorqual à bosse (*Megaptera novaeangliae*) et F) rorqual commun (*Balaenoptera physalus*) (Source: Savenkoff *et al.*, 2017).

2. Caractéristiques de l'habitat des bélugas du Saint-Laurent

En saison estivale, il existe une ségrégation spatiale au sein de la population des bélugas du Saint-Laurent qui est subdivisée en trois secteurs (c.-à-d., amont, intermédiaire et aval) en fonction de la composition des troupeaux de bélugas observés (Figure 0.2). Le secteur amont se caractérise par une profondeur allant de 20 à 50 m, des salinités variant de 10 à 25 ‰, une turbidité élevée (zone euphotique < 5 m) et la présence d'espèces en majorité marines et aussi d'eau douce (Therriault et al., 1990). Le secteur intermédiaire, qui s'étend d'une partie du Fjord du Saguenay jusqu'au tronçon sud de l'estuaire maritime, correspond à un canal de sortie d'un mix de masses d'eau composé des eaux du Saint-Laurent, du Saguenay et en provenance de l'estuaire maritime, avec des profondeurs similaires au secteur amont. Dû à une turbidité élevée des eaux et aux forts courants, la production primaire y est moins élevée que dans les autres régions de l'habitat des bélugas et la production de biomasse n'y est pas accumulée (Therriault et al., 1990). Enfin, le secteur aval d'une profondeur > 300 m, se distingue par une forte augmentation de la salinité (> 25 ‰), des concentrations en nutriments et un abaissement des températures moyennes et de la turbidité, causé en grande partie par la tête du Chenal Laurentien, qui provoque une remonté des eaux arctiques (Mosnier et al., 2010; Therriault et al., 1990). La production primaire dans ce secteur y étant particulièrement élevée, il y a une grande diversité et abondance des proies des mammifères marins (Simard, 2009). Bien que les secteurs amont, aval et intermédiaire aient des caractéristiques physicochimiques spécifiques, aucun de ces facteurs n'a permis d'expliquer la distribution particulière des bélugas du Saint-Laurent (Lesage et al., 2017). Cependant, des différences en terme de diversité de phytoplanctons et d'ichtyoplanctons (larves de poissons) ont été mises en évidence entre les secteur amont et aval (de Lafontaine, 1990; Therriault et al., 1990), et des agrégations importantes de krill ou de proies pélagiques comme le capelan ont été remarqués au niveau du Chenal Laurentien (Lavoie et al., 2000; Marchand et al., 1999). Ces

observations laissent présager que la composition de la diète des bélugas du Saint-Laurent pourrait varier selon l'aire majoritairement fréquentée.

APPENDICE B

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES PRINCIPAUX CONTAMINANTS ÉTUDIÉS

1. Polluants organiques persistants

BPC

Les biphényles polychlorés (BPC) forment un groupe de composés organiques chlorés



synthétiques qui sont exclusivement d'origine anthropique. Leur structure moléculaire consiste en une molécule de biphényle qui peut contenir jusqu'à dix atomes de chlore. Il existe au total 209 congénères de BPC, qui sont numérotés en fonction du nombre et de la position des atomes de chlore. Les mélanges commerciaux de BPC contiennent différentes proportions d'une sélection de congénères et sont connus sous différents noms commerciaux, tels que Aroclor, Chloretol, Dyknol, Inerteem, Kanechlor, Noflamol, Phenoclor et Pyranol (ATSDR, 2000). À cause de leur propriété isolante et ignifuge, les BPC ont été abondamment utilisés comme agents de refroidissement et lubrifiants dans les transformateurs, les condensateurs et autres équipements électriques, mais aussi comme retardateur de flamme (ATSDR, 2000). En 1977, les États-Unis ont mis un terme à leur fabrication, le Canada a restreint leur usage en raison de leur omniprésence dans l'environnement et des effets nocifs qu'ils peuvent avoir (Santé Canada, 2010).

Chlordanes

Le chlordane ($C_{10}H_6C_{18}$) est un pesticide organochloré synthétique qui a été introduit au Canada durant les années 1940 et a été utilisé jusque dans les années 1998 (Santé Canada, 2010). Il a été utilisé comme insecticide sur diverses cultures agricoles et dans diverses applications résidentielles,



notamment comme agent de fumigation sur les pelouses et les potagers, et pour le traitement souterrain des maisons contre les termites (ATSDR, 2018). Le mélange commercial de chlordane contient plus de 140 composés organochlorés de structure apparentée et les quatre composés majoritairement présents sont l' α -chlordane (CAS # 5103-71-9), le γ -chlordane (CAS # 5103-74-2), le *trans*-nonachlor (CAS # 39765-80-5) et le *cis*-nonachlor (CAS # 5103-73-1).

DDT

Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT; CAS # 50-29-3), est un insecticide organochloré de la catégorie des dichlorodiphényléthanes dont l'usage a été interdit durant les années 1970 et



1980 par de nombreux pays incluant le Canada, à cause de ses effets préoccupants sur l'environnement et la santé humaine (ATSDR, 2002). Le mélange de DDT utilisé comme insecticide pouvait contenir jusqu'à 14 composés, dont principalement trois isomères du DDT : le p,p'-DDT (65 à 80 %), l'o,p'-DDT (15 à 21 %) et des quantités traces de o,o'-DDT (Metcalf, 1995). En raison de son efficacité, de sa persistance et de son coût peu élevé, cet insecticide à large spectre a été utilisé pour lutter contre les vecteurs de maladies humaines transmises par les insectes, principalement les moustiques (paludisme), les moucherons et les poux (typhus), et son usage s'est ensuite étendu en agriculture où il servait à lutter contre les ravageurs agricoles (ATSDR, 2002).

Dans l'environnement, le DDT se décompose en formes chimiques plus stables telles que le p,p'-DDE (2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene; CAS # 72-55-9) et le p,p'-DDD (2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane; CAS # 72-54-8).

HCB

L'hexachlorobenzène (HCB; CAS # 118-74-1) est un produit chimique industriel totalement chloré qui a été utilisé dans Cl plusieurs produits, notamment des pesticides, des objets



pyrotechniques, des munitions, du caoutchouc synthétique, des produits de conservation du bois et des fluides diélectriques (ATSDR, 2015 ; Santé Canada, 2010). Au Canada, l'HCB a été principalement utilisé comme fongicide sur les semences de céréales depuis les années 1940, mais depuis la fin des années 1970, l'HCB n'est plus produit ni utilisé à des fins commerciales en Amérique du nord (ATSDR, 2015). De nos jours, les rejets d'HCB peuvent venir principalement de la fabrication et de l'utilisation de solvants et de pesticides chlorés qui contiennent du HCB sous forme d'impuretés, et d'émissions industrielles et d'incinération qui en libèrent durant les procédés de combustion incomplète (Santé Canada, 2010). Du fait de sa stabilité chimique et de sa résistance à la biodégradation, l'HCB est très persistant dans l'environnement.

PCCC

Les paraffines chlorées à chaîne courte (PCCC) sont des alcanes à structure



aliphatique, qui peuvent avoir des chaînes de 10 à 13 atomes de carbone et contenir de 40 à 50% de chlore (Tomy *et al.*, 2000). Les PCCC sont utilisés dans de nombreuses applications en raison de leur stabilité chimique, résistance aux flammes et aux basses températures, viscosité, faible pression de vapeur et faible coût de production, (Tomy

et al., 1998a). Initialement utilisés pendant la Première Guerre Mondiale pour la préparation d'antiseptiques, les PCCC ont ensuite été produits et utilisés par milliers de tonnes dans le monde entier depuis les années 1930 en tant qu'agent ignifuge (Bayen *et al.*, 2006 ; Tomy *et al.*, 2000). De nos jours, ils sont utilisés dans une grande gamme de produits de consommation et de procédés industriels comme réfrigérants, lubrifiants en métallurgie, agents plastifiants principalement pour la production de plastiques tels que les PVC, ou encore la fabrication de caoutchouc, de peinture et de produits d'étanchéité (Lassen *et al.*, 2014). Les PCCC ont été produits exclusivement produits aux États-Unis des années 1930 jusqu'aux années 1970, en quantités allant de 20 000 à 35 000 tonnes par an, puis la production a augmenté pour atteindre environ 300 000 tonnes par an aux États-Unis, au Japon et en Europe dans les années 1990, puis un million de tonnes en Chine en 2009 (Vorkamp *et al.*, 2019). En 2015, les PCCC étaient toujours fabriquées en Russie, en Inde, au Japon et au Brésil (UNEP, 2015).

PBDE

Les polybromodiphényléthers (PBDE) sont une famille de retardateurs de flamme



bromés à la structure très similaire aux BPC, car composés de deux cycles phényles. Selon le nombre et la position des atomes de bromes, ils peuvent être divisés en 10 groupes, (du *mono-* au *déca-*BDE), représentant au total 209 congénères. Plus le degré de bromination de ces composés organiques augmente et plus ils sont ignifuges, stables chimiquement et persistants, mais moins ils sont lipophiles (de Wit, 2002 ; Frederiksen *et al.*, 2009). Les PBDE sont produits industriellement sous forme de trois mélanges commerciaux, les Penta-, Octa- et Déca-BDE, qui sont nommées selon les congénères qui prédominent (**Tableau AP1.1**). Le Penta-BDE a été principalement utilisé pour les mousses de polyuréthane, les intérieurs de voiture ou d'avions, les produits pour bébé, puis l'Octa-BDE pour des résines thermoplastiques (p. ex., l'acrylonitrile-butadiènestyrène) ainsi que divers plastiques d'ordinateurs et d'électroménagers (Centre de Collaboration Nationale en Santé Environnementale, 2013). Le Deca-BDE, parmi le plus abondamment utilisé des trois mélanges, a été ajouté à des polymères de plastique (p. ex., polycarbonates, polychlorure de vinyle), pour le polystyrène puis pour des revêtements noirs dans l'industrie textile (Shaw *et al.*, 2010 ; Yogui et Sericano, 2009).

Mélanges commerciaux	Principaux congénères
Penta-BDE	<i>tetra</i> -BDE (BDE-47) <i>penta</i> -BDE (BDE-99, -100) <i>hexa</i> -BDE (BDE-153, -154)
Octa-BDE	hepta-BDE (BDE-183) octa-BDE (BDE-197) nona-BDE (BDE-207)
Déca-BDE	deca-BDE (BDE-209)
Numéros CAS des tetra- (# 40088-47-9), penta- (# 32534-81-9), hexa-	

Tableau AP1.1 Compositions majoritaires des trois principauxmélanges commerciaux de PBDE (d'après La Guardia et al., 2006)

Numéros CAS des tetra- (# 40088-47-9), penta- (# 32534-81-9), hexa-(# 36483-60-0), l'hepta- (# 68928-80-3), octa- (n° CAS : 32536-52-0), nona- (# 63936-56-1) et déca-BDE (# 1163-19-5).

Depuis les années 1960, l'utilisation massive des PBDE dans des produits de consommation courante (p. ex., ordinateurs, jouets en plastique, appareils électroménagers en plastiques, matelas, polystyrène, canapé, voiture, *etc.*) a entraîné un relargage important des congénères dans l'environnement, lors des processus de fabrication, de combustion, de recyclage des produits, des lessivages des sites d'enfouissement et des rejets urbains (McKenzie, 2009 ; Shaw *et al.*, 2010). De tous les congénères, le BDE-209 qui est le plus saturé en brome, va se retrouver en majorité dans les sédiments, le sol et la poussière, alors que les PBDE les moins bromés (p. ex., BDE-47, -99 et -100) étant plus bioaccumulables, seront davantage présent dans le biote (Brandsma *et al.*, 2015 ; Dosis *et al.*, 2011 ; Rahman *et al.*, 2001).

2. Contaminants d'intérêt émergents

BEHTBP

Le bis(2-ethylhexyl)-tetrabromophthalate (BEHTBP ou TBPH; CAS # 26040-51-7) est un additif utilisé dans la production de chlorure de polyvinyle (PVC), de néoprène, de tissus, d'adhésifs, d'enduits muraux et de



mousses polyuréthanes, en tant que substitut au Penta-BDE (Covaci *et al.*, 2011 ; de Jourdan, 2012). Il est utilisé depuis plus de 20 ans dans différents mélanges commerciaux comme le Firemaster®550, le DP-45 et le BZ-54 (de Jourdan, 2012 ; de Wit *et al.*, 2011 ; Ezechiáš *et al.*, 2014). Les volumes de production américains de 1990 à 2006 étaient de 400 à 4 500 tonnes par an (Covaci *et al.*, 2011).

DBDPE

Le décabromodiphényléthane (DBDPE; CAS # 84852-53-9) est un alternatif au Déca-BDE dont la structure moléculaire et les propriétés chimiques sont similaires (Covaci *et al.*, 2011 ; de Wit *et al.*, 2011). Tout comme ce dernier, il est utilisé en tant qu'additif dans une grande gamme de matériaux polymères, pour le polystyrène choc, les textiles, des résines ou le coton (Covaci *et al.*,



2011 ; de Jourdan, 2012). Le DBDPE a été mis sur le marché depuis la moitié des années 1980 et apparaît dans différents mélanges commerciaux comme le Saytex®8010, le Milebrome®8010 ou le Firemaster®2100 (Covaci *et al.*, 2011 ; Ezechiáš *et al.*, 2014). Il est préféré au Déca-BDE pour sa meilleure stabilité thermique,

l'empêchant de s'échapper du matériau à haute température lors sa fabrication, mais aussi de par sa structure qui le rend très peu susceptible de produire des dioxines et furannes sous conditions de pyrolyse (de Wit *et al.*, 2011). De plus, les restrictions et les législations surtout en Europe contre le Déca-BDE ont mis le DBDPE en première position pour tout ce qui est équipement électronique et électrique sur le marché européen (de Jourdan, 2012).

Déchloranes

Les déchloranes (Dec) représentent une famille de retardateurs de flamme organochlorés représentée tout d'abord par le chlordane $(C_{10}Cl_{12})$ qui dans les années 1960-1970 était



utilisé comme pesticide sous le nom de Mirex (de Jourdan, 2012). Ce dernier a été interdit à cause de sa persistance et de sa toxicité, et depuis sont apparus des substituts comme le déchlorane plus (DP ou Dec-605; $C_{18}H_{12}Cl_{12}$; CAS # 13560-89-9), le Dec-602 (C₁₄H₄Cl₁₂O; CAS # 31107-44-5), le Dec-603 (C₁₇H₈Cl₁₂; CAS # 13560-92-4) et le Dec-604 ($C_{13}H_4Br_4Cl_6$; CAS # 34571-16-9) qui sont maintenant utilisés depuis plus de 40 ans (Feo *et al.*, 2012). Le mélange commercial de DP contient les deux isomères, syn- et anti-, avec un ratio de 1 pour 3 (Feo et al., 2012). Le DP est utilisé pour l'isolation de fils et de câbles, les connecteurs d'ordinateur, les plastiques de toiture, le Dec-602 pour la fibre de verre renforcée et le Dec-604 dans une graisse de silicone (Feo *et al.*, 2012; Sverko *et al.*, 2011). Souvent inclus ou associé à cette famille de par sa structure proche, il y a le Chlordène plus (CPlus; $C_{15}H_6Cl_{12}$; CAS # 13560-91-3) qui a été détecté dans les mélanges commerciaux Chlordène et Chlordane, utilisés comme retardateurs de flamme halogéné dans divers plastiques (Shen et al., 2010, 2014). Dernièrement, il y a aussi l'hexachlorocyclopentadiene-tribromostyrene ou Dec-604 CB (2,4,5-Br₃Dec-604; CAS # 56890-89-2), qui serait un produit de photodégradation du Dec-604 et qui est présent également dans le mélange industriel Tech604-Mix A (Shen *et al.*, 2014 ; Wellington Laboratories, 2013). En revanche, aucune information n'est disponible sur la production et l'utilisation du CPlus et du Dec-604 CB.

