

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PERTURBATION DU MÉTABOLISME OSSEUX CHEZ LE GOÉLAND À BEC CERCLÉ
FORTEMENT EXPOSÉ AUX RETARDATEURS DE FLAMME HALOGÉNÉS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
STÉPHANIE PELLERIN PLOURDE

JANVIER 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Le présent projet résulte de la collaboration entre le Laboratoire du métabolisme osseux (Robert Moreau) et la Chaire de recherche en toxicologie comparée des espèces aviaires (Jonathan Verreault) de l'UQAM. Cette dernière regroupe différents projets, et celui dans lequel s'inscrit la présente étude a pour but l'étude des effets et du devenir des retardateurs de flamme (FR) halogénés chez une espèce modèle, soit le goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*). De par son comportement de quête alimentaire, celui-ci est amené à fréquenter l'environnement urbain en plus de nicher dans un point de contamination connu du Fleuve Saint-Laurent, l'île Deslauriers près de Varennes. Ces individus sont donc chroniquement exposés à ces contaminants. Le but du présent projet était donc de déterminer si les FR à l'étude sont associés à une perturbation du métabolisme osseux du goéland à bec cerclé. En combinant des techniques d'imagerie médicale et de dosage de marqueurs plasmiques à la quantification et l'identification de plusieurs FR dans le foie et le plasma des individus, la présente étude suggère que l'exposition chronique aux FR aurait des répercussions sur le tissu osseux du goéland à bec cerclé. Ce projet n'ayant pas pour but de trouver la cause de ces altérations, de futures études complémentaires devraient inclure, entre autres, la quantification des hormones thyroïdiennes et sexuelles dans le but d'élucider le mécanisme d'action de ces produits.

Ce document compte deux chapitres portant respectivement sur les connaissances associées aux FR, au métabolisme osseux et aux interactions possibles entre les contaminants organiques et ce dernier, et sur les effets observés au niveau du métabolisme osseux chez l'espèce modèle choisie. Le second chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique et utilise des données de contamination obtenues dans le cadre d'une étude sur la présence des FR chez le goéland à bec cerclé. Les résultats portant sur les différents marqueurs du métabolisme osseux, l'acquisition des images nécessaires à l'obtention de certains marqueurs ainsi que le traitement des données proviennent de travaux que j'ai réalisés ces deux dernières années. L'article présenté dans ce document sera soumis au journal « Chemosphere ».

Je tiens à remercier mon directeur, Jonathan Verreault, pour sa confiance, son support et ses réponses aux nombreuses questions tout au long de la réalisation de ce projet. Je désire aussi remercier Robert Moreau, mon codirecteur, pour son encadrement et ses conseils pour la portion os de cette étude. Un merci particulier à Corine Martineau pour sa précieuse assistance avec la numérisation des os. Je désire aussi remercier tous les membres du laboratoire de J. Verreault : Véronica Aponte, Élyse Caron-Beaudoin, Bernice Chabot-Giguère, Vicky Doré, Cynthia D. Franci, Marie-Line Gentes et Sarah Martinson. Travailler avec vous et vous côtoyer fut un plaisir au cours de ces deux dernières années.

Un merci tout spécial à Louis et Lyane, mes parents, qui m'ont donné l'envie et parfois même le courage de persévérer, tant à l'école que dans la vie. J'ai aussi une pensée spéciale pour mes amies Andrée, Catherine, Frédérique et Sophie qui m'ont supportée et conseillée. En terminant, j'aimerais souligner le travail effectué dans l'ombre par mon amoureux Jean-Philippe qui m'a épaulée au cours de ces deux années. Ses encouragements, sa foi en moi et son amour me permettent de me rendre au bout de ce que j'entreprends et ce projet en est une preuve de plus.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	II
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
RÉSUMÉ	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	5
1.1 Polluants organiques persistants	5
1.2 Retardateurs de flamme	6
1.2.1 Retardateurs de flamme bromés	6
1.2.2 FR émergents	8
1.3. OS.....	10
1.3.1 Structure microscopique	11
1.3.2 Résumé du remodelage.....	12
1.3.3 Homéostasie minérale.....	14
1.4 OS ET POLLUANTS ORGANIQUES.....	15
1.4.1 Mécanismes d'action proposés.....	16
1.5. BUT ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	17
CHAPITRE II	
IS BONE TISSUE A TARGET FOR HALOGENATED FLAME RETARDANTS IN RING-BILLED GULLS BREEDING IN A POLLUTION HOT SPOT IN THE SAINT LAWRENCE RIVER, CANADA?	19
2.1 Abstract.....	20
2.2 Introduction.....	21
2.3 Materials and Methods.....	24
2.3.1 Sample collection.....	24
2.3.2 Chemical analyses.....	24

2.3.3 Biochemical markers of bone metabolism.....	25
2.3.4 Bone structure evaluation	25
2.3.5 Data treatment.....	26
2.4 Results.....	28
2.4.1 FRs concentrations in liver and plasma	28
2.4.2 Biochemical markers of bone metabolism.....	28
2.4.3. Bone density and composition.....	29
2.4.4 Associations between PBDE/FR concentrations and bone tissue parameters.....	29
2.5 Discussion.....	35
2.5.1 Accumulation of FRs in RBGUs	35
2.5.2 Bone tissue alteration and potential role of contaminant exposure	36
2.6 Concluding remarks	40
2.7 Acknowledgements.....	41
2.8 References.....	42
CONCLUSION.....	48
RÉFÉRENCES	51

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
0.1 Représentation des os de la patte d'un pigeon biset (<i>Columba livia</i>) (image modifiée, Proctor et Lynch, 1993).....	4
2.1 Representative reconstructed images obtained from the NRecon software of a left male RBGU tarsus: a) cortical and b) trabecular sections.....	32
2.2 Relationship between BMD and Bv/Tv in both bone sections of male RBGUs: a) trabecular BMD (g/cm^3) and Bv/Tv (%) ($n = 20$; $r^2 = 0.92$; $p < 0.0001$) and b) cortical BMD (\log_{10} -transformed g/cm^3) and Bv/Tv (%) ($n = 20$; $r^2 = 0.44$; $p = 0.001$).....	33
2.3 Relationship between cortical BMD (\log_{10} -transformed g/cm^3) of male RBGUs tarsus and BDE-209 concentrations (\log_{10} -transformed ng/g ww) in: a) liver ($n = 20$; $r^2 = 0.23$; $p = 0.03$) and b) plasma ($n = 18$; $r^2 = 0.25$; $p = 0.03$).....	34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Mean (\pm S.E.) and range of PBDEs (sums of congeners) and other FR concentrations (ng/g ww) determined in liver and plasma of male RBGUs from Deslauriers Island, Quebec (Canada). Partial data from Gentes <i>et al.</i> (2012).....	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BEHTBP	Bis-(2-ethylxyl)-tetrabromophthalate
BFR	Retardateur de flamme bromé (Brominated flame retardant)
BMD	Densité minérale osseuse (Bone mineral density)
BMU	Unité multicellulaire de base
BPC et PCB	Polychlorobiphényle
BTBPE	1,2-Bis(2,4,6-tribromohenoxy)éthane
Bv/Tv	Ratio entre le volume de tissu osseux sur le volume total d'échantillon
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CIPA	Comité Institutionnel de Protection des Animaux (UQAM)
CT	Calcitonine
DBDPE	Decabromodiphényl éthane
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DP	Déchlorane plus
EROD	Ethoxyrésosofurin-O-deethylase
FR	Retardateur de flamme (Flame retardant)
GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gaz chromatography)
MS	Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
ECNI	Mode de capture d'électrons par ionisation négative (electron capture negative ionization)
HBCD	Hexabromocyclododécane
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages (Macrophage colony-stimulating factor)
MLOD	Limite de détection de la méthode (Method limit of detection)
MLOQ	Limite de quantification de la méthode (Method limit of quantification)
OH	Organohalogène
OPG	Ostéoprotégérine
PBB	Biphényle polybromé
PBDE	Polybromodiphényléther
POP	Polluant organique persistant
PTH	Parathormone
RANK	Receptor activator of nuclear factor- κ B
RANKL	Factor- κ B ligand
RBGU	Goéland à bec cerclé (Ring-billed gull)
ROI	Région d'intérêt (Region of interest)
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SIM	Détection d'ion spécifique (Selected ion monitoring)
T ₃	Triiodothyronine
T ₄	Thyroxine
TBBPA	Tetrabromobisphénol A
TBECH	1,2-dibromo-4-(1,2-dibromoéthyl)-cyclohexane
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine

TGF- β	Tumor growth factor β
TH	Hormone thyroïdienne (Thyroid hormone)
TRAP	Phosphatase acide tartrate-résistante (Tartrate-resistant acid phosphatase)

RÉSUMÉ

La présence humaine sur terre est responsable de la production et du déversement de nombreuses substances, dont certaines toxiques, dans l'environnement; il s'agit là d'un fait reconnu. Que ce soit en milieu naturel ou anthropique, ces contaminants y sont retrouvés et la faune les fréquentant est donc exposée à un cocktail de contaminants pouvant mener à l'apparition d'effets néfastes observables ou non. Parmi les contaminants présents dans ces environnements, les retardateurs de flamme (FR) de type halogéné sont d'intérêt puisque plusieurs effets toxiques leur sont attribuables. Parmi ceux-ci, certains, comme leur potentiel de perturbateurs endocriniens (axes thyroïdien et gonadique), peuvent mener à des effets au niveau du tissu osseux. Comme il est connu que le métabolisme de ce tissu est régulé de façon très précise par certaines hormones (calcitonine, parathormone, hormones thyroïdiennes) et molécules (interleukines, «macrophage colony-stimulating factor» (M-CSF), vitamine D), il est donc possible que la structure ou la qualité de ce tissu en soit affectée, ce qui pourrait causer certains désavantages aux individus plus grandement atteints.

Dans le cadre de cette étude, nous avons examiné les effets de l'exposition aux retardateurs de flamme halogénés sur le métabolisme osseux du goéland à bec cerclé (*Larus delawarensis*) nichant à proximité de la ville de Montréal (île Deslauriers). La proximité avec le centre urbain qu'est Montréal est grandement responsable de l'exposition des individus y nichant. En effet, ceux-ci consommant de grandes quantités de nourriture d'origine anthropique, ils se retrouvent donc fortement exposés aux FRs en fréquentant les lieux où ce type de nourriture est retrouvé (sites d'enfouissement technique et centres urbains). De plus, cette île est située dans le panache de l'effluent de la communauté urbaine de Montréal, ce qui peut aussi contribuer à l'exposition élevée de ces individus. Cette espèce étant considérée comme bio-indicatrice de ce milieu, les résultats obtenus pourront potentiellement être étendus à d'autres espèces qui pourraient voir leur santé affectée. Les contaminants ont été extraits des tissus sélectionnés (foie et plasma) et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS). Les marqueurs biochimiques, le calcium (Ca^{2+}) et le phosphate inorganique (PO_4^-) circulant ainsi que l'activité de la phosphatase alcaline, ont été mesurés à l'aide d'ensembles de colorimétrie disponibles sur le marché. Pour ce qui est des marqueurs physiques, ceux-ci ont été évalués à partir d'images obtenues par microtomographie qui ont été analysées pour permettre le calcul et l'estimation de certains paramètres du tissu osseux.

Des associations négatives entre la densité minérale osseuse (corticale et trabéculaire) ainsi que le niveau de certains contaminants (ex. : BDE-154, -183, -201, -209) dans le foie ou le plasma et des associations négatives entre la BMD (corticale et trabéculaire) et la Bv/Tv (trabéculaire) et le niveau de calcium circulant ont été observées. Ces résultats nous permettent de croire que les polluants à l'étude pourraient avoir un effet, direct ou indirect, sur le métabolisme osseux du goéland à bec cerclé, et donc que le tissu osseux de ces individus serait une cible potentielle pour ces composés.

Mots clés : retardateurs de flamme halogénés, polybromodiphényléthers, densité minérale osseuse, calcium, phosphate, goéland à bec cerclé

INTRODUCTION

L'être humain produit et déverse dans l'environnement des milliers de substances chimiques dont certaines sont connues pour y persister en plus d'être bioaccumulables et toxiques pour l'humain et la faune (El-Shahawi *et al.*, 2010). Ces dernières sont souvent désignées comme étant des polluants organiques persistants (POP). Les premiers identifiés furent les polychlorobiphényles (PCB). Nous savons maintenant que plusieurs autres substances organiques halogénées possèdent aussi ces caractéristiques et ont été classifiées comme des POP. C'est notamment le cas de certains congénères des polybromodiphényléthers (PBDE) (tétra-, penta-, hexa-, hepta- et octa-BDE); contaminants ayant beaucoup attiré l'attention depuis quelques années (Hale *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2003). Plusieurs polluants organiques, sans être officiellement reconnus comme POP, possèdent certaines caractéristiques associées à ceux-ci, c'est notamment le cas d'autres retardateurs de flamme bromés (BFR) ou FR, nouveaux ou non. Parmi ceux-ci notons le BDE-209, le bis(2-éthylhexyl)-tetrabromophthalate (BEHTBP), le déchlorane plus (DP) et l'hexabromocyclododécane (HBCD).

Les BFR ont été détectés chez certaines espèces d'oiseaux aquatiques dont le goéland bourgmestre (*Larus hyperboreus*) (Verreault *et al.*, 2007), et le goéland à bec cerclé (Gentes *et al.*, 2012) et d'oiseaux de proie dont le faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) (Herzke *et al.*, 2005). D'autres FR ont aussi été détectés chez des oiseaux aquatiques, dont le DP qui a entre autres été retrouvé chez le *L. delawarensis* (Gentes *et al.*, 2012) et le goéland argenté (*Larus argentatus*) (Gauthier et Letcher, 2009). Plusieurs revues de littérature indiquant la présence de ces contaminants chez plusieurs espèces fauniques et dans de nombreux écosystèmes sont aussi disponibles (Chen et Hale, 2010; de Wit, Herzke et Vorkamp, 2010; Law *et al.*, 2003; Sverko *et al.*, 2011).

Les polluants organiques, qu'ils soient persistants ou non, ont aussi des effets toxiques sur les humains et la faune y étant exposés. Par exemple, les BFR, dont certains congénères des PBDE, ont été identifiés comme étant des perturbateurs endocriniens (Birnbaum et Staskal,

2004). Effectivement, parmi les effets néfastes associés à l'exposition aux PBDE notons une diminution des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes (revu dans Darnerud, 2008). De façon plus générale, l'exposition à certains contaminants organiques halogénés a des effets documentés sur les os de certaines espèces exposées en milieu naturel (Fox *et al.*, 2008; Lind *et al.*, 2003 et 2004; Roos, Rigét et Örberg, 2010; Routti *et al.*, 2008; Sonne *et al.*, 2004) ou en laboratoire (Lind *et al.*, 2009b; Lundberg *et al.*, 2006 et 2007). Quant aux nouveaux retardateurs de flamme bromés, tels le décabromodiphényl éthane (DBDPE) (Nakari et Huhtala, 2010) et le 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)éthane (BTBPE) (Tomy *et al.*, 2007a), des études ont aussi mis en évidence leur potentiel toxique et de perturbateurs endocriniens. En ce qui concerne leur métabolisme chez les vertébrés supérieurs, il est connu que les BFR sont sujets à de nombreuses voies métaboliques telles l'oxydation et la débromination réductive catalysées principalement par des enzymes de la famille des cytochromes (P450) au niveau du foie (revue dans Hakk et Letcher, 2003). Il a aussi été démontré que, suite à une administration orale, plusieurs FR sont accumulés au niveau du foie, parmi ceux-ci, nous retrouvons l'HBCD, le BTBPE ainsi que certains congénères des PBDE (ex.: BDE-47, -100 et -209) (Hakk *et al.*, 2006, revu dans Hakk et Letcher, 2003).

