

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
Centre Eau Terre Environnement

Comparaison de la toxicité des pétroles conventionnels et non-conventionnels sur trois espèces de poissons d'eau douce : effets moléculaires, développement et santé globale

Par
Roxanne Bérubé

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	M ^{me} Isabelle Lavoie INRS, Centre Eau Terre Environnement
Examinatrice externe	M ^{me} Eve Gilroy Environnement et Changement climatique Canada
Examinatrice externe	M ^{me} Sarah Alderman Department of Integrative Biology University of Guelph
Directeur de recherche	M. Patrice Couture INRS, Centre Eau Terre Environnement
Codirectrice de recherche	M ^{me} Valérie Langlois INRS, Centre Eau Terre Environnement

Remerciements

Je n'aurais pu mener ce projet de thèse sans l'appui, la confiance et les judicieux conseils de mes directeurs Valérie Langlois et Patrice Couture. Je vous remercie sincèrement pour votre support et vos encouragements durant ces années de travail. L'équilibre et les différences entre vos styles d'encadrement ont été très enrichissants et m'ont appris énormément sur moi-même.

Ce projet n'aurait pas vu le jour sans la collaboration et la participation de Charles Gauthier, Gaëlle Triffault-Bouchet et Normand Bergeron. Je vous remercie pour vos contributions, elles ont permis de réaliser un projet d'envergure et de qualité.

Je remercie les membres de mon jury Isabelle Lavoie, Ève Gilroy et Sarah Alderman d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Vos commentaires, questions et suggestions ont grandement aidé à améliorer la qualité de ma thèse.

Je remercie sincèrement mes stagiaires pour leurs contributions inestimables. Thibault, Marilou, Molly, Pauline et Camille, je suis extrêmement reconnaissante de votre travail! Je sais que vous avez travaillé fort et que ça n'a pas toujours été simple! Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite de vos parcours et dans vos carrières respectives.

J'ai eu la chance d'être entourée de deux équipes de laboratoire, où l'entraide et la bonne humeur règnent. Mon parcours aurait été franchement différent sans vous mes collègues et ami(e)s. La Sushi Team : Mackenzie, Anthony, Elyas, Nishodi, Magali, Charlotte B et le Langlois lab : Julie, Paisley, Sarah, Lucie, Linda Lara, Vincent, Scott, Mélanie, Juan, Tuan, Marc et Véronica. Vous allez me manquer! Je me considère extrêmement chanceuse d'avoir pu travailler avec chacun et chacune d'entre vous. J'espère sincèrement que nos chemins se croiseront à nouveau et que nous pourrons collaborer et mener de grands projets de recherche ensemble!

Merci Jérôme Comte de m'avoir accueillie dans ton équipe. Charis, Martial, Christophe, Marie-Ange, Emmy, Laura et Aurélie, vous êtes une belle équipe, continuez de vous supporter et de vous entraider, c'est la clé pour survivre aux études supérieures!

Merci à mes mentors précédents : Pierre Rioux, Nicolas Pichaud, Pierre Blier et Patrick Rochette. Vous m'avez montré le travail et l'organisation nécessaire pour mener un projet de recherche de qualité. Vous êtes des chercheurs inspirants. Je ne serais sûrement pas parvenue au doctorat sans Pierre Rioux! Pierre, ta présence et ton appui durant mon baccalauréat (et encore aujourd'hui!) m'auront permis de me rendre ici aujourd'hui. Je t'en serais éternellement reconnaissante.

Camille B, Sofia F et Isbath j'ai adoré travailler avec vous sur le comité d'ÉcoBIM!

Mes amies précieuses : Sarah A, Angela P-W, Charlotte L-F et Élisabeth V. Merci pour tous les moments passés ensemble, je les chéris tous. Je vous souhaite le meilleur dans vos parcours respectifs. Je vous aime!

Mackenzie et Camille, je suis tellement chanceuse d'avoir pu travailler avec vous deux. Sans vous, les longues journées passées au labo n'auraient jamais été aussi divertissantes! Merci pour les fous rires et pour votre présence dans les moments plus difficiles. Merci pour le champagne à la plage :) Mack, I will NEVER forget the images... you know which ones! Thanks for complaining with me and cheering me up when I needed it. You always knew what I needed to hear. You are the best! I can't wait to collaborate and do amazing research with you babe!

Enfin, ma famille et mon amoureux, je suis extrêmement chanceuse d'avoir votre soutien, votre réconfort et vos encouragements! Sans vous, je ne serais pas ici aujourd'hui. Sylvie, Denis, Gaby, Céline, Alexe, Suzanne, Brigitte, Mimi et Guillaume, je vous aime tant!

Épigraphe

“Would you tell me, please, which way I ought to go from here?”
“That depends a good deal on where you want to get to,” said the Cat.
“I don’t much care where—” said Alice.
“Then it doesn’t matter which way you go,” said the Cat.
“—so long as I get SOMEWHERE,” Alice added as an explanation.
“Oh, you’re sure to do that,” said the Cat, “if you only walk long enough.”
-Alice in Wonderland

‘‘On n’apprend pas le surf bien au sec, dans les manuels; on apprend le surf dans l’eau, broyé par la mer, déchiré sur les récifs, les coraux, suffoquant dans l’écume.’’
- Carnets de naufrage, Guillaume Vigneault

Résumé

La production de produits pétroliers du Canada est en constante augmentation, principalement due à l'exploitation des sables bitumineux. Les pétroles bitumineux circulent majoritairement par oléoducs, dans lesquels ils doivent être dilués pour diminuer leur viscosité et augmenter leur fluidité. Ils sont alors nommés les pétroles bitumineux dilués (dilbit). L'ajout de diluant fait varier la composition chimique des pétroles bitumineux en augmentant la quantité d'hydrocarbures légers. Avec l'augmentation de la quantité d'oléoducs et du volume de ces produits qui circulent en Amérique du Nord, il est nécessaire d'étudier les effets de ces pétroles sur les écosystèmes dulcicoles. Dans le cadre de cette thèse, la toxicité des pétroles conventionnels et des pétroles bitumineux a été évaluée et comparée chez trois espèces de poissons d'eau douce du Canada, durant leurs jeunes stades de développement. Les résultats ont démontré que les dilbits étaient plus toxiques que le pétrole conventionnel, et cette toxicité était principalement induite par la concentration plus élevée de composés légers. La majorité des biomarqueurs des voies de détoxification augmentent en fonction de la quantité totale d'hydrocarbures, mais ne sont pas nécessairement des indicateurs précis de la toxicité des mélanges d'hydrocarbures. Les premiers stades de développement sont les plus sensibles aux hydrocarbures, les embryons exposés à partir de la fertilisation subissent des retards et des troubles de croissance. D'ailleurs, les expositions de la truite arc-en-ciel ont permis d'observer que les embryons s'étant développés dans un milieu contaminé avaient de plus faibles chances de survie et plus de probabilité d'avoir des malformations, malgré une remédiation du milieu. Les expositions du saumon atlantique ont permis d'observer que les hydrocarbures peuvent perturber des voies moléculaires essentielles, par exemple les rétinoïdes et la réparation de l'ADN. Globalement, cette thèse met en évidence l'importance d'obtenir un profil chimique complet des pétroles et de l'eau contaminée aux hydrocarbures, afin d'évaluer les risques environnementaux des déversements d'hydrocarbures en eau douce. En effet, les différents types de composés chimiques des pétroles induisent des effets spécifiques sur les organismes. Finalement, cette thèse a confirmé que la sensibilité des organismes aquatiques exposés aux produits pétroliers varie entre les espèces. Ces résultats permettront de protéger les espèces de poissons d'eau douce du Canada, particulièrement les salmonidés qui sont les plus sensibles aux expositions aux hydrocarbures, mais qui sont importants pour l'économie et la culture canadienne. Puis, les résultats obtenus par cette thèse pourront être utilisés par les ministères canadiens et québécois, afin de mettre à jour les plans d'interventions en cas de déversements de pétroles bitumineux en eau douce.

Mots clés : Hydrocarbures, pétrole non conventionnel, pétrole conventionnel, toxicité chronique, toxicité aquatique, développement, métabolisme de détoxification, métabolisme du stress oxydant.

Abstract

Canada's production of petroleum products is constantly increasing, mainly due to the exploitation of oil sands. The bituminous oils circulate mainly through pipelines, in which they must be diluted to reduce their viscosity and increase their fluidity. They are then called diluted bitumen (dilbit). The chemical composition of the dilbit varies with the addition of diluent which increases the amount of low molecular weight hydrocarbons. With the increasing volume of dilbits circulating in pipelines in North America, there is a need to study the effects of these oils on freshwater ecosystems. In this thesis, the toxicity of conventional oil and dilbits was evaluated and compared in three species of Canadian freshwater fish during their early developmental stages. The results showed that dilbits were more toxic than conventional oil, and this toxicity was mainly induced by the higher concentration of low molecular weight hydrocarbons. The majority of biomarkers of detoxification pathways increased with the total amount of hydrocarbons but were not necessarily accurate indicators of the toxicity of oil mixtures. Early developmental stages are the most sensitive to hydrocarbons, with embryos exposed from fertilization onward experiencing developmental delays and deformities. Moreover, rainbow trout exposures throughout their embryonic development had lower chances of survival and higher probability of having malformations, despite environmental remediation. Atlantic salmon exposures have shown that hydrocarbons can disrupt essential molecular pathways, such as retinoids and DNA repair. Overall, this thesis highlights the importance of obtaining a complete chemical profile of the oils and oil-contaminated water in order to assess the environmental risks of spills in freshwater ecosystems. Indeed, the different types of chemical compounds in oils induce specific effects on organisms. Finally, this thesis confirmed that different species have variable sensitivities to petroleum product exposures. These results will help protect Canada's freshwater fish species, particularly salmonids, which are the most sensitive to hydrocarbon exposures, and are important to the Canadian economy and culture. The results of this thesis can be used by Canadian and Quebec government departments to update their response plans in case of oil spills in freshwater.

Keywords: Hydrocarbons, unconventional oil, conventional oil, chronic toxicity, aquatic toxicity, development, detoxification pathway, oxidative stress pathway.

Table des matières

Remerciements	iii
Épigraphe	vi
Résumé	viii
Abstract	x
Table des matières	xii
Liste des figures	xvii
Liste des tableaux	xx
Liste des abréviations	xxii
1 Introduction	1
1.1 <i>Mise en contexte</i>	1
1.1.1 Originalité de l'étude	2
1.1.2 Objectifs généraux de la thèse	2
1.2 <i>Revue de littérature</i>	4
1.2.1 Réserves canadiennes de produits pétroliers	4
1.2.2 Extraction des pétroles conventionnels et bitumineux	4
1.2.3 Transport	5
1.2.4 Les produits pétroliers : Des mélanges hétérogènes	7
1.2.5 Hydrocarbures et composés aromatiques polycycliques	8
1.2.6 Composés organiques volatils	9
1.2.7 Composés saturés	10
1.2.8 Résines et asphaltènes	10
1.2.9 Métaux	11
1.2.10 Déversements importants et leurs impacts environnementaux	12
1.2.11 Toxicité des pétroles bitumineux	13
1.2.12 Métabolisme de détoxification xénobiotique	13
1.2.13 Stress oxydant	16
1.2.14 AhR et voies métaboliques connexes	20
1.2.15 Toxicité cardiovasculaire des produits pétroliers	22
1.2.16 Effets des produits pétroliers sur le développement embryonnaire	24
1.3 <i>Les espèces à l'étude</i>	26
1.3.1 Le mené à grosse tête (<i>Pimephales promelas</i>)	26
1.3.2 La truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	27
1.3.3 Le saumon atlantique (<i>Salmo salar</i>)	28
1.4 <i>Les pétroles de l'étude</i>	29
1.5 <i>Structure de la thèse</i>	31
2 Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) larvae exposed during their early development	35
2.1 <i>Abstract</i>	36
2.2 <i>Introduction</i>	37
2.3 <i>Methodology</i>	39
2.3.1 Oils and chemical analysis	39
2.3.2 Exposures and WAF preparation	39
2.3.3 Enzyme activity (SOD, CAT and GST)	40

2.3.4	Gene expression analysis	41
2.3.5	Lipid peroxidation analysis	41
2.3.6	Statistical analysis	42
2.4	<i>Results</i>	42
2.4.1	Chemistry	42
2.4.2	Mortality	43
2.4.3	Mean weight	44
2.4.4	Gene expression and enzymatic activity of SOD and CAT	45
2.4.5	Expression of <i>cy1a</i>	45
2.4.6	Gene expression and enzymatic activity of GST	46
2.4.7	Lipid peroxidation	49
2.4.8	Principal component analysis (PCA)	50
2.5	<i>Discussion</i>	51
2.6	<i>Funding</i>	55
2.7	<i>Acknowledgements</i>	55
2.8	<i>Supplementary data</i>	56
3	Comparative toxicity of conventional and unconventional oil during rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) embryonic development: From molecular to individual health consequences	64
3.1	<i>Highlights</i>	65
3.2	<i>Graphical abstract</i>	66
3.3	<i>Abstract</i>	67
3.4	<i>Introduction</i>	68
3.5	<i>Methodology</i>	70
3.5.1	Oils and chemical analysis	70
3.5.2	WAF preparation	70
3.5.3	Exposures	70
3.5.4	Developmental delays	72
3.5.5	Gene expression analysis	72
3.5.6	CYP1A activity	73
3.5.7	Lipid peroxidation analysis	73
3.5.8	Statistical analysis	74
3.6	<i>Results</i>	74
3.6.1	Chemistry	74
3.6.2	Developmental delays	75
3.6.3	Mortality	76
3.6.4	CYP1A gene expression	78
3.6.5	CYP1A activity	78
3.6.6	Lipid peroxidation	81
3.6.7	Principal component analysis (PCA)	81
3.7	<i>Discussion</i>	82
3.7.1	Chemistry	83
3.7.2	Developmental delays	84
3.7.3	Mortality	84
3.7.4	CYP1A gene expression and enzyme activity	86
3.7.5	Principal component analysis	87
3.8	<i>Conclusions</i>	87
3.9	<i>Funding</i>	89
3.10	<i>Acknowledgements</i>	89

3.11	<i>Author Statement</i>	89
3.12	<i>Supplementary materials</i>	90
4	Molecular effects and early developmental toxicity of a conventional and an unconventional oil on the Atlantic salmon	105
4.1	<i>Highlights</i>	106
4.2	<i>Graphical abstract</i>	107
4.3	<i>Abstract</i>	108
4.4	<i>Introduction</i>	109
4.5	<i>Methodology</i>	112
4.5.1	Oils and chemical analysis	112
4.5.2	WAF preparation	112
4.5.3	Exposures	112
4.5.4	qPCR analysis	113
4.5.5	Cellular oxidative damage	114
4.5.6	Developmental delays	115
4.5.7	Statistical analysis	115
4.6	<i>Results</i>	116
4.6.1	Oils and chemical analysis	116
4.6.2	Mortality	117
4.6.3	Detoxification pathway	118
4.6.4	Oxidative damage	120
4.6.5	Gene expression of retinoids and DNA repair protein	121
4.6.6	Developmental delays	124
4.6.7	Principal components analysis (PCA)	125
4.7	<i>Discussion</i>	126
4.8	<i>Conclusions</i>	128
4.9	<i>Funding</i>	130
4.10	<i>Acknowledgements</i>	130
4.11	<i>Supplementary materials</i>	131
5	Discussion générale et conclusions	161
5.1	<i>Principaux résultats</i>	161
5.1.1	Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) larvae exposed during their early development	161
5.1.2	Comparative toxicity of conventional and unconventional oils during rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) embryonic development: From molecular to health consequences	162
5.1.3	Molecular effects and early developmental toxicity of a conventional and unconventional oil on the Atlantic salmon	163
5.2	<i>Comparaison des résultats</i>	164
5.2.1	Compositions chimiques des WAF	165
5.2.2	Physiologie des espèces : stade de développement et différences moléculaires	167
5.3	<i>Limites de l'étude</i>	171
5.4	<i>Retombées scientifiques</i>	173
5.5	<i>Perspectives</i>	176
6	Bibliographie	179
7	Annexe	200

7.1	<i>Protocoles expérimentaux détaillées</i>	200
7.1.1	Préparation des WAF	200
7.1.2	Détails des expositions	202
7.2	<i>Résultats supplémentaires</i>	204

Liste des figures

Figure 1.1. Composition des sables bitumineux	5
Figure 1.2. Types d'oléoducs pour le transport des produits pétroliers du Canada	6
Figure 1.3. Molécule de phénanthrène (A) et une de ses formes alkylées, le C1 phénanthrène (B).	9
Figure 1.4. Structure moléculaire des BTEX.	10
Figure 1.5. Schéma de représentation du métabolisme des hydrocarbures dans la cellule eucaryote.....	15
Figure 1.6. Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des dommages cellulaires par la métabolisation des HAP, exemple du benzo[α]pyrène.	17
Figure 1.7. Formation des 8-OHdG	19
Figure 1.8. <i>Pimephales promelas</i> femelle (A) et mâle (B).	27
Figure 1.9. Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) adulte.	27
Figure 1.10. Saumon atlantique (<i>Salmo salar</i>)	28
Figure 1.11. Carte géographique présentant la distribution des sables bitumineux dans la province de l'Alberta au Canada	30
Figure 2.1. Percentage of mortality of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the Lloydminster conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Bluesky and Clearwater	44
Figure 2.2. Relative <i>cyp1a</i> mRNA level of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater.	46
Figure 2.3. Relative <i>gst</i> level of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the Lloydminster conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Bluesky, and Clearwater.	47
Figure 2.4. GST activity of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater.	48
Figure 2.5. MDA concentration of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater.	49
Figure 2.6. Principal component analysis (n = 150) presenting the relationships between WAF concentrations, components measured in the oils (PAHs, VOCs, and C6-C10), and the various biomarkers analysed in FHM larvae.	50
Figure S2.1. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of measured PAHs (A) and VOCs (B) in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB), and the Clearwater McMurray (DB).	59
Figure S2.2. Mean weight of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster (CV); Bluesky (DB) and Clearwater (DB).....	60
Figure S2.3. <i>Sod1</i> relative expression as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C6-C10 (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Data are presented as means \pm SEM with a regression line, if statistically significant ($p = 0.05$).	61

Figure S2.4. Superoxide dismutase enzymatic activity (U/g) as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C ₆ -C ₁₀ (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB).	61
Figure S2.5. CAT relative expression as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C ₆ -C ₁₀ (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB).	62
Figure S2.6. CAT enzymatic activity (U/g) as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs and C ₆ -C ₁₀ (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB).	62
Figure 3.1. Experimental design of the five rainbow trout exposures. The exposures were conducted during three developmental stages in rainbow trout.	71
Figure 3.2. Embryos from the Exposure 1, at approximately 276 to 300 degree-days. Growth measurements of the eye (A) and the lens (B) length normalized on the egg diameter of embryos (n = 3)	76
Figure 3.3. Mortality (A, D, G, J, M), <i>cyp1a</i> expression (B, E, H, K, N) and enzymatic activity (C, F, I, L, O) for the five exposures to Lloydminster conventional oil or Clearwater dilbit WAF dilutions	81
Figure 3.4. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (MDA, CYP1A, <i>cyp1a1</i> and mortality) and the oils components (PAHs and VOCs) in rainbow trout embryos and juveniles.	82
Figure S3.1. Concentration of PAHs and alkylated-PAHs (A) and in VOCs/BTEX (B) measured in the Lloydminster conventional oil and in the Clearwater dilbit (n=1).	94
Figure S3.2. Concentrations of PAHs and alkylated-PAHs measured in each WAF concentrations prepared with the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater dilbit (B) (n=3).	95
Figure S3.3. Concentrations VOCs and BTEX measured in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A) and of the Clearwater dilbit (B) (n=3).	96
Figure S3.4. Cumulative hatching per day for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit in Exposure 1 – from fertilization (A) and in Exposure 3 – from eyed stage (B).	97
Figure S3.5. Daily mortality of embryos exposed from fertilization to hatching (Exposure 1) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B)	98
Figure S3.6. Daily mortality of embryos exposed from eyed stage to hatching (Exposure 3) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B).	99
Figure S3.7. Daily mortality of embryos exposed from eyed stage to yolk sac resorption (Exposure 4) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B).	100
Figure S3.8. Daily mortality of embryos exposed from hatching to yolk sac resorption (Exposure 5) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B).	101
Figure S3.9. MDA concentration measured with the TBARS assay in larvae (μMol/g tissue) for Exposure 1 and 3 (A, B) and in juvenile (μMol/mg of prot) for exposure 4 and 5 (C, D), exposed to Lloydminster conventional oil or Clearwater dilbit WAF dilutions	102
Figure S3.10. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (MDA, CYP1A, <i>cyp1a1</i> and mortality) and the oils components (PAHs and VOCs) in rainbow trout embryos and juveniles.	103
Figure 4.1. Experimental design of the Atlantic salmon exposures	113
Figure 4.2. Percentage of mortality of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit.	117
Figure 4.3. Relative <i>cyp1a</i> mRNA level of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit	119

Figure 4.4. Relative <i>gst</i> level and GST enzyme activity of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit	120
Figure 4.5. Oxidative damage measured by MDA concentration (A, B) and 8-OHdG (C, D) of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A, C) or from eyed stage (B, D) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit.....	121
Figure 4.6. Relative gene expression (<i>aldh1a2</i> , <i>cyp26a1</i> , <i>PCNA</i> , and <i>xrcc1</i>) of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit.	123
Figure 4.7. Percentage of embryos carrying malformations for embryos exposed to the Lloydminster conventional oil or to the Clearwater dilbit WAF, from fertilization (A) and from eyed stage (B)	125
Figure S4.1. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of measured VOCs in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A), and the Clearwater McMurray dilbit (B).	152
Figure S4.2. Concentrations of PAHs ($\mu\text{g/L}$) in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A), and the Clearwater McMurray dilbit (B).	153
Figure S4.3. Concentration of C6-C10 (A), VOCs (B) and PAHs (C) in function of the WAF concentration for both oils.....	154
Figure S4.4. Hatching density per degree-day for both exposures for the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater dilbit (B).	155
Figure S4.5. Percentage of mortality per degree-day for both oils in exposure 1 (A) and in exposure 2 (B).	156
Figure S4.6. Percentage of each malformation (edemas and hemorrhages) observed for the Clearwater dilbit (A, C) and the Lloydminster (B, D) conventional oil in exposure 1 (top panels) and in exposure 2 (bottom panels).	157
Figure S4.7. Examples of the malformations pointed by the red arrow.....	158
Figure S4.8. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (<i>8-OHdG</i> , <i>PCNA</i> , <i>cyp1a1</i> , <i>cyp26a1</i> , <i>aldh1a2</i> , <i>xrcc1</i> , <i>gstπ</i> , GST, MDA, weight, and mortality) and the oils components (PAHs, VOCs and C ₆ -C ₁₀) in Atlantic salmon embryos	159
Figure S7.1. Exemple de préparation des WAF lors de l'exposition du mené à grosse tête.	200
Figure S7.2. Exemple de préparation des WAF lors de l'exposition de la truite arc-en-ciel.	201
Figure S7.3. Photographie d'une section de l'exposition des mené à grosse tête	202
Figure S7.4. Photographie de la salle d'exposition de la truite arc-en-ciel.....	202
Figure S7.5. Photographie d'une section de l'exposition du saumon atlantique.	203

Liste des tableaux

Table 2.1. Mean concentrations of PAHs, VOCs, including BTEX, and C6-C10 measured in 1 %, 10 % and 75 % WAF for each oil (n = 2- 3).	43
Table S2.1. Concentrations (µg/L) of measured PAHs in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB) and the Clearwater McMurray (DB)	56
Table S2.2. Concentrations (µg/L) of measured VOCs, including BTEX, in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB) and the Clearwater McMurray (DB).	57
Table S2.3. Genes of interest and specific primer parameters.	58
Table 3.1. Concentration of the sum of 64 VOCs (including BTEX), and the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs in each WAF dilution from the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).	75
Table S3.1. Genes of interest and specific primer parameters.	90
Table S3.2. Regression statistics of mortality, relative <i>cyp1a</i> levels and EROD activity responses following the 5 exposures of WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil or Clearwater McMurray dilbit.	91
Table S3.3. Effective concentration 20 (EC20) determined by dose-response modelling of the mortality, the relative <i>cyp1a</i> levels and the EROD activity responses following the exposure to the Lloydminster conventional oil or the Clearwater McMurray dilbit.	93
Table 4.1. Mean concentration of the sum of 64 VOCs, the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs, and the total C6-C10 in each WAF dilution of the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).	116
Table S4.1. Genes of interest and specific primer parameters.	131
Table S4.2. Concentration of the sum of 64 VOCs, the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs, and the total C6-C10 in the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).	132
Table S4.3. Results of 2-way ANOVAs showing p value for oil type, WAF concentrations and their interaction.	133
Table S4.4. Results of the pairwise comparison, comparing the mortality induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	134
Table S4.5. Results of the pairwise comparison, comparing the mortality induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	135
Table S4.6. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>cyp1a</i> expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	136
Table S4.7. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>cyp1a</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	137
Table S4.8. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>cyp1a</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	138
Table S4.9. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>gst</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	139

Table S4.10. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	140
Table S4.11. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	141
Table S4.12. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	142
Table S4.13. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	143
Table S4.14. Results of the pairwise comparison, comparing the MDA concentration induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	144
Table S4.15. Results of the pairwise comparison, comparing the MDA concentration induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	145
Table S4.16. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>aldh1a2</i> expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	146
Table S4.17. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>cyp26a1</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	147
Table S4.18. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>cyp26a1</i> expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.	148
Table S4.19. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>pcna</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	149
Table S4.20. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>pcna</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	150
Table S4.21. Results of the pairwise comparison, comparing the <i>xrcc1</i> expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.	151
Tableau 5.1. Comparaison des profils chimiques des WAF utilisés dans chacun des chapitres.	167
Tableau 5.2. Comparaison des gènes AhR et la sensibilité du mené à grosse tête, de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique lors d'expositions au pétrole conventionnel Lloydminster et aux dilbits Bluesky et Clearwater McMurray.	170
Tableau S7.1. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans les WAF de 1, 10 et 75 % des trois pétroles, lors des expositions du mené à grosse tête.	204
Tableau S7.2. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans toutes les concentrations de WAF des deux pétroles, lors des expositions de la truite arc-en-ciel.	205
Tableau S7.3. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans toutes les concentrations de WAF des deux pétroles, lors des expositions du saumon atlantique.	206

Liste des abréviations

8-OHdG	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur aryl-hydrocarbure,
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ANOVA	Analysis de variance
ARNT	<i>aryl-hydrocarbon nuclear translocator</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> ou hélice-boucle-hélice
BPDE	Benzo[α]pyrène époxyde diol
BSD	<i>Blue sac disease</i>
BTEX	Benzene, Toluene, Ethylbenze, Xylene
C ₆ -C ₁₀	Hydrocarbons with 6 to 10 carbon atoms
<i>cat</i>	Catalase - gène
CAT	Catalase - enzyme
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenze
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CLB	Cold lake blend
COV	Composés organiques volatils
<i>cyp1a</i>	Cytochrome P450 1A gene
CYP1A	Cytochrome P450 1A enzyme
CYP450	Cytochromes P450
<i>dilbit</i>	<i>diluted bitumen</i> ,
<i>ef1a</i>	Elongation factor 1 alpha
EPAS-1	Endothelial PAS protein-1
FHM	<i>Fathead minnow</i>
FQSA	Fédération Québécoise du Saumon Atlantique
<i>gst</i>	Glutathione S-transferase - gène
GST	Glutathione S-transferase - enzyme
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
Hsp90	<i>Heat-shock protein 90</i>
K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
LARSA	Laboratoire régional des sciences aquatiques
LMW	<i>Low molecular weight</i>
LRAT	Lécithine rétinol acyltransférase

MDA.....	Malondialdehyde
MELCC	Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques
MPO	Pêches et Océans Canada
MRP.....	<i>Multidrug resistance-associated proteins</i>
NCAG.....	<i>National contaminant advisory group</i>
ONÉ.....	Office National de l'Énergie,
PAC	<i>Polycyclic aromatic compound</i>
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PAS.....	PER-ARNT-SIM
PCA	<i>Principal component analysis</i>
RDH.....	Rétinol déhydrogénase
RNA.....	Acide ribonucléique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
<i>rpl8</i>	60S ribosomal protein L8
<i>sod</i>	Superoxide dismutase gène
SOD	Superoxyde dismutase enzyme
synbit	<i>Synthetic bitumen</i>
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
VEGF.....	<i>Vascular epithelial growth factor</i>
VOCs.....	<i>Volatils organic compounds</i>
WCS	<i>Western Canadian Select</i>
XAP2.....	<i>Hepatitis B virus X-associated protein</i>
XRE	Élément de réponse aux xénobiotiques

1 Introduction

1.1 Mise en contexte

En 2020, le Canada était le 4^e plus grand producteur mondial de produits pétroliers. Il produisait environ trois millions de barils par jour de pétrole extrait des sables bitumineux, aussi connu sous le nom de pétrole non conventionnel. L'extraction de pétrole bitumineux représentait environ 63 % de la production totale de produits pétroliers canadiens. Outre ces pétroles, le Canada possède et exploite des pétroles conventionnels et des pétroles de schiste. Les pétroles bitumineux sont transportés en majorité par des oléoducs qui traversent l'Amérique du Nord. Le transport des pétroles bitumineux par oléoducs nécessite que ces pétroles soient dilués, afin de diminuer leur viscosité et d'augmenter leur fluidité. Les diluants sont des mélanges de produits pétroliers plus légers, tels des condensats de gaz ou du naphte. À l'inverse des pétroles bitumineux, les pétroles conventionnels sont moins denses et lourds lors de l'extraction et ne nécessitent majoritairement pas d'ajout de diluant pour être transportés. Ces deux types de pétroles ont alors des caractéristiques physiques et chimiques différentes et variables. Les pétroles bitumineux dilués (*dilbit*; *diluted bitumen* en anglais) possèdent une concentration plus élevée de molécules légères, par exemple les composés organiques volatils (COV). Ces molécules sont les premières à s'évaporer ou à se dissoudre lors des déversements de pétrole. La perte de ces composés modifie la composition des dilbits et augmente leur densité, qui devient similaire ou plus élevée que celle de l'eau. Les dilbits peuvent alors couler, pénétrer dans la colonne d'eau et se mélanger avec les sédiments où ils peuvent persister et y affecter la faune durant des mois, voire des années.

Le gain d'information et de connaissances sur les effets des déversements de dilbits sur la faune d'eau douce canadienne est essentiel, étant donné les diverses propositions de construction et de réfection d'oléoducs au Canada. Ce projet de thèse, en collaboration avec le Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques (MELCC), Pêches et Océans Canada (MPO) et la Fédération Québécoise du Saumon Atlantique (FQSA), vise à obtenir de l'information servant sur plusieurs fronts. Tout d'abord, les résultats obtenus dans le projet permettront de mieux comprendre les effets et la toxicité des pétroles bitumineux dilués comparés aux pétroles conventionnels, qui ont déjà fait l'objet d'études extensives. Ensuite, les résultats obtenus pourront contribuer à protéger la faune des écosystèmes aquatiques d'eau douce, en mettant en évidence les espèces et les stades de développement les plus sensibles aux contaminations par les pétroles. Ces données pourront servir à la préparation des interventions de nettoyage et de réhabilitation des écosystèmes contaminés en cas de déversement de produits pétroliers. Finalement, les collaborations avec le MPO et la FQSA nous permettront de travailler avec deux salmonidés du Québec, la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique. Ces espèces ont une importance économique et culturelle non

négligeable pour le Canada et notre projet vise à favoriser leur protection et la protection de leurs écosystèmes qui sont vulnérables aux contaminations par les hydrocarbures.

1.1.1 Originalité de l'étude

Différentes études se sont penchées sur la toxicité des pétroles conventionnels et des pétroles bitumineux, mais très peu d'études ont comparé simultanément la toxicité de ces deux types de pétroles. Il est de plus en plus important de comprendre les impacts des dilbits dans l'environnement, étant donné l'augmentation de leur production et du volume transporté sur le territoire Nord-Américain. De plus, la composition chimique diffère d'un type de pétrole à l'autre, mais est aussi hétérogène à travers les pétroles de même type. La composition chimique des pétroles varie selon le type de pétrole, le site d'extraction, la saison et selon l'ajout de diluant et sa quantité. Mon projet de doctorat a été un des premiers à faire l'analyse de la toxicité d'un pétrole conventionnel lourd et de dilbits sur trois espèces de poissons d'eau douce indigènes de l'est de l'Amérique de Nord, puis d'en faire la comparaison à l'aide d'une même approche méthodologique. La majorité des études précédentes ont été faites sur des espèces d'eau salée ou des espèces modèles de laboratoire, qui ne représentent pas nécessairement la réalité de la faune d'eau douce québécoise. Avec l'augmentation de la construction d'oléoducs, les impacts des déversements de dilbits en eau douce doivent être mieux connus, afin de mettre en place des stratégies d'interventions, de nettoyage prioritaire et de protection des écosystèmes d'eau douce. De plus, les trois espèces à l'étude possèdent des différences quant à leur cycle de vie, leur physiologie, leur habitat et surtout leur sensibilité aux contaminants. L'information obtenue pourra ainsi être extrapolée à une vaste gamme d'espèces similaires, pour mieux comprendre les effets des déversements sur la faune habitant les écosystèmes d'eau douce d'Amérique du Nord. Les biomarqueurs utilisés dans cette étude permettront d'observer l'état physiologique des organismes par l'analyse des voies métaboliques de détoxification, de l'équilibre oxydant (voies antioxydantes et dommages oxydants) et des effets sur le développement des embryons et juvéniles. Un volet important du projet permettra de comparer les effets des expositions de pétroles à différents stades de développement des salmonidés. Finalement, mon projet de doctorat se penchera aussi sur les effets subits chez les poissons exposés, puis remis en eau propre, afin d'observer la capacité des organismes à survivre après un déversement d'hydrocarbures pétroliers.

1.1.2 Objectifs généraux de la thèse

L'objectif global de cette thèse était d'évaluer et de comparer la toxicité des pétroles conventionnels et non conventionnels (dilbits) sur trois espèces de poissons vivant dans les écosystèmes d'eau douce du Canada et d'Amérique de Nord. Plusieurs objectifs complémentaires ont été définis, permettant de répondre à

l'objectif global. Le premier était d'évaluer la toxicité aiguë des pétroles et ainsi de déterminer lequel causerait le plus de mortalité. Le second était de déterminer la toxicité sous-létale des pétroles, par la mesure de biomarqueurs du métabolisme de détoxification et des voies du stress oxydant, afin d'observer l'état de santé des organismes. Le dernier était de déterminer les impacts des pétroles sur le développement des salmonidés à l'aide d'observations des malformations et des changements dans différentes voies moléculaires. En complément, pour chacun des objectifs inclus dans cette thèse, des objectifs spécifiques ont été définis et sont décrits dans la section 1.5. Globalement, cette thèse permettra d'obtenir de l'information nécessaire pour la mise en place de plans d'intervention et de nettoyage à la suite des déversements de pétrole qui pourraient se produire dans les écosystèmes d'eau douce.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 Réserves canadiennes de produits pétroliers

Le Canada est l'un des plus grands producteurs de produits pétroliers au monde. L'exploitation des produits pétroliers s'y fait dans 12 des 13 provinces et territoires et a débuté il y a plus d'une centaine d'années. Mondialement, le Canada est le 4^e plus grand producteur de pétrole brut. La production canadienne de produits pétroliers a augmenté d'environ 382 000 m³ par jour depuis les 35 dernières années (CAPP, 2021). De plus, la production canadienne a doublé depuis les années 1980, et ce, malgré une diminution et une raréfaction des réserves pétrolifères mondiales (CAPP, 2021). L'augmentation de la production de produits pétroliers canadiens provient principalement de l'exploitation des sables bitumineux de l'Alberta, qui a débuté en 1967 (Cho *et al.*, 2017; Lynam *et al.*, 2015). Les réserves de pétrole bitumineux représentent 97 % des réserves totales de pétrole du Canada et l'exploitation des sables bitumineux représente 90 % du volume de pétrole produit au pays (ONÉ 2018). Le Canada possède des réserves de près d'un milliard de m³ de pétrole conventionnel et des réserves d'environ 25 milliards de m³ de pétrole bitumineux exploitables. La réserve pétrolifère du Canada est la 3^e plus grande et représente 10 % des réserves mondiales (Rana *et al.*, 2018; Xu, 2018).

1.2.2 Extraction des pétroles conventionnels et bitumineux

Les pétroles conventionnels et bitumineux diffèrent, entre autres, par leurs techniques d'extraction. Le pétrole conventionnel est trouvé dans les roches sédimentaires et il est extrait par pompage traditionnel, alors que les gisements de pétrole bitumineux sont trop épais et visqueux pour être pompés directement (Ivanova *et al.*, 2017). Les sables bitumineux sont un mélange composé de 10 % de bitume, 5 % d'eau et de 85 % de particules solides, comme du sable et de l'argile (Figure 1.1) (Finkel, 2018 ; Giacchetta *et al.*, 2015 ; Lynam *et al.*, 2015). L'extraction du bitume peut être faite de deux manières selon la profondeur de la réserve, soit dans une mine à ciel ouvert lorsque les réserves sont au plus à 70 m de profondeur ou par forage *in situ* pour les réserves plus profondes que 70 m (Finkel, 2018 ; Ivanova *et al.*, 2017). Lors de l'extraction dans une mine à ciel ouvert, le sable bitumineux est récolté à l'aide de pelles mécaniques, puis transporté vers les usines de traitement. Seulement 20 % du pétrole des sables bitumineux est extrait de mines à ciel ouvert, alors que 80 % du pétrole bitumineux est extrait *in situ* (Lynam *et al.* 2015). L'extraction *in situ* est faite directement sur le site du gisement et nécessite le forage de puits. De la vapeur d'eau, parfois mélangée à du gaz naturel, est pompée dans les puits pour liquéfier le bitume et lui permettre d'être remonté à la surface. Après l'extraction, deux étapes principales communes sont utilisées pour le traitement des sables bitumineux : la transformation du bitume lourd en produit synthétique intermédiaire puis le raffinage (Ivanova *et al.*, 2017). Cependant, certaines raffineries utilisent un procédé de raffinage à

haute conversion, fait directement sur le bitume lourd sans l'étape de transformation en produit synthétique. Environ 60 % du bitume extrait ne subit pas la transformation en produit synthétique (Finkel, 2018). Finalement, le pétrole bitumineux est dilué (*diluted bitumen* : dilbit) avec un condensat de gaz pour augmenter sa fluidité et lui permettre de circuler dans les oléoducs. Le dilbit est transporté par oléoducs de l'Alberta jusqu'aux États-Unis ou vers les côtes est et ouest de l'Amérique du Nord, pour permettre son exportation.

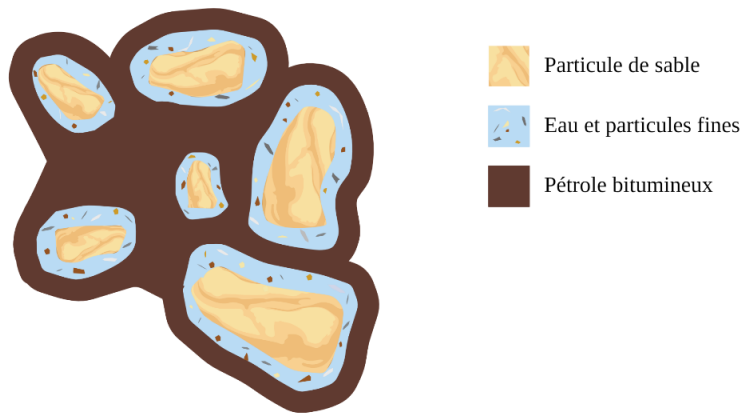


Figure 1.1. Composition des sables bitumineux. Les sables bitumineux sont composés de particules de sable et de particules fines entourées d'une mince couche d'eau et liées par le pétrole bitumineux. Figure créée avec BioRender.com.

1.2.3 Transport

Le transport des produits pétroliers, avant leur exportation par bateaux, est fait par trains ou par oléoducs. Les trains transportent environ 4 % du volume de production de pétrole du Canada, donc l'oléoduc est le moyen de transport principal des produits pétroliers sur le territoire canadien. De nouveaux projets de construction d'oléoducs sont proposés par les compagnies pétrolières afin d'augmenter les capacités de transport, suivant l'augmentation de la production des produits pétroliers canadiens. Par exemple, en 2016 le projet Énergie Est a été évalué, puis abandonné, et plus récemment le projet Trans Mountain a été accordé par le gouvernement canadien en 2019. L'oléoduc de Trans Mountain, d'une longueur de 1150 km, fera circuler environ 590 000 barils par jour de plus sur le territoire canadien. Au Canada, environ 840 000 km d'oléoducs traversent les écosystèmes terrestres et aquatiques. Il existe quatre types d'oléoducs qui transportent des produits pétroliers (Figure 1.2) :

- De collecte, qui transportent du pétrole ou du gaz naturel des sites d'extraction aux usines de raffinage ;
- D'amenée, qui transportent du pétrole ou du gaz naturel des usines de raffinage à des sites d'entreposage ou aux oléoducs de transport ;
- De transport, qui transportent du pétrole ou du gaz naturel entre les provinces et vers l'international et ;
- De distribution, qui transportent le gaz naturel seulement, des compagnies de distribution vers les industries et les résidences.

Au Canada, la réglementation des oléoducs est partagée entre les gouvernements fédéral et provincial. L'Office National de l'Énergie (ONÉ, 2018), un organisme fédéral indépendant, régule environ 73 000 km d'oléoducs de transport à grand diamètre qui traversent les frontières provinciales et internationales. De plus, une centaine de sociétés d'oléoducs sont réglementées par l'Office National de l'Énergie (ONÉ). Chaque province est ensuite responsable de la réglementation des oléoducs sur son territoire, sauf lors de la construction de nouveaux oléoducs. Tous les projets de construction d'oléoducs doivent être examinés par l'ONÉ et approuvés par le gouvernement du Canada (i.e., par Ressources naturelles Canada).

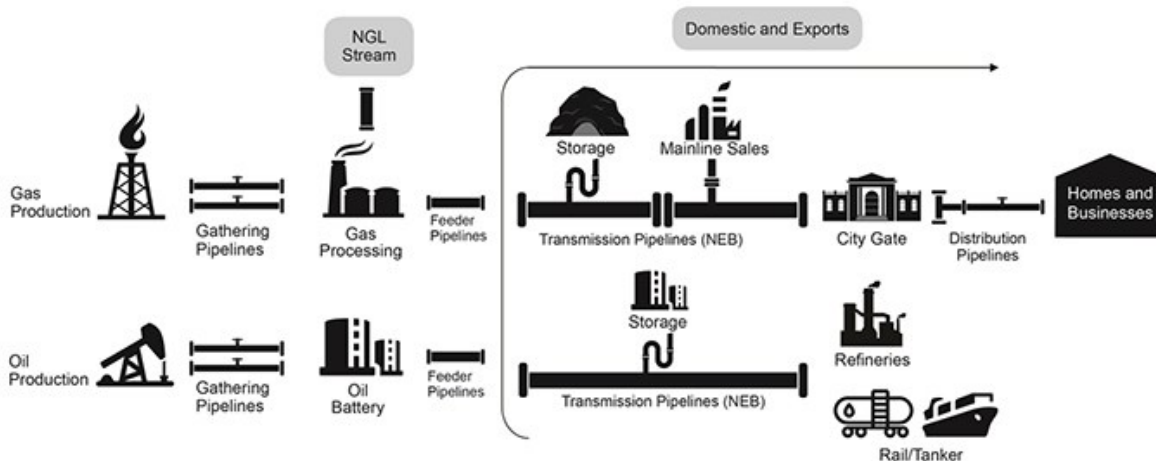


Figure 1.2. Types d'oléoducs pour le transport des produits pétroliers du Canada. Source : Bureau national de l'énergie (2018).

1.2.4 Les produits pétroliers : Des mélanges hétérogènes

Les produits pétroliers sont des mélanges complexes d'hydrocarbures, de composés organiques et de métaux. Les hydrocarbures sont des molécules composées d'atomes d'hydrogène et de carbone. Les hydrocarbures contenus dans les produits pétroliers peuvent contenir jusqu'à 200 atomes de carbones et sont classés parmi les saturés, les aromatiques, les résines et les asphaltènes (Chen *et al.*, 2018 ; Wen *et al.*, 2016). Le ratio d'hydrocarbures et de composés organiques des pétroles change selon le type de pétrole, ce qui modifie aussi les propriétés physiques et chimiques de pétroles. Par exemple, les pétroles conventionnels légers sont un mélange de composés saturés (92 %), d'aromatiques (8 %) et de résines (1 %), mais ne contiennent pas d'asphaltènes, tandis que les pétroles bitumineux dilués possèdent un taux important de résines (environ 33 %) et les trois autres composés dans un pourcentage similaire (20 à 25 %). Toutefois, la composition des pétroles d'un même type peut varier, selon les conditions environnementales lors de la formation des pétroles, par exemple la température, la quantité de matière organique et inorganique, les conditions du réservoir, etc. (NASM, 2016).

Les pétroles ont une consistance visqueuse et sont presque solides à la température ambiante. Lors de la formation géologique des pétroles bitumineux, les hydrocarbures légers sont dégradés par l'activité microbienne, alors que les hydrocarbures saturés et les asphaltènes ne le sont pratiquement pas. De ce fait, les pétroles bitumineux possèdent une plus grande concentration d'asphaltènes que les pétroles conventionnels (Barron *et al.*, 2018; NASM 2016; Subramanian *et al.*, 2016; ECCC *et al.* 2013 ; Polaris, 2013). De plus, les pétroles bitumineux de l'Alberta ont généralement une concentration élevée en azote, en soufre et en métaux (ECCC *et al.*, 2013). Lorsqu'ils sont dilués par des condensats de gaz lors du transport, leur densité devient inférieure à celle de l'eau douce sur laquelle ils flottent. Puis, lors d'un déversement, le vieillissement causé par les facteurs environnementaux facilite la perte des composés volatils par dissolution ou évaporation, permettant à la densité des dilbits d'augmenter et aux dilbits de couler dans la colonne d'eau (Hua *et al.*, 2018). Donc, dû à leur méthode d'extraction, à leur source et à la quantité de diluant qu'ils contiennent, les propriétés chimiques et physiques des dilbits varient de manière importante lors de leur vieillissement causé par l'exposition aux facteurs environnementaux lors d'un déversement (Hua *et al.*, 2018 ; Yang *et al.*, 2018). La vitesse de volatilisation des composés légers varie aussi selon la température, les saisons et le brassage de l'eau (Logeshwaran *et al.*, 2018 ; Yang *et al.*, 2018). Cette composition changeante amène un facteur de difficulté supplémentaire dans l'évaluation des risques associés aux déversements de dilbits (Adams *et al.* 2017).

1.2.5 Hydrocarbures et composés aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont composés d'atomes de carbone et d'hydrogène qui forment des anneaux ou cycles de carbone. Ces composés sont formés d'un minimum de deux anneaux de carbone et sont classés par le nombre d'anneaux qu'ils contiennent. Par exemple, les HAP composés de deux anneaux de carbone sont appelés les naphthalènes, tandis que lorsqu'ils contiennent trois anneaux de carbone ils sont plutôt classés dans les phénanthrènes, les dibenzothiophènes ou les fluorènes. Les HAP contenus dans les produits pétroliers sont majoritairement présents sous leur forme alkylée, soit environ 80 à 95 % d'HAP alkylés (Scott & Hodson, 2008 ; Wang & Seed, 2003). La figure 1.3 présente une molécule de phénanthrène et une de ses formes alkylées. Il a été démontré que la concentration de HAP alkylés est en lien avec le taux de mortalité induit par le *Blue sac disease* (Bauder *et al.*, 2005 ; Billiard *et al.*, 1999 ; Brinkworth *et al.*, 2003 ; Marty *et al.*, 1997). Le *Blue sac disease* est un ensemble de symptômes physiologiques observés chez les organismes exposés aux contaminants, lors des premiers stades de vie. Le *Blue sac disease* est généralement caractérisé par des malformations squelettiques, une diminution du taux de croissance, des hémorragies et des œdèmes péricardiques et du sac vitellin (Billiard *et al.*, 1999 ; Colavecchia *et al.*, 2006).

Les HAP sont des molécules non polaires et lipophiles. Elles diffusent passivement à travers les membranes cellulaires. La toxicité des HAP proviendrait en partie de leur capacité à s'accumuler dans les tissus (Grundy *et al.*, 1996). De plus, le taux d'accumulation des HAP des organismes aquatiques est spécifique à chaque tissu. Tel que démontré par Advait *et al.* (2013), le naphthalène s'accumule préférentiellement dans les intestins, alors que l'antracène s'accumule dans le foie et les reins. La concentration en lipides et la capacité de biotransformation de chaque tissu sont des facteurs déterminants dans l'accumulation spécifique des HAP (Advait *et al.*, 2013 ; Baumard *et al.*, 1998 ; Kayal & Connell, 1995). D'ailleurs, la capacité de chaque tissu à métaboliser les HAP aurait aussi un impact sur la toxicité des HAP (Advait *et al.*, 2013 ; Gauthier *et al.*, 2014). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques pétrogéniques sont connus pour leur toxicité chez les organismes aquatiques. La proportion d'organismes avec des troubles développementaux et les taux de mortalité augmentent significativement chez les organismes exposés aux HAP. Plusieurs études ont démontré que les poissons exposés aux HAP durant le stade embryonnaire étaient plus susceptibles de développer des malformations cardiaques et squelettiques et des œdèmes péricardiques que les poissons non-exposés (Alsaadi *et al.*, 2018 ; Carls *et al.*, 2008 ; Colavecchia *et al.*, 2006 ; Heintz *et al.*, 1999 ; Madison *et al.*, 2017 ; Marty *et al.*, 1997).

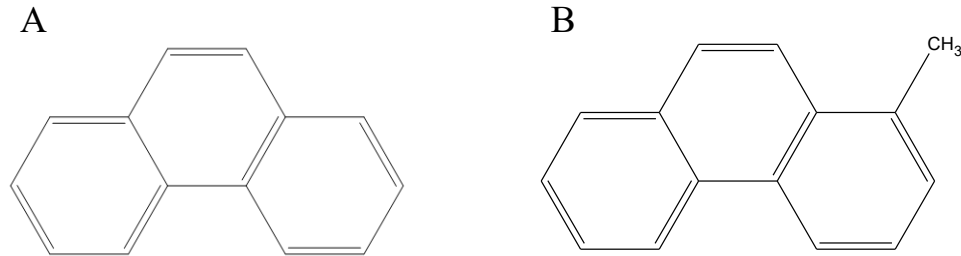


Figure 1.3. Molécule de phénanthrène (A) et une de ses formes alkylées, le C1 phénanthrène (B).

1.2.6 Composés organiques volatils

Les composés organiques volatils (COV) sont les plus petits hydrocarbures aromatiques. Ces molécules sont des composés monocycliques composés de 6 à 10 atomes de carbone qui forment un anneau ou un cycle (Logeshwaran *et al.*, 2018). Les COV les plus étudiées pour leur plus importante toxicité sont le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et le xylène, aussi désignés par l'acronyme BTEX, présenté dans la figure 1.4. Les BTEX sont solubles dans l'eau, très mobiles dans l'environnement et toxiques pour une majorité d'organismes (Mazzeo *et al.*, 2010). De plus, certaines études ont démontré que ces composés s'accumulent dans les tissus de certains organismes marins et sont fréquemment trouvés dans les eaux souterraines (Sørensen *et al.*, 2019; Roose *et al.*, 2003). Différents impacts négatifs ont été attribués à l'exposition des COV et des BTEX sur les organismes. Par exemple, le benzène est un carcinogène reconnu chez l'humain, qui cause des dommages et des cassures de l'ADN et sur les chromosomes (Whysner *et al.*, 2004; Bird *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Mazzeo *et al.*, 2011). De plus, le benzène inhibe la topoisomérase II, qui permet la recombinaison des fragments d'ADN durant la réplication et cette inhibition amène une amplification de matériel génétique et une formation de micro-noyaux dans les cellules (Ji *et al.*, 2009; Mazzeo *et al.*, 2011). Le toluène est neurotoxique et tératogène, alors que l'éthylbenzène a des effets néfastes sur le système respiratoire et sur les reins. Enfin, une exposition à long terme au xylène est toxique pour le système nerveux, le foie et les reins. Bref, la majorité de ces études démontrent que ces molécules sont toxiques pour les organismes (Mazzeo *et al.*, 2011; Niaz *et al.*, 2015; Salimi *et al.*, 2017; Webb *et al.*, 2018).

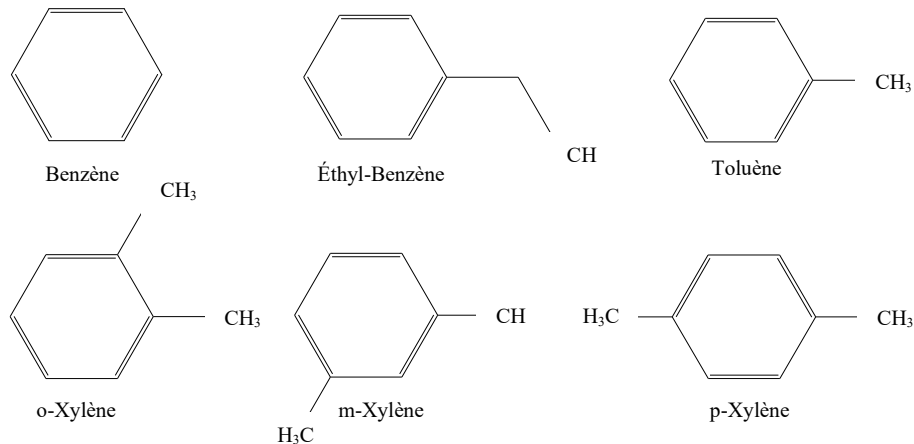


Figure 1.4. Structure moléculaire des BTEX.

1.2.7 Composés saturés

Les composés saturés sont divisés en deux autres catégories de molécules selon leur structure chimique : les alcanes et les cycloalcanes. Les alcanes sont formés de chaînes de carbones linéaires ou ramifiées. Leur formule chimique générale est : C_nH_{2n+2} . Les paraffines contenues dans les pétroles sont classées parmi les alcanes. Les cycloalcanes possèdent au moins un cycle aromatique de 5 ou 6 carbones et comprennent les naphènes (Harayama *et al.*, 1999 ; Tharanivasan *et al.*, 2009). Ce groupe de composés englobe des molécules de tailles variées, allant du méthane avec un seul atome de carbone à des molécules comme les paraffines pouvant contenir de 20 à 30 atomes de carbone. Ces molécules peuvent donc être autant sous forme gazeuse que solide à température pièce. De ce fait, la toxicité de ces composés dépend fortement de leur taille et de leur structure moléculaire (Fisk *et al.*, 2009; Zvinavashe *et al.*, 2008).

1.2.8 Résines et asphaltènes

Les résines et les asphaltènes sont les composés les plus denses des produits pétroliers et sont trouvés en plus grande quantité dans les produits bruts lourds. La viscosité des produits pétroliers est majoritairement due à la concentration des résines et des asphaltènes (Chen *et al.*, 2018 ; Tharanivasan *et al.*, 2009). Ces molécules ont une forte tendance à créer des agrégats, même avec une faible concentration, ce qui les rend difficiles à analyser. Ce sont majoritairement ces molécules qui s'accumulent et causent des problèmes lors de la circulation dans les oléoducs. De plus, la concentration importante de résines et d'asphaltènes des dilbits cause des accumulations de résidus persistants après un déversement dans l'environnement. Le vieillissement des dilbits augmente leur capacité d'adhésion aux matières organiques et en suspension dans

l'eau, ce qui induit une accumulation et une sédimentation du dilbit dans les substrats (Chen *et al.*, 2018 ; Guan *et al.*, 2018). Cependant, étant donné le haut coefficient de partition octanol-eau (K_{ow}) de ces molécules, elles sont peu solubles et peu assimilables pour les organismes. Leur toxicité est négligeable pour les organismes aquatiques (Hodson, 2017; Di Toro *et al.*, 2007).

1.2.9 Métaux

Les métaux sont des éléments naturels, dont certains sont essentiels dans les processus métaboliques des organismes vivants. Certains métaux non-essentiels possèdent des caractéristiques structurales, physiques et chimiques similaires aux métaux essentiels; ils peuvent alors être introduits dans les cellules. Ainsi, ils perturbent divers processus métaboliques, par exemple l'activité enzymatique, la régulation d'ions ou le métabolisme de certaines vitamines (Bougas *et al.*, 2013 ; Gauthier *et al.*, 2014 ; Pierron *et al.*, 2011). De plus, ils peuvent induire des dommages à l'ADN, par la formation d'adduits ou par l'augmentation du stress oxydant (Guerrero-Castilla *et al.*, 2014 ; Lepers *et al.*, 2014 ; Zocche *et al.*, 2013). Ces conséquences sont néfastes pour l'organisme, mais aussi sur les populations à moyen et long terme, car les métaux peuvent s'accumuler dans les organismes (Griboff *et al.*, 2017 ; Rasmussen *et al.*, 2008). Les métaux essentiels peuvent aussi devenir toxiques lorsqu'ils sont présents en concentration élevée (Kozlowski *et al.*, 2014).

Dès l'ère industrielle, l'augmentation rapide de l'activité minière a causé une contamination de certains écosystèmes aquatiques par les métaux, dont plusieurs lacs de la région de Sudbury en Ontario (Gauthier *et al.*, 2014 ; Havas *et al.*, 1995 ; Keller *et al.*, 2007). Parallèlement, l'extraction et l'utilisation des produits pétroliers ont aussi augmenté, causant la contamination de divers écosystèmes marins et dulcicoles (Gauthier *et al.*, 2014 ; Huang & Batterman, 2014). Plusieurs écosystèmes sont contaminés à la fois par les métaux et les HAP issus des produits pétroliers. Parmi les composantes cellulaires, les membranes lipidiques sont particulièrement affectées par la présence de métaux et de HAP. Les HAP sont en majorité liposolubles et diffusent à travers les membranes cellulaires en changeant leur fluidité et leur perméabilité (Sikkema *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995). Ces changements dans la membrane cellulaire induits par les HAP peuvent altérer les fonctions et la structure membranaire (Sikkema *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995). Ces altérations peuvent modifier l'assimilation des métaux et l'homéostasie des métaux dans certains tissus, par exemple les branchies (Gauthier *et al.*, 2014). Différentes études se sont intéressées aux impacts de la toxicité de ces deux contaminants. Cependant les effets de la co-toxicité des métaux et des HAP sont moins bien connus. Étant donnée la composition complexe et variée des pétroles, les interactions et les effets avec les métaux peuvent ou non s'additionner (Gauthier *et al.*, 2014). De plus, les pétroles bitumineux contiennent plus de métaux que les pétroles conventionnels. Ils contiennent généralement 102 fois plus de cuivre, 11 fois plus de nickel et 5 fois plus de plomb (Finkel, 2018). Jusqu'à présent, dans la littérature

scientifique il n'y a aucun consensus quant à la bioaccumulation des métaux par l'exposition aux produits pétroliers (Gauthier *et al.*, 2014). Toutefois, il est probable que les métaux et les hydrocarbures forment des complexes assimilables par les organismes aquatiques (Wise *et al.*, 2014).

1.2.10 Déversements importants et leurs impacts environnementaux

Selon l'ONÉ (2018), il y a eu une moyenne de 280,4 m³ par année, qui ont été déversés dans l'environnement de 2008 à 2017. Durant ces années, les volumes déversés varient de 7 m³ en 2016 jusqu'à 1109,75 m³ en 2017. De plus, toujours selon l'ONÉ, la quantité de déversements sur le territoire d'une province est généralement liée à sa quantité d'oléoducs (ONÉ, 2018). Donc, avec les nouveaux projets de construction d'oléoducs canadiens, les risques de déversements augmentent sur le territoire canadien.

Depuis quelques années, il y a eu au moins trois déversements d'oléoducs importants au Canada et aux États-Unis et les impacts environnementaux de ces déversements peuvent toujours être observés. En 2007, la rupture d'un oléoduc à Burnaby en Colombie-Britannique a causé une fuite d'environ 224 m³ d'un mélange de brut synthétique léger et d'un produit lourd des sables bitumineux. Une portion importante du littoral et de la zone intertidale a été contaminée. Les mesures de nettoyage ont permis de récupérer la majorité des hydrocarbures et les évaluations environnementales ont déterminé que les impacts à court et long termes avaient été limités. En 2011, des traces de HAP persistaient encore dans les sédiments, mais les exigences en matière de la qualité de l'eau étaient respectées dans les échantillons analysés. Ensuite, en 2010 le ruisseau Talmadge et la rivière Kalamazoo ont été envahis par 3190 m³ de dilbits provenant d'un oléoduc. Malheureusement, les pluies ont fait déborder la rivière Kalamazoo et les hydrocarbures qu'elle contenait ont été transportés jusqu'à plus de 60 km en aval. Une des caractéristiques du dilbit est sa capacité à former des agrégats stables avec les sédiments. Par exemple, dans le cas du déversement de la rivière Kalamazoo, des agrégats de bitume et de sédiment ont été retrouvés deux ans après le déversement (Environnement Canada, 2013). Puis, en janvier 2015, un oléoduc a déversé plus de 190 m³ pétrole brut conventionnel dans la rivière Yellowstone au Montana. Ce pétrole a été transporté jusqu'à 95 km en aval dans la rivière qui était partiellement gelée et couverte de neige. La présence du couvert de glace et de neige a empêché les opérations de nettoyage avant le mois de mars, permettant au pétrole de persister dans la rivière jusqu'en avril. Ce déversement a causé des problèmes de contaminations dans la station d'épuration des eaux à proximité. En effet, durant près de deux jours, l'eau potable des résidents de Glendive, une ville à environ 10 km du déversement, a été affectée (EPA, 2015).

Deux autres déversements importants ont façonné la recherche sur les effets des pétroles sur la faune aquatique : l'Exxon Valdez en 1989 dans la baie de Prince William en Alaska et le Deepwater Horizon en 2010 dans le nord du Golfe du Mexique. Ces déversements se sont produits en milieux marins, des milieux

différents de ceux à l'étude dans cette thèse, qui se penche plutôt sur les effets des déversements de pétroles dans les milieux d'eau douce. En effet, le vieillissement des pétroles et la dissolution des hydrocarbures dans l'eau sont affectés par la salinité de l'eau, l'action des vagues, l'ensoleillement et la microfaune présente dans l'environnement. De plus, les techniques de remédiation des déversements de pétrole en milieux marins sont différentes de celles utilisées en eau douce; par exemple l'utilisation de dispersants se fait seulement en milieu marin. Malgré ces différences, la multitude d'études antérieures, sur les impacts écologiques à court et long terme ayant suivies ces déversement, a permis de mieux comprendre les effets des pétroles conventionnels sur la faune aquatique et les mécanismes de toxicité des hydrocarbures pétroliers.

1.2.11 Toxicité des pétroles bitumineux

La composition et les caractéristiques des dilbits changent rapidement avec le vieillissement causé par l'environnement (Hua *et al.*, 2018). Lors du déversement dans la rivière Kalamazoo, l'évaporation du diluant et des composés légers a fait augmenter la densité du pétrole déversé, l'amenant à couler et à se mélanger aux sédiments. Tel que précisé dans la section 1.2.4, les pétroles conventionnels et les pétroles bitumineux ont des compositions chimiques qui diffèrent, conséquemment leur vieillissement varie, ainsi que les concentrations de différents composés dissous dans l'eau. Des études ont démontré que la toxicité des composés pétroliers varie selon la structure des composés, leur capacité à s'accumuler dans les tissus et leur solubilité dans les lipides. Ces facteurs et la toxicité des hydrocarbures sont corrélés au coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}). Cependant, la solubilité des hydrocarbures diminue avec l'augmentation de leur poids moléculaire. De ce fait, moins les molécules sont solubles dans l'eau, moins elles seront biodisponibles et moins elles diffuseront facilement à travers les membranes cellulaires (Hodson *et al.*, 2020). La toxicité des pétroles bitumineux ou conventionnels est donc plutôt complexe à évaluer et à prédire étant donné l'hétérogénéité des mélanges d'hydrocarbures qui les composent. Plusieurs études ont effectivement déterminé que les différents types d'hydrocarbures induisent des effets toxiques différents (Incardona, 2017), ces effets sont discutés dans les sections suivantes.