HBB

L'hexabromobenzène (HBB; CAS # 87-82-1) est un retardateur de flamme bromé émergent utilisé avec les plastiques, les bois, les textiles, les papiers, les matériaux électriques et qui est principalement produit et utilisé en



Chine et au Japon pour environ 100 tonnes par an (Ezechiáš *et al.*, 2014 ; Vorkamp et Rigét, 2014). L'HBB qui a un grand facteur de bioaccumulation, peut se retrouver dans l'environnement soit par son utilisation en tant que retardateur de flamme, soit lors de la pyrolyse des Octa- et Déca-BDE (de Wit *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a).

PBEB

Le pentabromoéthyle benzène (PBEB; CAS # 85-22-3), est utilisé comme ignifugeant pour les résines polyester, les circuits imprimés, les textiles, les adhésifs, les peintures et les mousses en polyuréthane (Covaci *et al.*, 2011 ; Ezechiáš *et al.*, 2014). Le PBEB



a été principalement produit dans les années 1970 aux États-Unis puis dans les années 1980 sous le nom FR-105 (Ezechiáš *et al.*, 2014). Le PBEB est bioaccumulable et peut s'échapper du matériau auquel il a été ajouté par la simple chaleur d'une pièce, causant ainsi des problèmes de contaminations et de relargage environnemental (de Wit *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a).

RÉFÉRENCES

- Abbasi, G., Buser, A. M., Soehl, A., Murray, M. W. et Diamond, M. L. (2015). Stocks and flows of PBDEs in products from use to waste in the U.S. and Canada from 1970 to 2020. *Environmental Science & Technology*, 49 (3), 1521-1528. doi: 10.1021/es504007v
- Alaee, M., Luross, J., Sergeant, D. B., Muir, D. C. G., Whittle, D. M. et Solomon, K. R. (1999). Distribution of polybrominated diphenyl ethers in the canadian environment. *Organohalogen Compounds*, 40, 347-350.
- Alharbi, O. M. L., Basheer, A. A., Khattab, R. A. et Ali, I. (2018). Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 442-453. doi: 10.1016/j.molliq.2018.05.029
- Alm, H., Kultima, K., Scholz, B., Nilsson, A., Andren, P. E., Fex-Svenningsen, A., ... Stigson, M. (2008). Exposure to brominated flame retardant PBDE-99 affects cytoskeletal protein expression in the neonatal mouse cerebral cortex. *Neurotoxicology*, 29 (4), 628-637. doi: 10.1016/j.neuro.2008.04.021
- Alonso, M. B., Azevedo, A., Torres, J. P. M., Dorneles, P. R., Eljarrat, E., Barceló, D., ... Malm, O. (2014). Anthropogenic (PBDE) and naturally-produced (MeO-PBDE) brominated compounds in cetaceans A review. *Science of the Total Environment*, 481, 619-634. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.022
- Altenburger, R., Scholz, S., Schmitt-Jansen, M., Busch, W. et Escher, B. I. (2012). Mixture Toxicity Revisited from a Toxicogenomic Perspective. *Environmental Science & Technology*, 46 (5), 2508-2522. doi: 10.1021/es2038036
- Aluru, N., Jorgensen, E. H., Maule, A. G. et Vijayan, M. M. (2004). PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor downregulation in anadromous Arctic charr. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 287 (4), R787-R793. doi: 10.1152/ajpregu.00091.2004
- Arab, L. (2003). Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. *The Journal of Nutrition*, 133 (3), 925S-932S. doi: 10.1093/jn/133.3.925s

ATSDR. (2000). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs).

- ATSDR. (2002). Toxicological profile for DDT, DDE and DDD.
- ATSDR. (2015). Toxicological profile for hexachlorobenzene.
- ATSDR. (2017). Toxicological profile for polybrominated diphenyl ethers (PBDEs).
- ATSDR. (2018). Toxicological Profile for Chlordane.
- Bailleul, F., Lesage, V., Power, M., Doidge, D. W. et Hammill, M. O. (2012). Differences in diving and movement patterns of two groups of beluga whales in a changing Arctic environment reveal discrete populations. *Endangered Species Research*, 17 (1), 27-41. doi: 10.3354/esr00420
- Barón, E., Giménez, J., Verborgh, P., Gauffier, P., de Stephanis, R., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2015a). Bioaccumulation and biomagnification of classical flame retardants, related halogenated natural compounds and alternative flame retardants in three delphinids from Southern European waters. *Environmental Pollution*, 203, 107-115. doi: 10.1016/j.envpol.2015.03.041
- Barón, E., Hauler, C., Gallistl, C., Giménez, J., Gauffier, P., Castillo, J. J., ... Barceló, D. (2015b). Halogenated Natural Products in Dolphins: Brain–Blubber Distribution and Comparison with Halogenated Flame Retardants. *Environmental Science & Technology*, 49 (15), 9073-9083. doi: 10.1021/acs.est.5b02736
- Bartha, G. B., Gowans, S., Simard, P., Tetley, M. et Keith, E. O. (2011). Population Size and Site Fidelity of North Atlantic Minke Whales (Balaenoptera acutorostrata acutorostrata) off the Atlantic Coast of Nova Scotia, Canada. *Aquatic Mammals*, 37 (4), 454-463. doi: 1578/AM.37.4.2011.454
- Bayen, S., Obbard, J. P. et Thomas, G. O. (2006). Chlorinated paraffins: A review of analysis and environmental occurrence. *Environment International*, 32 (7), 915-929. doi: 10.1016/j.envint.2006.05.009
- Benskin, J. P., Ikonomou, M. G., Liu, J., Veldhoen, N., Dubetz, C., Helbing, C. C. et Cosgrove, J. R. (2014). Distinctive metabolite profiles in in-migrating Sockeye salmon suggest sex-linked endocrine perturbation. *Environmental Science & Technology*, 48 (19), 11670-11678. doi: 10.1021/es503266x
- Bergman, Å., Rydén, A., Law, R. J., de Boer, J., Covaci, A., Alaee, M., ... van der Veen, I. (2012). A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals.

Environment International, 49 (0), 57-82. doi: 10.1016/j.envint.2012.08.003

- Bernt, K. E., Hammill, M. O., Lebeuf, M. et Kovacs, K. M. (1999). Levels and patterns of PCBs and OC pesticides in harbour and grey seals from the St Lawrence Estuary, Canada. *Science of the Total Environment*, 243-244, 243-262. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00400-3
- Bérubé, M. et Palsbøll, P. (1996). Identification of sex in Cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, 5 (2), 283-287. doi: 10.1111/j.1365-294X.1996.tb00315.x
- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T. et Tollefsen, K. E. (2014). Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: A discussion paper. *Marine Environmental Research*, 96, 81-91. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.10.008
- Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J. et Larsen, P. R. (2002). Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases.pdf. *Endocrine Reviews*, 23 (1), 38-89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455
- Binnington, M. J. et Wania, F. (2014). Clarifying relationships between persistent organic pollutant concentrations and age in wildlife biomonitoring: individuals, cross-sections, and the roles of lifespan and sex. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (6), 1415-1426. doi: 10.1002/etc.2576
- Bjørnerem, Å., Straume, B., Midtby, M., Fønnebø, V., Sundsfjord, J., Svartberg, J., ... Berntsen, G. K. R. (2004). Endogenous sex hormones in relation to age, sex, lifestyle factors, and chronic diseases in a general population: The Tromsø study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89 (12), 6039-6047. doi: 10.1210/jc.2004-0735
- Bondy, G. S., Newsome, W. H., Armstrong, C. L., Suzuki, C. A. M., Doucet, J., Fernie, S., ... Barker, M. G. (2000). Trans-nonachlor and cis-nonachlor toxicity in sprague-dawley rats: Comparison with technical chlordane. *Toxicological Sciences*, 58 (2), 386-398. doi: 10.1093/toxsci/58.2.386
- Born, E. W., Outridge, P. M., Rigét, F. F., Hobson, K. A., Dietz, R., Øien, N. et Haug, T. (2003). Population substructure of North Atlantic minke whales (Balaenoptera acutorostrata) inferred from regional variation of elemental and stable isotopic signatures in tissues. *Journal of Marine Systems*, 43 (1–2), 1-17. doi: 10.1016/S0924-7963(03)00085-X

- Braathen, M., Derocher, A. E., Wiig, Ø., Sørmo, E. G., Lie, E., Skaare, J. U. et Jenssen,
 B. M. (2004). Relationships between PCBs and Thyroid Hormones and Retinol in
 Female and Male Polar Bears. *Environmental Health Perspectives*, *112* (8), 826-833. doi: 10.1289/ehp.6809
- Brandsma, S. H., Leonards, P. E. G., Leslie, H. A. et de Boer, J. (2015). Tracing organophosphorus and brominated flame retardants and plasticizers in an estuarine food web. *Science of the Total Environment*, 505 (0), 22-31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.072
- Brown, D. J., Van Overmeire, I., Goeyens, L., Denison, M. S., De Vito, M. J. et Clark,
 G. C. (2004). Analysis of Ah receptor pathway activation by brominated flame retardants. *Chemosphere*, 55 (11), 1509-1518. doi: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.019
- Brown, T. M., Ross, P. S., Reimer, K. J., Veldhoen, N., Dangerfield, N. J., Fisk, A. T. et Helbing, C. C. (2014). PCB related effects thresholds as derived through gene transcript profiles in locally contaminated ringed seals (Pusa hispida). *Environmental Science and Technology*, 48 (21), 12952-12961. doi: 10.1021/es5032294
- Buckman, A. H., Veldhoen, N., Ellis, G., Ford, J. K. B., Helbing, C. C. et Ross, P. S. (2011). PCB-associated changes in mRNA expression in killer whales (Orcinus orca) from the NE Pacific Ocean. *Environmental Science and Technology*, 45 (23), 10194-10202. doi: 10.1021/es201541j
- Budge, S. M., Iverson, S. J. et Koopman, H. N. (2006). Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: A primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science*, 22 (4), 759-801. doi: 10.1111/j.1748-7692.2006.00079.x
- Bundy, J. G., Davey, M. P. et Viant, M. R. (2009). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5 (1), 3. doi: 10.1007/s11306-008-0152-0
- Burgess, K., Rankin, N. et Weidt, S. (2014). Metabolomics. Dans *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* (p. 181-205). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-386882-4.00010-4
- Busch, D. S. et Hayward, L. S. (2009). Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation*, *142* (12), 2844-2853. doi: 10.1016/j.biocon.2009.08.013

- Buser, H. R. (1986). Polybrominated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins: thermal reaction products of polybrominated diphenyl ether flame retardants. *Environmental Science & Technology*, 20 (4), 404-408. doi: 10.1021/es00146a015
- Byrne, J. J., Carbone, J. P. et Hanson, E. A. (1987). Hypothyroidism and Abnormalities in the Kinetics of Thyroid Hormone Metabolism in Rats Treated Chronically with Polychlorinated Biphenyl and Polybrominated Biphenyl. *Endocrinology*, *121* (2), 520-527. Récupéré de 10.1210/endo-121-2-520
- Cadieux, M. A., Muir, D. C. G., Béland, P. et Hickie, B. E. (2015). Lactational Transfer of Polychlorinated-Biphenyls (PCBs) and Other Organochlorines in St. Lawrence Beluga Whales (Delphinapterus leucas). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70 (1), 169-179. doi: 10.1007/s00244-015-0223-y
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *39*, 18S-32S. doi: 10.1177/0148607115595980
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I. et Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Mol Ecol Resour*, 13 (4), 663-673. doi: 10.1111/1755-0998.12108
- Canada Gazette. (2008). *Polybrominated Diphenyl Ethers Regulations*, 1665-1682. Ottawa, Qc, Canada : Queen's Printer for Canada, 2008.
- Canada Gazette. (2013). Prohibition of certain toxic substances regulations, 2012. Dans *Canada Gazette Part II, Vol. 147, No. 1* (p. 19-67). (s. l. : n. é.).
- Canada Gazette. (2015). *Regulations Amending the Prohibition of Certain Toxic Substances Regulations, 2012*, 748-773. Ottawa, Qc, Canada : Queen's Printer for Canada, 2008. Récupéré de http://www.gazette.gc.ca/rp-pr/p1/2015/2015-04-04/html/reg2-fra.php
- Carrizo, D., Chevallier, O. P., Woodside, J. V., Brennan, S. F., Cantwell, M. M., Cuskelly, G. et Elliott, C. T. (2017). Untargeted metabolomic analysis of human serum samples associated with exposure levels of Persistent organic pollutants indicate important perturbations in Sphingolipids and Glycerophospholipids levels. *Chemosphere*, 168, 731-738. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.001
- Casà, M. V., van Mourik, L. M., Weijs, L., Mueller, J. et Nash, S. B. (2019). First detection of short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) in humpback whales

(Megaptera novaeangliae) foraging in Antarctic waters. *Environmental Pollution*, 250, 953-959. doi: 10.1016/j.envpol.2019.04.103

- Casals-Casas, C. et Desvergne, B. (2011). Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual Review of Physiology*, 73 (1), 135-162. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200
- CEC. (2003). Chlordane no longer used in North America. Montréal, Canada. Récupéré de www.cec.org
- Centre de Collaboration Nationale en Santé Environnementale. (2013). Les polybromodiphényléthers (PBDE) révisé. Récupéré de http://www.ccnse.ca/documents/practice-scenario/les-polybromodiphényléthers-pbde-révisé
- Chen, C., McGarvey, P. B., Huang, H. et Wu, C. H. (2010a). Protein Bioinformatics Infrastructure for the Integration and Analysis of Multiple High-Throughput "omics" Data. *Advances in Bioinformatics*, 2010, 423589. doi: 10.1155/2010/423589
- Chen, D., Letcher, R. J., Burgess, N. M., Champoux, L., Elliott, J. E., Hebert, C. E., ... Wilson, L. (2012). Flame retardants in eggs of four gull species (Laridae) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada. *Environmental Pollution*, 168, 1-9. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.040
- Chen, I. H., Wang, J. H., Chou, S. J., Wu, Y. H., Li, T. H., Leu, M. Y., ... Yang, W. C. (2016). Selection of reference genes for RT-qPCR studies in blood of beluga whales (Delphinapterus leucas). *PeerJ*, 4, e1810. doi: 10.7717/peerj.1810
- Chen, M.-Y., Luo, X.-J., Zhang, X.-L., He, M.-J., Chen, S.-J. et Mai, B.-X. (2011). Chlorinated Paraffins in Sediments from the Pearl River Delta, South China: Spatial and Temporal Distributions and Implication for Processes. *Environmental Science & Technology*, 45 (23), 9936-9943. doi: 10.1021/es202891a
- Chen, S.-J., Ma, Y.-J., Wang, J., Tian, M., Luo, X.-J., Chen, D. et Mai, B.-X. (2010b). Measurement and human exposure assessment of brominated flame retardants in household products from South China. *Journal of Hazardous Materials*, 176 (1– 3), 979-984. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.138
- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., ... Chen, Y. (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, 203 (1), 291-304. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.022

- Cheskis, B. J., Greger, J. G., Nagpal, S. et Freedman, L. P. (2007). Signaling by estrogens. *Journal of cellular physiology*, 213, 610–617.
- Christiansen, F., Sironi, M., Moore, M. J., Di Martino, M., Ricciardi, M., Warick, H. A., ... Uhart, M. M. (2019). Estimating body mass of free-living whales using aerial photogrammetry and 3D volumetrics. *Methods in Ecology and Evolution*, 10 (12), 2034-2044. doi: 10.1111/2041-210X.13298
- Ciesielski, T. M., Hansen, I. T., Bytingsvik, J., Hansen, M., Lie, E., Aars, J., ... Styrishave, B. (2017). Relationships between POPs, biometrics and circulating steroids in male polar bears (Ursus maritimus) from Svalbard. *Environmental Pollution*, 230, 598-608. doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.095
- Clark, B. J. et Cochrum, R. K. (2007). The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. *Drug Metabolism Reviews*, *39* (2-3), 353-370. doi: 10.1080/03602530701519151
- Cocco, P. (2002). On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cadernos de Saúde Pública*, *18*, 379-402.
- Comité de Concertation Suivi de l'état du Saint-Laurent. (2008). Portrait global de l'état du Saint-Laurent 2008. Plan Saint-Laurent. Environnement Canada, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec, Pêches et Océans Canada.
- Connolly, R. M., Guest, M. A., Melville, A. J. et Oakes, J. M. (2004). Sulfur stable isotopes separate producers in marine food-web analysis. *Oecologia*, *138* (2), 161-167. doi: 10.1007/s00442-003-1415-0
- Corsolini, S. (2009). Industrial contaminants in Antarctic biota. *Journal of Chromatography A*, *1216* (3), 598-612. doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.012
- COSEPAC. (2002). Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur le rorqual bleu (Balaenoptera musculus) au Canada – Mise à jour. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. Ottawa : (s. é.).
- COSEPAC. (2006). Rapport annuel du COSEPAC.
- COSEPAC. (2014). Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur le béluga (Delphinapterus leucas), population de l'estuaire du Saint-Laurent, au Canada. Comité sur la situation des espèces en péril au Canada. Ottawa.