Le but de la présente étude était donc d'établir un lien entre les concentrations hépatique et plasmatique de certains FR halogénés et l'observation d'effets au niveau du tissu osseux. Le métabolisme osseux étant régulé de façon très précise par certaines hormones (ex. : parathormone, calcitonine, œstrogène, hormones thyroïdiennes) et autres molécules (ex. : vitamine D, interleukines, M-CSF), il est probable que celui-ci soit affecté *via* l'altération de certains de ces mécanismes de régulation. Par exemple, certaines substances peuvent, en se liant aux récepteurs de l'œstrogène des ostéoclastes, inhiber leur fonction et briser l'équilibre entre la minéralisation et la déminéralisation. Cela a d'ailleurs été suggéré par Lind *et al.* (2004) pour expliquer les effets observés au niveau du tissu osseux chez des femelles alligators (*Alligator mississippiensis*) exposées à des pesticides. Comme il a été démontré que certains FR sont des perturbateurs endocriniens et que des effets au niveau des os leur ont été associés en nature et en laboratoire, nous croyons que les *L. delawarensis* de l'île Deslauriers risquent de tels effets en raison de leur exposition chronique aux FR. Nous avons choisi le *L. delawarensis* comme espèce modèle en raison de sa position dans les maillons supérieurs de

la chaîne alimentaire, son type d'alimentation, les environnements urbains qu'il fréquente et son omniprésence dans l'écosystème du Fleuve Saint-Laurent. Ces caractéristiques font que le *L. delawarensis* est naturellement et chroniquement exposé à un grand nombre de contaminants organiques. Les contaminants, PBDE, retardateurs de flamme émergents et autres substances ignifuges halogénées ont été extraits des échantillons de foie (exposition à long terme) et de plasma (exposition à court terme) pour être ensuite quantifiés par GC/MS. En ce qui concerne le métabolisme osseux, son état a été évalué à l'aide de marqueurs de deux types soient des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux et des marqueurs structuraux du tissu osseux. Les marqueurs biochimiques choisis étaient : le calcium et le phosphate inorganique circulants ainsi que l'activité de la phosphatase alcaline. Le calcium et le phosphate inorganique ont été dosés puisqu'ils peuvent indiquer des anomalies au niveau de l'équilibre minéral de l'os, renseignant donc sur l'état du métabolisme osseux. La phosphatase alcaline a été choisie comme marqueur dans cette étude puisqu'elle est considérée comme bioindicatrice de l'activité des ostéoblastes. En effet, l'activité de cette enzyme, toutes isoformes confondues, est généralement associée à la formation de tissu osseux dans le cas de maladies affectant le renouvellement de ce tissu (Risteli et Risteli, 1993). Ces marqueurs ont été quantifiés par dosage colorimétrique à l'aide de trousses disponibles sur le marché. Pour ce qui est des marqueurs du tissu osseux, il s'agissait du rapport entre la quantité de tissu osseux et la quantité totale de tissu (tous tissus confondus) présent dans l'échantillon d'os (Bv/Tv) et de la densité minérale osseuse (BMD). Ces variables ont été obtenues à partir d'images acquises par microtomographie qui, suite à l'étape de reconstruction, nous ont permis d'obtenir les deux marqueurs à l'aide de logiciel d'analyse et d'estimation des paramètres osseux. Les valeurs de BMD et de Bv/Tv utilisées sont celles obtenues pour le tarsométatarse (tarse) des individus à l'étude (Figure I-1).

Le présent document se divise en deux chapitres; le premier portant sur les connaissances reliées aux contaminants à l'étude, au métabolisme osseux et aux interactions entre ceux-ci. Le deuxième chapitre porte sur les effets observés des FR halogénés sur le tissu osseux du goéland à bec cerclé.

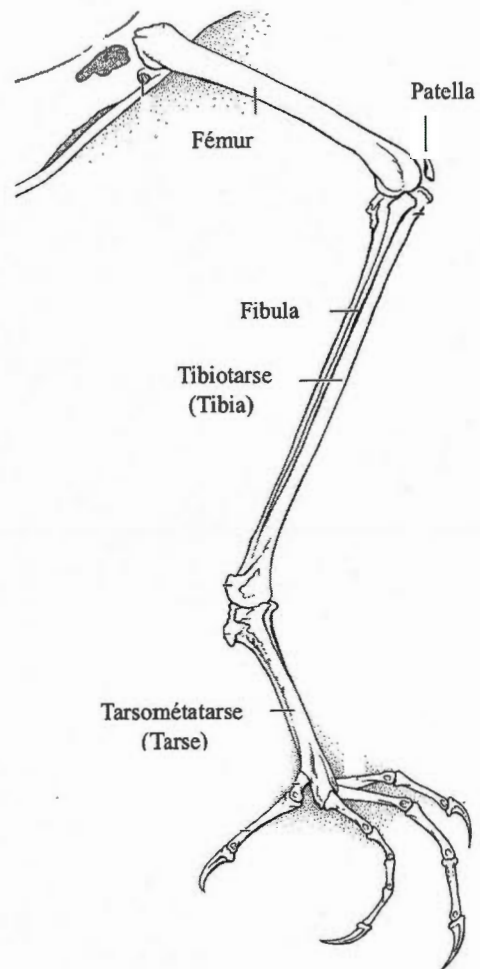


Figure 0.1 : Représentation des os de la patte d'un pigeon biset (*Columba livia*) (image modifiée, Proctor et Lynch, 1993).

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Polluants organiques persistants

Sont définis comme des POP toutes substances organiques toxiques pour la faune et l'humain, bioaccumulées, transportées sur de longues distances et persistantes dans l'environnement (Stockholm Convention Secretariat, 2008). Dans cette catégorie de polluants, nous retrouvons les BPC, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le tétra, le penta, l'hexa et l'hepta polybromodiphényléther (Stockholm Convention Secretariat, 2008). Il est aussi à noter que l'HBCD est quant à lui en voie d'être ajouté à cette liste des POP.

La toxicité de ces composés chez l'humain et la faune ayant été démontrée, c'est pourquoi il s'agit de contaminants d'intérêt (Jones et de Voogt, 1999). De nombreuses études ont aussi démontré que ces produits sont bioaccumulés dans les tissus adipeux et bioamplifiés dans les chaînes alimentaires (El-Shahawi *et al.*, 2010). Il est certain que d'autres produits ne répondant pas à tous les critères des POP ou en voie d'être déclarés comme tel se retrouvent aussi dans l'environnement. Ces polluants organiques ont parfois des structures et des propriétés physicochimiques semblables à celles de certains POP; c'est pourquoi ils sont considérés comme des polluants d'intérêt émergent. Étant potentiellement toxiques, ils reçoivent donc beaucoup d'attention de la communauté scientifique. Parmi cette classe de polluants, nous retrouvons certains nouveaux retardateurs de flamme (ex. : BEHTBP et DBDPE).

1.2 Retardateurs de flamme

Il y aurait plus de 175 types différents de FR connus (Birnbaum et Staskal, 2004); ceux-ci étant utilisés dans de nombreux biens de consommation tels les plastiques, textiles ou composantes électroniques dans le but de prévenir et ralentir la propagation des flammes. Certains de ces composés étant reconnus comme persistants dans l'environnement et bioaccumulés dans la chaîne alimentaire, il est normal qu'ils suscitent l'intérêt des toxicologues comme en témoigne l'abondante littérature disponible sur le sujet. La catégorie des FR halogénés regroupe les retardateurs de flamme bromés ainsi que d'autres molécules à base de chlore.

1.2.1 Retardateurs de flamme bromés

Les BFR sont sûrement les retardateurs de flamme les plus connus. Divisible en 5 classes, cette famille comprend les bisphénols bromés, les diphényles éthers, les cyclodécane, les phénols et les dérivés de l'acide phtalique (Birnbaum et Staskal, 2004). Ces molécules sont qualifiées d'additives ou de réactives selon qu'elles sont chimiquement liées ou simplement mélangées aux polymères les contenant. Les BFR de type additif peuvent donc s'échapper des produits les contenant tout au long de l'existence de ceux-ci et c'est ainsi qu'ils se retrouvent dans l'environnement.

1.2.1.1 Hexabromocyclododécane

Parmi les BFR, nous retrouvons l'HBCD ($C_{12}H_{18}Br_6$). Il s'agit d'un composé organique cyclique non aromatique de type additif. Il est majoritairement utilisé dans le domaine de la construction, plus précisément dans les mousses de polystyrène expansé utilisées comme isolant (Bromine Science and Environmental Forum, 2009). En ce qui concerne sa présence dans l'environnement, l'HBCD a notamment été détecté dans des poissons et des sédiments de la rivière Viskan en Suède ainsi que dans des œufs de guillemots (*Uria aalge*) de la Baltique (Sellström *et al.*, 1998 et 2003). On a aussi détecté l'HBCD dans des œufs de

goélands argentés des Grands Lacs (Gauthier *et al.*, 2007) ainsi que de faucons pèlerins de Suède (Lindberg *et al.*, 2003). Une étude conduite sur la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a démontré que l'HBCD avait trois principaux effets *in vivo* soit : l'inhibition de l'activité de l'ethoxyresofurin-O-deethylase (EROD), une enzyme utilisée comme marqueur de l'induction du cytochrome P4501A, l'augmentation de l'index somatique hépatique et parfois l'induction de l'activité d'une enzyme protégeant les cellules contre l'action du peroxyde d'hydrogène soit la catalase (Koolman et Röhm, 2003, Ronisz *et al.*, 2004). Ce produit serait bioaccumulé et bioamplifié dans la chaîne alimentaire (Morris *et al.*, 2004).

1.2.1.2 Polybromodiphényléthers

Les PBDE ($C_{12}H_{(9-0)}Br_{(1-10)}O$) sont une famille de BFR additifs contenant 209 congénères qui forment 10 groupes, mono- à déca-bromodiphényléther. Cela fait plus de 30 ans qu'ils ont été détectés dans l'environnement; la première fois dans des poissons de Suède (Andersson et Blomkvist, 1981). Largement utilisés, les PBDE sont maintenant retrouvés dans l'eau, l'air et les sédiments un peu partout sur la Terre, et ce, même dans des endroits éloignés de toutes sources tel l'Arctique Canadien (Ikonomou, Rayne et Addison, 2002). Des congénères de cette famille ont aussi été détectés chez plusieurs espèces d'oiseaux. Leur présence a en effet été recensée chez le goéland bourgmestre de Norvège (Verreault *et al.*, 2005), le goéland argenté des Grands Lacs (Norstrom *et al.*, 2002) et le faucon pèlerin de la Suède (Lindberg *et al.*, 2003).

Ces composés n'ayant que très peu d'effets lors d'une exposition à court terme aux concentrations présentes dans l'environnement (toxicité aiguë), c'est plutôt l'exposition chronique aux PBDE qui est la plus préoccupante. Les études portant sur ce sujet ont d'ailleurs démontré que les PBDE étaient des perturbateurs endocriniens (revu dans Darnerud, 2008; Meerts *et al.*, 2000; Porterfield, 2000; van der Ven *et al.*, 2008). Certains congénères et métabolites des PBDE ayant une structure semblable à celle de l'hormone thyroxine (T_4), il semble probable que ceux-ci aient un effet sur cet axe endocrinien. En effet, Fowles *et al.* (1994) et Hallgren *et al.* (2001) ont observé une diminution des niveaux de T_4

chez les individus exposés à ces contaminants, ce qui démontre que ces composés perturbent l'homéostasie thyroïdienne. Ils sont de plus associés à une perturbation de l'axe thyroïdien chez l'oiseau (revu dans McNabb, 2007). Cela serait causé par la liaison compétitive de certains PBDE avec la transthyréine, protéine de transport de la T₄, ce qui a d'ailleurs été démontré chez l'humain et deux espèces de laridés (Meerts *et al.*, 2000; Ucán-Marín *et al.*, 2009a, 2009b). Les PBDE peuvent aussi agir comme agonistes ou antagonistes des récepteurs de l'androgène, la testostérone, la progestérone et l'œstrogène (Darnerud, 2008; Hamers *et al.*, 2006; Legler et Brouwer, 2003). De plus certains congénères des PBDE, les tri- à hexa-BDE, seraient hautement bioaccumulables (McDonald, 2002).

En raison de ces nombreux effets délétères, certains PBDE ont été bannis et sont maintenant reconnus comme des POP. C'est notamment le cas des mélanges tétra-, penta-, hexa-, hepta et octa-BDE qui se retrouvent sur la liste de la convention de Stockholm, un traité international visant à restreindre et éliminer l'utilisation des substances identifiées comme POP. D'autres congénères, principalement le BDE-209, composant principal du mélange deca-BDE, sont encore largement utilisés.

1.2.2 FR émergents

1.2.2.1 bis(2-ethylhexyl)-tetrabromophthalate

Tous sont d'accord pour dire que l'interdiction d'usage de certains mélanges de PBDE est la cause de l'apparition dans l'environnement de nouvelles molécules ignifuges. Le BEHTBP (C₂₄H₃₄Br₄O₄) est un de ces nouveaux BFR additifs et entre notamment dans la composition des mélanges commerciaux Firemaster 550 et Firemaster BZ-54. Ce n'est que récemment que ce composé a été détecté dans l'environnement. Tout d'abord détecté dans la poussière de maison (Stapleton *et al.*, 2009), sa présence a ensuite été révélée dans des échantillons d'air provenant de la région des Grands Lacs (Ma, Venier et Hites, 2011). Le BEHTBP a aussi été recensé chez deux espèces de mammifères marins de la Chine (Lam *et al.*, 2009); il s'agissait de la première fois que ce composé était détecté chez des mammifères marins. En ce qui concerne sa bioaccumulation, une étude réalisée sur le méné tête de boule (*Pimephales*

promelas) suggère que le BEHTBP serait sujet à un métabolisme assez rapide, puisque cette substance n'était plus retrouvée chez les individus exposés après 14 jours (de Jourdan *et al.*, 2012). Très peu d'études sont disponibles sur les effets de cette substance sur la faune. Une étude de Ezechias, Svobodova et Cajthaml (2012) portant sur le potentiel de perturbation endocrinienne de nouveaux retardateurs de flamme n'a pas identifié d'activité androgénique ou oestrogénique du BEHTBP. De Jourdan *et al.* (2012) ont quant à eux démontré que l'exposition au Firemaster BZ-54 pourrait être la cause d'une augmentation du stress oxydatif chez les ménés tête de boule. Des études supplémentaires sont nécessaires pour bien cerner les effets de l'exposition à ce contaminant sur le système endocrinien et l'organisme.

1.2.2.2 Dechlorane plus

Le DP (formule $C_{18}H_{12}Cl_{12}$) est un retardateur de flamme chloré utilisé notamment dans la gaine des fils électriques, les ordinateurs et le domaine de la construction. Il a été introduit sur le marché pour remplacer le déchlorane et est un remplaçant probable au mélange deca-BDE (Hoh, Zhu et Hites, 2006). Utilisé depuis plus de 40 ans, ce n'est que dernièrement qu'il a été détecté dans l'environnement dans la région des Grands Lacs. C'est en effet Ho, Zhu et Hites (2006) qui, les premiers, ont détecté les deux isomères (*syn*- et *anti*-) du DP dans l'air, les sédiments et les poissons des Grands Lacs. De plus, la présence du DP a aussi été recensée dans les chaînes alimentaires des lacs Ontario et Winnipeg (Tomy *et al.*, 2007b) et du sud de la Chine (Wu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Ce composé a récemment été détecté chez des oiseaux nichant sur une île du Fleuve Saint-Laurent dans la grande région de Montréal (Gentes *et al.*, 2012). Les différentes conclusions des études portant sur cet ignifuge nous portent à croire que sa bioaccumulation est grandement liée à l'espèce exposée ainsi qu'aux particularités de la chaîne trophique (Wu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). En ce qui concerne sa toxicité, peu d'études sont disponibles sur le sujet. Une étude de Brock *et al.* (2010) faite sur le rat (*Rattus sp.*) n'a pas permis de révéler d'effets systémiques délétères ni de pathologies associés à la toxicité après une exposition orale de 28 jours. Cette même étude n'a pas non plus observé d'effets du DP sur la reproduction des individus exposés. Cela en soi n'est évidemment pas suffisant pour conclure qu'il est sans danger pour les espèces exposées, puisque les paramètres mesurés dans cette étude sont limités. Cette substance

pourrait donc avoir d'autres effets sur les organismes exposés que ceux que permettait d'observer cette étude.

1.3. Os

Les os sont des structures calcifiées formant le squelette des vertébrés. Ce dernier remplit trois fonctions : la locomotion, la régulation de l'homéostasie calcique et la protection des organes internes (Aarden, Burger et Nijweide, 1994). Le tissu osseux est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire qui est quant à elle formée de fibres collagènes et d'une substance de base (Nordin et Frankel, 2001). Celle-ci est produite par les cellules et contient des polysaccharides ou des glycosaminoglycans sous forme de macromolécules appelées protéoglycans (Nordin et Frankel, 2001). En ce qui concerne la portion inorganique de l'os, celle-ci contient essentiellement les minéraux composant l'os (calcium et phosphate). Ceux-ci sont arrangés en cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), représentent entre 60 et 70 % du poids sec de l'os et confèrent à ce dernier sa solidité (Nordin et Frankel, 2001). Le tissu osseux comprend aussi une composante organique regroupant différentes cellules et protéines (Nordin et Frankel, 2001).