1.2.12 Métabolisme de détoxification xénobiotique

Les hydrocarbures pénètrent les cellules en passant librement à travers les membranes cellulaires ou par l'activité des transporteurs d'anions organiques (Köhle & Bock, 2007). Le métabolisme de détoxification des produits xénobiotiques est le mécanisme principal d'élimination des hydrocarbures (Figure 1.5). La métabolisation des hydrocarbures débute lorsqu'ils sont reconnus par le récepteur aryl-hydrocarbure (AhR) et s'y lient (Hodson *et al.*, 2007). Le récepteur cytosolique AhR est une protéine de la famille hélice-boucle-

hélice ou *basic helix-loop-helix* (bHLH) PER-ARNT-SIM (PAS) (Baldwin, 2019). Elle se trouve dans le cytosol, où elle est complexée avec les protéines chaperonnes Hsp90, XAP2 (aussi connue sous le nom d'AIP, pour *AhR-interaction protein*) et p23. Ce complexe est alors transporté vers le noyau où les chaperonnes se détachent de la protéine AhR pour être remplacées par une protéine : le translocateur nucléaire aryl-hydrocarbure (ARNT). Le nouveau complexe formé d'AhR, ARNT et de l'hydrocarbure est un facteur de transcription qui se lie aux séquences de l'ADN nommées les éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE) (Denison & Nagy, 2003 ; Incardona, 2017 ; Tanguay *et al.*, 2003). Cette liaison permet la transcription d'une batterie de gènes, dont les cytochromes P450 (CYP450) (Nebert *et al.*, 2004). Le récepteur AhR est ensuite dégradé par le protéasome. Cette dégradation permet de contrôler le niveau de transcription des gènes par le facteur de transcription formé par le complexe AhR/ARNT/hydrocarbure en limitant sa quantité dans le noyau cellulaire (Ma & Baldwin, 2000). Ensuite, lors de la phase I, les CYP450, majoritairement CYP1A, transforment les contaminants en molécules solubles dans l'eau. Ces enzymes sont des monooxygénases qui catalysent l'oxydation des composés xénobiotiques (tels que les HAP). Cependant, cette biotransformation forme des métabolites réactifs, souvent plus toxiques que les composés originaux (Shankar & Mehendale, 2014). De ce fait, la liaison du complexe AhR aux XRE initie en plus la transcription des enzymes de détoxification de la phase II. Ces enzymes ont une activité antioxydante et catalysent la conjugaison des métabolites précédemment formés en métabolites moins toxiques, mais plus solubles et excrétables. L'excrétion des hydrocarbures est ensuite faite par les transporteurs MRP (*multidrug resistance-associated proteins*), aussi connus sous le nom de transporteurs ABC (Alharbi *et al.*, 2016 ; Köhle & Bock, 2007 ; Shipp & Hamdoun, 2012). Parmi les enzymes de phase II, la glutathion S-transférase (GST), la NAD(P)H:quinone oxydoréductase (NQO) et la UDP-glucuronosyl-transférase (UGT) sont les mieux connues et étudiées (Hassan *et al.*, 2015 ; Köhle & Bock, 2007).

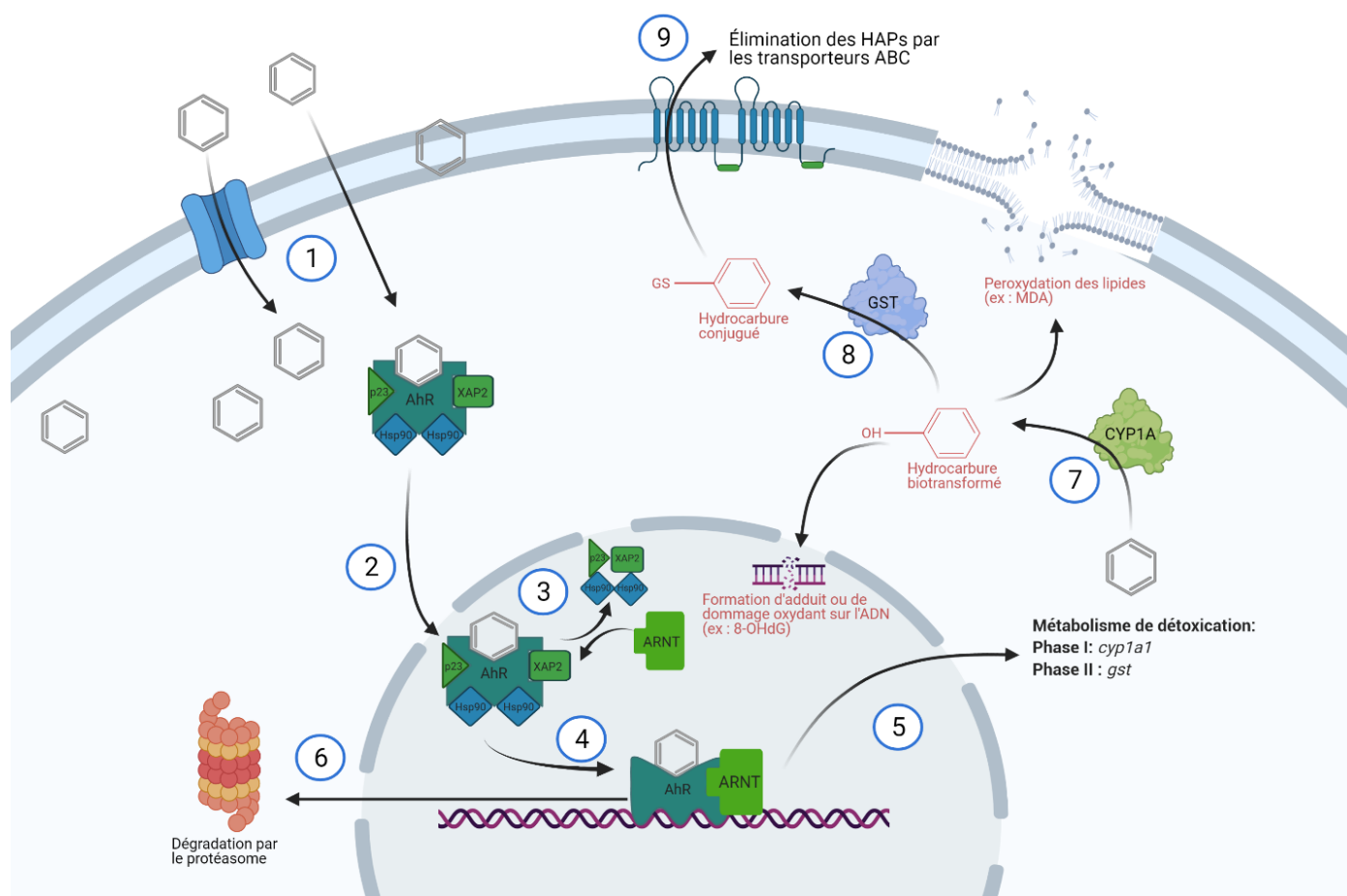


Figure 1.5. Schéma de représentation du métabolisme des hydrocarbures dans la cellule eucaryote. (1) Les hydrocarbures pénètrent la cellule librement ou par les transporteurs d'anions organiques et se lient au récepteur AhR en complexes avec les protéines chaperonnes p32, XAP2 et deux Hsp90. (2) Le complexe AhR/hydrocarbure pénètre le noyau cellulaire. (3) Les chaperonnes sont libérées et un nouveau complexe se forme avec les protéines AhR/ARNT et l'hydrocarbure. (4) Le nouveau complexe se lie sur l'ADN, sur les éléments de réponses xénobiotiques (XRE) (5) Une gamme de gènes est transcrite, dont les gènes *cyp1a1* et *gst* du métabolisme de détoxification phase I et II. (6) Le complexe AhR/ARNT est dégradé par le protéasome. (7) Détoxification phase I : l'enzyme CYP1A, une monooxygénase, ajoute une molécule d'oxygène sur l'hydrocarbure. (8) Détoxification phase II : l'enzyme GST conjugue l'hydrocarbure avec un substrat (p. ex., le glutathion). (9) L'hydrocarbure peut être exporté hors de la cellule par les transporteurs ABC. Figure créée avec BioRender.com et basée sur Larigot et al., 2018; Köhle & Bock, 2007; Denison & Nagy, 2003; Whyte et al., 2000.

1.2.13 Stress oxydant

La cellule produit des molécules de stress oxydant, appelées espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* : ROS). Les ROS sont normalement produits par le métabolisme mitochondrial lors de la formation de l'ATP (Ray *et al.*, 2012). Les ROS sont impliquées dans l'activation de différentes voies métaboliques cellulaires et sont essentielles dans la défense contre les pathogènes (Lim & Luderer, 2018). Différents facteurs peuvent induire une augmentation de production des ROS, par exemple une exposition à des contaminants (ex., hydrocarbures ou métaux) ou un stress thermique. Si l'équilibre oxydatif n'est pas maintenu dans la cellule, la présence de ROS dans l'organisme peut avoir des effets néfastes (Blier *et al.*, 2013; Ray *et al.*, 2012).

La métabolisation des HAP par les enzymes de la famille des cytochromes P450 peut induire une augmentation de la toxicité. En effet, la détoxification des hydrocarbures forme des métabolites réactifs et oxydants (Figure 1.6). Ces composés intermédiaires sont génotoxiques et carcinogènes; souvent ils sont plus toxiques que le composé original (Basu *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 2002). Par exemple, la dégradation du benzo[a]pyrene (B[a]P) par les CYP450 mène à la formation du benzo[a]pyrene diol époxyde (BPDE). Le BPDE est toxique par sa capacité à former des adduits à l'ADN. Les radicaux *o*-semiquinone et *o*-quinone sont formés lors de la métabolisation du BaP et favorisent la formation de ROS, qui à leur tour peuvent augmenter la peroxydation lipidique, les adduits et l'oxydation sur l'ADN. Les dommages à l'ADN peuvent mener à des mutations ou à de l'instabilité génétique, s'ils ne sont pas réparés adéquatement (Bérubé *et al.*, 2018). Par exemple chez l'humain, ce type de mutation sur le gène *p53* est lié à la cancérogenèse pulmonaire (Perera *et al.*, 2015). Ensuite, il a été démontré dans la littérature que les hydrocarbures alkylés, qui composent majoritairement les pétroles, sont aussi plus toxiques que leur composé parent, dû à une meilleure affinité avec le récepteur AhR (Billiard *et al.*, 1999; Carls *et al.*, 1999; Mu *et al.*, 2014; Ott *et al.*, 1978). Un exemple bien connu est celui du rétène (7-isopropyl-1-méthylphénanthrène), qui est un phénanthrène alkylé. Certaines études ont démontré que le rétène a une plus forte affinité avec le récepteur AhR et induit l'activité de CYP1A de manière plus importante que le phénanthrène (Billiard *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015).

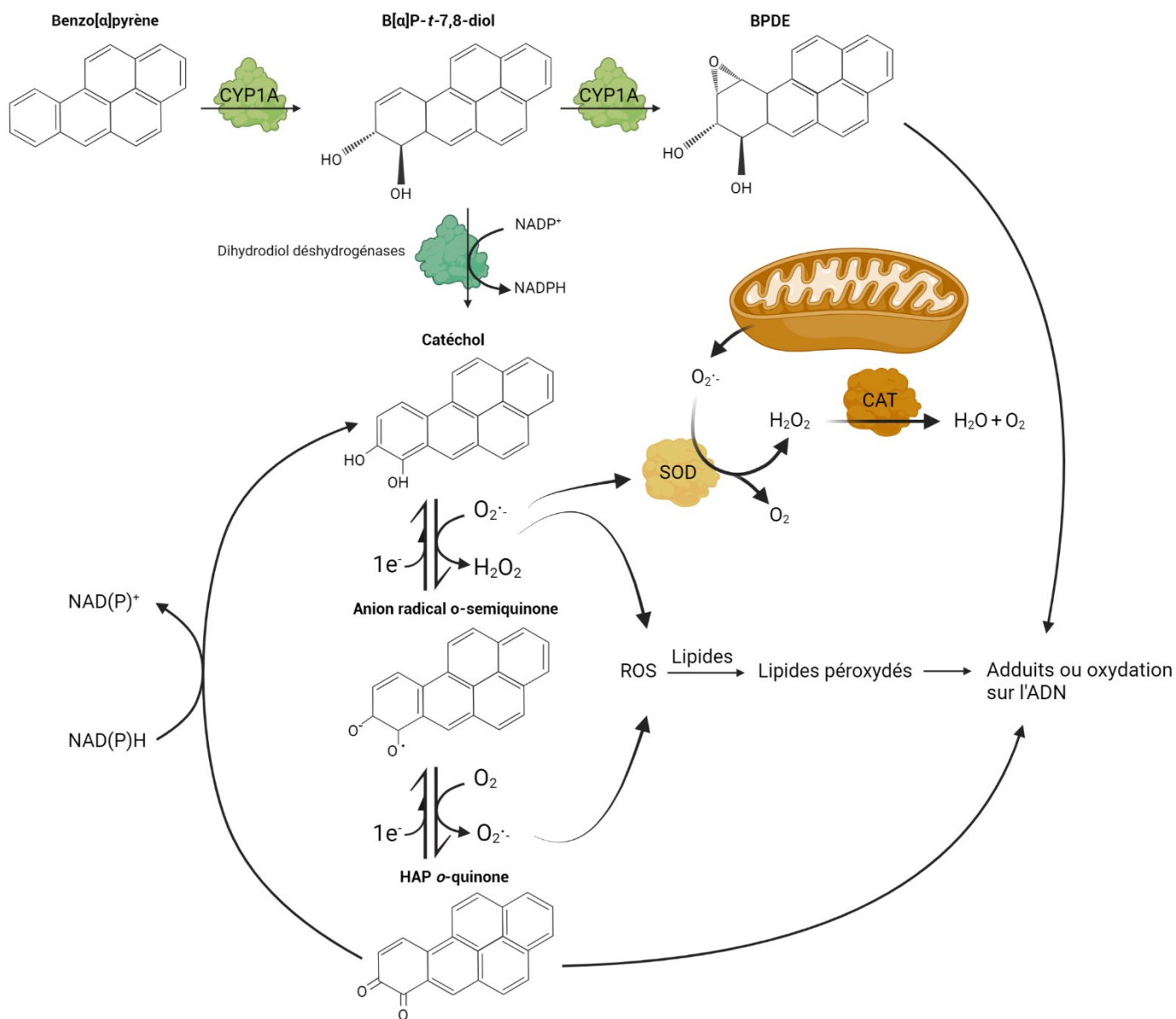


Figure 1.6. Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des dommages cellulaires par la métabolisation des HAP, exemple du benzo[a]pyrène. L'enzyme de détoxification CYP1A catalyse la biotransformation du benzo[a]pyrène en trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrène (BaP t-7,8-Diol). Le BaP t-7,8-Diol peut subir une seconde transformation par CYP1A pour créer le benzo[a]pyrène diol époxyde (BPDE) ou peut être transformé en catéchol, puis en HAP o-quinone par les dihydrodiol déshydrogénases. Ces molécules sont électrophiles et entrent dans un cycle d'oxydoréduction qui se poursuit en amplifiant la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les ROS formés peuvent être éliminés par les enzymes antioxydantes, catalase et superoxyde dismutase. Le BPDE, les lipides peroxydés et les HAP o-quinones peuvent se lier à l'ADN pour former des adduits et les ROS peuvent aussi causer des dommages oxydants sur l'ADN. Figure créée par BioRender.com et basée sur Fu et al., 2012; Burczynski & Penning, 2000; Penning et al., 1996.

L'activation d'AhR par les hydrocarbures permet aussi la transcription du *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2) et d'une gamme de gènes des voies antioxydantes (Köhle & Bock, 2007; Rousseau *et al.*, 2015). La protéine Nrf2 initie la transcription des gènes antioxydants de phase II, tels que la glutathion S-transférase (GST) et la NAD(P)H:quinone oxydoréductase (NQO1) (Köhle & Bock, 2006; Köhle & Bock, 2007; Ma *et al.*, 2004). Normalement, la phase II du métabolisme de détoxification est composée d'enzymes antioxydantes qui préviennent l'accumulation de ces métabolites et des ROS formés lors de la phase I (Cooke *et al.*, 2003; Slaninova *et al.*, 2009; Abeti *et al.*, 2015). Donc, la phase II prévient l'endommagement des composés cellulaires, tel que l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides membranaires et l'oxydation des bases de l'ADN (Bauder *et al.*, 2005; Berlett & Stadtman, 1997; Billiard *et al.*, 2007).

Les 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) sont des lésions à l'ADN, formées lors de l'oxydation des guanines par les ROS. Toutes les bases de l'ADN sont vulnérables aux dommages oxydatifs, cependant les guanines sont les plus sensibles (Tzortzaki *et al.*, 2012). Les 8-OHdG sont formés par l'ajout d'un groupement hydroxyle sur un des carbones de la purine (Figure 1.7). Lorsqu'elles ne sont pas réparées, ces lésions peuvent mener à des transversions G:C → T:A et ces mutations peuvent engendrer des conséquences néfastes, principalement durant le développement embryonnaire où la différenciation cellulaire est rapide (Martins & Costa, 2015; Negrato *et al.*, 2013; Tichy, 2011; Yasui *et al.*, 2014). De plus, la présence de 8-OHdG non réparés peut mener à des changements d'expression génique, à des cassures à l'ADN et à une augmentation de l'instabilité génomique. Enfin, la présence des 8-OHdG peut être associée au développement de différentes maladies et de cancers (Evans *et al.*, 2004; Isabel *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2010). Le 8-OHdG est un biomarqueur moléculaire d'analyse du stress oxydant chez les organismes exposés à différents contaminants. Il a souvent été analysé en combinaison avec l'enzyme CYP1A dans différentes études sur la contamination par les HAP (Alak *et al.*, 2017; Isabel *et al.*, 2012; Lister *et al.*, 2015; Negrato *et al.*, 2013). De plus, des études ont observé une augmentation des 8-OHdG chez les poissons exposés à des produits pétroliers et à des biopesticides, signifiant que leur mesure peut être utilisée en tant qu'indicateur de la santé globale des espèces contaminées (Oliveira *et al.*, 2010; Alak *et al.*, 2017).

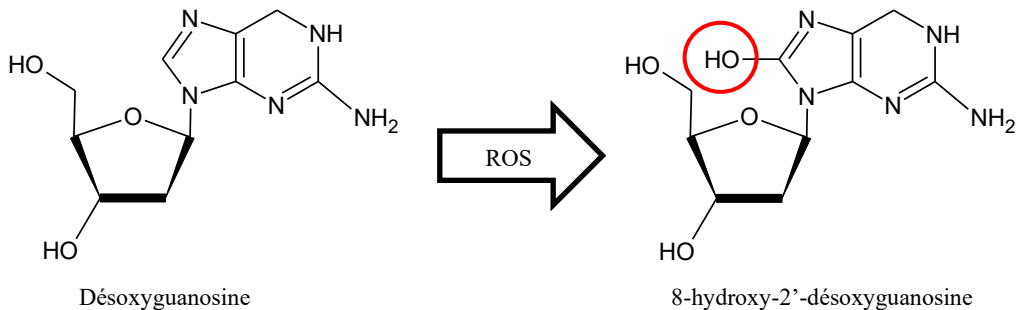


Figure 1.7. Formation des 8-OHdG. L'oxydation d'une désoxyguanosine de l'ADN par un ROS cause l'ajout d'un groupement hydroxyle (OH) sur une désoxyguanosine de l'ADN, qui devient un 8-OHdG.

Ensuite, lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité, les ROS peuvent causer la peroxydation des lipides membranaires. La peroxydation des lipides est un processus par lequel les molécules oxydantes retirent un atome d'hydrogène d'un lipide contenant un double lien carbone, créant un radical peroxyde. Le radical peroxyde peut ensuite extraire un atome d'hydrogène d'un lipide adjacent, causant une réaction en chaîne qui peut être arrêtée par un antioxydant (Ayala *et al.*, 2014). Les dommages oxydants sont étudiés chez les organismes aquatiques et les poissons, car ils contiennent une quantité généralement élevée de lipides polyinsaturés qui sont les lipides les plus sensibles à l'oxydation (Lushchak, 2010). En effet, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont une cible fréquente des ROS. Lorsqu'ils sont endommagés, les caractéristiques de la membrane cellulaire peuvent être affectées, soit par une augmentation de la perméabilité et une diminution de la fluidité. Ces changements peuvent aussi affecter certaines activités enzymatiques liées aux membranes (Barni *et al.*, 2014; Fontagné-Dicharry *et al.*, 2018). Différentes méthodes permettent de mesurer la quantité de lipides peroxydés, par exemple par la technique du fer/xylénol orange (Hermes-Lima *et al.*, 1995) ou par la mesure du malondialdéhyde. Le malondialdéhyde (MDA) est un sous-produit de la peroxydation des lipides et est utilisé en tant que biomarqueur du stress oxydant dans les études de toxicité des divers polluants, comme les HAP ou les polluants organiques persistants (POP) (Arukwe & Mortensen, 2011; Barni *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2018). De plus en plus d'évidences démontrent que la peroxydation lipidique augmente chez les organismes exposés aux produits pétroliers (Bettim *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2018). Donc, la mesure du MDA peut être utilisée en tant qu'indicateur de santé des organismes exposés. Le MDA est une molécule de la famille des aldéhydes : des molécules réactives et électrophiles (déficient en électron), reconnues pour former des adduits avec l'ADN, les protéines et les lipides cellulaires. Les aldéhydes sont éliminés de l'organisme par les enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) (Singh *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2012).

1.2.14 AhR et voies métaboliques connexes

Le récepteur AhR est une protéine qui se lie à plusieurs contaminants, par exemple les dioxines et autres composants similaires. Ces composés ont une structure moléculaire semblable, mais leur affinité au récepteur AhR varie (Doering *et al.*, 2013). Chez les oiseaux, il a été montré que l'affinité des composés au récepteur peut être utilisée pour prédire leur toxicité (Head *et al.*, 2008; Karchner *et al.*, 2006). À la différence des oiseaux, les poissons téléostéens ont subi une duplication génomique lors de l'évolution, causant la duplication de plusieurs gènes, dont le gène *AhR* (Glasauer & Neuhauss, 2014; Hahn *et al.*, 1997). Les poissons possèdent deux, parfois trois gènes *AhR*, dont la protéine AhR1 est similaire à celle chez les mammifères, qui n'en possèdent qu'un (Hahn *et al.*, 2006; Hansson & Hahn, 2008). Chez la majorité des espèces de poissons, AhR2 est la protéine la plus abondante et celle principalement utilisée dans le métabolisme de détoxification (Hahn, 2002; Incardona *et al.*, 2005). De ce fait, les différentes fonctions des isoformes et des protéines AhR ont été investiguées. Ces études ont démontré que l'activité et l'expression d'AhR et ses différents gènes sont spécifiques selon les tissus. De plus, Hansson et Hahn (2008) ont observé la présence de quatre gènes *Ahr2* chez le saumon atlantique. Une de ces formes avait des taux de transcription plus élevée que les autres à la suite d'exposition à la dioxine, démontrant par le fait même que les isoformes ont une affinité différente avec les molécules d'hydrocarbures. Cette même étude a démontré que les quatre gènes sont exprimés dans le cœur. Une plus grande présence des récepteurs AhR pourrait augmenter la réponse à la contamination et sachant que la métabolisation des hydrocarbures crée des métabolites toxiques, ceci pourrait expliquer la sensibilité du système cardiovasculaire à l'exposition aux hydrocarbures. La sensibilité du système cardiovasculaire par les hydrocarbures et la dioxine a aussi été démontrée chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) (Andreasen *et al.*, 2002a; Karchner *et al.*, 2005).

Le développement embryonnaire est un processus orchestré de manière précise. Plusieurs gènes sont impliqués dans les différentes étapes, qui doivent se produire à des moments précis. Le gène AhR, en plus de ses fonctions dans le métabolisme des hydrocarbures, est impliqué dans le développement des organismes. En effet, AhR est impliqué dans le développement du système vasculaire des souris (Lahvis *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1996) et des poissons-zèbres (Andreasen *et al.*, 2002b). Une étude récente a démontré que chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), AhR est impliqué dans le développement du système cardiovasculaire, et aussi dans plusieurs autres structures, telles que les yeux et les mâchoires (Aranguren-Abadía *et al.*, 2020). L'implication d'AhR dans le développement embryonnaire provient de son interaction avec d'autres voies moléculaires essentielles au développement, par exemple la voie des acides rétinoïques, mieux connue sous le nom de la vitamine A (Murphy *et al.*, 2007). Le métabolisme de la vitamine A est impliqué dans différents processus importants, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire lors du développement des vertébrés (Ross *et al.*, 2000). Ces processus sont à leur tour nécessaire

au développement de la majorité des structures corporelles (i.e., yeux, squelette, système nerveux, etc.) (Fernández & Gisbert, 2011). Plus précisément, comme rapporté dans une revue de littérature par Murphy et collaborateurs (2007), plusieurs étapes de la métabolisation de la vitamine A pourraient être modifiées par les voies AhR et par la métabolisation des hydrocarbures :

1. La transformation du rétinol en rétinal, normalement catalysée par les alcools ou les rétinols déshydrogénases (ADH ou RDH), peut être faite par l'enzyme CYP1A (Berntssen *et al.*, 2016; Roberts *et al.*, 1992);
2. La rétinaldéhyde déshydrogénase, une enzyme de conversion du rétinal en acide rétinoïque, possède dans sa séquence génique des éléments de réponse aux xénobiotiques. Les auteurs suggèrent que cette séquence pourrait être une cible d'AhR (Wang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000);
3. L'acide rétinoïque est isomérisé pour augmenter son affinité avec un récepteur spécifique; sans cette étape les voies de la vitamine A sont compromises. Cette étape nécessite la présence du glutathion et l'activité de la GST, qui sont aussi utilisés dans la phase II de la métabolisation des hydrocarbures (Aoki, 2001; Chen & Juchau, 1997; Shih *et al.*, 1997);
4. Des évidences démontrent que l'expression des récepteurs associés aux voies de la vitamine A est inhibée par AhR (Murphy *et al.*, 2004; Rushing & Denison, 2002);
5. D'autres enzymes, par exemple CYP26 ou les UGT, catalysent l'hydroxylation et la glucoron-conjugaison de métabolites de la vitamine A et pourraient aussi être impliquées dans la métabolisation des hydrocarbures (Yueh *et al.*, 2003);
6. Une diminution de l'activité de la lécithine rétinol transférase (LRAT) chez des rats exposés aux dioxines, un ligand ayant une forte affinité pour AhR, a été observée (Hoegberg *et al.*, 2003; Nilsson & Håkansson, 2002; Novák *et al.*, 2008).

Ces observations proviennent majoritairement d'études sur des mammifères (rats, lapins et humains). Pour cette raison, il faut être prudent avant d'inférer ces conclusions sur les poissons et autres espèces animales. Il y a tout de même certaines études ayant démontré que le métabolisme de la vitamine A chez les poissons est affecté par des expositions aux contaminants. Defo *et al.*, (2014) ont observé que des expositions au cadmium et au nickel diminuent les taux des métabolites de la vitamine A dans les tissus de la perchaude (*Perca flavescens*). Ensuite, Lie et collaborateurs (2019) ont analysé les effets des expositions d'un pétrole conventionnel sur l'aiglefin (*Melanogrammus aeglefinus*) durant deux stades de développement. Ils ont observé plusieurs changements au niveau de l'expression génique et de l'accumulation des métabolites de la vitamine A induits par les expositions au pétrole. En conséquence, des évidences montrent que le métabolisme de la vitamine A est affecté par des expositions à différents contaminants chez les poissons.

En revanche, les mécanismes moléculaires de perturbation de voies de la vitamine A par les pétroles chez les organismes aquatiques n'ont pas été investigués autant que chez les mammifères et, à ce jour ne sont pas tous élucidés.

D'autres évidences permettent de croire que le récepteur AhR et son cofacteur ARNT interagissent avec la signalisation cellulaire liée à l'hypoxie (Hahn, 1998). À nouveau, la majorité de ces interactions ont été observées d'abord chez les mammifères, puis plus récemment, certaines études ont mis en évidence les liens entre les deux voies moléculaires. La protéine ARNT se lie aussi à la protéine HIF-1 α et ce complexe initie la signalisation cellulaire de la réponse à l'hypoxie chez les vertébrés. Quelques études plus récentes ont confirmé l'interaction entre les voies de signalisation de l'hypoxie et les voies d'AhR chez les organismes aquatiques. Premièrement, Fleming *et al.* (2009) ont analysé l'interaction entre l'hypoxie et AhR en combinant des expositions à l'hypoxie et à des contaminants, dont deux hydrocarbures, le BaP et le BkF. Leur étude sur des cellules de carcinome de foie d'une espèce de mené (*Poeciliopsis lucida*) a confirmé qu'il y a effectivement une compétition entre la signalisation de réponse à l'hypoxie et le métabolisme AhR pour la liaison à ARNT. Deuxièmement, une étude subséquente des mêmes chercheurs (Fleming & Di Giulio, 2011) menée sur le développement du poisson-zèbre, a permis d'observer qu'une exposition combinée d'hydrocarbures en mélange avec un milieu hypoxique augmente le taux de mortalité et d'œdèmes péricardiques lors du développement. Troisièmement, une étude sur la carpe prussienne (*Carassius auratus gibelio*) a aussi confirmé la toxicité des expositions combinées d'hydrocarbures et de sédiments, en plus de déterminer que l'hypoxie peut augmenter l'exposition des poissons aux hydrocarbures par une augmentation du flux d'eau à travers les branchies pour pallier le manque d'oxygène dans l'eau (Kreitsberg *et al.*, 2013). En dernier, deux études plus récentes sur une variété d'espèces aquatiques en milieu marin ont démontré qu'il est nécessaire de tenir compte de la qualité de l'environnement lors d'études d'évaluation du risque associé aux déversements de pétrole, principalement dû aux effets combinés de l'hypoxie, de la température et des hydrocarbures sur la santé des organismes (Dasgupta *et al.*, 2016; Serafin *et al.*, 2019).

1.2.15 Toxicité cardiovasculaire des produits pétroliers

À la suite du déversement de l'Exxon Valdez, plusieurs études se sont penchées sur les effets des expositions aux produits pétroliers sur la vie aquatique. Parmi ces études, plusieurs ont trouvé un lien entre les expositions au pétrole et des problèmes de développement et de fonctionnement du système cardiovasculaire. Tout d'abord, des malformations cardiaques ont été relevées chez le poisson-zèbre exposé à divers composés pétroliers individuels ou en mélanges lors de son développement. Ces études ont démontré que les hydrocarbures de 3 à 5 anneaux de carbones sont particulièrement nocifs et causent des

dysfonctionnements cardiaques chez les organismes adultes et des problèmes lors du développement embryonnaire (Incardona *et al.*, 2005; Incardona *et al.*, 2004). Ces effets ont été observés en comparant des embryons de poisson-zèbre exposés à différents HAP avec des embryons dont l'expression génique de la troponine cardiaque T a été altérée. Les effets observés ont été similaires pour les deux groupes d'embryons, soit une diminution ou un arrêt de la circulation sanguine et un battement cardiaque déficient. Les embryons exposés et les embryons mutants ont aussi développé des œdèmes et des déformations squelettiques. Cette étude a démontré que les troubles cardiaques induits par les pétroles lors du développement mènent aussi à d'autres effets néfastes lors du développement, par exemple la diminution de la circulation sanguine peut mener à la formation d'œdèmes et de malformations squelettiques (Incardona *et al.*, 2004). Une étude sur le poisson-zèbre a caractérisé les effets de l'inhibition d'une protéine impliquée dans le fonctionnement des canaux à ions des cellules cardiaques. Les effets observés étaient de l'arythmie et un blocage du signal atrioventriculaire. Ces effets causés par la perturbation des canaux à ions potassium (K^+) et des jonctions communicantes (*gap junctions*) chez le poisson-zèbre mutant étaient similaires aux effets causés par les expositions aux hydrocarbures (Langheinrich *et al.*, 2003; Incardona *et al.*, 2004). Les effets de ces mutants et ceux des poissons-zèbres exposés aux HAP étaient similaires. Les processus de contraction des cellules cardiaques sont affectés par les HAP qui bloquent les canaux ioniques K^+ et Ca^{2+} et prolongent les potentiels d'action (Brette *et al.*, 2014). Ce processus inhibe les contractions des cellules cardiaques, réduit le rythme du battement cardiaque et cause de l'arythmie (Sørhus *et al.*, 2016). Plus récemment, des études sur le mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) ont démontré les effets physiologiques des poissons exposés aux pétroles; ces poissons présentaient des dysfonctions et malformations cardiaques. Ces changements physiologiques peuvent persister chez certains poissons jusqu'au stade adulte, causant une réduction de la capacité de nage (Mager *et al.*, 2014). Finalement, une étude s'est attardée à comprendre les changements moléculaires induits par les HAP dans les tissus cardiaques. Rigaud et collaborateurs (2020) ont exposé des truites arc-en-ciel lors de leurs jeunes stades de développement au pyrène, au rétène et au phénanthrène pour observer les changements dans les protéines et le métabolome cardiaque. Les résultats de leur étude ont à nouveau démontré des perturbations des canaux K^+ , des jonctions serrées et de l'homéostasie du calcium menant à des dysfonctions cardiaques.

Un autre mécanisme moléculaire des cellules cardiaques qui peut être affecté par les expositions aux pétroles est la stimulation β -adrénergique, tel qu'étudié par Cox *et al.*, (2017). La puissance cardiaque, définie par la force et le rythme, est contrôlée par les catécholamines qui se lient aux récepteurs β -adrénergiques. Cette étude a démontré que les expositions au pétrole affectent la puissance cardiaque en perturbant la stimulation β -adrénergique, ce qui chez les organismes aquatiques adultes peut aussi mener à des problèmes de nages, d'alimentation et de survie. Finalement, tel que mentionné précédemment, le récepteur ARNT peut se lier à d'autres protéines incluses dans des voies cellulaires différentes de la

métabolisation des xénobiotiques. Des évidences ont montré que les souris déficientes en ARNT avaient des troubles importants de développement du système vasculaire. Ces troubles de développement proviennent d'une altération de l'angiogenèse régulée par l'interaction entre ARNT/HIF-1 α et différents facteurs de réponses à l'hypoxie, par exemple les VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

1.2.16 Effets des produits pétroliers sur le développement embryonnaire

Les produits pétroliers (principalement les hydrocarbures qu'ils contiennent) sont reconnus pour leur tératogénicité : ils causent des effets néfastes sur les embryons en développement. À nouveau, une abondance d'études a été effectuée afin de comprendre et d'évaluer les effets du déversement de l'Exxon Valdez, qui s'est produit en même temps que la période de reproduction du hareng du Pacifique. Cette concordance d'événements a permis d'observer que les embryons exposés au pétrole étaient plus petits, avaient des taux de survie plus faibles et possédaient plus de malformations que les œufs non-exposés (Carls *et al.*, 1999). En conséquence, la population de hareng a décliné durant les 4 années suivant le déversement (Cherr *et al.*, 2017; Thorne & Thomas, 2007). Une étude a posteriori a démontré la présence de HAP à des concentrations de 1 à 10 $\mu\text{g/L}$ dans les zones de fraie du hareng; dans 46 % des zones échantillonnées, la concentration d'hydrocarbures était suffisante pour causer de la cardiotoxicité développementale (Incardona *et al.*, 2015).

D'autre part, les effets des composés pétroliers sur le développement des poissons ont été comparés aux symptômes induits par la dioxine, un composé ayant une forte affinité pour le récepteur AhR. L'ensemble de ces effets, soit une diminution de la croissance, des œdèmes dans le sac vitellin et une augmentation des taux de mortalité chez les embryons exposés, a été nommé le *Blue sac disease* (Billiard *et al.*, 1999). Le *Blue sac disease* induit par les produits pétroliers chez les poissons lors de leur développement embryonnaire présente des effets similaires aux effets d'un déséquilibre oxydant, soit une dysfonction des membranes cellulaires causant des œdèmes et des hémorragies (Cantrell *et al.*, 1998; Gille & Sigler, 1995). Ces effets ont été observés chez les embryons de meunier noir (*Catostomus commersoni*) exposés aux pétroles des sables bitumineux de la région de l'Athabaska, en Alberta (Colavecchia *et al.*, 2006). En plus des symptômes associés au *Blue sac disease*, les résultats de cette même étude ont démontré que l'éclosion des embryons exposés était précoce et que les capacités de nage et d'alimentation étaient réduites (Colavecchia *et al.*, 2006). Enfin, une des premières études sur les effets physiologiques causés par les dilbits lors du développement embryonnaire du médaka (*Oryzias latipes*) a démontré que les dilbits induisent des malformations similaires à celles causées par le pétrole conventionnel. Les expositions aux dilbits induisent la formation du *Blue sac disease*, une inhibition du développement et des problèmes de la vessie natatoire à l'éclosion (Madison *et al.*, 2015).

Plus récemment, les études se sont attardées à comprendre plus en détail le mécanisme des effets des pétroles chez les poissons durant leur développement embryonnaire. Une revue de littérature par Gary N. Cherr et collaborateurs (2016) décrit les conséquences des expositions aux pétroles sur les mécanismes cellulaires et moléculaires. En voici les principales conclusions :

Premièrement, il a été démontré que les premiers stades de développement sont les plus sensibles aux contaminations par les pétroles, en raison de la complexité et de la précision nécessaire pour orchestrer chacune des étapes du développement. Le développement embryonnaire débute par la fertilisation de l'œuf, et s'ensuit une division rapide des premières cellules. L'embryon au stade blastula ne produit pas d'ARN, il utilise l'ARNm maternel, il peut donc difficilement répondre aux changements environnementaux, par exemple une contamination aux hydrocarbures. Toutefois, une des premières étapes du développement perturbées par les hydrocarbures est la formation de l'axe embryonnaire, guidée par la voie Wnt/ β -caténine. Globalement, cette voie permet l'accumulation de la β -caténine, un facteur de transcription des gènes qui définissent la formation de la partie postérieure des embryons (Cadigan & Nusse, 1997). Les embryons exposés durant cette fenêtre temporelle de développement présentent des malformations ou ne parviennent pas à l'éclosion (Fairbairn *et al.*, 2012; Pillai *et al.*, 2003).

Deuxièmement, les auteurs de la revue (Cher *et al.*, 2016) décrivent les effets des hydrocarbures sur le système cardiovasculaire et son développement. Les perturbations du système cardiovasculaire par les pétroles ont été discutées précédemment dans la section 1.2.15 et ne seront pas réitérées ici. Toutefois, les effets des pétroles sur la cardiogenèse seront brièvement discutés. Les expositions aux produits pétroliers augmentent les probabilités que les embryons de poisson développent des anomalies du myocarde, des malformations du ventricule ou des cardiomyocytes plus gros que les poissons non exposés (Hicken *et al.*, 2011; Incardona *et al.*, 2011). Les composés pétroliers, principalement de 3 à 5 anneaux de carbones, induisent des délais ou même inhibent l'inflexion (ou *looping*) du tube cardiaque des poissons (observé chez le poisson-zèbre et le hareng du Pacifique par Incardona et divers collaborateurs, 2004; 2006; 2013; 2015; 2016).

Finalement, outre les perturbations lors de la formation de l'axe de symétrie de l'embryon et de la formation du système cardiovasculaire, les poissons exposés aux produits pétroliers sont aussi plus susceptibles de développer des malformations squelettiques, par exemple à la mâchoire. Ces malformations durant l'embryogenèse peuvent diminuer l'efficacité d'alimentation ou empêcher les poissons de s'alimenter après l'éclosion.

1.3 Les espèces à l'étude

Les études antérieures sur la toxicité des produits pétroliers ont été majoritairement réalisées sur des organismes des milieux marins ou chez les poissons de la côte ouest-américaine. Les espèces à l'étude de cette thèse ont été choisies en majeure partie pour leur présence dans les écosystèmes de l'Est canadien et québécois. En effet, trois espèces de poissons habitant les écosystèmes aquatiques d'eau douce du Québec ont été choisies pour accomplir cette étude. Ces poissons étaient le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*). Les expositions ont été faites sur les jeunes stades de chacune de ces espèces en utilisant des pétroles similaires. Les expositions ont été faites sur les larves d'au maximum 24 h après l'éclosion pour le mené à grosse tête et immédiatement après la fertilisation des œufs pour la truite et le saumon. Ces stades de vie ont été choisis, car ils sont généralement les plus sensibles et les plus courts. Ainsi, l'impact des pétroles pourra être comparé entre les espèces. De plus, ces trois espèces possèdent des cycles de vie différents : leurs températures optimales de croissance et de reproduction diffèrent. Ainsi, le choix de nos espèces permet d'obtenir des bases de comparaison pour une majorité d'autres espèces de poissons d'eau douce.

1.3.1 Le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*)

Le mené à grosse tête, présenté à la figure 1.8, est un cyprin commun de la famille des *Cyprinidae*, qui comprend les menés et les carpes. Ils sont trouvés dans les écosystèmes d'eau douce de l'Amérique du Nord. Ce sont des poissons qui favorisent les petites étendues d'eau, telles que les rivières, les ruisseaux et les étangs, mais qui peuvent habiter les lacs. Ils sont très tolérants à différentes conditions environnementales, par exemple les eaux turbides, peu oxygénées et chaudes. Ils tolèrent des températures allant de 0 à 33 °C, bien que pour leur reproduction ils favorisent des températures chaudes, avoisinant les 25 °C. Les œufs du mené à grosse tête sont généralement pondus dans un nid, où y adhèrent aux surfaces et sont protégés par les mâles jusqu'à peu après l'éclosion. Le mené à grosse tête est une espèce d'intérêt dans le cadre de mon projet de doctorat, car ce poisson a une vaste distribution qui s'apparente à la distribution des oléoducs en Amérique du Nord. De plus, le mené à grosse tête est une espèce standard des études toxicologiques au Canada, car son développement est rapide. Les stades embryonnaire et larvaire sont de courte durée, permettant de conduire des expositions sous létales sensibles similaires à des expositions chroniques (Marentette *et al.*, 2015; ECCC 2013).

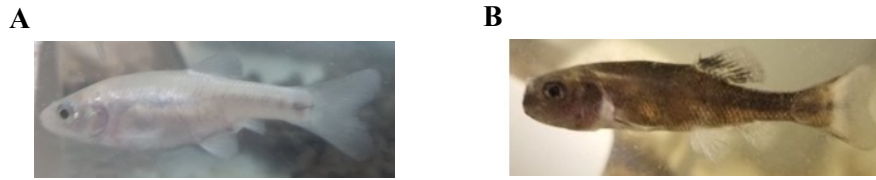


Figure 1.8. *Pimephales promelas* femelle (A) et mâle (B).

1.3.2 La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Inclus dans la famille des salmonidés, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Figure 1.9) est un poisson indigène de l'ouest de l'Amérique du Nord, qui a été introduit partout au Canada et ailleurs au monde. Cette espèce est généralement trouvée dans les eaux froides et douces, quoiqu'elle fréquente parfois les milieux estuariens. Au Canada, la truite arc-en-ciel est une des espèces les plus utilisées en aquaculture commerciale et pour les essais toxicologiques.

La fraie de la truite arc-en-ciel a lieu vers la fin de l'hiver et se poursuit jusqu'au printemps. Elle se produit dans les eaux froides et oxygénées, avec des températures allant de 0 à 14 °C. Cependant, plus les températures sont basses, plus la durée du stade embryonnaire sera longue. Par exemple, lorsque la température de l'eau est de 1 °C, l'éclosion de la moitié des embryons se fait en 182 jours à partir de la fertilisation, tandis qu'avec l'eau à une température de 14 °C, l'éclosion de la moitié des embryons se fait en 20 jours environ. Les œufs sont pondus au fond de l'eau dans des nids de gravier, où ils séjournent après l'éclosion, jusqu'à la résorption du sac vitellin. Les juvéniles quittent leur rivière natale après le premier hiver pour rejoindre les lacs. Cette espèce de poisson se nourrit d'une variété d'invertébrés, des insectes au zooplancton, et les adultes se nourrissent parfois d'autres poissons ou de crustacés (Environnement Canada, 1998).



Figure 1.9. Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) adulte. Source : Lisac Mark, U.S. Fish and Wildlife Service.

1.3.3 Le saumon atlantique (*Salmo salar*)

Le troisième poisson de notre étude était le saumon atlantique (*Salmo salar*, Figure 1.10). Cette espèce fait partie de la famille des salmonidés, de même que la truite arc-en-ciel, mais à la différence de cette dernière, cette espèce est anadrome, c'est-à-dire qu'elle se reproduit en eau douce et passe sa vie en eau salée. Cette espèce est retrouvée dans les zones tempérées et arctiques de l'hémisphère nord, majoritairement dans le nord de l'océan Atlantique. Le cycle de vie du saumon atlantique est le plus long parmi les trois espèces à l'étude. Les températures optimales du saumon atlantique sont de 2 à 10 °C. La fraie du saumon atlantique a lieu en rivière durant l'automne et l'éclosion se produit au printemps. Les œufs sont pondus dans un nid de gravier, où ils se développent durant l'hiver. Les alevins émergent du gravier vers le début de l'été en juin et passent les 2 à 5 premières années dans leur rivière natale, avant de migrer vers l'océan Atlantique (Page & Burr, 1991).



Figure 1.10. Saumon atlantique (*Salmo salar*). Source : Hans-Petter Fjeld, license: CC BY-SA 2.5

1.4 Les pétroles de l'étude

Au Canada, principalement en Alberta, il existe trois réservoirs de sables bitumineux, les réservoirs d'Athabasca, de Peace River et de Cold Lake (Busato & Maccari, 2016; CAPP, 2021) (Figure 1.11). Parmi les pétroles à l'étude, le Bluesky et le Clearwater McMurray proviennent de ces réservoirs, ce sont des pétroles non conventionnels ou bitumineux. Le troisième est un pétrole conventionnel lourd, provenant de puits de la région de Lloydminster, une petite ville en bordure de l'Alberta et de la Saskatchewan (Figure 1.11). Généralement, les dilbits sont plus lourds (plus visqueux et moins volatiles) et possèdent un indice d'acidité plus élevé que les pétroles conventionnels.

Les deux dilbits ont été choisis parce qu'ils possèdent des compositions chimiques similaires aux deux pétroles qui circulent le plus fréquemment dans les oléoducs canadiens : l'Access western blend et le Cold lake blend. La majeure différence entre ces pétroles est que les pétroles de notre étude proviennent d'une ou deux formations géologiques, alors que les dilbits Cold Lake Blend et Access Western Blend proviennent de différentes formations et régions. La production du dilbit Bluesky de notre étude provient de la formation géologique Bluesky-Gething située dans la région de Peace River, tandis que le dilbit Cold Lake Blend est un mélange de pétrole bitumineux provenant de différentes régions et formations géologiques, dont le réservoir Cold Lake qui se situe près de la frontière avec la Saskatchewan. Le dilbit Clearwater McMurray provient de la région de l'Athabasca et est extrait de deux formations géologiques connexes, soit la formation Clearwater, qui tient son nom d'une rivière proximale et de la formation McMurray, qui tient son nom de la ville de Fort McMurray. Pour sa part, l'Access Western Blend est aussi extrait de la formation de McMurray de la région de l'Athabaska (CQI, 2018). Le pétrole conventionnel a été choisi, car il est aussi un pétrole lourd avec un indice d'acidité élevé. Il est donc le type de pétrole conventionnel le plus similaire aux pétroles bitumineux de l'étude. Malgré les caractéristiques similaires des trois pétroles de l'étude, leur composition est différente, ce qui permet de réaliser une étude comparative.



Figure 1.11. Carte géographique présentant la distribution des sables bitumineux dans la province de l'Alberta au Canada. Les trois dépôts majeurs, l'Athabasca, le Cold Lake et le Peace River, sont délimités en orange. Le dilbit Bluesky de cette étude a été extrait dans la réserve Bluesky-Gething, du dépôt de Peace River, alors que le dilbit Clearwater McMurray provient d'une réserve près de Fort McMurray à la jonction de la rivière Clearwater dans le dépôt de l'Athabasca. La ville de Lloydminster (encadré orange) sur la frontière entre l'Alberta et la Saskatchewan est le site d'extraction du pétrole conventionnel de cette étude. Image par NormanEinstein, Domaine public.

1.5 Structure de la thèse

Dans le cadre de cette thèse, trois chapitres distincts sont présentés. Chaque chapitre avait pour objectif d'évaluer et de comparer les effets toxicologiques des pétroles conventionnels et des dilbits sur une espèce de poisson d'eau douce du Canada. Ces chapitres mis en communs ont permis de comparer la toxicité des deux types de pétroles sur différentes espèces de poissons ayant des cycles de vie et des caractéristiques distinctes. L'utilisation de techniques d'expositions des organismes et de mesure de biomarqueurs similaires entre les chapitres a permis de comparer la toxicité des pétroles entre les espèces et de déterminer celle qui serait la plus vulnérable à la suite d'un déversement de pétrole. Chaque chapitre a été basé sur le précédent afin d'intégrer les nouvelles connaissances, de parfaire la méthodologie et de mieux cibler quelles analyses chimiques et biologiques sont nécessaires pour évaluer la toxicité des pétroles. Un dernier chapitre de discussion en français est inclus dans cette thèse et se trouve à la suite des trois articles rédigés en anglais. Dans ce chapitre, un retour sur l'objectif global et les objectifs spécifiques est fait. Les résultats et les constats des articles sont comparés afin de mettre de l'avant les retombées scientifiques de cette thèse, d'observer les limites de l'étude et de déterminer des perspectives. Enfin, dans l'annexe, certains protocoles expérimentaux sont présentés, ainsi que certains résultats n'ayant pas été utilisés dans la rédaction des articles de cette thèse.

Le premier article de cette thèse s'intitule : *Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae exposed during their early development*. Dans cet article, l'objectif principal était de comparer la toxicité de deux dilbits avec la toxicité d'un pétrole conventionnel sur les larves du mené à grosse tête. Les hypothèses émises étaient que les dilbits sont plus toxiques que le pétrole conventionnel et que la toxicité des trois pétroles (mesurée par une gamme de biomarqueurs) augmente en fonction de la quantité totale d'hydrocarbures dans l'eau. L'approche méthodologique consistait à exposer les larves du mené à grosse tête à de l'eau contaminée par les composants des produits pétroliers dissous dans l'eau par agitation mécanique. Les larves ont été exposées aux trois pétroles durant les sept jours suivant leur éclosion. Des échantillons d'eau ont été récoltés pour y mesurer les concentrations des composés pétroliers. À la suite des expositions, la mortalité, le poids et les malformations grossières ont été comptabilisés. Puis, l'activité et l'expression génique d'enzymes impliqués dans les voies de détoxification (CYP1A et GST) et dans le métabolisme du stress oxydant (SOD et CAT) ont été mesurées par des techniques moléculaires et génétiques. Enfin, la peroxydation des lipides cellulaires a été mesurée par la technique des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Différentes analyses statistiques ont été utilisées afin de mettre en lumière les liens entre les composés chimiques des pétroles dissous dans l'eau et les réponses des biomarqueurs. Premièrement, la relation entre chaque composé chimique mesuré et la réponse des biomarqueurs a été déterminée par une régression

linéaire. Ensuite, les réponses moléculaires ont été comparées par des ANOVA et des comparaisons multiples, permettant de déterminer si certains traitements induisaient des réponses de biomarqueurs différentes chez les larves exposées et non-exposées. Enfin, une analyse en composante principale (ACP) a été utilisée, afin d'observer l'influence des composés pétroliers sur les réponses biologiques. Globalement, cet article souligne qu'il est nécessaire d'analyser une variété de biomarqueurs afin de bien comprendre et de comparer adéquatement la toxicité des différents types de pétroles. Aussi, étant donné la composition variable et hétérogène des pétroles, il est nécessaire d'obtenir des analyses chimiques complètes des hydrocarbures dissous dans l'eau contaminée par les pétroles, afin de mieux prédire les effets sur la faune aquatique. Les différents composés pétroliers causent des effets toxiques spécifiques et il serait nécessaire de mieux comprendre les effets additifs et synergiques de ces composés.

Le deuxième article de la thèse s'intitule : *Comparative toxicity of conventional and unconventional oil during rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) embryonic development: From molecular to health consequences*. Les objectifs de cet article étaient de comparer la toxicité des pétroles conventionnels et des dilbits sur la truite arc-en-ciel lors de son développement, d'évaluer la toxicité selon le stade de vie des poissons exposés et d'observer les effets d'une exposition aux pétroles sur le développement des poissons qui seraient ensuite retournés dans un milieu non contaminé. En se basant sur les observations faites dans le premier chapitre, les hypothèses suivantes ont été émises : le dilbit est plus toxique que le pétrole conventionnel; les poissons exposés à partir de la fertilisation sont plus sensibles que les poissons exposés à un stade plus avancé de leur développement; et les poissons exposés durant leur développement subissent des malformations et des retards de développement pouvant mener à la mort précoce des embryons ou à une mort tardive malgré un retour en milieu non contaminé. Pour ce volet de la thèse, cinq expositions ont été conduites : 1) de la fertilisation à l'éclosion; 2) de la fertilisation à l'éclosion suivie d'une remise en milieu non contaminé; 3) du stade œillé à l'éclosion; 4) du stade œillé à la résorption du sac vitellin et 5) de l'éclosion à la résorption du sac vitellin. Pour chacun de ces stades, la mortalité a été comptabilisée et l'expression génique et l'activité enzymatique de CYP1A ont été analysées. Les composés pétroliers dissous dans l'eau ont été mesurés, permettant de lier les réponses moléculaires observées aux concentrations de chaque composé. Des photographies des embryons de l'exposition 1 ont été prises afin d'observer l'état du développement des embryons juste avant l'éclosion par la mesure de la taille des yeux. Puis, pour observer l'effet des pétroles et de leur concentration sur l'éclosion, des graphiques de densité d'éclosions ont été faits. Ces graphiques présentent la quantité d'éclosions par jour, à partir des premières éclosions jusqu'aux dernières. La quantité de mortalité quotidienne a aussi été observée afin de déterminer si les périodes de mortalités importantes sont liées aux étapes cruciales du développement, par exemple la formation de l'axe de symétrie ainsi que la formation du système cardiovasculaire des embryons. Les analyses statistiques utilisées ont été similaires à celles utilisées précédemment, soit des régressions

linéaires, des ANOVA, des comparaisons multiples et des ACP. Cet article a permis d'observer la sensibilité de chaque stade de développement des poissons exposés aux hydrocarbures et de déterminer que les expositions lors du développement peuvent induire des effets nocifs à long terme même lors d'un retour en milieu non contaminé. À nouveau, cet article souligne l'importance de protéger les organismes en développement des contaminations aux hydrocarbures pétroliers.

Le troisième chapitre de cette thèse s'intitule : *Molecular effects and early developmental toxicity of a conventional and unconventional oil on the Atlantic salmon (Salmo salar)*. Les objectifs de cet article étaient d'évaluer et de comparer la toxicité d'un pétrole conventionnel et d'un dilbit sur différents stades de développement du saumon atlantique, par la mesure du métabolisme de détoxification phase I et II, des capacités de réparation de l'ADN et des dommages oxydants (lipidique et génomique). Après avoir observé les retards de développement des embryons de truite arc-en-ciel exposés aux pétroles, un objectif spécifique supplémentaire de cet article était d'observer les effets des pétroles sur le développement des embryons de saumon par la mesure de gènes impliqués dans les voies de développement qui peuvent interagir avec les voies d'AHR. Les hypothèses émises étaient qu'à nouveau le dilbit cause plus de mortalité que le pétrole conventionnel et que les embryons exposés depuis la fertilisation sont plus affectés par les expositions que ceux exposés plus tardivement. Une hypothèse supplémentaire était que l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire et la formation des yeux (métabolisme de la vitamine A et réparation de l'ADN) est affectée par les expositions. L'approche méthodologique, similaire aux deux premiers chapitres, était d'exposer les embryons à partir de la fertilisation des œufs ou à partir du stade œillé à de l'eau contaminée par les hydrocarbures dissous d'un pétrole conventionnel et d'un dilbit. Des enzymes et des gènes des voies du métabolisme de détoxification ont été mesurés, afin de comparer les effets des pétroles sur les embryons exposés à partir de la fertilisation ou du stade œillé. Étant donné les observations de malformations faites précédemment, ainsi que l'augmentation des dommages oxydants, l'expression de gènes impliqués dans la formation des yeux et du développement, et dans la réparation de l'ADN a été mesurée. Des photographies des embryons ont été prises immédiatement après l'éclosion, afin d'observer l'avancement du développement et de comptabiliser les malformations (œdèmes, hémorragies, malformations de la mâchoire et des yeux). Les statistiques utilisées dans cet article (régressions linéaires, 2-way ANOVA avec comparaisons multiples et ACP) ont à nouveau permis d'établir des relations entre les composés chimiques issus des pétroles dans les milieux d'exposition, de comparer l'effet des pétroles sur les embryons et d'observer les liens entre composés pétroliers et les réponses biologiques. Cet article a permis de comparer la sensibilité du saumon atlantique exposé tôt lors de son développement et exposé plus tardivement. Les effets des deux types de pétroles sur des protéines et gènes de développement et de détoxification ont été observés et comparés.

2 Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae exposed during their early development

Effets létaux et sous-létaux des pétroles bitumineux dilués et des pétroles conventionnels sur les larves du mené à grosse tête (*Pimephales promelas*) exposées en début de développement

Auteurs :

Roxanne Bérubé¹, Charles Gauthier¹, Thibault Bourdin¹, Marilou Bouffard¹, Gaëlle Triffault-Bouchet², Valérie S. Langlois¹, Patrice Couture¹

1. Institut National de la recherche scientifique, 490 rue de la Couronne, Québec, Canada.

2. CEAEQ, Ministère du développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques, 2700 rue Einstein, Québec, Canada.

Titre de la revue :

Aquatic Toxicology, accepté le 31 mai 2021

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105884>

Contribution des auteurs :

Roxanne Bérubé : Conceptualisation du projet, réalisation des expériences en laboratoire, traitement des données et présentation des résultats sous forme de graphiques. Supervision des stagiaires : Thibault Bourdin et Marilou Bouffard. Responsable de la rédaction du manuscrit.

Charles Gauthier : Conceptualisation du projet, acquisition du financement et des ressources matérielles. Réalisation des expositions de poissons en laboratoire et collaboration lors de l'analyse des résultats.

Thibault Bourdin : Analyse de l'expression génique et compilation des résultats présentés dans les figures 2, 3 et S3 et S5, ainsi qu'au tableau S3.

Marilou Bouffard : Analyse de la peroxydation des lipides. Réalisation des analyses de laboratoire et compilation des résultats présentés dans la figure 5.

Gaëlle Triffault-Bouchet, Valérie Langlois et Patrice Couture : Responsable de la conceptualisation initiale et de l'acquisition du financement. Supervision de l'ensemble des travaux.

Tous les auteurs ont participé aux révisions de l'article.

2.1 Abstract

The increasing extraction of bitumen from the oil sands region in Canada is creating a need for transport. Spills from current and projected pipelines represent a significant environmental risk, especially for freshwater ecosystems. The toxicity of diluted bitumen (dilbit) on freshwater fish is largely unknown. This study assessed the toxicity of two dilbits (Clearwater McMurray and Bluesky) and compared their toxicity to a conventional oil (Lloydminster Heavy) on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. Larvae were exposed to various concentrations of the water-accommodated fraction (WAF) of the oils during 7 days from hatching. In the WAF treatments, the concentrations of volatile organic compounds (VOCs), including benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX), hydrocarbons containing 6 to 10 carbon atoms (C₆₋₁₀), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their alkylated forms were measured. Both dilbits contained higher concentrations of light components, while the conventional oil contained the highest concentrations of PAHs and alkylated PAHs. The Clearwater McMurray dilbit induced a higher mortality, with a maximum of 65.3 %, while the other oils induced a similar mortality up to 16.5 % and 18.6 % for Lloydminster and for Bluesky, respectively. All three oils induced an increase in gene expression of the phase I detoxification enzyme (*cyp1a*) with increasing total hydrocarbon concentrations. All three exposures induced a similar increase in glutathione S-transferase (GST) activity, but no change in *gst* gene expression. For the Bluesky and Lloydminster exposures, an increase in malondialdehyde concentration was also observed, suggesting a rate limiting capacity of GST and phase II enzymes to perform the biotransformation of the PAH metabolites. Overall, this study brings new insights on the toxicity of dilbits in comparison to conventional oils on early life stages of North American freshwater fish and demonstrated that dilbits can be more toxic than conventional oils, depending on their composition and diluent proportions.

2.2 Introduction

Bitumen production is increasing in Canada (from 2.9 million barrels per day in 2018 and expected to reach 4.25 million barrels per day in 2035) as is the need for transport, mainly through pipelines (CAPP, 2019). To allow transport by pipelines, bitumen must be diluted with a mixture of lighter hydrocarbons, such as gas condensates, and various components to increase its fluidity (Alsaadi *et al.*, 2018a; King *et al.*, 2017a). With the increasing volume of diluted bitumen (dilbit) in circulation on the North American continent, there is an increased risk of spills in freshwater ecosystems (King *et al.*, 2017a). In fact, in the past years, important pipeline accidents were reported, including the Kalamazoo River spill in Michigan (USA) and the Kinder Morgan spill in Burnaby (Canada), (Deshpande *et al.*, 2018; Hua *et al.*, 2018). Both spills induced environmental damage, and oil residues and aggregates with sediment were still present many years after (Dew *et al.*, 2015; EPA 2013).

Bitumen is a heavy and dense matrix since it contains higher proportions of resins and asphaltenes, versus conventional oils (NASM, 2016). However, when bitumen is diluted for transport, its composition is changed and the content of lighter hydrocarbons increased depending on the diluent proportion, which is usually around 30 %, but may vary according to the seasons (Alsaadi *et al.*, 2018a; Crosby *et al.*, 2013). In addition, the composition and type of diluents vary according to the producers, rendering the physical characteristics and chemical composition of dilbits more variable than those of conventional oils (King *et al.*, 2017b). Consequently, due to the addition of diluents, most dilbits contain a higher percentage of monoaromatics and low molecular weight (LMW) hydrocarbons than conventional oils. The toxicity of conventional or non-conventional oils is highly dependent on the content of LMW hydrocarbons and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Adams *et al.*, 2014). Hydrocarbons containing less than 10 carbon atoms, encompass monoaromatic hydrocarbons and volatile organic compounds (VOCs), such as benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX). Philibert *et al.* (2016) observed that for zebrafish embryos, the concentration of monoaromatic hydrocarbons is a better predictor of lethality than PAH concentrations. These lighter components also rapidly evaporate or are dissolved in water mostly in the first hour after a spill, hence inducing toxic effects, but only for a short duration (Alsaadi *et al.*, 2018a; Dew *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015a).

Exposure to petroleum hydrocarbons is known to activate the xenobiotic metabolism through the aryl hydrocarbon receptor pathway (Incardona, 2017; Denison & Nagy, 2003; Hahn, 2002). Metabolization of PAHs is initiated with a hydroxylation reaction by cytochromes P450, mainly CYP1A in phase I, followed by conjugation reaction in phase II by enzymes such as glutathione S-transferase (GST) (Alsaadi *et al.*, 2018b; Hodson *et al.*, 2007). Being among the most upregulated genes in response to hydrocarbon exposure, *cyp1a* and *gst* expression can be used as biomarkers to evaluate and compare oils toxicity (Cherr *et al.*,

2017; Hassan *et al.*, 2015). Although phase I is meant to increase the solubility of exogenous molecules for excretion, CYP1A activity leads to the bioactivation of PAHs and to the production of reactive oxygen species (Lim & Luderer, 2018; Cherr *et al.*, 2017; Lushchak, 2011; Penning *et al.*, 1996). Bioactivated PAHs can deplete the glutathione reserves by GST activity leading to a decrease in antioxidant potential (Lushchak, 2011). These metabolites can also enter the redox cycles and amplify the ROS production, for example by the formation of PAH o-quinones (e.g. B[a]P-7,8-dione) who are highly reactive electrophilic metabolites. These compounds undergo non-enzymatic or enzymatic reduction by aldo-keto reductases using NADPH to form B[a]P-7,8-catechol, which in turn goes through autoxidation to reform B[a]P-7,8-dione, hence creating repeating cycles of ROS production (Kosmachevskaya *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012; Burczynski & Penning, 2000). Moreover, studies have shown a disruption in lipid metabolism and a lipid deprivation in adult fish tissues following oil exposures. Retinoic acid hydroxylation by CYP1A leads to an increased metabolization rate and depletion of retinoic acid storage (Laurel *et al.*, 2019; Sørhus *et al.*, 2017). The disruption of lipid metabolism may also lead to impacted growth and development during early life stages (Cherr *et al.*, 2017).