- COSEWIC. (2014a). COSEWIC assessment and status report on the Beluga Whale Delphinapterus leucas, St. Lawrence Estuary population, in Canada. Ottawa.
- COSEWIC. (2014b). COSEWIC Wildlife Species Assessments (detailed version), November 2014. Récupéré de http://www.cosewic.gc.ca/rpts/Archives/2014_11/Detailed_species_assessments _e.html
- Costa, D. P. (1990). Chapter 11 Chemical Contaminants in the St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord. Dans M. I. El-Sabh et N. Silverberg (dir.), *Oceanography of a large-scale estuarine system: the St. Lawrence (Vol. 39)* (chap. 11, p. 239-294). New York, NY : Springer-Verlag.
- Costa, L. G., de Laat, R., Tagliaferri, S. et Pellacani, C. (2014). A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. *Toxicology Letters*, 230 (2), 282-294. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.11.011
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M. A. E., Ali, N., Law, R. J., Herzke, D. et de Wit, C. A. (2011). Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International*, 37, 532-556. doi: 10.1016/j.envint.2010.11.007
- Crimmins, B. S., Pagano, J. J., Xia, X., Hopke, P. K., Milligan, M. S. et Holsen, T. M. (2012). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): Turning the Corner in Great Lakes Trout 1980–2009. *Environmental Science & Technology*, 46 (18), 9890-9897. doi: 10.1021/es302415z
- Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Andersen, D. G., Baetcke, K. P., ... Patel, Y. M. (1998). Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives*, 106 (SUPPL. 1), 11-56. doi: 10.2307/3433911
- Daley, J. M., Paterson, G. et Drouillard, K. G. (2014). Bioamplification as a Bioaccumulation Mechanism for Persistent Organic Pollutants (POPs) in Wildlife. Dans *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (vol. 227, p. 107-155). doi: 10.1007/978-3-319-01327-5 4
- Dam, M., van Bavel, B., Rigét, F. F., Rotander, A., Polder, A., Auðunsson, G. A., ... Sagerup, K. (2011). "New" POPs in marine mammals in Nordic Arctic and NE Atlantic areas during three decades (chap. 119). Copenhagen, Denmark : Nordic Council of Ministers.

Darnerud, P. O. (2008). Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters.

International Journal of Andrology, 31 (2), 152-160. doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00869.x

- Davis, P. J., Leonard, J. L. et Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29 (2), 211-218. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.09.003
- de Jourdan, B. P. (2012). Environmental Fate and Toxicity of Three Brominated Flame Retardants in Aquatic Mesocosms. Environmental Biology and Toxicology. University of Guelph.
- de la Torre, A., Alonso, M. B., Martínez, M. A., Sanz, P., Shen, L., Reiner, E. J., ... Barceló, D. (2012). Dechlorane-related compounds in franciscana dolphin (Pontoporia blainvillei) from southeastern and southern coast of Brazil. *Environmental Science and Technology*, 46, 12364-12372. doi: 10.1021/es302934p
- de Lafontaine, Y. (1990). Chapter 14 Ichthyoplankton communities in the St. Lawrence Estuary: composition and dynamics. Dans M. I. El-Sabh et N. Silverberg (dir.), Oceanography of a large-scale estuarine system: the St. Lawrence (Vol. 39) (chap. 14, p. 321-343). New York, NY : Springer-Verlag.
- de Pisarev, D. L. K., Sancovich, H. A. et de Sancovich, A. M. F. (1989). Enhanced thyroxine metabolism in hexachlorobenzene-intoxicated rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, *12* (11), 767-772. doi: 10.1007/BF03350056
- de Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, *46* (5), 583-624. doi: 10.1016/S0045-6535(01)00225-9
- de Wit, C. A., Herzke, D. et Vorkamp, K. (2010). Brominated flame retardants in the Arctic environment trends and new candidates. *Science of the Total Environment*, 408 (15), 2885-2918. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.08.037
- de Wit, C. A., Kierkegaard, A., Ricklund, N. et Sellström, U. (2011). Emerging Brominated Flame Retardants in the environment. Dans E. Eljarrat et D. Barceló (dir.), *Brominated Flame Retardants* (vol. 16, p. 241-286). London New York : Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/698 2010 73
- Dehn, L. A., Follmann, E. H., Rosa, C., Duffy, L. K., Thomas, D. L., Bratton, G. R., ... O'Hara, T. M. (2006). Stable isotope and trace element status of subsistencehunted bowhead and beluga whales in Alaska and gray whales in Chukotka. *Marine Pollution Bulletin*, 52 (3), 301-319. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.09.001

- Desforges, J.-P. W., Ross, P. S., Dangerfield, N., Palace, V. P., Whiticar, M. et Loseto, L. L. (2013). Vitamin A and E profiles as biomarkers of PCB exposure in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the western Canadian Arctic. *Aquatic Toxicology*, 142–143 (0), 317-328. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.004
- Desforges, J.-P. W., Ross, P. S. et Loseto, L. L. (2012). Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in arctic beluga whales (Delphinapterus leucas). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (2), 296-300. doi: 10.1002/etc.750
- Desforges, J.-P. W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S. et Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86, 126-139. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.007
- DFO. (2005). Recovery Assessment Report on Cumber- land Sound, Ungava Bay, Eastern Hudson Bay, and St Lawrence Beluga Populations (Delphinapterus leucas). Ottawa, Canada.
- DFO. (2012). Recovery Strategy for the Beluga Whale (Delphinapterus leucas), St. Lawrence Estuary Population in Canada. Species at Risk Act Recovery Strategy Series. Ottawa : Fisheries and Oceans Canada.
- DFO. (2014). Status of beluga (Delphinapterus leucas) in the St. Lawrence river estuary. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/076.
- DFO. (2017). Critical Habitat of the Beluga Whale (Delphinapterus leucas) St. Lawrence Estuary Population Order (SOR/2017-263). Ottawa. Récupéré de https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/species-riskpublic-registry/critical-habitat-orders/beluga-whale-st-lawrence-estuaryorder.html
- Dhakal, K., Gadupudi, G. S., Lehmler, H. J., Ludewig, G., Duffel, M. W. et Robertson, L. W. (2018). Sources and toxicities of phenolic polychlorinated biphenyls (OH-PCBs). *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (17), 16277-16290. doi: 10.1007/s11356-017-9694-x
- Dickens, M. J. et Romero, L. M. (2013). A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *General and Comparative Endocrinology*, *191*, 177-189. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.06.014

- Dickie, L. et Trites, R. W. (1983). The Gulf of St. Lawrence. Dans L. Dickie et R. W. Trites (dir.), *Estuaries and semi-enclosed seas* (p. 403-425). Amsterdam : Elsevier Scientific Publication.
- Dietz, R., Letcher, R. J., Desforges, J. P., Eulaers, I., Sonne, C., Wilson, S., ... Víkingsson, G. (2019). Current state of knowledge on biological effects from contaminants on arctic wildlife and fish. *Science of the Total Environment*, 696, 133792. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133792
- Dosis, I., Kamarianos, A., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I. et Karamanlis, X. (2011). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine sediment of Thermaikos Gulf, Greece. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 91 (12), 1151-1165. doi: 10.1080/03067319.2010.496041
- Eguchi, A., Miyaso, H. et Mori, C. (2016). The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, *41* (5), 667-675. doi: 10.2131/jts.41.667
- Eguchi, A., Sakurai, K., Watanabe, M. et Mori, C. (2017). Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: A pilot birth cohort study in Chiba, Japan. *Environment International*, *102*, 157-164. doi: 10.1016/j.envint.2017.02.011
- EHSI. (2004). Dechlorane Plus (CAS No. 13560-89-9) high production volume (HPV)
 Chemical challenge program Test Plan. Arlington, VA : The environment health science institute (EHSI). Récupéré de http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/dechlorp/c15635tc.htm
- Elfes, C. T., Vanblaricom, G. R., Boyd, D., Calambokidis, J., Clapham, P. J., Pearce, R. W., ... Krahn, M. M. (2010). Geographic variation of persistent organic pollutant levels in humpback whale (Megaptera novaeangliae) feeding areas of the North Pacific and North Atlantic. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (4), 824-834. doi: 10.1002/etc.110
- European Chemicals Agency. (2014). *Proposal for a Restriction Substance Name: Bis(pentabromophenyl) ether.* Annex XV Restriction Report. European Chemicals Agency.
- Evans, P. G. H. (2009). H Habitat Pressures. Dans W. F. Perrin, B. Würsig et J. G. M. Thewissen (dir.), *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)* (p. 521-524). London : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-373553-9.00122-X

- Ezechiáš, M., Covino, S. et Cajthaml, T. (2014). Ecotoxicity and biodegradability of new brominated flame retardants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110 (0), 153-167. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.08.030
- Fair, P. A., Adams, J., Mitchum, G., Hulsey, T. C., Reif, J. S., Houde, M., ... Bossart, G. D. (2010). Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from two southeastern US estuarine areas: Concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs, and PAHs. *Science of the Total Environment*, 408 (7), 1577-1597. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.021
- Feo, M. L., Barón, E., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2012). Dechlorane Plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (9), 2625-2637. doi: 10.1007/s00216-012-6161-x
- Feo, M. L., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2009). Occurrence, fate and analysis of polychlorinated n-alkanes in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (6), 778-791. doi: 10.1016/J.TRAC.2009.04.009
- Ferchiou, S. (2019). Nouvelle approche chimique basée sur la bioaccumulation des retardateurs de flamme pour identifier et évaluer la diète récente du béluga du Saint-Laurent (Delphinapterus leucas). Université du Québec à Rimouski.
- Flower, J. E., Allender, M. C., Giovanelli, R. P., Summers, S. D., Spoon, T. R., St. Leger, J., ... Tuttle, A. D. (2015). Circulating concentrations of thyroid hormone in beluga whales (Delphinapterus leucas): influence of age, sex, and season. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46 (3), 456-467. doi: 10.1638/2014-0127.1
- Folkow, L. P., Haug, T., Nilssen, K. T. et Nordøy, E. S. (2014). Estimated food consumption of minke whales Balaenoptera acutorostrata in Northeast Atlantic waters in 1992-1995. *NAMMCO Scientific Publications*, 2, 65-80.
- Fontaine, P.-H. (2005). Baleines et phoques: biologie et écologie, 432.
- Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M. et Knudsen, L. E. (2009). Human internal and external exposure to PBDEs – A review of levels and sources. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212 (2), 109-134. doi: 10.1016/j.ijheh.2008.04.005
- Fritsche, K. L. (2015). The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Advances in Nutrition*, 6 (3), 293S-301S. doi: 10.3945/an.114.006940.293S
- Fry, B. (2006). Stable Isotope Ecology. New York : Springer.

- Fry, B. et Chumchal, M. M. (2011). Sulfur stable isotope indicators of residency in estuarine fish. *Limnology and Oceanography*, *56* (5), 1563-1576. doi: 10.4319/lo.2011.56.5.1563
- Gabrielsen, K. M., Krokstad, J. S., Villanger, G. D., Blair, D. A. D., Obregon, M.-J., Sonne, C., ... Jenssen, B. M. (2015). Thyroid hormones and deiodinase activity in plasma and tissues in relation to high levels of organohalogen contaminants in East Greenland polar bears (Ursus maritimus). *Environmental Research*, 136 (Supplement C), 413-423. doi: 10.1016/j.envres.2014.09.019
- Gabrielsen, K. M., Villanger, G. D., Lie, E., Karimi, M., Lydersen, C., Kovacs, K. M. et Jenssen, B. M. (2011). Levels and patterns of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) and their associations with thyroid hormones in hooded seal (Cystophora cristata) mother-pup pairs. *Aquatic Toxicology*, 105 (3-4), 482-491. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.08.003
- Galligan, T. M., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Bolton, J. L., Quigley, B. M., Rosel, P. E., ... Boggs, A. S. P. (2019). Examining the relationships between blubber steroid hormones and persistent organic pollutants in common bottlenose dolphins. *Environmental Pollution*, 249, 982-991. doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.083
- Ganci, A. P., Vane, C. H., Abdallah, M. A. E., Moehring, T. et Harrad, S. (2019). Legacy PBDEs and NBFRs in sediments of the tidal River Thames using liquid chromatography coupled to a high resolution accurate mass Orbitrap mass spectrometer. *Science of the Total Environment*, 658, 1355-1366. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.268
- Gauthier, J. M., Metcalfe, C. D. et Sears, R. (1997). Chlorinated organic contaminants in blubber biopsies from northwestern Atlantic balaenopterid whales summering in the Gulf of St Lawrence. *Marine Environmental Research*, 44 (2), 201-223. doi: 10.1016/S0141-1136(97)00004-4
- Gauthier, L. T., Potter, D., Hebert, C. E. et Letcher, R. J. (2009). Temporal Trends and Spatial Distribution of Non-polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants in the Eggs of Colonial Populations of Great Lakes Herring Gulls. *Environmental Science & Technology*, 43 (2), 312-317. doi: 10.1021/es801687d
- Gavrilchuk, K., Lesage, V., Ramp, C., Sears, R., Bérubé, M., Bearhop, S. et Beauplet, G. (2014). Trophic niche partitioning among sympatric baleen whale species following the collapse of groundfish stocks in the Northwest Atlantic. *Marine Ecology Progress Series*, 497, 285-301. doi: 10.3354/meps10578

Ge, R.-S., Dong, Q., Niu, E., Sottas, C. M., Hardy, D. O., Catterall, J. F., ... Hardy, M.