Deux types de tissus osseux sont identifiables chez l'adulte, soient l'os cortical et l'os trabéculaire. Ce dernier est retrouvé, chez les individus d'âge adulte, au niveau des vertèbres et dans les extrémités des os (Marie, 1982). Il est formé de trabécules disposées à la manière d'un filet et dont les interstices sont remplis de moelle rouge (Nordin et Frankel, 2001). Les trabécules sont orientées suivant les forces mécaniques imposées à l'os (Marie, 1982). L'os cortical (ou compact) composerait 80% du squelette et c'est lui qui forme la couche extérieure de l'os, son cortex (Marie, 1982; Nordin et Frankel, 2001). La proportion entre ces deux types de tissu n'est pas constante dans le squelette puisqu'elle varie selon les os et à l'intérieur même de l'os (Nordin et Frankel, 2001). Bien que ces deux types de tissu soient impliqués dans la résistance mécanique de l'os, il est reconnu que l'os trabéculaire est métaboliquement plus actif. En effet, le taux de renouvellement de l'os trabéculaire est plus élevé que celui de l'os cortical qui est de 2 à 3% par année, un taux supérieur à ce que nécessite l'entretien et le maintien de la force mécanique de l'os. Cela signifie donc que l'os

trabéculaire est donc plus important que l'os cortical dans le maintien de l'homéostasie minérale (revu dans Clarke, 2008).

1.3.1 Structure microscopique

Quatre principaux types cellulaires sont retrouvés dans le tissu osseux, soient les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoclastes, les ostéocytes et les ostéoblastes. D'origine hématopoïétique, les ostéoclastes proviennent de la lignée des monocytes-macrophages et contiennent plusieurs noyaux (Roodman, 1999). En plus d'être multinucléées, ces cellules ont d'autres particularités dont l'expression de la phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) et la présence de récepteurs à la calcitonine (Teitelbaum et Ross, 2003). Lorsque celle-ci se lie à son récepteur, elle diminue l'activité des ostéoclastes (revu dans Boyle, Simonet et Lacey, 2003). Leur rôle au sein du métabolisme osseux est la résorption de la matrice osseuse. Provenant de cellules mésenchymales pluripotentes se différenciant sous l'effet du facteur de transcription RUNX2, les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes d'un diamètre de 20 à 50 μm ne contenant qu'un seul noyau (Marie, 1982; Franceschi *et al*, 2003; Raggatt et Partridge, 2010). Le rôle des ostéoblastes étant la formation de l'os, leur cytoplasme renferme des granules contenant le matériel nécessaire à la création de la matrice osseuse (Marie, 1982). Les ostéoblastes ont des récepteurs à la parathormone (PTH), une hormone impliquée dans le maintien de l'homéostasie calcique. Ces cellules ont aussi une activité phosphatase alcaline importante, ce qui fait que celle-ci peut être utilisée comme marqueur biochimique de leur activité et donc du métabolisme osseux (Christenson, 1997). Les ostéocytes sont en fait des ostéoblastes trappés dans la matrice osseuse lors de la minéralisation (Marie, 1982). Ces cellules représentent presque l'entièreté (90-95%) des cellules présentes dans le tissu osseux (Bonewald, 2007). Les ostéocytes les plus jeunes ont une morphologie ressemblant à celle des ostéoblastes et en vieillissant ils acquièrent une forme ovoïde et sont de plus petite taille (Marie, 1982). Bien que leur rôle dans l'os soit nébuleux, ces cellules seraient impliquées dans le maintien de la concentration plasmatique de calcium *via* la réponse à la PTH en plus de jouer un rôle dans l'initiation du procédé de remodelage lors d'un bris de l'os (Marie, 1982; revu dans Hadjidakis et Androulakis, 2006).

1.3.2 Résumé du remodelage

Le remodelage est responsable du maintien de l'intégrité du squelette chez les vertébrés adultes en plus d'assurer l'homéostasie minérale (Raggatt et Partridge, 2010). Il s'agit d'un procédé s'étalant sur plusieurs semaines réalisé par des unités de résorption et de formation, sites appelés unités multicellulaires de base (BMU). Les premières cellules à se retrouver à l'intérieur de celles-ci sont les ostéoclastes qui seront ensuite remplacés par les ostéoblastes, et ce, en suivant les 5 étapes du remodelage (phase d'activation, de résorption, d'inversion, de formation et finale) (Raggatt et Partridge, 2010).

Phase d'activation Il s'agit de la première phase du procédé de remodelage qui consiste en l'initiation et la détection des signaux d'activation et la formation d'ostéoclastes (Raggatt et Partridge, 2010). Deux signaux sont connus pour induire la formation d'ostéoclastes : la diminution du niveau de « transforming-growth factor β » (TGF- β) et la PTH. Les ostéocytes sains sécrètent du TGF- β , cytokine inhibant l'ostéoclastogénèse. Suivant une lésion ou un choc, des ostéocytes sont détruits par apoptose, ce qui cause une diminution de la sécrétion de TGF- β , supprimant ainsi l'inhibition de l'ostéoclastogénèse. Il y a donc formation d'ostéoclastes (Heino, Hentunen et Väänänen, 2002). En ce qui concerne la PTH, il s'agit d'une hormone sécrétée par les glandes parathyroïdes qui contribue à l'homéostasie minérale et lorsqu'elle se lie à son récepteur à la surface des précurseurs des ostéoblastes, elle permet l'activation de signaux qui stimulent la production de molécules recrutant les préostéoclastes et induisant leur différenciation (Guyton et Hall, 2006; Swarthout *et al.*, 2002). Parmi celles-ci, la cytokine « factor- κ B ligand » (RANKL) est exprimée à la surface des cellules préostéoblastiques et se lie au récepteur « receptor activator of nuclear factor- κ B » (RANK) retrouvé à la surface des précurseurs des ostéoclastes (Hadjidakis et Androulakis, 2006). Cela a pour effet de promouvoir la prolifération des précurseurs des ostéoclastes, encourager leur différenciation, augmenter leur activité de résorption et prolonger leur durée de vie (Raggatt et Partridge, 2010). L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur de type soluble membre de la famille des récepteurs « tumor necrosis factor » qui se lie à RANKL et l'empêche de se lier à RANK, ce qui empêche la stimulation de l'ostéoclastogénèse (Raggatt et Partridge, 2010; Wada *et al.*, 2006). Tout porte donc à croire que le ratio d'expression RANKL/OPG est

responsable du degré d'activation et de différenciation des ostéoclastes (Raggatt et Partridge, 2010).

Phase de résorption Une fois activés, les ostéoclastes s'attachent à la surface osseuse et s'en suit un transport de vésicules sécrétrices. Celles-ci contiennent de l'acide chlorhydrique et des protéases qui dissolvent les matrices inorganique et organique respectivement (Väänänen *et al.*, 2000).

Phase d'inversion Suite à la phase de résorption, des cellules mononucléées de lignée inconnue et appelées « reversal cells » apparaissent à la surface de l'os le préparant ainsi à la déposition de matrice en enlevant les résidus de collagène qui pourraient être présents au niveau de la BMU (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Raggatt et Partridge, 2010).

Phase de formation Une fois la phase d'inversion terminée, la formation de la matrice débute. On croit que les ostéoclastes seraient responsables de la production du signal permettant la transition entre inversion et formation (Martin et Sims, 2005). Le signal inhibant la formation osseuse étant levé, le facteur de transcription RUNX2 permet la différenciation des précurseurs des ostéoblastes présents dans la BMU (Franceschi *et al.*, 2003). Suite à la différenciation des ostéoblastes, la production des protéines et la minéralisation débutent.

Phase finale Le remodelage se termine lorsque des quantités égales de matrice ont été dissoutes et produites. La nature du ou des signaux menant à l'arrêt de la production de protéines et de la minéralisation reste encore inconnue (Raggatt et Partridge, 2010).

1.3.3 Homéostasie minérale

L'équilibre minéral de l'oiseau, tout comme celui des autres vertébrés, est régi par différentes hormones et molécules, dont la vitamine D, la parathormone et la calcitonine (CT). La vitamine D, plus précisément sa forme active la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, est synthétisée au niveau de la peau et du rein (Guyton et Hall, 2006). Celle-ci agit comme une hormone lors de la diminution de la concentration plasmatique de calcium. Son principal rôle est d'augmenter l'absorption intestinale de calcium et de phosphate, notamment *via* l'augmentation de la synthèse des protéines responsables du transport du calcium au niveau de l'épithélium intestinal (Guyton et Hall, 2006; Dacke, 2000). La vitamine D pourrait donc avoir un effet sur le taux de minéralisation osseuse par son rôle dans le transport des ions calcium. Elle agit aussi indirectement au niveau de l'os puisque son absence entraîne une diminution ou même une annulation de l'effet de la PTH qui elle agit sur la résorption osseuse (Guyton et Hall, 2006). La PTH, répond à une diminution de la concentration plasmatique d'ions calcium et cible directement le tissu osseux (Dacke, 2000). Cette hormone agit à court et à long terme. Son action à court terme promeut l'ostéolyse, soit le prélèvement de calcium à proximité 1) des ostéocytes à l'intérieur de l'os et 2) des ostéoblastes à la surface de l'os. Il a en effet été démontré que ces deux types cellulaires forment une sorte de système de cellules interconnectées appelé membrane ostéocytaire, membrane qui sépare l'os du liquide extracellulaire (Guyton et Hall, 2006). Des expériences ont suggéré que cette membrane pompe le calcium contenu dans le liquide situé entre celle-ci et l'os vers le liquide extracellulaire. Lorsque la membrane est fortement activée, par exemple par la PTH, le calcium de l'os est dissout et relâché dans la circulation sanguine (Guyton et Hall, 2006). À long terme, elle agit sur les ostéoclastes en deux temps : premièrement, les ostéoclastes déjà formés sont activés et deuxièmement, de nouveaux ostéoclastes sont formés. Puisque ces derniers n'ont pas de récepteur à la PTH, il est suggéré que les ostéoblastes seraient responsables de la production d'un signal secondaire activant les ostéoclastes (Guyton et Hall, 2006). La CT, hormone sécrétée en réponse à une augmentation du niveau circulant de calcium, a pour effet de diminuer la concentration plasmatique de calcium (Guyton et Hall, 2006). Cette hormone agit au niveau du rein et des cellules osseuses. Son action sur le rein se fait *via* la diminution de la réabsorption tubulaire de calcium, ce qui augmente son excrétion

et donc contribue à diminuer la concentration de ce minéral (Guyton et Hall, 2006). Elle est aussi responsable de la diminution de l'activité ostéoclastique, de l'ostéolyse et de la formation de nouveaux ostéoclastes (Guyton et Hall, 2006).

1.4 Os et polluants organiques

Tel qu'abordé plus tôt, le tissu osseux et le métabolisme osseux sont des cibles potentielles pour les polluants, ce qui peut entraîner des problèmes au niveau de la structure du tissu ou de la régulation du métabolisme et même des maladies (McGowan, 1996). Il est aussi connu que certaines substances organiques peuvent avoir des effets sur l'os, dont plusieurs contaminants retrouvés dans l'environnement. Les animaux fréquentant des écosystèmes contaminés sont donc chroniquement exposés à ces toxiques et c'est pourquoi il est possible de trouver plusieurs études portant sur le tissu osseux et l'exposition aux contaminants organiques.

Des études *in vivo* ont d'ailleurs permis de démontrer des effets notamment au niveau de la composition, de la force mécanique et de la densité minérale de l'os. Parmi celles-ci, une étude sur le rat a démontré que l'exposition au congénère 126 des BPC pouvait altérer le processus de minéralisation osseuse des vertèbres (Alvarez-Lloret *et al.*, 2009). Une autre étude sur le rat a mis de l'avant que l'exposition au 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) interférait avec la croissance osseuse et le remodelage en plus d'affecter la force mécanique de l'os (Jämsä *et al.*, 2001). Toujours chez le rat, Lind *et al.* (2009a) ont démontré une atteinte du tissu osseux *via* une augmentation de la résorption osseuse et une diminution de la formation osseuse chez des individus exposés au TCDD. Chez la chèvre (*Capra hircus*), une exposition au BPC-123 a été associée avec une diminution de certaines variables osseuses des métacarpes en plus d'être associée avec une augmentation de la BMD trabéculaire au niveau de la métaphyse (Lundberg *et al.*, 2006). Lind *et al.* (2009b) ont démontré que l'exposition à des boues d'épuration pouvait être reliée avec une altération de l'homéostasie du tissu osseux du fémur chez le mouton (*Ovis aries*). Finalement, une étude sur la grenouille rousse (*Rana temporaria*) a mis de l'avant que le tissu osseux des

grenouilles mâles exposées au *p-p'*-DDE présentait une diminution de la BMD corticale de la diaphyse du fémur (Lundberg *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les animaux sauvages, Lind *et al.* (2003) ont démontré la relation entre la présence dans l'environnement de certains contaminants organiques, notamment les BPC, et des variations des BMD trabéculaire et corticale du radius chez le phoque gris (*Halichoerus grypus*). L'étude conclut en avançant que, même si le mécanisme ayant causé ces effets n'est pas établi, les polluants organiques sont probablement impliqués dans celui-ci. Une étude semblable menée avec des crânes d'ours polaires (*Ursus maritimus*) a elle aussi démontré que l'exposition des individus aux organochlorés était en lien avec la présence de certaines altérations du tissu osseux (Sonne *et al.*, 2004). L'altération de certaines variables osseuses chez la loutre (*Lutra lutra*) a aussi été mise en relation avec les charges de BPC des individus à l'étude (Roos, Rigét et Örberg, 2010). Lind *et al.* (2004) ont de plus mis en évidence des modifications de certaines variables osseuses, notamment une augmentation des BMD trabéculaire et totale, de femelles alligators chroniquement exposées à des pesticides dans leur milieu naturel. En ce qui concerne les oiseaux, une étude de Fox *et al.* (2008) portant sur le goéland argenté qui visait à observer la relation entre la santé des individus et leur lieu de nidification a aussi observé des différences au niveau des variables osseuses, dont la BMD, entre les individus nichant dans les zones contaminées et ceux nichant dans les colonies de références.

1.4.1 Mécanismes d'action proposés

Nous n'avons recensé que peu d'études portant sur les mécanismes d'action sous-jacents aux diverses anomalies et altérations des variables et structures osseuses. Routti *et al.* (2008) ont démontré une relation entre les concentrations circulantes de 1,25-dihydroxy vitamine D₃, d'hormones thyroïdiennes, de calcium et de phosphate et la concentration hépatique de BPC et de DDT. L'hypothèse concernant les effets sur l'os qui y est présentée propose que l'exposition chronique aux contaminants cause l'augmentation des niveaux circulants d'hormones thyroïdiennes; augmentant ainsi la résorption, ce qui hausse les niveaux circulants de calcium. De ces hauts niveaux de calcium découlerait une inhibition de la

sécrétion de PTH, ce qui diminue la production de 1,25-dihydroxy vitamine D₃. Des niveaux altérés de 1,25-dihydroxy vitamine D₃ pouvant, tout comme les hormones thyroïdiennes, déranger l'équilibre entre minéralisation et résorption osseuse (Routti *et al.*, 2008). Les effets observés sur le tissu osseux dus à l'exposition aux contaminants organiques seraient donc reliés aux taux circulants de ces molécules. Lind *et al.* (2004) proposent quant à eux un autre mécanisme d'action. Selon cette étude, les effets sur le tissu osseux des alligators étudiés pourraient résulter du potentiel oestrogénique des contaminants auxquels ils étaient exposés. Ceux-ci pouvant se lier aux récepteurs de l'œstrogène à la surface des ostéoclastes, ils peuvent par le fait même inhiber l'activité ostéoclastique, comme le ferait une augmentation du niveau circulant d'œstrogène (Lind *et al.*, 2004).

Les effets au niveau de l'os peuvent donc être dits directs ou indirects selon qu'ils s'attaquent directement à l'os ou aux cellules de l'os ou qu'ils altèrent les taux d'hormones, de vitamine D, de calcium ou de phosphate plasmatiques.

1.5. But et objectifs de l'étude

Comme exposé dans la section précédente, les polluants sélectionnés pour cette étude sont des produits répandus à l'échelle planétaire, signifiant ainsi qu'ils sont retrouvés dans tous les écosystèmes, aquatiques ou terrestres. Leur présence a de plus été démontrée dans l'écosystème du Fleuve Saint-Laurent et des Grands Lacs. Aussi, certains des polluants à l'étude sont associés à l'altération du métabolisme osseux ou des fonctions endocriniennes (principalement l'axe thyroïdien) impliquées dans le métabolisme osseux chez certaines espèces, dont les oiseaux. Nous pensons donc qu'il est légitime de croire que ceux-ci pourraient avoir des effets sur le tissu osseux des *L. delawarensis* de l'île Deslauriers. La présence de différentes associations entre les variables sélectionnées associées au tissu osseux et les niveaux hépatique et plasmatique des contaminants à l'étude pourraient indiquer ou non une altération du métabolisme osseux pouvant résulter de l'exposition aux FR.