An increasing amount of information is available regarding the toxicity of dilbits and weathered dilbits on freshwater fish (McDonnell *et al.*, 2019; Alderman *et al.*, 2018; Alsaadi *et al.*, 2018b; Barron *et al.*, 2018; Robidoux *et al.*, 2018; Alderman *et al.*, 2017a; Alderman *et al.*, 2017b; Madison *et al.*, 2017). However, very few studies have compared the toxicity of dilbits with that of conventional oils in freshwater fish. One study by Philibert *et al.* (2016) compared two conventional oils, mixed sweet blend, and medium sour composite, to one dilbit blend. These conventional oils having a lower density compared to dilbits could react differently in case of an oil spill. In comparison, our study used three oils: Lloydminster Heavy Conventional oil; Bluesky dilbit and Clearwater McMurray dilbit. Lloydminster is extracted from the Lloydminster region, in Alberta, Canada. It is a heavy crude oil, with a high sulfur concentration and was chosen for its similar density to the dilbits (Crude Quality Inc., 2020). The Clearwater McMurray dilbit was extracted from the McMurray and the Clearwater formations found in the Athabasca oils sands area. The Bluesky dilbit was extracted from the Bluesky-Gething formation, the main reservoir of the Peace River oil sands area. Both dilbits are unconventional heavy oils with a high sulfur concentration and were each extracted from a single well. They were chosen for their similarity with the most common dilbits circulating in Canadian pipelines, the Cold Lake Blend (CLB) and the Western Canadian Select (WCS), which are blends of dilbits from various wells and were also implicated in the Kalamazoo River spill (Deshpande *et al.*, 2018). Barron *et al.* (2018) evaluated the acute toxicity (96 h) of CLB and WCS on fathead minnow larvae (7-12 days) and obtained the LC50 for the major components (BTEX, tPAH and TPH). Fathead minnows (FHM) are ubiquitous in North America, specifically in freshwater ecosystems bordering pipeline systems and they are a model species in various ecotoxicological studies. In this study, newly hatched FHM

larvae were exposed to the three oils, in order to test the hypothesis that dilbit toxicity is comparable to conventional oil toxicity in FHM during their early life stages. Dilbits toxicity was also compared with dilbits toxicity measured in previous studies, to gain a better understanding of the effects of various dilbits on Canadian freshwater species during different life stages and with a chronic exposure, compared to the acute exposure by Barron *et al.* (2018). We used a range of biomarkers involved in the detoxification pathway, the antioxidant capacities, and the oxidative stress response. Finally, we also examined relationships between the chemical composition of the oils and biomarker responses.

2.3 Methodology

2.3.1 Oils and chemical analysis

The three oils used in this study were purchased through Crude Quality Inc. (Edmonton, Alberta, Canada). Chemical analysis of oils and WAF dilutions were conducted by the *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec* (CEAEQ), from the *Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques*, in Québec, Canada. Briefly, total concentrations of VOCs and PAHs were analyzed by GC-MS, while C₆-C₁₀ and C₁₀-C₅₀ total concentrations were analyzed by GC-FID (CEAEQ 2015; 2016). Concentrations of 64 VOCs, including BTEX, and of 141 parent and alkylated PAHs were measured. The components were measured in three WAF dilutions, in triplicate throughout the exposures (1 %, 10 %, and 75 %).

2.3.2 Exposures and WAF preparation

Fathead minnow eggs were produced by the colony maintained at the INRS, Quebec, Canada. The colony was maintained in an environmental room at 24 ± 1 °C, with 16 h daylight. The colony was fed twice a day every day with either artemia, pellets or flakes. Water was monitored weekly for ammonia, nitrite, nitrate, and pH, and was renewed by 70 % twice a week or more if needed. Eggs were collected every day at a maximum of 24 h after spawning and kept in separate aerated jars until hatching (~3 to 5 days). FHM larvae exposures were conducted for 7 days and started within 24 h after hatching. Larvae were placed by groups of 50 in 500 mL jars filled with exposure media and aerated. Every day, reconstituted water was prepared with a mixture of salts (Ca⁺ 70 µM; Cl⁻ 129 µM; K⁺ 12 µM; Mg²⁺ 13 µM; Na⁺ 179 µM; SO₄²⁻ 63 µM; pH 7.5) (Lapointe & Couture, 2009) and was allowed 24 h of aeration before use. Reconstituted water was used for water renewal of the colony and for the WAF preparation. Water accommodated fraction (WAF) was prepared daily during the exposure, according to a standardized method (Singer *et al.*, 2000). The WAF method we used, is also known as Low Energy WAF; LEWAF. Briefly, oil and reconstituted water (100 g oil/L water) were mixed at low energy for 18 h. After 1 h of settling, the WAF was collected and diluted

with reconstituted water. Exposure media consisted of nine direct WAF dilutions (0.32, 1, 3.2, 5, 7.5, 10, 25, 50, and 75 % of WAF) and a control group in clean reconstituted water, each in replicates of 5, for a total of 50 jars each containing 50 larvae. Exposure media were changed daily, and larvae were fed with newly hatched brine shrimps. Dead larvae were removed daily and counted. At the end of the 7 days of exposures, larvae were collected, malformed larvae were scored, and living larvae were counted. Larvae were pooled ($n = 9-10$ larvae per pool, 5 replicates per treatment), weighed and mean weight was calculated for each treatment. Living larvae pools were frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis. Exposures to each oil were performed sequentially.

2.3.3 Enzyme activity (SOD, CAT and GST)

The activities of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) were measured using Cayman Chemicals kits (AnnArbor, Michigan USA). For SOD and CAT activities, the larval pools were homogenized in ice cold HEPES buffer (1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0,1% Triton-X100) in a mixer mill (MM400 RETSCH®) for 30 sec at 30 Hz. The homogenate was split in two even fractions before centrifugation (SOD: 1500 g, 5 min; CAT: 10,000 g, 15 min, at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). For GST activity, the larval pools were homogenized in ice cold buffer (100 mM potassium phosphate, 2 mM EDTA, pH 7.0) with the mixer mill (30 sec at 30 Hz). Then, homogenates were centrifuged (10,000 g, 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatants were removed and stored in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis, which were performed in less than a month after storing. Quantification of the three enzyme activities was made by following manufacturer's instructions. Briefly, for SOD activity, 200 μL of radical detector was added to each microplate well, with 10 μL of standard or sample in triplicate. Then, reaction was initiated by adding 20 μL of xanthine oxidase quickly to all wells. Plates were incubated (30 min, RT), then absorbance was read at 450 nm. For CAT activity, 100 μL of diluted assay buffer, 30 μL of methanol and 20 μL of sample or standards with a positive control were added to the wells, in triplicate. The reaction was initiated by adding 20 μL of hydrogen peroxide quickly to all wells. Plates were incubated (20 min, RT), then 30 μL of potassium hydroxide and 30 μL of catalase Purpald were added before a second incubation (10 min, RT). Lastly, 10 μL of catalase potassium periodate were added to each well and absorbance was read at 540 nm after an incubation (5 min, RT). Finally, GST activity was measured by adding 170 μL of assay buffer to background wells and 150 μL of assay buffer to positive controls and samples wells. Then, 20 μL of glutathione were added to each well and 20 μL of GST control or 20 μL of sample were added to the wells, in triplicate. Reaction was initiated by adding 10 μL of CDNB quickly. Plate absorbance was read at 340 nm every minute for 10 min. For each enzyme, total activity was measured with a spectrophotometer (Varian Cary 100; Varian Inc., Palo Alto, CA). Enzyme activity was normalized with the sample's protein

concentration, which was measured with Bradford's assay (Pierce™ Coomassie Plus Assay Kit, ThermoFisher).

2.3.4 Gene expression analysis

To measure gene expression in each treatment, RNA was extracted from larvae pools (10 whole larvae, 5 replicates per treatment) using TRIzol® (Invitrogen) by following the manufacturer's protocol. Briefly, larvae were homogenized with the mixer mill (30 sec at 30 Hz) by adding 0.75 mL of TRIzol® and two stainless steel beads to the frozen larvae pool. RNA was purified with the iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). DNase mix was added to the samples (1 µL of DNase mix/1 µg of RNA) and incubated in a thermocycler, for 5 min at 25 °C and 5 min at 75 °C (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, Ontario). The final RNA concentration was measured using a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (ThermoFisher, Canada). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the iScript™ RT Supermix (Bio-Rad Laboratories). RNA samples were diluted to obtain 1 µg of total RNA, the RT Supermix (containing RT and primers) was added and placed in the thermocycler (5 min at 25 °C, 20 min at 46 °C and 1 min at 95 °C). The cDNA product was diluted 80-fold prior to qPCR amplification for all genes and standard curves were prepared by serial dilutions (1:4) starting at 100 ng. In each plate, samples without RT and no template controls were included. The input values were normalized with the mean expression level of two housekeeping genes (elongation factor 1 alpha: *ef1a* and 60S ribosomal protein L8: *rpl8*). Gene relative expression was calculated using the Ct mean of the two reference genes and normalized using their expression in control group. The primers used in the study were obtained from Alsaadi *et al.* (2018b) and Lara-Jacobo *et al.* (2021). Primer sequences and information are listed in table 2.3. Genes of interest included genes involved in the detoxification pathway phase I (cytochrome P450: *cyp1a*) and phase II (glutathione-S-transferase: *gst*) and the antioxidant pathway (superoxide dismutase: *sod* and catalase: *cat*).

2.3.5 Lipid peroxidation analysis

Lipid peroxidation was measured by quantifying malondialdehyde (MDA), with the TBARS assay kit (Cayman Chemicals, MI), according to the manufacturer's instructions. Briefly, homogenates of whole larvae pools (n = 5/treatment) were prepared with the mixer mill (30 sec at 30 Hz) and by mixing samples with ice cold RIPA Buffer (dilution 1/10) (Cayman chemicals) containing a mix of protease inhibitors (1 µL PI/100 µL RIPA) (Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged (1600 g, 10 min at 4 °C), then the supernatant was kept at -80 °C until performing the assay. Samples were mixed with reagents (SDS

solution and color reagent) and brought to a boil for 60 min, then samples were placed on ice for 10 min. After a second centrifugation (1600 g, 10 min at 4 °C), supernatant absorbance was read at 540 nm.

2.3.6 Statistical analysis

Mean and standard deviation were calculated for every treatment group, with removal of outliers with the interquartile range method. To determine which treatment induced a response that significantly differed from the control, we used a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. When data did not pass normality and homogeneity of variance, they were either transformed or Kruskal-Wallis test and Dunn's test were used. Two-way ANOVAs were also performed, combined with a multiple pairwise comparison, allowing to determine which oil induced a different biomarker response for each WAF concentration. Then, linear regressions were performed for all biomarkers as a function of each measured components in WAF concentrations. Principal components analysis (PCA) was performed on all variables, with individual points representing the 5 replicate per treatment (3 oils, 10 WAF concentrations for a total: n = 150). Statistical analyses were performed with R version 4.0.0 (packages ggplot2, tidyverse, FactoMineR and factoextra) (Wickham, 2016; 2019; Kassambara, 2020; R Core Team, 2020) and GraphPad (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.4 Results

2.4.1 Chemistry

Hydrocarbons from the three major components of oils, PAHs, VOCs, and C₆-C₁₀, were measured in 1, 10, and 75 % WAF (Table 2.1 & S2.1). The concentrations of hydrocarbons measured in this study increased with the WAF concentrations for the three oils. The concentration of PAHs was the highest in Lloydminster (CV), while it was the lowest in Clearwater (DB) (Table 2.1). Inversely, the concentrations of the low molecular weight compounds (VOCs and C₆-C₁₀) were higher in Clearwater and lower in Lloydminster. Per example, C₆-C₁₀ ranged from 435 ± 385 µg/L at 1 % WAF to 56500 ± 14500 µg/L at 75 % WAF of Clearwater (DB) and ranged from 90.50 ± 1.5 µg/L at 1 % WAF to 5800 ± 0.0 µg/L at 75 % WAF of Lloydminster. While the concentration of benzene in 75 % WAF was 520 ± 28.28 µg/L with the Lloydminster, 1465 ± 1322.29 µg/L with the Bluesky and 2066.67 ± 950.44 µg/L with the Clearwater. Bluesky concentrations of VOCs and C₆-C₁₀ were higher than in Lloydminster, but PAHs concentration was higher than in Clearwater. The concentrations of 141 PAHs/alkylated PAHs were measured and compared in the 75 % WAF concentration. Per example, the concentration of naphthalene in the 75 % WAF was 15.33 ± 0.71 µg/L in the Lloydminster, 10.4 ± 0.849 µg/L in the Bluesky and

3.36 ± 1.97 µg/L in the Clearwater. For all oils, benzene was the most concentrated BTEX/VOC, while naphthalene was the most concentrated PAH measured.

Table 2.1. Mean concentrations of PAHs, VOCs, including BTEX, and C6-C10 measured in 1 %, 10 % and 75 % WAF for each oil (n = 2- 3)

Oil	Component (µg/L)	WAF (%)		
		1	10	75
Lloydminster (CV)	PAHs	0.93 ± 0.17	19.05 ± 10.04	89.66 ± 18.44
	VOCs/BTEX	11 ± 1.41	89.45 ± 24.25	789.3 ± 55.7
	C ₆ -C ₁₀	90.50 ± 1.5	895 ± 45	5800 ± 0
Bluesky (DB)	PAHs	0.63 ± 0.06	6.76 ± 0.79	60.67 ± 0.29
	VOCs/BTEX	35.5 ± 8.34	115.35 ± 114.06	2597 ± 2097
	C ₆ -C ₁₀	398 ± 526	690 ± 721	25900 ± 34082
Clearwater McMurray (DB)	PAHs	0.15 ± 0.1	3.85 ± 1.82	23.05 ± 3.54
	VOCs/BTEX	61.75 ± 1.65	541.33 ± 118.37	3509 ± 1386
	C ₆ -C ₁₀	435 ± 385	7700 ± 2000	56500 ± 14500

2.4.2 Mortality

Mortality was affected by the oil type, the WAF concentrations and their interaction for each exposure, as measured with a two-way ANOVA (Figure 2.1; WAF = $p < 0.0001$; Oil = $p < 0.0001$; interaction = $p < 0.001$). At 75 % WAF, both Clearwater and Bluesky dilbits induced a different percentage of mortality from each other: 48.7 ± 21.2 % and 16.5 ± 2.6 %, respectively. Lloydminster-induced mortality at 75 % WAF (21.7 ± 5.1 %) was not different from the mortality induced by either dilbit. In addition, at 75 % WAF, mortality was significantly higher in all oil treatments than in controls. Already, at 50 % WAF, Clearwater-induced mortality was significantly higher compared to controls ($p < 0.0001$), while Lloydminster and Bluesky exposure was not. At 50% WAF, all three oils induced a different percentage of mortality, with the highest values again for Clearwater (DB) (65.3 ± 28.0 %), followed by Bluesky (DB) (25.2 ± 14.1 %) and Lloydminster (CV) inducing the lowest mortality (8.5 ± 6.8 %). Lastly, at 25 % WAF, only the Clearwater (DB)-induced mortality was significantly higher than in controls.

There were significant and positive correlations between mortality and the concentration of each class of components in the WAF measured (Figure 2.1B, C and D). The regressions demonstrated that concentrations of VOCs and C₆-C₁₀ are better predictors of mortality than PAHs. As presented in figure 2.1D, Lloydminster contained the highest total PAH concentration, but caused less mortality than both dilbits, whereas Clearwater contained the lowest total PAHs but induced the highest mortality. In addition, the WAF containing the highest VOCs and C₆-C₁₀ were also where the important mortality was observed (Figure 2.1A, B and C, and Table 2.1, see above).

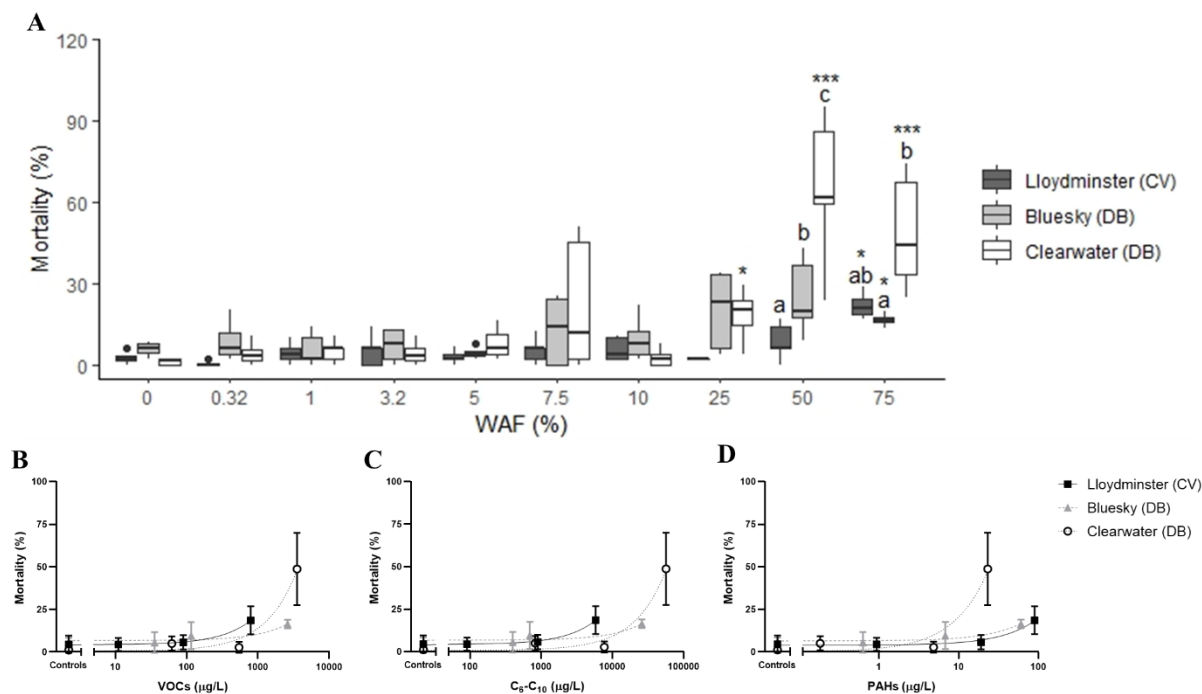


Figure 2.1. Percentage of mortality of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the Lloydminster conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Bluesky and Clearwater. Significant differences between each treatment and their control group (*) were identified by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and Dunnett or Dunn’s post hoc analysis (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparison and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), C₆-C₁₀ (C), and PAHs (D) measured in 1, 10, and 75 % WAF. Data is presented as mean \pm standard deviation, and linear regressions are presented on the lower panels (Lloydminster: $p \leq 0.0001$, $R^2 = 0.48$; Bluesky: $p \leq 0.0005$, $R^2 = 0.24$ and Clearwater: $p \leq 0.0001$, $R^2 = 0.56$).

2.4.3 Mean weight

According to a two-way ANOVA analysis, mean weight was influenced by oil type and by WAF concentrations, but not by their interaction ($p < 0.0001$ and $p = 0.01$ for oil type and WAF, respectively) (Figure S2.2). The mean weight of larvae in the Bluesky exposure was significantly smaller than at least one other oil for the majority of WAF concentrations, except for 50 % where there were no differences (Figure S2.2A). WAF concentrations at 3.2 % and 75 % WAF of Lloydminster caused a significant smaller mean weight than control group. No differences in larval weight were observed for any WAF concentration compared to the control group in Bluesky and Clearwater exposures. In addition, linear regressions (Figure S2.2B, C, and D) demonstrated that there was a correlation between mean weight and the concentration of either class of components of the WAFs for all three oils (Lloydminster: $p < 0.0002$, $R^2 = 0.58$, Bluesky:

$p < 0.013$, $R^2=0.31$; Clearwater: p -value < 0.01 , $R^2 = 0.41$). Like for mortality, mean weight also seemed to be more influenced by lighter components (VOCs and C_6 - C_{10}) than by PAH concentration.

2.4.4 Gene expression and enzymatic activity of SOD and CAT

Gene expression and activity of antioxidant enzymes, SOD and CAT, were measured in each WAF treatment and presented as a function of the WAF concentration and of the measured components (Figure S2.3 to S2.6). Gene expression of neither enzyme was affected by any treatment, as measured by linear regressions and ANOVA. The type of oil did not have any effect on the gene expression of *sod1* and *cat*. Enzymatic activity of both enzymes increased along with the WAF concentration in the Lloydminster oil exposure, as demonstrated by a significant linear regression in Figure S2.5A and Figure S2.6A. However, ANOVA did not identify any difference between treatment and control groups. Hence, oil type and WAF concentration did not have a significant effect on the antioxidant enzyme activity of SOD and CAT.

2.4.5 Expression of *cyp1a*

Expression of *cyp1a* (Figure 2.2) was influenced by the oil type and by the WAF concentrations ($p < 0.0001$ for both factors), but not by their interaction. Specifically, the relative *cyp1a* expression was significantly higher at 75 % and 50 % WAF of Clearwater, with 79-fold and 78-fold, respectively, compared to 16-fold and 23-fold for 75 % WAF of Lloydminster and Bluesky, and to 11-fold for 50 % WAF of Lloydminster and Bluesky, respectively. These WAF concentrations of Clearwater and Lloydminster also induced a significantly higher *cyp1a* response than their respective control groups. For Bluesky, only 75 % WAF induced a higher expression of *cyp1a* compared with the control group. The expression of *cyp1a* increased significantly with the concentrations of the main oil components measured in the WAFs. Here as well, the WAF with the most concentrated LMW components (Clearwater) induced the highest the *cyp1a* expression (Figure 2.2A, B, C and D).

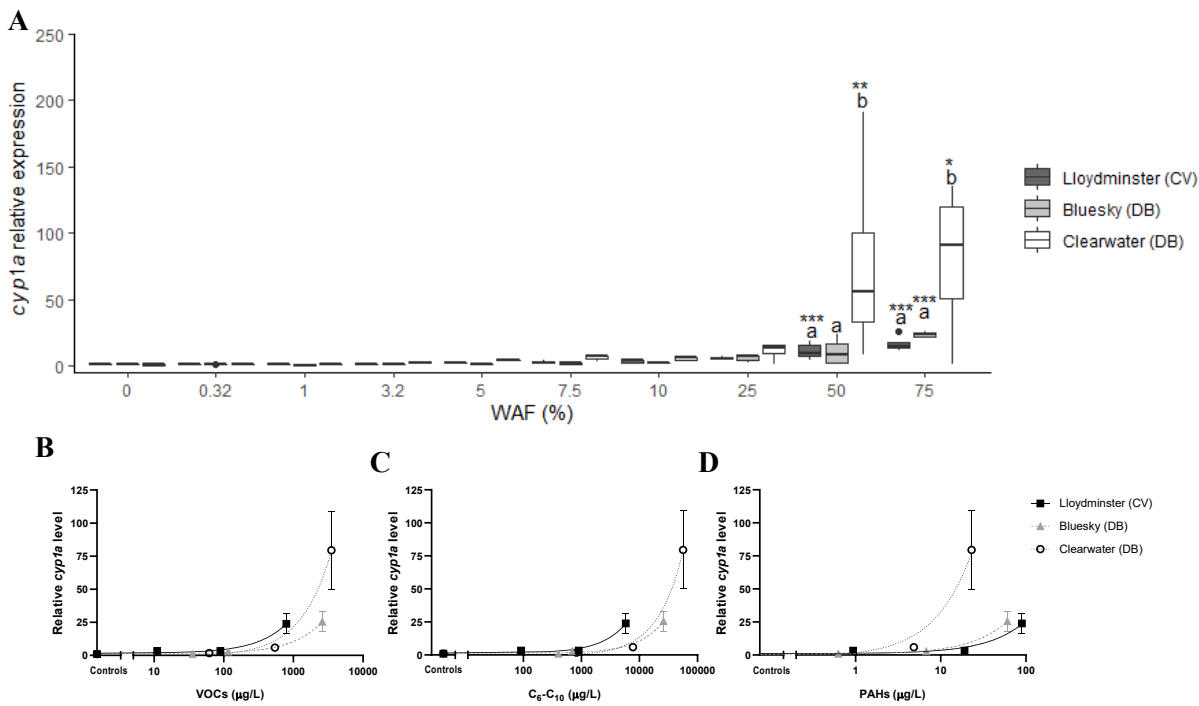


Figure 2.2. Relative *cyp1a* mRNA level of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater. Significant differences between each treatment and their control group (*) were identified by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and Dunnett or Dunn's post hoc analysis (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparison and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), C₆-C₁₀ (C), and PAHs (D) in each WAF dilution. Data is presented as mean \pm standard deviation and linear regression curves are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

2.4.6 Gene expression and enzymatic activity of GST

A two-way ANOVA determined that the WAF concentrations and the type of oil had a significant impact on *gst* expression (WAF: $p < 0.0001$; Oil type: $p = 0.0002$). However, further analysis with multiple pairwise comparisons and Dunnett's test did not point to a difference in *gst* expression among oils for the same WAF concentration and for all WAF concentrations compared to their control group (Figure 2.3A). In contrast to the *gst* expression, there was significant increases in GST activity for 75 % WAF of Lloydminster and Bluesky, for 50 % WAF of Lloydminster, Bluesky, and Clearwater, and 25 % WAF of Lloydminster (Figure 2.4A). No GST activity was measured in larvae treated with 75 % WAF of Clearwater due to a lack of tissue. Linear regression analysis demonstrated positive correlations between *gst* expression and GST activity and concentrations of the main WAF constituents measured (Figure 2.3B, C and D and Figure 2.4B, C and D, all oils: $p < 0.0001$). However, no chemical components from the oils seemed to be the main driver in both responses.

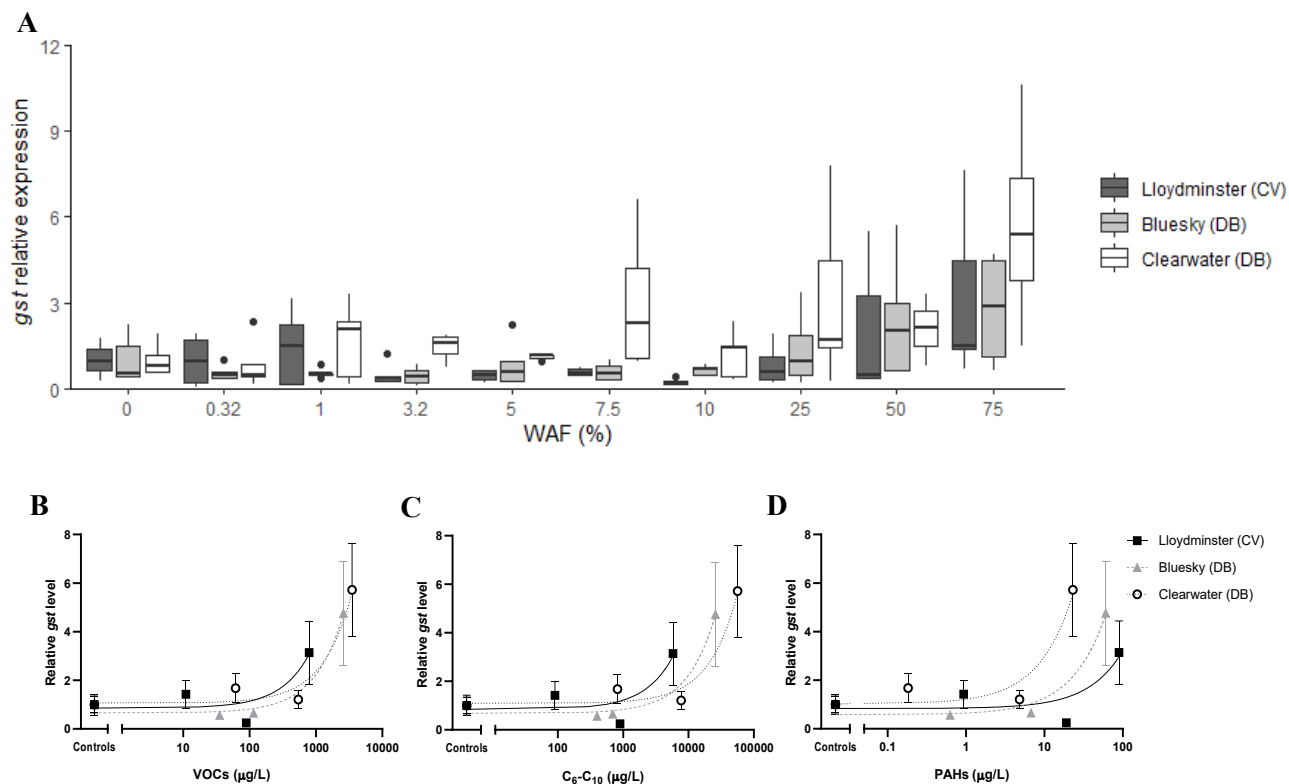


Figure 2.3. Relative *gst* level of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the Lloydminster conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Bluesky, and Clearwater. Significant differences between each treatment and their control group (*) were identified by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and Dunnett or Dunn's post hoc analysis (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparison and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ (C), and PAHs (D) in each WAF dilution. Data is presented as mean \pm standard deviation and linear regression curves are present when the regression is significant (Lloydminster, $p = 0.0008$, $R^2 = 0.24$; Bluesky, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.36$; Clearwater, $p = 0.0002$, $R^2 = 0.28$).

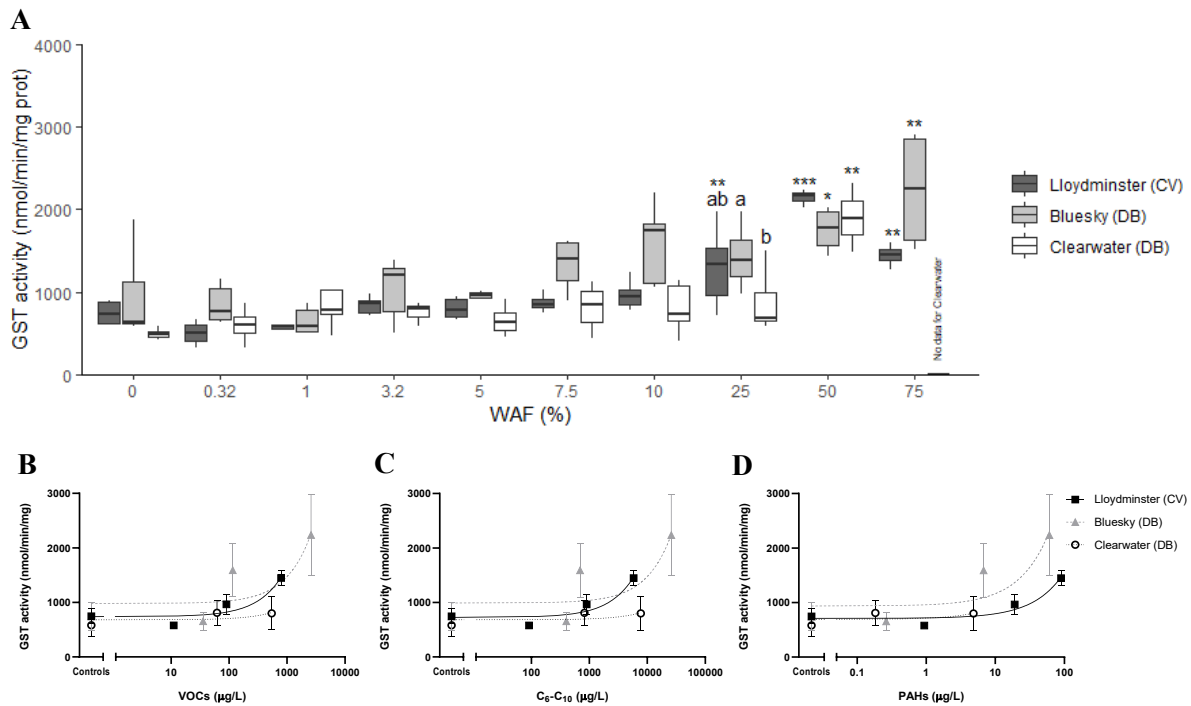


Figure 2.4. GST activity of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater. Significant differences for each treatment and their control group ($*$) were identified by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and Dunnett or Dunn's post hoc analysis ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparison and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), C₆-C₁₀ (C), and PAHs (D) in each WAF dilution. Data is presented as mean \pm standard deviation and linear regression curves are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

2.4.7 Lipid peroxidation

Finally, lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde concentration in pooled larvae (Figure 2.5). A two-way ANOVA demonstrated that WAF concentrations and oil type independently influenced the MDA concentrations. Larvae exposed to 75 % WAF of Lloydminster and Bluesky had a significantly higher MDA concentration than their control group. The MDA concentration in the larvae exposed to 75 % Bluesky WAF was one and a half times greater than the MDA concentration in the larvae exposed to 75 % Lloydminster WAF (pairwise comparison, $p = 0.005$). Linear regressions revealed positive correlations between larval MDA concentrations and the concentrations of the main constituents in the WAFs for exposure to Lloydminster and Bluesky ($p = 0.02$ and $p < 0.0001$, respectively). For Clearwater exposures, no relationship was observed with either linear regression or ANOVA with multiple comparisons (Figure 2.5B, C and D). Again, because of high mortality, no MDA analysis could be performed for 25, 50, and 75 % Clearwater WAFs.

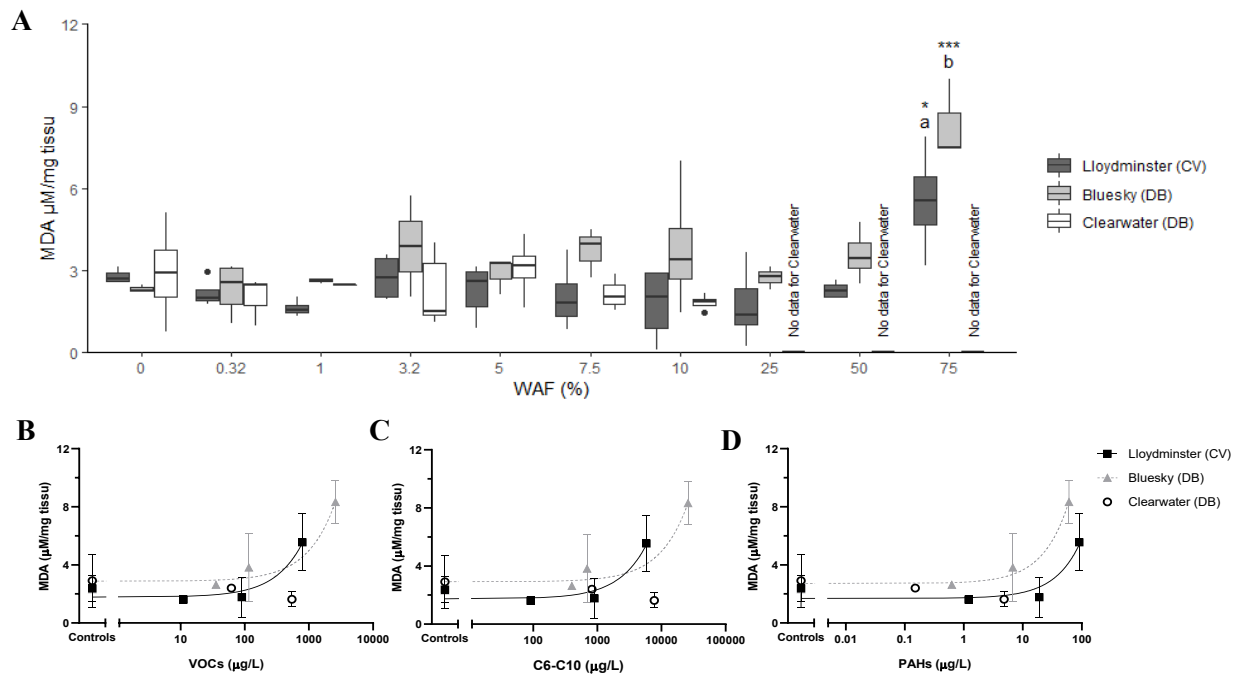


Figure 2.5. MDA concentration of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster, Bluesky, and Clearwater. Significant differences between each treatment and their control group (*) were identified by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis and Dunnett or Dunn's post hoc analysis ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparison and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), C6-C10 (C), and PAHs (D) in each WAF dilutions. Data is presented as mean \pm standard deviation and linear regression curves are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

2.4.8 Principal component analysis (PCA)

The first three dimensions of the PCA performed explained 55 % of the variability of our data. The two first dimensions explained 43 % of the data variability are presented on figure 2.6. Almost all variables were situated in the same direction on the first dimension, except mean weight. There was a clear division of data around the second dimension. The PCA highlighted the positive correlations among mortality, GST activity, VOCs, SOD activity, and C₆-C₁₀ and their associations with the Clearwater treatment. Similarly, the PCA clearly illustrate the positive correlations of PAH concentrations with the gene expression of *cypla* and *gst* for fish exposed to the Lloydminster treatment. The data obtained by the Bluesky treatment were mostly related to the WAF concentrations. The WAF and the PAHs concentrations were located on the same side of the second dimension, as opposed to the VOCs and C₆-C₁₀, which suggest Bluesky data were more correlated to the PAHs than the LMW components. The MDA concentration and the catalase (gene and enzyme) were more correlated with the PAHs than with other components. The SOD enzyme activity was correlated with LMW components, while the *sod* expression was correlated with PAHs concentrations.

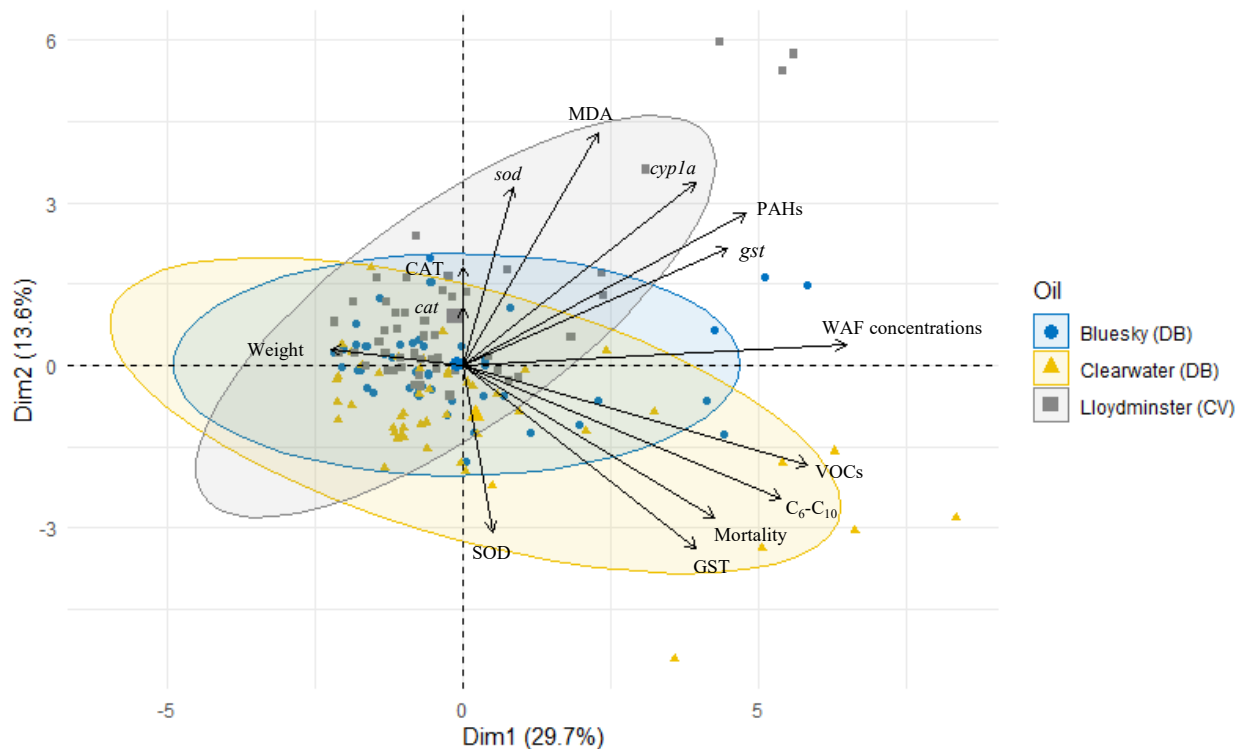


Figure 2.6. Principal component analysis (n = 150) presenting the relationships between WAF concentrations, components measured in the oils (PAHs, VOCs, and C₆-C₁₀), and the various biomarkers analysed in FHM larvae.

2.5 Discussion

The main objective of this study was to compare the toxicity of a conventional heavy crude oil and two dilbits on FHM larvae, by monitoring mortality, larval growth (weight), *cyp1a* and *gst* gene expression, and enzyme activity of proteins involved in detoxification and antioxidant capacities as well as an indicator of oxidative stress. The LMW hydrocarbons, such as VOCs, including BTEX, and C₆-C₁₀, were found in greater concentrations in WAFs prepared with both dilbits compared to the WAF from the heavy conventional oil. Conversely, the WAF of the conventional oil contained a higher concentration of PAHs and alkylated PAHs than those from both dilbits. After a 7-day exposure post-hatching, the Clearwater McMurray dilbit was the most toxic, causing more mortality and a higher *cyp1a* expression in FHM larvae. The Bluesky dilbit and the Lloydminster oil were similarly toxic overall, except for a higher lipid peroxidation induced by the Bluesky dilbit at 75 % WAF compared with the Lloydminster oil. Our results are consistent with the only other study comparing dilbit and conventional oils' toxicity (Philibert *et al.*, 2016), where monoaromatic compounds in WAFs were shown to be better predictors of mortality than PAHs in zebrafish embryos. Indeed, the data obtained in our study demonstrated that mortality was higher in larvae exposed to the Clearwater dilbit, which also had the highest concentrations of LMW components (~5 times more than Lloydminster and ~3 times more than Bluesky). However, in contrast to our study, the dilbits used by Philibert *et al.* (2016) were less toxic compared to the conventional oils. The type of conventional oil used in the two studies explains this discrepancy. In the Philibert *et al.* (2016) study, two conventional oils were used, both were light/medium oils, with low density and high BTEX concentration, while in our study, we used a heavy conventional oil, with a high density and low BTEX concentration. In addition, both dilbits used in our study were obtained in winter, suggesting a higher diluent proportion, which is usually 25 % to 30 % in summer, but can go up to 40 % during the winter depending on the bitumen density (Crosby *et al.*, 2013). The concentrations of VOCs/BTEX and C₆-C₁₀ were 3 to 10 times greater in both dilbits than in the conventional oil and mortality was the highest in the Clearwater dilbit, the dilbit with the highest concentrations of these light components. The diluent addition to dilbits likely explains the higher concentrations of LMW hydrocarbons. Our study supports that independently of oil type, mortality in WAF exposed fish increases with LMW concentration.

The Bluesky dilbit and the Lloydminster oil had similar effects on FHM larvae mortality and phase I and II detoxification pathway gene expression. The Lloydminster oil contained the highest concentration of PAHs and alkylated PAHs (~5 times more than Clearwater and ~1.5 times more than Bluesky). Furthermore, certain alkylated PAHs that were measured in the conventional oil were absent from both dilbits (indicated with an asterisk in Table S2.1). Previous studies have shown that the alkylation of PAHs (e.g., addition of a methyl group) can significantly increase the CYP1A-mediated toxicity of the compounds

(Mu *et al.*, 2014; Ott *et al.*, 1978). For example, retene (7-isopropyl-1-methylphenanthrene) was determined to be a more potent *cyp1a* inducer compared to its parent form, phenanthrene (Rigaud *et al.*, 2020). Also, Adams *et al.* (2014) determined that the greatest induction of EROD activity, by AhR ligand activation, was caused by 3 to 5-ringed PAHs and alkylated PAHs (log K_{ow} of 6 to 8), whereas a lesser response was induced by lower molecular weight hydrocarbons (log K_{ow} of 3 to 5, such as alkyl benzene and naphthalene). Similarly, data from the present study suggest that both components, LMW hydrocarbons and alkylated PAHs, caused different responses such as demonstrated with by the PCA (Figure 2.6) and need to be accounted for when assessing oil toxicity. Previous studies supported this observation. Philibert *et al.* (2016) demonstrated that in zebrafish embryos, monoaromatic hydrocarbons are better predictors of mortality than PAHs, while PAHs were more likely to induce a decrease in heart rate. Sorensen *et al.* (2019) analyzed the effects of monoaromatics and PAHs on cod and haddock embryos and proposed synergistic effects of both compounds. Such synergy may be responsible for the similar effects measured in the Bluesky dilbit and the Lloydminster conventional oil in this study, the former having the higher concentration of LMW/monoaromatic compounds (weaker inducers of *cyp1a*) and the latter composed of a higher concentration of PAHs and alkylated PAHs (stronger inducers of *cyp1a*). Consequently, our results suggest that future evaluations of oil toxicity should include the measure of LMW, PAHs, and alkylated PAHs, considering that these compounds seem to have different but combined effects on early life stage fish.

In comparison, LMW hydrocarbons are more volatile and more soluble in water than high molecular weight (HMW) hydrocarbons (Peterson, 1994). In a sealed environment such as during WAF preparation, the concentration of LMW hydrocarbons in the water is likely to be higher, creating a more acutely toxic WAF, compared to an environmental oil spill scenario, where evaporation of these components is expected to occur rapidly. The LMW hydrocarbons are known for their acute toxicity (Lin *et al.*, 2020; Kennedy & Farrell, 2005), and cause narcosis during the first week after an oil spill (Short, 2003), while 3- to 5-ringed PAHs and alkylated PAHs cause developmental deformities (Cherr *et al.*, 2017). Following an oil spill in the natural environment, oil weathering occurs and there is a rapid evaporation and dissolution of LMW components of oils. Ortmann *et al.* (2020) studied the weathering pattern of two dilbits and one synthetic bitumen (synbit) in saltwater mesocosm experiments. The dilbit containing the highest BTEX concentration (due to the addition of diluent) induced higher concentrations of these components in the water column. However, many other factors may modify the dissolution and weathering process of oils, such as the thickness of the spill, the environmental temperature, and the mixing energy (Ortmann *et al.*, 2020). Lara-Jacobo *et al.* (2020) have recently suggested that the weathering of the medium sweet crude oil conducted in a pilot-scale spill tank resulted in the production of unidentified oxidized compounds with time, preventing the reduction of fish embryotoxicity with oil weathering. Therefore, the nature of the

hydrocarbon products spilled and other weathering conditions, such as water source (e.g., river, lake, sea) and the duration of oil weathering are other important variables to consider.

The detoxification process is known to induce the formation of reactive metabolites (Hodson *et al.*, 2007; Aas *et al.*, 2000). PAH metabolites are eliminated by phase II enzymes, mainly by GST, which also acts as an antioxidant enzyme (Santana *et al.*, 2018). In our experiments with the three oils, *gst* expression did not increase with WAF concentrations in a significant manner compared to the controls. The GST enzyme activity, however, increased in a concentration-dependent manner with WAF concentrations, and significant increases were observed for most treatments compared to their controls. The oil type did not influence GST activity except at 25% WAF, where Clearwater exposed FHM larvae expressed a lower activity compared to fish from the Bluesky treatment. GST activity was similar at 50 and 75 % WAF for all measured treatments, suggesting it may be saturated at 75 % WAF. Consequently, GST saturation caused an accumulation of PAH-metabolites leading to a lipid peroxidation increase, as seen in figure 5 for 75 % WAF. In addition, PCA suggested that mortality was correlated with the GST activity, which may be indicative of an accumulation of PAH metabolites leading to cell damage and death. Overall, data suggest the accumulation of PAH metabolites in phase II of the detoxification process is causing lipid damage by overwhelming oxidative stress defences as seen in Bauder *et al.* (2005). Other studies also found an increase in lipid peroxidation following hydrocarbon treatments (Recabarren-Villalón *et al.*, 2019; Santana *et al.*, 2018). In consequence, the lipid peroxidation measured in this study was likely induced by PAH metabolites and by the limiting capacity of GST to pursue their biotransformation.

Exposure to alkylated PAHs has been associated with an increase in blue sac disease (BSD) in developing fish. BSD causes defects during development, leading to reduced growth, skeletal and cardiovascular system malformations. Some evidence tends to demonstrate that BSD may be caused by oxidative stress imbalance induced by hydrocarbon metabolism (Finn, 2007; Bauder *et al.*, 2005; Billiard *et al.*, 1999), but our exposures began after hatching, hence BSD symptoms were not expected. Indeed, skeletal malformations (lordosis and scoliosis), growth rate (Figure S2.2), along with the activity and gene expression of two antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were measured. However, we did not detect any effect of WAF concentration or oil type on the activity of either enzyme (Fig. S2.3 to S2.6) or on malformations (data not shown) of FHM larvae. Mean weight decreased with increasing WAF, but no significant differences between the treatments and control were determined, except for 3,2 and 75 % WAF of Lloydminster. The highest malformation percentages that we observed in all exposures was under 10 %, which is equivalent to malformations seen in control groups of other similar studies (Parrott *et al.*, 2019; Alsaadi *et al.*, 2018b). Another factor to consider when observing the malformations data is the survivorship bias. Our measurements were performed on surviving larvae, which

are expected to be the most resistant to the exposure (Gagliardi *et al.*, 2019), especially in the two highest WAF treatments (50 and 75 % WAF), where mortality was higher than in the control group. Hence, the malformation rate could have been more important in the larvae that did not survive in our experiment. We also hypothesize that some responses (e.g. oxidative stress and cellular damage) could be more important than what we observed in larvae that died before the end of the experiment.

In conclusion, our findings are in agreement with data showing that in oil spills, such as the Exxon Valdez spill, early lethal fish toxicity is driven by VOCs (Peterson, *et al.*, 2003), while 3-to 5-ringed hydrocarbons are mostly responsible for long-term effects, such as cellular damage (e.g., lipid peroxydation), developmental malformations, and cardiac abnormalities (Cherr *et al.*, 2017; Peterson *et al.*, 2003). Altogether, we demonstrated that dilbits can be equally or more toxic than conventional oils of similar density. The acute toxicity of oils is better assessed by the LMW component in combination with the alkylated PAHs, independently of the oil types. Our data validated the expression of *cyp1a* to be the best predictor of fish larval oil toxicity. We hypothesized that GST activity or phase II may be the limiting step in the phase II detoxification process, allowing PAH metabolites to accumulate and causing subsequent cellular damage, such as lipid peroxidation, however, this requires further investigation. Additional work should investigate the toxicity of other types of dilbits as their chemical composition varies. This work is important as various oil types are currently being transported worldwide and it is critical to have pre-existing toxicity data before a spill occurs in freshwater ecosystems.

2.6 Funding

This project was funded by the National Contaminant Advisory Group (NCAG) of Fisheries and Oceans Canada to PC and VSL and by the Canada Research Chair (CRC) program to VSL (#950-232235).

2.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Lucie Baillon and Geraldine Patey at INRS for their support with protocol implementations, the Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) for their analytical support, and Crude Quality Inc. (Alberta, Canada) for the oils.

2.8 Supplementary data

Table S2.1. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of measured PAHs in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB) and the Clearwater McMurray (DB). Asterisks (*) denote PAHs measured in the Lloydminster (CV) oil that were absent in both dilbits.

PAHs	Lloydminster (CV)	Bluesky (DB)	Clearwater (DB)
Naphthalene	15.33 \pm 0.47	10.4 \pm 0.85	4.4 \pm 1.61
C1-Naphthalene	17.67 \pm 0.94	12 \pm 0	3.87 \pm 1.29
C2-Naphthalene	11.33 \pm 0.47	7.7 \pm 0.57	3.73 \pm 1.22
C3-Naphthalene	4.33 \pm 0.25	2.85 \pm 0.07	3 \pm 0.85
C4-Naphthalene	1.02 \pm 0.06	0.805 \pm 0.11	1.06 \pm 0.24
1-Methylnaphthalene	8.4 \pm 0.37	5.25 \pm 0.07	1.53 \pm 0.5
2-Methylnaphthalene	9.4 \pm 0.43	7.15 \pm 0.07	2.3 \pm 0.75
1,2-Dimethylnaphthalene	1.13 \pm 0.047	0.575 \pm 0.04	0.34 \pm 0.11
1,3+1,6-Dimethylnaphthalene	3.17 \pm 0.09	2.3 \pm 0.14	1.02 \pm 0.35
1,4-Dimethylnaphthalene	0.54 \pm 0.02	0.37 \pm 0.03	0.16 \pm 0.05
1,5-Dimethylnaphthalene	0.78 \pm 0.014	0.46 \pm 0.04	0.29 \pm 0.09
1,7-Dimethylnaphthalene	1.63 \pm 0.05	1.15 \pm 0.07	0.52 \pm 0.17
*1,8-Dimethylnaphthalene	0.03 \pm 0		
2,3-Dimethylnaphthalene	0.73 \pm 0.03	0.56 \pm 0.04	0.29 \pm 0.1
2,6-Dimethylnaphthalene	1.13 \pm 0.05	0.895 \pm 0.04	0.45 \pm 0.16
2,7-Dimethylnaphthalene	1.02 \pm 0.06	0.765 \pm 0.08	0.36 \pm 0.12
1-Ethylnaphthalene	0.67 \pm 0.03	0.295 \pm 0.02	0.18 \pm 0.06
2-Ethylnaphthalene	1.01 \pm 0.06	0.515 \pm 0.04	0.23 \pm 0.08
2,3,5-Trimethylnaphthalene	0.52 \pm 0.03	0.34 \pm 0.06	0.32 \pm 0.13
2,3,6-+1,4,6-Trimethylnaphthalene	0.69 \pm 0.03	0.51 \pm 0.03	0.42 \pm 0.15
2-Isopropylnaphthalene	0.1 \pm 0.006	0.0535 \pm 0.005	0.038 \pm 0.01
1,2,5,6-Tetramethylnaphthalene	0.08 \pm 0.001	0.04 \pm 0	0.07 \pm 0.02
1,4,6,7-Tetramethylnaphthalene	0.05 \pm 0.004		0.05 \pm 0.01
Biphenyl	0.56 \pm 0.02	0.355 \pm 0.01	0.18 \pm 0.05
C1-Biphenyl	0.47 \pm 0.01	0.305 \pm 0.01	0.15 \pm 0.05
C2-Biphenyl	0.28 \pm 0.04	0.11 \pm 0	0.14 \pm 0
2-Methylbiphenyl	0.11 \pm 0.01	0.042 \pm 0.003	0.03 \pm 0.01
3-Methylbiphenyl	0.26 \pm 0.01	0.19 \pm 0	0.0975 \pm 0.02
4-Methylbiphenyl	0.1 \pm 0.005	0.073 \pm 0.004	0.05 \pm 0.01
*2,2'-Dimethylbiphenyl	0.02 \pm 0.002		
3,3'-Dimethylbiphenyl	0.05 \pm 0.002	0.033 \pm 0.004	
Fluorene	0.52 \pm 0.02	0.275 \pm 0.02	0.26 \pm 0.07
C1-Fluorene	0.64 \pm 0.01	0.54 \pm 0.06	0.54 \pm 0.15
C2-Fluorene	0.35 \pm 0.02	0.255 \pm 0.007	0.26 \pm 0.09
1-Methylfluorene	0.3 \pm 0.005	0.21 \pm 0.01	0.2 \pm 0.06
2-Methylfluorene	0.1 \pm 0.001	0.0645 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02

1,7-Dimethylfluorene	0.05 ± 0.006		0.05 ± 0.01
Dibenzothiophene	0.7 ± 0.03	0.285 ± 0.04	0.21 ± 0.06
C1-Dibenzothiophene	0.81 ± 0.04	0.48 ± 0.13	0.5 ± 0.09
C2-Dibenzothiophene	0.46 ± 0.03	0.345 ± 0.13	0.26 ± 0.09
C3-Dibenzothiophene	0.1 ± 0	0.145 ± 0.06	0.13 ± 0.05
*2-Methyldibenzothiophene	0.14 ± 0.005		
4-Methyldibenzothiophene	0.27 ± 0.005	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.04
*4,6-Dimethyldibenzothiophene	0.05 ± 0		
Phenanthrene	0.55 ± 0.01	0.29 ± 0	0.35 ± 0.1
C1-Phenanthrene/Anthracene	0.56 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.41 ± 0.12
C2-Phenanthrene/Anthracene	0.34 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.09
C3-Phenanthrene/Anthracene	0.13 ± 0.02		0.12 ± 0.01
1-Methylphenanthrene	0.12 ± 0		0.1 ± 0
2-Methylphenanthrene	0.12 ± 0	0.073 ± 0.004	0.08 ± 0.02
9-Methylphenanthrene	0.17 ± 0.005	0.099 ± 0.001	0.11 ± 0.03
*2-Methylanthracene	0.02 ± 0.004		
1,6-Dimethylphenanthrene	0.04 ± 0.002		0.04 ± 0
1,2,8-Trimethylphenanthrene	0.02 ± 0		0.033 ± 0
Acenaphthene	0.27 ± 0.008	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.06
Carbazole	0.34 ± 0.005	0.625 ± 0.04	0.32 ± 0.07

Table S2.2. Concentrations (µg/L) of measured VOCs, including BTEX, in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB) and the Clearwater McMurray (DB).

	Lloydminster (CV)	Bluesky (DB)	Clearwater (DB)
Benzene	520 ± 28.28	1465 ± 1322	2067 ± 950
Toluene	215 ± 35.36	845 ± 785	1200 ± 655
Ethylbenzene	8.5 ± 2.12	28 ± 0	14 ± 0
m+p xylenes	17 ± 4.24	225 ± 77	223 ± 126
o-xylenes	17 ± 2.83	55 ± 0	28 ± 0
n-propylbenzene	0 ± 0	2.4 ± 0	0 ± 0
1,3,5-Trimethylbenzene	1.6 ± 0	7.7 ± 0	5 ± 0
1,2,4-Trimethylbenzene	3.95 ± 0.92	24 ± 0	11 ± 0
1,2,3-Trichlorobenzene	5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Table S2.3. Genes of interest and specific primer parameters.

Gene	Gene name	Forward and reverse primers	Annealing temp. (°C)	Primer conc. (µM)	Primer efficiency range (%)	Primer efficiency mean (%)	R ² (Range)	R ² (Mean)	Amplicon length (bp)	Reference
<i>cat</i>	Catalase	F: CAACACCCCATCTTCTTTATC R: CACTGAACAGGAAAGACACCTG	60	0.35	102,3 - 110,6	104.1	0,992 - 0,995	0.994	161	Alsaadi <i>et al.</i> , 2018; Martyniuk <i>et al.</i> , 2012
<i>cyp1a</i>	Cytochrome p450	F: TCCTGGGCTGTCGTCTATCT R: CTGGAATGAAGTATCCGTTG	60	0.35	96,5 - 105,7	100.0	0,992 - 0,999	0.995	230	Lara-Jacobo <i>et al.</i> , 2021; Alsaadi <i>et al.</i> , 2018
<i>ef1a</i>	Elongation factor 1α	F: AGCGTAAGGAGGGAAATGCT R: CTCAGAAAGGACTCGTGGT	60	0.35	100,0 - 104,5	102.9	0,995 - 0,999	0.998	254	Lara-Jacobo <i>et al.</i> , 2021; Alsaadi <i>et al.</i> , 2018
<i>gst</i>	Glutathione-s-transferase	F: GACGTTCACTTCTGGAAGC R: GAGGCTTCTCGACTGC	60	0.40	96,2 - 100,0	98.2	0,992 - 0,999	0.994	151	Lara-Jacobo <i>et al.</i> , 2021; Alsaadi <i>et al.</i> , 2018
<i>rpl8</i>	Ribosomal protein L8	F: TTGTTGGTGTGTTGCTGGT R: TCCTGATTGTTGAGGGCTTG	58	0.30	100,6 - 116,3	105.5	0,991 - 0,999	0.997	186	Lara-Jacobo <i>et al.</i> , 2021; Alsaadi <i>et al.</i> , 2018
<i>sod1</i>	Superoxide dismutase	F: GCACCTTCCAACCCTCACACAC R: TCTTCATTGCCTCCCTTACC	60	0.35	101,5 - 114,8	108.1	0,992 - 0,997	0.995	213	Alsaadi <i>et al.</i> , 2018; Martyniuk <i>et al.</i> , 2012

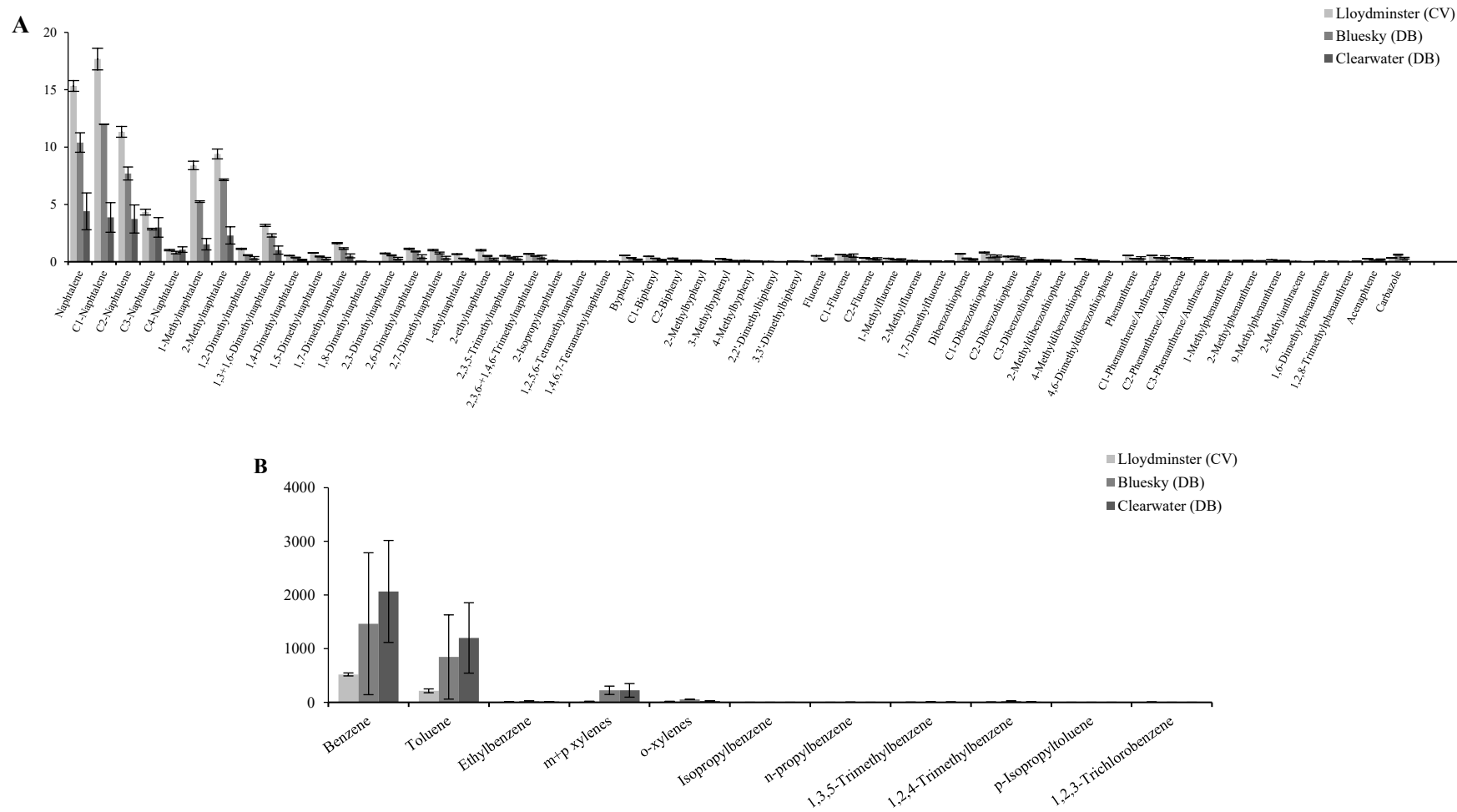


Figure S2.1. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of measured PAHs (A) and VOCs (B) in the 75 % WAF of the Lloydminster (CV), the Bluesky (DB), and the Clearwater McMurray (DB).