P. (2005). 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 in Rat Leydig Cells: Its Role in Blunting Glucocorticoid Action at Physiological Levels of Substrate. *Endocrinology*, *146* (6), 2657-2664. doi: 10.1210/en.2005-0046

- Geng, N., Zhang, H., Zhang, B., Wu, P., Wang, F., Yu, Z. et Chen, J. (2015, 3 mars). Effects of Short-Chain Chlorinated Paraffins Exposure on the Viability and Metabolism of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society. doi: 10.1021/es505802x
- Gentes, M.-L., Letcher, R. J., Caron-Beaudoin, É. 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. doi: 10.1021/es302099f
- Geraci, J. R. et Lounsbury, V. J. (2005). *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*. Galveston : National Aquarium in Baltimore.
- Ghaffari, M. H., Sadri, H., Schuh, K., Dusel, G., Frieten, D., Koch, C., ... Sauerwein, H. (2019). Biogenic amines: Concentrations in serum and skeletal muscle from late pregnancy until early lactation in dairy cows with high versus normal body condition score. *Journal of Dairy Science*, 102 (7), 6571-6586. doi: 10.3168/jds.2018-16034
- Gilson, A., Syvanen, M., Levine, K. et Banks, J. (1998). Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *California Fish and Game*, 84 (4), 159-169.
- Godard-Codding, C. A. J. et Fossi, M. C. (2018). Field Sampling Techniques and Ecotoxicologic Biomarkers in Cetaceans. Dans M. C. Fossi et C. Panti (dir.), *Marine Mammal Ecotoxicology* (chap. 9, p. 237-259). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-812144-3.00009-7
- Gong, Y., Zhang, H., Geng, N., Ren, X., Giesy, J. P., Luo, Y., ... Chen, J. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) disrupt hepatic fatty acid metabolism in liver of male rat via interacting with peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 164-171. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.06.003
- Gong, Y., Zhang, H., Geng, N., Xing, L., Fan, J., Luo, Y., ... Chen, J. (2018). Short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) induced thyroid disruption by enhancement of hepatic thyroid hormone influx and degradation in male Sprague Dawley rats. *Science of the Total Environment*, 625, 657-666. doi:

10.1016/j.scitotenv.2017.12.251

- Goodman, S. R. et Zimmer, W. E. (2008). Chapter 3 Cytoskeleton. Dans S. R. Goodman (dir.), *Medical Cell Biology (Third Edition)* (p. 59-100). San Diego : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-370458-0.50008-6
- Gosselin, J.-F., Hammill, M. O. et Mosnier, A. (2014). Summer abundance indices of St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas) from a photographic survey in 2009 and 28 line transect surveys from 2001 to 2009. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2014/021.
- Gouvernement du Canada. (2012). *Sommaire sur les alcanes chlorés*. Récupéré de https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/substances-chimiques/fiches-renseignements/en-bref/sommaire-alcanes-chlores.html
- Gouvernement du Canada. (2013). *Liste des substances toxiques : DDT*. Récupéré de https://www.canada.ca/fr/environnement-changementclimatique/services/gestion-substances-toxiques/liste-loi-canadienne-protectionenvironnement/dichlorodiphenyltrichloroethane.html
- Gouvernement du Canada. (2017). *Liste des substances toxiques : hexachlorobenzène*. Récupéré de https://www.canada.ca/fr/environnement-changementclimatique/services/gestion-substances-toxiques/liste-loi-canadienne-protectionenvironnement/hexachlorobenzene.html
- Gouvernement du Canada. (2019a). Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) et documents connexes. Récupéré de https://www.canada.ca/fr/environnement-changementclimatique/services/registre-environnemental-loi-canadienneprotection/documents-connexes.html
- Gouvernement du Canada. (2019b). *Règlement sur les BPC (DORS/2008-273)*. Récupéré de https://laws-lois.justice.gc.ca/fra/reglements/DORS-2008-273/index.html
- Gouvernement du Québec. (2019). *Le Saint-Laurent*. Dans (Gouvernement du Québec, dir.). Récupéré de http://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/flrivlac/fleuve.htm
- Grant, M. (2015). Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (Vol. 3). Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals (6th Editio). St. Louis, Missouri. doi: 10.1016/B978-0-7020-2823-6.X5001-5

Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. et Gerstein, M. (2003). Comparing protein

abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4 (9), 117. doi: 10.1186/gb-2003-4-9-117

- GREMM. (2017). Où commence le golfe et où finit l'estuaire? Et pourquoi une espèce serait-elle plus adaptée au golfe qu'à l'estuaire? Récupéré de https://baleinesendirect.org/ou-commence-le-golfe-et-ou-finit-lestuaire-et-pourquoi-une-espece-serait-elle-plus-adaptee-au-golfe-qua-lestuaire/
- Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent. (2014). Portrait global de l'état du Saint-Laurent 2014. Plan Saint-Laurent. Environnement Canada, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs d. Plan Saint-Laurent.
- Gustavson, L., Ciesielski, T. M., Bytingsvik, J., Styrishave, B., Hansen, M., Lie, E., ... Jenssen, B. M. (2015). Hydroxylated polychlorinated biphenyls decrease circulating steroids in female polar bears (Ursus maritimus). *Environmental Research*, 138, 191-201. doi: 10.1016/j.envres.2015.02.011
- Häggström, M. et Richfield, D. (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal of Medicine*, *1* (1), 2-6. doi: 10.15347/wjm/2014.005
- Hale, R. C., Alaee, M., Manchester-Neesvig, J. B., Stapleton, H. M. et Ikonomou, M. G. (2003). Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. *Environment International*, 29 (6), 771-779. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00113-2
- Hall, A. J., McConnell, B. J., Rowles, T. K., Aguilar, A., Borrell, A., Schwacke, L., ...
 Wells, R. S. (2006). Individual-based model framework to assess population consequences of polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins. *Environmental Health Perspectives*, 114 (SUPPL.1), 60-64. doi: 10.1289/ehp.8053
- Hammill, M. O., Measures, L., Gosselin, J.-F. et Lesage, V. (2007). *Lack of Recovery in St. Lawrence Estuary beluga*. Secrétariat canadien de consultation scientifique
 Document de recherche 2007/026 nº 2007/026.
- Hampl, R., Kubátová, J. et Stárka, L. (2016). Steroids and endocrine disruptors— History, recent state of art and open questions. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 217-223. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.013

- Hargreaves, A. J., Sachana, M. et Flaskos, J. (2014). Chapter 50 Cytoskeletal disruption as a biomarker of developmental neurotoxicity. Dans R. C. Gupta (dir.), *Biomarkers in Toxicology* (p. 833-845). Boston : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00050-6
- Harju, M., Heimstad, E. S., Herzke, D., Sandanger, T., Posner, S. et Wania, F. (2008).
 Current State of Knowledge and Monitoring requirements, Emerging "new" Brominated flame retardants in flame retarded products and the environment.
 Oslo : SFT Statens forurensningstilsyn, Norwegian pollution control authority.
- Harvey, P. W., Everett, D. J. et Springall, C. J. (2007). Adrenal toxicology: a strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis. *Journal of Applied Toxicology*, 27 (2), 103-115. doi: 10.1002/jat.1221
- He, Y., Murphy, M. B., Yu, R. M. K., Lam, M. H. W., Hecker, M., Giesy, J. P., ... Lam, P. K. S. (2008). Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. *Toxicology Letters*, 176 (3), 230-238. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.12.001
- Hebert, C. E. et Weseloh, D. V. C. (2006). Adusting for Temporal Change in Trophic Position Results in Reduced Rates of Contaminant Decline. *Environmental Science & Technology*, 40 (18), 5624-5628. doi: 0.1021/es0520621
- Hickie, B. E., Kingsley, M. C. S., Hodson, P. V., Muir, D. C. G., Béland, P. et Mackay,
 D. (2000). A modelling-based perspective on the past, present, and future polychlorinated biphenyl contamination of the St. Lawrence beluga whale (Delphinapterus leucas) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57 (S1), 101-112. doi: 10.1139/f99-242
- Hoguet, J., Keller, J. M., Reiner, J. L., Kucklick, J. R., Bryan, C. E., Moors, A. J., ... Becker, P. R. (2013). Spatial and temporal trends of persistent organic pollutants and mercury in beluga whales (Delphinapterus leucas) from Alaska. *Science of the Total Environment*, 449, 285-294. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.072
- Hoh, E., Zhu et Hites, R. A. (2005). Novel Flame Retardants, 1,2-Bis(2,4,6tribromophenoxy)ethane and 2,3,4,5,6-Pentabromoethylbenzene, in United States' Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, 39 (8), 2472-2477. doi: 10.1021/es048508f
- Hoh, E., Zhu et Hites, R. A. (2006). Dechlorane Plus, a Chlorinated Flame Retardant, in the Great Lakes. *Environmental Science & Technology*, 40 (4), 1184-1189. doi: 10.1021/es051911h

- Horwood, J. (1990). *Biology and Exploitation of the Minke Whale* (vol. Boca Raton). (s. l.) : CRC Press.
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y. et Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. Science of the Total Environment, 479-480, 48-56. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.105
- Houde, M., Muir, D. C. G., Tomy, G. T., Whittle, D. M., Teixeira, C. et Moore, S. (2008). Bioaccumulation and Trophic Magnification of Short- and Medium-Chain Chlorinated Paraffins in Food Webs from Lake Ontario and Lake Michigan. *Environmental Science & Technology*, 42 (10), 3893-3899. doi: 10.1021/es703184s
- Houde, M., Wang, X., Ferguson, S. H., Gagnon, P., Brown, T. M., Tanabe, S., ... Muir, D. C. G. (2017). Spatial and temporal trends of alternative flame retardants and polybrominated diphenyl ethers in ringed seals (Phoca hispida) across the Canadian Arctic. *Environmental Pollution*, 223, 266-276. doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.023
- Hu, G. X., Lian, Q. Q., Lin, H., Latif, S. A., Morris, D. J., Hardy, M. P. et Ge, R.-S. (2008). Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids*, 73 (9-10), 1018-1024. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.020
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J. et Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition and Metabolism*, 7 (Table 1), 7-9. doi: 10.1186/1743-7075-7-47
- Huang, Y., Chen, L., Jiang, G., He, Q., Ren, L., Gao, B. et Cai, L. (2019). Bioaccumulation and biomagnification of short-chain chlorinated paraffins in marine organisms from the Pearl River Estuary, South China. *Science of the Total Environment*, 671, 262-269. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.346
- Ibhazehiebo, K. et Koibuchi, N. (2014). Impact of endocrine-disrupting chemicals on thyroid function and brain development. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 9 (6), 579-591. doi: 10.1586/17446651.2014.950227
- Ismail, N., Gewurtz, S. B., Pleskach, K., Whittle, D. M., Helm, P. A., Marvin, C. H. et Tomy, G. T. (2009). Brominated and chlorinated flame retardants in Lake Ontario, Canada, lake trout (Salvelinus namaycush) between 1979 and 2004 and possible influences of food-web changes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (5), 910-920. doi: 10.1897/08-162.1

ISQ. (2013). Le Québec chiffres en main. Gouvernement du Québec.

- Iverson, S. J., Field, C., Don Bowen, W. et Blanchard, W. (2004). Quantitative fatty acid signature analysis: A new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs*, 74 (2), 211-235. doi: 10.1890/02-4105
- Iverson, S. J. et Koopman, H. N. (2018). Blubber. Dans B. Würsig, J. G. M. Thewissen et K. M. Kovacs (dir.), *Encyclopedia of Marine Mammals (Third Edition)* (p. 107-110). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-804327-1.00069-8
- Jayasankar, P., Anoop, B. et Rajagopalan, M. (2008). PCR-based sex determination of cetaceans and dugong from the Indian seas. *Current Science*, 94 (11), 1513-1516.
- Jenkins, G. et Tortora, G. J. (2013). *Anatomy and Physiology, From Science to Life* (Third edit). Hoboken, NJ, USA : John Wiley and Sons.
- Jensen, B. A. et Hahn, M. E. (2001). cDNA Cloning and Characterization of a High Affinity Aryl Hydrocarbon Receptor in a Cetacean, the Beluga, Delphinapterus leucas. *Toxicological Sciences*, *64* (1), 41-56. doi: 10.1093/toxsci/64.1.41
- Jepson, P. D., Deaville, R., Barber, J. L., Aguilar, À., Borrell, A., Murphy, S., ... Law, R. J. (2016). PCB pollution continues to impact populations of orcas and other dolphins in European waters. *Scientific Reports*, 6 (July 2015), 1-17. doi: 10.1038/srep18573
- Johnstone, C., Hendry, C., Farley, A. et Mclafferty, E. (2014). Endocrine system: part 1. *Nursing Standard*, *28* (38), 42-49. doi: 10.7748/ns.28.38.42.e7471
- Käkelä, R. et Hyvärinen, H. (1998). Composition of polyunsaturated fatty acids in the liver of freshwater and marine ringed seals (Phoca hispida ssp.) differs largely due to the diet of the seals. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, 120 (2), 231-237. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10012-3
- Katsu, Y. et Iguchi, T. (2016). Subchapter 95D Cortisol. Dans Y. Takei, H. Ando et K. B. T.-H. of H. Tsutsui (dir.), (p. 532-533). San Diego : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-801028-0.00231-2
- Kefeni, K. K., Okonkwo, J. O., Olukunle, O. I. et Botha, B. M. (2011). Brominated flame retardants: sources, distribution, exposure pathways, and toxicity. *Environmental Reviews*, *19*, 238-253. doi: 10.1139/a11-010

Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A. et Wilson, E.

M. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, *375* (6532), 581-585. doi: 10.1038/375581a0

- Kelly, B. C., Ikonomou, M. G., Blair, J. D. et Gobas, F. A. P. C. (2008). Bioaccumulation behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Canadian Arctic marine food web. *Science of the Total Environment*, 401 (1–3), 60-72. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.03.045
- Khetan, S. K. (2014). Mechanisms of Endocrine System Function. Dans *Endocrine Disruptors in the Environment* (p. 29-50). Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781118891094.ch2
- Kim, M., Guerra, P., Theocharides, M., Barclay, K., Smyth, S. A. et Alaee, M. (2013). Parameters affecting the occurrence and removal of polybrominated diphenyl ethers in twenty Canadian wastewater treatment plants. *Water Research*, 47 (7), 2213-2221. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.031
- Kitamura, S., Jinno, N., Suzuki, T., Sugihara, K., Ohta, S., Kuroki, H. et Fujimoto, N. (2005). Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, 208 (3), 377-387. doi: 10.1016/j.tox.2004.11.037
- Köhrle, J. (2002). Iodothyronine deiodinases. *Methods in Enzymology*, 347, 125-167. doi: 10.1016/S0076-6879(02)47014-0
- Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshida, T. et Kitamura, S. (2009). Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 117 (8), 1210-1218. doi: 10.1289/ehp.0900753
- Krahn, M. M., Hanson, M. B., Baird, R. W., Boyer, R. H., Burrows, D. G., Emmons, C. K., ... Collier, T. K. (2007). Persistent organic pollutants and stable isotopes in biopsy samples (2004/2006) from Southern Resident killer whales. *Marine Pollution Bulletin*, 54 (12), 1903-1911. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.08.015
- Krahn, M. M., Hanson, M. B., Schorr, G. S., Emmons, C. K., Burrows, D. G., Bolton, J. L., ... Ylitalo, G. M. (2009). Effects of age, sex and reproductive status on persistent organic pollutant concentrations in « Southern Resident » killer whales. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1522-1529. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.05.014
- Krozowski, Z., Li, K. X. Z., Koyama, K., Smith, R. E., Obeyesekere, V. R., Stein-Oakley, A., ... Sheppard, K. E. (1999). The type I and type II 11β-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*,