Ce projet avait donc pour but global d'étudier la relation entre la présence des divers polluants sélectionnés chez les *L. delawarensis* de l'île Deslauriers et une variation de certaines variables osseuses; ce qui indiquerait une altération du métabolisme osseux. De plus, ce projet contribue à enrichir la littérature disponible sur les effets des FR sur les oiseaux, principalement au niveau de leur tissu osseux. Nous tenons à rappeler que l'espèce choisie est dite bio-indicatrice de son écosystème et donc, les conclusions pourraient être étendues à d'autres espèces aviaires résidant dans celui-ci. Bien que sa conception soit de type écotoxicologique et que certains facteurs confondants soient présents (ex. : la présence d'autres contaminants que ceux quantifiés ou l'absence de population de référence), cette étude pourra mener à des études plus ciblées qui pourront éventuellement cerner certains mécanismes de toxicité. La question à laquelle nous avons tenté de répondre est donc : les contaminants organiques de type FR ont-ils un effet sur le métabolisme osseux d'une espèce y étant chroniquement exposée en milieu naturel ?

CHAPITRE II

IS BONE TISSUE A TARGET FOR HALOGENATED FLAME RETARDANTS IN RING-
BILLED GULLS BREEDING IN A POLLUTION HOT SPOT IN THE SAINT-
LAWRENCE RIVER, CANADA?

Stéphanie Pellerin Plourde ¹, Robert Moreau ² and Jonathan Verreault ^{1*}

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

² Laboratoire du métabolisme osseux, Centre de recherche BIOMED, Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, CANADA

Article à être soumis

2.1 Abstract

Bone metabolism is a tightly regulated process that ensures bone strength and repair in addition to maintaining calcium and phosphate plasmatic concentrations. It has been shown that certain organohalogen compounds (OHs) may interfere with bone metabolism and structure in vertebrates, although studies have nearly entirely focused on mammalian species. The objective of the present study was to investigate the associations between markers of bone metabolism and concentrations (plasma and liver) of selected halogenated flame retardants (FRs) in adult male ring-billed gulls (*Larus delawarensis*) nesting in a known FR-contaminated area in the St-Lawrence River (Quebec, Canada). Bone (tarsus) metabolism markers including plasmatic calcium and inorganic phosphate levels and alkaline phosphatase activity were investigated along with bone tissue integrity (percentage of bone tissue comprised in the bone sample (Bv/Tv) and bone mineral density (BMD)). BMD and Bv/Tv of the tarsus tended to be positively associated with circulating calcium levels in male ring-billed gulls. Moreover, concentrations of FRs in liver (e.g., BDE-154, -183, -201, -209) and plasma (BDE-209) were negatively correlated with trabecular or cortical BMD in the tarsus of these birds. These results may suggest a loss of mineral bone tissue associated with FR exposure in those individuals. Present findings provide some evidence that bone (tarsus) metabolism and integrity may be impacted in high FR-exposed (mainly PBDEs) ring-billed gulls breeding in the highly urbanized Montreal area.

Keywords: Halogenated flame retardants; PBDEs; bone mineral density; calcium; phosphate; gull

2.2 Introduction

Halogenated flame retardants (FRs) have been and are still widely used in consumer and industrial products to prevent the spreading of fire. Production volumes of polybrominated diphenyl ether (PBDE) additives have been among the highest during the last three decades, and a number of PBDE congeners are now commonly found in ecosystems globally, including the remote areas such as the Arctic (Covaci *et al.*, 2011; de Wit, 2010). Growing environmental concern has led to the worldwide ban of two PBDE mixtures, Penta- and Octa-BDE, starting in Europe (2004) and then the US and Canada (2008) (European Parliament, 2003; UNEP, 2010). Moreover, Deca-BDE (composed of >97% of BDE-209), the last commercial PBDE mixture still in use today, is scheduled to be phased out (production and use) in the US and Canada by the end of 2013 (Environment Canada, 2011; USEPA, 2009). As a consequence of the strict fire safety legislation requirements, the ban of PBDE mixtures has resulted in the increased usage of alternative FR products. Some of them have been on the market for some time (e.g., Dechlorane-Plus (DP)), while others are considered as novel or emerging FRs (e.g., Bis-(2-ethylhexyl)-tetrabromophthalate (BEHTBP), 1,2-Bis(2,4,6-tribromohenoxy)ethane (BTBPE) and 1,2-dibromo-4-(1,2-dibromoethyl)-cyclohexane (TBECH)) (Betts, 2008). A number of these PBDEs replacement FRs are now increasingly being detected in the environment and wildlife samples. These include BEHTBP (Lam *et al.*, 2009), BTBPE (Hoh *et al.*, 2005), *syn*- and *anti*-DP isomers (Sverko *et al.*, 2011) and TBECH (Covaci *et al.*, 2011; Gentes *et al.*, 2012). An increasing number of studies have also reported on the presence of a large suite of PBDE congeners (mainly) and other established and emerging FRs in bird species from around the globe. For example, PBDEs, polybrominated biphenyls (PBBs), tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD) have been detected in eggs or tissues of several avian species (Chen and Hale, 2010; Covaci *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2003; Morris, 2004). Novel and emerging FRs, mainly BTBPE, decabromodiphenyl ethane (DBDPE) and occasionally DP isomers, were also detected in eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes (Chen *et al.*, 2012; Gauthier *et al.*, 2008), eggs of Norwegian Arctic glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) (Verreault *et al.*, 2007), muscles of birds from China (Luo *et al.*, 2008) and eggs of peregrine falcons (*Falco peregrinus*) from Canada and Norway

(Guerra *et al.*, 2011). More recently, a study conducted in the Montreal area reported a large suite and occasionally high concentrations of PBDE congeners, including BDE-209, as well as current-use BEHTBP and *anti*- and *syn*-DP in the liver of ring-billed gulls (RBGUs) (*Larus delawarensis*) nesting on an island in the St-Lawrence River (Quebec, Canada) (Gentes *et al.*, 2012). In this study, the contribution of BDE-209 represented 26% of the Σ PBDEs in the liver and surpassed that of BDE-47 and -99, which generally represent the most abundant congeners in fish-eating birds such as Larids (gulls). Based on these results, Gentes *et al.* (2012) suggested that the feeding ecology of urban-breeding RBGUs, characterized by high intake of anthropogenic food sources, has led to high exposure to currently used FRs (e.g., BDE-209, BEHTBP and DP) in sites where these food items commonly are found (e.g., city center, wastewater treatment plant basins, landfills, etc.).

The high tissue levels of FRs, and especially PBDEs, in RBGUs can potentially elicit adverse health effects, some of them that have previously been described in FR-exposed birds. Examples of effects reported in birds exposed to FRs (mainly PBDEs) include delayed egg laying, egg shell thinning and altered thyroid hormone (TH) levels (Ferne *et al.*, 2005, 2009; Verreault *et al.*, 2007), as well as small egg volume (Van den Steen *et al.*, 2009). However, despite that a few studies have addressed the endocrine disruptive properties of PBDEs, no study has investigated bone metabolism in birds exposed to these chemicals. In fact, bone metabolism is a process tightly regulated by several hormones (mainly parathormone, calcitonine, THs and estrogen), vitamins and other signals (M-CSF and interleukines) (Duncan Bassett and Williams, 2003; Franceschi *et al.*, 2003; Guyton and Hall, 2006; Horowitz, 1993; Roodman, 1999), which may be targets for PBDEs and other FRs in naturally-exposed birds. A number of *in vivo* studies have investigated the impact of polychlorinated biphenyls (PCB), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), dioxins and PBDEs dosage on bone tissue and its metabolism in a few mammalian and amphibian species. For example, effects of PCBs and dioxins on bone tissue have been observed in rats (Alvarez-Lloret *et al.*, 2009; Jämsä *et al.*, 2001; Lind *et al.*, 2009a), compounds present in sewage sludge (PCBs, PBDEs, alkyl phenols, phthalates, etc.) in sheep (*Ovis aries*) (Lind *et al.*, 2009b), PCB congeners in goats (*Capra hircus*) (Lundberg *et al.*, 2006), and *p,p'*-DDE in common frogs (*Rana temporaria*) (Lundberg *et al.*, 2007). The major observed chemically-

induced effects on bone included altered bone composition, mechanical strength and bone mineral density (BMD). Corroborative effects on bone metabolism have also been reported in studies of OH-exposed free-ranging animals. More specifically, investigations on grey seals (*Halichoerus grypus*) (Lind *et al.*, 2003), otters (*Lutra lutra*) (Roos, Rigét and Örberg, 2010), polar bears (*Ursus maritimus*) (Sonne *et al.*, 2004), herring gulls (Fox *et al.*, 2008) and alligators (*Alligator mississippiensis*) (Lind *et al.*, 2004) naturally exposed to OHs (PCBs, PBDEs, dioxins and organochlorine pesticides) have reported effects on the bone tissue, mainly increased or reduced BMD. To our knowledge, exceedingly few studies have investigated the effects of PBDEs exposure on bone tissue in wildlife (Sonne *et al.*, 2004, 2006), and none in birds or involving emerging non-PBDE FRs of recent environmental concern.

The aim of this study was to investigate the associations between concentrations of major PBDEs and novel FRs with selected bone structure parameters and biochemical markers of bone metabolism in RBGUs breeding in a highly FR-contaminated region near Montreal (QC, Canada). Because PBDEs and a number of other OHs were demonstrated to exhibit endocrine disruptive (mainly thyroid axis) properties in birds (Darnerud, 2008 ; McNabb, 2007), and because bone metabolism may be affected by THs and other hormones (reviewed in Duncan Bassett and Williams, 2003; Christenson, 1997), we hypothesized that the highly FR-exposed RBGUs breeding on Deslauriers Island exhibit altered bone metabolism.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Sample collection

Sampling of RBGUs (21 males and 6 females) was conducted between April 15th and June 1st, 2010 on Deslauriers Island in the St-Lawrence River, east of Montreal (QC, Canada). This period corresponds to the incubation period of RBGUs. At the beginning of field season, 50 nests with one egg were randomly selected within the different sections of the island, and identified with a unique number. Once the nests had complete clutches (i.e., three eggs), one of the partner was randomly live-captured using a nest trap that was triggered from a distance by a radio transmitter. A 5-6 mL sample of blood was collected from the brachial vein of the wing using heparinized 10 mL syringe, and immediately transferred into an amber 10 mL centrifuge tube for storage in a cool-box while in the field. The birds were then euthanized by cervical dislocation for tissue collection. The liver (right lobe) and complete left and right leg bones (femur, tibiotarsus and tarsometatarsus; referred to along the text as femur, tibia and tarsus, respectively) were retrieved and cleaned (all flesh was removed), and stored in a cool-box. In the laboratory (within 10 hrs of sample collection), blood samples were centrifuged (7 min; 2500 x g) and the plasma was stored at -20°C for further analyses (sections 2.3.2 and 2.3.3). The liver samples were also transferred to a -20°C freezer until chemical analyses (section 2.3.2). Capture and handling methods were approved by the Université du Québec à Montréal's Committee on Animal Care (CIPA), and comply with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines.

2.3.2 Chemical analyses

Sample extraction and cleanup procedures as well as instrument analysis for the determination of a suite of FRs (e.g., 47 PBDE congeners and 23 emerging FRs) in present RBGU liver and plasma samples can be found in Gentes *et al.* (2012). Analytes determination was performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single

quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5890, Palo Alto, U.S.A.) operated in the electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI). The quantification of analytes was performed using selected ion monitoring (SIM). Quality control and assurance procedures included method blanks and injection of standard reference materials for each batch of 10 samples as detailed by Gentes *et al.* (2012). Because negligible background contamination of method blanks occurred, no blank correction was performed, except for BDE-209 for which concentrations were blank-corrected in liver samples only (mean blank concentration was 1.76 ± 0.48 ng/g ww). Method limits of quantification (MLOQ) and detection (MLOD) can also be found in Gentes *et al.* (2012).

2.3.3 Biochemical markers of bone metabolism

Plasma levels of calcium (Ca^{2+} , referred to as calcium hereafter) and inorganic phosphate (PO_4^- , referred to as phosphate hereafter), as well as alkaline phosphatase activity were analyzed in RBGUs (in duplicates) using commercially available kits (QuantiChrom Assay Kit, BioAssay Systems, Hayward, USA). Absorbance for the three assays was measured using a Infinite M1000 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.3.4 Bone structure evaluation

For the purpose of this study, only the tarsus structure of RBGUs was analyzed. This bone was selected as its position in the bird's skeleton makes it more exposed to mechanical loads (stretching and compression), thus enhancing its remodeling activity and susceptibility to bone metabolism deregulation (by environmental contaminants). Moreover, both the trabecular and cortical regions of the tarsus were scanned as these bone sections are known to have different metabolic rates (reviewed by Clarke, 2008). For the trabecular section, the region of interest (ROI) was selected on the basis of a visual reference. The ROI started when the proximal head of the bone was completely formed and ended 400 slices (6 mm) later. For the cortical section, ROIs that all had the same visual appearance were selected. Non-broken 100 slices (1.5mm) ROIs with homogenous appearance were selected. The tarsi were scanned

using a Skyscan 1172 microtomograph (Skyscan, Aartselaar, Belgium) with a configuration of 70 kV, 0.5 mm Al filter and 15 μm resolution. Once introduced in a plastic tube mounted in the microtomograph scanning chamber, the bone would describe a 180° rotation while x-ray pictures were taken at every 0.5°. These pictures were used to reconstruct images of the bones using the NRecon software (Skyscan, Aartselaar, Belgium). All cortical bone samples were reconstructed and analyzed using the same parameters as with the trabecular bones. The reconstruction images were analyzed using the CTAn software (Skyscan, Aartselaar, Belgium) and the ratio of bone volume comprised in the bone sample (%) (Bv/Tv) was obtained. Using the same software, the BMD was computed using calibration rods purchased from Skyscan (Aartselaar, Belgium) and following the manufacturer's instructions.

2.3.5 Data treatment

Individual PBDE congeners and FR compounds included in statistical analyses were selected only if they were detected in at least 65% of the plasma or liver samples. As a result, 19 PBDE congeners (BDE-47, -85, -99, -100, -138, -153, -154, -170, -179, -180, -183, -196, -197, -201, -202, -203, -207, -208 and -209), HBCD, BEHTBP, and DP (*syn* and *anti* isomers) were used in the different models for liver, while in plasma 8 PBDE congeners (BDE-47, -99, -100, -153, -154, -197, -207, and -209) were selected (Table 1). However, in samples for which concentration of a given compound/congener was below the detection limits, missing values were replaced with randomly-generated values such that concentrations below the MLOD were replaced with values between 0 and MLOD, while concentrations below the MLOQ were replaced by random values between the MLOD and MLOQ.

All bones were sampled during the incubation period of RBGUs, that is, between 11 and 22 days after onset of egg laying. Because it is well known that the female skeleton undergoes modifications (mainly demineralization) to allow egg production, males and females were analyzed separately to avoid bias in the interpretations. Nevertheless, because the number of females was very low ($n=6$), statistical comparisons between males and females could not be performed, and thus females were not used further. The effect of body size and body mass was tested on PBDE/FR concentrations, bone structure and metabolism markers. To do so,

individual morphometric measurements (head, bill and tarsus length) and body mass were tested for possible associations with PBDE/FR concentrations and bone parameters using Pearson's correlations. Data distribution was tested for normality using Shapiro-Wilk's test and homogeneity was assessed using studentized residuals. When necessary, data were \log_{10} -transformed to achieve normality. Relationships were considered to be significant when $p \leq 0.05$, and were considered as trends when $0.05 < p \leq 0.1$.

2.4 Results

2.4.1 FRs concentrations in liver and plasma

Among the 47 screened PBDE congeners in male RBGUs, 19 and 8 congeners were detected in at least 65% of liver and plasma samples, respectively (Table 2.1). The four most abundant congeners in liver were BDE-209 > -99 > -47 > -153, and their combined concentrations represented 70% of Σ PBDE in that tissue, while in plasma, these same congeners accounted for 82% of Σ PBDE. BDE-209 alone accounted for 25% of Σ PBDE burden in RBGU liver; which uniquely surpassed the contributions of BDE-47 and -99 (16% and 20%, respectively). In plasma samples, these three congeners had more similar contributions to Σ PBDE (26%, 26%, and 23% for BDE-47, -99 and -209, respectively). A few other non-PBDE FRs (BEHTBP, *syn*- and *anti*-DP and HBCD) were also detected in most of the liver samples, although at lower concentrations, whereas these were all under detection limits in RBGU plasma. For both liver and plasma, levels of individual PBDE congeners were inter-correlated ($0.42 \leq r \leq 0.8$; $0.0001 \leq p \leq 0.05$ and $0.47 \leq r \leq 0.97$; $0.0001 \leq p \leq 0.04$, for liver and plasma, respectively), with some exceptions (BDE-170 in liver, and BDE-197 and -207 in plasma). Furthermore, concentrations of the 8 commonly quantified PBDEs as well as Σ PBDEs in plasma and liver were significantly correlated with each other ($0.96 \leq r \leq 0.61$; $0.006 \leq p \leq 0.0001$). A more comprehensive description of PBDE and other FR patterns and concentrations in liver and plasma samples of present RBGUs can be found in (Gentes *et al.*, 2012).