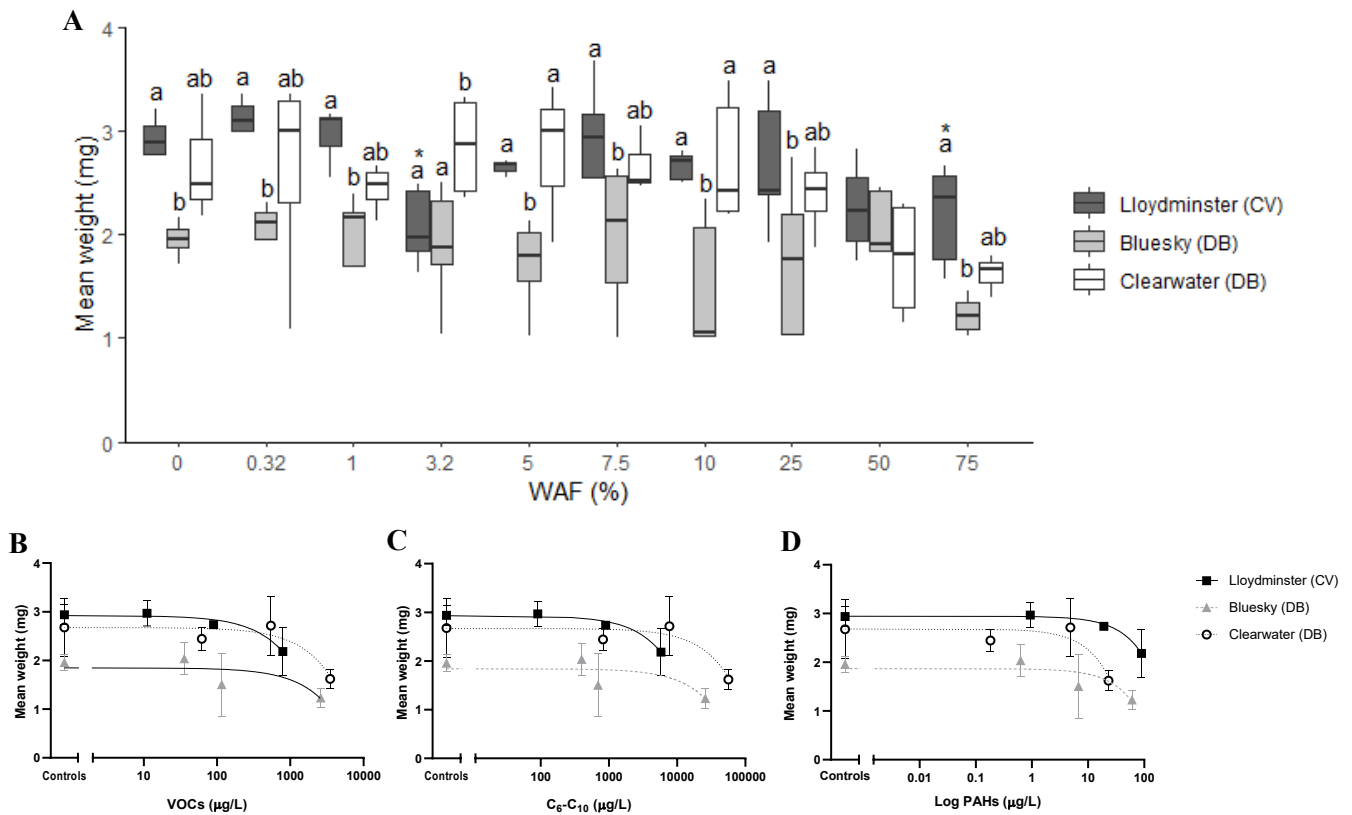


Figure S2.2. Mean weight of FHM larvae after 7-day exposure post-hatching as a function of WAF % (A) prepared with the conventional oil (CV) and the two dilbits (DB): Lloydminster (CV); Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Significant differences between each treatment and their control group (*) were identified by one-way ANOVA and Tukey (* $p \leq 0.05$). Significant differences among oil types for each WAF concentration were identified by two-way ANOVA and pairwise comparisons and presented by letters. Percentage of mortality is also presented as a function of VOCs (B), C₆-C₁₀ (C) and PAHs (D) for each WAF dilution. Data is presented as mean \pm standard deviation and linear regression curves are presented for each significant regression ($p \leq 0.05$).

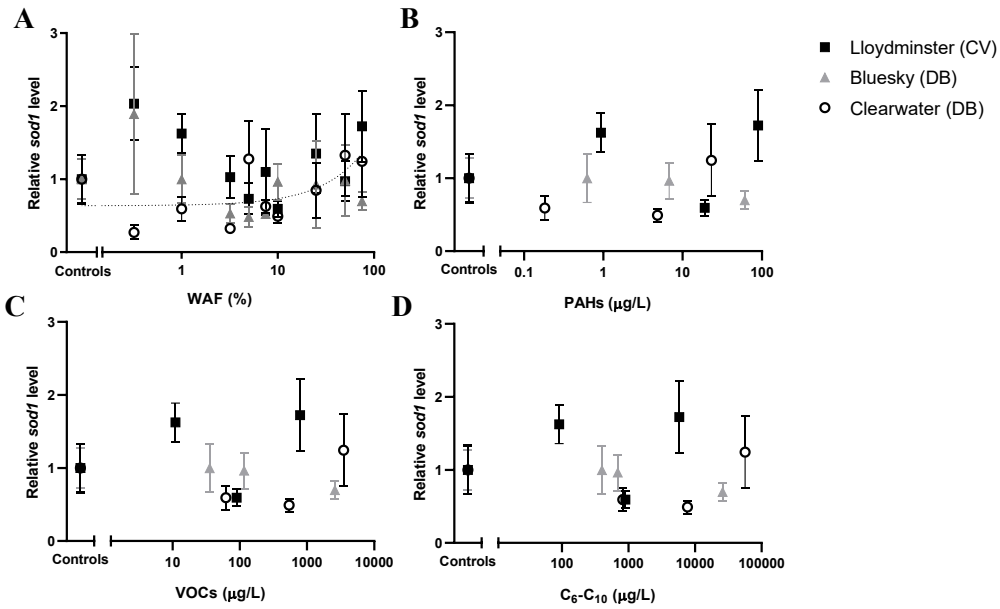


Figure S2.3. Sod1 relative expression as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C₆-C₁₀ (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Data are presented as means ± SEM with a regression line, if statistically significant ($p = 0.05$).

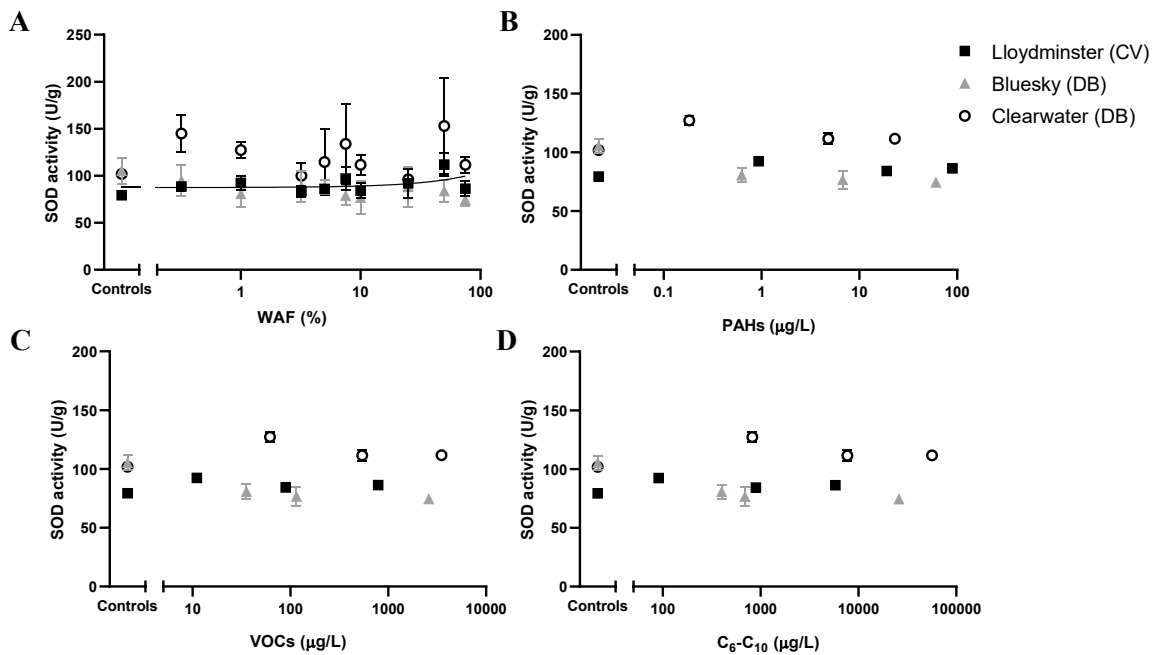


Figure S2.4. Superoxide dismutase enzymatic activity (U/g) as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C₆-C₁₀ (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Data are presented as means ± SEM with a regression line, if statistically significant ($p = 0.05$).

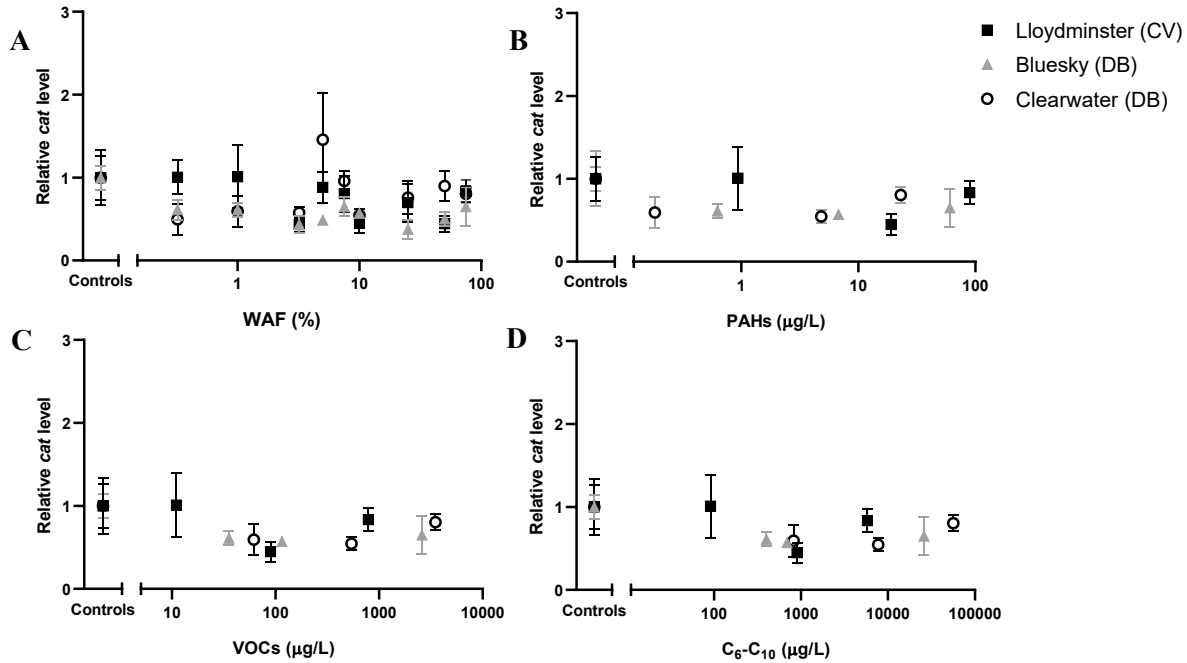


Figure S2.5. CAT relative expression as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs, and C6-C10 (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Data are presented as means \pm SEM with a regression line, if statistically significant ($p = 0.05$).

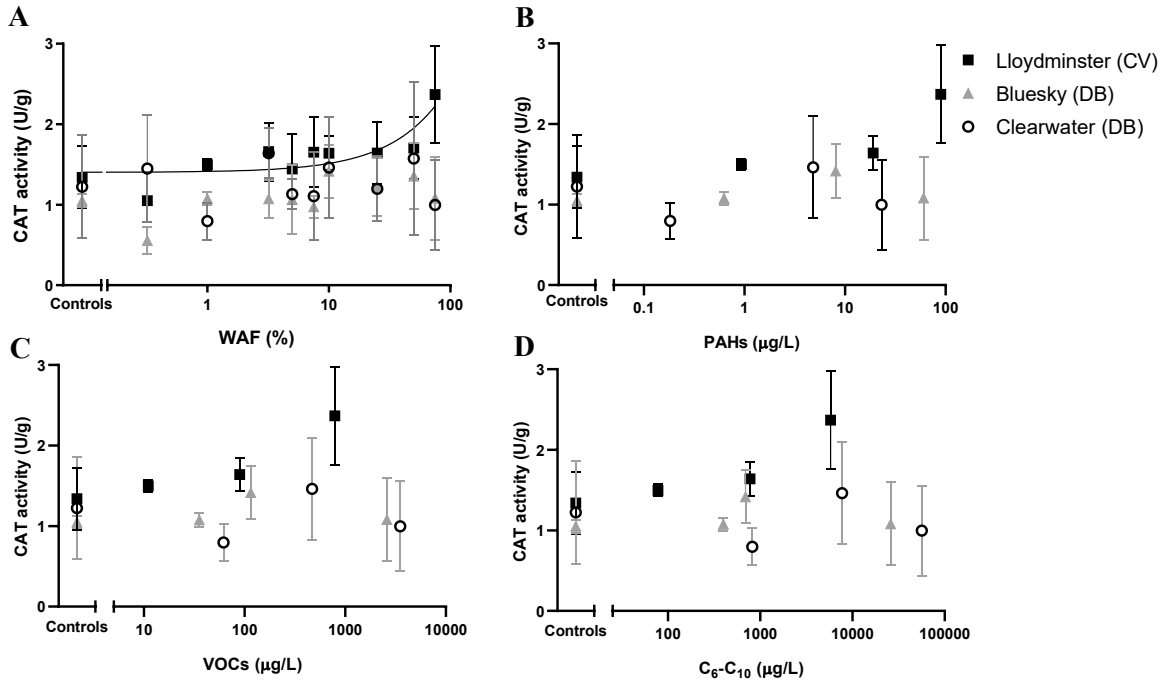


Figure S2.6. CAT enzymatic activity (U/g as a function of the concentrations of WAF (A), PAHs (B), VOCs and C6-C10 (D) for each oil; Lloydminster (CV), Bluesky (DB) and Clearwater (DB). Data are presented as means \pm SEM with a regression line, if statistically significant ($p = 0.05$).

3 Comparative toxicity of conventional and unconventional oil during rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryonic development: From molecular to individual health consequences

Toxicité comparative des pétroles conventionnels et non conventionnels durant le développement de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*): des conséquences moléculaires aux conséquences globales sur la santé des organismes

Auteurs :

Roxanne Bérubé¹, Molly Lefebvre-Raine¹, Charles Gauthier¹, Pauline Bellot¹, Thibault Bourdin¹, Gaëlle Triffault-Bouchet², Valérie S. Langlois¹, Patrice Couture¹

1. Institut National de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 rue de la Couronne, Québec, Canada.
2. CEAEQ, Ministère du développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques, 2700 rue Einstein, Québec, Canada.

Titre de la revue :

Chemosphere, accepté le 07 octobre 2021

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132521>

Contribution des auteurs :

Roxanne Bérubé : Conceptualisation du projet, réalisation des expériences en laboratoire, traitement des données et présentation des résultats sous forme de graphiques. Supervision des stagiaires : Thibault Bourdin, Marilou Bouffard et de Molly Lefebvre-Raine. Responsable de la rédaction du manuscrit.

Molly Lefebvre-Raine : Réalisation des analyses géniques et de l'analyse des résultats de la figure 2B, E, H, K et N.

Charles Gauthier : Conceptualisation du projet, acquisition du financement et des ressources matérielles.

Pauline Bellot : Réalisation et participation aux analyses de laboratoire présentées à la figure S9 et d'autres analyses non présentées dans l'article.

Thibault Bourdin : Réalisation des expositions et acquisition des échantillons.

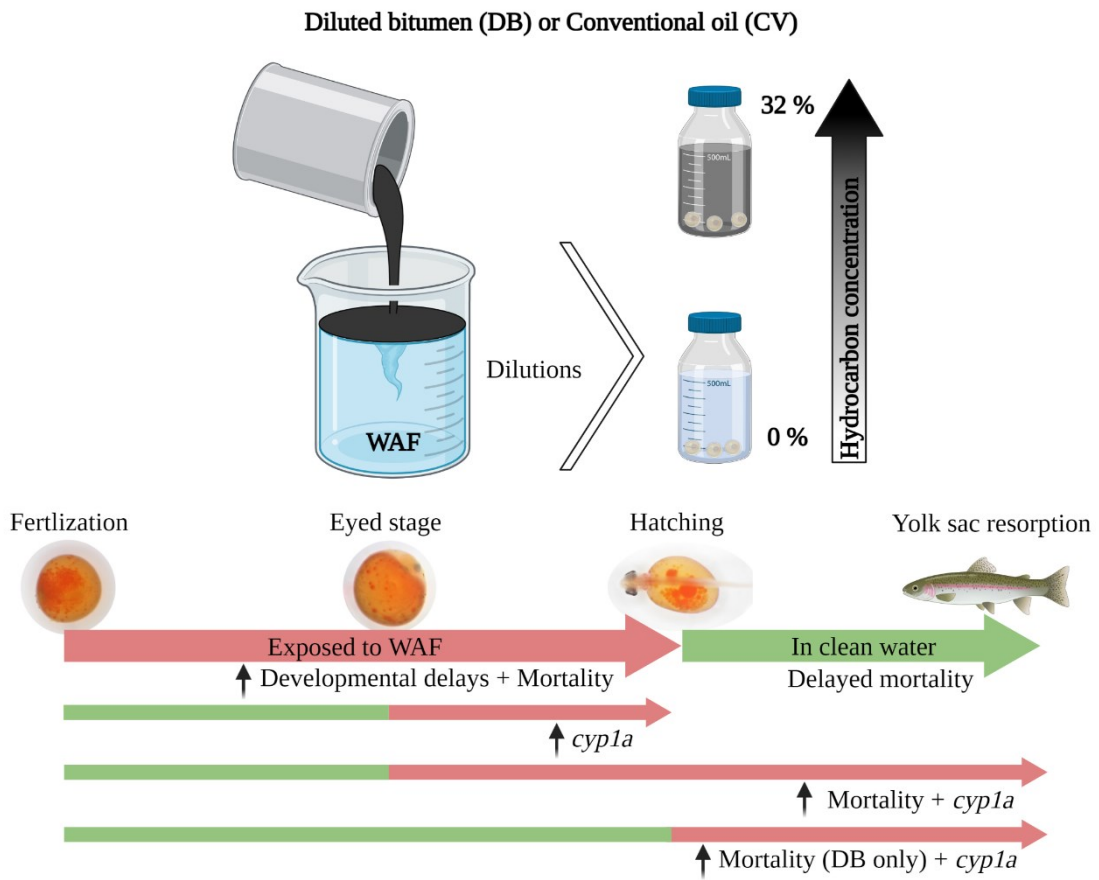
Gaëlle Triffault-Bouchet, Valérie Langlois et Patrice Couture : Responsables de la conceptualisation initiale et de l'acquisition du financement. Supervision de l'ensemble des travaux.

Tous les auteurs ont participé aux révisions de l'article.

3.1 Highlights

1. Rainbow trout exposed from fertilization are the most affected by oil exposure.
2. Dilbits cause more mortality in fish during early development and at hatching.
3. Developmental and hatching delays are induced by both oil types.

3.2 Graphical abstract



3.3 Abstract

Canadian freshwater ecosystems are vulnerable to oil spills from pipelines, which contain mostly diluted bitumen. This study aimed to compare the toxicity of a dilbit and a conventional oil on developing rainbow trout. A total of five exposure scenarios were performed, from 10 to 43 days, using water-accommodated fraction (WAF) with an initial loading of 1:9 oil to water ratio (w/v) in a range of dilutions from 0.32 to 32% WAF, respectively, with TPAH and VOC concentrations from 2.41 to 17.5 µg/L and 7.94 to 660.99 µg/L, and with or without a recovery period. Following the five exposures, several endpoints were examined, including survivorship, morphometrics, gene expression, and enzymatic activity. Significant mortality rates were measured for the highest WAF concentration of the dilbit in all five exposures (60-100% mortality at 32% WAF). In comparison, the highest WAF concentration of the conventional oil induced significant mortality in three out of the five exposures (from 35 to 100% mortality at 32% WAF). Hatching delays were noted in embryos exposed to both oils. Developmental delays were observed in dilbit-exposed embryos and are suspected to be an indicator of reduced survivorship after hatching. The induced expression of *cyp1a* remained a reliable biomarker of exposure and of fish malformations, though it did not always predict mortality. Using CYP1A activity in combination with *cyp1a* may bring more insights in studies of oil risk assessment. This study demonstrates that dilbits are more toxic to early life stages compared to conventional oils and highlights the need to consider the most sensitive stage of development when performing risk assessment studies on oils.

3.4 Introduction

The presence of pipelines on the North American continent is increasing, and so is the risk of associated spills (reviewed in Alsaadi *et al.*, 2018). In Canada, most of the oil circulating in pipelines is a dense and viscous unconventional oil with a diluent (e.g., natural gas condensate or naphtha), also called diluted bitumen (dilbit) (King *et al.*, 2017). Dilbits are chemically different than conventional oils, hence their weathering and dispersion processes in the environment could differ in the event of a spill (Lee *et al.*, 2015; Ortmann *et al.*, 2020). Bitumen is composed of a high proportion of heavy molecular weight (HMW) compounds, such as resins and asphaltenes, but the addition of diluent strongly increases the proportion of low molecular weight (LMW) compounds (Ortmann *et al.*, 2020; King *et al.*, 2019). The LMW hydrocarbons, such as volatile organic compounds (VOCs) are also known to cause increased toxicity and developmental malformations (Philibert *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015; Adams *et al.* 2014; Incardona *et al.*, 2004). Conventional oils are slightly different and can vary in density from light to heavy, depending on the proportion of LMW and HMW components (National Academies of Sciences & Medicine, 2016; Lee *et al.*, 2015). In consequence, the toxicological effects of both oil types, conventional and dilbit, may vary widely. More studies are necessary to evaluate their impacts on freshwater ecosystems in relation to their chemical composition.

Oil exposure affects fish development during their early life stages (Cherr *et al.*, 2017; Incardona *et al.*, 2004). As explained by Cherr *et al.* (2017), oil exposure affects two important stages of development. First, during cleavage, the formation of the embryonic axis is inhibited by the disruption of the Wnt/ β -catenin pathway, leading to the embryo's death (Fairbairn *et al.*, 2012, Stachel *et al.*, 1993). The second stage affected by oil exposure is the formation of the cardiovascular system. Studies on different species of fish demonstrated that low chronic polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations affect the development and contractility of the heart, leading to lower swimming performance (Jung *et al.*, 2015, Mager *et al.*, 2014, Dubansky *et al.*, 2013, Griffin *et al.*, 2009, Brannon *et al.*, 2006; Vines *et al.*, 2000). Furthermore, oil exposure may induce cardiac and yolk sac edema, spinal and jaw malformations, as well as smaller head size and dorsal malformations (Incardona *et al.*, 2004, Vines *et al.*, 2000, Middaugh *et al.*, 1998). In addition, rainbow trout possess two aryl hydrocarbon receptors (*AhR*) genes; *AhR1* and *AhR2*. The latter, *AhR2*, is the dominant form and possess two isoforms *AhR2 α* and *AhR2 β* (Doering *et al.*, 2013; Gräns *et al.*, 2010). It was previously shown that there is a tissue-specific expression of *AhR2* isoforms in different organs, with *AhR2 β* being highly expressed in the heart, a target organ in developmental toxicity by dioxin and similar compounds (Pollenz *et al.*, 2002; Abnet *et al.*, 1999). The AhR pathway can also interact with other pathways, such as the retinoic acid pathway (Murphy *et al.*, 2007). Retinol metabolism is also affected by metal contamination and oil exposure (Defo *et al.*, 2014). These perturbations of retinol

metabolism impact vitamin A homeostasis and eye development and may last several days after exposure (Lie *et al.*, 2019). Vitamin A/retinoic acid metabolism disruption could also be a factor in other developmental problems seen after exposure to oils, such as heart and fin development (Sehring *et al.*, 2016). Cellular proliferation, regeneration and differentiation in the heart and fins of fish are regulated by the retinoic acid pathway downstream of the Wnt/ β -catenin pathway (Wehner *et al.*, 2014), hence dysregulation in both these pathways by oil exposure may explain most developmental issues previously observed in various studies.

During fish development, the metabolism of xenobiotics changes and increases when embryos approach hatching. From fertilization until early blastula stages, there is no RNA synthesis by the embryo which is using maternal mRNA and stored protein from oogenesis. Hence, PAH metabolism may be inefficient, due to the inability to respond with intrinsic RNA synthesis (Cherr *et al.*, 2017, Langley *et al.*, 2014). Intrinsic embryonic gene expression is initiated at the blastula stage. Xenobiotic metabolism can be detected along with the formation of the circulatory system and liver in the embryo, and its efficiency increases closer to hatching (Andreasen *et al.*, 2002). The early development lacking an efficient xenobiotic metabolism may induce an accumulation of lipophilic hydrocarbons in the yolk sac of exposed fish embryos (Hornung *et al.*, 2007). Embryonic growth leads to the utilization of yolk sac lipids, rendering the accumulated hydrocarbons more available and causing an increased mortality (Brinkworth *et al.*, 2003). Delayed mortality may also be induced by oil exposure, as observed by Alderman *et al.* (2018). Sockeye salmon embryos exposed to 100 $\mu\text{g/L}$ from fertilization to swim-up and returned to clean water for 80 days continued to die, yielding a final mortality of 53%.

Rainbow trout is a cold-water vertebrate native to the North American west coast and widely used as a model species (Blewett *et al.*, 2021). Its habitat required for reproduction (e.g., freshwater rivers and streams) can be affected by pipeline spills (COSEWIC, 2014). Given the well-documented oil-induced effects on fish development, this study aimed to compare the toxicity and sublethal effects of one dilbit and one conventional oil on rainbow trout embryos. The hypothesis of this study is that the early development (e.g., starting at fertilization) will be the most sensitive stage to oil exposure, particularly to the dilbit exposure, compared to fish exposed later in their development. Also, we hypothesized that fish returning to clean water after an exposure during development will continue to be affected by their previous exposure to both oils. In order to evaluate these hypotheses, the chemistry and toxicity of both oils were compared on embryos at various developmental stages, and a subgroup was returned in clean water after an exposure from fertilization to hatching. Mortality, *cypla* expression, and CYP1A activity were assessed after exposure to a range of concentrations of water-accommodated fraction (WAF) prepared with Clearwater dilbit and Lloydminster conventional oil (described in Bérubé *et al.*, 2021).

3.5 Methodology

3.5.1 Oils and chemical analysis

The oils used in this study were purchased through Crude Quality Inc. (Edmonton, Alberta, Canada). Chemical analysis of oils and WAF dilutions were conducted by the Centre d'expertise en analyses environnementales du Québec (CEAEQ, MELCC) in Québec City, Canada. Briefly, the total and individual concentrations of 64 VOCs (including BTEX) and 141 parent and alkylated PAHs were determined by GC-MS, while C10-C50 total concentration was measured by GC-FID. The components were measured in all WAF dilutions for the two oils, in triplicate throughout the exposure. Each WAF dilution was collected a minimum of three times during the whole exposure, immediately after the dilution and sent for analysis. Method blanks and surrogates were also injected. The detection limits varied between 0.05 and 0.5 µg/L for the VOCs, between 0.005 and 0.18 µg/L for PAHs, and between 0.2 and 0.6 mg/L for the C₁₀-C₅₀. The CEAEQ is accredited by the international norm ISO 17025.

3.5.2 WAF preparation

Clearwater McMurray dilbit and Lloydminster heavy conventional oil WAF stock solutions were prepared at the same temperature as the exposure (12 ± 1 °C), in the dark, daily or every two days. Oil was added to water (100 g/L), the preparation was stirred gently for 18 h, then the solution was allowed to settle for 1 h before the aqueous layer was recovered. This method is also known as the WAF (or Low Energy WAF), as suggested by Singer *et al.* (2000) and adapted by Adams *et al.* (2017). Reconstituted water was prepared with a mixture of salts (Ca⁺ 70 µM; Cl⁻ 129 µM; K⁺ 12 µM; Mg²⁺ 13 µM; Na⁺ 179 µM; SO₄²⁻ 63 µM; pH 7.5) and was allowed 24 h of aeration before use (as in Bérubé *et al.*, 2021). Direct dilutions of WAF were prepared with the reconstituted water in a logarithmic series (0.32 – 32% v/v) for daily renewal. If any, the extra stock solution for the next day was kept at 4 °C in a glass Erlenmeyer, filled to the brim, sealed with Teflon, and covered with parafilm. Glass preparation jars were cleaned after each preparation with organic solvent-soaked wipes to remove residual oil, washed again with dish soap, and rinsed with distilled water.

3.5.3 Exposures

Rainbow trout eggs (*Oncorhynchus mykiss*) were provided by the Monts de Bellechasse fish farm (St-Damien-de-Buckland, QC) just after fertilization and transported on ice. Eggs were slowly acclimated in large, immersed trays until water temperature reached 12 ± 1 °C, for a total duration of 6 to 8 h. Then, they were placed randomly in exposure jars, in groups of 20 or 30 eggs. The experimental design included a clean water control and five WAF concentrations (0.32, 1, 3.2, 10 and 32% v/v), in triplicates, for both oils.

Five exposures were conducted, as illustrated in Figure 3.1. Exposure 1 was conducted from egg fertilization to hatching for a maximum of 25 days, after which half of the fish were sampled ($n = 10-15$ alevins per replicate). For Exposure 2, a subset of alevins from Exposure 1 ($n=10$ per replicate) was placed in clean water for a depuration period of approximately 25 days from hatching until yolk sac resorption. Exposures 3 and 4 were started when embryos reached the eyed stage. Alevins from Exposure 3 were sampled at hatching after 10 days ($n = 10-15$), and the remaining alevins were sampled at yolk sac resorption for Exposure 4, for a maximum of 35 days. Finally, alevins from Exposure 5 were exposed from hatching to yolk sac resorption, for a maximum of 20 days ($n = 20$ per treatment). WAF renewal was performed daily by replacing at least 80% of the exposure medium with newly prepared WAF. Jars were closed and aerated. Water quality was measured daily for temperature, O_2 concentration and pH and maintained at 12 ± 1 °C, above 85% O_2 and at $pH 7.5 \pm 1$.

During water renewal, dead organisms were removed, daily mortality was recorded, and total mortality was calculated at the end of the exposure. Remaining live embryos, larvae, or juveniles were sampled at the same time each day. At the end of each exposure, samples were weighed, then frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analysis.

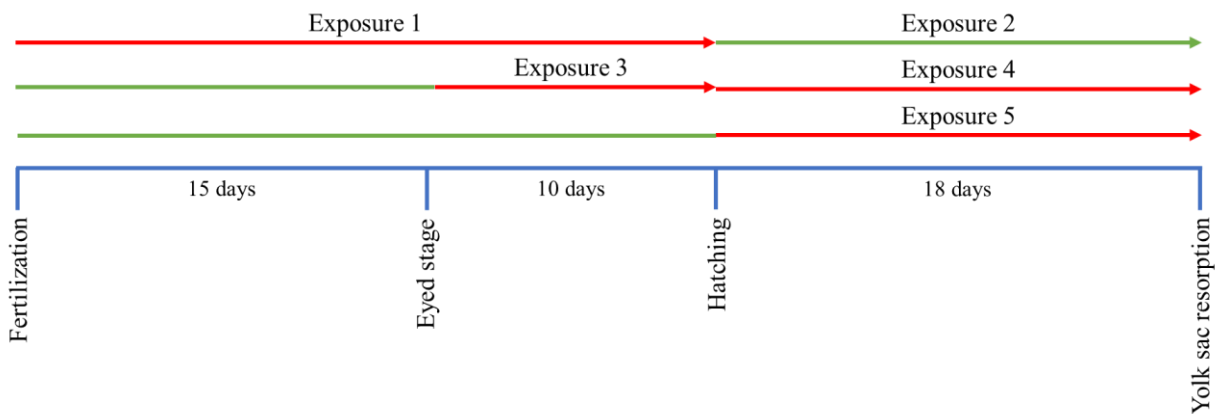


Figure 3.1. Experimental design of the five rainbow trout exposures. The exposures were conducted during three developmental stages in rainbow trout. Red arrow means eggs were exposed WAF; green arrow means eggs were exposed to uncontaminated water. Exposure 1 lasted from fertilization to hatching; exposure 2 was eggs exposed from fertilization to hatching, then replaced in uncontaminated water (depuration period) from hatching to yolk sac resorption; exposure 3 was from eyed stage to hatching; exposure 4 was from eyed stage to yolk sac resorption and exposure 5 was from hatching to yolk sac resorption. The number of days indicate the maximum duration of each exposure.

3.5.4 Developmental delays

To assess the rate of developmental in exposed fish, a subset of eggs in Exposure 1 was weighed, and embryos photographed just before hatching. Physiological measurements were performed with the ImageJ software (v 1.52a) to assess growth. Eye and lens length were measured, as well as egg diameter in six different angles. Egg diameter measurements were averaged and used to normalize eye and lens length for individual size variation. Also, to observe any delay or premature hatching induced by the treatments, cumulative hatching (in percentage) was calculated for exposure 1 and 3 and for both oils.

3.5.5 Gene expression analysis

Total RNA was extracted and purified from whole individual (n= 4-8 per treatment) using Trizol® (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Briefly, fish were homogenized with the mixer mill (30 sec at 30 Hz; MM 400 Retsch) by adding 0.75 mL of TRIZOL® and two stainless steel beads. For alevins, 2 cycles were necessary for complete homogenization. RNA was purified with the iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). DNase mix was added to the samples (1 µL of DNase mix per 1 µg of RNA) and incubated in a thermocycler, for 5 min at 25 °C and 5 min at 75 °C (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, Ontario). Purified RNA was suspended in RNase-free water and quantified with a NanoDrop-2000 spectrophotometer (ThermoFischer, Ottawa, ON, Canada). RNA was used as a template to synthesize complementary DNA (cDNA) using iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Nuclease-free water was added to 1 µg RNA according to the manufacturer's protocol and placed on ice. A pre-step of cleaning was processed with the same kit using a master mix containing DNase and DNase buffer according to the manufacturer's protocol. Samples were placed in the thermocycler for 5 min at 25 °C and at 75 °C for 5 min. Then, iScript™ Reverse Transcription Supermix was added to samples according to the manufacturer's protocol and samples were placed a second time in the thermocycler for 5 min at 25 °C for priming, then 20 min at 46 °C for transcription and at 95 °C for 1 min for enzyme inactivation. The cDNA products were diluted 80-fold prior to PCR amplification. Samples without reverse-transcriptase, no-template controls and standard curve prepared by serial dilutions (1:4) were also included. Amplification using the following thermal profile: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 60 s. Efficiency and R² of the standard curves were maintained between 90-110% and 0.98-1.00, respectively. The cytochrome P450 1A (*cyp1a*) relative expression was calculated with the 2^{-ΔΔCT} method, using the Ct mean of elongation factor 1α (*ef1α*) and ribosomal protein L8 (*rpl8*). The primers used in the study were obtained from Adams *et al.* (2020) and Wiseman & Vijayan (2011). Primer

sequences and information are listed in Table S3.1. No statistical differences in mRNA levels were observed between controls and treatments for *ef1a* and *rpl8* (ANOVA: p-value > 0.05).

3.5.6 CYP1A activity

CYP1A activity was measured using the EROD assay. Total weight used was around 100 mg of whole larvae with pools of one whole juvenile or two whole larvae per replicate (n = 5-10). Tissues were homogenized with HEPES Grinding Buffer, kept at 4 °C in a 1:10 dilution. Samples and buffer were placed in a 1.5 mL eppendorf, with two grinder beads, tubes were placed in the mixer mill (MM400 RETSCH®) for 30 sec at 30 Hz, at least two cycles were necessary to completely homogenize the samples. Homogenates were centrifuged at 9000 g, for 20 min at 4 °C, supernatant was kept on ice until next step. Standard curves were prepared with resorufin in a concentration range of 0 to 5 µg/ml in DMSO. The reaction was measured in a 96-wells plate by adding samples or standards, HEPES buffer and 0.022 mg/mL of 7-ethoxy-resorufin solution in 0.1% DMSO. After an incubation of 10 min, at RT, NADPH was added to initiate reaction. Fluorescence was immediately read (excitation: 530 nm, emission: 590 nm) with a spectrophotometer (FilterMax™ F5; Molecular Devices, San Jose, CA, US). The plate was shaken at low intensity, then read again every minute for at least 14 min. Protein concentration in each sample was measured with the Bradford's assay (Pierce™ Coomassie Plus Assay Kit, ThermoFisher).

3.5.7 Lipid peroxidation analysis

Lipid peroxidation was measured by quantifying malondialdehyde (MDA), with the TBARS assay kit (Cayman Chemicals, MI), according to the manufacturer's instructions. Briefly, homogenates of whole larvae or juveniles (n = 3-8) were prepared with the mixer mill (30 sec at 30 Hz) and by mixing samples with ice cold RIPA Buffer (dilution 1/10) (Cayman chemicals) containing a mix of protease inhibitors (1 µL PI/100 µL RIPA) (Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged (1600 g, 10 min at 4 °C), then the supernatant was kept at - 80 °C until performing the assay, the next day. Samples were mixed with reagents (SDS solution and color reagent) and brought to a boil for 60 min, then samples were placed on ice for 10 min. After a second centrifugation (1600 g, 10 min at 4 °C), supernatant absorbance was read at 540 nm. MDA concentration was measured in each exposure, except for Exposure 2, where there was not enough remaining tissue. MDA concentration in juveniles was normalized with the protein concentration measured with the Bradford assay.

3.5.8 Statistical analysis

Mean and standard deviation (mortality, enzyme activity, and oxidative damage) or mean and standard error of the mean (gene expression) were calculated for every treatment group, with removal of outliers with the interquartile range method. Linear regressions were performed for all biomarkers as a function of each measured component in WAF concentrations, and slope equality between oils was tested with GraphPad. Two-way ANOVAs were performed, allowing to determine the effect of the oil, the WAF concentrations and their interaction on each biomarker, for each exposure. When data did not pass normality and homogeneity of variance (verified by Shapiro-Wilk and Levene's test), they were log-transformed, and normality was reassessed. Results (p-values) are presented in Table S3.2. When a significant interaction was observed, pairwise comparisons of the least-square means (Tukey method, using adjusted *P*-values), were performed to reveal significant differences among treatments. If the interaction was not significant, simple main effect was assessed with one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. The relationship between biomarkers (8-OHdG, *PCNA*, *cyp1a1*, *cyp26a1*, *aldh1a2*, *xrcc1*, *gstπ*, GST, MDA, weight, and mortality) and the concentrations of the oil components (PAHs, VOCs and C₆-C₁₀) was explored using principal component analysis (PCA). PCA was computed using Euclidean distance matrices. ANOVAs, post hoc tests and PCA figure were performed with R version 4.0.0 (packages ggplot2, tidyverse, FactoMineR and factoextra) (Wickham, 2016; 2019; Kassambara, 2020; R Core Team, 2020). Linear regressions and remaining figures were made with GraphPad (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.6 Results

3.6.1 Chemistry

The concentrations of VOCs and PAHs were measured in the crude oils and in each WAF dilution. The concentration of individual hydrocarbons for both crude oils is shown in table 3.1. The Lloydminster oil generally had higher concentration of each PAH, except for C1/C2-dibenzothiophene and C3-phenanthrene/anthracene which were more concentrated in the dilbit. In addition, the dilbit had higher concentrations of each individual VOCs/BTEX, except for chloromethane and ethylbenzene. The concentrations of individual PAHs and VOCs in the WAF dilutions are shown in Fig. S3.3 and S3.4. The naphthalene dissolution pattern differed between oils; the dilbit WAF contained more naphthalene and less of the alkyl-naphthalene compared to the Lloydminster WAF, especially for the 32% WAF. The concentration of C₁₀-C₅₀ in the oils were similar, with 350 g/kg for the Lloydminster conventional oil and 340 g/kg for the Clearwater dilbit but were under the detection limit (0.2 to 0.6 mg/L) in every WAF

concentration. The PAHs and the VOCs total concentration increased with WAF concentration (Table 3.1), and for the majority of the WAF dilutions, the concentrations of both types of components were higher in the Clearwater dilbit. Generally, there was a higher total concentration of 2- to 5-ringed PAHs, alkylated PAHs, VOCs, and BTEX in the Clearwater dilbit WAF compared to the Lloydminster oil WAF.

Table 3.1. Concentration of the sum of 64 VOCs (including BTEX), and the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs in each WAF dilution from the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).

% WAF	0.32		1		3.2		10		32	
	LD	CW	LD	CW	LD	CW	LD	CW	LD	CW
Oil										
VOCs	7.94 ±	12.6 ±	19.44 ±	26.76 ±	69.18 ±	73.12 ±	279.71 ±	393.87 ±	630.55 ±	660.99 ±
(µg/L)	3.54	8.09	12.83	19.74	49.46	72.87	32.18	134.39	82.82	68.16
PAHs	2.41 ±	1.84 ±	2.67 ±	4.05 ±	2.57 ±	3.84 ±	5.11 ±	7.25 ±	17.50 ±	15.14 ±
(µg/L)	0.77	0.62	1.16	1.66	0.32	0.69	3.12	1.29	1.53	9.82

3.6.2 Developmental delays

Embryo growth rate was assessed by measuring the egg weight and the eye and lens length, just before hatching for each WAF treatment of Exposure 1 (Figure 3.2). Statistical analysis (ANOVA and Dunnett's test) demonstrated that exposure to neither oil induced a change in egg weight (results not presented). Eye and lens length were significantly smaller for 10 and 32% WAF of Lloydminster ($p = 0.0005$ and $p = 0.005$, respectively) than for the controls. Eye length, but not lens length, was significantly smaller for 10% WAF of Clearwater ($p = 0.03$) than for the controls.

Exposures 1 and 3 ended at hatching. Daily hatching was recorded and is presented as cumulative hatching in percentage for a period of 7 days (Figure S3.4). The top panel (Figure S3.4A) shows that eggs exposed from fertilization to the Lloydminster conventional oil all hatched in 7 days, while the eggs exposed to the Clearwater dilbit all hatched in only 5 days. The bottom panel (Figure S3.4B) shows that eggs exposed from the eyed stage to the Clearwater dilbit hatched one day later than eggs exposed to the Lloydminster oil. Hence, most of the eggs exposed to the Clearwater dilbit hatched at least one day earlier than eggs exposed to the Lloydminster conventional oil. In contrast, eggs exposed to the higher WAF concentrations started hatching later than the control groups. For example, at 10 and 32% WAF of the Lloydminster oil, the majority of eggs hatched on day 6, while controls and eggs exposed to lower WAF concentrations hatched on day 5.

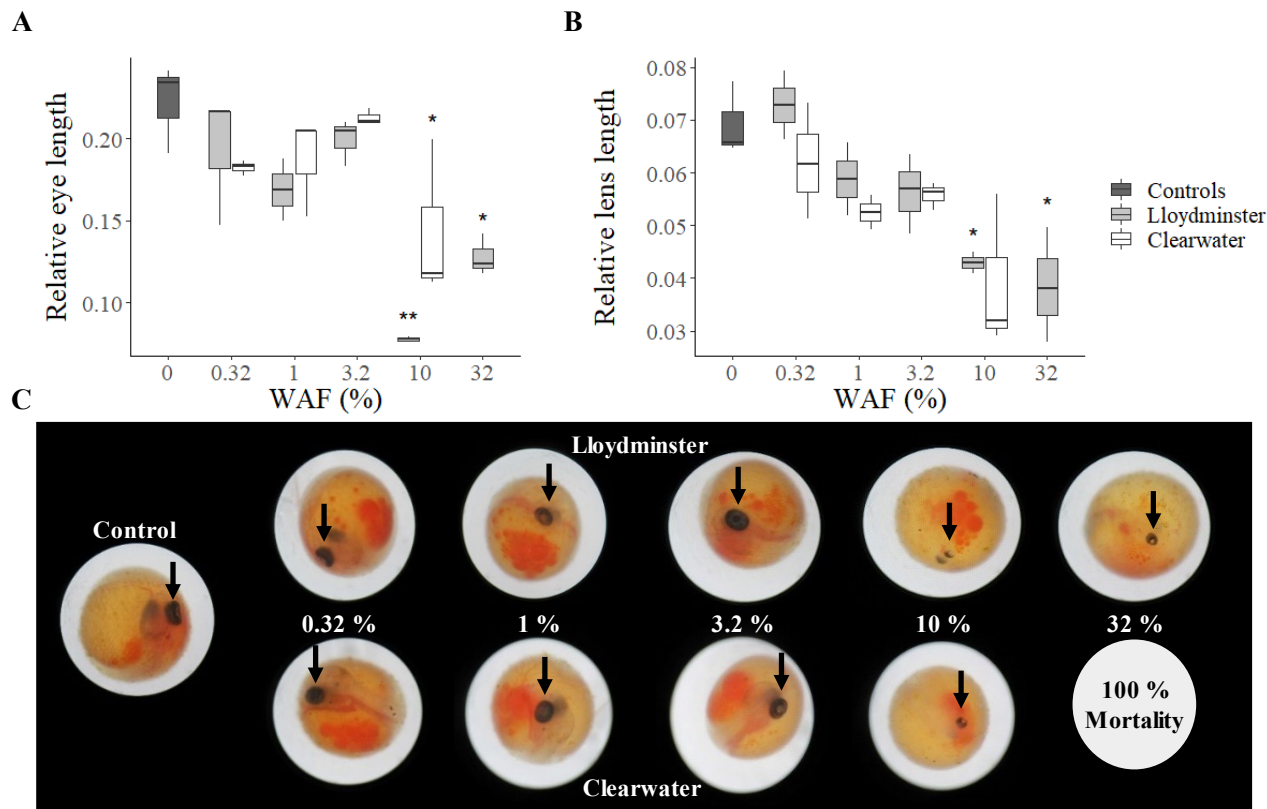


Figure 3.2. Embryos from the Exposure 1, at approximately 276 to 300 degree-days. Growth measurements of the eye (A) and the lens (B) length normalized on the egg diameter of embryos (n = 3). Significant difference between treatment and control group is shown by an asterisk (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$). (C) Examples of pictures of the eggs from each treatment from exposure 1. The arrows are pointing the eye.

3.6.3 Mortality

Final percentage of mortality increased following the Clearwater dilbit WAF in a concentration-dependent manner (Figure 3.3A, D, G, J, M). Final mortality rates varied depending on life stage and exposure duration. The Lloydminster conventional oil induced a concentration-dependent increase in mortality in Exposures 1, 2 and 4, while mortality did not vary between treatments and the control group during Exposures 3 and 5. In comparison, the Clearwater dilbit induced a concentration-dependent mortality in every Exposure (1 to 5), and 32% WAF yielded 100% mortality in Exposures 1 and 5. Overall, in each exposure the Clearwater dilbit induced a higher percentage of mortality than the conventional oil for the same two WAF concentrations, 10 and 32%.

During Exposure 1, 32% WAF of the Clearwater dilbit induced 25% more mortality than the conventional oil. All the other treatments induced percentages of mortality that were comparable with their respective control group ($24.1 \pm 1.6\%$ and $16.8 \pm 15.9\%$, for Lloydminster and Clearwater, respectively).

The LC50 was estimated at 12.9% (CI 95%: 16.2 – 24.5) and 20.0% (CI 95%: 9.1 – 17.8) WAF for the Clearwater dilbit and the Lloydminster conventional oil, respectively. These WAF concentrations are equivalent to approximately 10 and 7 µg/L of PAHs and of 410 and 302 µg/L of VOCs in the WAF of the Lloydminster and the Clearwater, respectively. After Exposure 2, linear regression demonstrated that the mortality increased with WAF concentration for both oils (p-value = 0.0008 and 0.004, for the Lloydminster oil and the Clearwater dilbit, respectively) (Figure 3.3 and Table S3.2). Embryos exposed to 10% Clearwater WAF had up to 25% mortality during the depuration period, while embryos exposed to 10% Lloydminster WAF did not suffer any mortality. Mortality could not be measured for embryos exposed to 32% Clearwater WAF, given the 100% mortality in Exposure 1. A mortality rate of 100% was observed during the depuration of embryos exposed to 32% of the Lloydminster WAF. According to the linear regression, mortality in Exposure 3 increased following the Clearwater WAF concentrations; however, according to the ANOVA, there was no significant difference between treatments and controls (p = 0.71), with 32% WAF inducing a final mortality of $68.8 \pm 51.2\%$, compared with $25.7 \pm 6.2\%$ for the controls. The percentage of mortality remained at control levels at all WAF concentration following Lloydminster conventional oil exposure according to the linear regression (p = 0.69) and the ANOVA (p = 0.92). Exposure 4 induced an increased mortality for both oils following the WAF concentration (linear regression: $p \leq 0.0001$). The Clearwater exposure induced the highest mortality with 100% and 75% of mortality when fish were exposed to 32% and 10% WAF, respectively. The Lloydminster-induced mortality in fish exposed to 32% WAF ($27.2 \pm 4.4\%$) was significantly higher than mortality in the control group ($6.1 \pm 5.4\%$) (p = 0.02). Lastly, Exposure 5 caused an increase in mortality following the Clearwater dilbit WAF concentrations (linear regression, p = 0.001). In contrast, mortality induced by each WAF concentration of the Lloydminster oil was comparable to the mortality in the controls.

The daily mortality of Exposures 1, 3, 4 and 5 is presented in figure S3.5 to S3.8. Peaks of mortality generally had a duration of 3 to 7 days. For example, in Exposure 1, the Clearwater 32% WAF induced a peak of mortality from day 7 to day 12, which is just after the formation of the embryonic axis of the embryos. We observed a different pattern in embryos exposed to the Lloydminster oil, with mortality increasing 4 days before hatching. Mortality was generally observed after one of the important embryonic developmental stages, either the embryonic axis formation, or the liver formation and the beginning of the heartbeat (denoted by gray boxes). In Exposure 3 (Figure S3.6), the 32% Clearwater WAF induced mortality during and just past the liver formation. Exposures 4 and 5 (Figure S3.7 and S3.8), both induced significant mortality between days 4 and 7 of the exposures, following the eyed stage/formation of the liver in Exposure 4 and few days after hatching in Exposure 5.

3.6.4 CYP1A gene expression

At the end of Exposure 1, *cyp1a* expression was induced similarly and, in a concentration-dependent manner for both oils (Figure 3.3B and Table S3.2) (linear regression: $p < 0.0001$). However, *cyp1a* expression in the 32% Clearwater dilbit WAF was not measured due to 100% mortality. The ANOVA demonstrated a significant increase in *cyp1a* expression for every WAF concentration of both oils, compared to their control group. Exposure 2 yielded no response for *cyp1a* expression (Figure 3.3E). Furthermore, ANOVA determined that gene expression did not differ in any treatment group compared to the controls. Exposure 3 induced an increase in *cyp1a* expression similar to Exposure 1 (Figure 3.3H). Linear regressions showed a significant increase of *cyp1a* expression following the WAF concentration for both oils and ANOVAs underlined significant differences for all WAF concentrations. Exposure 4 induced *cyp1a* expression increasing with the WAF concentration in a sigmoidal fashion and reach a plateau at 3.2% WAF (Figure 3.3K). After exposure to the Lloydminster conventional oil, every treatment, except 0.32% WAF, induced a significantly higher *cyp1a* expression compared to the control group. With the Clearwater dilbit exposure, a significant increase in *cyp1a* expression was observed in the 3.2% WAF treatment. Exposure 5 induced an increase in *cyp1a* expression after exposure to the Lloydminster conventional oil (linear regression: $p < 0.0001$; Figure 3.3N), and the two highest WAF concentrations, 10 and 32% WAF, yielded an increase in *cyp1a* expression significantly higher than the control group. Finally, *cyp1a* expression induced by Clearwater dilbit 10% WAF concentration was significantly higher than the control group.

3.6.5 CYP1A activity

Exposure 1 induced an increase in EROD activity with WAF treatments of both oils in a sigmoidal fashion (Figure 3.3C) and for both oils the activity in three highest concentrations was significantly higher than in the control group. During the depuration period (Exposure 2), there was a significant decrease (linear regression, $p = 0.02$) in EROD activity for the Lloydminster oil; however, the ANOVA did not reveal any difference among treatments. None of the statistical analyses used (ANOVA and regression analysis) found any difference in activity for the Clearwater dilbit exposure (Figure 3.3F). Unexpectedly, with Exposure 3, EROD activity was lower than in the control group for 0.32 and 32% WAF treatments of the Lloydminster oil. In the Clearwater exposure, no treatment differed from the control group (Figure 3.3I). However, the EROD activity measured in both control groups differed by two-fold, and the activity in all treatment groups exposed to the Lloydminster WAF was more important than in the Clearwater exposure. The EROD activity in Exposure 4 showed an increase following the WAF concentration of both the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit (Figure 3.3L and Table S3.2). In the 10 and 32% WAF Clearwater dilbit

exposure, EROD activity was not measured due to a lack of tissue at the end of the exposure. Finally, EROD activity in Exposure 5 did not change after exposure to either oil for any treatment (Figure 3.3O).

Conventional (*)
 Dilbit (†)

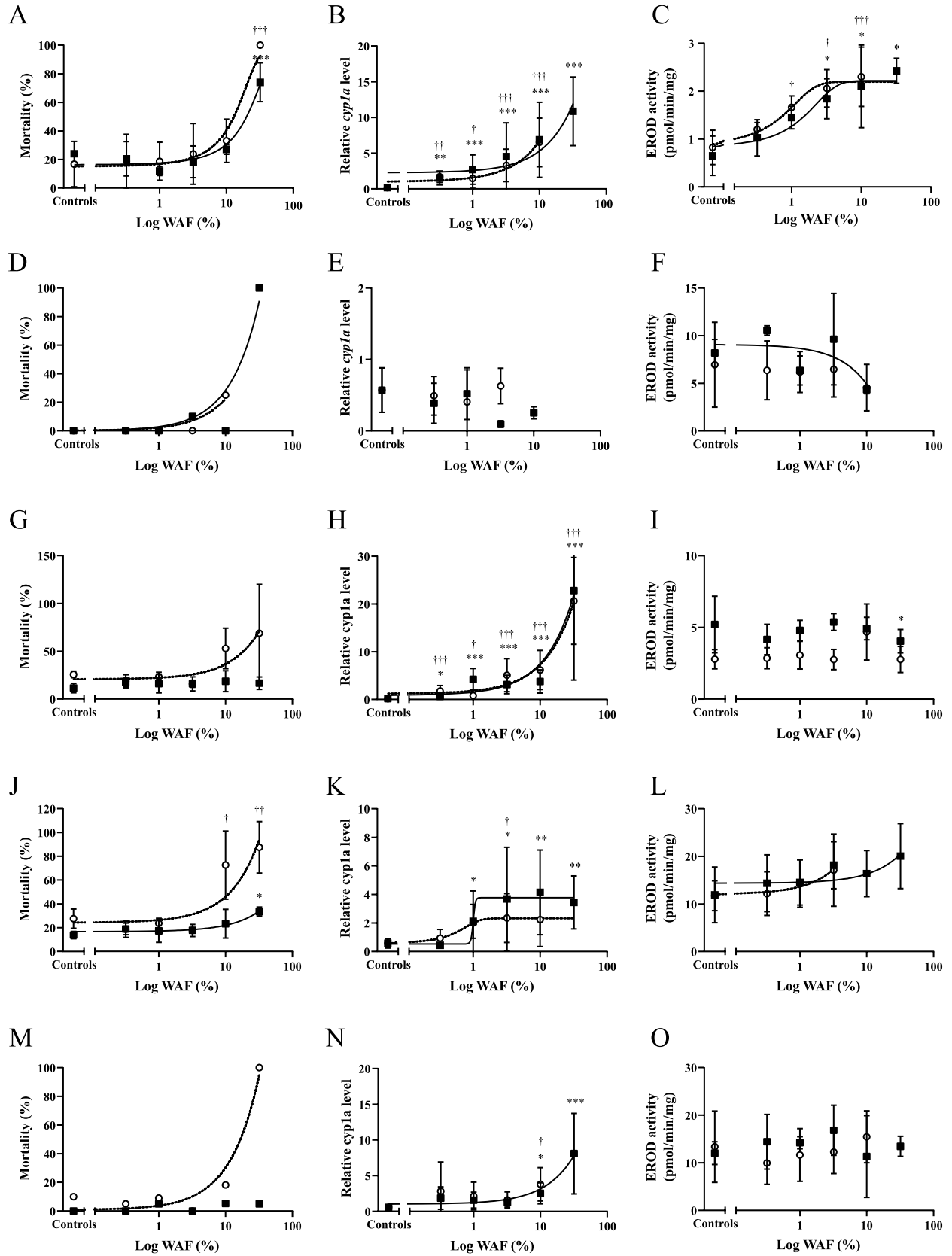


Figure 3.3. Mortality (A, D, G, J, M), *cyp1a* expression (B, E, H, K, N) and enzymatic activity (C, F, I, L, O) for the five exposures to Lloydminster conventional oil or Clearwater dilbit WAF dilutions. Data are presented as means \pm SD for mortality and EROD activity and in means \pm SEM for relative *cyp1a* expression (n= 5-10). Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regression showed a significant p-value (< 0.05). Significant difference between treatment and control group is showed by either an asterisk (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross († $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.001$; ††† $p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Axes differ among panels.

3.6.6 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation (MDA) in the Exposure 1 decreased for 1, 3.2 and 10% WAF of the Lloydminster compared to the control group (Figure S3.9A). However, MDA concentration in the control group of the Lloydminster exposure was three times higher than in the control group of the Clearwater exposure. There was no difference in any treatment exposed to the Clearwater dilbit during Exposure 1. In Exposure 3, two treatments, 0.32 and 10% WAF of the Lloydminster oil, induced an increase in MDA compared to the control group, while there were no differences among treatments for the Clearwater exposure (Figure S3.9B). Unfortunately, not all treatments had sufficient tissue to allow measurement: in 1, 10 and 32% WAF of Clearwater, MDA could not be measured. After Exposure 4, there were no differences in MDA for any treatment and for neither oil (Figure S3.9C). Lastly, in Exposure 5, only 0.32% WAF of Clearwater induced a significant increase in MDA concentration (Figure S3.9D).

3.6.7 Principal component analysis (PCA)

The first two dimensions of the PCA performed explained 81.5% of the variability of our data. Figure 3.4 presents the data grouped by the WAF concentration. Mortality and *cyp1a* expression followed a gradient along the first principal component (Dimension 1) depending on the WAF concentration. The results of the PCA illustrated a strong positive correlation between mortality, *cyp1a*, PAHs and VOCs along the first dimension. Nevertheless, biomarkers MDA concentration and CYP1A activity were not correlated with WAF proportion, but positively correlated with post-hatching development stage (Exposure 4 and 5, Figure S3.10) and negatively correlated with development stages before hatching (Exposure 1 and 3). This suggests that WAF concentrations and oils components had more influence on mortality and *cyp1a* compared to the oil and the exposure type.

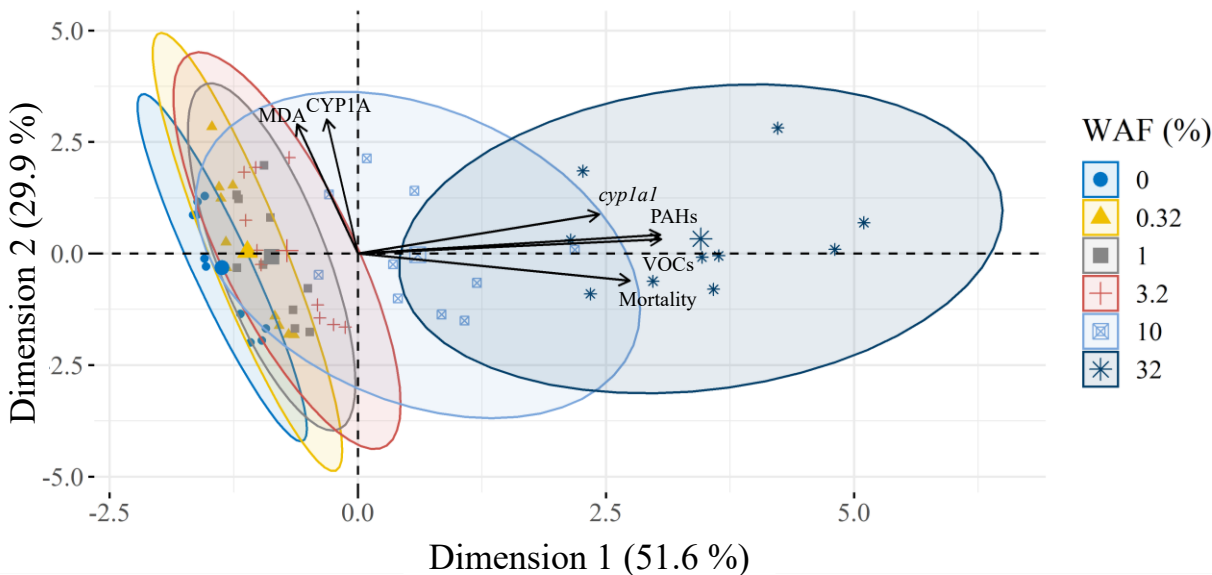


Figure 3.4. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (MDA, CYP1A, *cyplal* and mortality) and the oils components (PAHs and VOCs) in rainbow trout embryos and juveniles. Individual points representing the average value per treatment (n = 60) are grouped by WAF concentrations, marked by the colors and ellipses. Abbreviations: CYP1A: Cytochrome p450 enzyme; *cyplal*: Cytochrome p450 gene; MDA: Malondialdehyde; PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons; VOCs: Volatiles organic compounds; WAF: Water accommodated fraction.

3.7 Discussion

The goal of this study was to compare the toxicity of one conventional heavy crude oil and one dilbit on different stages in the early development of rainbow trout. Using the response of genes and proteins of the detoxification pathway, as well as mortality, in relation to the chemical profiles of the WAF, this study supports that early developmental stages are sensitive to oil exposures. At hatching, high concentrations of dilbit created similar mortality rates than at earlier stages of development. Developmental delays in embryos were induced by petroleum hydrocarbons, regardless of the oil type. Previously, Adams *et al.* (2020) studied the effects of two other dilbits on rainbow trout alevins, from hatching to swim up. Their findings demonstrated that dilbits' toxicity was similar to light and medium conventional oils and cause similar developmental defects when alevins are exposed to chemically dispersed fractions of oils. The authors also reported a reduction of growth and the presence of edema at swim-up. However, literature suggests that fish embryos and larvae are the most sensitive stages to contaminant exposure (Carls *et al.*, 2008; Heintz *et al.*, 2000; Incardona *et al.*, 2005; Marty *et al.*, 1997).

3.7.1 Chemistry

The chemical profile of the two oils studied differed. These results contrast with a previous study published by our group, where more PAHs were measured in the Lloydminster WAF compared to the dilbits (Bérubé *et al.*, 2021). Although, we used the same oils, they were not actually from the same batch, which may explain the differences in composition. This observation signifies that it is important to characterize the oils, since they vary according to the production period. The total concentrations of PAHs were similar between the WAF of both oils, however there were variations among individual components. For example, phenanthrene, C1 and C2-phenanthrene/anthracene were present at higher concentrations in the conventional oil than in the dilbit. These polycyclic aromatic components (PACs) were also found in important concentrations in the oil from the Deepwater Horizon spill and studies linked their presence to a decrease in swimming performances in juvenile mahi-mahi (Mager *et al.*, 2014) and they were also associated with cardiac dysfunctions (Incardona *et al.*, 2005; Incardona *et al.*, 2004; Incardona *et al.*, 2014). The VOCs measured had a slightly higher total concentration in the dilbit, but the concentration of benzene was higher in the Lloydminster WAF, while toluene and xylene were found in higher concentrations in the dilbit WAF. The ratio of benzene to toluene and xylene may also be an indicator of toxicity. In fact, it has been determined that alkylated hydrocarbons induce more toxicity than the parent compounds (Mu *et al.*, 2014; Ott *et al.*, 1978), and toluene and xylene are an alkylated form of benzene.

Overall, the Clearwater dilbit contained higher total concentration of LMW components in comparison to the Lloydminster conventional oil, which are known to be toxic, and this may explain the differences in mortality induced by both oils (Philibert *et al.*, 2016). Interestingly, some differences were observed in the chemical profiles of the oils compared with the WAF preparations. In both oils, there was an increase in concentration from naphthalene to C3-naphthalene, the latter being the most concentrated, while C4-naphthalene and methylated naphthalene compounds had lower concentrations. This same pattern was observed in the WAF of the conventional oil. However, for the dilbit WAF, a different pattern was observed: naphthalene parent compound had the highest concentration, and the alkylated and methylated compounds had lower concentrations (Fig. S3.2). It was previously demonstrated that the oil:water ratio of the WAF preparation is not directly correlated to the partitioning of the oil components in the resulting WAF (Singer *et al.*, 2000; Rufli *et al.*, 1998; Girling *et al.*, 1994). Hence, the wide range of K_{ow} s and solubility of the components can induce divergences between the oils and WAFs' chemical profiles (Singer *et al.*, 2000).