69 (1-6), 391-401. doi: 10.1016/s0960-0760(99)00074-6

- Kumar, A., Banerjee, A., Singh, D., Thakur, G., Kasarpalkar, N., Gavali, S., ... Sachdeva, G. (2018). Estradiol : A Steroid with Multiple Facets I Estrogens in Normal Physiology Estrogen synthesis. *Hormones Metabolism Research*, 50 (5), 359-374.
- La Guardia, M. J., Hale, R. C. et 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. doi: 10.1021/es060630m
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., ... Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrinedisrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16 (1), 45-57. doi: 10.1038/s41574-019-0273-8
- La Merrill, M., Emond, C., Kim, M. J., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Clément, K., ... Barouki, R. (2013). Toxicological function of adipose tissue: Focus on persistent organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, *121* (2), 162-169. doi: 10.1289/ehp.1205485
- Lacroix-Lepage, C. (2018). Analyse spatiale des assemblages de mammifères marins de l'estuaire du Saint-Laurent. Université du Québec à Rimouski.
- Lair, S. (2018). Évolution des causes de mortalités des bélugas du Saint-Laurent au cours des 35 dernières années. *Colloque du parc marin du Saguenay–Saint-Laurent*.
- Lair, S., Béland, P., De Guise, S. et Martineau, D. (1997). Adrenal hyperplastic and degenerative changes in beluga whales. *Journal of Wildlife Diseases*, *33* (3), 430-437. doi: 10.7589/0090-3558-33.3.430
- Lair, S., Martineau, D. et Measures, L. (2014). *Causes of mortality in St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas) from 1983 to 2012.* DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/119.
- Lair, S., Measures, L. et Martineau, D. (2016). Pathologic Findings and Trends in Mortality in the Beluga (Delphinapterus leucas) Population of the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, From 1983 to 2012. *Veterinary Pathology*, 53 (1), 22-36. doi: 10.1177/0300985815604726

Larsen, K. (2015). GAM: The Predictive Modeling Silver Bullet. Récupéré de

http://multithreaded.stitchfix.com/blog/2015/07/30/gam/

- Lassen, C., Sørensen, G., Crookes, M., Christensen, F., Jeppesen, C. N., Warming, M., ... Nielsen, J. M. (2014). Survey of short- chain and medium- chain chlorinated paraffins. Copenhagen, Denmark: The Danish Environmental Protection Agency.
- Lavoie, D., Simard, Y. et Saucier, F. J. (2000). Aggregation and dispersion of krill at channel heads and shelf edges: the dynamics in the Saguenay St. Lawrence Marine Park. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *57*, 1853-1869.
- Law, R. J. (2014). An overview of time trends in organic contaminant concentrations in marine mammals: Going up or down? *Marine Pollution Bulletin*, 82 (1-2), 7-10. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.03.024
- Law, R. J., Allchin, C. R. et Mead, L. K. (2005). Brominated diphenyl ethers in the blubber of twelve species of marine mammals stranded in the UK. *Marine Pollution Bulletin*, 50 (3), 356-359. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.01.014
- Law, R. J., Covaci, A., Harrad, S., Herzke, D., Abdallah, M. A. E., Fernie, K., ... Takigami, H. (2014). Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: status at the end of 2012. *Environment International*, 65, 147-158. doi: 10.1016/j.envint.2014.01.006
- Law, R. J., Losada, S., Barber, J. L., Bersuder, P., Deaville, R., Brownlow, A., ... Jepson, P. D. (2013). Alternative flame retardants, Dechlorane Plus and BDEs in the blubber of harbour porpoises (Phocoena phocoena) stranded or bycaught in the UK during 2008. *Environment International*, 60, 81-88. doi: 10.1016/j.envint.2013.08.009
- Lê, S., Josse, J. et Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25 (1), 1-18.
- Lebeuf, M., Measures, L., Noël, M., Raach, M. et Trottier, S. (2014a). A twenty-one year temporal trend of persistent organic pollutants in St. Lawrence Estuary beluga, Canada. *Science of the Total Environment*, 485, 377-386. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.097
- Lebeuf, M., Noël, M., Trottier, S. et Measures, L. (2007). Temporal trends (1987–2002) of persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary, Canada. *Science of the Total Environment*, *383* (1–3), 216-231. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.04.026

- Lebeuf, M. et Nunes, T. (2005). PCBs and OCPs in sediment cores from the lower St. Lawrence Estuary, Canada: Evidence of fluvial inputs and time lag in delivery to coring sites. *Environmental Science and Technology*, *39* (6), 1470-1478. doi: 10.1021/es049051c
- Lebeuf, M., Raach, M., Measures, L., Ménard, N. et Hammill, M. O. (2014b). Temporal trends of PBDEs in adult and newborn beluga (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/120.
- Lelli, S. M., Ceballos, N. R., Mazzetti, M. B., Aldonatti, C. A. et San Martín de Viale, L. C. (2007). Hexachlorobenzene as hormonal disruptor-studies about glucocorticoids: Their hepatic receptors, adrenal synthesis and plasma levels in relation to impaired gluconeogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 73 (6), 873-879. doi: 10.1016/j.bcp.2006.11.012
- Lesage, V. (2014). Trends in the trophic ecology of St. Lawrence beluga (Delphinapterus leucas) over the period 1988-2012, based on stable isotope analysis. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/126.
- Lesage, V., Gosselin, J.-F., Hammill, M. O., Kingsley, M. C. S. et Lawson, J. W. (2007). Ecologically and Biologically Significant Areas (EBSAs) in the Estuary and Gulf of St. Lawrence – A marine mammal perspective. CSAS Doc. Res. 2007/046 nº 2007/046. Canadian Science Advisory Secretariat. Récupéré de http://www.dfompo.gc.ca/csas
- Lesage, V., Gosselin, J.-F., Mosnier, A., Larocque, R. et Lebeuf, M. (2017). Définition et caractérisation de l'habitat du béluga du Saint-Laurent par une approche écosystémique. Dans Savenkoff, C., Gagné, J.A., Gilbert, M. et al. Le concept d'approche écosystémique appliqué à l'estuaire du Saint-Laurent (Canada). Environ. Rev. 25 (p. 74-86). (s. 1. : n. é.).
- Lesage, V., Hammill, M. O. et Kovacs, K. M. (2001). Marine mammals and the community structure of the Estuary and Gulf of St Lawrence, Canada: evidence from stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 210, 203-221. doi: 10.3354/meps210203
- Lesage, V., McQuinn, I. H., Carrier, D., Gosselin, J.-F. et Mosnier, A. (2014a). Exposure of the beluga (Delphinapterus leucas) to marine traffic under various scenarios of transit route diversion in the St. Lawrence Estuary. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/125.

- Lesage, V., Measures, L., Mosnier, A., Lair, S., Michaud, R. et Béland, P. (2014b). Mortality patterns in St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas), inferred from the carcass recovery data, 1983-2012. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/118.
- Lesage, V., Morin, Y., Rioux, E., Pomerleau, C., Ferguson, S. H. et Pelletier, E. (2010). Stable isotopes and trace elements as indicators of diet and habitat use in cetaceans: predicting errors related to preservation, lipid extraction, and lipid normalization. *Marine Ecology Progress Series*, 419, 249-265. doi: 10.3354/meps08825
- Letcher, R. J., Morris, A. D., Dyck, M., Sverko, E., Reiner, E. J., Blair, D. A. D., ... Shen, L. (2018). Legacy and new halogenated persistent organic pollutants in polar bears from a contamination hotspot in the Arctic, Hudson Bay Canada. *Science of the Total Environment*, 610-611, 121-136. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.035
- Letcher, R. J., Norstrom, R. J., Muir, D. C. G., Sandau, C. D., Koczanski, K., Michaud, R., ... Béland, P. (2000). Methylsulfone polychlorinated biphenyl and 2,2bis(chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene metabolites in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence river estuary and western Hudson Bay, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (5), 1378-1388.
- Liu, C., Shi, Y., Li, H., Wang, Y. et Yang, K. (2011). p,p'-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. *Hormone and Metabolic Research*, 43 (06), 391-396. doi: 10.1055/s-0031-1277135
- Liu, L., Li, Y., Coelhan, M., Chan, H. M., Ma, W.-L. et Liu, L. (2016a). Relative developmental toxicity of short-chain chlorinated paraffins in Zebrafish (Danio rerio) embryos. *Environmental Pollution*, 219, 1122-1130. doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.016
- Liu, L. Y., Salamova, A., Venier, M. et Hites, R. A. (2016b). Trends in the levels of halogenated flame retardants in the Great Lakes atmosphere over the period 2005-2013. *Environment International*, 92-93, 442-449. doi: 10.1016/j.envint.2016.04.025
- Liu, Y., Beyer, A. et Aebersold, R. (2016c). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165 (3), 535-550. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014
- Livak, K. J. et Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25 (4),
402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

- Lodish, H., Berk, A. et Zipursky, S. L. (2000). Overview of extracellular signaling. Dans W. H. Freeman (dir.), *Molecular Cell Biology, 4th ed.* (4th éd.). New York : (s. é.).
- Lösel, R. et Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 4, 46–56.
- Loseto, L. L., Pleskach, K., Hoover, C., Tomy, G. T., Desforges, J.-P. W., Halldorson, T. et Ross, P. S. (2018). Cortisol levels in beluga whales (Delphinapterus leucas): Setting a benchmark for Marine Protected Area monitoring. *Arctic Science*, *4* (3), 358-372. doi: 10.1139/as-2017-0020
- Lunardi, D., Abelli, L., Panti, C., Marsili, L., Fossi, M. C. et Mancia, A. (2016). Transcriptomic analysis of bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) skin biopsies to assess the effects of emerging contaminants. *Marine Environmental Research*, *114* (Supplement C), 74-79. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.01.002
- Luque, S. P. et Ferguson, S. H. (2010). Age structure, growth, mortality, and density of belugas (Delphinapterus leucas) in the Canadian Arctic: responses to environment? *Polar Biology*, *33* (2), 163-178. doi: 10.1007/s00300-009-0694-2
- Ma, X., Chen, C., Zhang, H., Gao, Y., Wang, Z., Yao, Z., ... Chen, J. (2014a). Congener-specific distribution and bioaccumulation of short-chain chlorinated paraffins in sediments and bivalves of the Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 79 (1–2), 299-304. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.11.020
- Ma, X., Zhang, H., Wang, Z., Yao, Z., Chen, J. et Chen, J. (2014b). Bioaccumulation and Trophic Transfer of Short Chain Chlorinated Paraffins in a Marine Food Web from Liaodong Bay, North China. *Environmental Science & Technology*, 48 (10), 5964-5971. doi: 10.1021/es500940p
- Ma, Y., Salamova, A., Venier, M. et Hites, R. A. (2013). Has the Phase-Out of PBDEs Affected Their Atmospheric Levels? Trends of PBDEs and Their Replacements in the Great Lakes Atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 47 (20), 11457-11464. doi: 10.1021/es403029m
- Mack, A. G. (2004). Flame Retardants, Halogenated. Dans *Kirk-Othmer Encyclopedia* of *Chemical Technology* (p. 454-483). John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/0471238961.0801121516052020.a01.pub2

Mancia, A. (2018). New Technologies for Monitoring Marine Mammal Health. Dans

M. C. Fossi et C. Panti (dir.), *Marine Mammal Ecotoxicology* (chap. 11, p. 291-320). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-812144-3.00011-5

- Marchand, C., Simard, Y. et Gratton, Y. (1999). Concentration of capelin (Mallotus villosus) in tidal upwelling fronts at the head of the Laurentian Channel in the St. Lawrence estuary. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56 (10), 1832-1848. doi: 10.1139/f99-117
- Marlowe, J. et Puga, A. (2010). 2.07 Novel AHR Interactions. Dans C. A. McQueen (dir.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (p. 93-115). Oxford : Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-046884-6.00207-4
- Marsh, G., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Bergman, Å., Endo, T. et Haraguchi,
 K. (2005). Identification, Quantification, and Synthesis of a Novel
 Dimethoxylated Polybrominated Biphenyl in Marine Mammals Caught Off the
 Coast of Japan. *Environmental Science & Technology*, 39 (22), 8684-8690. doi: 10.1021/es051153v
- Martin, A. R. et Reeves, R. R. (2000). Status of monodontid whales. Report of the International Whaling Commission Scientific Committee, Annex I. *Journal of Cetacean Research and Management*, *2 (Suppl.)*, 243-252.
- Martineau, D. (2010). Contaminants and Health of Beluga Whales of the Saint Lawrence Estuary. Dans L. Norrgren et J. Levengood (dir.), *Ecology and Animal Health Ecosystem Health and Sustainable Agriculture 2* (chap. 17, p. 139-148). (s. l.): The Baltic University Programme, Uppsala University.
- Martineau, D., Béland, P., Desjardins, C. et Lagacé, A. (1987). Levels of Organochlorine Chemicals in Tissues of Beluga Whales (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 16, 137-147.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B. et W., O. B. (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocrine Reviews*, 20 (3), 321-344. doi: 0163-769X/99/\$03.00/0
- McKenzie, A. (2009). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): Environmental Exposure Assessment and Evaluation of the Role of PBDEs in Human Health. Kingston, Ontario : Queen's University.
- McKinney, M. A., De Guise, S., Martineau, D., Béland, P., Lebeuf, M. et Letcher, R. J. (2006). Organohalogen contaminants and metabolites in beluga whale (Delphinapterus leucas) liver from two Canadian populations. *Environmental*

Toxicology and Chemistry, 25 (5), 1246-1257. doi: 10.1897/05-284R.1

- McKinney, M. A., Letcher, R. J., Aars, J., Born, E. W., Branigan, M., Dietz, R., ... Sonne, C. (2011). Flame retardants and legacy contaminants in polar bears from Alaska, Canada, East Greenland and Svalbard, 2005–2008. *Environment International*, 37 (2), 365-374. doi: 10.1016/j.envint.2010.10.008
- McNabb, F. M. A. (1992). Thyroid hormones. (s. l.): Prentice Hall.
- Ménard, N., Michaud, R., Chion, C. et Turgeon, S. (2014). Documentation of Maritime Traffic and Navigational Interactions with St. Lawrence Estuary Beluga (Delphinapterus leucas) in Calving Areas Between 2003 and 2012. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2014/003.
- Metcalf, R. L. (1995). Insect Control Technology. Dans J. Kroschwitz et M. Howe-Grant (dir.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology (Volume 14)* (p. 524-602). New York, NY : John Wiley & Sons, Inc.
- Michaud, R. (1993). *Distribution estivale du béluga du Saint-Laurent: synthèse 1986 à 1992*. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1906.
- Michaud, R. (2014). *St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas) population parameters based on photo-identification surveys, 1989-2012.* DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/130.
- Michener, R. H. et Kaufman, L. (2008). Stable Isotope Ratios as Tracers in Marine Food Webs: An Update. Dans *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science* (p. 238-282). Blackwell Publishing Ltd. doi: 10.1002/9780470691854.ch9
- Miller, W. L. et Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, *32*(1), 81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013
- Mizukawa, K., Takada, H., Takeuchi, I., Ikemoto, T., Omori, K. et Tsuchiya, K. (2009).
 Bioconcentration and biomagnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through lower-trophic-level coastal marine food web. *Marine Pollution Bulletin*, 58 (8), 1217-1224. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.03.008
- Möller, A., Xie, Z., Cai, M., Zhong, G., Huang, P., Cai, M., ... Ebinghaus, R. (2011). Polybrominated Diphenyl Ethers vs Alternate Brominated Flame Retardants and Dechloranes from East Asia to the Arctic. *Environmental Science & Technology*, 45 (16), 6793-6799. doi: 10.1021/es201850n

- Möller, A., Xie, Z., Sturm, R. et Ebinghaus, R. (2010). Large-Scale Distribution of Dechlorane Plus in Air and Seawater from the Arctic to Antarctica. *Environmental Science & Technology*, 44 (23), 8977-8982. doi: 10.1021/es103047n
- Montie, E. W., Letcher, R. J., Reddy, C. M., Moore, M. J., Rubinstein, B. et Hahn, M. E. (2010). Brominated flame retardants and organochlorine contaminants in winter flounder, harp and hooded seals, and North Atlantic right whales from the Northwest Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*, 60 (8), 1160-1169. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.04.002
- Moon, H.-B., Kannan, K., Choi, M., Yu, J., Choi, H.-G., An, Y.-R., ... Kim, Z.-G. (2010). Chlorinated and brominated contaminants including PCBs and PBDEs in minke whales and common dolphins from Korean coastal waters. *Journal of Hazardous Materials*, 179 (1-3), 735-741. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.03.063
- Morizono, H., Cabrera-Luque, J., Shi, D., Gallegos, R., Yamaguchi, S., Yu, X., ... Tuchman, M. (2006). Acetylornithine transcarbamylase: A novel enzyme in arginine biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, *188* (8), 2974-2982. doi: 10.1128/JB.188.8.2974-2982.2006
- Morris, A. D., Letcher, R. J., Dyck, M., Chandramouli, B. et Cosgrove, J. (2019). Concentrations of legacy and new contaminants are related to metabolite profiles in Hudson Bay polar bears. *Environmental Research*, 168 (October 2018), 364-374. doi: 10.1016/j.envres.2018.10.001
- Mosnier, A., Doniol-Valcroze, T., Gosselin, J.-F., Lesage, V., Measures, L. et Hammill, M. O. (2014). An age-structured Bayesian population model for St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas). DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/127.
- Mosnier, A., Doniol-Valcroze, T., Gosselin, J.-F., Lesage, V., Measures, L. et Hammill, M. O. (2015). Insights into processes of population decline using an integrated population model: The case of the St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas). *Ecological Modelling*, 314, 15-31. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2015.07.006
- Mosnier, A., Lesage, V., Gosselin, J.-F., Lemieux Lefebvre, S., Hammill, M. O. et Doniol-Valcroze, T. (2010). *Information relevant to the documentation of habitat use by St. Lawrence beluga (Delphinapterus leucas), and quantification of habitat quality*. Mont-Joli, Qc : DFO Canadian Science Advisory Secretariat.
- MPO. (2012). Programme de rétablissement du béluga (Delphinapterus leucas), population de l'estuaire du Saint-Laurent au Canada, Série de Programmes de rétablissement de la Loi sur les espèces en péril, 93.