2.4.2 Biochemical markers of bone metabolism

The mean calcium level in male RBGUs was 10.11 ± 0.21 mg/dl, with a range of 8.66-11.77 mg/dl. Circulating inorganic phosphate levels varied between 0.83 and 6.37 mg/dl with a mean of 3.41 ± 0.41 mg/dl. Based on the distribution of this specific marker, one extreme value had to be removed as it was identified as an outlier using the box plot and the

interquartile range. There was no significant relationship between calcium and phosphate levels ($p = 0.27$) in male plasma. Mean alkaline phosphatase activity was 69.4 ± 8.4 UI and ranged between 26.7 and 155.9 U.I. There was no correlation between alkaline phosphatase activity and calcium or phosphate levels ($p = 0.96$ and 0.72 , respectively).

2.4.3. Bone density and composition

The multiple images obtained from the RBGU male tarsus scans were used to reconstruct the bone, and cross-section images were used for the determination of BMD and Bv/Tv (Fig. 2.1). Mean trabecular Bv/Tv was $19.7 \pm 0.6\%$ (range: 15.8- 24.6%), while cortical Bv/Tv varied between 45.9 and 66.9% (mean: Bv/Tv $58.5 \pm 1.2\%$). Neither trabecular nor cortical Bv/Tv of male RBGUs was significantly associated with the three plasmatic markers (calcium and inorganic phosphate levels, and alkaline phosphatase activity) ($0.26 \leq p \leq 0.65$), while a negative tendency was observed between trabecular Bv/Tv and plasma calcium levels ($r = -0.39$; $p = 0.10$). Mean trabecular BMD was 0.036 ± 0.004 g/cm³ with a range of 0.002 to 0.06 g/cm³, while the mean cortical BMD was of 0.92 ± 0.01 g/cm³ (range: 0.84-1.02 g/cm³). BMD and Bv/Tv for the same tarsus section were positively correlated ($r = 0.44$; $p = 0.05$ and $r = 0.92$; $p < 0.0001$, for cortical and trabecular bone, respectively) (Fig. 2.2). No significant relationship was obtained when phosphate levels and alkaline phosphatase activities were regressed against the trabecular and cortical BMD values ($0.15 \leq p \leq 0.53$), whereas those two BMD values tended to be negatively associated with calcium levels ($r = -0.42$; $p = 0.07$ and $r = -0.44$; $p = 0.06$, for cortical and trabecular BMD, respectively).

2.4.4 Associations between PBDE/FR concentrations and bone tissue parameters

Calcium levels in male RBGU plasma were found to be positively correlated with *anti*-DP concentrations in liver ($r = 0.48$; $p = 0.04$). No association was found between calcium levels and any other liver or plasma PBDE/FR concentrations ($0.22 \leq p \leq 0.90$). Moreover, no correlation was found between plasma phosphate levels and concentrations of PBDEs/FRs in liver or plasma ($0.13 \leq p \leq 0.85$), with the exception of BDE-170 concentration in liver that

was negatively correlated with plasma phosphate levels ($r = -0.59$; $p = 0.01$). Plasma alkaline phosphatase activity and PBDE/FR concentrations were not associated in liver or plasma ($0.26 \leq p \leq 0.99$).

Trabecular and cortical Bv/Tv of tarsus did not correlate with any PBDE and FR concentrations in liver or plasma ($0.11 \leq p \leq 0.98$). In contrast, trabecular BMD was negatively correlated with BDE-183 concentrations in liver ($r = -0.47$; $p = 0.04$) and consistent trends were observed with two other PBDE congeners, BDE-197 and -201 ($r = -0.42$; $p = 0.06$ and $r = -0.42$; $p = 0.06$, respectively). No other PBDE/FR concentrations determined in liver or plasma were linked to this marker ($0.13 \leq p \leq 0.99$), although comparable tendencies were identified with plasma BDE-153 and -209 levels ($r = -0.44$; $p = 0.06$ and $r = -0.41$; $p = 0.09$, respectively). Cortical BMD was negatively correlated with concentrations of three PBDEs in liver: BDE-154 ($r = -0.45$; $p = 0.05$), BDE-201 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) and BDE-209 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) (Fig. 2.3). Negative associative tendencies with cortical BMD were also observed with seven other PBDEs (BDE-99, -153, -183, -197, -203, -207, and -208) ($0.38 \leq r \leq -0.48$; $0.06 \leq p \leq 0.1$) and Σ PBDE in liver ($r = -0.40$; $p = 0.08$). Cortical BMD was also found to correlate negatively with BDE-209 levels in plasma ($r = -0.50$; $p = 0.03$) (Fig. 2.3), while tendencies also emerged for three other PBDE congeners (BDE-99, -153 and -154) ($-0.40 \leq r \leq -0.43$; $0.07 \leq p \leq 0.08$).

Significant positive relationships were found between tarsus length and plasma concentrations of BDE-47, -99, -100, -153, and -154 as well as Σ PBDEs ($0.55 \leq r \leq 0.70$; $0.0009 \leq p \leq 0.02$), and a similar tendency was found with BDE-85 in liver ($r = 0.38$; $p = 0.09$). No significant association was observed between other morphological measurements and body mass and any other contaminant concentrations and bone parameters ($0.15 \leq p \leq 0.99$).

Table 2.1 Mean (\pm S.E.) and range of PBDEs (sums of congeners) and other FR concentrations (ng/g ww) determined in liver and plasma of male RBGUs from Deslauriers Island, Quebec (Canada). Partial data from Gentes *et al.* (2012).

	Liver ($n = 21$)			Plasma ($n = 19$)		
	Samples >MLOD	Mean \pm S.E.	Range	Samples >MLOD	Mean \pm S.E.	Range
Σ PBDE ^{a,b}	-	200 \pm 38.2	26.2-680	-	23.0 \pm 4.82	3.55-89.2
Total-HBCD	90%	4.45 \pm 1.12	ND-19.8	0%	-	ND
BEHTBP	90%	1.65 \pm 0.16	ND-3.29	0%	-	ND
<i>anti</i> -DP	100%	6.93 \pm 2.12	0.72-38.5	0%	-	ND
<i>syn</i> -DP	90%	2.68 \pm 0.86	ND-15.2	0%	-	ND

^a Σ_{19} PBDE in the liver : sum of the following 19 PBDE congeners : 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), 2,2',3,4,4'-pentabromodiphenyl ether (BDE-85), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100), 2,2',3,4,4',5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-138), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-153), 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether/2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl (BDE-154/BB153), 2,2',3,3',4,4',5-heptabromodiphenyl ether (BDE-170), 2,2',3,3',5,6,6'-heptabromodiphenyl ether (BDE-179), 2,2',3,4,4',5,5'-heptabromodiphenylether (BDE-180), 2,2',3,4,4',5,6-heptabromodiphenyl ether (BDE-183), 2,2',3,3',4,4',5,6-octabromodiphenyl ether (BDE-196), 2,2',3,3',4,4',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-197), 2,2',3,3',4,5',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-201), 2,2',3,3',5,5',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-202), 2,2',3,4,4',5,5',6-octabromodiphenyl ether (BDE-203), 2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nonabromodiphenyl ether (BDE-207), 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonabromodiphenyl ether (BDE-208), and 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209).

^b Σ_8 PBDE in the plasma : sum of the 8 following PBDE congeners : 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether (BDE-153), 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether/2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl (BDE-154/BB153), 2,2',3,3',4,4',6,6'-octabromodiphenyl ether (BDE-197), 2,2',3,3',4,4',5,6,6'-nonabromodiphenyl ether (BDE-207), and 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209).

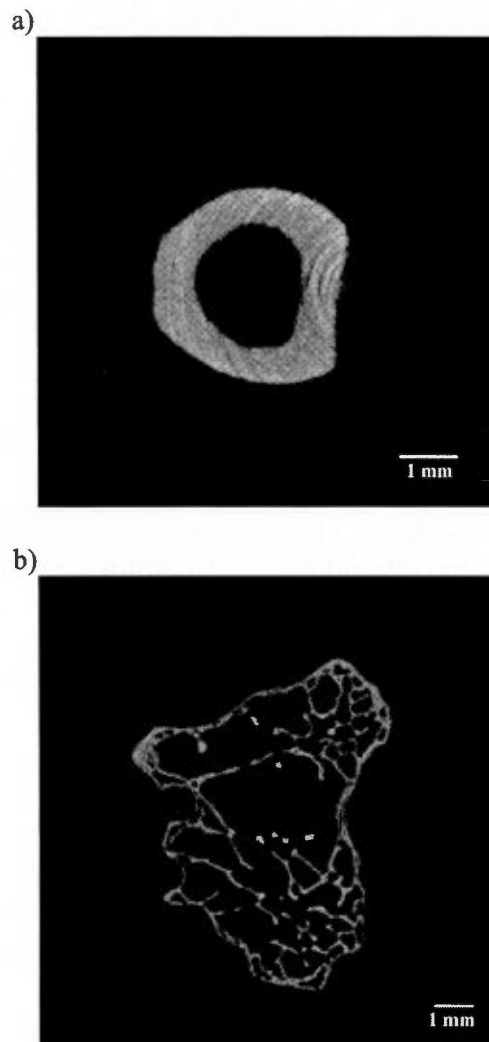


Figure 2.1 Representative reconstructed images obtained from the NRecon software of a left male RBGU tarsus: a) cortical and b) trabecular sections.

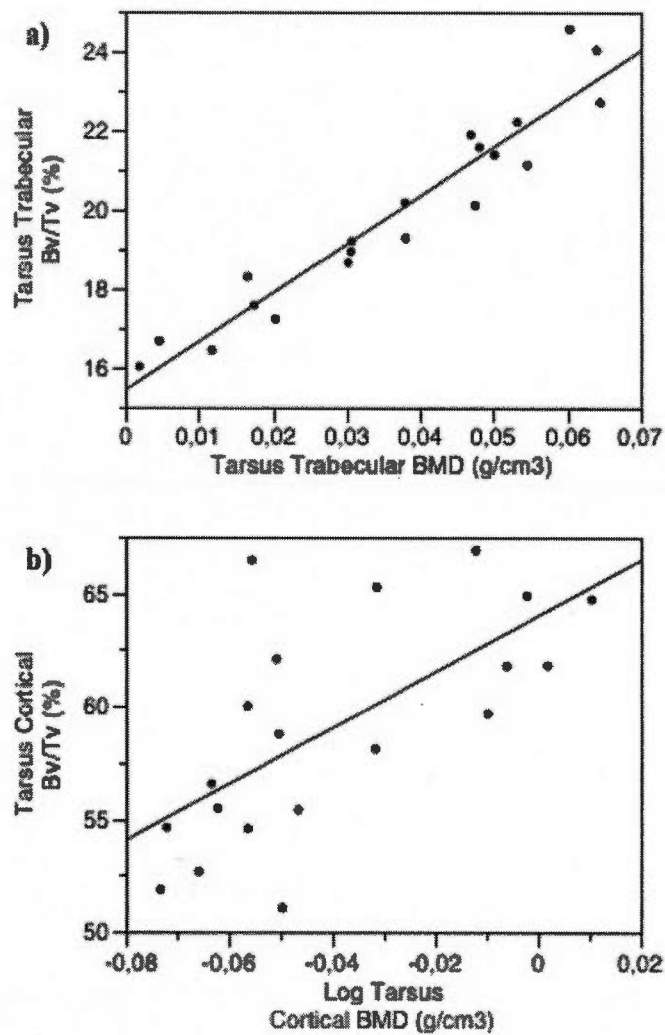


Figure 2.2 Relationship between BMD and Bv/Tv in both bone sections of male RBGUs: a) trabecular BMD (g/cm³) and Bv/Tv (%) ($n = 20$; $r^2 = 0.92$; $p < 0.0001$) and b) cortical BMD (log₁₀-transformed g/cm³) and Bv/Tv (%) ($n = 20$; $r^2 = 0.44$; $p = 0.001$).

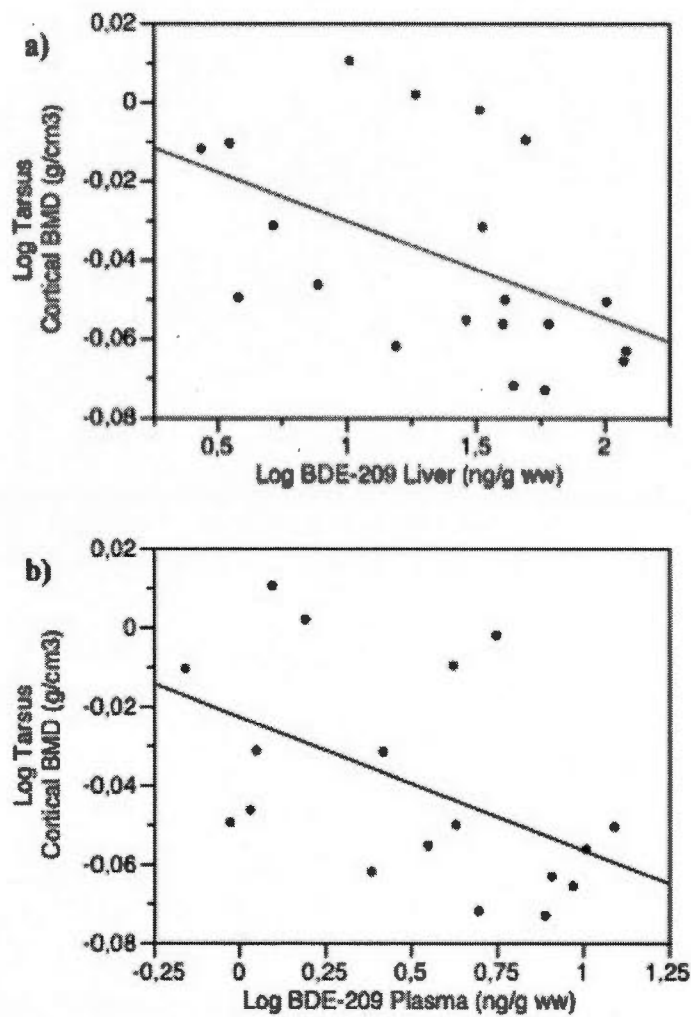


Figure 2.3. Relationship between cortical BMD (\log_{10} -transformed g/cm^3) of male RBGUs tarsus and BDE-209 concentrations (\log_{10} -transformed $\text{ng}/\text{g ww}$) in: a) liver ($n = 20$; $r^2 = 0.23$; $p = 0.03$) and b) plasma ($n = 18$; $r^2 = 0.25$; $p = 0.03$).

2.5 Discussion

2.5.1 Accumulation of FRs in RBGUs

Plasma PBDE levels in male RBGUs were positively related to tarsus length, which is a good indicator of the general size of birds, including gulls (Freeman and Jackson, 1990; Rising and Somers, 1989). It has been demonstrated that larger-size gulls occasionally exhibit more predatory behavior and feed upon higher trophic level preys that accumulate higher concentrations of organic contaminants (Kidd *et al.*, 1995). Therefore, the positive associations between tarsus length and concentrations of certain PBDE congeners are potentially an artifact of foraging preference of larger individuals, and likely unrelated to bone (tarsus) length and structure. Nevertheless, PBDE/FR concentrations and profiles in liver and plasma of male RBGUs from Deslauriers Island highly differed from those reported for other aquatic bird species. As recently reported by Gentes *et al.* (2012) for the same RBGUs as utilized in present study, this species accumulates noticeably elevated liver concentrations of BDE-209, that surpassed those of BDE-99 and 47, which typically represent the most dominant PBDE congeners detected in free-ranging aquatic birds (reviewed by Chen et Hale, 2010; reviewed by de Wit, 2010). Moreover, in this study, detection percentages and concentrations of BEHTBP and anti- and syn-DP in liver were among the highest reported in any avian species. In the study by Gentes *et al.* (2012) and in a pan-Canadian FRs investigation of gull eggs (Chen *et al.*, 2012), it was suggested that the high exposure of BDE-209 and other current-use FRs in RBGUs was associated with human density and urbanization in the Montreal area. These area being more contaminated due to high usage and disposal of products containing FR, higher levels of these (including BDE-209) are present in the surroundings, resulting in a greater exposure to wildlife (Chen *et al.*, 2012). Similar observations were made in a study of osprey (*Pandion haliaetus*) eggs from the Columbia basin (Henry *et al.*, 2011). A more comprehensive description and discussion on PBDE and emerging FR profiles and concentrations in present RBGUs can be found in Gentes *et al.* (2012).