The oil chemistry measured in this study presents slight variations compared with our previous study (Bérubé *et al.*, 2021), where WAF preparation and fathead minnow (FHM) exposures were performed at 24 °C, instead of 12 °C in the current study. Differences in temperature can affect the dissolution of oil components in the water, by decreasing the solubility of petroleum components in the water (Deshpande *et*

al., 2017, Li *et al.*, 2010). Moreover, the differences in preparation jars (e.g., shape and headspace) and thickness of the oil slick on the water may have affected the dissolution of the oil components in the water and created these variations between our studies, despite the use of a similar technique for WAF preparation.

3.7.2 Developmental delays

Our study confirmed that rainbow trout embryos exposed to conventional and unconventional oils were afflicted with global developmental and hatching delays. These delays were observed by a reduction in eye size in rainbow trout embryos exposed 10% WAF of the Lloydminster oil (around 5 µg/L of PAHs and 280 µg/L of VOCs) and of the Clearwater dilbit (starting around 7 µg/L of PAHs and 394 of VOCs). Our results are consistent with several previous studies. For example, Philibert *et al.* (2021) and Carls and Thedinga (2010) observed eye deformity in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) exposed to weathered crude oil with a concentration of 6.6 µg/L for total PAHs. Another study, by Lie *et al.* (2019) also observed a disruption in eye growth and increased eye deformities after embryonic exposure to crude oil. They observed alterations in *cyp26a1* expression during embryonic exposures, which is related with activation of all-trans retinoic acid, the most potent retinol metabolite. Defects in eye development induced by an inhibition of all-trans retinoic acid production has also been observed in zebrafish (Le *et al.*, 2012). Hence, retinoid metabolism could be disrupted by AhR-gene activation following hydrocarbon exposure. The regulation of all-trans retinoic acid is crucial for the eye development but is also necessary in skeletogenesis and general embryonic development (Fernández & Gisbert, 2011). As demonstrated in Atlantic cod by Aranguren-Abadía *et al.* (2020), *ahr2a* is the main actor in hydrocarbon detoxification pathways, while *ahr1a* mostly located in the eye would have a more specialized role in development. Finally, more evidence seems to demonstrate that the activation of the AhR pathway by oil components is linked to disruption of the Wnt/β-catenin signaling leading to regeneration and inhibition of development in embryonic fish (Cherr *et al.*, 2017, Mathew *et al.*, 2008). In addition, cardiovascular deformities have been observed in many fish species exposed during their embryonic development, which may also be induced by *ahr1* (Incardona *et al.*, 2015, Incardona *et al.*, 2004).

3.7.3 Mortality

Higher mortality rates were observed in embryos exposed to the Clearwater dilbit compared to the Lloydminster conventional oil, regardless of the stage and duration of the exposure. Because the concentrations of the various components measured were similar in the same WAF dilutions of both oils, we hypothesized that the difference in mortality was induced by other components, not measured in this study. For example, in our previous study we measured the concentration of C₆-C₁₀ hydrocarbons, which

seemed to have a stronger correlation with mortality than other oil components. This family of components were 10 times more concentrated in the dilbit compared to the conventional oil, hence are probably constituents of the diluent (Bérubé et al., 2021). A study by Lara-Jacobo and collaborators (2021) measured the ratio of oxidized compounds in the oil and water. These compounds were characterized as more soluble and more toxic than parent and alkylated PAHs compounds. These compounds were not measured in our study; however, they may have affected toxicity of either oils. These results demonstrated the importance of obtaining a complete WAF chemical profile, but because oils are a complex mixture is it not always possible. This reinforces our choice to present the biomarkers responses in function of the WAF % and not in function of the measured TPAHs. In addition, the mortality observed here seems to be related to the disruption of two important developmental stages, the embryonic axis formation, and the cardiovascular system formation (Cherr *et al.*, 2017). The disruption of these stages may directly lead to embryonic death or have delayed effects by inducing malformations in exposed embryos. Indeed, we observed latent mortality during a depuration period, after an exposure from fertilization to hatching, with concentrations of PAHs as low as 7.3 µg/L, combined with 394 µg/L of VOCs. In sockeye salmon embryos exposed to 100 µg/L of total PAHs and returned in clean water, Alderman *et al.* (2018) observed a latent mortality up to 50% after 180 days in clean water. The PAHs concentration in our study was 10 times lower than in the study by Alderman and collaborators. However, they did not measure VOC concentrations. The two studies used different WAF preparation and exposure protocols, our study using Low Energy WAF with daily renewal, while theirs used water soluble fraction with bead coating every 14 days. The two different exposure media preparation techniques create different water chemical profiles. The VOCs and LMW compounds will most likely evaporate quickly, after approximately 24 h with their method, while with our exposure media preparation, LMW components are renewed with the daily WAF renewal. Overall, in our study the latent mortality may be explained by two factors. The first one is the oil-induced malformations in embryos, mainly cardiovascular deformities, and impaired functions, such as observed previously by Hicken *et al.* (2011), and by Incardona *et al.* (2015). These malformations do not cause immediate embryonic death, but at hatching they could cause a delayed mortality. We also observed a decrease in yolk sac vascularization (personal observation) which may prevent the embryo from developing properly. This however was not quantified and warrants further investigation. The second factor of latent mortality could be the bioaccumulation of lipophilic PAHs in the yolk sac. As the embryo develops and utilizes yolk-sac lipids, it may also mobilize bioaccumulated PAHs and oil components, increasing their bioavailability (Brinkworth et al 2003, Billiard *et al.*, 1999). This leads to increased toxic effects with the metabolization of these components, especially at hatching where the embryo goes through many physiological changes (Whyte *et al.*, 2000).

Finally, exposure to a high WAF concentration of the dilbit at hatching resulted in complete mortality, while no significant increase in mortality was observed with the conventional oil exposure. This increase in mortality, starting after less than 7 days post-hatching, can be caused by an increase in overall exposure by ingestion, dermal exposure, and gill exposure of hydrocarbons, which is prevented by the chorion in earlier life stages (Philibert *et al.*, 2019; Carls *et al.*, 2008). Biotransformation takes place in three main sites in fish, the liver, the gills, and the gastrointestinal tract (Santos & Bueno dos Reis Martinez, 2020, Tierney *et al.*, 2013), and an increase in biotransformation in these regions induces more reactive metabolites, leading to cellular and physiological damage (Hodson *et al.*, 2007; Aas *et al.*, 2000). In this study, the C₆-C₁₀ were not measured, but their concentration was likely higher in the dilbit (Bérubé *et al.*, 2021; Tremblay *et al.*, 2005). In our previous study and other similar studies (Philibert *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015), LMW components were determined to cause acute mortality, and the current results were consistent with these studies. The Clearwater dilbit was the most toxic at 32% WAF, because it contained higher concentrations of LMW hydrocarbons, which are readily absorbed by the rainbow trout alevin (Lin *et al.*, 2020; Kennedy & Farrell, 2005).

3.7.4 CYP1A gene expression and enzyme activity

The relative expression of *cyp1a* was observed to be a reliable predictor of malformations in PAH-exposed larval fish (Lara-Jacobo *et al.*, 2021; Alsaadi *et al.*, 2018). In comparison, the results of this study demonstrated that *cyp1a* expression was indeed an efficient biomarker of hydrocarbon exposure and seemed to be related to developmental delays observed in fish exposed to oil WAF from fertilization to hatching. Malformations and developmental delays were not measured in the other exposures, however *cyp1a* expression was expressed at low concentrations of hydrocarbons in the water at every developmental stage. CYP1A activity is a less sensitive biomarker and did not increase along with hydrocarbon concentrations in some of the exposures. This highlights the importance to consider the survivorship bias when assessing the toxicity of various contaminants. Otherwise, substantial information is lost, for example the CYP1A gene expression and enzyme activity in fish affected the most by the exposure (Gagliardi *et al.*, 2019). Similar to the observations by Adams *et al.* (2014), our results demonstrated that CYP1A gene expression and activity do not always reflect toxicity of the oils mainly due to the variability in AhR activation by the various oil components. These results support that *cyp1a* expression is a sensitive biomarker of exposure; however, it is not necessarily linked to an increase in mortality, hence is not a good biomarker of effect. This is mainly observed during the depuration period (Exposure 2), where the alevins are no longer exposed to oil components and both biomarkers (*cyp1a* and CYP1A) returned to the same level as the control group. Similar observations were made by Avey *et al.* (2020), where EROD activity returned to control levels in

a depuration period of 14 days. Hence, new biomarkers may be necessary to assess the global health of these fish that may still be suffering the effects of hydrocarbon exposure after remediation. Globally, these observations emphasize the importance of measuring a variety of biomarkers (e.g., oxidative stress damage and antioxidant capacity or developmental pathways) and oil components to assess with more accuracy the effects of the oil on freshwater fish development and early life stages.

3.7.5 Principal component analysis

Complementary PCA analysis demonstrated that the oil components and their concentrations, more than the oil type itself, influenced fish mortality and the responses of the biomarkers measured. Hence, it would be interesting to further study the synergistic or additive effects of the oil components in relation to the detoxification metabolism. In addition, PCA presenting the data grouped by exposure also illustrates relationships among the exposures at latter life stages, MDA and CYP1A activity. No clear tendency was observed with the concentration of MDA in our treatments, when comparing exposures and oil type. High mortality prevented the MDA analysis in many treatments, and the relation of the MDA concentration and the exposure may need to be investigated further. Finally, the relation between the exposure and CYP1A activity, denoted by the PCA, is probably due to the developmental stage and the duration of the exposure, which in turn impact the level of activity measured.

3.8 Conclusions

Overall, this study confirms that dilbits can be equally or more toxic compared to a heavy conventional oil, depending on many factors, such as the oil components and their solubility. The developmental stage of the embryo is an important factor when assessing toxicological effects of oil spills on freshwater fish, due to the specific sensitivity of each developmental stage and the probability to disrupt crucial developmental steps. In addition, the temperature and WAF preparation conditions have an impact on the solubility of oil components and needs to be considered when comparing different types of oils. Our study suggests that the expression of *cyp1a* is a reliable biomarker of exposure, regardless of the type of oil, however CYP1A gene expression and activity may not always predict oil toxicity. Measuring CYP1A gene expression and enzyme activity may be interesting in future risk assessment analysis, mainly for their different responses to hydrocarbon exposures. We also observed that the most sensitive stage of development was the early development (e.g., blastula-gastrula). Exposure to both conventional and unconventional oils induced developmental delays that prevented fish from surviving after hatching, even when returned in clean water. This study demonstrates that dilbits are more toxic to early life stages in comparison to conventional oil

and highlights the need to consider the most sensitive stage of embryonic development when performing risk assessment studies on oils.

3.9 Funding

This project was funded by the National Contaminant Advisory Group (NCAG) of Fisheries and Oceans Canada to PC and VSL and by the Canada Research Chair (CRC) program to VSL (#950-232235). Part of the analyses was funded by a program of the Quebec Government, the Stratégie maritime du Gouvernement du Québec, Plan d'action 2015-2020.

3.10 Acknowledgements

The authors would like to thank Lucie Baillon and Géraldine Patey at INRS for their support with protocol implementation, the *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec* (CEAEQ, MELCC) for their analytical support, and Crude Quality Inc. (Alberta, Canada) for the oils. Graphical abstract was created with BioRender.com.

3.11 Author Statement

Roxanne Bérubé: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing- Original draft preparation, Writing- Review & Editing. **Molly Lefebvre-Raine:** Investigation, Visualization, Writing- Review & Editing. **Charles Gauthier:** Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Writing- Review & Editing. **Thibault Bourdin:** Investigation, Visualization, Writing- Review & Editing. **Pauline Bellot:** Investigation, Writing- Review & Editing. **Gaëlle Triffault-Bouchet:** Supervision, Funding acquisition, Writing- Review & Editing. **Valérie S. Langlois:** Supervision, Funding acquisition, Writing- Review & Editing. **Patrice Couture:** Supervision, Funding acquisition, Writing- Review & Editing.

3.12 Supplementary materials

Table S3.1. Genes of interest and specific primer parameters.

Gene	Gene Name	Forward and reverse primers	Primer concentration (uM)	Annealing temp (°C)	Amplicon length (bp)	Reference
<i>ef1a</i>	Elongation factor 1 α	F: CTGTTGCCTTTGTGCCCATC R: TTCCATCCCTTGAACCAGCC	0.35	60.0	85	Adams <i>et al.</i> , 2020
<i>rpl8</i>	Ribosomal protein L8	F: CTGCTGTCTGGAGGAGAAGC R: CTGGGTTGTGGGAGATGACC	0.35	60.0	158	Custom design
<i>cyplal</i>	Cytochrome p450	F: GATGTCAGTGGCAGCTTTGA R: TCCTGGTCATCATGGCTGTA	0.35	60.0	99	Wiseman & Vijayan 2011

Table S3.2. Regression statistics of mortality, relative *cyp1a* levels and EROD activity responses following the 5 exposures of WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil or Clearwater McMurray dilbit.

Figure	Regression Type	Parameter	Oil	
			Lloydminster conventional oil	Clearwater McMurray dilbit
3A. Mortality	Sigmoidal (variable)	Hillslope	0.04	0.06
		Upper	100	100
		Lower	0	0
		R square	0.85	0.82
3B. <i>cyp1a</i>	Linear	Intercept (x = 0)	1.55	1.02
		Slope	0.58	0.56
		R square	0.39	0.55
		P value	< 0.0001	< 0.0001
3C. EROD activity	Sigmoidal (variable)	Hillslope	0.34	0.67
		Upper	2.43	2.3
		Lower	0.65	0.83
		R square	0.61	0.68
3D. Mortality	Linear	Intercept (x = 0)	0	0
		Slope	2.85	2.25
		R square	NA	NA
		P value	0.0008	0.004
3E. <i>cyp1a</i>	Linear	Intercept (x = 0)	0.48	0.51
		Slope	-0.03	0.03
		R square	0.13	0.01
		P value	0.09	0.65
3F. EROD activity	Linear	Intercept (x = 0)	9.07	6.7
		Slope	-0.42	-0.21
		R square	0.23	0.07
		P value	0.02	0.2
3G Mortality	Linear	Intercept (x = 0)	15.58	20.71
		Slope	0.06	1.58
		R square	0.01	0.44
		P value	0.69	0.007
3H. <i>cyp1a</i>	Linear	Intercept (x = 0)	1.6	1.59
		Slope	0.65	0.62
		R square	1.6	1.59
		P value	<0.0001	<0.0001
3I. EROD activity	Linear	Intercept (x = 0)	3.07	4.89
		Slope	0.01	-0.02
		R square	0.01	0.06
		P value	0.61	0.16
3J. Mortality	Linear	Intercept (x = 0)	2.87	4.56
		Slope	0.73	3.3
		R square	0.62	0.73
		P value	0.0001	<0.0001
3K. <i>cyp1a</i>	Sigmoidal (variable)	Hillslope	11.8	1.57
		Upper	3.77	2.33
		Lower	0.53	0.31
		R square	0.28	0.22
3L. EROD activity	Linear	Intercept (x = 0)	11.95	14.35
		Slope	1.66	0.19
		R square	0.14	0.11
		P value	0.02	0.02
3M. Mortality	Linear	Intercept (x = 0)	1.55	0.79

		Slope	0.13	2.96
		R square	0.33	0.95
		P value	0.24	0.001
3N. <i>cypla</i>	Linear	Intercept (x = 0)	1.02	1.61
		Slope	0.21	0.21
		R square	0.51	0.11
		P value	<0.0001	0.06
3O. EROD activity	Linear	Intercept (x = 0)	13.15	11.28
		Slope	-0.04	0.4
		R square	0.07	0.01
		P value	0.13	0.61

Table S3.3. Effective concentration 20 (EC20) determined by dose-response modelling of the mortality, the relative cyp1a levels and the EROD activity responses following the exposure to the Lloydminster conventional oil or the Clearwater McMurray dilbit. Results show EC estimates (% WAF) and the 95% confidence intervals (CI). n.d.: not determined.

		Lloydminster conventional oil	Clearwater McMurray dilbit
3A. Mortality	EC20	3.6	3.5
	95 % CI	-1.6 - 8.9	-3.7 - 10.6
3B. cyp1a	EC20	4.2	1.3
	95 % CI	1.5 - 6.8	-0.1 - 2.7
3C. EROD activity	EC20	0.3	.3
	95 % CI	-0.1 - 0.7	-0.02 - 0.5
3D. Mortality	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.
3E. cyp1a	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.
3F. EROD activity	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.
3G Mortality	EC20	n.d.	1.4
	95 % CI	n.d.	-1.9 - 4.8
3H. cyp1a	EC20	10.4	4.6
	95 % CI	5.6 - 15.2	0.4 - 8.8
3I. EROD activity	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.
3J. Mortality	EC20	n.d.	5.5
	95 % CI	n.d.	0.2 - 10.9
3K. cyp1a	EC20	n.d.	0.2
	95 % CI	n.d.	-0.1 - 0.5
3L. EROD activity	EC20	0.2	0.6
	95 % CI	-0.4 - 0.8	-0.7 - 1.9
3M. Mortality	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.
3N. cyp1a	EC20	2.6	0.1
	95 % CI	-0.3 - 5.4	-0.3 - 0.5
3O. EROD activity	EC20	n.d.	n.d.
	95 % CI	n.d.	n.d.

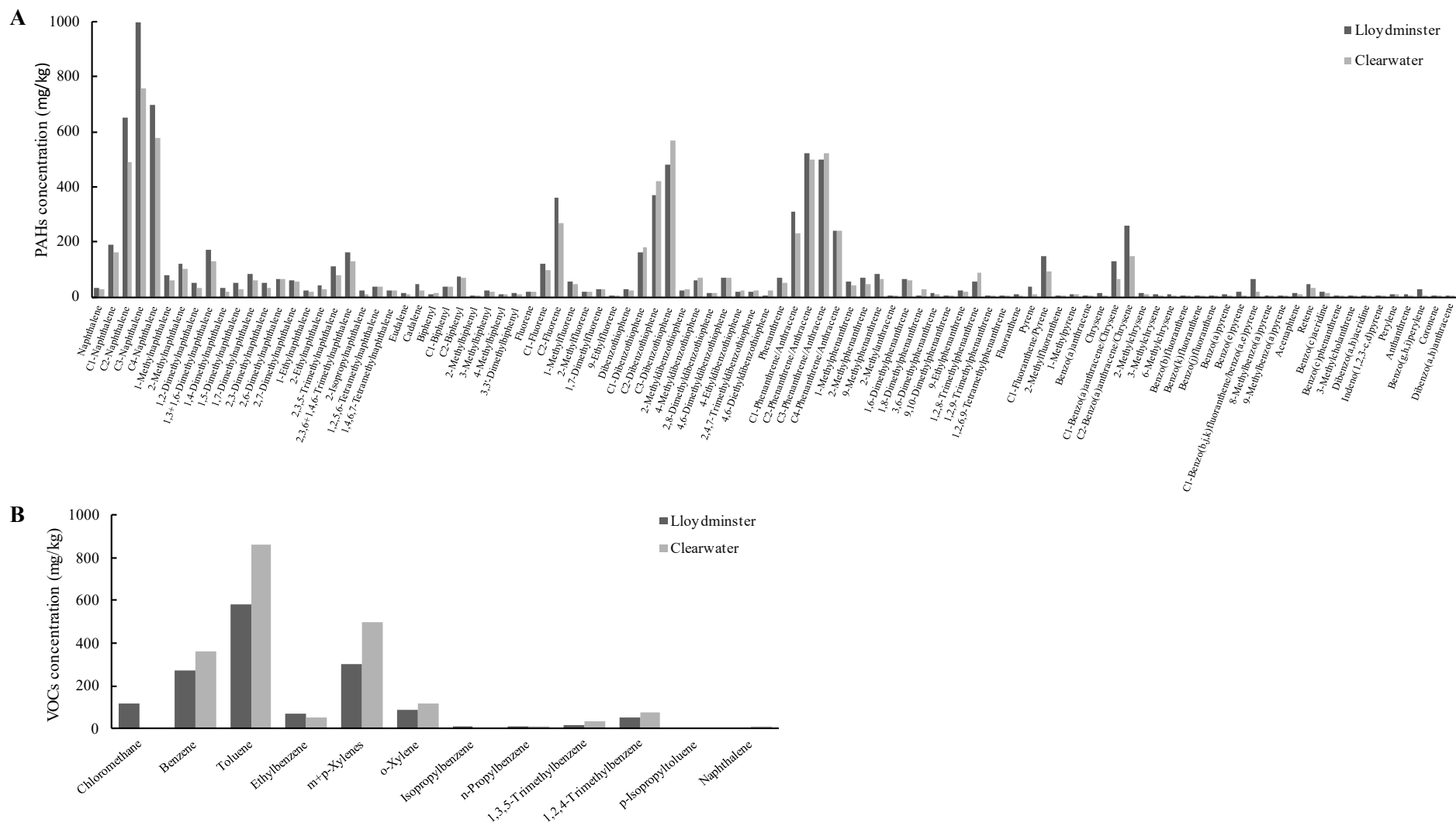


Figure S3.1. Concentration of PAHs and alkylated-PAHs (A) and in VOCs/BTEX (B) measured in the Lloydminster conventional oil and in the Clearwater dilbit (n=1).

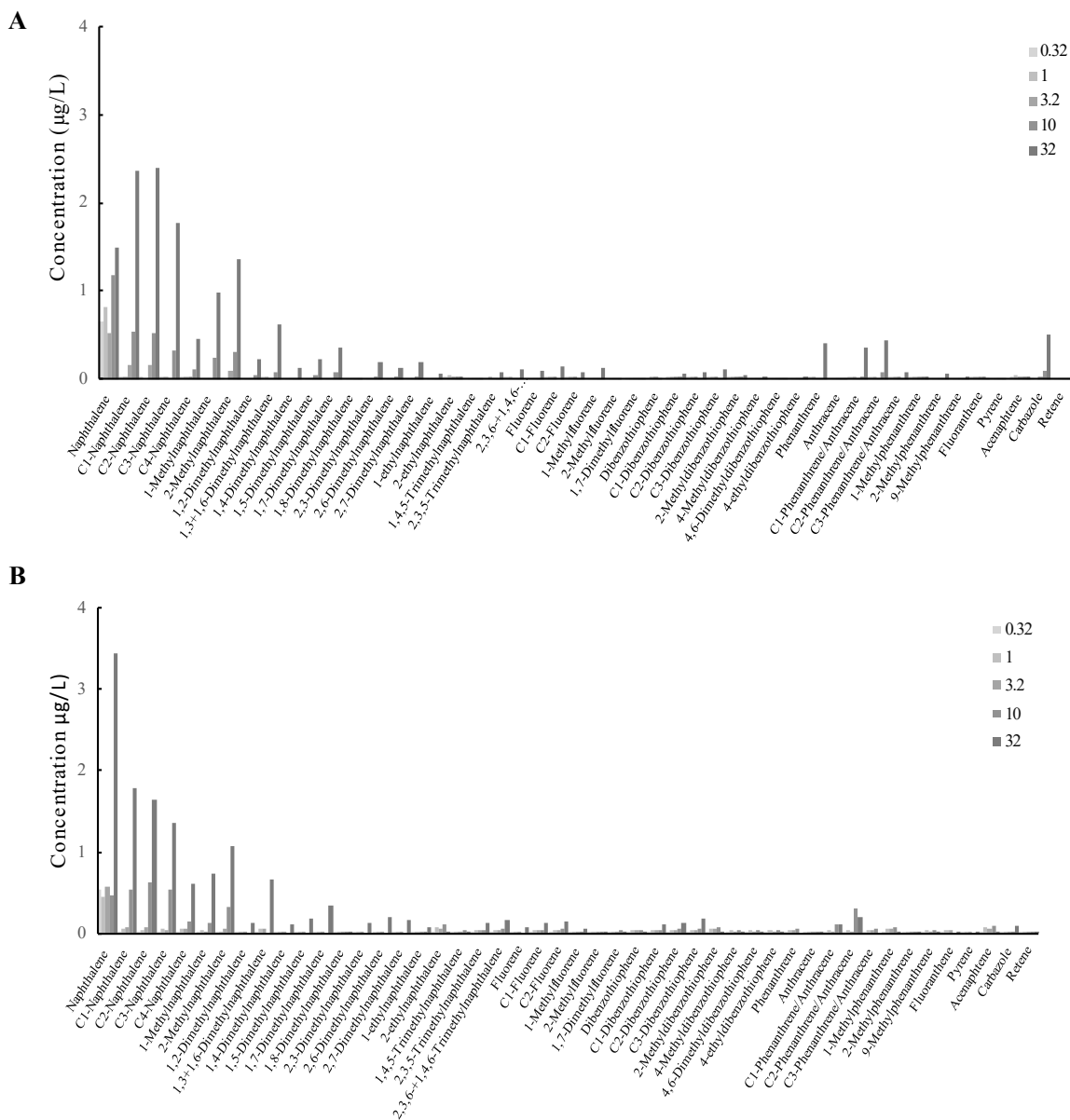


Figure S3.2. Concentrations of PAHs and alkylated-PAHs measured in each WAF concentrations prepared with the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater dilbit (B) (n=3).

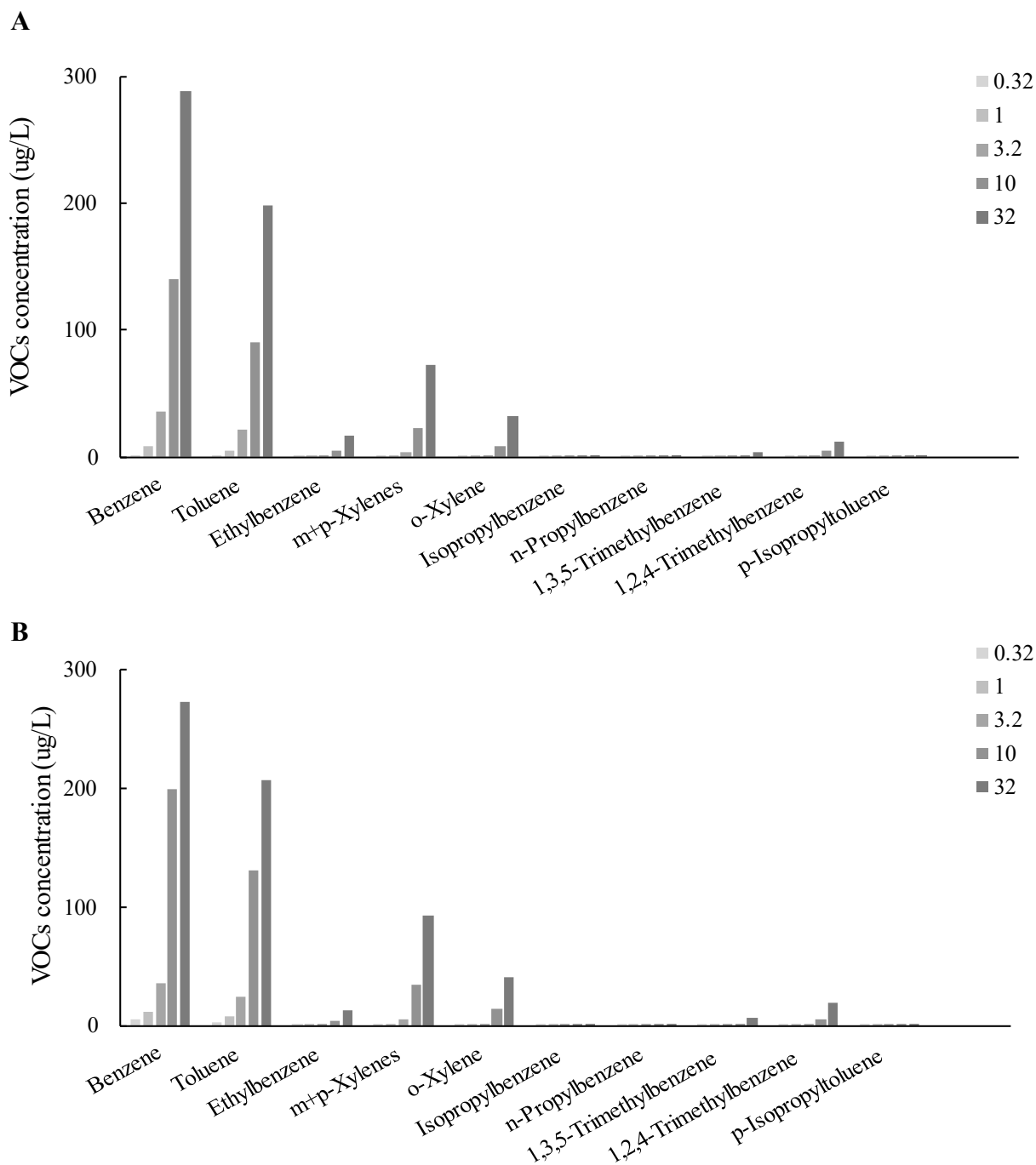


Figure S3.3. Concentrations VOCs and BTEX measured in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A) and of the Clearwater dilbit (B) (n=3).

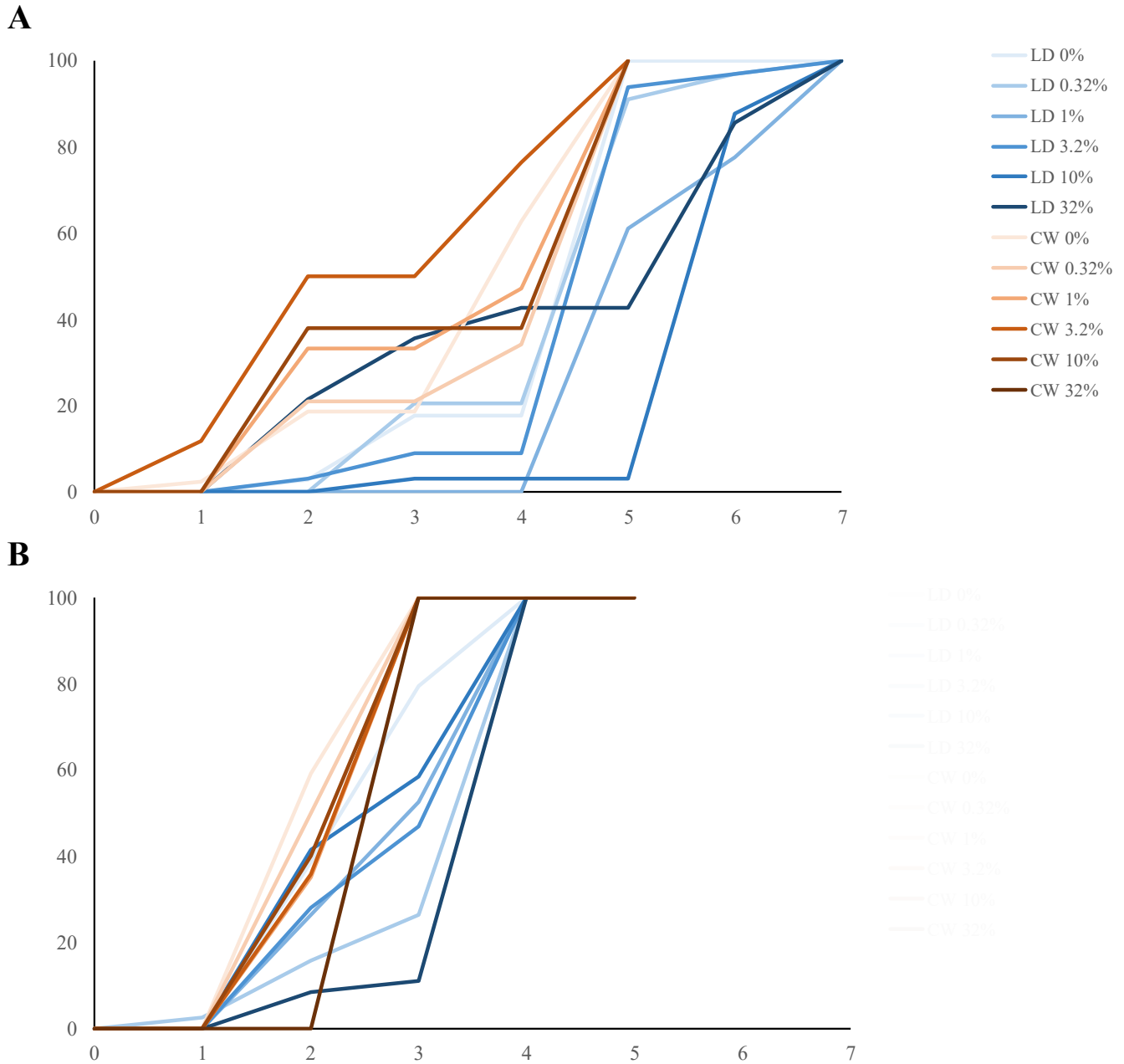


Figure S3.4. Cumulative hatching per day for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit in Exposure 1 – from fertilization (A) and in Exposure 3 – from eyed stage (B).

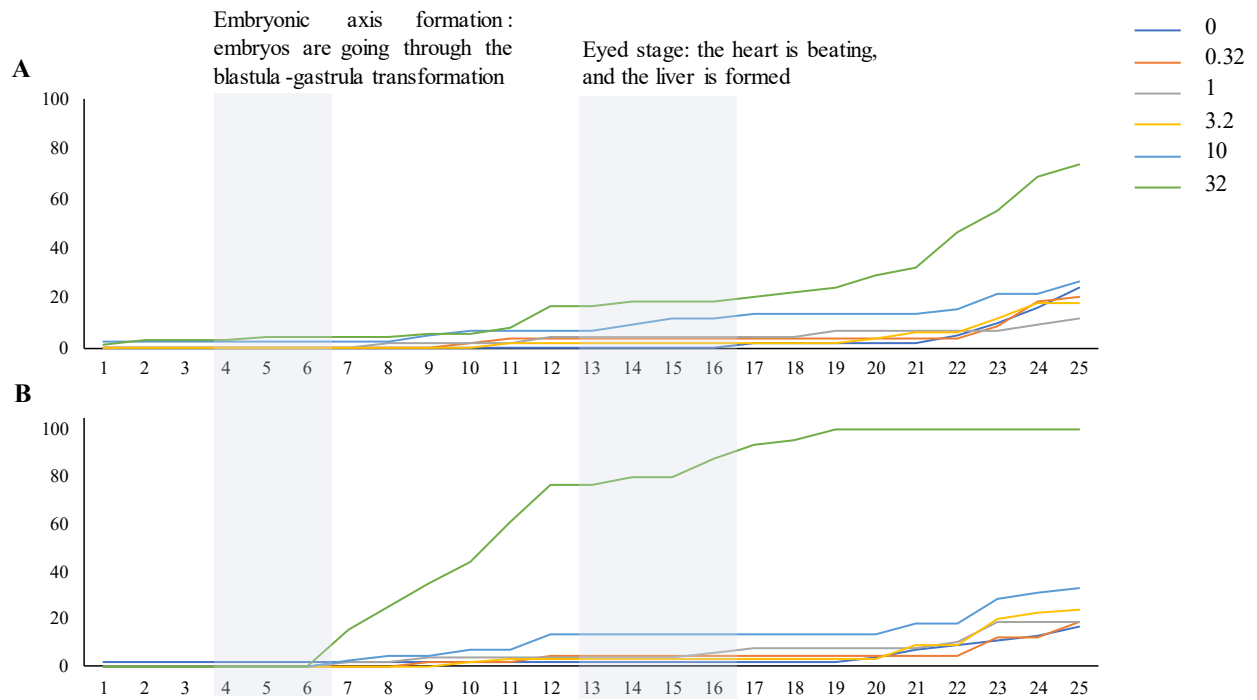


Figure S3.5. Daily mortality of embryos exposed from fertilization to hatching (Exposure 1) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B). Grey boxes represent the embryonic developmental stages most sensitive to chemical toxicity.

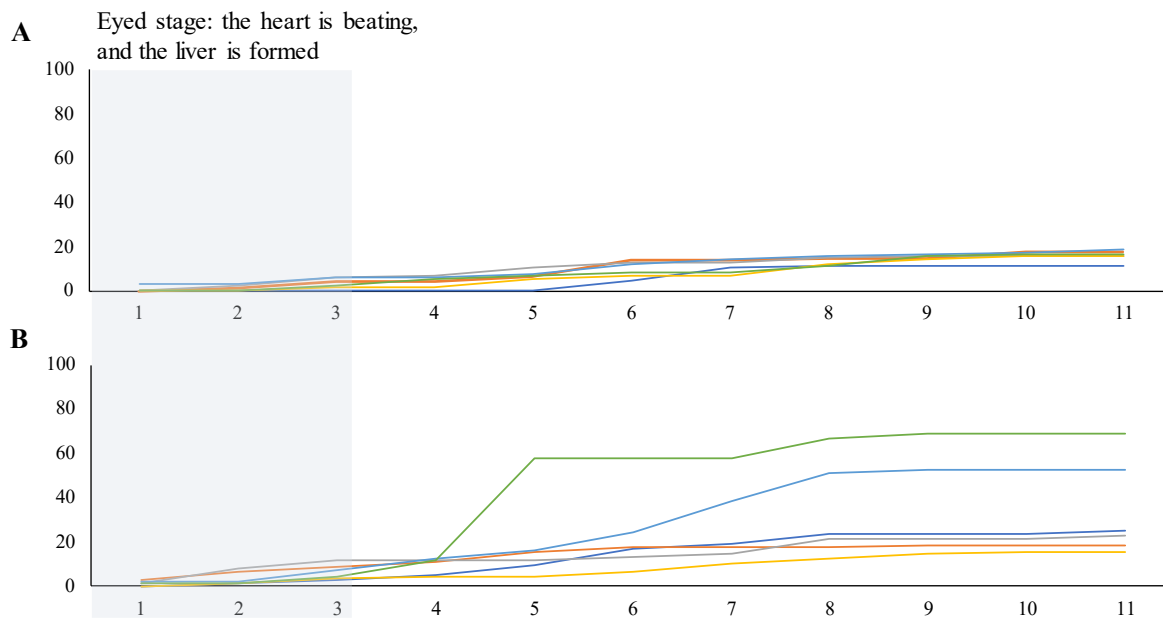


Figure S3.6. Daily mortality of embryos exposed from eyed stage to hatching (Exposure 3) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B). Grey boxes represent the embryonic developmental stages most sensitive to chemical toxicity.

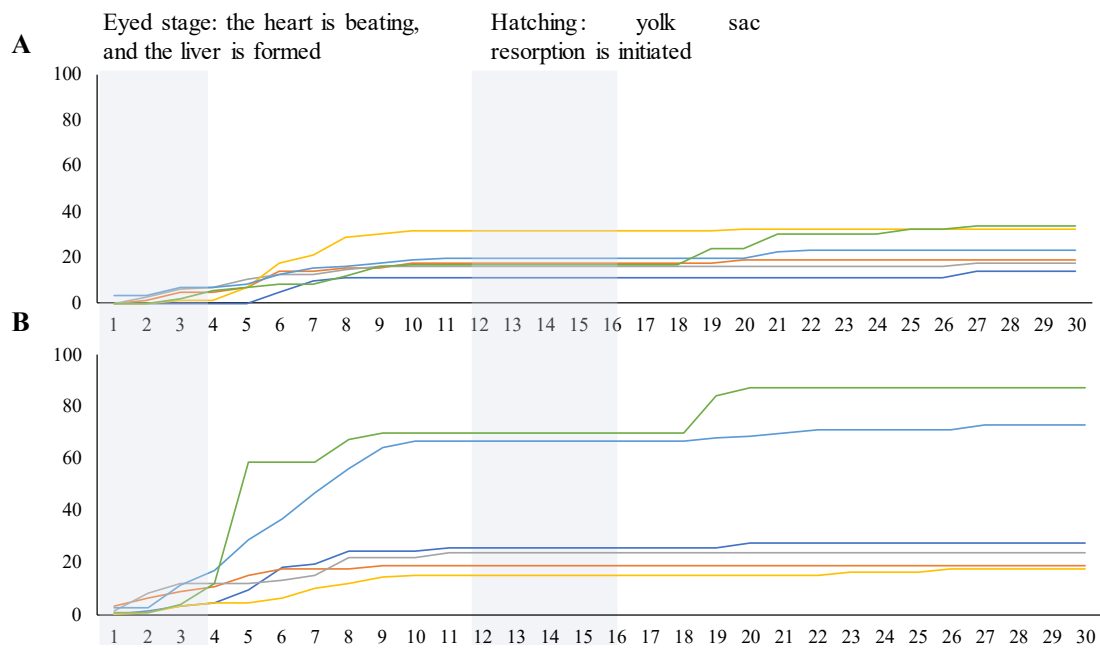


Figure S3.7. Daily mortality of embryos exposed from eyed stage to yolk sac resorption (Exposure 4) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B). This graph includes mortality from Exposure 3, from eyed stage to hatching – day 1 to 11. Grey boxes represent the embryonic developmental stages most sensitive to chemical toxicity.

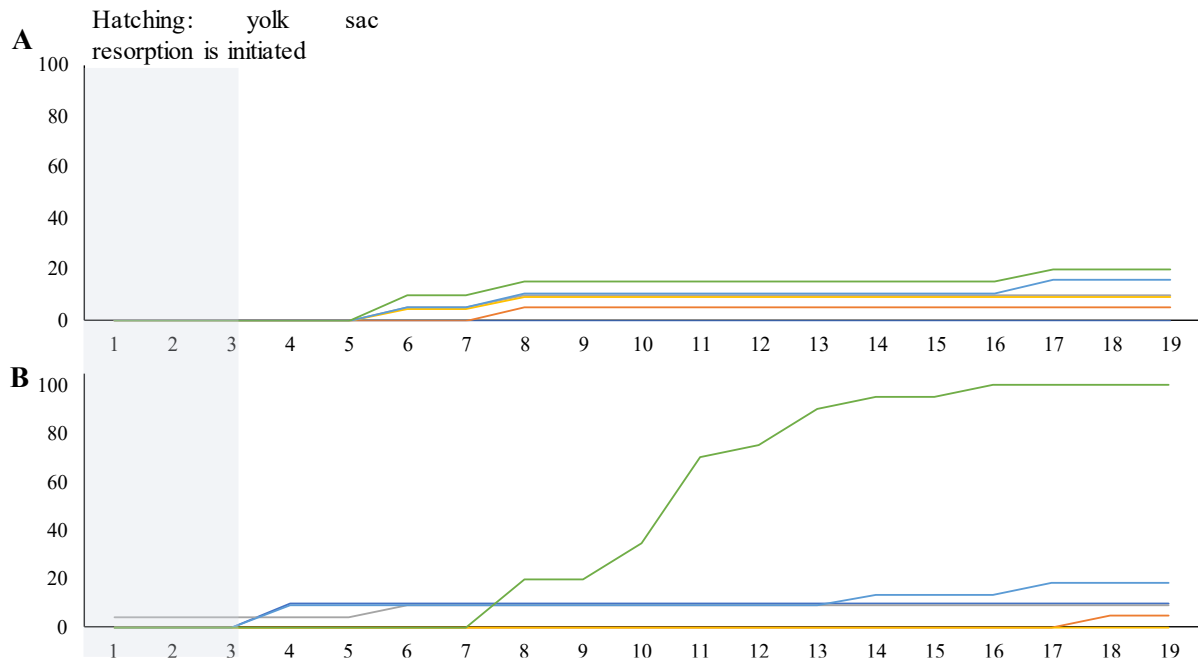


Figure S3.8. Daily mortality of embryos exposed from hatching to yolk sac resorption (Exposure 5) to the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater McMurray dilbit (B). Grey boxes represent the embryonic developmental stages most sensitive to chemical toxicity. Grey boxes represent the embryonic developmental stages most sensitive to chemical toxicity.

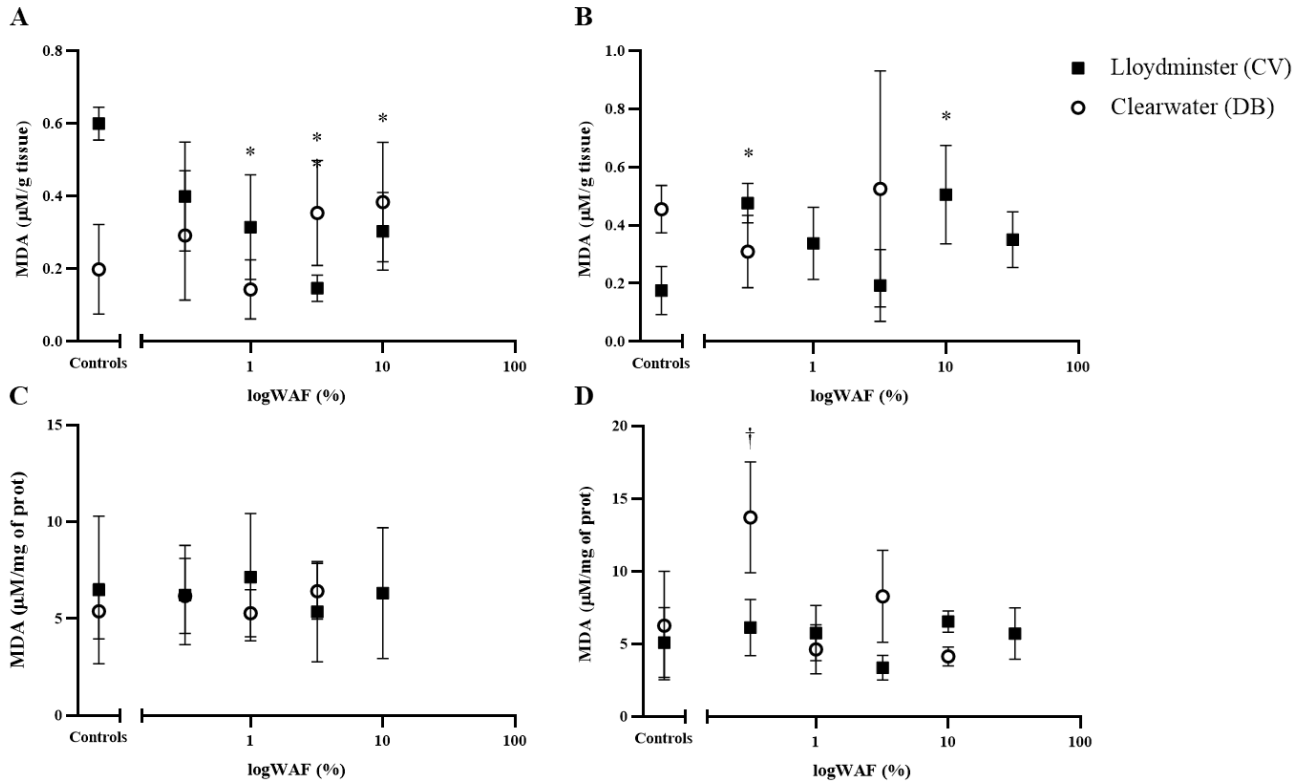


Figure S3.9. MDA concentration measured with the TBARS assay in larvae ($\mu\text{Mol/g}$ tissue) for Exposure 1 and 3 (A, B) and in juvenile ($\mu\text{Mol/mg}$ of prot) for exposure 4 and 5 (C, D), exposed to Lloydminster conventional oil or Clearwater dilbit WAF dilutions. Data are presented as means \pm SD ($n=3-8$). Significant difference between treatment and control group is shown by either an asterisk ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross ($\dagger p \leq 0.05$; $\dagger\dagger p \leq 0.001$; $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure.

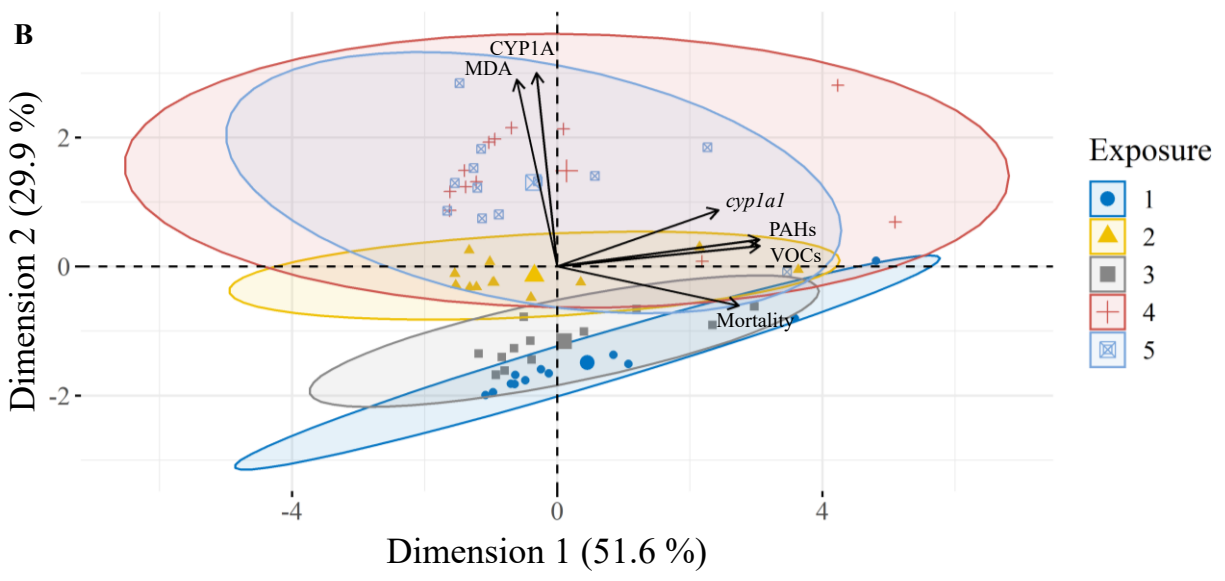
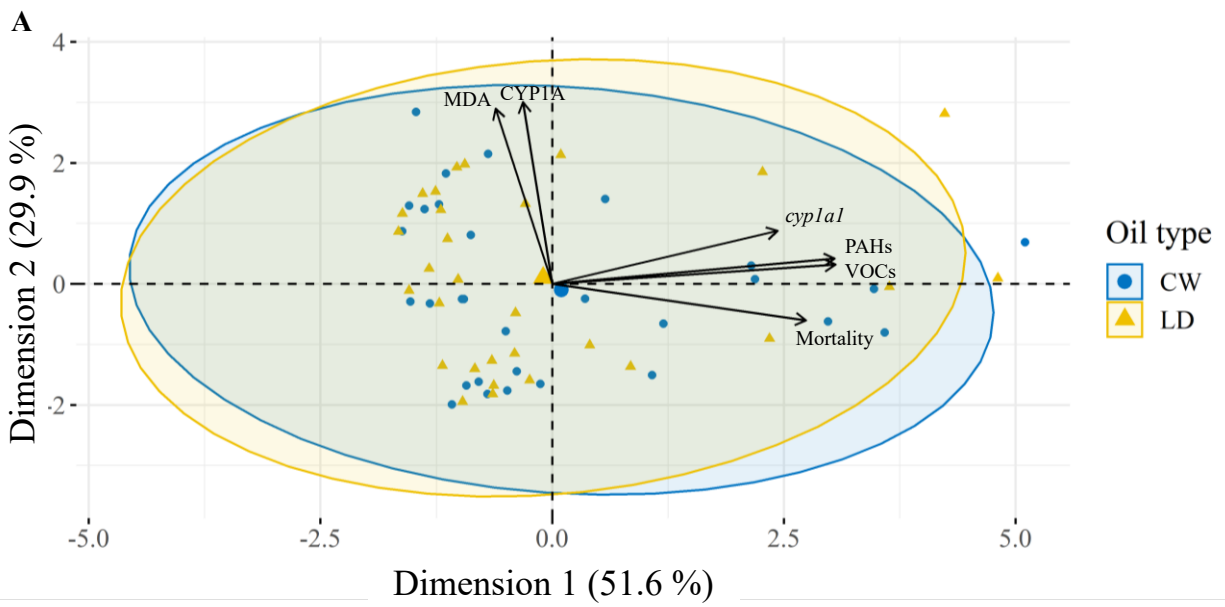


Figure S3.10. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (MDA, CYP1A, *cyp1a1* and mortality) and the oils components (PAHs and VOCs) in rainbow trout embryos and juveniles. Individual points representing the average value of each treatment (n = 60) are grouped by oil type (A) or by the Exposure (B) and marked by the colored symbols and ellipses. Abbreviations: CYP1A: Cytochrome p450 enzyme; *cyp1a1*: Cytochrome p450 gene; MDA: Malondialdehyde; PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons; VOCs: Volatiles organic compounds; WAF: Water accommodated fraction.

4 Molecular effects and early developmental toxicity of a conventional and an unconventional oil on the Atlantic salmon

Effets moléculaires et toxicité des premiers stades de développement d'un pétrole conventionnel et d'un pétrole non conventionnel sur le saumon atlantique

Auteurs :

Roxanne Bérubé¹, Camille Garnier¹, Molly Lefebvre-Raine¹, Charles Gauthier¹, Normand Bergeron¹, Gaëlle Triffault-Bouchet², Valérie S. Langlois¹, Patrice Couture¹

1. Institut National de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 rue de la Couronne, Québec, Canada.

2. CEAEQ, Ministère du développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques, 2700 rue Einstein, Québec, Canada.

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Article prêt à soumettre

Contribution des auteurs :

Roxanne Bérubé : Conceptualisation du projet, réalisation des expériences en laboratoire, traitement des données et présentation des résultats sous forme de graphiques. Supervision des stagiaires : Camille Garnier et Molly Lefebvre-Raine. Responsable de la rédaction du manuscrit.

Camille Garnier : Participation aux analyses de laboratoires présentés aux figures 4C, 4D et 5.

Molly Lefebvre-Raine : Réalisation des expositions et acquisition des échantillons.

Charles Gauthier : Conceptualisation du projet, acquisition du financement et des ressources matérielles.

Normand Bergeron : Responsable de l'acquisition du financement et des échanges avec la FQSA pour l'obtention des œufs de saumon atlantique.

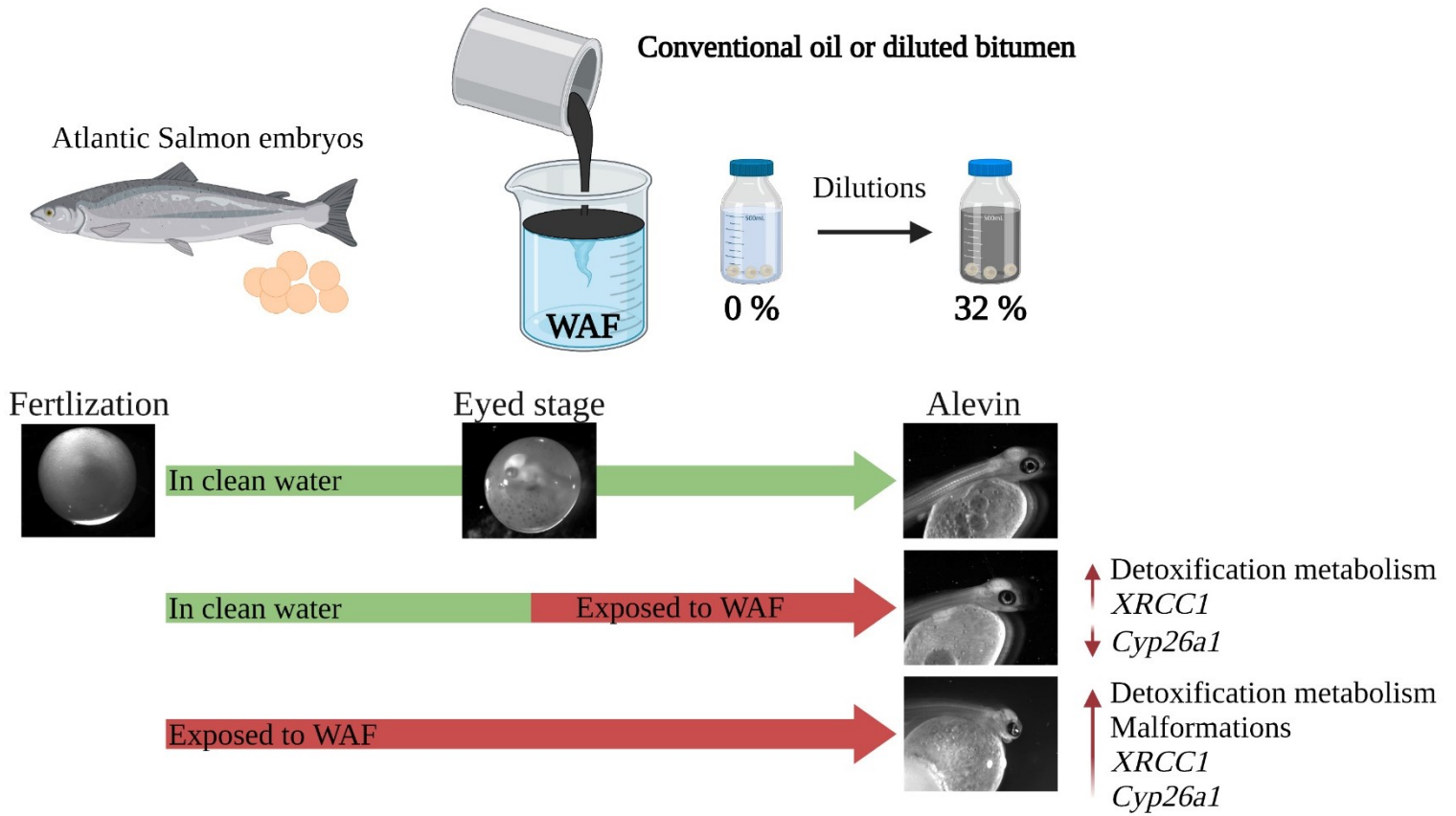
Gaëlle Triffault-Bouchet, Valérie Langlois et Patrice Couture : Responsable de la conceptualisation initiale et de l'acquisition du financement. Supervision de l'ensemble des travaux.

Tous les auteurs ont participé aux révisions de l'article.

4.1 Highlights

- Atlantic salmon embryos are most sensitive to dilbit when exposed from fertilization.
- The vitamin A and DNA repair pathways are altered in oil-treated salmon.
- Developmental delays and premature hatching were induced by both oil types.

4.2 Graphical abstract



4.3 Abstract

Atlantic salmon is an important species for Canadian culture and economy. However, it is a vulnerable species facing decline due to habitat contamination and destruction. Existing and new Canadian pipeline projects pose a threat to salmonid habitat. The effects of diluted bitumen (dilbit), the main oil circulating in pipelines, are less studied than for conventional oils, especially during the critical early embryonic developmental stage occurring in freshwater ecosystems. Therefore, this study aimed to compare the effects of various concentrations of water-accommodated fractions (WAF) of the Clearwater McMurray dilbit and the Lloydminster Heavy conventional oil, on Atlantic salmon embryos either from fertilization or from eyed stage until hatching. The concentrations of volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), C₆-C₁₀ and C₁₀-C₅₀ hydrocarbon chains were measured in the parent oils and in the WAF treatments. The dilbit contained the highest concentrations of low molecular weight (LMW) compounds (including BTEX and C₆-C₁₀), while the conventional oil contained the highest concentrations of PAHs. The Clearwater dilbit was generally more toxic, causing a higher percentage of mortality and malformations than the conventional oil at similar WAF concentrations. In addition, the salmon embryos exposed from fertilization suffered a higher mortality rate and more developmental delays and malformations than those exposed from the eyed stage, suggesting that early development is the most sensitive developmental stage to oil exposure. Gene expression and enzymatic activity of the detoxification phase I and II enzymes (CYP1A and GST) were measured. Data showed increases in both *cyp1a* expression and GST activity with increasing WAF concentrations, while *gst* expression was not affected by the exposures. Except for the highest concentration of the conventional oil, no treatments induced a change in oxidative cellular damage variables (e.g., lipid peroxidation and 8-OHdG). In contrast, gene expression of proteins involved in the biotransformation of vitamin A and DNA damage repair were modified by the oil exposures. Globally, this study indicates that Atlantic salmon are most affected by oil exposure at the beginning of their development and may accumulate deformities and delays impacting their survival at later life stages. Our study recommends that pipeline construction projects should avoid freshwater ecosystems serving as spawning grounds for the salmonid species.

4.4 Introduction

In Canada, where 63 % of the oil production comes from the oil sands reserve exploitation, 2.95 million barrels per day of bitumen were produced in 2019 (CAPP, 2019). Increasing production creates the need for construction of pipelines throughout Canada, augmenting the risk of spills and freshwater ecosystem contamination (King *et al.*, 2017b). The bitumen extracted in oil sands is viscous and needs to be diluted with lighter hydrocarbons, such as gas condensates, to increase its fluidity before its transport by pipelines (Lee *et al.*, 2015). The addition of diluents increases the proportion of low molecular weight (LMW) components in the dilbit and decreases its density. The diluted bitumen (dilbit) floats on water after a spill, but the LMW components rapidly evaporate and are dissolved in water. The dilbit then sinks in the water column and mixes with the sediments, where it can persist years after a spill, for example after the Kalamazoo oil spill (EPA, 2013). The processes following a spill will vary greatly according to oil type and the properties of the environment, such as temperature, wind, water turbulence, and waves action (King *et al.*, 2017a; Lee *et al.*, 2015).

Salmonids are particularly sensitive to exposure to hydrocarbons and dioxin-like compounds. The toxicity of these compounds is mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Abnet *et al.*, 1999; Hansson *et al.*, 2004). The AhR protein complex is a transcription factor leading to the activation of the detoxification pathway, phases I and II, but can also be linked directly or indirectly to other important pathways, such as developmental, retinoic acid and oxidative stress pathways, and more (Cherr *et al.*, 2017; Haarmann-Stemmann *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 2012). As described by Cherr *et al.* (2017), hydrocarbons are known to affect two fundamental steps in embryos early development. First, exposure to PAHs can interfere with β -catenin accumulation and signalling necessary for axis determination during the formation of the embryonic axis at the blastula stage, leading to abnormal embryos that die early or fail to hatch. The disruption of the Wnt/ β -catenin pathway by PAHs was observed in various aquatic species, such as zebrafish and sea urchins (Cherr *et al.*, 2017; Fairbairn *et al.*, 2012; Pillai *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 1996). Second, the cardiovascular system can be impacted by PAH exposure and lead to developmental defects or dysfunctions that have significant impact further in life or lead to early death of the embryos (Brette *et al.*, 2014; Brette *et al.*, 2017). Cardiotoxicity of PAHs was observed in marine species such as the Pacific herring (*Clupea pallasii*) (Griffin *et al.*, 2009; Incardona *et al.*, 2009; Kocan *et al.*, 1996) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Brannon *et al.*, 2006). The effects of the hydrocarbon exposure on the cardiovascular system are various. These compounds can affect the whole formation of the heart but can also induce cardiac arrhythmia in adult fish (Incardona *et al.*, 2009; Vines *et al.*, 2000). In our previous study on the rainbow trout, we observed a mortality peak coinciding with these stages of development (Bérubé *et al.* 2022), and we also observed a significant reduction of eye size, similar to the

observation by Lie *et al.* (2019). They analysed the impact of a weathered Heidrun oil exposure on haddock larvae (*Melanogrammus aeglefinus*), more specifically on the retinol pathway genes, which is a crucial pathway for development and in later life. Their study demonstrated that their exposure disrupted the vitamin A pathway and the expression of *cyp26a1* and *aldh1a1*, which in turn affected eye development in haddock embryos. These effects were also observed several days after the exposure.