- MPO. (2014). Situation du béluga (Delphinapterus leucas) dans l'estuaire du Saint-Laurent. Mont-Joli.
- Mrema, E. J., Rubino, F. M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A. M. et Colosio, C. (2013). Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology*, 307, 74-88. doi: 10.1016/j.tox.2012.11.015
- Mucci, A., Levasseur, M., Gratton, Y., Martias, C., Scarratt, M., Gilbert, D., ... Lansard, B. (2017). Tidally induced variations of pH at the head of the Laurentian Channel. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75 (7), 1128-1141. doi: 10.1139/cjfas-2017-0007
- Muhlhausler, B. S. (2018). The Effect of Dietary Modification on Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism. Dans G. C. Burdge (dir.), *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism* (chap. 10, p. 181-192). (s. l.) : Academic Press and AOCS Press. doi: 10.1016/b978-0-12-811230-4.00010-7
- Muir, D. C. G. et de Wit, C. A. (2010). Trends of legacy and new persistent organic pollutants in the circumpolar arctic: Overview, conclusions, and recommendations. *Science of the Total Environment*, 408 (15), 3044-3051. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.032
- Muir, D. C. G., Koczanski, K., Rosenberg, B. et Béland, P. (1996). Persistent organochlorines in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the St. Lawrence river estuary - II. Temporal trends, 1982-1994. *Environmental Pollution*, 93, 235-245. doi: 10.1016/0269-7491(96)00008-5
- Munschy, C., Héas-Moisan, K., Tixier, C., Boulesteix, L. et Morin, J. (2011). Classic and novel brominated flame retardants (BFRs) in common sole (Solea solea L.) from main nursery zones along the French coasts. *Science of the Total Environment*, 409 (21), 4618-4627. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.021
- Nagel, C., Aurich, C. et Aurich, J. (2019). Stress effects on the regulation of parturition in different domestic animal species. *Animal Reproduction Science*, 207 (April), 153-161. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.04.011
- National Center for Biotechnology Information. (s. d.). PubChem Database.Dechloraneplus,CID=26111.Récupérédehttps://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26111#section=U-S- Production
- NCP. (2013). Canadian Arctic Contaminants Assessment Report On Persistent Organic Pollutants. (D. Muir, P. Kurt-Karakus, & J. Stow, dir.). Ottawa ON : Northern Contaminants Program, Aboriginal Affairs and Northern Development

Canada.

- Newsome, S. D., Clementz, M. T. et Koch, P. L. (2010). Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. *Marine Mammal Science*, 26 (3), 509-572. doi: 10.1111/j.1748-7692.2009.00354.x
- Niemuth, J. et Stoskopf, M. K. (2014). Hepatic metabolomic investigation of the North American black bear (Ursus americanus) using 1H-NMR spectroscopy. *Wildlife Biology in Practice*, 10 (1), 14–23. doi: 10.2461/wbp.2014.10.3
- Noël, M., Dangerfield, N., Jeffries, S., Lambourn, D., Lance, M., Helbing, C., ... Ross, P. S. (2017). Polychlorinated Biphenyl-Related Alterations of the Expression of Essential Genes in Harbour Seals (Phoca vitulina) from Coastal Sites in Canada and the United States. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73 (2), 310-321. doi: 10.1007/s00244-016-0362-9
- Noël, M., Loseto, L. L., Helbing, C. C., Veldhoen, N., Dangerfield, N. J. et Ross, P. S. (2014). PCBs Are Associated With Altered Gene Transcript Profiles in Arctic Beluga Whales (Delphinapterus leucas). *Environmental Science & Technology*, 48 (5), 2942-2951. doi: 10.1021/es403217r
- Noren, D. P. et Mocklin, J. A. (2012). Review of cetacean biopsy techniques: Factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. *Marine Mammal Science*, 28 (1), 154-199. doi: 10.1111/j.1748-7692.2011.00469.x
- Norman, S. A., Beckett, L. A., Miller, W. A., St Leger, J. et Hobbs, R. C. (2013). Variation in hematologic and serum biochemical values of belugas (Delphinapterus leucas) under managed care. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 44 (2), 376-88. doi: 10.1638/2012-0172R
- Norris, D. O. et Carr, J. A. (2005). *Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans*. (s. l.) : Oxford University Press.
- O'Corry-Crowe, G. M. (2018). Beluga Whale: Delphinapterus leucas. Dans B. Würsig, J. G. M. Thewissen et K. M. Kovacs (dir.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (*Third Edition*) (3rd éd., p. 93-96). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-804327-1.00065-0
- O'Hara, T. M., Woshner, V., Bratton, G., Gardner, D. E., Hayes, A. W. et Thomas, J. A. (2003). Inorganic pollutants in Arctic marine mammals. Dans J. G. Vos, G. D. Bossart, M. Fournier et T. J. O'Shea (dir.), *Toxicology of Marine Mammals*

(Taylor & F, chap. 9, p. 206-246). London & New York : CRC Press. doi: doi:10.1201/9780203165577.ch9 10.1201/9780203165577.ch9

- Odermatt, A. (2004). Corticosteroid-dependent hypertension: environmental influences. *Swiss medical weekly*, *134* (1/2), 4-13.
- Ohshima, M., Ohno, S. et Nakajin, S. (2005). Inhibitory effects of some possible endocrine-disrupting chemicals on the isozymes of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and expression of their mRNA in gonads and adrenal glands. *Environmental sciences : an international journal of environmental physiology and toxicology*, 12 (4), 219-230. Récupéré de http://europepmc.org/abstract/MED/16184081
- Okoro, H. K., Ige, J. O., Iyiola, O. A., Pandey, S., Lawal, I. A., Zvinowanda, C. et Ngila, J. C. (2017). Comprehensive reviews on adverse health effects of human exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26 (7), 4623-4636.
- Olsen, E. et Grahl-Nielsen, O. (2003). Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Marine Biology*, *142* (1), 13-24. doi: 10.1007/s00227-002-0934-2
- OSPAR Commission. (2013). OSPAR List of Chemicals for Priority Action (Revised 2013), (Reference number 2004–12). OSPAR Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic. Récupéré de http://www.ospar.org/work-areas/hasec/chemicals/priority-action
- Painchaud, J. et Laliberté, D. (2010). *La contamination des poissons d'eau douce par les toxiques*. (G. du Québec, dir.)Suivi de l'état du Saint-Laurent.
- Pakalin, S., Cole, T., Steinkellner, J., Nicolas, R., Tissier, C., Sharon, M. et Eisenreich,
 S. (2007). *Review on production processes of Decabromodiphenyl ether* (DecaBDE) used in polymeric applications in electrical and electronic equipment, and assessment of the availability of potential alternatives to DecaBDE. (E. C. Bureau, dir.) nº EUR 22693 EN. European Commission, Institute for Health and Consumer Protection Toxicology and Chemical Substances (ECB).
- Panizzi, S., Suciu, N. A. et Trevisan, M. (2017). Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Science of the Total Environment*, 580, 136-146. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.154
- Pelch, K. E., Beeman, J. M., Niebrugee, B. A., Winkeler, S. R. et Nagel, S. C. (2011). Chapter 14 - Endocrine-disrupting Chemicals (EDCs) in Mammals. Dans D. O.

Norris et K. H. Lopez (dir.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (chap. Chapter 14, p. 329-371). London : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-374928-4.10014-8

- Pelletier, M. (2002). Toxic Contamination in sediments Lake Saint-François: A century-old story.
- Pelletier, M. (2005). Toxic contamination in sediments Lake Saint-Pierre: Last Stop before the Estuary.
- Pelletier, M. et Rondeau, M. (2013). *Polybrominated diphenyl ethers in the suspended matter and sediments of the St. Lawrence River.* (Environment Canada, dir.)Monitoring the state of the St. Lawrence River. Environment Canada.
- Peña, D., Pontillo, C., García, M. A., Cocca, C., Alvarez, L., Chiappini, F., ... Randi, A. (2012). Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor α signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicology*, 293 (1-3), 68-77. doi: 10.1016/j.tox.2011.12.012
- Peng, B., Li, H. et Peng, X. X. (2015). Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein and Cell*, 6 (9), 628-637. doi: 10.1007/s13238-015-0185-x
- Perrin, W. F. et Brownell Jr, R. L. (2009). Minke Whales: Balaenoptera acutorostrata and B. bonaerensis. Dans W. F. Perrin, B. Würsig et J. G. M. Thewissen (dir.), *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)* (p. 733-735). London : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-373553-9.00170-X
- Pike, N. (2011). Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution. *Methods in Ecology and Evolution*, 2 (3), 278-282. doi: 10.1111/j.2041-210X.2010.00061.x
- Plan Saint-Laurent. (2012). *Le Saint-Laurent*. Récupéré de http://planstlaurent.qc.ca/fr/le saint laurent.html
- Plourde, S., Galbraith, P. S., Lesage, V., Grégoire, F., Bourdages, H., Gosselin, J.-F., ... Scarratt, M. (2014). *Ecosystem perspective on changes and anomalies in the Gulf* of St. Lawrence: a context in support of the management of the St. Lawrence beluga whale population. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/129. DFO.
- Poesen, R., Mutsaers, H. A. M., Windey, K., Van Den Broek, P. H., Verweij, V., Augustijns, P., ... Masereeuw, R. (2015). The influence of dietary protein intake

on mammalian tryptophan and phenolic metabolites. *PLoS ONE*, *10* (10), 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0140820

- Polanowski, A. M., Robbins, J., Chandler, D. et Jarman, S. N. (2014). Epigenetic estimation of age in humpback whales. *Molecular Ecology Resources*, 14 (5), 976-987. doi: 10.1111/1755-0998.12247
- Post, J. R. et Parkinson, E. A. (2001). Energy Allocation Strategy in Young Fish: Allometry and Survival. *Ecology*, 82 (4), 1040-1051. doi: 10.2307/2679901
- Qi, H., Liu, L., Jia, H., Li, Y.-F., Ren, N.-Q., You, H., ... Ding, Y. (2010). Dechlorane Plus in Surficial Water and Sediment in a Northeastern Chinese River. *Environmental Science & Technology*, 44 (7), 2305-2308. doi: 10.1021/es9027106
- Qiu, X., Marvin, C. H. et Hites, R. A. (2007). Dechlorane Plus and Other Flame Retardants in a Sediment Core from Lake Ontario. *Environmental Science & Technology*, 41 (17), 6014-6019. doi: 10.1021/es070810b
- R Core Team. (2015). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. Récupéré de https://www.r-project.org/
- Raach, M., Lebeuf, M. et Pelletier, E. (2011). PBDEs and PCBs in the liver of the St Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas): a comparison of levels and temporal trends with the blubber. *Journal of Environmental Monitoring*, 13 (3), 649-656. doi: 10.1039/C0EM00310G
- Rahman, F., Langford, K. H., Scrimshaw, M. D. et Lester, J. N. (2001). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Science of the Total Environment*, 275 (1–3), 1-17. doi: 10.1016/S0048-9697(01)00852-X
- Read, F. L., Hohn, A. A. et Lockyer, C. H. (2018). A review of age estimation methods in marine mammals with special reference to monodontids. *NAMMCO Scientific Publications*, 10, 1-67. doi: 10.7557/3.4474
- Reijnders, P. J. H., Aguilar, A. et Borrell, A. (2009). Pollution and Marine Mammals. Dans W. F. Perrin, B. Würsig et J. G. M. Thewissen (dir.), *Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)* (p. 890-898). London : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-373553-9.00205-4
- Reijnders, P. J. H., Borrell, A., van Franeker, J. A. et Aguilar, A. (2018). Pollution. Dans B. Würsig, J. G. M. Thewissen et K. M. Kovacs (dir.), *Encyclopedia of*

Marine Mammals (Third Edition) (3rd éd., p. 746–753). (s. l.) : Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-804327-1.00202-8

- Risch, D., Castellote, M., Clark, C., Davis, G., Dugan, P., Hodge, L., ... Van Parijs, S. (2014). Seasonal migrations of North Atlantic minke whales: novel insights from large-scale passive acoustic monitoring networks. *Movement Ecology*, 2 (1), 24. Récupéré de http://www.movementecologyjournal.com/content/2/1/24
- Rolland, R. M., Parks, S. E., Hunt, K. E., Castellote, M., Corkeron, P. J., Nowacek, D. P., ... Kraus, S. D. (2012). Evidence that ship noise increases stress in right whales. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279 (1737), 2363-2368. doi: 10.1098/rspb.2011.2429
- Ross, P. S., Ellis, G. M., Ikonomou, M. G. et Addison, R. F. (2000). High PCB Concentrations in Free- Ranging Pacific Killer Whales, Orcinus orca: Effects of Age, Sex and Dietary Preference. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 504-515. doi: 10.1016/S0025-326X(99)00233-7
- Rotander, A., van Bavel, B., Polder, A., Rigét, F. F., Auðunsson, G. A., Gabrielsen, G. W., ... Dam, M. (2012). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine mammals from Arctic and North Atlantic regions, 1986–2009. *Environment International*, 40, 102-109. doi: 10.1016/j.envint.2011.07.001
- Routti, H., Arukwe, A., Jenssen, B. M., Letcher, R. J., Nyman, M., Bäckman, C. et Gabrielsen, G. W. (2010). Comparative endocrine disruptive effects of contaminants in ringed seals (Phoca hispida) from Svalbard and the Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152 (3), 306-312. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.05.006
- Saborido Basconcillo, L., Backus, S. M., McGoldrick, D. J., Zaruk, D., Sverko, E. et Muir, D. C. G. (2015). Current status of short- and medium chain polychlorinated n-alkanes in top predatory fish across Canada. *Chemosphere*, 127, 93-100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.01.016
- Salamova, A. et Hites, R. A. (2011). Dechlorane plus in the atmosphere and precipitation near the Great Lakes. *Environmental Science & Technology*, 45 (23), 9924-9930. doi: 10.1021/es202762n
- Salihovic, S., Ganna, A., Fall, T., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., van Bavel, B., ... Lind, L. (2016). The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. *Environment International*, 88, 60-66. doi: 10.1016/j.envint.2015.12.015