2.5.2 Bone tissue alteration and potential role of contaminant exposure

To our knowledge, the present RBGU study is the first assessing the potential impact of PBDE/FR exposure on bone tissue in a free-ranging bird species. Present results suggest that circulating levels of calcium in RBGU males are weakly positively associated with liver concentrations of anti-DP, whereas concentrations of BDE-170 are inversely related to inorganic phosphate. However, *anti-DP*, the most abundant of the two DP isomers determined, is a compound of relatively minor importance with respect to its overall contribution to the total quantified liver burden of FRs. Regardless, positive association in male RBGUs between liver contaminant levels and those of plasma calcium are consistent with results by Routti *et al.* (2008) who reported on positive correlations between circulating calcium and PCB and DDT levels in Baltic grey seals. In this study, inorganic phosphate levels also were positively correlated with contaminant concentrations, although this was not observed in the present RBGU investigation. Contrastingly, the only significant relationship with plasma inorganic phosphate was a negative correlation with concentrations of a minor PBDE congener, BDE-170 (3% of Σ PBDE), and thus low importance was attributed to this finding. It was hypothesized that these two markers (calcium and inorganic phosphate) would be positively associated in RBGUs since variation in bone metabolic activity generally is mirrored by fluctuations in circulation calcium and inorganic phosphate levels. Effectively, bone mineralization and demineralization integrate or liberate both minerals via formation or dissolution of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Cruess, 1982). The absence of linkage between calcium and inorganic phosphate in plasma could be partly explained by the opportunistic and omnivorous diet of RBGUs. In fact, because diet is a major source of these minerals, potentially large variations among individuals in the intake of calcium and inorganic phosphate could have masked any associations emerging from bone metabolism-related dynamics.

Because no relationship was observed between PBDE/FR concentrations and plasmatic alkaline phosphatase activity in male RBGUs, it can be suggested that the osteoblast functions of these birds are essentially unaffected by these contaminants. The activity of this enzyme (all isoforms) has generally been associated with bone formation activity by the

osteoblasts in low or high bone turnover diseases (reviewed in Risteli and Risteli, 1993). However, it is also known that other sources of alkaline phosphatase may confound the interpretation of this marker with respect to chemical-related bone metabolism alteration (reviewed in Christenson, 1997). In fact, enhanced hepatic metabolism resulting from RBGUs' exposure to contaminants (Chabot-Giguère *et al.*, accepted) may lead to elevated activity of the hepatic isoforms, which could interfere with the bone biomarker potential of this enzyme. The observed absence of significant relationship between alkaline phosphatase activity and liver or plasma PBDEs/FRs levels in male RBGUs does not automatically mean that these substances have no effect on the osteoblasts activity.

Present results indicate that trabecular BMD of the tarsus could be associated, although weakly, with FR exposure in male RBGUs based on its negative correlations (or trends) with certain PBDE congeners in liver (e.g., BDE-183, -197, -201) and plasma (BDE-153 and -209). The combined concentrations of these PBDEs represented less than 8% of Σ PBDE in liver, while this percent contribution was substantially higher in plasma (30% of Σ PBDE). This high congener contribution in plasma was mainly the result of the high BDE-209 abundance (22% of Σ PBDE). In addition, negative correlations and tendencies were noted between concentrations of PBDEs (e.g., BDE-99, -153, -207, and -209) and Σ PBDE in liver and plasma (e.g., BDE-99, -153, and -209), and cortical BMD. Collectively, these associations indicate that FR exposure may be linked to a decreased BMD in RBGUs from Deslauriers Island. Moreover, because Bv/Tv and BMD of the same tarsus section were positively correlated, and that both BMDs and trabecular Bv/Tv generally were negatively associated with circulating calcium levels, this may further be indicative of a perturbation in the equilibrium of mineralization/demineralization rates. In fact, a higher bone resorption rate would result in a net loss of bone tissue and mobilized minerals, which is coherent with the higher plasmatic calcium levels measured in those RBGU males that had lower BMDs (cortical and trabecular) and trabecular Bv/Tv. The observed negative associations between BMD and PBDEs in present RBGUs were somewhat consistent with other studies in which lower BMD was associated with higher tissue OH concentrations. Sonne *et al.* (2004) have shown that DDT and dieldrin concentrations in adipose tissue were linked to lower BMD in the skull of subadult and adult male polar bears. Moreover, these authors noted a negative

trend (not significant) between skull BMD of subadults and Σ PBDE in adipose tissue. Other supportive evidence of contaminant-related bone structure alteration was reported by Lind *et al.* (2010) who showed that exposure of sheep to sewage sludge, which is known to contain many OHs (e.g., PBDEs, PCBs, polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins and insecticides) and other contaminants such as trace elements, was associated with lower femoral trabecular BMD. Moreover, an investigation on the health of herring gulls also reported on variations in femoral BMD in individuals breeding in different locations, in which birds from the most contaminated Great Lakes colony exhibited lower femoral cortical BMD when compared with reference colonies (Lake Winnipeg and Kent Island) (Fox *et al.*, 2008). Overall, present RBGU findings as well as those reported elsewhere for other free-ranging species point to a potential role of environmental OH exposition (e.g., organochlorines, PBDEs) on BMD alterations.

Alteration of bone metabolism could occur via a number of pathways since bone remodeling is a process initiated and regulated by several hormones (parathormone, calcitonine and THs) and molecules (vitamin D, interleukins, and M-SCF) (Guyton et Hall, 2006; McNabb, 2007; Roodman, 1999). For example, deregulation of hormones, more specifically circulation levels of parathormone, calcitonine, estrogen and THs, may contribute to stimulate or inhibit bone cell activity, and thus alter the integrity of this tissue. Among other mechanisms, potential chemically-induced BMD alteration in male RBGU, associated with elevated circulating calcium levels, could be at least in part explained via indirect disturbance on the thyroid axis. More precisely, even though THs (T_3 and T_4) were not determined in RBGUs plasma, it cannot be completely disregarded that the chronic exposure to FRs could have led to elevated levels of THs. Although dosage with OHs in laboratory setting and their exposure in free-ranging animals reported negative associations between OH and TH levels (e.g., Brouwer *et al.*, 1998; Fernie *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2007; Letcher *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2001), other studies have shown that THs were positively correlated with OH levels, for example, in pinnipeds like grey seals from Farne Island (UK) (Hall *et al.*, 2003) and the Baltic Sea (Routti *et al.*, 2008) as well as in avian species like kittiwakes (*Rissa tridactyla*) and northern fulmars (*Fulmarus glacialis*) from the Canadian and European Arctic (Nøst *et al.*, 2012; Verreault *et al.*, 2012). Furthermore, abnormally high levels of circulating THs have been

associated with enhanced stimulation of bone resorption (reviewed in Karga *et al.*, 2004) and loss of equilibrium between bone formation and resorption, thus resulting in a loss of mineralized bone tissue (reviewed in Duncan Bassett and Williams, 2003, Christenson, 1997). More specifically, high levels of T_3 , beyond the thresholds of homeostatic compensation and variation, have been shown to affect osteoclast activity (increased bone turnover), which resulted in a more altered cortical bone matrix (reviewed in Christenson, 1997). The possible disruptive mechanism of altered TH levels in birds have also been investigated in two gull species, and were suggested to potentially involve competitive binding of hydroxyl (OH)-containing metabolites of PBDEs with TH carrier proteins (transthyretin and albumin), which could have led to the observed effects on circulating THs levels (Ucán-Marín *et al.*, 2009a; 2009b).

2.6 Concluding remarks

The present study provided some (correlative) evidence suggesting that bone tissue could be a target for halogenated FRs in male RBGUs breeding on Deslauriers Island, as a number of significant relationships were observed between concentrations of FRs (mainly BDE-154, -183, -201, -209, and anti-DP) and selected bone parameters and metabolism markers. In addition, positive associations of BMD (cortical and trabecular) and Bv/Tv (trabecular) with calcium levels were observed, indicating a possible demineralization potentially associated with higher FRs exposure. However, because these birds were exposed to a cocktail of toxics in their environment, it cannot be completely disregarded that other chemical compounds that were not screened for (e.g., PCBs, DDT and trace elements) in the present RBGU study could have contributed to the observed effects. Therefore, future investigations should take into account the potential disruptive roles of other bioaccumulative compounds that could affect, directly or indirectly, bone tissue in this specie. In order to elucidate the mechanism through which FRs may affect bone tissue (structure and metabolism) in RBGUs, ongoing work in our laboratory aims to examine TH status in differentially-exposed individuals breeding in the greater Montreal area. Ultimately, biomechanical testing will be helpful in assessing bone strength and evaluate whether or not RBGUs could be physically affected as a result of bone tissue alteration.

2.7 Acknowledgements

Funding for this project was provided by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery Grant (to J.V) and the Canadian Research Chair in Comparative Avian Toxicology (to J.V.). We would like to thank UQAM lab members (Élyse Caron-Beaudoin, Bernice Chabot-Giguère, Marie-Line Gentes, Francis St-Pierre and Mathieu Tremblay) for sample collection and handling in the field. Also, special thanks to Élyse Caron-Beaudoin and Vicky Doré (UQAM) for assistance with the chemical analyses and to Corine Martineau (R.M. lab) for her helpful advice and technical support in scanning and analyzing bones.

2.8 References

- Alvarez-Lloret, P., Lind, P.M., Nyberg, I., Öberg, J., Rodriguez-Navarro, A.B., 2009. Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 187, 2, 63-68.
- Betts, K., 2008. New flame retardants detected in indoor and outdoor environments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6778-6778.
- Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E. Bergman, Å., Visser, T.J., 1998. Interactions of Persistent Environmental Organohalogenes With the Thyroid Hormone System: Mechanisms and Possible Consequences for Animal and Human Health. *Toxicol. Ind. Health* 14, 59-84.
- Chabot-Giguère, B., Letcher, R.J., Verreault, J. *In vitro* biotransformation of BDE-209 and Dechlorane Plus flame retardants: A case study of ring-billed gull breeding in a pollution hotspot in the St-Lawrence River, Canada. Submitted to *Environ. Int.* Nov. 16th, 2012.
- Chen, D., Hale, R.C., 2010. A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds. *Environ. Int.* 36, 800-811.
- Chen, D., Letcher, R.J., Burgess, N.M., Champoux, L., Elliott, J.E., Hebert, C.E., Martin, P., Wayland, M., Weseloh, D.V.C., Wilson, L. 2012. Flame retardants in eggs of four gull species (Laridae) from breeding sites spanning Atlantic to Pacific Canada. *Environ. Pollut.* 168, 1-9.
- Christenson, R.H., 1997. Biochemical Markers of Bone Metabolism: An Overview. *Clin. Biochem.* 30, p. 573-593.
- Clarke, B., 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephro.* 3, S131-S139.
- Covaci, A., Gerecke, A.C., Law, R.J., Voorspoels, S., Kohler, M., Heeb, N.Z., Leslie, H., Allchin, C.R., de Boer, J., 2006. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the Environment and Humans: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3679-3688.
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M.A.E., Ali, N., Law, R.J., Herzke, D., de Wit, C.A., 2011. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environ. Int.* 37, 532-556.
- Cruess, R.L. 1982. Physiology of bone formation and resorption. In Cruess, R.L., *The musculoskeletal system: Embryology, biochemistry, and physiology.* New York: Churchill Livingstone.

Darnerud, P.O., 2008. Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters Int. J. Androl. 31, 152-160.

de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates. Sci. Total Environ. 408, 2885-2918.

Duncan Bassett, J.H., Williams G.R., 2003. The molecular actions of thyroid hormone in bone. Trends Endocrin. Met. 14, 356-364.

Environment Canada, 2011. Risk Management of DecaBDE: Commitment to Voluntary Phase-Out Exports to Canada.

<http://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/default.asp?lang=En&n=F64D6E3B-1&xml=F64D6E3B-0328-4C11-A9E4-790D053E42A1>

European Parliament, 2003. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether), Official Journal L 042.

Fernie, K.J., Shutt, J.L., Mayne, G., Hoffman, D., Letcher, R.J., Drouillard K.G., Ritchie, I.J., 2005. Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): Changes in Thyroid, Vitamin A, Glutathione Homeostasis, and Oxidative Stress in American Kestrels (*Falco sparverius*). Toxicol. Sci. 88, 375-383.

Fernie, K.J., Laird Shutt, J., Letcher, R.J., Ritchie, I.J., Bird, D.M., 2009. Environmentally Relevant Concentrations of DE-71 and HBCD Alter Eggshell Thickness and Reproductive Success of American Kestrels. Environ. Sci. Technol. 43, 2124-2130.

Fox, G.A., Jeffrey, D.A., Williams, K.S., Kennedy, S.W., Grasman, K.A., 2007. Health of Herring Gulls (*Larus argentatus*) in Relation to Breeding Location in the Early 1990s. I. Biochemical Measures. J. Toxicol. Environ. Heal. A 70, 1443 - 1470.

Fox, G.A., Lundberg, R., Wejheden, C., Lind, L., Larsson, S., Örborg, J., Lind, M., 2008. Health of Herring Gulls (*Larus argentatus*) in Relation to Breeding Location in the Early 1990s. III. Effects on the Bone Tissue. J. Toxicol. Environ. Heal. A 71, 1448 - 1456.

Franceschi, R.T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S., Reith, E., 2003. Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. Connect. Tissue Res. 44, 109-116.

Freeman, S., Jackson, W.M., 1990. Univariate Metrics Are Not Adequate to Measure Avian Body Size. Auk 107, 69-74.

Gauthier, L.T., Potter, D., Hebert, C.E., Letcher, R.J., 2008. Temporal Trends and Spatial Distribution of Non-polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants in the Eggs of Colonial Populations of Great Lakes Herring Gulls. Environ. Sci. Technol. 43, 312-317.

- Gentes, M.L., Letcher, R.J., Caron-Beaudoin, É., Verreault, J., 2012. Novel Flame Retardants in Urban-Feeding Ring-Billed Gulls from the St Lawrence River, Canada. *Environ. Sci. Technol.* In Press.
- Guerra, P., Fernie, K., Jiménez, B., Pacepavicius, G., Shen, L., Reiner, E., Eljarrat, E., Barceló, D., Alae, M., 2011. Dechlorane Plus and Related Compounds in Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) Eggs from Canada and Spain. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1284-1290.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2006. Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism, vitamin D, bone and teeth, in Guyton, A.C., Hall, J.E., *Textbook of Medical Physiology* 11th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Hale, R.C., Alae, M., Manchester-Neesvig, J.B., Stapleton, H.M., Ikonou, M.G., 2003. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. *Environ. Int.* 29, 771-779.
- Hall, A.J., Kalantzi, O.I., Thomas, G.O., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in grey seals during their first year of life-are they thyroid hormone endocrine disrupters?. *Environ. Pollut.* 126, 29-37.
- Henny, C.J., Grove, R.A., Kaiser, J.L., Johnson, B.L., Furl, C.V., Letcher, R.J., 2011. Wastewater dilution index partially explains observed polybrominated diphenyl ether flame retardant concentrations in osprey eggs from Columbia River Basin, 2008-2009. *Ecotoxicology*, vol. 20, no 4, p. 682-697.
- Hoh, E., Zhu, L., Hites, R.A., 2005. Novel Flame Retardants, 1,2-Bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane and 2,3,4,5,6-Pentabromoethylbenzene, in United States' Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2472-2477.
- Horowitz, M.C., 1993. Cytokines and Estrogen in Bone: Anti-Osteoporotic Effects. *Science*, 260, 626-627.
- Jämsä, T., Viluksela, M., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Tuukkanen, J., 2001. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Bone in Two Rat Strains with Different Aryl Hydrocarbon Receptor Structures. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1812-1820.
- Karga, H., Papapetrou, P.D., Korakovouni, A., Papandroulaki, F., Polymeris, A., Pampouras, G., 2004. Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clin. Endocrinol.* 61, 466-472.
- Kidd, K.A., Schindler, D.W., Hesslein, R.H., Muir, D.C.G., 1995. Correlation between stable nitrogen isotope ratios and concentrations of organochlorines in biota from a freshwater food web. *Sci. Total Environ.* 160-161, 381-390.
- Lam, J.C.W., Lau, R.K.F., Murphy, M.B., Lam, P.K.S., 2009. Temporal Trends of Hexabromocyclododecanes (HBCDs) and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and

Detection of Two Novel Flame Retardants in Marine Mammals from Hong Kong, South China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6944-6949.

Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Sci. Total Environ.* 408, 2995-3043.