Another pathway impacted by PAH exposure and AhR activation is the antioxidant pathway. This pathway is initiated by Nrf2, a target gene for AhR or by indirect activation by the reactive oxygen species (ROS) produced in phase I (Köhle & Bock, 2007; Rousseau *et al.*, 2015). Nrf2 is a transcription factor for a battery of genes with antioxidant function, such as detoxification phase II enzymes glutathione *S*-transferase (GST) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) (Köhle & Bock, 2006; Köhle & Bock, 2007; Ma *et al.*, 2004). In addition, there is an induction of the Nrf2 gene battery by the production of electrophilic compounds and reactive oxygen species (ROS), such as activated metabolites produced by CYP1A1 activity (Köhle & Bock, 2006). The phase II genes involved in the metabolism of PAHs and other hydrocarbon compounds prevent the accumulation of oxidant molecules, that otherwise would lead to oxidation of cellular component, such as DNA and lipids. DNA oxidation can be particularly damaging, leading to mutations and/or cellular dysfunction (Cooke *et al.*, 2003; Slaninova *et al.*, 2009). The oxidative DNA lesion 8-OHdG was previously studied in golden grey mullet (*Liza aurata*) from a PAH-contaminated environment in Portugal (Oliveira *et al.*, 2010) and in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to a biopesticide (Alak *et al.*, 2017). Both studies found an increase in 8-OHdG in contaminated fish, emphasizing the importance of measuring this type of damage in organisms as an indicator of contamination and of health. Another less studied biomarker in oil-exposed fish is malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. Some evidence indicates that MDA or lipid peroxidation increases in organisms exposed to PAHs and could potentially be used as an indicator of organismal health after exposure (Bettim *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2018). MDA is an aldehyde that is metabolized by aldehyde dehydrogenases (ALDHs) (Fu *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). Interestingly, among these enzymes, ALDH1A2 is also part of the retinoid pathway, catalyzing the conversion of retinaldehyde to retinoic acid (Ayala *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013). Vitamin A or retinol is inert and must be bioactivated by enzymes such as CYP26a1 and Aldh1a2. Some studies suggest that there could be a crosstalk between the AhR pathway and vitamin A metabolism (Murphy *et al.*, 2007). More so, retinoic acid hydroxylation by CYP1A to all-trans retinol can increase its excretion and lead to a global depletion of the retinoid reserves (Berntssen *et al.*, 2016). Other studies obtained similar findings and observed developmental delays (Carls & Thedinga, 2010) and an increased vulnerability to mechanical damage in pink salmon exposed to dissolved PAHs. Comparable results were obtained by Lie *et al.* (2019): they observed a decrease in *cyp26a1* and an increase in malformations (i.e., eye deformities) in haddock exposed to a weathered Heidrun oil during early

development. CYP26 and ALDH enzymes work in conjunction in the metabolism of vitamin A, and a depletion of vitamin A levels was demonstrated in Atlantic salmon following long term dietary benzo[a]pyrene (BaP) exposure (Berntssen et al., 2016). In addition, Lie *et al.* (2019) reported a decrease in *cyp26* with an increase in *cyp1a*, hence exposure to hydrocarbons may disrupt the vitamin A pathway and related enzymes, creating cellular damage and developmental delays.

Dilbit toxicity was previously studied in model fish species, such as medaka and fathead minnows (Barron *et al.*, 2018; Bérubé *et al.*, 2022; Bérubé *et al.* 2021; Lara-Jacobo *et al.*, 2021; Philibert *et al.*, 2021; Robidoux *et al.*, 2018); however, few studies were conducted on wild fish species. Two recent studies (Alderman *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020) were performed on wild juvenile salmonids native of the American west coast, the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Recent studies focused on the effects of dilbits on Atlantic salmon smolts (Alderman *et al.*, 2020; Avey *et al.*, 2020). However, no studies were performed to assess the impact of dilbit on developing Atlantic salmon embryos. The Atlantic salmon is an important species for Canadian culture and economy. Projected pipelines may impact freshwater habitat, which are spawning grounds for this anadromous species. Unfortunately, Atlantic salmon populations are already facing decline, due to freshwater habitat loss and contamination (ASF, 2020; ECCC, 2013). Studies on the pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) following the Exxon Valdez oil spill in Alaska, which happened during the spawning season, noted developmental delays, abnormalities, and reduced survival to maturity in these fish exposed to the conventional oil from the spill (Heintz, 2007; Lie *et al.*, 2019; Ron *et al.*, 2000). Our study aims at comparing the toxicity of one dilbit and one conventional oil extracted in Alberta, Canada (described previously in Bérubé *et al.*, 2021) on developing Atlantic salmon. We tested the hypothesis that the dilbit would be the most toxic on the Atlantic salmon embryos due to addition of diluent and higher concentration of low molecular weight compounds, and that both oils would induce developmental delays to early developmental stages, similar to the ones observed following the Exxon Valdez oil spill. A range of biomarkers in the detoxification pathway, in the oxidative stress responses (antioxidant enzymes and oxidative damage) and in developmental processes were measured to assess and compare the effects of both oils on two developmental stages. Lastly, the relationship between the oil components dissolved in the water and the biomarker responses were assessed.

4.5 Methodology

4.5.1 Oils and chemical analysis

The oils used in this study were provided by Crude Quality Inc. (Edmonton, Alberta, Canada). Chemical analysis of both oils and of the WAF dilutions were conducted by the Centre d'expertise en analyses environnementales (CEAEQ) in Québec, Canada. The total concentrations of VOCs, PAHs, and alkylated PAHs were detected by GC-MS, while the total concentration of C₆-C₁₀ and C₁₀-C₅₀ was detected by GC-FID. The individual concentrations of 64 VOCs, including BTEX, and of 141 PAHs and alkylated-PAHs were measured (CEAEQ 2015; 2016). The components were measured in all WAF dilutions, in triplicate throughout the exposure.

4.5.2 WAF preparation

Clearwater McMurray dilbit and Lloydminster Heavy conventional oil WAF stock solutions were prepared at the same temperature as the exposure (4 ± 1 °C), in the dark, daily. WAF, more precisely Low Energy WAF (LEWAF) were prepared as suggested by Singer *et al.*, (2000) and adapted by Adams *et al.*, (2017). Oil was added to water (1:9 v/v), the preparation was stirred gently for 18 h, then the solution was allowed to settle for 1 h before the aqueous layer was recovered. Nominal dilutions of WAF were prepared with reconstituted water (as in Bérubé *et al.*, 2021) in a logarithmic curve (0.32 - 32% v/v) for daily renewal. Glass preparation jars were cleaned daily with organic solvent-soaked wipes to remove residual oil, washed again with dish soap, and rinsed with distilled water.

4.5.3 Exposures

Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs were provided by the Fondation Saumon and La Société de la Romaine, just after fertilization by the LARSA (Université Laval, QC, CA). Eggs were fertilized from three females and six males from the Puyjalon and Romaine river (Canada), and immediately placed randomly in 500 mL exposure jars, in groups of 30. The experimental design included a clean water control and five WAF concentrations (0.32%, 1%, 3.2%, 10% and 32% v/v). Two exposures were conducted, as demonstrated in Figure 4.1. Exposure 1 was conducted from fertilization to hatching (approximately 120 days or 480 degree-days) and Exposure 2 was conducted from eyed stage to hatching (approximately 60 days or 240 degree-days). WAF renewal was performed daily by replacing up to 80 % with newly prepared WAF. Jars were sealed and aerated. Embryos were sampled at the same time each day. Individual fish were weighed, photographed and frozen in liquid nitrogen. At the end of the experiment, all samples were stored at -80 °C until further analysis.

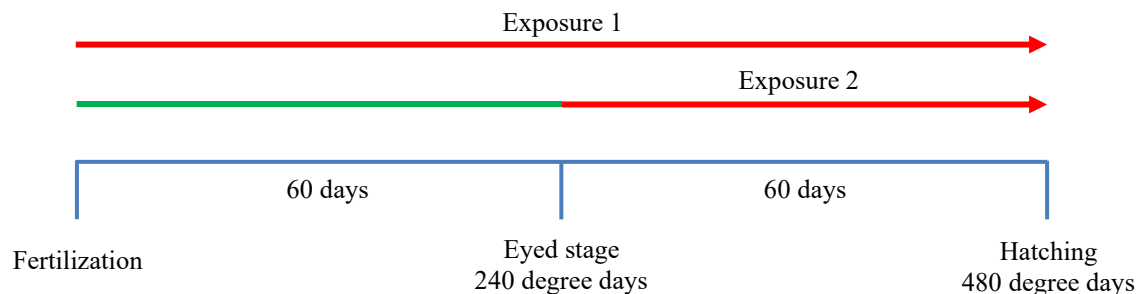


Figure 4.1. Experimental design of the Atlantic salmon exposures. Two exposures were conducted, during early developmental stages. Red arrow means eggs were exposed in WAF; green arrow means eggs were in clean water. Exposure 1 started at fertilization and exposure 2 started at eyed stage. Both ended at hatching.

4.5.4 qPCR analysis

Total RNA was extracted and purified from whole embryos ($n = 10$) using Trizol® (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Briefly, embryos were homogenized with the mixer mill (30 sec at 30 Hz), (MM 400, Retsch) by adding 0.75 mL of TRIZOL® and two stainless steel beads. RNA was purified with the iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). DNase mix was added to the samples (1 μ L of DNase mix/1 μ g of RNA) and incubated in a thermocycler, for 5 min at 25 °C and 5 min at 75 °C (CFX96 Touch Real-Day PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, Ontario). Purified RNA was suspended in RNase-free water and quantified with a NanoDrop-2000 spectrophotometer (ThermoFischer, Ottawa, ON, Canada). RNA was used as a template to synthesize complementary DNA (cDNA) using iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Nuclease-free water was added to 1 μ g RNA according to the manufacturer's protocol and placed on ice. A pre-step of cleaning was processed with the same kit using a master mix containing DNase and DNase buffer according to the manufacturer's protocol. Samples were placed in the thermocycler for 5 min at 25 °C and inactivated at 75 °C for 5 min. Then, iScript™ Reverse Transcription Supermix was added to samples according to the manufacturer's protocol and samples were placed a second time in the thermocycler for 5 min at 25 °C for priming then 20 min at 46 °C and inactivated at 95 °C for 1 min. The cDNA products were diluted 80-fold prior to PCR amplification and samples without reverse-transcriptase and no-template controls were also included. The relative expression of each gene (*aldh1a2*, *cyp1a1*, *cyp26a1*, *gst*, *pcna* and *xrcc1*) was assessed by normalization using the mean relative expression of the reference genes beta-actin (*β -actin*) and ribosomal protein L8 (*rpl8*). Gene relative expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using the Ct mean of the two reference genes. Primer sequences and information are listed in Table S4.1.

4.5.5 Cellular oxidative damage

4.5.5.1 8-OHdG

DNA was extracted using the Quick DNA Miniprep Plus kit (ZymoResearch, USA). Frozen larvae were thawed on ice, then approximately 25 mg of tissue (whole body, without yolk sac) were vortexed with ultrapure water, tissue lysis buffer, and proteinase K, then incubated at 55 °C for 60 minutes. Lysed tissues were vortexed for 15 sec with 400 µL of Genomic binding buffer (provided in the kit) and transferred to a spin column, followed by a centrifugation (12 000 g, 1 min). Flow through and collection tube were discarded and 400 µL of DNA pre-wash buffer were added to the column in a new collection tube, followed by a centrifugation (12 000 g, 1 min). To the spin column, 700 µL of g-DNA wash buffer was added and the column was centrifuged (12 000 g, 1 min). The collection tube was emptied, another 200 µL of g-DNA wash buffer was added to the column before another centrifugation (12,000 g, 1 min). Lastly, the column was transferred to a clean tube and 50 µL of elution buffer were carefully placed on the center of the column, then centrifuged (12,000 g, 1 min). DNA in samples was heat-denatured (15 min at 100 °C, then 10 min on ice). Samples were incubated with nuclease P1 (1 mg for 0.2 g of heat-denatured DNA) (N8630, MilliporeSigma) in acetic acid buffer (200 mM acetic acid, 10 mM CaCl₂, pH 6) with an incubation (60 min, 37 °C) (Wu *et al.*, 2015). Then, samples were incubated (30 min, 37 °C) with 1 U of alkaline phosphatase (P7640, MilliporeSigma) for 100 µg DNA, followed by an incubation to inhibit enzymes (10 min, 100 °C). Samples were kept on ice, quantified using the NanoDrop-2000 spectrophotometer (ThermoFischer, Ottawa, ON, Canada), and diluted to obtain a final concentration of 20 ng/µL. The concentration of 8-OHdG in prepared samples was measured using the DNA/RNA oxidative damage ELISA kit (Cayman Chemicals, AnnArbor, Michigan USA). All solutions were provided by the kit and the protocol followed as is. Briefly, ELISA buffer, standards (3000 to 10.3 pg/mL), samples, AChE tracer, and antibody were added to specific wells. The plate was incubated overnight at 4 °C. The next day, the plate was rinsed five times with the wash buffer and 200 µL of Ellman's reagent was added to each well. Finally, the plate was incubated on an orbital shaker at RT, for 90 min and was read at 420 nm on a spectrophotometer (FilterMax™ F5; Molecular Devices, San Jose, CA, US). The final concentration of 8-OHdG was calculated and normalized with the DNA concentration, to obtain a final concentration of 8-OHdG in pg/µg of DNA.

4.5.5.2 Lipid peroxydation

Lipid peroxidation was measured by quantifying malondialdehyde (MDA), with the TBARS assay kit (Cayman Chemicals, MI), according to the manufacturer's instructions. Briefly, homogenates of whole larvae ($n = 5/\text{treatment}$) were prepared with the mixer mill (30 sec at 30 Hz) and by mixing samples with ice cold RIPA Buffer (dilution 1/10) (Cayman chemicals) containing a mix of protease inhibitors (1 μL PI/100 μL RIPA) (Sigma-Aldrich). Homogenates were centrifuged (1600 g, 10 min at 4 °C), then the supernatant was kept at -80 °C until performing the assay. Samples were mixed with reagents (SDS solution and color reagent) and brought to a boil for 60 min, then placed on ice for 10 min. After a second centrifugation (1600 g, 10 min at 4 °C), supernatant absorbance was read at 540 nm.

4.5.6 Developmental delays

The photos and videos of hatched fish ($n = 6$ to 10 per treatment) were analysed and scored for malformations (edemas in the heart and yolk, and hemorrhages in the body, head and yolk sac). Videos were used to observe the movement of the jaw and jaw that was not moving at all was scored as a malfunction. The percentage of affected fish was calculated for each treatment. Examples of photos are presented in supplementary materials with quantification histograms of each malformation observed (Figure S4.6 and S4.7).

4.5.7 Statistical analysis

Mean and standard deviation (mortality, enzyme activity, and oxidative damage) or mean and standard error of the mean (gene expression) were calculated for every treatment group, with removal of outliers with the interquartile range method. Linear regressions were performed for all biomarkers as a function of each measured component in WAF concentrations, and slope equality between oils was tested with GraphPad. Two-way ANOVAs were performed, allowing to determine the effect of the oil, the WAF concentrations and their interaction on each biomarker, for each exposure. When data did not pass normality and homogeneity of variance (verified by Shapiro-Wilk and Levene's test), they were log-transformed, and normality was reassessed. Results (p -values) are presented in Table S4.3. When a significant interaction was observed, pairwise comparisons of the least-square means (Tukey method, using adjusted P -values), were performed to reveal significant differences among treatments. If the interaction was not significant, simple main effect was assessed with one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. The relationship between the biomarkers (8-OHdG, *PCNA*, *cyp1a1*, *cyp26a1*, *aldh1a2*, *xrcc1*, *gst π* , GST, MDA, weight, and mortality) and the concentrations of the oil components (PAHs, VOCs and C₆-C₁₀) was explored using principal component analysis (PCA). PCA was computed using Euclidean distance matrices.

ANOVAs, post hoc tests and PCA figures were performed with R version 4.0.0 (packages ggplot2, tidyverse, FactoMineR and factoextra) (Wickham, 2016; 2019; Kassambara, 2020; R Core Team, 2020). Linear regressions and remaining figures were made with GraphPad (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.6 Results

4.6.1 Oils and chemical analysis

The total concentrations of VOCs, parent and alkylated PAHs, C₆-C₁₀, and C₁₀-C₅₀ were measured in the oils (Table S4.2) and in their WAF dilutions (Table 4.1). The concentrations of LMW components (VOCs and C₆-C₁₀) were higher in the dilbit than in the conventional oil, which contained more higher molecular weight components (PAHs and C₁₀-C₅₀). The concentration of the different components in the oils were reflected on the WAF dilutions; the concentration of the LMW components were higher in the dilbit WAF, compared to the conventional oil WAF. In addition, C₁₀-C₅₀ were measured in the WAFs dilution, but are not presented in Table 4.1, since the concentrations obtained were all under the detection limit (0.1 mg/L). The concentration of individual VOC and PAH are presented for each WAF (Figure S4.1 and S4.2). For both oils, the BTEX were the major components of the VOCs measured and the naphthalene and its alkylated forms were the PAHs in higher concentration. Finally, the concentrations of VOCs increased linearly with the WAF concentrations (Figure S4.3A), while the concentration of PAHs and C₆-C₁₀ increased in an exponential manner (Figure S4.3B and C).

Table 4.1. Mean concentration of the sum of 64 VOCs, the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs, and the total C₆-C₁₀ in each WAF dilution of the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).

WAF (%)	0		0.32		1		3.2		10		32	
Oil type	CTRL	LD	CW	LD	CW	LD	CW	LD	CW	LD	CW	
VOCs (µg/L)	11.43 ± 3.4	63.44 ± 48.3	83.04 ± 48.2	58.26 ± 8.87	67.78 ± 12.9	139.7 ± 29.2	186.6 ± 16.3	277.8 ± 68.9	354.0 ± 80.3	403.8 ± 223.5	504.3 ± 77.8	
PAHs (µg/L)	1.25 ± 0.25	2.41 ± 0.67	1.96 ± 0.60	2.24 ± 0.19	1.92 ± 0.08	5.02 ± 2.63	3.86 ± 1.33	10.71 ± 1.11	10.21 ± 4.36	30.42 ± 8.95	23.03 ± 1.93	
C ₆ -C ₁₀ (µg/L)	2.50 ± 0.00	23.2 ± 18.1	10.8 ± 8.8	9.7 ± 12.4	8.5 ± 5.4	73.2 ± 68.8	88.3 ± 54.9	453.3 ± 147.4	640.0 ± 145.3	1967 ± 473	3233 ± 551	

4.6.2 Mortality

For the first exposure, from fertilization to hatching, linear regression showed that embryo mortality was related to the WAF concentrations in exposure to both oils ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.89$ and $R^2 = 0.91$ for Lloydminster and Clearwater, respectively). As demonstrated by two-way ANOVA, mortality was affected by the oil type, the WAF concentrations and the interaction of both factors (Table S4.3). Pairwise comparisons demonstrated that both oils induced a significantly different mortality at 3.2 and 32 % WAF (Table S4.4). Then, starting at 3.2 % WAF, there was a significant increase in mortality induced by the dilbit, while the conventional oil induced an increase in mortality starting at 10 % WAF (Figure 4.2A and Table S4.5). For the second exposure, there was a significant increase in mortality following the WAF concentrations with the Lloydminster exposure, however no differences in mortality between oils, WAF concentrations and their interaction were found by two-way ANOVA (Table S4.3).

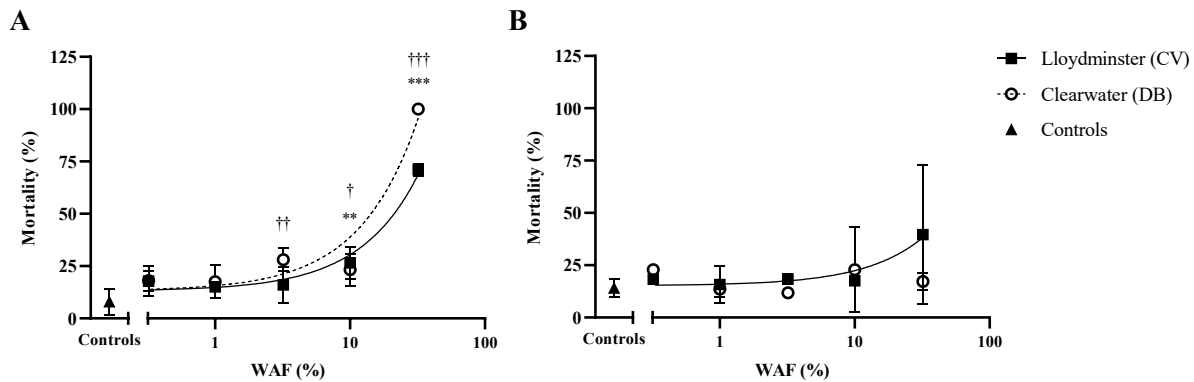


Figure 4.2. Percentage of mortality of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit. Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regressions showed a significant p-value (< 0.05). Significant differences between treatment and control group are shown by either an asterisk ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross ($\dagger p \leq 0.05$; $\dagger\dagger p \leq 0.001$; $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Data is presented as mean \pm standard deviation and regression lines are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

4.6.3 Detoxification pathway

Cyp1a expression (detoxification phase I) was measured in all treatments, except in embryos exposed from fertilization to 32 % dilbit WAF due to 100 % mortality (Figure 4.3). Linear regression demonstrated that *Cyp1a* expression was related to the WAF concentrations for both oils and both exposures (Exposure 1: $p = 0.014$ and $p < 0.0001$; Exposure 2: $p = 0.03$, and $p = 0.009$, for Lloydminster and Clearwater, respectively). For the first exposure, regression slopes for both oils were significantly different ($p = 0.0002$). The Clearwater dilbit induced a higher increase in *cyp1a* expression in relation to the WAF concentration compared to the Lloydminster conventional oil. Two-way ANOVA determined that oil type influenced *cyp1a* expression; however, no differences were observed when *cyp1a* induction was compared for both oils at the same WAF concentration with the pairwise comparison post hoc test (Table S4.6). In addition, WAF concentrations influenced *cyp1a* expression and for both oils (Table S4.3), every treatment induced a significantly higher expression than controls (Table S4.7). In the second exposure, slopes were equal and two-way ANOVA did not detect differences between the oils, but they did show an effect of the WAF concentration on *cyp1a* induction (Table S4.3). Further analyses showed that every treatment induced a significantly higher *cyp1a* expression than the control group for both oils and in both exposures (Table S4.8).

Gene expression and enzyme activity of glutathione-S-transferase (*gst*: detoxification phase II) were measured in all treatments, except when mortality was too high (32 % dilbit WAF, exposure 1) (Figure 4.4). Two-way ANOVA did reveal an effect of the WAF concentration, for the second exposure, however pairwise comparison did not determine any differences among treatments (Table S4.9). Also, no effect was revealed for the oil type or the interaction on *gst* expression for both exposures (Figure 4.4A and B, Table S4.3). In contrast, GST enzyme activity increased with the concentration of both oils in the two exposures. The increase in WAF concentration predicted an increase in GST in exposure 1 for both oils, according to the linear regressions ($p < 0.0001$ and $p = 0.02$ for Lloydminster and Clearwater, respectively). Linear regression slopes of both oils were not different, and two-way ANOVA determined that the WAF concentrations and the oil type influenced GST activity (Figure 4.4C and D, Table S4.3). Further analysis detected a difference induced by the oil type at 3.2 % WAF ($p = 0.001$) (Table S4.10). Then, in the Lloydminster exposure, 32 % WAF induced a significantly higher GST activity than controls and in the Clearwater exposure, 3.2 and 10 % WAF induced a higher activity than controls ($p = 0.007$ and $p = 0.05$, respectively) (Table S4.11). For exposure 2, GST activity was also related with the WAF concentrations for both oils, according to the linear regressions ($p = 0.0006$ and $p = 0.014$ for Lloydminster and Clearwater, respectively). Linear regression slopes were not different, but two-way ANOVA determined that the WAF concentrations and the oil type impacted the GST activity (Table S4.3). At 1 and 10 % the GST activity

was significantly different for the two oils (Table S4.12). Finally, in the Lloydminster exposure, 32 % WAF induced a higher activity than controls, while in the Clearwater exposure 1, 10 and 32 % WAF induced a higher GST activity than controls (Table S4.13).

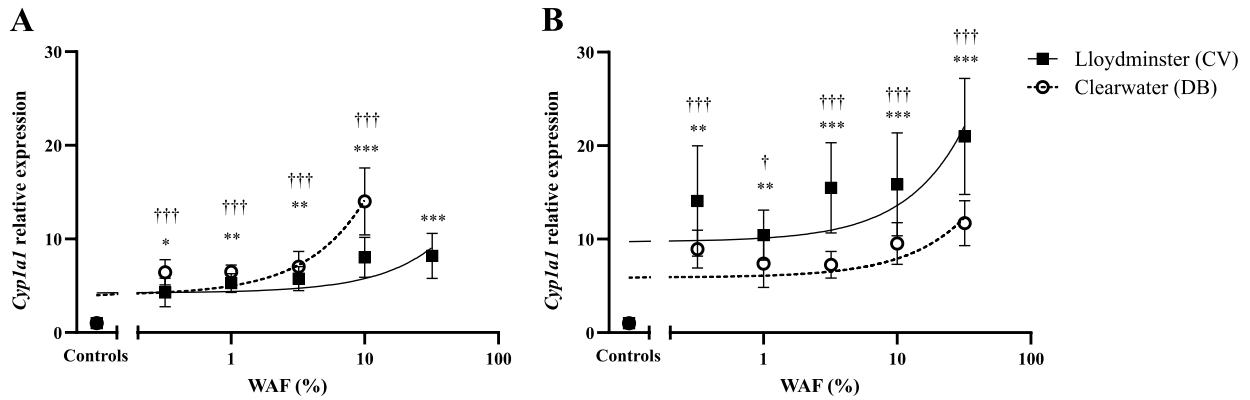


Figure 4.3. Relative *cyp1a* mRNA level of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit. Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regressions showed a significant p-value (< 0.05). Significant difference between treatment and control group are shown by either an asterisk ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross ($†p \leq 0.05$; $††p \leq 0.001$; $†††p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Data is presented as mean \pm standard deviation and regression lines are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

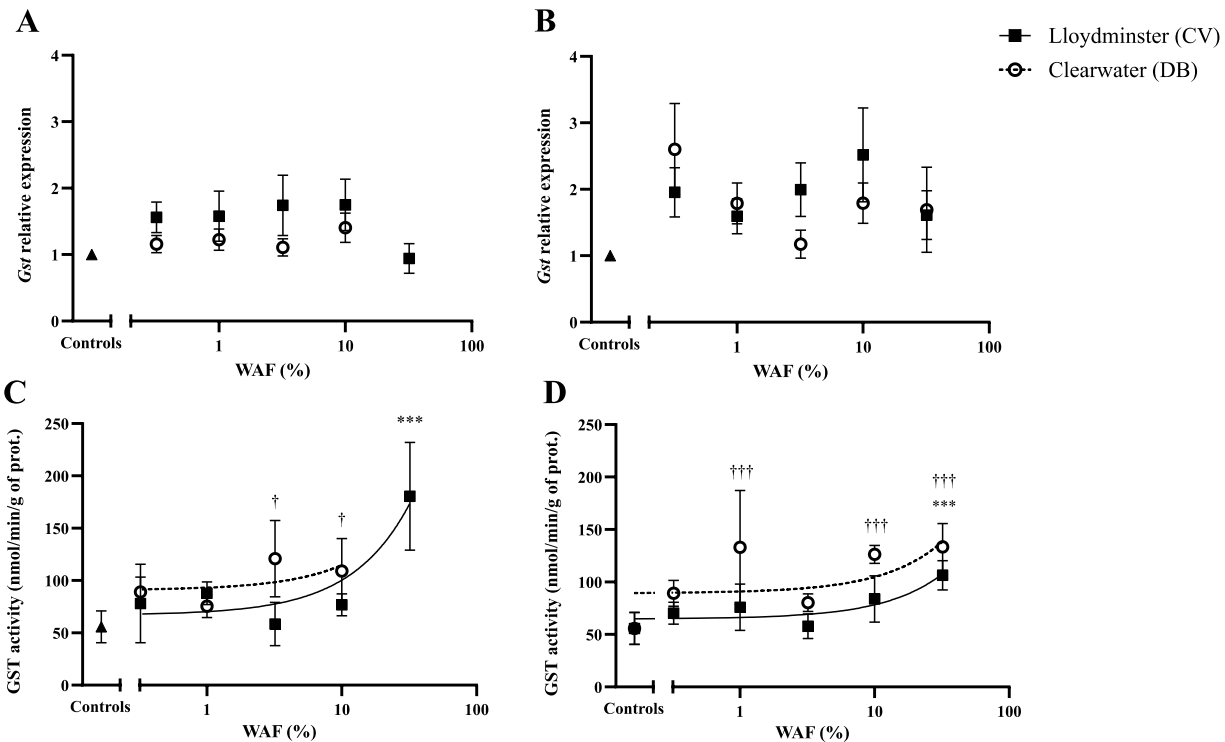


Figure 4.4. Relative *gsr* level and GST enzyme activity of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit. Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regressions showed a significant p-value (< 0.05). Significant difference between treatment and control group are shown by either an asterisk ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross ($\dagger p \leq 0.05$; $\dagger\dagger p \leq 0.001$; $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Data is presented as mean \pm standard deviation and regression lines are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

4.6.4 Oxidative damage

Lipid peroxidation (MDA) and DNA oxidative damage (8-OHdG) were measured in each treatment (Figure 4.5). Two-way ANOVA determined that the oil type and the WAF concentrations did not affect the concentration of both types of damage in embryos from Exposure 1, from fertilization. For the second exposure, linear regression determined that MDA concentration were not related to the WAF concentration, however two-way ANOVA determined that all parameters affected the MDA concentration (Table S4.3). At 32 % WAF of the Lloydminster oil, the concentration of MDA was higher than in controls and than for the 32 % WAF of the Clearwater dilbit (Table S4.14 and S4.15). No difference among treatments was observed for the Clearwater exposure in fish exposed from the eyed stage (Exposure 2). In the both exposures, there were no changes in the 8-OHdG concentration among treatments (Table S4.3).

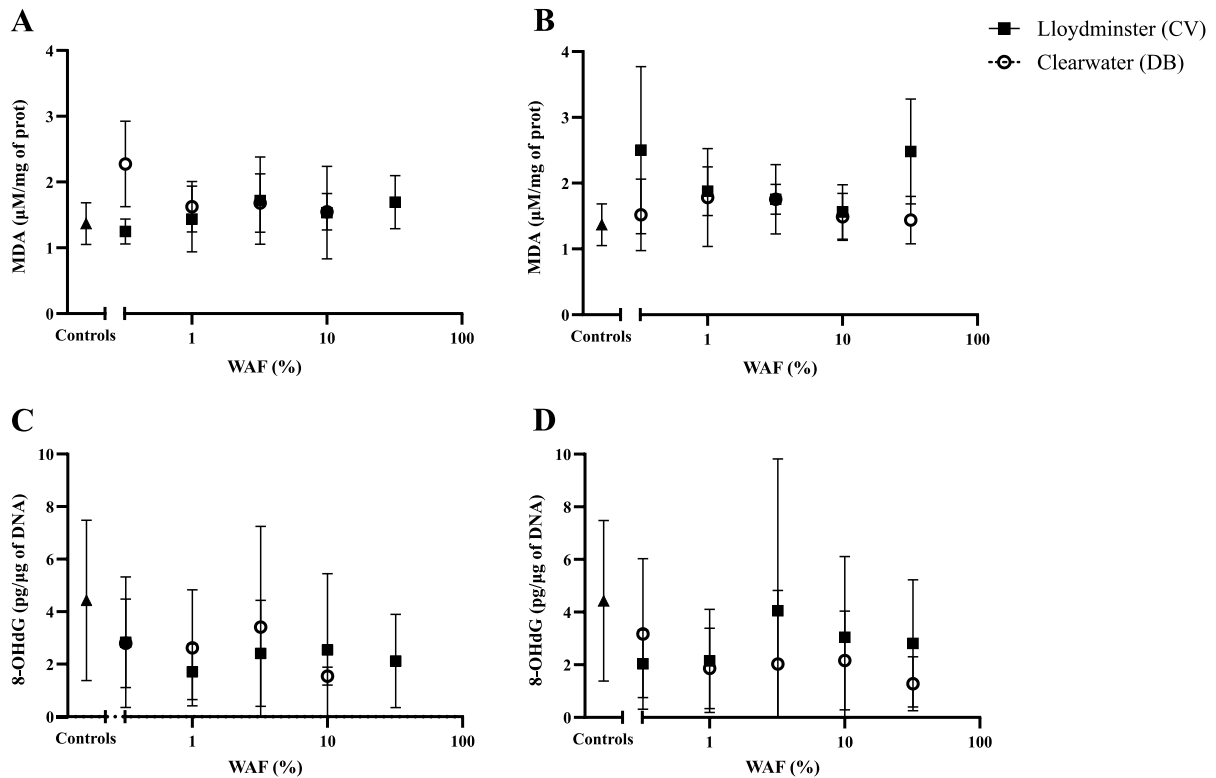


Figure 4.5. Oxidative damage measured by MDA concentration (A, B) and 8-OHdG (C, D) of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A, C) or from eyed stage (B, D) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit. Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regressions showed a significant p-value (< 0.05). Significant difference between treatment and control group are shown by either an asterisk ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.001$; $***p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross ($\dagger p \leq 0.05$; $\dagger\dagger p \leq 0.001$; $\dagger\dagger\dagger p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Data is presented as mean \pm standard deviation and regression lines are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

4.6.5 Gene expression of retinoids and DNA repair protein

Various genes involved in development and DNA repair were measured (Figure 4.6). First, we measured *aldh1a2* and *cyp26a1*, both involved in the retinol metabolism. For larvae exposed to the Clearwater dilbit from fertilization, the WAF concentrations predicted *aldh1a2* expression (linear regression, $p = 0.05$). In contrast, in the second exposure the Lloydminster oil WAF concentration predicted *aldh1a2* expression (linear regression, $p = 0.03$). According to the two-way ANOVA analysis, oil type, WAF concentration and their interaction did not have any effect on *aldh1a2* expression, and no statistical differences were observed among treatments of the first exposure (Table S4.3). For the second exposure, oil type but not WAF concentrations affected *aldh1a2* expression. At 32 % WAF, the Lloydminster oil induced a higher response than the Clearwater dilbit (Table S4.16). Then, in the first exposure, the *cyp26a1* expression was positively

related to the WAF concentration of both oils. For the second exposure, *cyp26a1* expression was negatively related to the WAF concentration in embryos exposed to the Lloydminster oil. Two-way ANOVA determined that the WAF concentration had a significant effect on *cyp26a1* expression during the first exposure (Table S4.3). In fact, 10 % WAF of the Clearwater dilbit induced a significantly higher response than 0.32 % WAF ($p = 0.014$) (Table S4.17). In the second exposure, the oil type and the interaction of the oil and the WAF concentrations impacted *cyp26a1* expression. Further analysis demonstrated that each oil induced a different response for 0.32 and 1 % WAF ($p = 0.008$ and $p = 0.0005$, respectively) (Table S4.3 and S4.18).

Subsequently, we measured *pcna* and *xrcc1*, two genes involved in the base excision repair (BER) repair pathway. After both exposures, linear regression did not determine a relationship between the oils and *pcna* expression. Two-way ANOVA noted an effect of the WAF concentration on *pcna* expression for both exposures (Table S4.3). For the first exposure, 0,32 % WAF of the Lloydminster oil induced a different *pcna* expression than in controls (Table S4.19). While in the second exposure, 1 % WAF of Clearwater dilbit induced a significantly different response than the controls and than 10 % WAF (Table S4.20). The expression of *xrcc1* was related to the WAF concentration after the exposure from fertilization to the Clearwater dilbit ($p = 0.0006$), while no relation was observed for the exposure to the Lloydminster conventional oil. However, for the first exposure, two-way ANOVA did not denote any effect of the parameters on the *xrcc1* expression. Then, for the second exposure, *xrcc1* expression was related to the WAF concentration of both oil ($p = 0.0001$ and $p = 0.0005$ for Lloydminster and Clearwater, respectively). Two-way ANOVA demonstrated that WAF concentrations, but not the oil type, influenced the *xrcc1* expression (Table S4.3). The expression of *xrcc1* at 32 % WAF of the Lloydminster oil was significantly higher than for 0.32 % WAF and controls (Table S4.21). Finally, with the Clearwater exposure, 1 % WAF induced a lower *xrcc1* expression than 10 and 32 % WAF (Table S4.21).

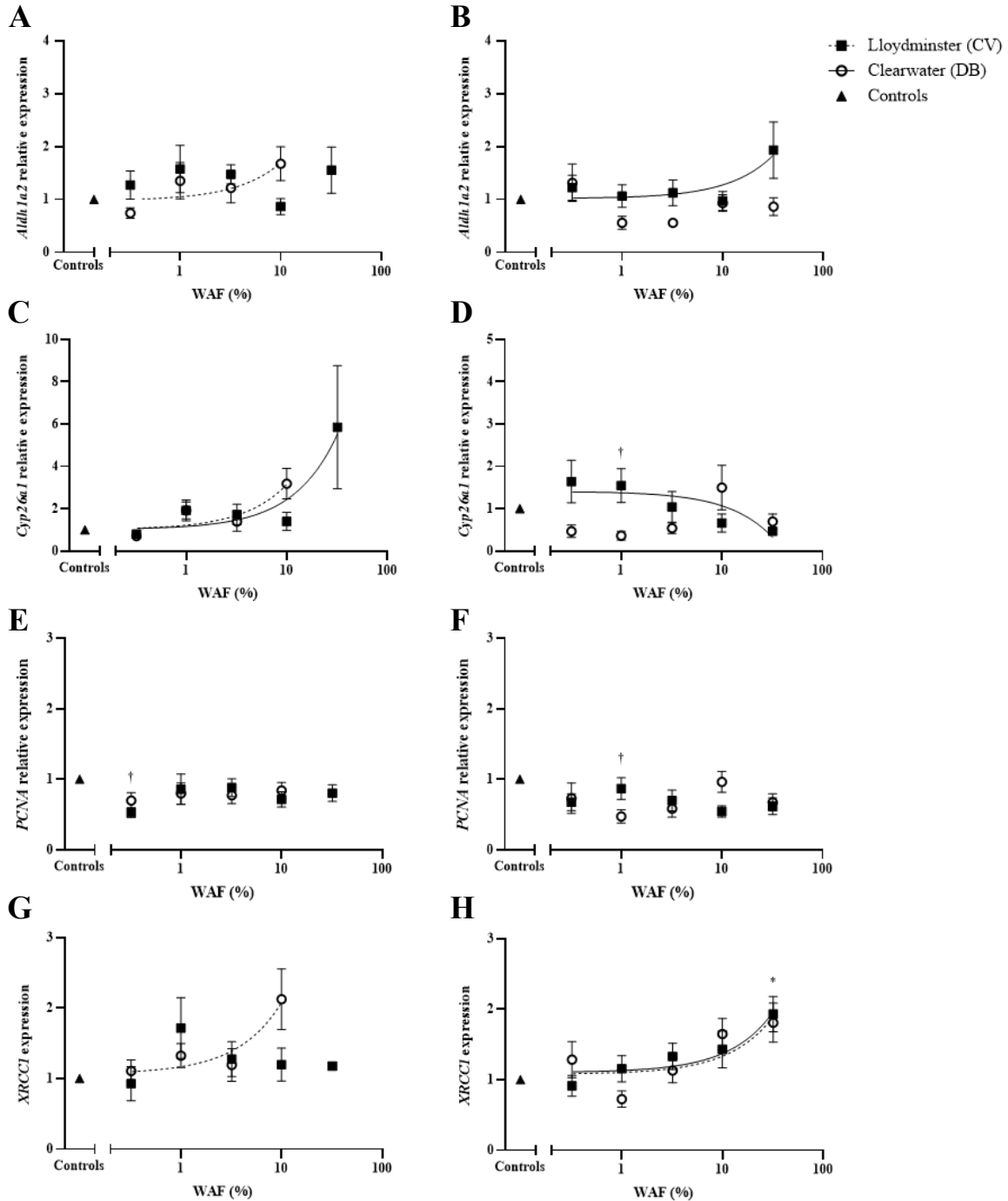


Figure 4.6. Relative gene expression (*aldh1a2*, *cyp26a1*, *PCNA*, and *xrcc1*) of Atlantic salmon embryos larvae after exposure from hatching (A) or from eyed stage (B) as a function of WAF % prepared with the Lloydminster conventional oil and the Clearwater McMurray dilbit. Regression lines (Lloydminster: solid line, and Clearwater: dashed line) are present when regressions showed a significant p-value (< 0.05). Significant difference between treatment and control group are shown by either an asterisk (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$) for the Lloydminster exposure or a cross († $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.001$; ††† $p \leq 0.0001$) for the Clearwater exposure. Data is presented as mean \pm standard deviation and regression lines are present when the regression is significant ($p \leq 0.05$).

4.6.6 Developmental delays

Developmental delays and malformations were induced by the exposures and increased with the WAF concentration for both oils. Figure 4.7 presents the percentage of hatched embryos possessing at least one of the following malformations: yolk sac or heart edemas, head, body or yolk sac hemorrhages, or jaw deformities/malfunctions. For both exposures, the proportions of malformed fish increased with the increasing WAF concentration of the dilbit and the conventional oil. Figure S4.6 illustrates the percentage of each malformation counted per treatment. Embryos exposed from fertilization showed a higher percentage of malformations than embryos exposed from the eyed stage: 10 % dilbit WAF and 32 % conventional oil WAF each induced 93 and 100 % malformed embryos, while for the second exposure, there were 83 and 33 % of malformed embryos exposed to 32 % WAF of the dilbit and the conventional oil, respectively. The most frequent malformation observed in exposed fish was yolk sac edema, while control fish were mostly affected with small head, eye, and body hemorrhages.

The hatching period of the embryos was observed by quantifying the number of embryos hatching each day and plotting the results on a density graph (Figure S4.4). Embryos exposed from fertilization to 3.2, 10 and 32 % WAF of the Lloydminster oil hatched at least 28 degree-days before embryos from the control group, which is about one week at 4 °C. Embryos exposed from fertilization also hatched earlier than controls, with around 14 degree-days difference. Generally, embryos from the control group hatched over a longer period than embryos from every exposed group. Differences in hatching period were less pronounced with embryos exposed to the Clearwater dilbit with an earlier hatching period of 14 degree-days for every treatment compared to controls in both exposures.

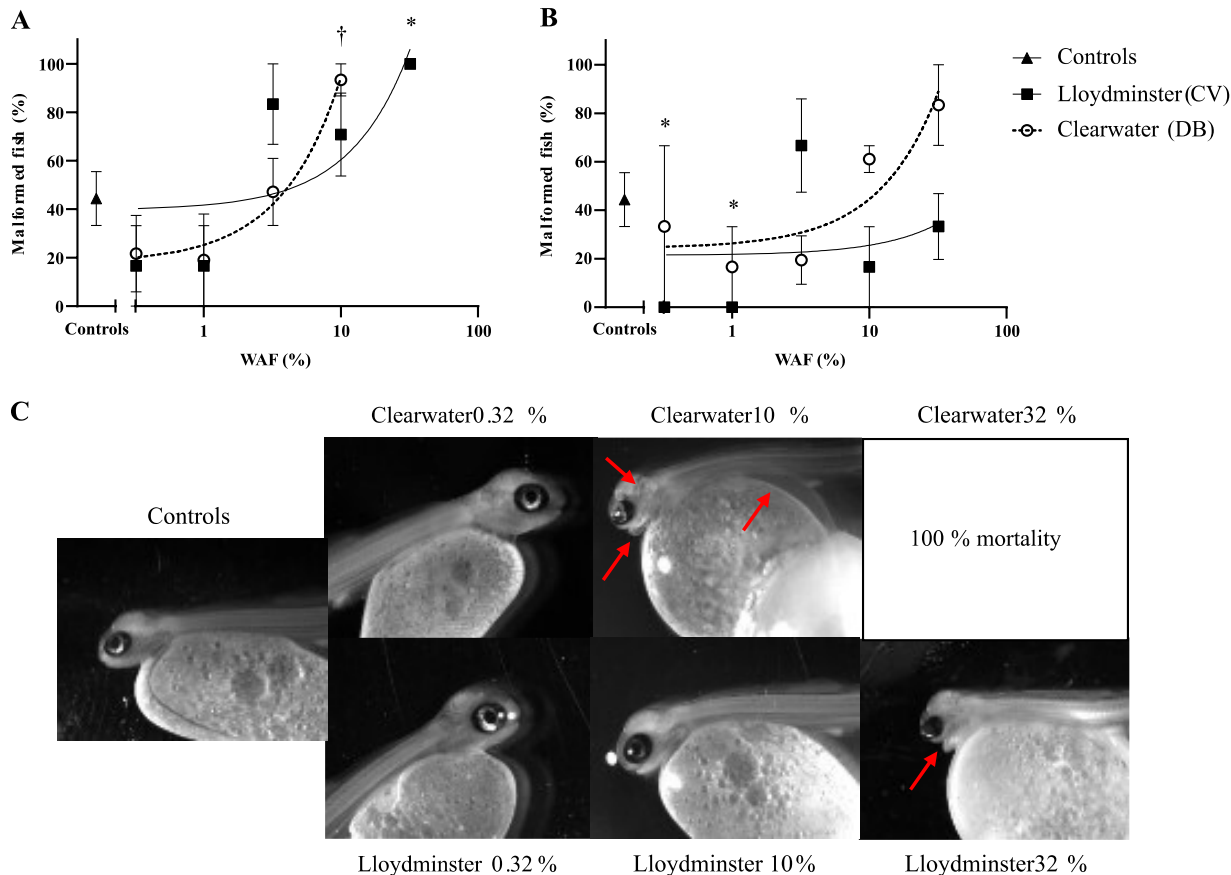


Figure 4.7. Percentage of embryos carrying malformations for embryos exposed to the Lloydminster conventional oil or to the Clearwater dilbit WAF, from fertilization (A) and from eyed stage (B). Pictures from embryos exposed from fertilization demonstrate the type of malformations observed in each treatment. Red arrows are pointing at various malformations (hemorrhages and edemas).

4.6.7 Principal components analysis (PCA)

The PCA biplot is presenting the data grouped by the WAF concentration of the exposure (Fig. S8A). However, the first two dimension explained only 43 % of the data variability, hence we used the scree plot to determine the percentage of explained variances of all dimensions (Fig. S8B). Dimensions 3 to 7 each explained between 11.2 and 6.2 % of the variances. A correlation plot was also produced to observe the percentage of contribution of each variable to the five first dimensions (Fig. S8C). The oil components (VOCs, PAHs, and C₆-C₁₀) are mainly contributing to the first dimension, with little contribution from the mortality, the GST activity, the expression of *cyp1a1* and *cyp26a1*. Then, the expression of *xrcc1*, *PCNA* and *aldh1a2* are mainly contributing to the second dimension. The third dimension is driven by the MDA concentration, the weight, the GST activity, and the expression of *cyp1a1* and *cyp26a1*. Finally, the expression of *gstπ* and the concentration of 8-OHdG contribute to the fourth dimension and *gstπ* is the most important contributors to the fifth dimension.

4.7 Discussion

We have previously demonstrated that dilbits can induce more mortality than a heavy conventional oil on fathead minnow larvae (Bérubé *et al.* 2021), and on rainbow trout embryos and larvae (Bérubé *et al.* 2022). In addition, rainbow trout presented the highest mortality rate when exposed from fertilization (Bérubé *et al.* 2022). The present study presents similar results: mortality was higher in Atlantic salmon embryos exposed from fertilization to the dilbit, compared to the conventional oil. No differences in mortality were observed in embryos exposed from the eyed stage. Because detoxification metabolism may be insufficient in early life stages (e.g., until the blastula stage), due to the lack of intrinsic mRNA synthesis (Cherr *et al.*, 2017; Langley *et al.*, 2014; Songe *et al.*, 2016), lipophilic PAHs and hydrocarbons may penetrate the yolk sac and disrupt the embryonic axis formation and/or accumulate (Hornung *et al.*, 2007). When the detoxification process is initiated and increases along with the growth of the embryo, the PAHs accumulated in the yolk sac are metabolized with the yolk sac lipid utilization (Brinkworth *et al.*, 2003). The rapid metabolization of PAHs in developing embryos may cause cellular damage, disrupt crucial developmental steps and lead to embryonic death (Cherr *et al.*, 2017; Dahlke *et al.*, 2020; Hamdoun & Epel, 2007; Jezierska *et al.*, 2009). In addition, the dilbit used in this study contained higher concentrations of LMW components than the conventional oils. These components (VOCs, BTEX and C₆-C₁₀) dissolve rapidly in the water and their smaller size facilitates their passage through the chorion, in comparison to heavy hydrocarbons (Pelka *et al.*, 2017). Past studies have confirmed the acute toxicity induced by the LMW components in oils, occurring rapidly after a spill (Adams *et al.*, 2014; Alsaadi *et al.*, 2018; Philibert *et al.*, 2016). The chemical analyses from this study have shown that the Clearwater McMurray dilbit contained more LMW components that led to a higher acute mortality, while the conventional oil contained more PAHs, which can lead to sublethal effects, such as heart defects induced by 3 to 5-ringed PAHs (Incardona *et al.*, 2015; Incardona *et al.*, 2005; Marty *et al.*, 1997).

The present study also supported the impact of a dilbit and a conventional oil exposure on the disruption of certain proteins in the detoxification pathway phase I and II, in the vitamin A metabolism and in a DNA repair pathway, the BER. *Cyp1a* was a precise biomarker of exposure and increased with the WAF concentration in each exposure. In our study, *gst* expression did not change in any of our treatment, but GST activity increased with the WAF concentration in both exposures and for both oils, suggesting there is post-transcriptional regulation. These results are similar to the ones of our previous study on the fathead minnow (Bérubé *et al.*, 2021). Studying the increase in GST activity brings interesting insights on the molecular responses of the embryos; however, the increase in activity does not necessarily lead to an oxidative stress imbalance. To investigate the effects of oil exposure on the oxidative stress equilibrium, we assessed the prevalence of cellular damage (e.g., lipid peroxidation and 8-OHdG). During the exposure

from fertilization there was no increase in MDA or in 8-OHdG in fish exposed to either oil, but exposure to the highest concentrations of the Lloydminster WAF cause increased lipid peroxidation in embryos exposed from the eyed stage only. This result also corresponds with *aldh1a2* gene expression, which seems to be related to the WAF concentration. The enzyme *aldh1a2* is part of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) family that can metabolize malondialdehyde (MDA), a byproduct of lipid peroxidation (Ayala *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2009). This suggests that during exposure from the eyed stage, when the embryos are larger and utilize more lipids from the yolk sac than at earlier stages, the faster metabolization of hydrocarbons leads to an increase in lipid peroxidation. In addition, *aldh1a2* is one of the main enzymes in the retinoid pathway to promote the bioactivation of vitamin A, from retinal to retinoic acid (Alexa *et al.*, 2009). Lie *et al.* (2019) observed a decrease in *aldh1a1* in haddock embryos exposed to crude oils, but no effect when exposed at hatching. Our results are consistent with their observation, since *aldh1a2* did not change significantly in our exposures. Furthermore, they observed a decrease in *cyp26a1* during the embryonic exposure and an increase during the larval exposure. In comparison, the exposures performed here were both during the embryonic stage, but they induced different *cyp26a1* responses: the exposure from fertilization induced a positive relation with *cyp26a1* expression and WAF concentration for both oils, while the exposure from eyed stage induced a negative relation in fish exposed to the conventional oil. The retinoid pathway (vitamin A), with CYP26a1 and ALDH1 enzymes, controls embryogenesis by regulating cellular proliferation and differentiation of various tissues (Fernández & Gisbert, 2011). The changes in gene expression observed in our results indicate a dysfunction of the retinoid pathway or a depletion of the bioactivated forms of vitamin A or its precursors (Berntssen *et al.*, 2016; Lie *et al.*, 2019). In both articles (Lie *et al.*, 2019 and the present), the exposures with the shorter duration induced a decrease in *cyp26a1*. Here we hypothesized that it could be due to a short term relocalization of resources, allowing time for damage repair mechanisms (Branzei & Foiani, 2008). Indeed, the decrease in *cyp26a1* was accompanied by an increase in *xrcc1* expression. After a long period of exposure, retinoid pools are depleted and there is a necessity to reactivate their metabolism, hence in our exposure from fertilization and in the embryonic exposure by Lie *et al.* (2019), an increase in *cyp26a1* was observed. In addition, previous studies observed a disruption of the retinoid pathway in yellow perch exposed to metals (Defo *et al.*, 2012) and in zebrafish exposed to benzo[α]pyrene, a well-studied PAH (Alsop *et al.*, 2007).

The formation of lipid peroxidation products (e.g., MDA or 4-hydroxynonenal) may lead to an increase in oxidative DNA damage, which is also caused by the production of ROS and PAH metabolites of the detoxication metabolism (Łuczaj & Skrzydlewska, 2003). Despite the increase in MDA in the 32% WAF treatment of the Lloydminster exposure, DNA damage was not observed in this treatment or in any other treatment. In contrast, *xrcc1* expression, coding for a protein involved in the BER repair pathway increased in three exposures out of four. This may suggest a global increase in DNA repair, which would occur faster

than damage formation (Zinflou & Rochette, 2017). In addition, we also measured *pcna*, coding for a protein facilitating the polymerase action during DNA repair process (Kelman, 1997). In our results, no change in *pcna* expression was observed; however, this protein is ubiquitous in cells and holds important functions in DNA synthesis and repair pathway (e.g., nucleotide excision repair, mismatch repair, single strand break repair, etc.) (Chatterjee & Walker, 2017; Karmakar *et al.*, 2001); it may have been already sufficient in cells. In addition, oil-induced oxidative DNA damage (8-OHdG) is known to be mostly repaired by the short patch BER (Braithwaite *et al.*, 1998), which does not require the use of the PCNA protein, while it is necessary in the long patch BER (Bohr & Dianov, 1999; Gary *et al.*, 1999).

The increase in detoxification metabolism and the perturbation in the retinoid and DNA repair pathways can lead to developmental delays and deformities in freshwater fish exposed to oil contamination. Indeed, high prevalence of malformations were observed in embryos exposed from fertilization to both oils. The malformations were related to the increase in oil components in the water; however, a high percentage of fish were afflicted with malformations in the control group. However, malformations observed in embryos exposed to oils could have more lethal effects than the malformations of the controls. For example, the controls had small head hemorrhages around the eyes, while exposed embryos had important edemas around the heart and yolk sac, some of them taking as much as 75 % of the yolk sac. An important number of exposed embryos had jaw dysfunctions (not moving or not properly closing), which can affect the feeding ability of older life stage (Incardona *et al.*, 2015). We also reported earlier hatching in exposed fish compared to control embryos, similar to the observations by Carls *et al.* (2010), who reported developmental delays and premature hatching in Pacific herring exposure to oils (Carls *et al.*, 1999). Prematurely hatching fish were smaller, leading to embryos that were generally more exposed to predation and less able to feed. Globally, oil-induced malformations and developmental delays affect individual fish but may lead to decreased embryo survival and further population diminution.

4.8 Conclusions

Overall, this study brought new insights into the effects of conventional and unconventional oil on developing Atlantic salmon embryos and demonstrated that embryos are more affected when exposed to oils from fertilization, compared to embryos exposed from eyed stage. Similar to our previous studies (Bérubé *et al.*, 2021 and Bérubé *et al.*, 2022), the present study showed that dilbits containing higher concentrations of LMW components also induced more mortality than conventional oils. Detoxification pathway phases I and II are interesting biomarkers of exposure and may also be indicators of malformations. In addition, we observed little oxidative damage in exposed embryos; however, both the vitamin A and DNA damage repair pathways seemed to be affected by exposure to both oils. The results demonstrated an

increase in the percentage of malformed fish exposed from eyed stage to both oils, and more affected fish were observed following the Clearwater dilbit exposure. Atlantic salmon is of particular significance in eastern Canadian culture and economy and is vulnerable or endangered in some regions. Therefore, this work is important to ensure the establishment of proper remediation plans according to the species and their developmental stages in environments where oil spills can occur.

4.9 Funding

This project was funded by the National Contaminant Advisory Group (NCAG) of Fisheries and Oceans Canada to PC and VSL and by the Canada Research Chair (CRC) program to VSL (#950-232235).

4.10 Acknowledgements

The authors would like to thank Lucie Baillon and Geraldine Patey at INRS for their support with protocol implementations, the *Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec* (CEAEQ-MELCC) for their analytical support, and Crude Quality Inc. (Alberta, Canada) for the oils.

4.11 Supplementary materials

Table S4.1. Genes of interest and specific primer parameters.

Gene	Gene Name	Gene accession number	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing temp. (°C)	Primer conc. (μM)	Mean primer efficiency (%)	Mean R ²	Amplicon Length (bp)	References
<i>β-actin</i>	Beta-actin	100136352	CTACCTGATGAAGATCCTGACG	ATCTCCTGCTCAAAGTCCAGC	58	0.3	95.1	0.990	120	Custom design
<i>aldh1a2</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A2	100196764	TTCTTCAATGCAGGCCAGTGC	TCCTACTGTCCTCCTTGG	62	0.2	104.4	0.987	114	Custom design
<i>cyp1a1</i>	Cytochrome p450 1A	100136916	ATTGTCGTATCGGTGGCC	TGAAGTCTGCAGGGTTGC	60	0.3	93.1	0.991	142	Custom design
<i>cyp261A</i>	Cytochrome p450 26 1a	106577307	TGACGGAATGGCTAGAGAAGG	TCAACCAGCTCCTGTTGTC	60	0.2	109.6	0.992	136	Custom design
<i>gstz</i>	Glutathione s-transferase	106611535	CGCTATGAGAATCATGATGGC	CTTTCAGATCTCCCTTCATCC	58	0.3	98.7	0.991	89	Custom design
<i>pcna</i>	Proliferating cell nuclear antigen	106580445	TCAGATTGGTGACGCCGTC	GTCCACATTGCTGGTCTGG	58	0.2	90.8	0.994	112	Custom design
<i>rpl8</i>	Ribosomal protein L8	393686	GGACAGAGGAAAGGTGCTGG	ATGTAACCATGACGCTCAGC	60	0.3	92.2	0.996	104	Custom design
<i>xrcc1</i>	X-Ray Repair Cross Complementing 1	106605164	AGCCTGTCCAAACCAGAAGC	AAGCCGCTCAGCACAAACACC	58	0.2	102.58	0.989	152	Custom design

Table S4.2. Concentration of the sum of 64 VOCs, the sum of 141 PAHs/alkylated PAHs, and the total C6-C10 in the Lloydminster conventional oil (LD) and the Clearwater dilbit (CW) (n = 3 to 5).

Components (g/kg)	Oil type	
	LD	CW
VOCs	12,65	16,07
PAHs	7633	6762
C ₆ -C ₁₀	480	510
C ₁₀ -C ₅₀	250	260

Table S4.3. Results of 2-way ANOVAs showing p value for oil type, WAF concentrations and their interaction.

	Error df	Oil type df = 1	WAF concentrations df = 5	Oil x WAF df = 4 or 5
Mortality				
Exposure 1	31	0.008*	<0.0001***	0.001**
Exposure 2	24	0.32	0.18	0.53
<i>Cyp1a</i> relative expression				
Exposure 1	93	0.03*	<0.0001***	0.61
Exposure 2	92	0.06	<0.0001***	0.79
<i>Gst</i> relative expression				
Exposure 1	92	0.18	0.08	0.96
Exposure 2	96	0.50	0.043*	0.65
GST enzyme activity				
Exposure 1	38	0.030*	<0.0001***	0.05
Exposure 2	39	<0.0001***	<0.0001***	0.25
MDA				
Exposure 1	37	0.16	0.46	0.10
Exposure 2	42	<0.001**	0.02*	0.01*
8-OHdG				
Exposure 1	32	0.77	0.60	0.99
Exposure 2	31	0.51	0.19	0.94
<i>Aldh1a2</i> gene expression				
Exposure 1	91	0.86	0.74	0.08
Exposure 2	91	0.009*	0.16	0.16
<i>Cyp26a1</i> gene expression				
Exposure 1	90	0.56	0.01*	0.19
Exposure 2	90	0.032*	0.16	0.002*
<i>PCNA</i> gene expression				
Exposure 1	91	0.64	0.02*	0.71
Exposure 2	96	0.58	0.004*	0.04*
<i>XRCCI</i> gene expression				
Exposure 1	93	0.23	0.06	0.21
Exposure 2	96	0.65	<0.0001***	0.29
Malformations				
Exposure 1	20	0.85	0.0006*	0.42
Exposure 2	22	0.16	0.08	0.06

*p ≤ 0.05; **p ≤ 0.001; ***p ≤ 0.0001

Table S4.4. Results of the pairwise comparison, comparing the mortality induced by the Llodminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	5.51E-15	1	1	ns
2	0.32	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	0.066265	0.947592	0.947592	ns
3	1	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	0.516662	0.609059	0.609059	ns
4	3.2	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	2.499718	0.017932	0.017932	*
5	10	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	-0.68031	0.501359	0.501359	ns
6	32	Mortality	Clearwater	Lloydminster	31	5.255493	1.03E-05	1.03E-05	****

Table S4.5. Results of the pairwise comparison, comparing the mortality induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	Mortality	0	0.32	31	-2.25227	0.03153	0.472955	ns
2	Clearwater	Mortality	0	1	31	-2.13648	0.040641	0.609622	ns
3	Clearwater	Mortality	0	3.2	31	-4.13888	0.000248	0.003719	**
4	Clearwater	Mortality	0	10	31	-3.39108	0.001916	0.02874	*
5	Clearwater	Mortality	0	32	31	-20.4572	1.47E-19	2.20E-18	***
6	Clearwater	Mortality	0.32	1	31	0.11579	0.908566	1	ns
7	Clearwater	Mortality	0.32	3.2	31	-2.05368	0.048524	0.727858	ns
8	Clearwater	Mortality	0.32	10	31	-1.13881	0.263506	1	ns
9	Clearwater	Mortality	0.32	32	31	-18.205	4.16E-18	6.24E-17	***
10	Clearwater	Mortality	1	3.2	31	-2.16088	0.038547	0.5782	ns
11	Clearwater	Mortality	1	10	31	-1.2546	0.219001	1	ns
12	Clearwater	Mortality	1	32	31	-18.3208	3.47E-18	5.21E-17	***
13	Clearwater	Mortality	3.2	10	31	0.999347	0.325364	1	ns
14	Clearwater	Mortality	3.2	32	31	-14.8008	1.34E-15	2.00E-14	***
15	Clearwater	Mortality	10	32	31	-17.0662	2.58E-17	3.88E-16	***
16	Lloydminster	Mortality	0	0.32	31	-2.18601	0.036491	0.547358	ns
17	Lloydminster	Mortality	0	1	31	-1.46134	0.153986	1	ns
18	Lloydminster	Mortality	0	3.2	31	-1.7705	0.086479	1	ns
19	Lloydminster	Mortality	0	10	31	-3.81984	0.000601	0.009017	*
20	Lloydminster	Mortality	0	32	31	-11.4478	1.15E-12	1.73E-11	***
21	Lloydminster	Mortality	0.32	1	31	0.562513	0.577812	1	ns
22	Lloydminster	Mortality	0.32	3.2	31	0.415509	0.680631	1	ns
23	Lloydminster	Mortality	0.32	10	31	-1.79599	0.082249	1	ns
24	Lloydminster	Mortality	0.32	32	31	-9.66291	7.22E-11	1.08E-09	***
25	Lloydminster	Mortality	1	3.2	31	-0.17783	0.860017	1	ns
26	Lloydminster	Mortality	1	10	31	-2.20618	0.034911	0.523671	ns
27	Lloydminster	Mortality	1	32	31	-9.63767	7.68E-11	1.15E-09	***
28	Lloydminster	Mortality	3.2	10	31	-2.18068	0.036918	0.553774	ns
29	Lloydminster	Mortality	3.2	32	31	-10.0022	3.19E-11	4.78E-10	***
30	Lloydminster	Mortality	10	32	31	-7.66441	1.21E-08	1.81E-07	***

Table S4.6. Results of the pairwise comparison, comparing the *cyplal* expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	92	-1.73E-15	1	1	ns
2	0.32	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	92	1.957175	0.053358	0.053358	ns
3	1	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	92	0.875171	0.38376	0.38376	ns
4	3.2	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	92	0.477016	0.634482	0.634482	ns
5	10	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	92	1.645757	0.103226	0.103226	ns
6	32	<i>cyplal</i>	Clearwater	Lloydminster	NA	NA	NA	NA	?