Santé Canada. (2005). Votre santé et vous - BPC. Récupéré de

https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/vie-saine/votre-sante-vous/environnement/bpc.html

- Santé Canada. (2010). Rapport sur la biosurveillance humaine des substances chimiques de l'environnement au Canada Résultats de l'Enquête canadienne sur les mesures de la santé Cycle 1 (2007 à 2009). Ottawa, ON. Récupéré de https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/sante-environnement-milieu-travail/rapports-publications/contaminants-environnementaux/rapport-biosurveillance-humaine-substances-chimiques-environnement-canada-sante-canada-2010.html
- Sato, S., Shirakawa, H., Tomita, S., Tohkin, M., Gonzalez, F. J. et Komai, M. (2013). The aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor interact to activate human metallothionein 2A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273 (1), 90-99. doi: 10.1016/j.taap.2013.08.017
- Savenkoff, C., Gagné, J. A., Gilbert, M., Castonguay, M., Chabot, D., Chassé, J., ... Starr, M. (2017). Le concept d'approche écosystémique appliqué à l'estuaire maritime du Saint-Laurent (Canada). *Environmental Reviews*, 25 (1), 26-96. doi: 10.1139/er-2015-0083
- Scarratt, M., Michaud, S., Measures, L. et Starr, M. (2014). *Phycotoxin analyses in st. Lawrence Estuary beluga*. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/124.
- Schichtel, B. A. et Husar, R. B. (2001). Eastern North American transport climatology during high- and low-ozone days. *Atmospheric Environment*, 35 (6), 1029-1038. doi: 10.1016/S1352-2310(00)00370-8
- Seckl, J. R. et Holmes, M. C. (2007). Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal « programming » of adult pathophysiology. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3, 479-488. doi: 10.1038/ncpendmet0515
- Sergeant, D. E. (1980). Levels of mercury and organochlorine residues in tissues of sea mammals from the St. Lawrence Estuary. International Council for the Exploration of the Sea, Doc. CM/E: 55 nº [C.M./E:55].
- Shaul, N. J., Dodder, N. G., Aluwihare, L. I., Mackintosh, S. A., Maruya, K. A., Chivers, S. J., ... Hoh, E. (2015). Nontargeted biomonitoring of halogenated organic compounds in two ecotypes of bottlenose dolphins (tursiops truncatus) from the Southern California bight. *Environmental Science and Technology*, 49 (3), 1328-1338. doi: 10.1021/es505156q

- Shaw, G. C. et Kaczkowski, V. (2015). *Voie maritime du Saint-Laurent*. Récupéré de https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/voie-maritime-du-saintlaurent
- Shaw, S. D., Berger, M. L., Weijs, L. et Covaci, A. (2012). Tissue-specific accumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) including Deca-BDE and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in harbor seals from the northwest Atlantic. *Environment International*, 44, 1-6. doi: 10.1016/j.envint.2012.01.001
- Shaw, S. D., Blum, A., Weber, R., Kannan, K., Rich, D., Lucas, D., ... Birnbaum, L. S. (2010). Halogenated Flame Retardants: Do the Fire Safety Benefits Justify the Risks? *Reviews on Environmental Health*, 25 (4), 261-305.
- Shen, L., Jobst, K. J., Helm, P. A., Reiner, E. J., McCrindle, R., Tomy, G. T., ... Marvin, C. H. (2012). Identification and determination of the dechlorination products of Dechlorane 602 in Great Lakes fish and Arctic beluga whales by gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (9), 2737-2748. doi: 10.1007/s00216-012-6164-7
- Shen, L., Jobst, K. J., Reiner, E. J., Helm, P. A., McCrindle, R., Taguchi, V. Y., ... Brindle, I. D. (2014). Identification and Occurrence of Analogues of Dechlorane 604 in Lake Ontario Sediment and their Accumulation in Fish. *Environmental Science & Technology*, 48 (19), 11170-11177. doi: 10.1021/es503089c
- Shen, L., Reiner, E. J., Helm, P. A., Marvin, C. H., Hill, B., Zhang, X., ... Brindle, I. D. (2011a). Historic Trends of Dechloranes 602, 603, 604, Dechlorane Plus and Other Norbornene Derivatives and Their Bioaccumulation Potential in Lake Ontario. *Environmental Science & Technology*, 45 (8), 3333-3340. doi: 10.1021/es104328r
- Shen, L., Reiner, E. J., MacPherson, K. A., Kolic, T. M., Helm, P. A., Richman, L. A., ... Chittim, B. G. (2011b). Dechloranes 602, 603, 604, Dechlorane Plus, and Chlordene Plus, a Newly Detected Analogue, in Tributary Sediments of the Laurentian Great Lakes. *Environmental Science & Technology*, 45 (2), 693-699. doi: 10.1021/es1027844
- Shen, L., Reiner, E. J., MacPherson, K. A., Kolic, T. M., Sverko, E., Helm, P. A., ... Marvin, C. H. (2010). Identification and Screening Analysis of Halogenated Norbornene Flame Retardants in the Laurentian Great Lakes: Dechloranes 602, 603, and 604. *Environmental Science & Technology*, 44 (2), 760-766. doi: 10.1021/es902482b

Shirihai, H. et Zucca, M. (2007). Baleinoptères (rorquals). Dans G. M. Kirwan et J.

Bailey (dir.), *Guide des mammifères marins du monde* (p. 46-68). Paris : Delachaux & Niestlé SA.

- Simard, Y. (2009). Le Parc Marin Saguenay–Saint-Laurent : processus océanographiques à la base de ce site unique d'alimentation des baleines du Nord-Ouest Atlantique. *Revue des sciences de l'eau*, 22 (2), 177-197. doi: 10.7202/037481ar
- Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V., Michaud, R., Zbinden, D. et Verreault, J. (2019). Associations between organohalogen exposure and thyroid- and steroid-related gene responses in St. Lawrence Estuary belugas and minke whales. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 174-184. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2019.05.029
- Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V. et Verreault, J. (2017). Temporal trends of PBDEs and emerging flame retardants in belugas from the St. Lawrence Estuary (Canada) and comparisons with minke whales and Canadian Arctic belugas. *Environmental Research*, 156, 494-504. doi: 10.1016/j.envres.2017.03.058
- Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8 (3), 1-17. doi: 10.3390/nu8030128
- Skaare, J. U., Bernhoft, A., Wiig, Ø., Norum, K. R., Haug, E., Eide, D. M. et Derocher, A. E. (2001). Relationships between plasma levels of organochlorines, retinol and thyroid hormones from polar bears (Ursus maritimus) at Svalbard. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 62 (4), 227-241. doi: 10.1080/009841001459397
- Slominski, A., Zbytek, B., Nikolakis, G., Manna, P. R., Skobowiat, C., Zmijewski, M., ... Tuckey, R. C. (2013). Steroidogenesis in the skin: Implications for local immune functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 107-123. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.006
- Soldin, O. P., O'Mara, D. M. et Aschner, M. (2008). Thyroid hormones and methylmercury toxicity. *Biological Trace Element Research*, *126* (1-3), 1-12. doi: 10.1007/s12011-008-8199-3
- Song, R., He, Y., Murphy, M. B., Yeung, L. W. Y., Yu, R. M. K., Lam, M. H. W., ... Fu, J. (2008). Effects of fifteen PBDE metabolites, DE71, DE79 and TBBPA on steroidogenesis in the H295R cell line. *Chemosphere*, 71 (10), 1888-1894. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.01.032
- Song, W., Ford, J. C., Li, A., Sturchio, N. C., Rockne, K. J., Buckley, D. R. et Mills,W. J. (2005). Polybrominated Diphenyl Ethers in the Sediments of the Great

Lakes. 3. Lakes Ontario and Erie. *Environmental Science & Technology*, 39 (15), 5600-5605. doi: 10.1021/es050631z

- Sonne, C., Dietz, R., Letcher, R. J., Pedersen, K. M., Rigét, F. F. et Styrishave, B. (2014). Steroid hormones in blood plasma from Greenland sledge dogs (Canis familiaris) dietary exposed to organohalogen polluted minke whale (Balaenoptera acuterostrata) blubber. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96 (2), 273-286. doi: 10.1080/02772248.2014.924195
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. et Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl 7), 113-122. doi: 10.1289/ehp.95103s7113
- St. Aubin, D. J., de Guise, S., Richard, P. R., Smith, T. G. et Geraci, J. R. (2001). Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in Beluga Whales, Delphinapterus leucas. *Arctic*, 54 (3), 317-331.
- St. Germain, D. L. et Hernandez, A. (2016). Thyroid Hormone Metabolism and Transport. Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Ed). Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-323-18907-1.00076-7
- Starek-Świechowicz, B., Budziszewska, B. et Starek, A. (2017). Hexachlorobenzene as a persistent organic pollutant: Toxicity and molecular mechanism of action. *Pharmacological Reports*, 69 (6), 1232-1239. doi: 10.1016/j.pharep.2017.06.013
- Stern, G. A. et Ikonomou, M. G. (2000a). Temporal trends of polybrominated biphenyls and polybrominated and polychlorinated diphenyl ethers in southeast Baffin beluga. Dans Synopsis of research conducted under the 1999 – 2000 northern contaminants program (p. 227-232). Ottawa: Indian Affairs and Northern Development.
- Stern, G. A. et Ikonomou, M. G. (2000b). Temporal trends of polybrominated diphenyl ethers in SE Baffin beluga: increasing evidence of long-range atmospheric transport. *Organohalogen Compounds*, 47, 81-84.
- Stern, G. A. et Ikonomou, M. G. (2001). Temporal trends of organohalogen compounds in Canadian Arctic beluga. Synopsis of research conducted under the 2000–2001 Northern Contaminants Program. Dans *Indian Affairs and Northern Development* (p. 237-242). Ottawa : (s. é.).
- Stern, G. A., Macdonald, C. R., Armstrong, D., Dunn, B., Fuchs, C., Harwood, L. A., ... Rosenberg, B. (2005). Spatial trends and factors affecting variation of

organochlorine contaminants levels in Canadian Arctic beluga (Delphinapterus leucas). *Science of the Total Environment*, *351-352*, 344-368. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.10.033

- Stewart, R. E. A., Campana, S. E., Jones, C. M. et Stewart, B. E. (2006). Bomb radiocarbon dating calibrates beluga (Delphinapterus leucas) age estimates. *Canadian Journal of Zoology*, *84* (12), 1840-1852. doi: 10.1139/z06-182
- Stocco, D. M. (2001). StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. Annual Review of Physiology, 63, 193-213. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.193
- Stockholm Convention. (2008). *Status of ratification*. Récupéré de http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatifications/PartiesandSignatoires/tabid/4 500/Default.aspx
- Stockholm Convention. (2009). Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting. Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Fourth meeting. Geneva, Switzerland.
- Stockholm Convention. (2017). Report of the Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its eighth meeting. Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Fourth meeting. Geneva, Switzerland.

Stockholm Convention. (2020). Chemicals proposed for listing under the Convention.

- Su, G., Letcher, R. J., Moore, J. N., Williams, L. L., Martin, P. A., de Solla, S. R. et Bowerman, W. W. (2015). Spatial and temporal comparisons of legacy and emerging flame retardants in herring gull eggs from colonies spanning the Laurentian Great Lakes of Canada and United States. *Environmental Research*, 142, 720-730. doi: 10.1016/j.envres.2015.08.018
- Suárez, M., Caimari, A., del Bas, J. M. et Arola, L. (2017). Metabolomics: An emerging tool to evaluate the impact of nutritional and physiological challenges. *TrAC -Trends in Analytical Chemistry*, 96, 79-88. doi: 10.1016/j.trac.2017.06.003
- Sun, R., Luo, X., Tang, B., Chen, L., Liu, Y. et Mai, B. (2017). Bioaccumulation of short chain chlorinated paraffins in a typical freshwater food web contaminated by e-waste in south china: Bioaccumulation factors, tissue distribution, and trophic transfer. *Environmental Pollution*, 222, 165-174. doi: 10.1016/j.envpol.2016.12.060

- Sverko, E., Tomy, G. T., Marvin, C. H., Zaruk, D., Reiner, E. J., Helm, P. A., ... McCarry, B. E. (2008). Dechlorane Plus Levels in Sediment of the Lower Great Lakes. *Environmental Science & Technology*, 42 (2), 361-366. doi: 10.1021/es0710104
- Sverko, E., Tomy, G. T., Reiner, E. J., Li, Y.-F., McCarry, B. E., Arnot, J. A., ... Hites, R. A. (2011). Dechlorane Plus and Related Compounds in the Environment: A Review. *Environmental Science & Technology*, 45 (12), 5088-5098. doi: 10.1021/es2003028
- Tabuchi, M., Veldhoen, N., Dangerfield, N., Jeffries, S., Helbing, C. C. et Ross, P. S. (2006). PCB-Related Alteration of Thyroid Hormones and Thyroid Hormone Receptor Gene Expression in Free-Ranging Harbor Seals (Phoca vitulina). *Environmental Health Perspectives*, 114 (7), 1024-1031. Récupéré de http://www.jstor.org.proxy.bibliotheques.uqam.ca:2048/stable/3651772
- Talsness, C. E. (2008). Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: A flame-retardant additive in several consumer products. *Environmental Research*, *108* (2), 158-167. doi: 10.1016/j.envres.2008.08.008
- Tanabe, A., Shimizu, R., Osawa, Y., Suzuki, M., Ito, S., Goto, M., ... Sahara, H. (2019). Age estimation by DNA methylation in the Antarctic minke whale. *Fisheries Science*, (0123456789). doi: 10.1007/s12562-019-01371-7
- Tanabe, S. (2002). Contamination and toxic effects of persistent endocrine disrupters in marine mammals and birds. *Marine Pollution Bulletin*, 45 (1–12), 69-77. doi: 10.1016/S0025-326X(02)00175-3
- Tang, F., Yan, C., Li, F., Wu, S., Yu, Y., Gao, Y., ... Shen, X. (2007). Protective effects of insulin on polychlorinated biphenyls-induced disruption of actin cytoskeleton in hippocampal neurons. *Environmental Toxicology*, 22 (2), 152-158. doi: 10.1002/tox.20247
- Tao, L., Zhang, Y., Wu, J. P., Wu, S. K., Liu, Y., Zeng, Y. H., ... Mai, B. X. (2019). Biomagnification of PBDEs and alternative brominated flame retardants in a predatory fish: Using fatty acid signature as a primer. *Environment International*, 127 (March), 226-232. doi: 10.1016/j.envint.2019.03.036
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. et Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50 (4), S1-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005

Therriault, J.-C., Legendre, L. et Demers, S. (1990). Chapter 12 - Oceanography and

Ecology of Phytoplankton in the St.Lawrence Estuary. Dans M. I. El-Sabh et N. Silverberg (dir.), *Oceanography of a large-scale estuarine system: the St. Lawrence (Vol. 39)* (chap. 12, p. 269-295). New York, NY : Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-1-4615-7534-4 12