Lind, P. M., Bergman, A., Olsson, M., Örborg, J., 2003. Bone Mineral Density in Male Baltic Grey Seal (*Halichoerus grypus*). *AMBIO* 32, 385-388.

Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Örborg, J.A., Guillette, L. J. Jr., 2004. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ. Health Persp.* 112, 359-362.

Lind, P.M., Wejheden, C., Lundberg, R., Alvarez-Lloret, P., Hermsen, S.A.B., Rodriguez-Navarro, A.B., Larsson, S., Rannug, A., 2009a. Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. *Chemosphere* 75, 680-684.

Lind, P.M., Gustafsson, M., Hermsen, S.A.B., Larsson, S., Kyle, C.E., Örborg, J., Rhind, S.M., 2009b. Exposure to pastures fertilised with sewage sludge disrupts bone tissue homeostasis in sheep. *Sci. Total Environ.* 407, 2200-2208.

Lind, P.M., Örborg, D., Larsson, S., Kyle, C.E., Örborg, J., Rhind, S.M., 2010. Pregnant ewes exposed to multiple endocrine disrupting pollutants through sewage sludge-fertilized pasture show an anti-estrogenic effect in their trabecular bone. *Sci. Total Environ.* 408, 2340-2346.

Lundberg, R., Lyche, J.L., Ropstad, E., Aleksandersen, M., Rönn, M., Skaare, J.U. Larsson, S., Örborg, J., Lind, P.M., 2006. Perinatal exposure to PCB 153, but not PCB 126, alters bone tissue composition in female goat offspring. *Toxicology* 228, 33-40.

Lundberg, R., Jenssen, B.M., Leiva-Presa, A., Rönn, M., Hernhag, C., Wejheden, C., Larsson, S., Örborg, J., Lind, P.M., 2007. Effects of Short-term Exposure to the DDT Metabolite p,p'-DDE on Bone Tissue in Male Common Frog (*Rana temporaria*). *J. Toxicol. Environ. Health A*, 70, 614-619.

Luo, X.-J., Zhang, X.-L., Liu, J., Wu, J.-P., Luo, Y., Chen, S.-J., Mai, B.-X., Yang, Z.-Y., 2008. Persistent Halogenated Compounds in Waterbirds from an e-Waste Recycling Region in South China. *Environ. Sci. Technol.* 43, 306-311.

McNabb, F.M.A., 2007. The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Birds and Its Role in Bird Development and Reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 163-193.

Morris, S., Allchin, C.R., Zegers, B.N., Hafka, J.J.H., Boon, J.P., Belpaire, C., Leonards, P.E.G., van Leeuwen, S.P.J., de Boer, J., 2004. Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Brominated Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5497-5504.

- Nøst, T.H., Helgason, L.B., Harju, M., Heimstad, E.S., Gabrielsen, G.W., Jenssen, B.M., 2012. Halogenated organic contaminants and their correlations with circulating thyroid hormones in developing Arctic seabirds. *Sci. Total Environ.* 414, 248-256.
- Rising, J.D., Somers, K.M., 1989. The Measurement of Overall Body Size in Birds. *Auk* 106, 666-674.
- Risteli, L., Risteli, J., 1993. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Ann. Med.* 25, 385-393.
- Roodman, G.D., 1999. Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* 27, 1229-1241.
- Roos, A., Rigét, F., Örberg, J., 2010. Bone mineral density in Swedish otters (*Lutra lutra*) in relation to PCB and DDE concentrations. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 1063-1070.
- Routti, H., Nyman, M., Jenssen, B.M., Bäckman, C., Koistinen, J., Gabrielsen, G.W., 2008. Bone-related effects of contaminants in seals may be associated with vitamin D and thyroid hormones. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 873-880.
- Sonne, C., Dietz, R., Born, E.W., Riget, F.F., Kirkegaard, M., Hyldstrup, L., Letcher, R.J., Muir, D.C.G., 2004. Is Bone Mineral Composition Disrupted by Organochlorines in East Greenland Polar Bears (*Ursus maritimus*)?. *Environ. Health Persp.* 112, 1711-1716.
- Sonne, C., Leifsson, P.S., Dietz, R., Born, E.W., Letcher, R.J., Hyldstrup, L., Riget, F.F., Kirkegaard, M., Muir, D.C.G., 2006. Xenoendocrine Pollutants May Reduce Size of Sexual Organs in East Greenland Polar Bears (*Ursus maritimus*). *Environ. Sci. Technol.* 40, 5668-5674.
- Sverko, E., Tomy, G.T., Reiner, E.J., Li, Y.-F., McCarry, B.E., Arnot, J.A., Law, R.J., Hites, R.A., 2011. Dieldrin Plus and Related Compounds in the Environment: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5088-5098.
- Ucán-Marín, F., Arukwe, A., Mortensen, A., Gabrielsen, G.W., Fox, G.A., Letcher, R.J., 2009a. Recombinant Transthyretin Purification and Competitive Binding with Organohalogen Compounds in Two Gull Species (*Larus argentatus* and *Larus hyperboreus*). *Toxicol. Sci.* 107, 440-450.
- Ucán-Marín, F., Arukwe, A., Mortensen, A., Gabrielsen, G.W., Letcher, R.J., 2009b. Recombinant Albumin and Transthyretin Transport Proteins from Two Gull Species and Human: Chlorinated and Brominated Contaminant Binding and Thyroid Hormones. *Environ. Sci. Technol.* 44, 497-504.
- UNEP, 2010. The 9 new POPs: An introduction to the nine chemicals added to the Stockholm Convention by the Conference of the Parties at its fourth meeting. <http://chm.pops.int/Programmes/New%20POPs/Publications/tabid/695/language/en-US/Default.aspx>

USEPA, 2009. DecaBDE Phase-out Initiative.
<http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/deccadbe.html>

Van den Steen, E., Eens, M., Covaci, A., Dirtu, A.C., Jaspers, V.L.B., Neels, H., Pinxten, R., 2009. An exposure study with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in female European starlings (*Sturnus vulgaris*): Toxicokinetics and reproductive effects. *Environ. Pollut.* 157, 430-436.

Verreault, J., Gebbink, W.A., Gauthier, L.T., Gabrielsen, G.W., Letcher, R.J., 2007. Brominated Flame Retardants in Glaucous Gulls from the Norwegian Arctic: More Than Just an Issue of Polybrominated Diphenyl Ethers. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4925-4931.

Verreault, J., Helgason, L.B., Gabrielsen, G.W., Dam, M., Braune, B.M., 2012. Contrasting retinoid and thyroid hormone status in differentially-contaminated northern fulmar colonies from the Canada Arctic, Svalbard and the Faroe Island. Accepted in *Environ. Int.*

Zhou, T., Ross, D.G., DeVito, M.J., Crofton, K.M., 2001. Effects of Short-Term in Vivo Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers on Thyroid Hormones and Hepatic Enzyme Activities in Weanling Rats. *Toxicol. Sci.* 61, 76-82.

CONCLUSION

Les contaminants organiques étant présents dans plusieurs écosystèmes de la planète, il est normal que les écotoxicologues se penchent sur les effets que ces produits peuvent avoir sur les organismes y étant exposés. Les retardateurs de flamme halogénés sont des composés organiques ajoutés aux produits de consommation dans le but de ralentir la propagation des flammes, et ce, dans l'objectif de se conformer à des normes strictes en matière de sécurité. Tout comme les autres contaminants organiques, ceux-ci sont maintenant retrouvés dans plusieurs écosystèmes et, conséquemment, plusieurs espèces y sont chroniquement exposées. Plusieurs études se sont penchées sur les effets d'une telle exposition chez certaines espèces animales, soit en laboratoire ou en milieu naturel. Les études s'accordent pour dire que ces contaminants ont des effets notamment au niveau de l'équilibre hormonal et de certains tissus. L'os étant un tissu dont le métabolisme est précisément régulé par certaines hormones et autres signaux, il se pourrait qu'il soit affecté par l'exposition à ces contaminants. Étant donné que les contaminants organiques classiques (BPC, DDT, dioxines, etc.) ont été associés à des altérations du métabolisme ou du tissu osseux, tant en laboratoire qu'en milieu naturel (Lind *et al.*, 2009 et 2010; Lundberg *et al.*, 2007; Routti *et al.*, 2008; Sonne *et al.*, 2004), et ce aussi chez l'oiseau (Fox *et al.*, 2008), il est possible que les retardateurs de flamme puissent aussi être associés à de telles altérations. En effet, ceux-ci ont des effets comparables et peuvent activer des récepteurs communs aux composés classiques.

Le but de la présente étude était donc d'établir un tel lien entre exposition aux retardateurs de flamme halogénés et altération du métabolisme osseux chez une population de *L. delawarensis* nichant dans un point de contamination connu du Fleuve Saint-Laurent (île Deslauriers). Étant un omnivore de type opportuniste fréquentant les milieux urbains et périurbains de la ville de Montréal, celui-ci se retrouve donc chroniquement exposé à une foule de contaminants dont font évidemment partie les retardateurs de flamme. Pour vérifier l'existence d'un lien entre exposition aux FR et altération du métabolisme osseux, nous avons tout d'abord évalué le métabolisme osseux à l'aide de cinq marqueurs, soient : Bv\Tv, BMD, niveaux de calcium et phosphate inorganique plasmiques et activité de la phosphatase

alcaline. Les os ont été numérisés à l'aide d'un microtomographe, ce qui a permis l'obtention de la Bv/Tv et de la BMD pour les portions trabéculaire et corticale. Les marqueurs plasmiques ont quant à eux été quantifiés à l'aide d'ensembles de colorimétrie disponibles sur le marché. Ensuite, ces marqueurs ont été mis en relation avec les niveaux des différents FR présents dans le foie et le plasma.

Les présents résultats ont démontré que les BMD trabéculaire et corticale pouvaient être significativement et négativement associées aux niveaux de certains contaminants, dont certains de concentrations élevées. Effectivement, la BMD semble diminuer en fonction de l'augmentation de la concentration de certains FR. Aussi, nous avons observé des tendances négatives entre les niveaux circulants de calcium et la BMD corticale ainsi que la Bv/Tv et la BMD trabéculaire. Donc, une BMD ou une Bv/Tv plus faible semble être associée à des niveaux de calcium circulant plus élevés. Toutes ces observations suggèrent que les FR à l'étude pourraient effectivement avoir un effet sur le tissu osseux des goélands à bec cerclé de l'île Deslauriers. Les oiseaux à l'étude étant exposés à un cocktail de contaminants, nous ne pouvons certifier que ces effets sont dus aux FR.

Les effets observés, diminution de la BMD associée à l'augmentation des taux circulants de calcium, nous portent à croire que les effets observés seraient dus à une augmentation de la résorption osseuse, et que, tel qu'observé dans Routti *et al.*, 2008, celle-ci pourrait être liée à un déséquilibre de l'axe thyroïdien. En effet, il a été démontré que les hormones thyroïdiennes sont responsables de la stimulation de la résorption osseuse par les ostéoclastes (Mundy *et al.*, 1976). De plus, l'hyperthyroïdie a été associée à une augmentation du remodelage osseux caractérisée par un déséquilibre entre la résorption et la formation, entraînant une perte de tissu osseux (revu dans Duncan Basset et Williams, 2003). Plus précisément, la durée de la résorption est conservée, mais celle de la formation est réduite du 2/3, ce qui entraîne une perte d'environ 10 % de tissu osseux minéralisé par cycle (revu dans Duncan et Williams, 2003). Par contre, plusieurs autres causes (ex.: altération des niveaux circulants de vitamine D, CT ou PTH, effets directs au niveau des cellules osseuses) pourraient être à l'origine des effets observés et c'est pourquoi nous suggérons que le dosage des hormones thyroïdiennes soit ajouté au protocole d'expériences futures. Aussi, d'autres

contaminants organiques et métaux lourds ayant une influence sur le tissu osseux devraient eux aussi être quantifiés dans ces nouvelles expériences. Nous croyons que des tests biomécaniques pourraient ajouter au protocole. En effet, ceux-ci permettraient de voir si la solidité des os est affectée et donc d'établir si oui ou non, les individus sont physiquement affectés par cette atteinte de leur tissu osseux et si cela a le potentiel d'entraver leurs activités (migration, reproduction, quête alimentaire). De plus, doser les contaminants dans les os, permettrait de savoir si ceux-ci peuvent, tout comme certains métaux et polluants, se lier à la matrice osseuse. Cette étude a permis de présenter des preuves que l'intégrité du tissu osseux ainsi que le métabolisme osseux des oiseaux sont des cibles potentielles pour les contaminants de type retardateurs de flamme halogénés. Ceci est donc une preuve supplémentaire que l'exposition à ce type de composés, c'est-à-dire les composés organiques halogénés, porte atteinte à la santé des espèces aviaires y étant exposées.

RÉFÉRENCES

- Aarden, E.M., E.H. Burger et P.J. Nijweide. 1994. «Function of osteocytes in bone». *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 55, no 3, p. 287-299.
- Alvarez-Lloret, P., P.M. Lind, I. Nyberg, J. Öberg et A.B. Rodriguez-Navarro. 2009. «Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats». *Toxicology Letters*, vol. 187, no 2, p. 63-68.
- Andersson, Ö., et G. Blomkvist. 1981. «Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden». *Chemosphere*, vol. 10, no 9, p. 1051-1060.
- Birnbaum, L.S., et D.F. Staskal. 2004. «Brominated flame retardants: cause for concern?». *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, no 1, p. 9-17.
- Bonewald, L.F. 2007. «Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1116, no 1, p. 281-290.
- Boyle, W.J., W.S. Simonet et D.L. Lacey. 2003. «Osteoclast differentiation and activation». *Nature*, vol. 423, no 6937, p. 337-342.
- Brock, W.J., R.E. Schroeder, C.A. McKnight, J.L. VanSteenhouse et J.M. Nyberg. 2010. «Oral Repeat Dose and Reproductive Toxicity of the Chlorinated Flame Retardant Dechlorane Plus». *International Journal of Toxicology*, vol. 29, no 6, p. 582-593.
- Bromine Science and Environmental Forum. 2009. *HBCD Fact Sheet*, 4 p.
- Chen, D., et R.C. Hale. 2010. «A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds». *Environment International*, vol. 36, no 7, p. 800-811.
- Christenson, R.H. 1997. «Biochemical Markers of Bone Metabolism: An Overview». *Clinical Biochemistry*, vol. 30, no 8, p. 573-593.
- Clarke, B. 2008. «Normal Bone Anatomy and Physiology». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, Supplément 3, p. S131-S139.
- Dacke, C.G. 2000 «The parathyroids, calcium, and vitamine D». In *Sturkie's Avian Physiology*, 5e Édition, G.C. Whittow (Éd), p.473-488. Londres : Academic Press.
- Darnerud, P.O. 2008. «Brominated flame retardants as possible endocrine disrupters». *International Journal of Andrology*, vol. 31, no 2, p. 152-160.
- de Jourdan, B., K. Oakes, M. Hanson, P. Sibley, M. Servos, D. Muir et K. Solomon. 2012. «Physiological effects of 3 non-PBDE brominated flame retardants on *Pimephales promelas*

(fathead minnow) exposed in outdoor mesocosms». *Interdisciplinary studies on environmental chemistry-Environmental Pollution and Ecotoxicology*, vol. 16, p. 55-66.

de Wit, C.A., D. Herzke et K. Vorkamp. 2010. «Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates». *Science of The Total Environment*, vol. 408, no 15, p. 2885-2918.

Duncan Bassett, J.H., et G.R. Williams. 2003. «The molecular actions of thyroid hormone in bone». *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 14, no 8, p. 356-364.

El-Shahawi, M.S., A. Hamza, A.S. Bashammakh et W.T. Al-Saggaf. 2010. «An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants». *Talanta*, vol. 80, no 5, p. 1587-1597.

Ezechias, M., K. Svobodova et T. Cajthaml. 2012. «Hormonal activities of new brominated flame retardants». *Chemosphere*, vol. 87, no 7, p. 820-824.

Fowles, J.R., A. Fairbrother, L. Baecher-Steppan et N.I. Kerkvliet. 1994. «Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice». *Toxicology*, vol. 86, no 1-2, p. 49-61.

Fox, G.A., R. Lundberg, C. Wejheden, L. Lind, S. Larsson, J. Örberg et P.M. Lind. 2008. «Health of Herring Gulls (*Larus argentatus*) in Relation to Breeding Location in the Early 1990s. III. Effects on the Bone Tissue». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, vol. 71, no 21, p. 1448 - 1456.

Franceschi, R.T., G. Xiao, D. Jiang, R. Gopalakrishnan, S. Yang et E. Reith. 2003. «Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation». *Connective Tissue Research*, vol. 44 Supplément 1, p. 109-116.