Table S4.7. Results of the pairwise comparison, comparing the *cyplal* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	0.32	92	-5.04174	2.30E-06	3.45E-05	****
2	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	1	92	-5.35537	6.25E-07	9.38E-06	****
3	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	3.2	92	-4.81707	5.71E-06	8.57E-05	****
4	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	10	92	-6.72968	1.42E-09	2.14E-08	****
5	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	32	NA	NA	NA	NA	?
6	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	1	92	-0.30568	0.760535	1	ns
7	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	3.2	92	0.218985	0.827147	1	ns
8	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	10	92	-1.6452	0.103342	1	ns
9	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	32	NA	NA	NA	NA	?
10	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	3.2	92	0.52467	0.601075	1	ns
11	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	10	92	-1.33951	0.183703	1	ns
12	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	32	NA	NA	NA	NA	?
13	Clearwater	<i>cyplal</i>	3.2	10	92	-1.86418	0.065485	0.982272	ns
14	Clearwater	<i>cyplal</i>	3.2	32	NA	NA	NA	NA	?
15	Clearwater	<i>cyplal</i>	10	32	NA	NA	NA	NA	?
16	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	0.32	92	-3.03373	0.00314	0.047093	*
17	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	1	92	-4.60297	1.33E-05	0.0002	***
18	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	3.2	92	-4.32766	3.83E-05	0.000574	***
19	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	10	92	-5.22324	1.09E-06	1.63E-05	****
20	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	32	92	-5.45493	4.10E-07	6.16E-06	****
21	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	1	92	-1.44647	0.151443	1	ns
22	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	3.2	92	-1.26117	0.210435	1	ns
23	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	10	92	-2.0502	0.04319	0.647857	ns
24	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	32	92	-2.35989	0.020394	0.305903	ns
25	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	3.2	92	0.152537	0.879097	1	ns
26	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	10	92	-0.62027	0.536614	1	ns
27	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	32	92	-0.97473	0.332252	1	ns
28	Lloydminster	<i>cyplal</i>	3.2	10	92	-0.75626	0.451424	1	ns
29	Lloydminster	<i>cyplal</i>	3.2	32	92	-1.09872	0.274757	1	ns
30	Lloydminster	<i>cyplal</i>	10	32	92	-0.371	0.71149	1	ns

Table S4.8. Results of the pairwise comparison, comparing the *cyplal* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	0.32	97	-3.97935	0.000133	0.002	**
2	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	1	97	-3.10508	0.002494	0.037409	*
3	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	3.2	97	-3.55131	0.000593	0.008902	**
4	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	10	97	-4.32066	3.76E-05	0.000565	***
5	Clearwater	<i>cyplal</i>	0	32	97	-4.95278	3.09E-06	4.64E-05	****
6	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	1	97	1.161532	0.248276	1	ns
7	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	3.2	97	0.653492	0.514985	1	ns
8	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	10	97	-0.04795	0.961858	1	ns
9	Clearwater	<i>cyplal</i>	0.32	32	97	-0.62427	0.533916	1	ns
10	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	3.2	97	-0.52905	0.597982	1	ns
11	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	10	97	-1.2984	0.19723	1	ns
12	Clearwater	<i>cyplal</i>	1	32	97	-1.93052	0.056463	0.84695	ns
13	Clearwater	<i>cyplal</i>	3.2	10	97	-0.74987	0.455149	1	ns
14	Clearwater	<i>cyplal</i>	3.2	32	97	-1.36598	0.175103	1	ns
15	Clearwater	<i>cyplal</i>	10	32	97	-0.61612	0.539261	1	ns
16	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	0.32	97	-4.21503	5.61E-05	0.000841	***
17	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	1	97	-4.36931	3.13E-05	0.000469	***
18	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	3.2	97	-5.16315	1.29E-06	1.94E-05	****
19	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	10	97	-4.95091	3.12E-06	4.67E-05	****
20	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0	32	97	-6.03618	2.89E-08	4.34E-07	****
21	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	1	97	-0.03774	0.969969	1	ns
22	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	3.2	97	-1.05457	0.294244	1	ns
23	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	10	97	-0.71725	0.474946	1	ns
24	Lloydminster	<i>cyplal</i>	0.32	32	97	-1.77504	0.079028	1	ns
25	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	3.2	97	-1.04373	0.299205	1	ns
26	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	10	97	-0.69813	0.486763	1	ns
27	Lloydminster	<i>cyplal</i>	1	32	97	-1.78341	0.077647	1	ns
28	Lloydminster	<i>cyplal</i>	3.2	10	97	0.358734	0.720574	1	ns
29	Lloydminster	<i>cyplal</i>	3.2	32	97	-0.66748	0.506052	1	ns
30	Lloydminster	<i>cyplal</i>	10	32	97	-1.0578	0.292776	1	ns

Table S4.9. Results of the pairwise comparison, comparing the *gst* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>gst</i>	0	0.32	96	-2.4693	0.015304	0.229564	ns
2	Clearwater	<i>gst</i>	0	1	96	-1.55368	0.123551	1	ns
3	Clearwater	<i>gst</i>	0	3.2	96	-0.2488	0.804045	1	ns
4	Clearwater	<i>gst</i>	0	10	96	-1.57042	0.119607	1	ns
5	Clearwater	<i>gst</i>	0	32	96	-0.78554	0.434073	1	ns
6	Clearwater	<i>gst</i>	0.32	1	96	0.941374	0.348876	1	ns
7	Clearwater	<i>gst</i>	0.32	3.2	96	2.17524	0.032068	0.481019	ns
8	Clearwater	<i>gst</i>	0.32	10	96	0.988697	0.325297	1	ns
9	Clearwater	<i>gst</i>	0.32	32	96	1.667716	0.098631	1	ns
10	Clearwater	<i>gst</i>	1	3.2	96	1.27184	0.206502	1	ns
11	Clearwater	<i>gst</i>	1	10	96	0.025147	0.97999	1	ns
12	Clearwater	<i>gst</i>	1	32	96	0.748696	0.455871	1	ns
13	Clearwater	<i>gst</i>	3.2	10	96	-1.27973	0.203723	1	ns
14	Clearwater	<i>gst</i>	3.2	32	96	-0.52314	0.60208	1	ns
15	Clearwater	<i>gst</i>	10	32	96	0.742999	0.459297	1	ns
16	Lloydminster	<i>gst</i>	0	0.32	96	-1.75463	0.082514	1	ns
17	Lloydminster	<i>gst</i>	0	1	96	-1.20914	0.229577	1	ns
18	Lloydminster	<i>gst</i>	0	3.2	96	-1.78809	0.076917	1	ns
19	Lloydminster	<i>gst</i>	0	10	96	-2.37178	0.019698	0.295475	ns
20	Lloydminster	<i>gst</i>	0	32	96	-1.05722	0.293064	1	ns
21	Lloydminster	<i>gst</i>	0.32	1	96	0.614637	0.540249	1	ns
22	Lloydminster	<i>gst</i>	0.32	3.2	96	0.022067	0.98244	1	ns
23	Lloydminster	<i>gst</i>	0.32	10	96	-0.65024	0.517088	1	ns
24	Lloydminster	<i>gst</i>	0.32	32	96	0.71316	0.477477	1	ns
25	Lloydminster	<i>gst</i>	1	3.2	96	-0.6112	0.542514	1	ns
26	Lloydminster	<i>gst</i>	1	10	96	-1.2745	0.205562	1	ns
27	Lloydminster	<i>gst</i>	1	32	96	0.119673	0.904992	1	ns
28	Lloydminster	<i>gst</i>	3.2	10	96	-0.68906	0.492445	1	ns
29	Lloydminster	<i>gst</i>	3.2	32	96	0.712363	0.477968	1	ns
30	Lloydminster	<i>gst</i>	10	32	96	1.355419	0.178464	1	ns

Table S4.10. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 1 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	GST	Clearwater	Lloydminster	38	2.19E-16	1	1	ns
2	0.32	GST	Clearwater	Lloydminster	38	0.639311	0.526456	0.526456	ns
3	1	GST	Clearwater	Lloydminster	38	-0.64343	0.523807	0.523807	ns
4	3.2	GST	Clearwater	Lloydminster	38	3.454058	0.001372	0.001372	**
5	10	GST	Clearwater	Lloydminster	38	1.632268	0.110884	0.110884	ns
6	32	GST	Clearwater	Lloydminster	NA	NA	NA	NA	?

Table S4.11. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	GST	0	0.32	38	-1.95022	0.058555	0.88	ns
2	Clearwater	GST	0	1	38	-1.09192	0.281745	1.00	ns
3	Clearwater	GST	0	3.2	38	-3.82189	0.000477	0.01	**
4	Clearwater	GST	0	10	38	-3.1241	0.003407	0.05	*
5	Clearwater	GST	0	32	NA	NA	NA	NA	?
6	Clearwater	GST	0.32	1	38	0.746772	0.459797	1	ns
7	Clearwater	GST	0.32	3.2	38	-1.87167	0.068965	1	ns
8	Clearwater	GST	0.32	10	38	-1.17387	0.24775	1	ns
9	Clearwater	GST	0.32	32	NA	NA	NA	NA	?
10	Clearwater	GST	1	3.2	38	-2.5114	0.016395	0.25	ns
11	Clearwater	GST	1	10	38	-1.85351	0.071585	1	ns
12	Clearwater	GST	1	32	NA	NA	NA	NA	?
13	Clearwater	GST	3.2	10	38	0.697796	0.489553	1	ns
14	Clearwater	GST	3.2	32	NA	NA	NA	NA	?
15	Clearwater	GST	10	32	NA	NA	NA	NA	?
16	Lloydminster	GST	0	0.32	38	-1.31091	0.197755	1	ns
17	Lloydminster	GST	0	1	38	-1.77015	0.084725	1	ns
18	Lloydminster	GST	0	3.2	38	-0.14926	0.882141	1	ns
19	Lloydminster	GST	0	10	38	-1.07328	0.289914	1	ns
20	Lloydminster	GST	0	32	38	-6.9003	3.36E-08	5.03E-07	****
21	Lloydminster	GST	0.32	1	38	-0.53421	0.596305	1	ns
22	Lloydminster	GST	0.32	3.2	38	1.086683	0.284022	1	ns
23	Lloydminster	GST	0.32	10	38	0.062004	0.950885	1	ns
24	Lloydminster	GST	0.32	32	38	-5.66436	1.64E-06	2.47E-05	****
25	Lloydminster	GST	1	3.2	38	1.537719	0.132403	1	ns
26	Lloydminster	GST	1	10	38	0.528493	0.60023	1	ns
27	Lloydminster	GST	1	32	38	-4.86688	2.01E-05	0.000302	***
28	Lloydminster	GST	3.2	10	38	-0.89516	0.376338	1	ns
29	Lloydminster	GST	3.2	32	38	-6.4046	1.59E-07	2.38E-06	****
30	Lloydminster	GST	10	32	38	-5.03435	1.19E-05	0.000179	***

Table S4.12. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	GST	Clearwater	Lloydminster	39	1.13E-14	1	1	ns
2	0.32	GST	Clearwater	Lloydminster	39	1.372045	0.177891	0.177891	ns
3	1	GST	Clearwater	Lloydminster	39	3.311639	0.002006	0.002006	**
4	3.2	GST	Clearwater	Lloydminster	39	1.991762	0.053433	0.053433	ns
5	10	GST	Clearwater	Lloydminster	39	2.545651	0.014973	0.014973	*
6	32	GST	Clearwater	Lloydminster	39	1.257649	0.215997	0.215997	ns

Table S4.13. Results of the pairwise comparison, comparing the GST activity induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	GST	0	0.32	39	-2.83	0.007319	0.109787	ns
2	Clearwater	GST	0	1	39	-5.18454	6.99E-06	0.000105	***
3	Clearwater	GST	0	3.2	39	-2.43388	0.01962	0.294297	ns
4	Clearwater	GST	0	10	39	-5.26606	5.39E-06	8.09E-05	****
5	Clearwater	GST	0	32	39	-5.87665	7.68E-07	1.15E-05	****
6	Clearwater	GST	0.32	1	39	-1.84763	0.072251	1	ns
7	Clearwater	GST	0.32	3.2	39	0.568298	0.573091	1	ns
8	Clearwater	GST	0.32	10	39	-1.91924	0.062293	0.934397	ns
9	Clearwater	GST	0.32	32	39	-2.25932	0.029528	0.442916	ns
10	Clearwater	GST	1	3.2	39	2.609503	0.012794	0.191907	ns
11	Clearwater	GST	1	10	39	-0.07734	0.938748	1	ns
12	Clearwater	GST	1	32	39	-0.35602	0.723745	1	ns
13	Clearwater	GST	3.2	10	39	-2.68684	0.010546	0.158188	ns
14	Clearwater	GST	3.2	32	39	-3.10668	0.003521	0.05281	ns
15	Clearwater	GST	10	32	39	-0.2745	0.785153	1	ns
16	Lloydminster	GST	0	0.32	39	-1.68351	0.100267	1	ns
17	Lloydminster	GST	0	1	39	-1.98651	0.054035	0.810532	ns
18	Lloydminster	GST	0	3.2	39	-0.33438	0.739884	1	ns
19	Lloydminster	GST	0	10	39	-2.58271	0.01367	0.20505	ns
20	Lloydminster	GST	0	32	39	-3.83168	0.000451	0.006771	**
21	Lloydminster	GST	0.32	1	39	-0.303	0.763497	1	ns
22	Lloydminster	GST	0.32	3.2	39	1.252845	0.217722	1	ns
23	Lloydminster	GST	0.32	10	39	-0.99549	0.325636	1	ns
24	Lloydminster	GST	0.32	32	39	-2.37372	0.022631	0.339459	ns
25	Lloydminster	GST	1	3.2	39	1.53852	0.131996	1	ns
26	Lloydminster	GST	1	10	39	-0.70981	0.482044	1	ns
27	Lloydminster	GST	1	32	39	-2.11131	0.041207	0.6181	ns
28	Lloydminster	GST	3.2	10	39	-2.13295	0.039278	0.589164	ns
29	Lloydminster	GST	3.2	32	39	-3.3701	0.001704	0.025563	*
30	Lloydminster	GST	10	32	39	-1.39536	0.170801	1	ns

Table S4.14. Results of the pairwise comparison, comparing the MDA concentration induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-4.92E-15	1	1	ns
2	0.32	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-1.8049	0.078263	0.078263	ns
3	1	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-1.52753	0.134125	0.134125	ns
4	3.2	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-0.24746	0.805756	0.805756	ns
5	10	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-0.28504	0.777017	0.777017	ns
6	32	MDA	Clearwater	Lloydminster	42	-4.92235	1.37E-05	1.37E-05	****

Table S4.15. Results of the pairwise comparison, comparing the MDA concentration induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	MDA	0	0.32	42	-0.58015	0.564914	1	ns
2	Clearwater	MDA	0	1	42	-0.3493	0.728611	1	ns
3	Clearwater	MDA	0	3.2	42	-1.07639	0.287896	1	ns
4	Clearwater	MDA	0	10	42	-0.46124	0.647004	1	ns
5	Clearwater	MDA	0	32	42	-0.27984	0.780971	1	ns
6	Clearwater	MDA	0.32	1	42	0.197672	0.844256	1	ns
7	Clearwater	MDA	0.32	3.2	42	-0.52942	0.599299	1	ns
8	Clearwater	MDA	0.32	10	42	0.118905	0.905917	1	ns
9	Clearwater	MDA	0.32	32	42	0.300305	0.765426	1	ns
10	Clearwater	MDA	1	3.2	42	-0.68978	0.494124	1	ns
11	Clearwater	MDA	1	10	42	-0.08557	0.932217	1	ns
12	Clearwater	MDA	1	32	42	0.085458	0.932303	1	ns
13	Clearwater	MDA	3.2	10	42	0.641529	0.524665	1	ns
14	Clearwater	MDA	3.2	32	42	0.812554	0.421056	1	ns
15	Clearwater	MDA	10	32	42	0.1814	0.856926	1	ns
16	Lloydminster	MDA	0	0.32	42	-2.35187	0.023443	0.351651	ns
17	Lloydminster	MDA	0	1	42	-1.99068	0.053049	0.795736	ns
18	Lloydminster	MDA	0	3.2	42	-1.24753	0.219113	1	ns
19	Lloydminster	MDA	0	10	42	-0.74628	0.459655	1	ns
20	Lloydminster	MDA	0	32	42	-5.18619	5.80E-06	8.71E-05	****
21	Lloydminster	MDA	0.32	1	42	0.475041	0.637219	1	ns
22	Lloydminster	MDA	0.32	3.2	42	0.872804	0.387733	1	ns
23	Lloydminster	MDA	0.32	10	42	1.648273	0.106758	1	ns
24	Lloydminster	MDA	0.32	32	42	-2.68887	0.010237	0.153559	ns
25	Lloydminster	MDA	1	3.2	42	0.476447	0.636226	1	ns
26	Lloydminster	MDA	1	10	42	1.2444	0.220252	1	ns
27	Lloydminster	MDA	1	32	42	-3.30936	0.001926	0.028886	*
28	Lloydminster	MDA	3.2	10	42	0.601236	0.550915	1	ns
29	Lloydminster	MDA	3.2	32	42	-3.36221	0.001658	0.024864	*
30	Lloydminster	MDA	10	32	42	-4.48259	5.60E-05	0.00084	***

Table S4.16. Results of the pairwise comparison, comparing the *aldh1a2* expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	1.68E-15	1	1	ns
2	0.32	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	0.045054	0.964163	0.964163	ns
3	1	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	-1.80544	0.074313	0.074313	ns
4	3.2	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	-1.89395	0.061409	0.061409	ns
5	10	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	-0.06025	0.952088	0.952088	ns
6	32	<i>aldh1a2</i>	Clearwater	Lloydminster	91	-2.90088	0.004666	0.004666	**

Table S4.17. Results of the pairwise comparison, comparing the *cyp26a1* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0	0.32	90	1.401533	0.164494	1	ns
2	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0	1	90	-1.14913	0.253547	1	ns
3	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0	3.2	90	0.434754	0.664782	1	ns
4	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0	10	90	-2.08184	0.040197	0.602949	ns
5	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0	32	NA	NA	NA	NA	?
6	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0.32	1	90	-2.44703	0.016347	0.245198	ns
7	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0.32	3.2	90	-0.9423	0.348562	1	ns
8	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0.32	10	90	-3.42785	0.000919	0.01379	*
9	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	0.32	32	NA	NA	NA	NA	?
10	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	1	3.2	90	1.532861	0.128818	1	ns
11	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	1	10	90	-0.81364	0.417996	1	ns
12	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	1	32	NA	NA	NA	NA	?
13	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	3.2	10	90	-2.46107	0.01576	0.236401	ns
14	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	3.2	32	NA	NA	NA	NA	?
15	Clearwater	<i>cyp26a1</i>	10	32	NA	NA	NA	NA	?
16	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0	0.32	90	0.902874	0.369003	1	ns
17	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0	1	90	-0.81038	0.419857	1	ns
18	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0	3.2	90	-0.64758	0.518904	1	ns
19	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0	10	90	0.184235	0.854243	1	ns
20	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0	32	90	-1.72323	0.088282	1	ns
21	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0.32	1	90	-1.66691	0.099008	1	ns
22	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0.32	3.2	90	-1.47089	0.144808	1	ns
23	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0.32	10	90	-0.72918	0.467788	1	ns
24	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	0.32	32	90	-2.51082	0.01383	0.207457	ns
25	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	1	3.2	90	0.116456	0.90755	1	ns
26	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	1	10	90	0.99462	0.322588	1	ns
27	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	1	32	90	-0.93446	0.352569	1	ns
28	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	3.2	10	90	0.82128	0.413657	1	ns
29	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	3.2	32	90	-0.99729	0.3213	1	ns
30	Lloydminster	<i>cyp26a1</i>	10	32	90	-1.90255	0.060297	0.904452	ns

Table S4.18. Results of the pairwise comparison, comparing the *cyp26a1* expression induced by the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit during the Exposure 2 for each WAF concentration, following the two-way ANOVA.

	WAF	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	0	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	-6.76E-16	1	1	ns
2	0.32	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	-2.7271	0.007681	0.007681	**
3	1	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	-3.62484	0.000479	0.000479	***
4	3.2	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	-1.2002	0.233212	0.233212	ns
5	10	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	1.833138	0.070088	0.070088	ns
6	32	<i>cyp26a1</i>	Clearwater	Lloydminster	90	0.258131	0.796895	0.796895	ns

Table S4.19. Results of the pairwise comparison, comparing the *pcna* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 1 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>pcna</i>	0	0.32	91	2.145524	0.034573	0.5186	ns
2	Clearwater	<i>pcna</i>	0	1	91	1.458863	0.148046	1	ns
3	Clearwater	<i>pcna</i>	0	3.2	91	1.628261	0.106927	1	ns
4	Clearwater	<i>pcna</i>	0	10	91	1.205111	0.231285	1	ns
5	Clearwater	<i>pcna</i>	0	32	NA	NA	NA	NA	?
6	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	1	91	-0.56396	0.574171	1	ns
7	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	3.2	91	-0.46004	0.646585	1	ns
8	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	10	91	-0.94041	0.349495	1	ns
9	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	32	NA	NA	NA	NA	?
10	Clearwater	<i>pcna</i>	1	3.2	91	0.115524	0.908284	1	ns
11	Clearwater	<i>pcna</i>	1	10	91	-0.32267	0.747683	1	ns
12	Clearwater	<i>pcna</i>	1	32	NA	NA	NA	NA	?
13	Clearwater	<i>pcna</i>	3.2	10	91	-0.45529	0.649984	1	ns
14	Clearwater	<i>pcna</i>	3.2	32	NA	NA	NA	NA	?
15	Clearwater	<i>pcna</i>	10	32	NA	NA	NA	NA	?
16	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	0.32	91	3.151081	0.002202	0.033033	*
17	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	1	91	1.317742	0.190898	1	ns
18	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	3.2	91	0.857609	0.393361	1	ns
19	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	10	91	2.021667	0.046148	0.692219	ns
20	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	32	91	1.341897	0.182968	1	ns
21	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	1	91	-1.69323	0.093832	1	ns
22	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	3.2	91	-2.2354	0.027838	0.417563	ns
23	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	10	91	-1.18333	0.239759	1	ns
24	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	32	91	-1.76337	0.081194	1	ns
25	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	3.2	91	-0.47543	0.635622	1	ns
26	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	10	91	0.588304	0.557785	1	ns
27	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	32	91	-0.01749	0.98608	1	ns
28	Lloydminster	<i>pcna</i>	3.2	10	91	1.110137	0.269865	1	ns
29	Lloydminster	<i>pcna</i>	3.2	32	91	0.472025	0.638039	1	ns
30	Lloydminster	<i>pcna</i>	10	32	91	-0.62585	0.53298	1	ns

Table S4.20. Results of the pairwise comparison, comparing the *pcna* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>pcna</i>	0	0.32	96	2.400496	0.018301	0.27451	ns
2	Clearwater	<i>pcna</i>	0	1	96	3.766101	0.000286	0.004288	**
3	Clearwater	<i>pcna</i>	0	3.2	96	2.842446	0.005469	0.082035	ns
4	Clearwater	<i>pcna</i>	0	10	96	0.653367	0.515081	1	ns
5	Clearwater	<i>pcna</i>	0	32	96	2.351881	0.020722	0.310824	ns
6	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	1	96	1.086266	0.280081	1	ns
7	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	3.2	96	0.244143	0.807641	1	ns
8	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	10	96	-1.80758	0.073804	1	ns
9	Clearwater	<i>pcna</i>	0.32	32	96	-0.2662	0.790657	1	ns
10	Clearwater	<i>pcna</i>	1	3.2	96	-0.90027	0.370231	1	ns
11	Clearwater	<i>pcna</i>	1	10	96	-3.13016	0.002315	0.034723	*
12	Clearwater	<i>pcna</i>	1	32	96	-1.47695	0.142963	1	ns
13	Clearwater	<i>pcna</i>	3.2	10	96	-2.20651	0.029733	0.445996	ns
14	Clearwater	<i>pcna</i>	3.2	32	96	-0.55329	0.581349	1	ns
15	Clearwater	<i>pcna</i>	10	32	96	1.698514	0.09265	1	ns
16	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	0.32	96	2.126057	0.036064	0.540961	ns
17	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	1	96	1.254265	0.212791	1	ns
18	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	3.2	96	1.959448	0.052961	0.794413	ns
19	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	10	96	2.85352	0.005297	0.079448	ns
20	Lloydminster	<i>pcna</i>	0	32	96	2.268598	0.025533	0.382989	ns
21	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	1	96	-0.94352	0.347781	1	ns
22	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	3.2	96	-0.15806	0.874742	1	ns
23	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	10	96	0.622797	0.534895	1	ns
24	Lloydminster	<i>pcna</i>	0.32	32	96	0.135227	0.892716	1	ns
25	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	3.2	96	0.776915	0.439119	1	ns
26	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	10	96	1.632708	0.105806	1	ns
27	Lloydminster	<i>pcna</i>	1	32	96	1.086066	0.280169	1	ns
28	Lloydminster	<i>pcna</i>	3.2	10	96	0.785438	0.434131	1	ns
29	Lloydminster	<i>pcna</i>	3.2	32	96	0.293286	0.769937	1	ns
30	Lloydminster	<i>pcna</i>	10	32	96	-0.48365	0.629736	1	ns

Table S4.21. Results of the pairwise comparison, comparing the *xrcc1* expression induced by each WAF concentration during the Exposure 2 for the Lloydminster conventional oil and the Clearwater dilbit, following the two-way ANOVA.

	Oil	.y.	group1	group2	df	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0	0.32	96	-0.84299	0.401328	1	ns
2	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0	1	96	1.535118	0.128044	1	ns
3	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0	3.2	96	-0.31962	0.749948	1	ns
4	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0	10	96	-2.4068	0.018006	0.270089	ns
5	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0	32	96	-2.82035	0.005829	0.087428	ns
6	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0.32	1	96	2.223958	0.028495	0.427431	ns
7	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0.32	3.2	96	0.532935	0.59531	1	ns
8	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0.32	10	96	-1.34114	0.183039	1	ns
9	Clearwater	<i>xrcc1</i>	0.32	32	96	-1.71644	0.089307	1	ns
10	Clearwater	<i>xrcc1</i>	1	3.2	96	-1.80778	0.073772	1	ns
11	Clearwater	<i>xrcc1</i>	1	10	96	-3.87773	0.000193	0.002896	**
12	Clearwater	<i>xrcc1</i>	1	32	96	-4.28025	4.42E-05	0.000663	***
13	Clearwater	<i>xrcc1</i>	3.2	10	96	-2.02298	0.045856	0.687836	ns
14	Clearwater	<i>xrcc1</i>	3.2	32	96	-2.42551	0.017156	0.25734	ns
15	Clearwater	<i>xrcc1</i>	10	32	96	-0.41355	0.680123	1	ns
16	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0	0.32	96	0.585134	0.55983	1	ns
17	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0	1	96	-0.45075	0.653184	1	ns
18	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0	3.2	96	-1.15014	0.252945	1	ns
19	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0	10	96	-1.41159	0.161303	1	ns
20	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0	32	96	-3.30107	0.001353	0.020297	*
21	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0.32	1	96	-0.99742	0.321067	1	ns
22	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0.32	3.2	96	-1.64622	0.102988	1	ns
23	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0.32	10	96	-1.90597	0.059646	0.894684	ns
24	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	0.32	32	96	-3.69262	0.000369	0.00553	**
25	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	1	3.2	96	-0.69653	0.487783	1	ns
26	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	1	10	96	-0.93651	0.351361	1	ns
27	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	1	32	96	-2.77815	0.006576	0.098642	ns
28	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	3.2	10	96	-0.21202	0.832539	1	ns
29	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	3.2	32	96	-1.99868	0.048471	0.727072	ns
30	Lloydminster	<i>xrcc1</i>	10	32	96	-1.84164	0.068615	1	ns

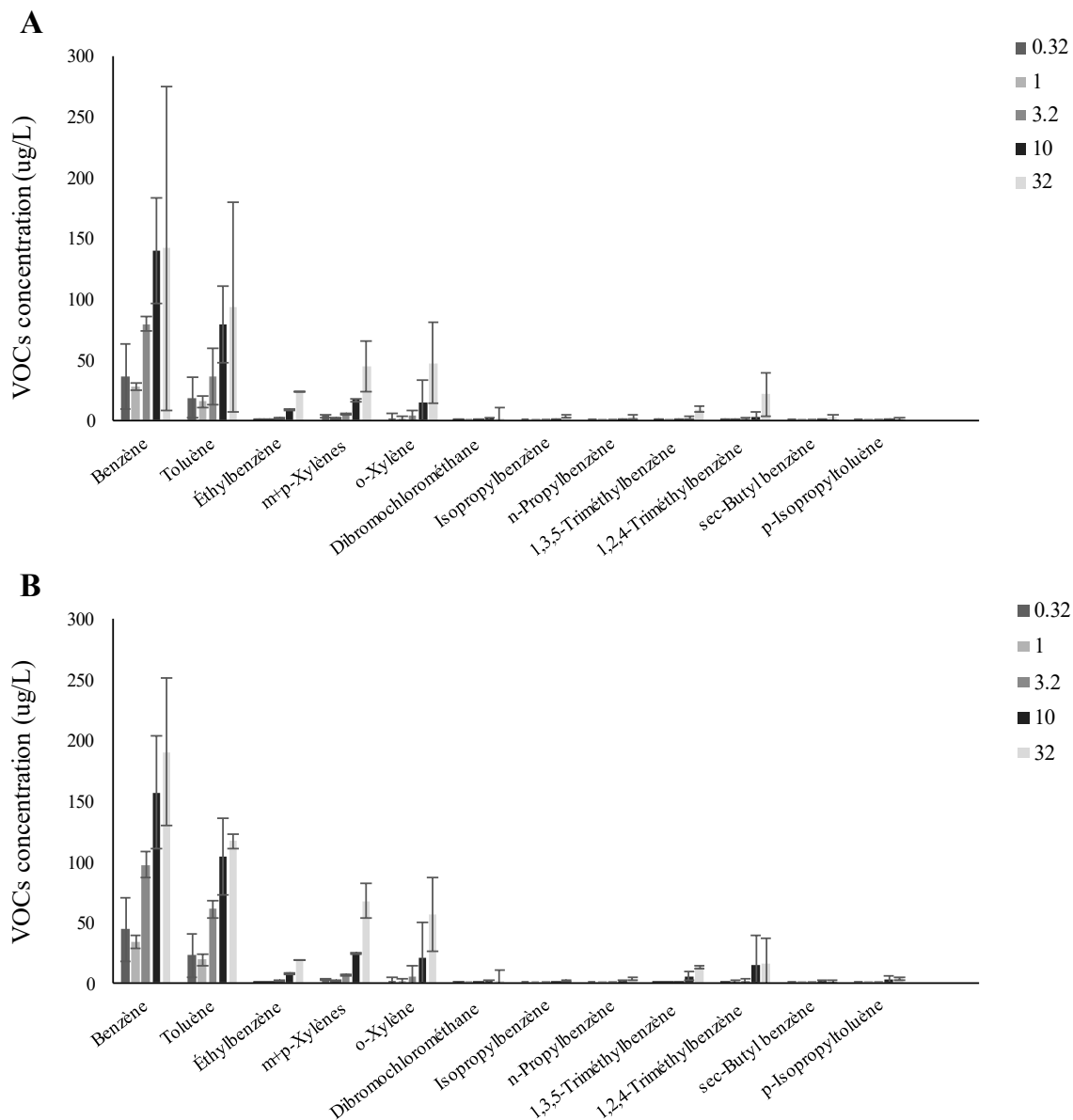


Figure S4.1. Concentrations ($\mu\text{g/L}$) of measured VOCs in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A), and the Clearwater McMurray dilbit (B).

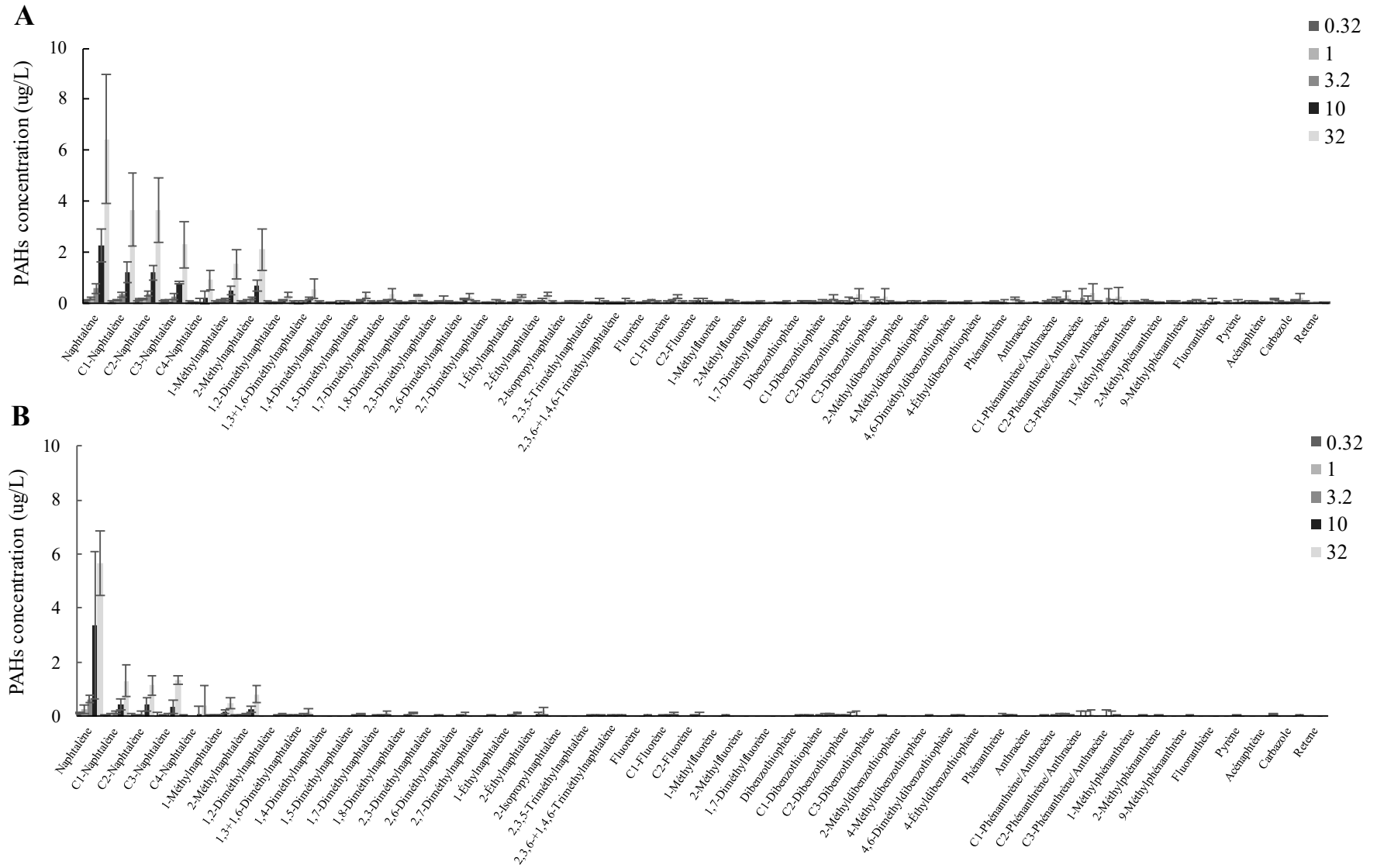


Figure S4.2. Concentrations of PAHs (ug/L) in the WAF dilutions of the Lloydminster conventional oil (A), and the Clearwater McMurray dilbit (B).

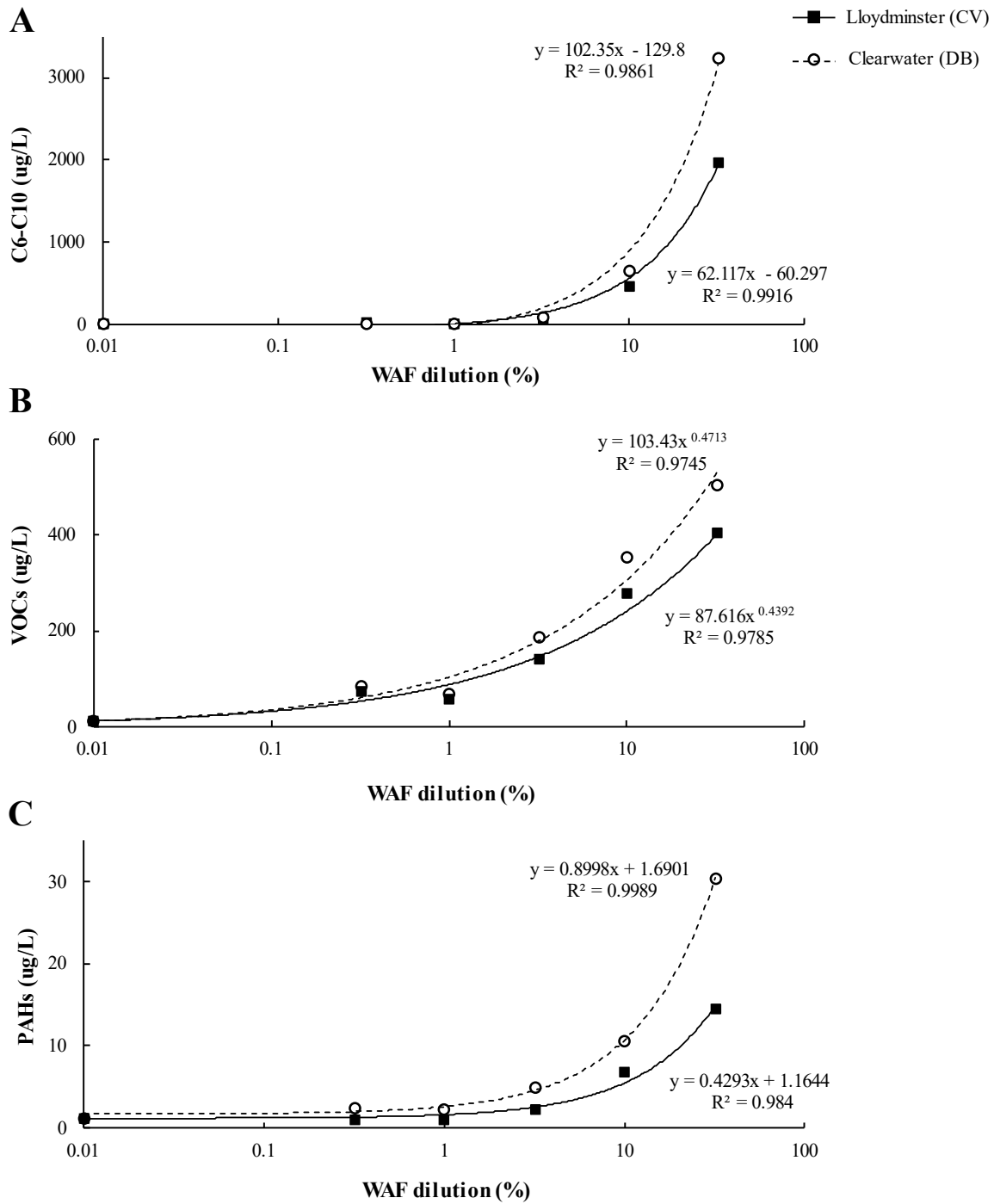


Figure S4.3. Concentration of C6-C10 (A), VOCs (B) and PAHs (C) in function of the WAF concentration for both oils.

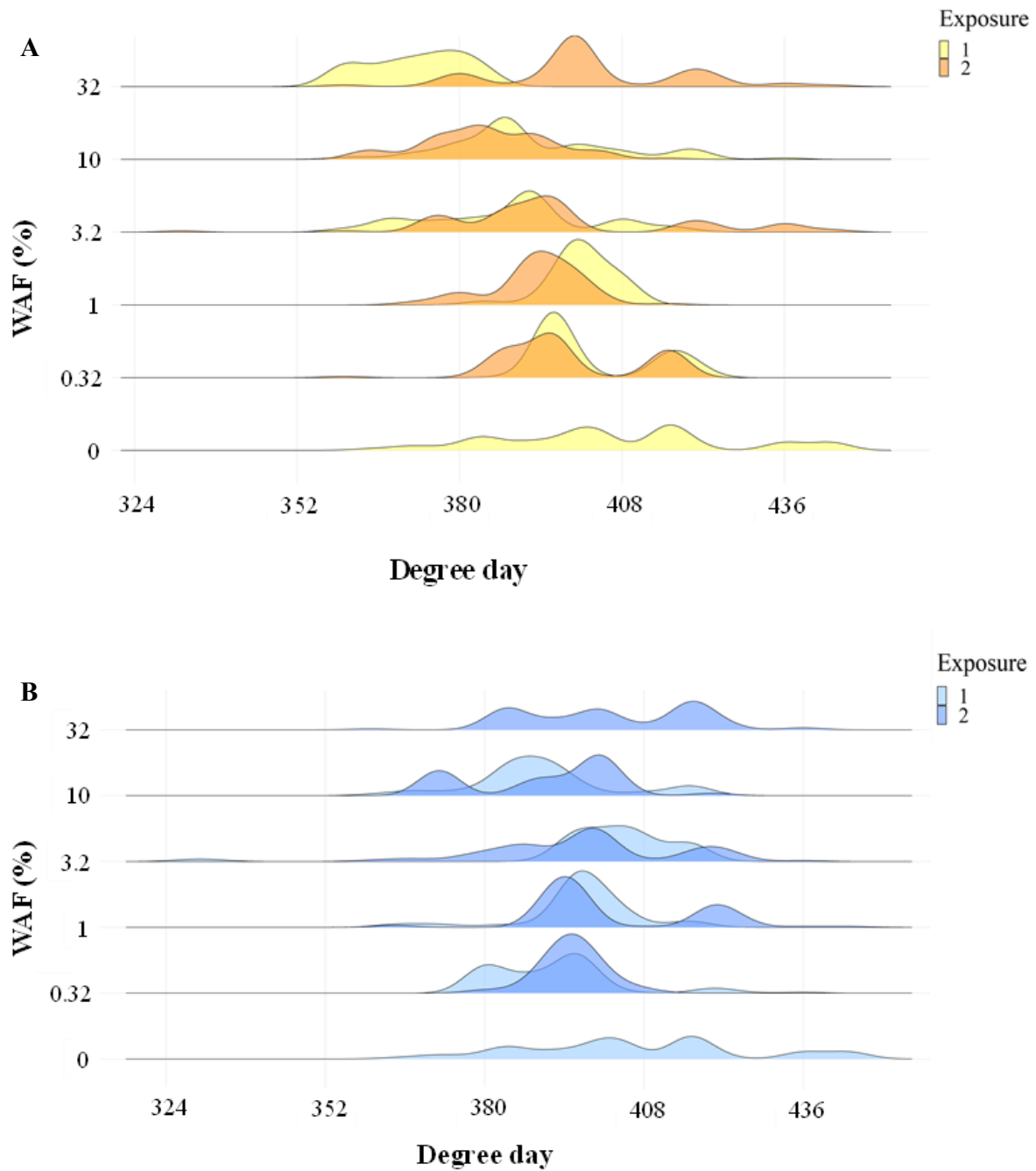


Figure S4.4. Hatching density per degree-day for both exposures for the Lloydminster conventional oil (A) and the Clearwater dilbit (B).

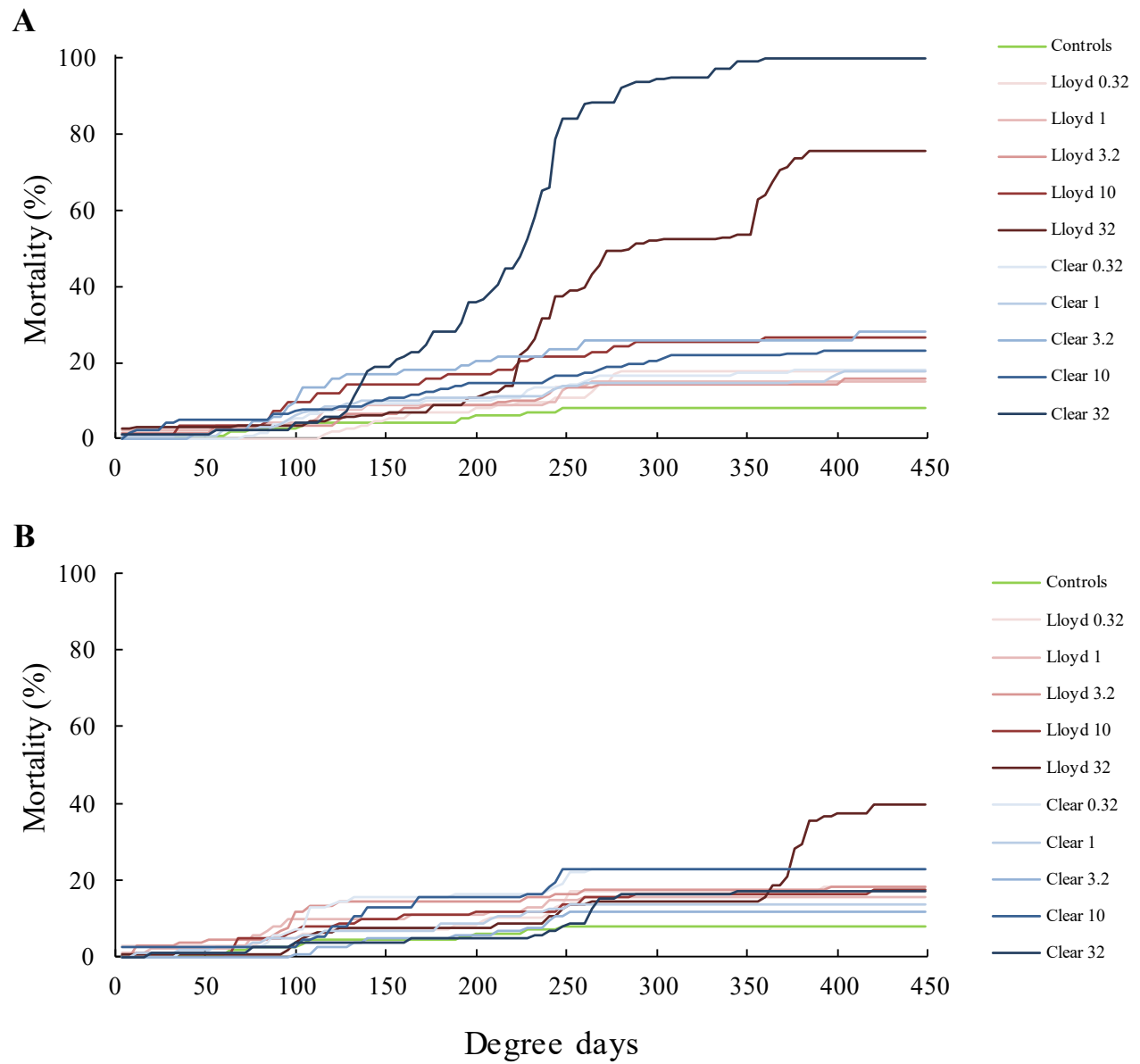


Figure S4.5. Percentage of mortality per degree-day for both oils in exposure 1 (A) and in exposure 2 (B).

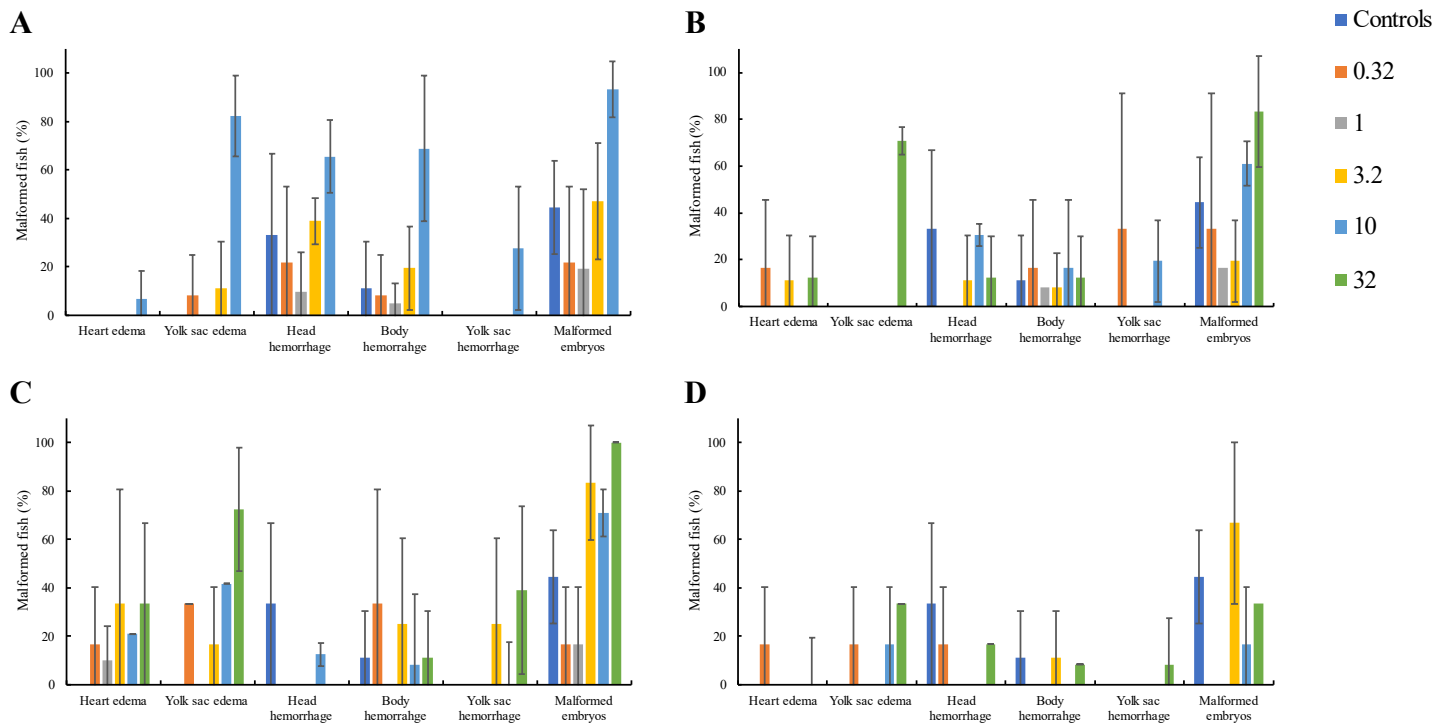


Figure S4.6. Percentage of each malformation (edemas and hemorrhages) observed for the Clearwater dilbit (A, C) and the Lloydminster conventional oil in exposure 1 (top panels) and in exposure 2 (bottom panels).

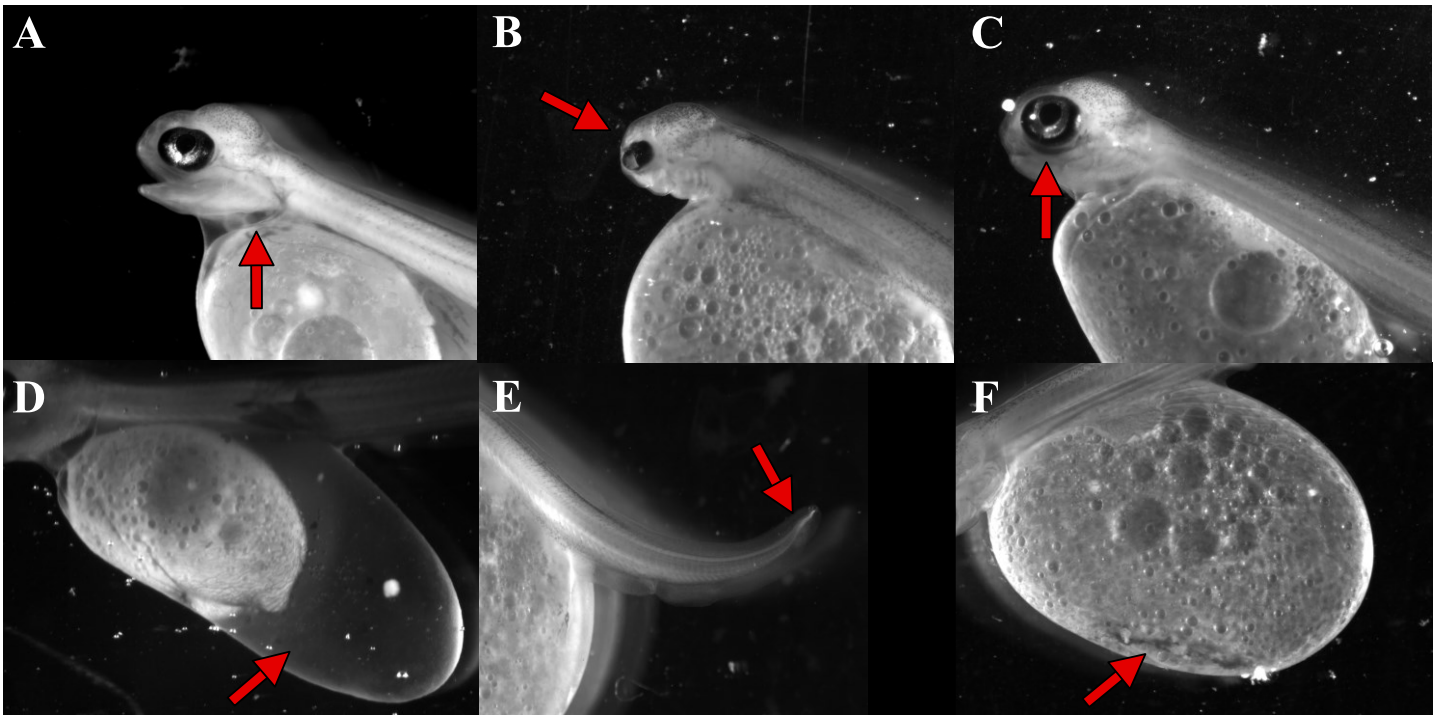


Figure S4.7. Examples of the malformations pointed by the red arrow. A) Heart hemorrhage; B) Underdeveloped head; C) Eye hemorrhage; D) Yolk sac edema; E) Underdeveloped tail; F) Yolk sac hemorrhages.

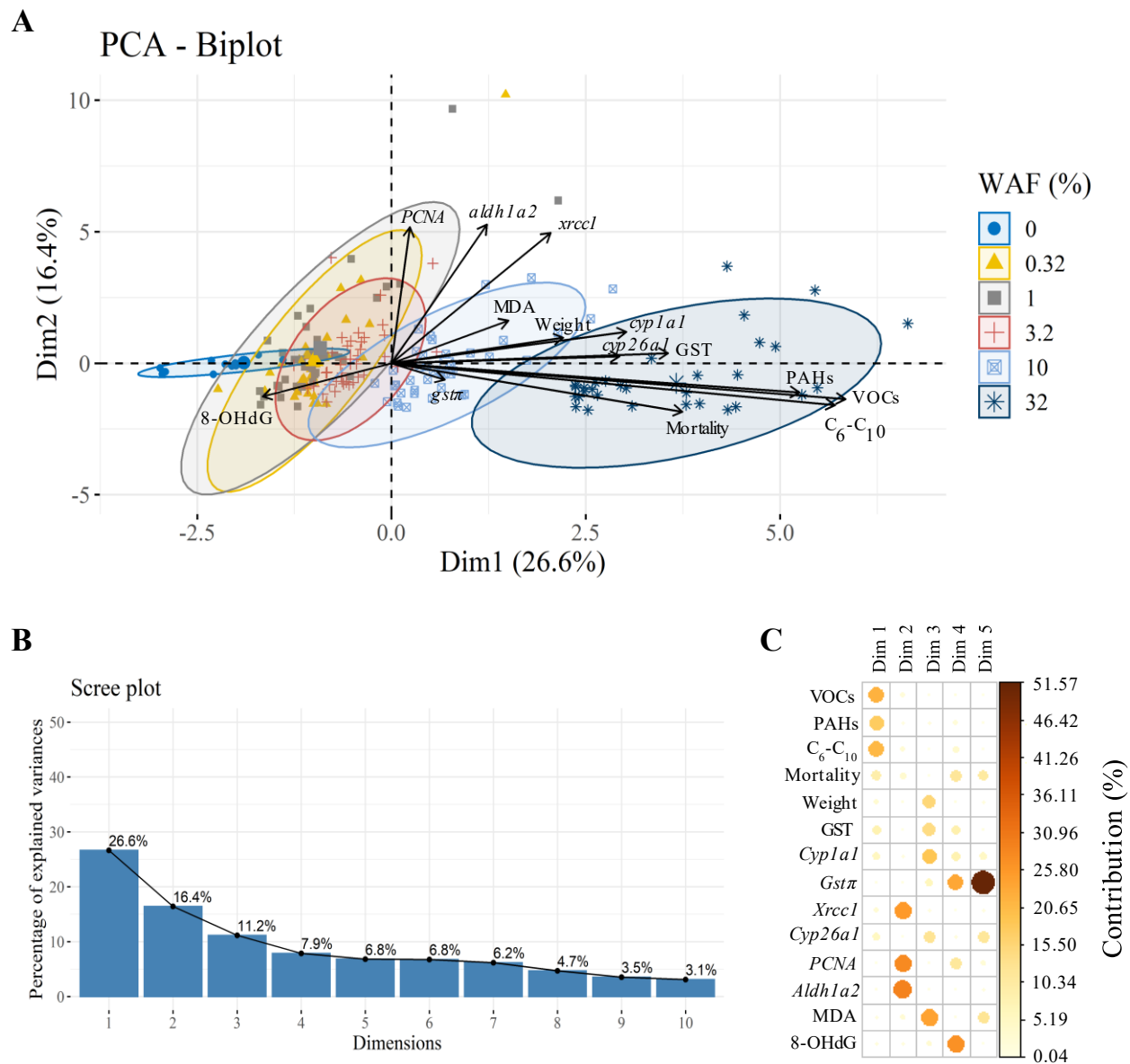


Figure S4.8. Principal component analysis showing the relationships between the biomarkers (8-OHdG, *PCNA*, *cyp1a1*, *cyp26a1*, *ald1a2*, *xrcc1*, *gsta*, GST, MDA, weight, and mortality) and the oils components (PAHs, VOCs and C₆-C₁₀) in Atlantic salmon embryos. Individual points representing individual fish (n = 240) are grouped by oil type and marked by the colored symbols and ellipses (A). The percentage of explained variances for each dimensions is presented by the scree plot (B) and the contribution in percentage of each variable for the five first dimensions is presented in a correlation plot. Darker and larger circles represent higher percentages, while lighter and smaller circles represent lower percentages of contribution, as presented with the color legend on the right (C). Abbreviations: CYP1A: Cytochrome p450 1A1 enzyme; *cyp1a1*: Cytochrome p450 1a1 gene; *cyp26a1*: Cytochrome p450 26a1 gene; MDA: Malondialdehyde; PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons; VOCs: Volatiles organic compounds; WAF: Water accommodated fraction.

5 Discussion générale et conclusions

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer et de comparer la toxicité des pétroles conventionnels et des pétroles non conventionnels (dilbit) sur trois espèces de poissons d'eau douce du Canada, soit le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*). Chacun des articles présentés dans cette thèse met en évidence les relations entre les profils chimiques des deux types de pétroles et les effets physiologiques et moléculaires observés chez les espèces sélectionnées. Dans chaque chapitre, des objectifs secondaires spécifiques ont été déterminés afin d'analyser les effets sous létaux des expositions aux pétroles sur les poissons. Les prochaines sections présentent un retour sur les objectifs spécifiques de chaque article, les principaux résultats obtenus, puis mettent en lien les découvertes et les constats des trois articles.

5.1 Principaux résultats

5.1.1 Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae exposed during their early development

L'objectif général du premier article (chapitre 2) était d'étudier les effets de deux dilbits (Bluesky et Clearwater McMurray) et d'un pétrole conventionnel (Lloydminster) sur les larves du mené à grosse tête. Les objectifs spécifiques définis étaient : 1. d'évaluer la toxicité aigüe des pétroles; 2. d'évaluer les effets sous-létaux; et 3. de déterminer les relations entre les composants des produits pétroliers et les effets biologiques observés. Les larves du mené à grosse tête ont été exposées à différentes concentrations de composés pétroliers dissous mécaniquement dans l'eau. Ces expositions ont été faites sur une période de sept jours à partir de l'éclosion et à une température de 24 °C. Les analyses biologiques subséquentes ont démontré que les dilbits peuvent causer des taux de mortalité équivalents ou plus élevés que les pétroles conventionnels. Effectivement, un des dilbits de l'étude, le Clearwater McMurray, a induit environ deux fois plus de mortalité que les deux autres pétroles. L'expression du gène *cyplal* (métabolisme de détoxification, phase I) a été mesurée et s'est avérée presque 3 fois plus élevée chez les larves exposées au dilbit Clearwater McMurray, par rapport aux larves exposées aux deux autres pétroles. Les analyses génétiques et enzymatiques de la GST (métabolisme de détoxification, phase II) ont permis d'observer que l'expression génique n'était pas affectée par les expositions, tandis que l'activité enzymatique augmentait chez les poissons exposés. Cette augmentation était similaire pour les larves exposées aux concentrations élevées des trois pétroles. Cependant, les larves de mené à grosse tête exposées aux concentrations élevées du dilbit Bluesky et du pétrole conventionnel Lloydminster possédaient une concentration plus élevée de produits de peroxydation lipidique que les larves non-exposées aux contaminants, ce qui suggère que

l'activité enzymatique de la phase II (mesurée par la GST) avait atteint un plateau et l'accumulation de métabolites réactifs formés en phase I avait causé une augmentation des dommages oxydants. Cette étude a aussi permis de mettre en lien la concentration des composés chimiques avec la toxicité aigüe et les effets sous-létaux des pétroles. L'ajout de diluant dans les dilbits cause une augmentation de la concentration des composés pétroliers légers, tels que les composés organiques volatils et les C₆-C₁₀. Des analyses précédentes ont démontré que ces composés étaient parmi les plus toxiques, et qu'ils étaient responsables d'une grande part de la mortalité aigüe observée dans les quelques heures après un déversement d'hydrocarbures dans les écosystèmes aquatiques (Philibert *et al.*, 2016; Peterson *et al.*, 2003; Peterson 1994;). Donc, l'ajout de diluant peut augmenter la toxicité des dilbits à court terme. Les pétroles composés de concentrations plus élevées de composés plus lourds et moins volatils, tels les HAP de 3 à 5 cycles, engendrent des effets toxiques à plus long terme, par exemple la formation de dommages oxydants. Globalement, les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de répondre à notre objectif principal, qui était de comparer la toxicité des deux types de pétrole, ainsi qu'à nos objectifs secondaires qui étaient d'évaluer la toxicité aigüe et sous-létale des pétroles, puis de mettre en relation les composés chimiques des pétroles et les effets biologiques que ces composés induisent chez les poissons.

5.1.2 Comparative toxicity of conventional and unconventional oils during rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryonic development: From molecular to health consequences

L'objectif principal de cet article était d'évaluer la toxicité de deux pétroles, le pétrole conventionnel Lloydminster et le pétrole non-conventionnel Clearwater McMurray, sur la truite arc-en-ciel lors de différents stades de développement. En nous basant sur les résultats du chapitre précédent, nous avons déterminé qu'il était préférable de poursuivre les analyses avec le dilbit Clearwater seulement. Ce dilbit était plus toxique et causait des effets plus marqués que le dilbit Bluesky, lorsque ces deux pétroles étaient comparés au pétrole conventionnel. Les trois sous-objectifs spécifiques définis étaient; 1. de déterminer quels stades de développement seraient les plus sensibles aux contaminations par les pétroles (i.e., taux de mortalité); 2. de mesurer les effets d'une exposition durant le développement embryonnaire lors d'un retour en eau propre sur la survie et la santé des juvéniles et; 3. d'observer les effets sous-létaux des expositions de pétroles sur le développement embryonnaire (i.e., effets moléculaires, retard de croissance et malformations). Les résultats obtenus ont permis de constater que les embryons étaient le plus affectés par les expositions aux deux types de pétroles lorsque celles-ci débutent à la fertilisation par rapport aux stades plus avancés de développement. De plus, les expositions au dilbit ont causé une augmentation de la mortalité pour les poissons exposés à partir de l'éclosion, mais les poissons exposés au pétrole conventionnel n'ont pas été affectés. Les réponses biologiques ont permis de confirmer que l'expression

génique et de l'activité enzymatique de CYP1A sont des biomarqueurs d'exposition intéressants ; toutefois, plusieurs études démontrent qu'ils ne sont pas toujours représentatifs de la toxicité des pétroles, due à l'affinité différente des composés pétroliers avec le récepteur AhR. Ces variations d'affinités selon les composés affectent l'induction subséquente du métabolisme de détoxification. Les expositions de cet article ont causé des taux de mortalité importants chez les poissons exposés aux concentrations élevées de pétrole, lors de plusieurs stades de développement. Ceci met en évidence l'importance de tenir compte du biais du survivant, qui stipule qu'en mesurant les effets chez les survivants seulement, les raisons ayant mené à la mort des organismes sont perdues. Donc, afin de comprendre les raisons de la haute mortalité induite par certains traitements, il serait nécessaire de mesurer les biomarqueurs à plusieurs périodes durant l'exposition et non pas seulement à la toute fin. Une autre observation intéressante de ce chapitre est que les poissons exposés durant le développement embryonnaire, puis remis en eau propre dès l'éclosion, ont des taux de mortalité plus importants que les poissons non exposés. Une contamination aux hydrocarbures peut donc induire des effets à long terme sur les embryons, mais les biomarqueurs classiques d'expositions ne permettent pas d'évaluer l'ampleur de ces effets. En effet, lors d'un retour en eau propre, les voies AhR ne sont plus induites par les hydrocarbures : l'expression génique et l'activité de CYP1A sont équivalentes chez les poissons ayant été exposés ou non. Ceci signifie qu'il serait nécessaire de recourir à d'autres biomarqueurs. AhR et CYP1A sont plutôt des biomarqueurs d'expositions pour les poissons dans un milieu où une remédiation a été effectuée après un déversement; il serait préférable d'utiliser des biomarqueurs d'effets pour les études d'impacts environnementaux. Finalement, le développement global des poissons a été observé par la mesure de la taille de l'œil et la fréquence d'éclosions par jour a été calculée. Les résultats de cet article ont démontré que les poissons exposés aux deux types de pétroles accumulent des retards de croissance importants et sont plus à risques d'éclore de manière précoce. Les poissons exposés qui parviennent à l'éclosion ont des retards de croissance, qui à moyen long terme et moins pourraient affecter leur capacité d'alimentation et d'échapper à la prédation. Globalement, les constats de cet article confirment que les embryons en début de développement sont les plus sensibles aux expositions, alors qu'à l'éclosion seuls les dilbits causent une augmentation de la mortalité. Les poissons qui se développent dans un milieu contaminé aux hydrocarbures, peu importe le type de pétrole, peuvent en subir les effets à long terme. Finalement, les expositions causent des retards de développement et des éclosions précoces, ce qui diminuerait les probabilités de survie à moyen/long terme.