- Todd, S. K. (1997). Dietary patterns of humpback whales (Megaptera novaeangliae) in the northwest Atlantic: Evidence from carbon-13 and nitrogen-15 stable isotopes. Memorial University of Newfoundland (Canada), Ann Arbor, United States.
- Toms, L.-M. L., Hearn, L., Kennedy, K., Harden, F., Bartkow, M., Temme, C. et Mueller, J. F. (2009). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in matched samples of human milk, dust and indoor air. *Environment International*, 35 (6), 864-869. doi: 10.1016/j.envint.2009.03.001
- Tomy, G. T. (2014). Time-Trend Studies on New and Emerging Persistent Halogenated Compounds in Beluga Whales from Hendrickson Island (NWT) and Sanikiluaq (Nunavut). Dans Synopsis of Research Conducted under the 2013-2014 Northern Contaminants Program (p. 209-215). Gatineau : Aboriginal Affairs and Northern Development Canada.
- Tomy, G. T., Fisk, A. T., Westmore, J. B. et Muir, D. C. G. (1998a). Environmental Chemistry and Toxicology of Polychlorinated n-Alkanes. Dans G. W. Ware (dir.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (vol. 158, chap. 2, p. 53-128). Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4612-1708-4 2
- Tomy, G. T., Muir, D. C. G., Stern, G. A. et Westmore, J. B. (2000). Levels of C10–C13 Polychloro-n-Alkanes in Marine Mammals from the Arctic and the St. Lawrence River Estuary. *Environmental Science & Technology*, 34 (9), 1615-1619. doi: 10.1021/es990976f
- Tomy, G. T., Pleskach, K., Arsenault, G., Potter, D., McCrindle, R., Marvin, C. H., ... Tittlemier, S. (2008a). Identification of the Novel Cycloaliphatic Brominated Flame Retardant 1,2-Dibromo-4-(1,2-dibromoethyl)cyclohexane in Canadian Arctic Beluga (Delphinapterus leucas). *Environmental Science & Technology*, 42 (2), 543-549. doi: 10.1021/es072043m
- Tomy, G. T., Pleskach, K., Oswald, T., Halldorson, T., Helm, P. A., MacInnis, G. et Marvin, C. H. (2008b). Enantioselective Bioaccumulation of Hexabromocyclododecane and Congener-Specific Accumulation of Brominated Diphenyl Ethers in an Eastern Canadian Arctic Marine Food Web. *Environmental Science & Technology*, 42 (10), 3634-3639. doi: 10.1021/es703083z

- Tomy, G. T., Stern, G. A., Koczanski, K. et Halldorson, T. (1998b). Polychloro-nalkanes in Beluga Whales from the Arctic and the St. Lawrence River Estuary. *Organohalogen Compounds*, *35*, 399-401.
- Tomy, G. T., Stern, G. A., Muir, D. C. G., Fisk, A. T., Cymbalisty, C. D. et Westmore, J. B. (1997). Quantifying C10–C13 Polychloroalkanes in Environmental Samples by High-Resolution Gas Chromatography/Electron Capture Negative Ion High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69 (14), 2762-2771. doi: 10.1021/ac961244y
- Trites, R. W. (1972). The gulf of St. Lawrence from a pollution point of view. Dans M. Ruivo (dir.), *Marine Pollution and Sea Life* (p. 55-72). London, UK : Fishing News Books.
- Tsai, Y. L., Chen, S. Y., Lin, S. C. et Li, J. Y. (2016). Effects of physiological factors and seasonal variations on hematology and plasma biochemistry of beluga whales (Delphinapterus leucas) managed in Pingtung, Taiwan. *Aquatic Mammals*, 42 (4), 494-506. doi: 10.1578/AM.42.4.2016.494
- Turgeon, J., Duchesne, P., Colbeck, G. J., Postma, L. D. et Hammill, M. O. (2012). Spatiotemporal segregation among summer stocks of beluga (Delphinapterus leucas) despite nuclear gene flow: implication for the endangered belugas in eastern Hudson Bay (Canada). *Conservation Genetics*, 13 (2), 419-433. doi: 10.1007/s10592-011-0294-x
- UNEP. (2015). Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its eleventh meeting: Risk profile on short-chained chlorinated paraffins. UNEP/POPS/POPRC.11/10/Add.2. Rome, Italy.
- US EPA. (2015). *High Production Volume (HPV) Challenge*. Récupéré de http://iaspub.epa.gov/oppthpv/hpv_hc_characterization.get_report?doctype=2
- US EPA. (2017). *Risk Management for Short-Chain Chlorinated Paraffins*. Récupéré de https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/risk-management-short-chain-chlorinated-paraffins
- Van Dolah, F. M., Neely, M. G., McGeorge, L. E., Balmer, B. C., Ylitalo, G. M., Zolman, E. S., ... Schwacke, L. H. (2015). Seasonal Variation in the Skin Transcriptome of Common Bottlenose Dolphins (Tursiops truncatus) from the Northern Gulf of Mexico. *PLoS ONE*, 10 (6), e0130934. doi: 10.1371/journal.pone.0130934

van Mourik, L. M., Gaus, C., Leonards, P. E. G. et de Boer, J. (2016). Chlorinated

paraffins in the environment: A review on their production, fate, levels and trends between 2010 and 2015. *Chemosphere*, 155 (Supplement C), 415-428. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.037

- Venier, M., Salamova, A. et Hites, R. A. (2015). Halogenated Flame Retardants in the Great Lakes Environment. Accounts of Chemical Research, 48 (7), 1853-1861. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00180
- Villanger, G. D., Lydersen, C., Kovacs, K. M., Lie, E., Skaare, J. U. et Jenssen, B. M. (2011). Disruptive effects of persistent organohalogen contaminants on thyroid function in white whales (Delphinapterus leucas) from Svalbard. *Science of the Total Environment*, 409 (13), 2511-2524. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.03.014
- Vladykov, V. D. (1944). III Chasse, biologie et valeur économique du marsouin blanc ou beluga (Delphinapterus leucas) du fleuve et du golfe Saint-Laurent. Études sur les mammifères aquatiques. Québec, QC : Contributions de l'Institut de Biologie de l'Université de Montréal, Département des Pêcheries.
- Vogel, C. et Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13 (4), 227-232. doi: 10.1038/nrg3185
- von der Recke, R. et Vetter, W. (2007). Synthesis and Characterization of 2,3-Dibromopropyl-2,4,6-tribromophenyl Ether (DPTE) and Structurally Related Compounds Evidenced in Seal Blubber and Brain. *Environmental Science & Technology*, 41 (5), 1590-1595. doi: 10.1021/es062383s
- Vorkamp, K., Balmer, J., Hung, H., Letcher, R. J. et Rigét, F. F. (2019). A review of chlorinated paraffin contamination in Arctic ecosystems. *Emerging Contaminants*, 5, 219-231. doi: 10.1016/j.emcon.2019.06.001
- Vorkamp, K. et Rigét, F. F. (2014). A review of new and current-use contaminants in the Arctic environment: Evidence of long-range transport and indications of bioaccumulation. *Chemosphere*, 111, 379-395. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.019
- Vorkamp, K., Rigét, F. F., Bossi, R., Sonne, C. et Dietz, R. (2017). Endosulfan, Short-Chain Chlorinated Paraffins (SCCPs) and Octachlorostyrene in Wildlife from Greenland: Levels, Trends and Methodological Challenges. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 73 (4), 542-551. doi: 10.1007/s00244-017-0428-3

Wagemann, R., Stewart, R. E. A., Béland, P. et Desjardins, C. (1990). Heavy metals

and selenium in tissues of beluga whales from the Canadian Arctic and St. Lawrence Estuary. Dans T. G. Smith, D. J. St. Aubin et J. R. Geraci (dir.), *Advances in research on the beluga whale, Delphinapterus leucas. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences 224* (p. 191–206). Ottawa, ON : (s. é.).

- Wang, F., Zhang, H., Geng, N., Ren, X. M., Zhang, B., Gong, Y. et Chen, J. (2017). A metabolomics strategy to assess the combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and short-chain chlorinated paraffins (SCCPs). *Environmental Pollution*, 234, 572-580. doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.073
- Wang, X., Zhu, J., Kong, B., He, B., Wei, L., Jin, Y., ... Fu, Z. (2019a). C9–13 chlorinated paraffins cause immunomodulatory effects in adult C57BL/6 mice. *Science of the Total Environment*, 675, 110-121. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.199
- Wang, X., Zhu, J., Xue, Z., Jin, X., Jin, Y. et Fu, Z. (2019b). The environmental distribution and toxicity of short-chain chlorinated paraffins and underlying mechanisms: Implications for further toxicological investigation. *Science of The Total Environment*, 695, 133834. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133834
- Watanabe, I. et Sakai, S. (2003). Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International*, 29 (6), 665-682. doi: 10.1016/S0160-4120(03)00123-5
- Watt, C. A., Stewart, B. E., Loseto, L., Halldorson, T. et Ferguson, S. H. (2019). Estimating narwhal (Monodon monoceros) age using tooth layers and aspartic acid racemization of eye lens nuclei. *Marine Mammal Science*, (July 2018), 1-13. doi: 10.1111/mms.12623
- Wellington Laboratories. (2013). New Halogenated Flame Retardant Dechlorane 604 Component B. Wellington Reporter.
- White, P. C., Mune, T. et Agarwal, A. K. (1997). 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase and the Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess 1. *Endocrine Reviews*, 18 (1), 135-156. doi: 10.1210/edrv.18.1.0288
- WHO. (2012). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. (Å. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd, & R. T. Zoeller, dir.). United Nations Environment Programme and the World Health Organization.
- Wolkers, H., Van Bavel, B., Derocher, A. E., Wiig, Ø., Kovacs, K. M., Lydersen, C. et Lindström, G. (2004). Congener-Specific Accumulation and Food Chain Transfer of Polybrominated Diphenyl Ethers in Two Arctic Food Chains. *Environmental*

Science & Technology, 38, 1667-1674.

- Wu, J.-P., Guan, Y.-T., Zhang, Y., Luo, X.-J., Zhi, H., Chen, S.-J. et Mai, B.-X. (2011a). Several current-use, non-PBDE brominated flame retardants are highly bioaccumulative: Evidence from field determined bioaccumulation factors. *Environment International*, 37 (1), 210-215. doi: 10.1016/j.envint.2010.09.006
- Wu, J.-P., Zhang, Y., Luo, X.-J., Wang, J., Chen, S.-J., Guan, Y.-T. et Mai, B.-X. (2010). Isomer-Specific Bioaccumulation and Trophic Transfer of Dechlorane Plus in the Freshwater Food Web from a Highly Contaminated Site, South China. *Environmental Science & Technology*, 44 (2), 606-611. doi: 10.1021/es902744b
- Wu, R. Q., Zhao, X. F., Wang, Z. Y., Zhou, M. et Chen, Q. M. (2011b). Novel molecular events in oral carcinogenesis via integrative approaches. *Journal of Dental Research*, 90 (5), 561-572. doi: 10.1177/0022034510383691
- Wyatt, I., Coutss, C. T. et Elcombe, C. R. (1993). The effect of chlorinated paraffins on hepatic enzymes and thyroid hormones. *Toxicology*, 77 (1–2), 81-90. doi: 10.1016/0300-483X(93)90139-J
- Wyrzykowski, B. (2005). Évaluations pathologique et épidemiologique de la pneumonie vermineuse chez les bélugas (Delphinapterus leucas) de l'estuaire du Saint-Laurent au Québec, Canada. Faculté de médecine de Créteil. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Créteil, France.
- Xian, Q., Siddique, S., Li, T., Feng, Y., Takser, L. et Zhu, J. (2011). Sources and environmental behavior of dechlorane plus — A review. *Environment International*, 37 (7), 1273-1284. doi: 10.1016/j.envint.2011.04.016
- Xiao, H., Shen, L., Su, Y., Barresi, E., DeJong, M., Hung, H., ... Kang, S.-C. (2012). Atmospheric concentrations of halogenated flame retardants at two remote locations: The Canadian High Arctic and the Tibetan Plateau. *Environmental Pollution*, 161, 154-161. doi: 10.1016/j.envpol.2011.09.041
- Xu, Y., Yu, R. M. K., Zhang, X., Murphy, M. B., Giesy, J. P., Lam, M. H. W., ... Yu, H. (2006). Effects of PCBs and MeSO2–PCBs on adrenocortical steroidogenesis in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Chemosphere*, 63 (5), 772-784. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.08.013
- Yasunaga, G., Pastene, L. A., Bando, T., Hakamada, T. et Fujise, Y. (2017). Age estimation of Antarctic minke whales Balaenoptera bonaerensis based on aspartic acid racemization technique. *Fisheries Science*, 83 (6), 947-954. doi: 10.1007/s12562-017-1122-0

- Yim, H.-S., Cho, Y. S., Guang, X., Kang, S. G., Jeong, J.-Y., Cha, S.-S., ... Lee, J.-H. (2014). Minke whale genome and aquatic adaptation in cetaceans. *Nature Genetics*, 46 (1), 88-92. doi: 10.1038/ng.2835
- Yogui, G. T. et Sericano, J. L. (2009). Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. marine environment: A review. *Environment International*, 35 (3), 655-666. doi: 10.1016/j.envint.2008.11.001
- Yordy, J. E., Mollenhauer, M. A. M., Wilson, R. M., Wells, R. S., Hohn, A., Sweeney, J., ... Peden-Adams, M. M. (2010). Complex contaminant exposure in cetaceans: A comparative E-Screen analysis of bottlenose dolphin blubber and mixtures of four persistent organic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (10), 2143-2153. doi: 10.1002/etc.279
- Yu, L., Han, Z. et Liu, C. (2015a). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 64-73. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.12.010
- Yu, Y., Hung, H., Alexandrou, N., Roach, P. et Nordin, K. (2015b). Multiyear Measurements of Flame Retardants and Organochlorine Pesticides in Air in Canada's Western Sub-Arctic. *Environmental Science & Technology*, 49 (14), 8623-8630. doi: 10.1021/acs.est.5b01996
- Yuan, B., Vorkamp, K., Roos, A. M., Faxneld, S., Sonne, C., Garbus, S. E., ... de Wit, C. A. (2019). Accumulation of Short-, Medium-, and Long-Chain Chlorinated Paraffins in Marine and Terrestrial Animals from Scandinavia. *Environmental Science & Technology*, 53 (7), 3526-3537. doi: 10.1021/acs.est.8b06518
- Yurkowski, D. J., Hussey, N. E., Semeniuk, C., Ferguson, S. H. et Fisk, A. T. (2014). Effects of lipid extraction and the utility of lipid normalization models on δ 13C and δ 15N values in Arctic marine mammal tissues. *Polar Biology*, *38* (2), 131-143. doi: 10.1007/s00300-014-1571-1
- Zeng, L., Lam, J. C. W., Wang, Y., Jiang, G. et Lam, P. K. S. (2015). Temporal Trends and Pattern Changes of Short- and Medium-Chain Chlorinated Paraffins in Marine Mammals from the South China Sea over the Past Decade. *Environmental Science & Technology*, 49 (19), 11348-11355. doi: 10.1021/acs.est.5b02473
- Zhang, J., Zhang, J., Liu, R., Gan, J., Liu, J. et Liu, W. (2016a). Endocrine-Disrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor. *Environmental Science & Technology*, 50 (1), 435-443. doi: 10.1021/acs.est.5b03731

- Zhang, Q., Wang, J., Zhu, J., Liu, J., Zhang, J. et Zhao, M. (2016b). Assessment of the endocrine-disrupting effects of short-chain chlorinated paraffins in in vitro models. *Environment International*, 94 (Supplement C), 43-50. doi: 10.1016/j.envint.2016.05.007
- Zhang, R., Guo, J., Wu, F., Mu, Y., Giesy, J. P., Chang, H., ... Feng, C. (2014). Toxicity Reference Values for Polybrominated Diphenyl Ethers: Risk Assessment for Predatory Birds and Mammals from Two Chinese Lakes. Dans D. Whitacre (dir.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (p. 111-137). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-03777-6 6
- Zhu, B., Lai, N. L. S., Wai, T.-C., Chan, L. L., Lam, J. C. W. et Lam, P. K. S. (2014). Changes of accumulation profiles from PBDEs to brominated and chlorinated alternatives in marine mammals from the South China Sea. *Environment International*, 66, 65-70. doi: 10.1016/j.envint.2014.01.023