Gauthier, L.T., C.E. Hebert, D.V.C. Weseloh et R.J. Letcher. 2007. «Current-Use Flame Retardants in the Eggs of Herring Gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes». *Environmental Science & Technology*, vol. 41, no 13, p. 4561-4567.

Gauthier, L.T. et R.J. Letcher. 2009. «Isomers of Dechlorane Plus flame retardant in the eggs of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Laurentian Great Lakes of North America: Temporal changes and spatial distribution». *Chemosphere*, vol. 75, no 1, p. 115-120.

Gentes, M.-L., R.J. Letcher, É. Caron-Beaudoin et J. Verreault. 2012. «Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St-Lawrence River, Canada». *Environmental Science & Technology* (sous presse).

Guyton, A.C. et J.E. Hall. 2006. «Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism, vitamin D, bone and teeth». In *Textbook of Medical Physiology* 11e édition, A.C. Guyton et J.E. Hall, p.978-995. Philadelphie : Elsevier Saunders.

- Hadjidakis, D.J., et I.I. Androulakis. 2006. «Bone Remodeling». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1092, no 1, p. 385-396.
- Hakk, H., et R.J. Letcher. 2003. «Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants- a review». *Environment International*, vol. 29, no 6, p. 801-828.
- Hakk, H., J. Huwe, M. Low, D. Rutherford et G. Larsen. 2006. «Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats». *Xenobiotica*, vol. 36, no 1, p. 79-94.
- Hale, R.C., M. Alaei, J.B. Manchester-Neesvig, H.M. Stapleton et M.G. Ikononou. 2003. «Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment». *Environment International*, vol. 29, no 6, p. 771-779.
- Hallgren, S., T. Sinjari, H. Håkansson et P. Darnerud. 2001. «Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice». *Archives of Toxicology*, vol. 75, no 4, p. 200-208.
- Hamers, T., J.H. Kamstra, E. Sonneveld, A.J. Murk, M.H.A. Kester, P.L. Andersson, J. Legler et A. Brouwer. 2006. «In Vitro Profiling of the Endocrine-Disrupting Potency of Brominated Flame Retardants». *Toxicological Sciences*, vol. 92, no 1, p. 157-173.
- Heino, T.J., T.A. Hentunen et H.K. Väänänen. 2002. «Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor- β : Enhancement by estrogen*». *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 85, no 1, p. 185-197.
- Herzke, D., U. Berger, R. Kallenborn, T. Nygård et W. Vetter. 2005. «Brominated flame retardants and other organobromines in Norwegian predatory bird eggs». *Chemosphere*, vol. 61, no 3, p. 441-449.
- Hoh, E., L. Zhu et R.A. Hites. 2006. «Dechlorane Plus, a Chlorinated Flame Retardant, in the Great Lakes». *Environmental Science & Technology*, vol. 40, no 4, p. 1184-1189.
- Ikononou, M.G., S. Rayne et R.F. Addison. 2002. «Exponential Increases of the Brominated Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000». *Environmental Science & Technology*, vol. 36, no 9, p. 1886-1892.
- Jämsä, T., M. Viluksela, J.T. Tuomisto, J. Tuomisto et J. Tuukkanen. 2001. «Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin on Bone in Two Rat Strains with Different Aryl Hydrocarbon Receptor Structures». *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 16, no 10, p. 1812-1820.
- Jones, K.C., et P. de Voegt. 1999. «Persistent organic pollutants (POPs): state of the science». *Environmental Pollution*, vol. 100, no 1-3, p. 209-221.

- Koolman, J., et K.-H. Röhm. 2003. *Atlas de poche de biochimie*, 3e Édition. Paris: Flammarion, 478 p.
- Lam, J.C.W., R.K.F. Lau, M.B. Murphy et P.K.S. Lam. 2009. «Temporal Trends of Hexabromocyclododecanes (HBCDs) and Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Detection of Two Novel Flame Retardants in Marine Mammals from Hong Kong, South China». *Environmental Science & Technology*, vol. 43, no 18, p. 6944-6949.
- Law, R.J., M. Alae, C.R. Allchin, J.P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom et G.A. Stern. 2003. «Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife». *Environment International*, vol. 29, no 6, p. 757-770.
- Legler, J. et A. Brouwer. 2003. «Are brominated flame retardants endocrine disruptors?». *Environment International*, vol. 29, no 6, p. 879-885.
- Lind, P.M., A. Bergman, M. Olsson et J. Öberg. 2003. «Bone Mineral Density in Male Baltic Grey Seal (*Halichoerus grypus*)». *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, vol. 32, no 6, p. 385-388.
- Lind, P.M., M. R. Milnes, R. Lundberg, D. Bermudez, J.A. Öberg et L.J. Guillette, Jr. 2004. «Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida)». *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, no 3, p. 359-362.
- Lind, P.M., C. Wejheden, R. Lundberg, P. Alvarez-Lloret, S.A.B. Hermsen, A.B. Rodriguez-Navarro, S. Larsson et A. Rannug. 2009a. «Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats». *Chemosphere*, vol. 75, no 5, p. 680-684.
- Lind, P.M., M. Gustafsson, S.A.B. Hermsen, S. Larsson, C.E. Kyle, J. Öberg et S.M. Rhind. 2009b. «Exposure to pastures fertilised with sewage sludge disrupts bone tissue homeostasis in sheep». *Science of The Total Environment*, vol. 407, no 7, p. 2200-2208.
- Lind, P.M., D. Öberg, S. Larsson, C.E. Kyle, J. Öberg et S.M. Rhind. 2010. «Pregnant ewes exposed to multiple endocrine disrupting pollutants through sewage sludge-fertilized pasture show an anti-estrogenic effect in their trabecular bone». *Science of The Total Environment*, vol. 408, no 11, p. 2340-2346.
- Lindberg, P., U. Sellström, L. Häggberg et C.A. de Wit. 2003. «Higher Brominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane Found in Eggs of Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) Breeding in Sweden». *Environmental Science & Technology*, vol. 38, no 1, p. 93-96.
- Lundberg, R., J.L. Lyche, E. Ropstad, M. Aleksandersen, M. Rönn, J.U. Skaare, S. Larsson, J. Öberg et P.M. Lind. 2006. «Perinatal exposure to PCB 153, but not PCB 126, alters bone tissue composition in female goat offspring». *Toxicology*, vol. 228, no 1, p. 33-40.

- Lundberg, R., B.M. Jenssen, À. Leiva-Presa, M. Rönn, C. Hernhag, C. Wejheden, S. Larsson, J. Örberg et P.M. Lind. 2007. «Effects of Short-term Exposure to the DDT Metabolite p,p'-DDE on Bone Tissue in Male Common Frog (*Rana temporaria*)». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 70, no 7, p. 614-619.
- Ma, Y., M. Venier et R.A. Hites. 2011. «2-Ethylhexyl Tetrabromobenzoate and Bis(2-ethylhexyl) Tetrabromophthalate Flame Retardants in the Great Lakes Atmosphere». *Environmental Science & Technology*, vol. 46, no 1, p. 204-208.
- Marie, P.J. 1982. «Structure, organisation, and healing». In *The musculoskeletal system : Embryology, biochemistry, and physiology*, R.L. Cruess (Éd), p.109-169. New York : Churchill Livingstone.
- Martin, T.J., et N.A. Sims. 2005. «Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption». *Trends in Molecular Medicine*, vol. 11, no 2, p. 76-81.
- McDonald, T.A. 2002. «A perspective on the potential health risks of PBDEs». *Chemosphere*, vol. 46, no 5, p. 745-755.
- McGowan, J.A. 1996. «Bone: target and source of environmental pollutant exposure». *Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 114, no 2, p. 220-223.
- McNabb, F.M.A. 2007. «The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Birds and Its Role in Bird Development and Reproduction». *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 37, no 1-2, p. 163-193.
- Meerts, I.A.T.M., J.J. van Zanden, E.A.C. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, À. Bergman et A. Brouwer. 2000. «Potent Competitive Interactions of Some Brominated Flame Retardants and Related Compounds with Human Transthyretin in Vitro». *Toxicological Sciences*, vol. 56, no 1, p. 95-104.
- Morris, S., C.R. Allchin, B.N. Zegers, J.J.H. Haftka, J.P. Boon, C. Belpaire, P.E.G. Leonards, S.P.J. van Leeuwen et J. de Boer. 2004. «Distribution and Fate of HBCD and TBBPA Brominated Flame Retardants in North Sea Estuaries and Aquatic Food Webs». *Environmental Science & Technology*, vol. 38, no 21, p. 5497-5504.
- Mundy, G.R., J.L. Shapiro, J.G. Bandelin, E.M. Canalis et L.G. Raisz. 1976. «Direct Stimulation of Bone Resorption by Thyroid Hormones». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 58, p. 529-534.
- Nakari, T. et S. Huhtala. 2010. «In vivo and in vitro toxicity of decabromodiphenyl ethane, a flame retardant». *Environmental Toxicology*, vol. 25, no 4, p. 333-338.
- Nordin, M. et V.H. Frankel. 2001. «Biomechanics of bone». In *Basic Biomechanics of the musculoskeletal system*, 3e édition, M. Nordin et V.H. Frankel, p.27-58. Philadelphie: Lippincott Williams & Wilkins.

- Norstrom, R.J., M. Simon, J. Moisey, B. Wakeford et D.V.C. Weseloh. 2002. «Geographical Distribution (2000) and Temporal Trends (1981-2000) of Brominated Diphenyl Ethers in Great Lakes Herring Gull Eggs». *Environmental Science & Technology*, vol. 36, no 22, p. 4783-4789.
- Porterfield, S.P. 2000. «Thyroidal dysfunction and environmental chemicals--potential impact on brain development». *Environmental Health Perspectives*, vol. 108, Suppl 3, p. 433-438.
- Proctor, N.S., et P.J. Lynch. 1993. *Manual of Ornithology Avian Structure & Function*. New Haven: Yale University Press, 340 p.
- Raggatt, L.J., et N.C. Partridge. 2010. «Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no 33, p. 25103-25108.
- Risteli, L. et J. Risteli. 1993. «Biochemical Markers of Bone Metabolism». *Annals of Medicine*, vol. 25, no 4, p. 385-393.
- Roodman, G.D. 1999. «Cell biology of the osteoclast». *Experimental Hematology*, vol. 27, no 8, p. 1229-1241.
- Ronisz, D., E.F. Finne, H. Karlsson et L. Förlin. 2004. «Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout». *Aquatic Toxicology*, vol. 69, no 3, p. 229-245.
- Roos, A., F. Rigét et J. Örberg. 2010. «Bone mineral density in Swedish otters (*Lutra lutra*) in relation to PCB and DDE concentrations». *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, no 5, p. 1063-1070.
- Routti, H., M. Nyman, B.M. Jenssen, C. Bäckman, J. Koistinen et G.W. Gabrielsen. 2008. «Bone-related effects of contaminants in seals may be associated with vitamin D and thyroid hormones». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, no 4, p. 873-880.
- Sellström, U., A. Kierkegaard, C. de Wit et B. Jansson. 1998. «Polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from a Swedish River». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 17, no 6, p. 1065-1072.
- Sellström, U., A. Bignert, A. Kierkegaard, L. Häggberg, C. A. de Wit, M. Olsson et B. Jansson. 2003. «Temporal Trend Studies on Tetra- and Pentabrominated Diphenyl Ethers and Hexabromocyclododecane in Guillemot Egg from the Baltic Sea». *Environmental Science & Technology*, vol. 37, no 24, p. 5496-5501.
- Sonne, C., R. Dietz, E. W. Born, F. F. Riget, M. Kirkegaard, L. Hyldstrup, R. J. Letcher et D. C. G. Muir. 2004. «Is Bone Mineral Composition Disrupted by Organochlorines in East

Greenland Polar Bears (*Ursus maritimus*)?». *Environ Health Perspect*, vol. 112, no 17, p. 1711-1716.

Stapleton, H.M., S. Klosterhaus, S. Eagle, J. Fuh, J.D. Meeker, A. Blum et T.F. Webster. 2009. «Detection of Organophosphate Flame Retardants in Furniture Foam and U.S. House Dust». *Environmental Science & Technology*, vol. 43, no 19, p. 7490-7495.

Stockholm Convention Secretariat. 2008. «Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POP)». En ligne. <<http://chm.pops.int/default.aspx>>. Consulté le 20 février 2011.

Sverko, E., G.T. Tomy, E.J. Reiner, Y.-F. Li, B.E. McCarry, J.A. Arnot, R.J. Law et R.A. Hites. 2011. «Dechlorane Plus and Related Compounds in the Environment: A Review». *Environmental Science & Technology*, vol. 45, no 12, p. 5088-5098.

Swarthout, J.T., R.C. D'Alonzo, N. Selvamurugan et N.C. Partridge. 2002. «Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells». *Gene*, vol. 282, no 1-2, p. 1-17.

Teitelbaum, S.L., et F.P. Ross. 2003. «Genetic regulation of osteoclast development and function». *Nature Reviews Genetics*, vol. 4, no 8, p. 638-649.

Tomy, G.T., V.P. Palace, K. Pleskach, N. Ismail, T. Oswald, R. Danell, K. Wautier et B. Evans. 2007a. «Dietary Exposure of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to 1,2-bis(2,4,6-tribromo- phenoxy)ethane: Bioaccumulation Parameters, Biochemical Effects, and Metabolism». *Environmental Science & Technology*, vol. 41, no 14, p. 4913-4918.

Tomy, G.T., K. Pleskach, N. Ismail, D. Michael Whittle, P.A. Helm, E. Sverko, D. Zaruk et C.H. Marvin. 2007b. «Isomers of Dechlorane Plus in Lake Winnipeg and Lake Ontario Food Webs». *Environmental Science & Technology*, vol. 41, no 7, p. 2249-2254.

Ucán-Marín, F., A. Arukwe, A. Mortensen, G.W. Gabrielsen, G.A. Fox et R.J. Letcher. 2009a. «Recombinant Transthyretin Purification and Competitive Binding with Organohalogen Compounds in Two Gull Species (*Larus argentatus* and *Larus hyperboreus*)». *Toxicological Sciences*, vol. 107, no 2, p. 440-450.

Ucán-Marín, F., A. Arukwe, A. Mortensen, G.W. Gabrielsen et R.J. Letcher. 2009b. «Recombinant Albumin and Transthyretin Transport Proteins from Two Gull Species and Human: Chlorinated and Brominated Contaminant Binding and Thyroid Hormones». *Environmental Science & Technology*, vol. 44, no 1, p. 497-504.

Väänänen, H.K., H. Zhao, M. Mulari et J.M. Halleen. 2000. «The cell biology of osteoclast function». *Journal of Cell Science*, vol. 113 (Pt 3), p. 377-381.

van der Ven, L.T.M., T. van de Kuil, A. Verhoef, P.E.G. Leonards, W. Slob, R.F. Cantón, S. Germer, T. Hamers, T.J. Visser, S. Litens, H. Håkansson, Y. Fery, D. Schrenk, M. van den Berg, A.H. Piersma et J.G. Vos. 2008. «A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect

endocrine effects of a purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats». *Toxicology*, vol. 245, no 1-2, p. 109-122.

Verreault, J., G.W. Gabrielsen, S. Chu, D.C.G. Muir, M. Andersen, A. Hamaed et R.J. Letcher. 2005. «Flame Retardants and Methoxylated and Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers in Two Norwegian Arctic Top Predators: Glaucous Gulls and Polar Bears». *Environmental Science & Technology*, vol. 39, no 16, p. 6021-6028.

Verreault, J., W.A. Gebbink, L.T. Gauthier, G.W. Gabrielsen et R.J. Letcher. 2007. «Brominated Flame Retardants in Glaucous Gulls from the Norwegian Arctic : More Than Just an Issue of Polybrominated Diphenyl Ethers». *Environmental Science & Technology*, vol. 41, no 14, p. 4925-4931.

Wada, T., T. Nakashima, N. Hiroshi et J. M. Penninger. 2006. «RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease». *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no 1, p. 17-25.

Wu, J.-P., Y. Zhang, X.-J. Luo, J. Wang, S.-J. Chen, Y.-T. Guan et B.-X. Mai. 2009. «Isomer-Specific Bioaccumulation and Trophic Transfer of Dechlorane Plus in the Freshwater Food Web from a Highly Contaminated Site, South China». *Environmental Science & Technology*, vol. 44, no 2, p. 606-611.

Zhang, X.-L., X.-J. Luo, H.-Y. Liu, L.-H. Yu, S.-J. Chen et B.-X. Mai. 2010. «Bioaccumulation of Several Brominated Flame Retardants and Dechlorane Plus in Waterbirds from an E-Waste Recycling Region in South China: Associated with Trophic Level and Diet Sources». *Environmental Science & Technology*, vol. 45, no 2, p. 400-405.