5.1.3 Molecular effects and early developmental toxicity of a conventional and unconventional oil on the Atlantic salmon

Le dernier article de la thèse s'est concentré sur les effets d'un pétrole conventionnel et d'un dilbit sur le saumon atlantique lors de son développement embryonnaire. Les objectifs spécifiques de cet article étaient ;

1. d'observer les effets des pétroles sur le développement embryonnaire pour déterminer le stade le plus sensible; 2. de déterminer si le métabolisme de la vitamine A et la réparation de l'ADN sont affectés par les hydrocarbures et; 3. d'observer la physiologie des poissons exposés en lien avec les réponses moléculaires mesurées. Globalement, cet article a mis en évidence les effets d'une exposition au pétrole bitumineux ou au pétrole conventionnel sur deux stades importants du développement embryonnaire. Les résultats confirment à nouveau que les embryons exposés aux pétroles à partir de la fertilisation sont plus sensibles que les embryons exposés à partir du stade œillé. D'ailleurs, les embryons exposés depuis la fertilisation avaient plus de malformations à l'éclosion (i.e., œdèmes et hémorragies) que les poissons exposés à partir du stade œillé. De plus, les embryons exposés au dilbit possédaient plus de malformations que ceux exposés aux pétroles conventionnels. Le métabolisme de la vitamine A, qui joue un rôle important dans le développement des embryons, a été perturbé par les expositions, soit en augmentant chez les poissons exposés à partir de la fertilisation et en diminuant chez les poissons exposés à partir du stade œillé. Précédemment dans la littérature, il a été démontré que les hydrocarbures induisent la formation de dommages oxydants, cependant dans cette étude ni les lipides cellulaires ni l'ADN n'ont été endommagés de manière significative. Selon une communication personnelle d'Émilie Proulx (LARSA), les géniteurs des œufs utilisés étaient nourris avec une moulée enrichie en antioxydants, ce qui aurait pu prévenir la formation de dommages oxydants dans nos expositions. Néanmoins, un gène des voies de réparation de l'ADN par excision de base, le gène *xrcc1* augmentait en suivant la concentration de WAF dans la majorité des expositions. Il est donc probable que les dommages oxydants étaient limités par l'alimentation et réparés suffisamment rapidement pour ne pas s'accumuler. Finalement, de manière similaire à l'étude sur la truite arc-en-ciel, les résultats de cette étude ont démontré que les embryons exposés aux deux types de pétroles subissaient des retards de développement en plus d'éclore précocement.

5.2 Comparaison des résultats

Un des points d'intérêt de cette thèse est qu'elle permet la comparaison de la toxicité de pétroles conventionnels et bitumineux sur trois espèces de poissons d'ici. À ce jour, très peu d'études ont comparé la toxicité des deux types de pétrole simultanément et dans des conditions expérimentales similaires. Chaque article inclus dans cette thèse s'est penché sur la comparaison des effets toxicologiques des deux types pétroles sur une espèce de poisson préalablement choisie, en s'attardant au métabolisme de détoxification, au stress oxydant (gestion et dommages) et à l'expression génique. La présente section mettra plutôt de l'avant les comparaisons entre les espèces par l'analyse de la méthodologie utilisée lors des expositions, la comparaison de la physiologie des espèces (cycle de vie, stades de développement) et des différences moléculaires entre les espèces.

5.2.1 Compositions chimiques des WAF

Avant de comparer les effets toxicologiques induits par les hydrocarbures, il faut premièrement considérer les profils chimiques de l'eau contaminée à laquelle les trois espèces de poissons ont été exposées. Dans l'environnement, la dissolution et le vieillissement des pétroles sont affectés par une variété de facteurs environnementaux. Dans les chapitres de cette thèse, la méthodologie utilisée pour la préparation des milieux d'expositions est la méthode de la fraction adaptée à l'eau (WAF: *water accommodated fraction*). Cette technique élimine les effets de la majorité des facteurs environnementaux sur le vieillissement des pétroles, tels que la dégradation bactérienne, la photodégradation et le mélange des pétroles avec les sédiments. Lors de la préparation des WAF, le pétrole flotte sur l'eau dans un contenant fermé, hermétique et dans l'obscurité. Le mélange est effectué en utilisant une énergie faible pour former un vortex d'environ 25 % de la colonne d'eau et qui évite la formation d'une émulsion et la dispersion de gouttelettes de pétroles dans l'eau. Lors du mélange, les paramètres qui affectent la dissolution des composés pétroliers sont la température ambiante, la vitesse d'agitation et les caractéristiques du contenant (Singer *et al.*, 2000). Les caractéristiques du contenant, principalement ses dimensions, affectent le ratio d'air et de liquide dans le contenant et aussi l'épaisseur de la couche de pétrole sur l'eau.

Le tableau 5.1 présente les résultats combinés des analyses chimiques des trois chapitres de la thèse. Les composés chimiques dans les WAF de 1, 10 et 75 % ont été mesurés dans le chapitre 2 (*P. promelas*), tandis que pour les chapitres 3 (*O. mykiss*) et 4 (*S. salar*) les composés dans les WAF de 0,32 à 32 % ont été mesurés. De plus, les C₆-C₁₀ ont été mesurés dans les articles sur le mené et le saumon seulement. Dans les trois articles, la concentration de chaque groupe de composés augmentait en suivant la concentration de WAF, cependant les patrons de dissolution des composés étaient différents entre chaque exposition. Premièrement, pour les expositions des chapitres 2 et 4, les WAF préparés avec le pétrole conventionnel avaient des concentrations plus élevées de HAP qu'avec le dilbit et inversement pour les COV. Ce patrons chimiques étaient attendus, car les dilbits possèdent théoriquement plus de composés légers par l'ajout de diluant. Ensuite, lors des expositions de la truite arc-en-ciel, les WAF préparés avec le dilbit avaient des concentrations équivalentes de HAP et à nouveau les COV étaient légèrement plus élevés. Une autre observation intéressante apportée par le tableau 5.1 est que contrairement aux attentes, la dilution des composés pétroliers ne semble pas liée aux changements de température entre les expositions. Les hypothèses, suivant la littérature sur la solubilité des hydrocarbures, étaient que généralement les composés pétroliers seraient plus solubles en eau plus chaude. Les résultats obtenus démontrent des tendances plutôt différentes. Par exemple, dans le WAF de 10 % du pétrole conventionnel la concentration la plus élevée de HAP a été mesurée dans l'exposition effectuée à 24 °C et la concentration la plus faible dans l'exposition à 12 °C. À l'inverse, la concentration la plus faible de COV a été mesurée dans l'exposition à 24 °C et des

concentrations similaires de COV ont été obtenues à 12 et 4 °C. Ce résultat semble démontrer que dans nos expositions la température, n'était pas le facteur prédominant pour expliquer la dissolution des composés pétroliers dans l'eau. Ces données semblent plutôt montrer que d'autres facteurs dans notre technique de préparation des WAF ont influencé la dissolution des hydrocarbures. Les contenants utilisés lors de la préparation des WAF de chaque exposition n'étaient pas les mêmes entre celles-ci. Le volume d'eau nécessaire lors de chaque exposition était la raison de ce changement, qui a causé des effets non désirés. Un des facteurs importants dans la préparation des WAF est l'espace d'air disponible dans le contenant; cet espace favorise l'évaporation des composés plutôt que leur dissolution. La quantité d'air et l'épaisseur de la couche de pétrole sur l'eau font changer les composés qui seront préférentiellement dissous ou évaporés. Une couche de pétrole plus épaisse dans un contenant plus étroit créera une surface de contact moins importante entre le pétrole et l'eau, donc moins de dissolution des hydrocarbures, tandis qu'un contenant plus large et une couche de pétrole plus mince favoriseront la dissolution des composés. Malgré ces différences, la comparaison des profils chimiques des trois chapitres de cette thèse permet d'observer que les composés pétroliers de faible poids moléculaire se retrouvent dans l'eau en plus grande concentration en comparaison aux composés de poids moléculaire plus élevé et ce, peu importe le type de pétrole. Les C₆-C₁₀ mesurés dans les chapitres 2 et 4 sont les composés les plus concentrés, alors que les C₁₀-C₅₀ ont été détectés mais se trouvaient sous la limite de quantification des analyses pour chaque chapitre.

Étant donné la présence d'une multitude de composés pétroliers, dont plusieurs n'ont pas été mesurés dans les trois chapitres de cette thèse, les réponses des biomarqueurs ont été présentées en fonction de la concentration de WAF auquel les organismes ont été exposés. Cette manière de présenter les résultats n'est pas la plus fréquemment utilisée dans la littérature. Les résultats sont plus fréquemment présentés en fonction de la concentration de HAP ou de la concentration totale des composés aromatiques polycycliques (PAC), car ces molécules et leurs effets toxiques sont les mieux connus. Toutefois, les résultats des analyses chimiques combinés aux réponses des biomarqueurs ont démontré qu'il est important de considérer l'ensemble des composés pétroliers auxquels les organismes sont exposés pour évaluer plus précisément les effets toxiques. Donc, la présentation des données en relation avec la concentration de WAF permet une meilleure analyse de l'effet de l'ensemble des composés issus des pétroles, d'où l'importance aussi de mesurer une grande variété de composés pour obtenir un profil chimique le plus complet possible.

Tableau 5.1. Comparaison des profils chimiques des WAF utilisés dans chacun des chapitres. Les concentrations de HAP, VOC et C6-C10 ont été mesurées pour les WAF de 1, 10 et 75 % chez le mené à grosse tête (FHM) et chez la truite arc-en-ciel (RT) et le saumon atlantique (AS) les composés ont été mesurés dans les WAF de 0,32 à 32 %.

Component (µg/L)		Lloydminster conventional oil (% WAF)					
		0,32	1	3,2	10	32	75
HAP	FHM	N.D.	1,21	N.D.	12,1	N.D.	90,6
	RT	2,41	2,67	2,57	5,1	17,5	N.D.
	AS	2,41	2,24	5,02	10,6	30,5	N.D.
COV	FHM	N.D.	10,50	N.D.	105	N.D.	787
	RT	7,94	19,4	69,3	280	634	N.D.
	AS	73,0	58,3	140	278	404	N.D.
C ₆ -C ₁₀	FHM	N.D.	77,6	N.D.	776	N.D.	5816
	AS	23,17	9,7	73,2	453	1967	N.D.
WAF		Clearwater dilbit (% WAF)					
		0,32	1	3,2	10	32	75
HAP	FHM	N.D.	0,15	N.D.	3,85	N.D.	29,5
	RT	1,84	2,25	2,31	5,64	15,1	N.D.
	AS	1,04	1,09	2,26	6,79	14,5	N.D.
VOC	FHM	N.D.	46,92	N.D.	469,2	N.D.	3519
	RT	12,8	26,8	73,1	395	661	N.D.
	AS	83,0	67,8	187	354	504	N.D.
C ₆ -C ₁₀	FHM	N.D.	754	N.D.	7535	N.D.	56517
	AS	10,83	8,50	88,3	640	3233	N.D.

AS : Atlantic Salmon (chapitre 4); COV : Composé organique volatil; FHM : Fathead minnow (chapitre 2); HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique; N.D. : non disponible; RT : Rainbow trout (chapitre 3).

5.2.2 Physiologie des espèces : stade de développement et différences moléculaires

Cette thèse met en évidence la toxicité des pétroles sur trois espèces de poissons, exposés durant différents stades de vie et de développement. Tout d'abord, pour comparer les espèces et leur sensibilité aux contaminants, la physiologie et les cycles de vie des différentes espèces doivent être discutés. Premièrement, le mené à grosse tête est une espèce de poisson fréquemment utilisée en laboratoire dans les études de toxicité. C'est une espèce plutôt résistante aux changements environnementaux, comme la température, l'oxygène et le pH (Ankley & Villeneuve, 2006). Leur développement embryonnaire est court, soit d'environ 4 à 5 jours. Pour cette raison, les expositions du chapitre 2 ont été faites à partir de l'éclosion, permettant d'éviter d'obtenir un biais dans la mortalité avec les œufs non fécondés ou qui n'arriveraient naturellement pas à l'éclosion. Lors d'une exposition au stade larvaire, les organismes ont une surface de contact plus grande avec l'eau que lorsqu'ils sont protégés par le chorion (Carls *et al.*, 2008; Philibert *et al.*, 2019). Cependant, les organismes à un stade de développement plus avancé ont aussi plus de capacités de défense contre les contaminants. Leur réponse génique est plus adaptée que celle des organismes en développement qui allouent leurs ressources énergétiques dans la différenciation et la division cellulaire. Donc, les organismes au stade embryonnaire sont encore protégés par l'œuf et ont une protection externe;

en revanche ils ont une faible capacité intrinsèque à se défendre contre les contaminants externes. Les organismes plus développés sont directement exposés aux contaminants, cependant leur système est plus apte à se défendre, principalement après la formation du foie. La toxicité des hydrocarbures peut être estimée et comparée selon leur poids moléculaire et leur facilité à pénétrer les organismes, soit par leur biodisponibilité. Par exemple, dans le chapitre 3, les taux de mortalité des alevins de truite arc-en-ciel exposés au dilbit à partir de l'éclosion étaient plus élevés que ceux des alevins exposés au pétrole conventionnel. En effet, la toxicité des dilbits provient de sa teneur en composés légers, des composés plus solubles et dont la biodisponibilité est plus élevée. Les alevins et les embryons exposés au dilbit avaient des taux de mortalité similaires. En revanche lorsqu'exposés au pétrole conventionnel, les embryons présentaient des taux de mortalité plus importants que les alevins. D'un autre côté, dans le chapitre 4, les embryons de saumon atlantique exposés à partir de la fertilisation étaient plus sensibles et avaient des taux de mortalité plus élevés que les embryons exposés à partir du stade œillé. Donc, globalement les résultats de cette thèse mis en commun confirment que les embryons exposés tôt durant leur développement sont les plus sensibles. Pourtant, à l'éclosion, le dilbit qui possède généralement une concentration plus élevée en composés de faible poids moléculaire peut causer autant de mortalité chez les alevins que chez les embryons exposés à partir de la fertilisation.

Ensuite, il est nécessaire de s'attarder à la protéine AhR et ses différences. Les gènes et les isoformes du récepteur AhR à travers les espèces ont été investigués par différentes équipes depuis la fin des années 90. Tel que mentionné précédemment (section 1.2.11), plusieurs facteurs influencent la toxicité des pétroles et des composés reconnus par le récepteur AhR. Premièrement, l'affinité entre le récepteur AhR et ses ligands peut être utilisée pour prédire la toxicité des hydrocarbures (Head *et al.*, 2008; Karchner *et al.*, 2006). Dans la revue de littérature de Doering et collaborateurs (2013), la sensibilité des poissons exposés à la dioxine a été comparée en utilisant la CL50 obtenue dans diverses études. Selon leurs analyses, la truite arc-en-ciel serait plus sensible que le mené à grosse tête. Le saumon atlantique n'est pas inclus dans cette étude, mais les salmonidés sont généralement reconnus pour leur sensibilité plus élevée aux contaminants en comparaison à d'autres espèces de poissons (Elonen *et al.*, 1998). Les études de Hansson et collaborateurs (2003, 2004 et 2008) se sont attardées à déterminer la présence des gènes *AhR* chez les salmonidés, dont la truite arc-en-ciel et le saumon atlantique. La truite arc-en-ciel posséderait minimalement deux gènes *AhR2*, alors que le saumon atlantique posséderait six gènes, dont deux *AhR1* et quatre *AhR2*, présentés dans le tableau 5.2. Récemment, l'étude de Doering et collaborateurs (2018) a confirmé la présence d'un gène *AhR1* et un *AhR2* chez le mené à grosse tête. À nouveau, cette étude a validé que les salmonidés (*Salvelinus namaycush* et *Salvelinus fontinalis*) étaient plus sensibles aux expositions à la dioxine que les menés à grosse tête. Dans le cadre de cette thèse, les taux de mortalité des trois espèces de poissons concordent avec la littérature. Premièrement, le mené à grosse tête a été exposé à partir de l'éclosion dans un environnement

de 24 °C. Cette espèce était la plus résistante aux expositions. En effet, des taux de mortalité significatifs ont été observés à 75 % de WAF pour le pétrole conventionnel et le dilbit Bluesky, et à 25 % de WAF pour le dilbit Clearwater (Tableau 5.2). Le mené à grosse tête a été exposé à partir de l'éclosion seulement, donc pour comparer adéquatement la toxicité entre les espèces, il faut regarder l'exposition de la truite arc-en-ciel qui a été faite durant le même stade de vie, soit l'Exposition 4 (Figure 3.1). Les taux de mortalité de la truite arc-en-ciel exposée à partir de l'éclosion étaient significativement plus élevés à 32 % et à 10 % de WAF du pétrole conventionnel et du dilbit Clearwater, respectivement. Donc, pour le mené à grosse tête exposé au dilbit, 25 % de WAF a induit un taux de mortalité significatif, alors que pour la truite arc-en-ciel 10 % de WAF a été suffisant pour induire un taux de mortalité significatif. Pour l'exposition du mené à grosse tête à 25 % de WAF, les concentrations estimées de HAP et de COV étaient de 8 µg/L et de 1100 µg/L, respectivement. Pour l'exposition de la truite à 10 % de WAF, les concentrations de HAP et de COV étaient de 5 µg/L et de 280 µg/L, respectivement. La concentration de WAF qui a induit une mortalité significative chez la truite arc-en-ciel était inférieure et comportait aussi moins de composés pétroliers que la concentration ayant causé un taux de mortalité significative chez le mené à grosse tête. À l'éclosion, la truite arc-en-ciel serait affectée par de plus faibles concentrations d'hydrocarbures dans l'eau que le mené à grosse tête, malgré la différence de température. La mortalité chez les alevins de la truite arc-en-ciel a été observée à partir de sept jours d'exposition, soit la durée de l'exposition du mené à grosse tête. La température plus froide et le développement plus lent ralentissent la toxicité et la mortalité causées par les hydrocarbures, cependant pour la même durée d'exposition et une concentration plus faible d'hydrocarbures, la truite arc-en-ciel avait un taux de mortalité plus élevé.

Ensuite, les taux de mortalité induits par les expositions chez le saumon atlantique et la truite arc-en-ciel pour les mêmes expositions, c'est-à-dire à partir de la fertilisation (E1) ou à partir du stade œillé (Truite : E3, Saumon : E2, Tableau 5.2), démontrent que le saumon atlantique semble plus sensible que la truite arc-en-ciel. En effet, pour les deux espèces, les expositions au dilbit ont induit des taux de mortalité significatifs lors de l'exposition débutant à la fertilisation, cependant 32 % de WAF ont été nécessaires pour induire de la mortalité chez la truite, alors que 3,2 % de WAF a causé un taux de mortalité significatif chez le saumon atlantique. Les embryons de saumon ont donc eu des taux de mortalité plus grands, malgré une exposition à des concentrations d'hydrocarbures plus faibles. En revanche, les expositions du saumon atlantique avaient une durée d'environ quatre mois (de la fertilisation à l'éclosion), tandis que celle de la truite avait une durée de deux mois pour les mêmes stades de développement. La durée de l'exposition peut avoir affecté les taux de mortalité entre les espèces, cependant en se fiant aux stades de développement seulement, le saumon atlantique est le plus sensible, suivi de la truite arc-en-ciel, et tel qu'attendu, le mené à grosse tête est l'espèce la plus résistante aux contaminants dans cette étude.

Tableau 5.2. Comparaison des gènes AhR et la sensibilité du mené à grosse tête, de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique lors d'expositions au pétrole conventionnel Lloydminster et aux dilbits Bluesky et Clearwater McMurray. Le pourcentage de WAF indiqué pour chaque exposition est le plus bas pourcentage à avoir induit un taux de mortalité significativement plus élevé que le contrôle.

Espèce	Gènes <i>AhR</i>	Pétrole	% WAF induisant de la mortalité ($p < 0.05$)
Mené à grosse tête	<i>AhR1</i> <i>AhR2</i>	Lloydminster conventionnel	75
		Bluesky dilbit	75
		Clearwater dilbit	25
Truite arc-en-ciel	<i>AhR1</i> <i>AhR2α</i> <i>AhR2β</i>	Lloydminster conventionnel	E1 : 32 E2 : 32 E3 : > 32 E4 : 32 E5 : > 32
		Clearwater dilbit	E1 : 32 E2 : 10 E3 : > 32 E4 : 10 E5 : 32
Saumon atlantique	<i>AhR1α</i> <i>AhR1β</i> <i>AhR2α</i> <i>AhR2β</i> <i>AhR2δ</i> <i>AhR2γ</i>	Lloydminster conventionnel	E1 : 10 E2 : > 32
		Clearwater dilbit	E1 : 3.2
			E2 : > 32

Références pour les gènes *AhR* : Doering *et al.*, 2018; Hansson & Hahn, 2008; Hansson *et al.*, 2004; Hansson *et al.*, 2003.

5.3 Limites de l'étude

Plusieurs techniques de préparation des milieux d'expositions sont trouvées dans la littérature actuelle. Parmi ces techniques, certaines utilisent l'agitation mécanique afin de dissoudre les hydrocarbures des pétroles dans l'eau, alors que d'autres utilisent une combinaison de dispersion mécanique et chimique. La dispersion chimique est une technique de remédiation utilisée lors de déversement dans les milieux marins. Cette méthode n'est pas utilisée en eau douce, donc n'a pas été prise en compte dans cette étude. Chacune de ces méthodes possède des avantages et des inconvénients. La méthode utilisée dans cette thèse se nomme la méthode de la fraction adaptée à l'eau (water accommodated fraction: WAF). Cette méthode nécessite une préparation quotidienne et un renouvellement quotidien des milieux d'exposition. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'évaluer les composés pétroliers dissous dans l'eau à partir des pétroles non vieillis ; la technique de préparation des WAF limite le vieillissement du pétrole causé par les conditions environnementales lors d'un déversement. Puis, la dilution des WAF permet d'obtenir une gamme de concentrations d'hydrocarbures dans l'eau similaires à celles mesurées à proximité d'un déversement et en aval.

Les articles de cette thèse ont démontré que les composés principaux liés à la mortalité sont les composés de faible poids moléculaire. Ces observations sont en accord avec la littérature. Les composés de faibles poids moléculaires ont une solubilité élevée. Ils étaient les plus concentrées dans les WAF préparés lors de chacune des expositions de cette thèse. Cependant, cette technique ne représente pas la réalité des déversements de pétroles à long terme. Normalement, les composés pétroliers légers sont évaporés et dissous rapidement, soit dans les quelques heures à environ une journée après un déversement. En préparant les WAF quotidiennement, les composés légers sont renouvelés aussi quotidiennement, créant une concentration de composés légers plus stable dans nos expositions que dans la nature. Globalement, ceci peut augmenter la toxicité des pétroles dans nos analyses par rapport à la toxicité réelle d'un déversement en eau douce.

Ensuite, les expositions de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique réalisées dans cette thèse sont des expositions chroniques s'étant étendues sur l'entièreté du développement embryonnaire des deux espèces, et même plus encore. Il est peu probable qu'une quantité de pétrole importante soit déversée d'un oléoduc durant 2 à 4 mois. D'un autre côté, plusieurs petites fuites d'oléoducs restent indétectées durant des jours voire des semaines. De ce fait, les concentrations élevées utilisées dans ce projet de recherche ne sont probablement pas réalistes, tandis que les concentrations de WAF les plus faibles seraient plus réalistes pour des études de longues durées, telles que celles réalisées dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse.

Les pétroles possèdent des compositions hétérogènes et variables, ce qui rend leur analyse complexe et coûteuse. L'établissement de profils chimiques complets des pétroles n'a pas été fait dans cette thèse, et est

rarement fait dans la littérature. Donc, il est difficile de déterminer précisément les relations entre chaque composé chimique et les réponses biologiques observées. Les composés pétroliers sont classifiés en quatre grandes catégories (Saturés, Aromatiques, Résines et Asphaltènes : SARA). Il serait nécessaire dans les études toxicologiques futures de mesurer les composés principaux de chacune de ces catégories, dans l'intention de pouvoir lier avec précision les composés chimiques aux effets observés. L'application de ces connaissances permettrait de pouvoir mieux prévoir et gérer les effets des déversements de pétroles sur la faune d'eau douce, selon le type de pétrole déversé.

Une des limites de cette étude provient du fait que les malformations des poissons du chapitre 2 n'ont pas été compilées. Plusieurs biomarqueurs intéressants ont été mesurés et analysés, cependant le *Blue sac disease* est connu pour être un ensemble de symptômes chez les poissons exposés aux produits pétroliers. Ces effets sont généralement observés après des expositions à de faibles concentrations de HAP (ng/L). L'analyse des malformations, donc du *Blue sac disease*, chez le mené à grosse tête n'a pas été faite. Il est donc probable que certains effets sous-létaux induits par les faibles concentrations de pétrole n'aient pas été observés dans notre étude. De plus, pour le chapitre 3 sur la truite arc-en-ciel, cinq expositions ont été faites, mais pour certaines expositions, les taux de mortalité élevés n'ont pas permis d'obtenir suffisamment de tissu pour réaliser toutes les analyses prévues.

Finalement, les mesures d'expression génique ont été faites seulement à la fin des expositions. Tel que démontré dans la majorité des chapitres, nos résultats font face au biais du survivant. Il aurait été intéressant d'analyser la réponse initiale des organismes à l'exposition, ainsi que les changements moléculaires avant la mort de l'organisme. Aussi, certaines évidences démontrent que le sexe biologique aurait un impact sur les réponses géniques et moléculaires des individus. Étant donné le stade de développement des organismes exposés, le sexe n'a pu être déterminé.

5.4 Retombées scientifiques

Cette thèse a permis d'observer la toxicité des pétroles bitumineux dilués sur trois espèces de poissons d'ici. À présent, aucune autre étude n'a comparé la toxicité des pétroles conventionnels lourds et des bitumes dilués en utilisant la même technique d'exposition sur trois espèces vivant principalement ou en partie en eau douce. De plus, ces espèces ont des cycles de vie différents et vivent à des températures optimales différentes. Cette thèse permet donc de mettre en évidence plusieurs facteurs physiologiques pouvant affecter la toxicité des pétroles. Tel que discuté dans la section 1.2.14, les espèces aquatiques possèdent plusieurs gènes *AhR*, exprimés différemment dans les tissus et ayant une affinité différente pour les contaminants. Ces différences moléculaires influencent la sensibilité des espèces aux expositions aux hydrocarbures et autres ligands d'*AhR*. Les trois chapitres de cette thèse renforcent les observations et les prédictions sur la toxicité des produits pétroliers : les salmonidés sont parmi les espèces les plus sensibles aux contaminations par les hydrocarbures dû à la variété de gènes *AhR* qu'ils possèdent. Le mené à grosse tête est connu pour être plus résistant aux changements environnementaux et aux contaminants et possède le moins de gènes *AhR* parmi les trois espèces étudiées dans cette thèse. Tel qu'avancé par Doering *et al.* (2018), l'activation de la protéine *AhR* serait responsable de la toxicité qui s'ensuit par la perturbation de voies moléculaires connexes et des facteurs de croissance VEGF et TGF- β . L'activation de *AhR* et du métabolisme de détoxification augmente les métabolites réactifs des hydrocarbures et augmente la formation des molécules oxydantes dans la cellule. Il est donc plausible que les organismes ayant plus de gènes *AhR* subissent aussi plus de répercussions lorsqu'ils sont exposés aux ligands d'*AhR*.

Une autre observation importante dans cette thèse, faite lors des expositions de la truite arc-en-ciel, est que les poissons exposés durant leur développement embryonnaire peuvent subir des effets à long terme. Les poissons, après avoir été exposés durant leur développement, peuvent toujours être affectés par les expositions, même après la remédiation de leur environnement. Ceci démontre qu'un déversement de pétrole en eau douce se produisant en même temps que la période de ponte des poissons pourrait être dommageable pour la population à plus long terme. Des effets similaires (i.e., mortalité, retards de croissance, cardiotoxicité, etc.) avaient été observés sur une multitude d'espèces d'eau salée lors du déversement du Deepwater Horizon dans le Golfe du Mexique, qui coïncidait avec la période de ponte de ces espèces (Incardona *et al.*, 2014). De plus, les résultats obtenus dans cette thèse mettent en évidence l'importance de tenir compte du stade de vie des espèces aquatiques lorsqu'un déversement survient. Chaque stade de vie a une sensibilité différente : nos expositions ont démontré que les embryons en début de développement et les poissons immédiatement après l'éclosion étaient les plus sensibles. En effet, les embryons, immédiatement après la fertilisation, subissent des changements moléculaires importants et orchestrés de manière précise. Des perturbations lors de ces étapes sensibles peuvent être fatales pour les

embryons ou peuvent induire des effets néfastes à long terme. Puis, lors de l'éclosion, les poissons dont les organes vitaux sont déjà formés sont plus aptes à se défendre et à répondre aux contaminations. En revanche, l'augmentation de la surface de contact des embryons avec l'eau contaminée peut augmenter l'absorption des contaminants principalement les hydrocarbures de faible poids moléculaire, qui sont aussi les plus toxiques.

Cette thèse renforce le constat que les pétroles, conventionnels ou non, sont des mélanges complexes et hétérogènes dont il est nécessaire d'évaluer les profils chimiques complets, afin de réaliser des études précises d'évaluation des risques. La comparaison des résultats des trois articles de cette thèse confirme que chaque groupe de composés pétroliers induit des effets spécifiques et différents sur les organismes vivants. Malgré la mesure de quatre groupes d'hydrocarbures les plus fréquemment trouvés dans les pétroles, cette étude démontre qu'il y a certainement d'autres contaminants ou d'autres facteurs pouvant affecter la toxicité des pétroles pour les poissons d'eau douce. Les taux de mortalité obtenus semblent généralement être liés à la concentration d'hydrocarbures à faible poids moléculaire, cependant les résultats obtenus dans l'étude sur le mené à grosse tête semblent indiquer que des composés supplémentaires auraient un impact sur la toxicité des pétroles, par exemple les composés oxydés mesurés dans l'étude de Lara-Jacobo *et al.* (2020). Il est aussi probable que certains composés pétroliers agissent en synergie pour induire des effets toxiques plus importants que les composés individuellement. Donc, il devient important de réaliser des études sur les produits pétroliers en mélanges et pas seulement des composés individuels, car les composés pétroliers peuvent induire des effets complémentaires, additifs ou synergiques. Plus d'études sont nécessaires pour comprendre les interactions des composés pétroliers et les effets sur les biomarqueurs mesurés. Dans le cas de cette thèse, les deux pétroles bitumineux utilisés provenaient chacun d'un seul site d'extraction, alors que généralement les dilbits en circulation dans les oléoducs sont des mélanges de pétroles de différents puits ou sites d'extraction. La provenance des pétroles est un indicateur de leur composition chimique, de leur concentration en soufre et en autres composés.

Les trois espèces de cette étude ont été choisies pour l'écart entre leur température préférentielle de reproduction. La température affecte le métabolisme des organismes, mais aussi les propriétés chimiques et physiques des pétroles. En effet la température de l'eau et de l'air influence la dissolution des composés pétroliers, et de ce fait leur biodisponibilité. La sensibilité des espèces aux peut aussi être prédite par la quantité de gènes AhR qu'elles possèdent. En effet, le saumon atlantique est le plus sensible aux expositions, probablement dû à ses multiples versions du gène *AhR*. De plus, les embryons de saumon atlantique se développent préférentiellement de 0 à 7 °C et leur développement est environ deux fois plus lent que celui de la truite arc-en-ciel. En comparant les expositions des deux espèces durant le même stade de développement, les taux de mortalité semblaient similaires à la fin des expositions, cependant des

concentrations d'hydrocarbures plus faibles causaient des taux de mortalité significatifs chez le saumon. Globalement, la comparaison de la toxicité des pétroles entre les trois espèces des études de cette thèse confirme que le saumon atlantique est le plus sensible aux expositions aux hydrocarbures, suivi par la truite arc-en-ciel et en dernier le mené à grosse tête qui est le moins sensible.

L'objectif principal de cette thèse était de comparer la toxicité des pétroles conventionnels et des pétroles dilbit. Chacun des articles de cette thèse a permis d'observer que la toxicité des pétroles, peu importe leur type, dépendait largement de la teneur en composés à faible poids moléculaire. L'ajout de diluant des dilbits augmente généralement la concentration de ces composés, dont les COV, les BTEX et les C₆-C₁₀, qui sont reconnus pour causer de la toxicité aigüe dans les quelques heures après les déversements de pétroles. La toxicité des dilbits est donc équivalente ou supérieure à la toxicité des pétroles conventionnels lourds, dépendamment de la concentration de diluant ajouté au pétrole bitumineux. Globalement, cette thèse a permis de comparer la méthodologie de préparation des WAF à différentes températures, les effets des expositions sur trois espèces de poissons d'eau douce lors de différents stades de vie, et a surtout fait la lumière sur la comparaison de la toxicité des pétroles non conventionnels et des pétroles conventionnels.

5.5 Perspectives

Tout d'abord, à la lumière des résultats obtenus dans cette thèse, il est clair que les effets des pétroles conventionnels et non conventionnels sur la faune d'eau douce sont multiples et variables, dû à leur composition hétérogène et aux effets de l'environnement sur le vieillissement des pétroles. Malgré l'abondance d'études sur les effets des pétroles, plus d'études comparatives sur les types de pétroles sont toujours nécessaires dû aux différences marquées entre les types de pétroles et leur composition chimiques. Ces études apporteraient plus d'information sur la toxicité des différents types de produits pétroliers, lorsque ceux-ci sont étudiés dans des circonstances similaires. Encore à ce jour, trop d'études sont réalisées en utilisant un seul type de pétrole à la fois et ne rapportent leurs résultats qu'en fonction des HAP au lieu de tenir compte de l'ensemble des composés pétroliers. Ces études, quoi que pertinentes, ne tiennent pas compte du profil chimiques complet des produits pétroliers et des effets synergiques ou additifs des hydrocarbures contenus dans les pétroles qui sont des mélanges complexes. D'ailleurs, aucune étude à ce jour ne s'est penchée sur la toxicité des diluants seuls pour réellement comprendre leur importance dans la toxicité des pétroles bitumineux dilués. Il serait pertinent de comprendre leur influence et ainsi d'obtenir une meilleure prédiction de la toxicité des dilbits, selon la quantité de diluant ajouté. Malheureusement, ces produits et leur composition, outre les composés volatils ou monoaromatiques, sont gardés confidentiels par les compagnies pétrolières, ce qui rend leur analyse improbable, mais non pas moins importante.

Ensuite, les trois projets de cette thèse ont été réalisés en laboratoire, sous des conditions contrôlées. Les expositions ne reflètent pas totalement la réalité des déversements dans les écosystèmes d'eau douce. Il serait intéressant de collaborer avec des chercheurs en hydrologie pour obtenir des données sur la dynamique de l'écoulement de l'eau autour des frayères des différentes espèces. Ces données pourraient être transposées en laboratoire, afin d'augmenter la similarité de la chimie des milieux d'expositions et de l'eau contaminée lors d'un déversement. De plus, il serait intéressant d'intégrer l'utilisation de substrats dans nos expositions. Il a été démontré que les dilbits peuvent couler et s'y mélanger, et ainsi les pétroles peuvent persister plus longtemps dans les cours d'eau. Ce fait est particulièrement important pour les salmonidés qui enfouissent leurs œufs sous des nids rocailleux pour les protéger. Les conditions d'expositions en laboratoire pourraient ainsi mieux refléter les conditions environnementales qui affectent la dissolution des composés pétroliers dans l'eau et la réalité des frayères. De telles études apporteraient plus de variables à analyser, mais apporteraient plus de précision et de réalisme pour évaluer les risques environnementaux des déversements de pétroles.

En terminant, les deux chapitres sur les salmonidés ont permis de comparer la toxicité des pétroles sur les différents stades de développement. L'intérêt premier de ces chapitres était de comparer la toxicité des pétroles. En conséquence, les effets moléculaires des composés pétroliers sur le développement n'ont pas

été étudiés en profondeur. Par exemple, pour le quatrième chapitre, l'expression de certains gènes du métabolisme de la vitamine A et de la réparation de l'ADN a été mesurée, mais les raisons expliquant les modifications dans l'expression de ces gènes n'ont pas été investiguées. Les études futures pourraient se pencher les effets moléculaires des pétroles lors du développement, principalement sur certaines voies qui ont jusqu'à présent été peu étudiées, telles que la différenciation cellulaire, l'apoptose et les mécanismes de communication cellulaire. Certaines études ont émis l'hypothèse que ces voies sont perturbées par les hydrocarbures, principalement par les interactions des voies de AhR avec ses voies (Shankar *et al.*, 2020), mais les mécanismes précis restent encore à être investigués. Ces mécanismes sont particulièrement importants pour le développement des organismes et de comprendre l'influence des pétroles sur ceux-ci permettrait d'enrichir nos connaissances sur la toxicité des pétroles.

Depuis les dernières années, les études sur les effets des pétroles conventionnels et non conventionnels ont augmenté et se sont diversifiées. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux prédire les effets des déversements de pétroles non conventionnels sur la faune d'eau douce québécoise et canadienne. Les tracés des projets d'oléoducs doivent être faits en évitant de traverser les aires de répartition des espèces vulnérables, afin d'en assurer la protection. Malgré les affirmations des compagnies pétrolières disant que l'oléoduc est le moyen de transport des produits pétroliers le plus sécuritaire, les risques de déversements persistent et doivent être évités pour la protection et la santé de l'environnement.

6 Bibliographic

- Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B & Andersen OK (2000) PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat Toxicol* 51(2):241-258.
- Abeti R, Uzun E, Renganathan I, Honda T, Pook MA & Giunti P (2015) Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich's ataxia. *Pharmacological Research* 99:344-350.
- Abnet CC, Tanguay RL, Hahn ME, Heideman W & Peterson RE (1999) Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Evidence for differential expression and enhancer specificity. *J Biol Chem* 274(21):15159-15166.
- Adams J, Bornstein JM, Munno K, Hollebhone B, King T, Brown RS & Hodson PV (2014) Identification of compounds in heavy fuel oil that are chronically toxic to rainbow trout embryos by effects-driven chemical fractionation. *Environmental toxicology and chemistry* 33(4):825-835.
- Adams JE, Madison BN, Charbonneau K, Sereneo M, Baillon L, Langlois VS, Brown RS & Hodson PV (2020) Effects on Trout Alevins of Chronic Exposures to Chemically Dispersed Access Western Blend and Cold Lake Blend Diluted Bitumens. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39(8):1620-1633.
- Adams, J, Charbonneau, K, Tuori, D, Brown, RS and Hodson, PV (2017) Review of Methods for Measuring the Toxicity to Aquatic Organisms of the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fraction (CEWAF) of petroleum. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2017/064. xi + 110 p.
- Advait B, Shanta S & Abhijit M (2013) Bioaccumulation kinetics and bioconcentration factors for polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues of rasbora daniconius. *International Journal of chemical and physical sciences* 2(Special Issue).
- Alak G, Ucar A, Parlak V, Yeltekin AÇ, Taş IH, Ölmez D, Kocaman EM, Yılmaz M, Atamanalp M & Yanık T (2017) Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, gene expression and antioxidant enzyme activity on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues exposed to biopesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 203:51-58.
- Alboukadel Kassambara (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.2.5. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Alderman SL, Dilkumar CM, Avey SR, Farrell AP, Kennedy CJ & Gillis TE (2020) Effects of diluted bitumen exposure and recovery on the seawater acclimation response of Atlantic salmon smolts. *Aquatic Toxicology* 221:105419.
- Alderman SL, Dindia LL, Kennedy CJ, Farrell AP & Gillis TE (2017a) Proteomic analysis of sockeye salmon serum as a tool for biomarker discovery and new insight into the sublethal toxicity of diluted bitumen. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D* 22:157-166.
- Alderman SL, Lin F, Farrell AP, Kennedy CJ & Gillis TE (2017b) Effects of diluted bitumen exposure on juvenile sockeye salmon: From cells to performance. *Environ Toxicol Chem* 36(2):354-360.
- Alderman SL, Lin F, Gillis TE, Farrell AP & Kennedy CJ (2018) Developmental and latent effects of diluted bitumen exposure on early life stages of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Aquat Toxicol* 202:6-15.
- Alexa K, Choe S-K, Hirsch N, Etheridge L, Laver E & Sagerström CG (2009) Maternal and zygotic aldh1a2 activity is required for pancreas development in zebrafish. *PLoS One* 4(12):e8261-e8261.

- Alharbi HA, Saunders DMV, Al-Mousa A, Alcorn J, Pereira AS, Martin JW, Giesy JP & Wiseman SB (2016) Inhibition of ABC transport proteins by oil sands process affected water. *Aquatic Toxicology* 170:81-88.
- Alsaadi FM, Hodson PV & Langlois VS (2018) An Embryonic Field of Study: The Aquatic Fate and Toxicity of Diluted Bitumen. *Bull Environ Contam Toxicol* 100(1):8-13.
- Alsaadi FM, Madison BN, Brown RS, Hodson PV & Langlois VS (2018b) Morphological and molecular effects of two diluted bitumens on developing fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 204:107-116.
- Alsop D, Brown S & Van Der Kraak G (2007) The effects of copper and benzo[a]pyrene on retinoids and reproduction in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 82(4):281-295.
- Andreasen EA, Hahn ME, Heideman W, Peterson RE & Tanguay RL (2002a) The Zebrafish (*Danio rerio*) Aryl Hydrocarbon Receptor Type 1 Is a Novel Vertebrate Receptor. *Molecular Pharmacology* 62(2):234-249.
- Andreasen EA, Spitsbergen JM, Tanguay RL, Stegeman JJ, Heideman W & Peterson RE (2002b) Tissue-Specific Expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in Zebrafish Embryos and Larvae: Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure. *Toxicological Sciences* 68(2):403-419.
- Ankley GT & Villeneuve DL (2006) The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future. *Aquatic Toxicology* 78(1):91-102.
- Aoki Y (2001) Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters—What We Have Learned from Yusho Disease. *Environmental Research* 86(1):2-11.
- Aranguren-Abadía L, Donald CE, Eilertsen M, Gharbi N, Tronci V, Sørhus E, Mayer P, Nilsen TO, Meier S, Goksøyr A & Karlsen OA (2020) Expression and localization of the aryl hydrocarbon receptors and cytochrome P450 1A during early development of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* 226:105558.
- Arukwe A & Mortensen AS (2011) Lipid peroxidation and oxidative stress responses of salmon fed a diet containing perfluorooctane sulfonic- or perfluorooctane carboxylic acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154(4):288-295.
- Atlantic Salmon Federation (ASF), 2020. 2020 State of wild Atlantic salmon report. A summary of public reports on 2019 adult salmon returns and population.
- Avey SR, Kennedy CJ, Farrell AP, Gillis TE & Alderman SL (2020) Effects of diluted bitumen exposure on Atlantic salmon smolts: Molecular and metabolic responses in relation to swimming performance. *Aquatic Toxicology* 221:105423.
- Ayala A, Muñoz MF & Argüelles S (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:360438.
- Baldwin WS (2019) Phase 0 of the Xenobiotic Response: Nuclear Receptors and Other Transcription Factors as a First Step in Protection from Xenobiotics. *Nucl Receptor Res* 6.
- Barni MF, Gonzalez M & Miglioranza KS (2014) Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicol Environ Saf* 99:45-53.

- Barron MG, Conmy RN, Holder EL, Meyer P, Wilson GJ, Principe VE & Willming MM (2018) Toxicity of Cold Lake Blend and Western Canadian Select dilbits to standard aquatic test species. *Chemosphere* 191:1-6.
- Basu N, Billiard S, Fragoso N, Omoike A, Tabash S, Brown S & Hodson P (2001) Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in trout exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6):1244-1251.
- Bauder MB, Palace VP & Hodson PV (2005) Is oxidative stress the mechanism of blue sac disease in retene-exposed trout larvae? *Environ Toxicol Chem* 24(3):694-702.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T & Bellocq J (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36(12):951-960.
- Berlett BS & Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 272(33):20313-20316.
- Berntssen MHG, Ørnstrud R, Rasinger J, Sjøteland L, Lock E-J, Kolås K, Moren M, Hylland K, Silva J, Johansen J & Lie K (2016) Dietary vitamin A supplementation ameliorates the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 175:171-183.
- Bérubé R, Drigeard Desgarnier MC, Douki T, Lechasseur A & Rochette PJ (2018) Persistence and Tolerance of DNA Damage Induced by Chronic UVB Irradiation of the Human Genome. *J Invest Dermatol* 138(2):405-412.
- Bérubé, R, Gauthier C, Bourdin T, Bouffard M, Triffault-Bouchet G, Langlois VS and Couture P (2021). Lethal and sublethal effects of diluted bitumen and conventional oil on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae exposed during their early development. *Aquat Toxicol* 237: 105884.
- Bérubé R, Lefebvre-Raine M, Gauthier C, Bourdin T, Bellot P, Triffault-Bouchet G, Langlois VS & Couture P (2022) Comparative toxicity of conventional and unconventional oils during rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryonic development: From molecular to health consequences. *Chemosphere* 288(Pt 2):132521.
- Bettim FL, Galvan GL, Cestari MM, Yamamoto CI & Silva de Assis HC (2016) Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere* 144:1467-1474.
- Billiard SM, Hahn ME, Franks DG, Peterson RE, Bols NC and Hodson PV (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133(1): 55-68.
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV & Di Giulio RT (2007) Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences* 105(1):5-23.
- Billiard SM, Querbach K & Hodson PV (1999) Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(9):2070-2077.
- Bird MG, Greim H, Snyder R & Rice JM (2005) International symposium: Recent advances in benzene toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 153-154:1-5.
- Blewett TA, Boyd A, Folkerts EJ, Snihur KN, Alessi DS & Goss G (2021) Effect of temperature on phenanthrene accumulation from hydraulic fracturing flowback and produced water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Pollution* 272:116411.
- Blier PU, Lemieux H & Pichaud N (2013) Holding our breath in our modern world: will mitochondria keep the pace with climate changes? *Canadian Journal of Zoology* 92(7):591-601.

- Bohr VA & Dianov GL (1999) Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81(1):155-160.
- Bougas B, Normandeau E, Pierron F, Campbell PGC, Bernatchez L & Couture P (2013) How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) – Results from a 1000 candidate-gene microarray. *Aquatic Toxicology* 142-143:355-364.
- Braithwaite E, Wu X & Wang Z (1998) Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* 19(7):1239-1246.
- Brannon EL, Collins KM, Brown JS, Neff JM, Parker KR & Stubblefield WA (2006) Toxicity of weathered Exxon Valdez crude oil to pink salmon embryos. *Environ Toxicol Chem* 25(4):962-972.
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(4):297-308.
- Brette F, Machado B, Cros C, Incardona JP, Scholz NL & Block BA (2014) Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science* 343(6172):772-776.
- Brette F, Shiels HA, Galli GL, Cros C, Incardona JP, Scholz NL & Block BA (2017) A Novel Cardiotoxic Mechanism for a Pervasive Global Pollutant. *Sci Rep* 7:41476.
- Brinkworth LC, Hodson PV, Tabash S & Lee P (2003) CYP1A induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) exposed to retene. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 66(7):627-646.
- Burczynski ME & Penning TM (2000) Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *ortho*-Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cancer Research* 60(4):908-915.
- Busato F & Maccari N (2016) Canadian oil sand extraction: Exploring the nexus between economic development and environmental sustainability. *The Extractive Industries and Society* 3(1):141-148.
- Cadigan KM & Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24):3286-3305.
- Canadian Association of Petroleum Producers (CAPP), Crude oil forecasts, markets and transportation, <https://www.capp.ca/publications-and-statistics/publications/338794>, accessed MARCH 3RD, 2021.
- Cantrell SM, Joy-Schleizinger J, Stegeman JJ, Tillitt DE & Hannink M (1998) Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 148(1):24-34.
- Carls MG & Thedinga JF (2010) Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Marine Environmental Research* 69(5):318-325.
- Carls MG, Holland L, Larsen M, Collier TK, Scholz NL & Incardona JP (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic Toxicology* 88(2):121-127.
- Carls MG, Rice SD & Hose JE (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(3):481-493.
- CEAEQ 2015. Détermination des composés organiques volatils dans l'eau et les sols: dosage par « Purge and Trap » couplé à un chromatographe en phase gazeuse et à un spectromètre de masse. MA. 400-COV 2.0. <http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400COV20.pdf>

- CEAEQ 2016. Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques: dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. MA. 400-HAP 1.1.
- Chatterjee N & Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58(5):235-263.
- Chen CS, Hseu YC, Liang SH, Kuo J-Y & Chen SC (2008) Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *Journal of Hazardous Materials* 153(1):351-356.
- Chen G, Lin J, Hu W, Cheng C, Gu X, Du W, Zhang J & Qu C (2018) Characteristics of a crude oil composition and its in situ waxing inhibition behavior. *Fuel* 218:213-217.
- Chen H & Juchau RM (1997) Glutathione S-transferases act as isomerases in isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *Biochemical Journal* 327(3):721-726.
- Cherr GN, Fairbairn E & Whitehead A (2017) Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development. *Annual Review of Animal Biosciences* 5(1):185-203.
- Cho S, Vijayaraghavan K, Spink D, Jung J, Morris R & Pauls R (2017) Assessment of regional acidifying pollutants in the Athabasca oil sands area under different emission scenarios. *Atmospheric Environment* 156:160-168.
- Colavecchia MV, Hodson PV & Parrott JL (2006) CYP1A Induction and Blue Sac Disease in Early Life Stages of White Suckers (*Catostomus commersoni*) Exposed to Oil Sands. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 69(10):967-994.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M & Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17(10):1195-1214.
- COSEWIC. 2014. COSEWIC assessment and status report on the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. xi + 60 pp. (www.registrelep-sararegistry.gc.ca/default_e.cfm).
- Cox GK, Crossley DA, Stieglitz JD, Heuer RM, Benetti DD & Grosell M (2017) Oil Exposure Impairs In Situ Cardiac Function in Response to β -Adrenergic Stimulation in Cobia (*Rachycentron canadum*). *Environmental Science & Technology* 51(24):14390-14396.
- Crosby S, Fay R, Groark C, Smith JR, Sullivan T, Pavia R & Shigenaka G (2013) Transporting Alberta oil sands products: defining the issues and assessing the risks. (No. NOS OR&R 44), NOAA Technical Memorandum. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Seattle, WA.
- Crude Quality Inc. (2020). Crude Monitor, Monthly reports. Retrieved from <https://www.crudemonitor.ca/>
- Crude Quality Inc. (CQI), 2018. [crudemonitor.ca](https://www.crudemonitor.ca/), [en ligne]. <https://www.crudemonitor.ca/home.php>. Page consultée le 08 juillet 2018.
- Dahlke F, Lucassen M, Bickmeyer U, Wohlrab S, Puvanendran V, Mortensen A, Chierici M, Pörtner H-O & Storch D (2020) Fish embryo vulnerability to combined acidification and warming coincides with a low capacity for homeostatic regulation. *Journal of Experimental Biology* 223(11).
- Dasgupta S, Digiulio RT, Drollette BD, L. Plata D, Brownawell BJ & McElroy AE (2016) Hypoxia depresses CYP1A induction and enhances DNA damage, but has minimal effects on antioxidant responses in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology* 177:250-260.

- Defo MA, Bernatchez L, Campbell PGC & Couture P (2014) Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquatic Toxicology* 154:207-220.
- Defo MA, Pierron F, Spear PA, Bernatchez L, Campbell PGC & Couture P (2012) Evidence for metabolic imbalance of vitamin A2 in wild fish chronically exposed to metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85:88-95.
- Denison MS & Nagy SR (2003) Activation of the Aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology* 43:309-334.
- Deshpande RS, Sundaravadivelu D, Campo P, SantoDomingo JW & Conmy RN (2017) Comparative Study on Rate of Biodegradation of Diluted Bitumen and Conventional Oil in Fresh Water. *International Oil Spill Conference Proceedings* 2017(1):2256-2267.
- Deshpande RS, Sundaravadivelu D, Techtmann S, Conmy RN, Santo Domingo JW & Campo P (2018) Microbial degradation of Cold Lake Blend and Western Canadian select dilbits by freshwater enrichments. *J Hazard Mater* 352:111-120.
- Dew WA, Hontela A, Rood SB & Pyle GG (2015) Biological effects and toxicity of diluted bitumen and its constituents in freshwater systems. *J Appl Toxicol* 35(11):1219-1227.
- Di Toro DM, Mcgrath JA & Stubblefield WA (2007). PREDICTING THE TOXICITY OF NEAT AND WEATHERED CRUDE OIL: TOXIC POTENTIAL AND THE TOXICITY OF SATURATED MIXTURES. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 24. <https://doi.org/10.1897/06174r.1>
- Doering JA, Giesy JP, Wiseman S & Hecker M (2013) Predicting the sensitivity of fishes to dioxin-like compounds: possible role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand binding domain. *Environmental Science and Pollution Research* 20(3):1219-1224.
- Doering JA, Wiseman S, Giesy JP & Hecker M (2018) A Cross-species Quantitative Adverse Outcome Pathway for Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leading to Early Life Stage Mortality in Birds and Fishes. *Environmental Science & Technology* 52(13):7524-7533.
- Dubansky B, Whitehead A, Miller JT, Rice CD & Galvez F (2013) Multitissue molecular, genomic, and developmental effects of the Deepwater Horizon oil spill on resident Gulf killifish (*Fundulus grandis*). *Environmental science & technology* 47(10):5074-5082.
- Elonen GE, Spehar RL, Holcombe GW, Johnson RD, Fernandez JD, Erickson RJ, Tietge JE & Cook PM (1998) Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(3):472-483.
- Environment Canada, 2005. Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. Environmental Protection Series. EPS 1/RM/46, 283 pp.
- Environment Canada, 2013. Properties, Composition and Marine Spill Behavior, Fate and Transport of Two Diluted Bitumen Products from the Canadian Oil Sands. Federal Government Technical Report. Environment Canada, Fisheries and Oceans Canada, Natural Resources Canada, p. 85. November 30, 2013.
- Environnement Canada, 1998. Méthode d'essai biologique : essai de toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique. Deuxième édition. Gouvernement du Canada. 129 pages et annexes.
- Environnement Canada, 2011. Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule. Deuxième édition. Gouvernement du Canada. 108 pages et annexes.

- EPA, 2013. Dredging Begins on Kalamazoo River, www.epa.gov/enbridgespill/pdfs/enbridge_fs_201308.pdf. Accessed March 2021.
- EPA, 2015. Emergency Response and Management Activities, 2015. EPA Protects Yellowstone River from Oil Spill. <https://www.epa.gov/emergency-response/emergency-response-and-management-activities-2015>. Accessed November 2021.
- Evans M, Dizdaroglu M & Cooke M (2004) Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567:1-61. *Mutation research* 567:1-61.
- Fairbairn EA, Bonthuis J & Cherr GN (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons and dibutyl phthalate disrupt dorsal–ventral axis determination via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 124-125:188-196.
- Fernández I & Gisbert E (2011) The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: A review. *Aquaculture* 315(1):34-48.
- Finkel ML (2018) The impact of oil sands on the environment and health. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 3:52-55.
- Finn RN (2007) The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology* 81(4):337-354.
- Fisk AT, Tomy GT & Muir DCG (1999). Toxicity of C₁₀-, C₁₁-, C₁₂-, and C₁₄-Polychlorinated alkanes to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), 2894-2902.
- Fleming CR & Di Giulio RT (2011) The role of CYP1A inhibition in the embryotoxic interactions between hypoxia and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH mixtures in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 20(6):1300-1314.
- Fleming CR, Billiard SM & Di Giulio RT (2009) Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(3):383-389.
- Fontagné-Dicharry S, Larroquet L, Dias K, Cluzeaud M, Héraud C & Corlay D (2018) Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 74:43-51.
- Fu PP, Xia Q, Sun X & Yu H (2012) Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 30(1):1-41.
- Gagliardi B, Long SM, Pettigrove VJ, Griffin PC & Hoffmann AA (2019) A Re-Evaluation of Chironomid Deformities as an Environmental Stress Response: Avoiding Survivorship Bias and Testing Noncontaminant Biological Factors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38(8):1658-1667.
- Gary R, Kim K, Cornelius HL, Park MS & Matsumoto Y (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274(7):4354-4363.
- Gauthier P, Norwood W, Prepas E & Pyle G (2014) Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology* 154:253-269.
- Giacchetta G, Leporini M & Marchetti B (2015) Economic and environmental analysis of a Steam Assisted Gravity Drainage (SAGD) facility for oil recovery from Canadian oil sands. *Applied Energy* 142:1-9.
- Gille G & Sigler K (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol (Praha)* 40(2):131-152.

- Girling AE, Whale GF & Adema DMM (1994) A guideline supplement for determining the aquatic toxicity of poorly water-soluble complex mixtures using water-accommodated fractions. *Chemosphere* 29(12):2645-2649.
- Glasauer SM & Neuhauss SC (2014) Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics* 289(6):1045-1060.
- Gräns J, Wassmur B & Celander MC (2010) One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology* 100(3):263-270.
- Griboff J, Horacek M, Wunderlin D & Monferran M (2017) Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by anthropic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and environmental safety* 148:275-284.
- Griffin FJ, Smith EH, Vines CA & Cherr GN (2009) Impacts of Suspended Sediments on Fertilization, Embryonic Development, and Early Larval Life Stages of the Pacific Herring, *Clupea pallasii*. *The Biological Bulletin* 216(2):175-187.
- Grundy, MM, Ratcliffe NA & Moore MN (1996). "Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons." *Marine Environmental Research* 42(1-4): 187-190.
- Guan Q, Goharzadeh A, Chai JC, Vargas FM, Biswal SL, Chapman WG, Zhang M & Yap YF (2018) An integrated model for asphaltene deposition in wellbores/pipelines above bubble pressures. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 169:353-373.
- Guerrero-Castilla A, Olivero-Verbel J & Marrugo-Negrete J (2014) Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 762:24-29.
- Haarmann-Stemmann T, Bothe H & Abel J (2009) Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical Pharmacology* 77(4):508-520.
- Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA & Perera SA (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25):13743-13748
- Hahn ME (1998) The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121(1-3):23-53.
- Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141(1-2):131-160.
- Hahn ME, Karchner SI, Evans BR, Franks DG, Merson RR & Lapsertis JM (2006) Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 305A(9):693-706.
- Hamdoun A & Epel D (2007) Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(6):1745-1750.
- Hansson MC, Wittzell H, Persson K & Von Schantz T (2003) Characterization of two distinct aryl hydrocarbon receptor (AhR2) genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and evidence for multiple AhR2 gene lineages in salmonid fish. *Gene* 303:197-206.
- Hansson MC, Wittzell H, Persson K & von Schantz T (2004) Unprecedented genomic diversity of AhR1 and AhR2 genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology* 68(3):219-232.

- Hansson MC & Hahn ME (2008) Functional properties of the four Atlantic salmon (*Salmo salar*) aryl hydrocarbon receptor type 2 (AHR2) isoforms. *Aquat Toxicol* 86(2):121-130.
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y & Syutsubo K (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 63-70. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1:63-70.
- Hassan I, Nasimudeen R J, Ahmad S, Shah A & Tabrez S (2015) Certain Phase I and II Enzymes as Toxicity Biomarker: An Overview. *Water, Air, & Soil Pollution* 226.
- Havas M, D.G W, P L, Yung Y-k, MacIsaac H & Hutchinson T (1995) Biological recovery of two previously acidified, metal-contaminated lakes near Sudbury Ontario, Canada. *Water Air and Soil Pollution* 85:791-796.
- Hawkins SA, Billiard SM, Tabash SP, Brown RS & Hodson PV (2002) Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9):1845-1853.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT & McMahon M (2009) Cross-talk between Transcription Factors AhR and Nrf2: Lessons for Cancer Chemoprevention from Dioxin. *Toxicological Sciences* 111(2):199-201.
- Head JA, Hahn ME & Kennedy SW (2008) Key Amino Acids in the Aryl Hydrocarbon Receptor Predict Dioxin Sensitivity in Avian Species. *Environmental Science & Technology* 42(19):7535-7541.
- Heintz RA (2007) Chronic exposure to polynuclear aromatic hydrocarbons in natal habitats leads to decreased equilibrium size, growth, and stability of pink salmon populations. *Integr Environ Assess Manag* 3(3):351-363.
- Heintz RA, Rice SD, Wertheimer AC, Bradshaw RF, Thrower FP, Joyce JE & Short JW (2000) Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Marine Ecology Progress Series* 208:205-216.
- Heintz RA, Short JW & Rice SD (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(3):494-503.
- Hermes-Lima M, Willmore WG & Storey KB (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic Biol Med* 19(3):271-280.
- Hicken CE, Linbo TL, Baldwin DH, Willis ML, Myers MS, Holland L, Larsen M, Stekoll MS, Rice SD, Collier TK, Scholz NL & Incardona JP (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(17):7086-7090.
- Hodson PV (2017). The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils. *Arch Environ Contam Toxicol*, 73(1), 12-18. doi:10.1007/s00244-016-0357-6
- Hodson PV, Qureshi K, Noble CA, Akhtar P & Brown RS (2007) Inhibition of CYP1A enzymes by alpha-naphthoflavone causes both synergism and antagonism of retene toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 81(3):275-285.
- Hodson PV, Wallace SJ, de Solla SR, Head SJ, Hepditch SLJ, Parrott JL, Thomas PJ, Berthiaume A & Langlois VS (2020) Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: The challenges of ecological risk assessments. *Environmental Pollution* 266:115165.
- Hoegberg P, Schmidt CK, Nau H, Ross AC, Zolfaghari R, Fletcher N, Trossvik C, Nilsson CB & Håkansson H (2003) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces lecithin: retinol acyltransferase transcription in the rat kidney. *Chem Biol Interact* 145(1):1-16.

- Horii Y, Khim JS, Higley EB, Giesy JP, Ohura T & Kannan K (2009) Relative Potencies of Individual Chlorinated and Brominated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Induction of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Responses. *Environmental Science & Technology* 43(6):2159-2165.
- Hornung MW, Cook PM, Fitzsimmons PN, Kuehl DW & Nichols JW (2007) Tissue Distribution and Metabolism of Benzo[a]pyrene in Embryonic and Larval Medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicological Sciences* 100(2):393-405.
- Hua Y, Mirnaghi FS, Yang Z, Hollebone BP & Brown CE (2018) Effect of evaporative weathering and oil-sediment interactions on the fate and behavior of diluted bitumen in marine environments. Part 1. Spill-related properties, oil buoyancy, and oil-particulate aggregates characterization. *Chemosphere* 191:1038-1047.
- Huang L & Batterman SA (2014) Multimedia Model for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Nitro-PAHs in Lake Michigan. *Environmental Science & Technology* 48(23):13817-13825.
- Incardona JP (2017) Molecular Mechanisms of Crude Oil Developmental Toxicity in Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 73(1):19-32.
- Incardona JP, Swarts TL, Edmunds RC, Linbo TL, Aquilina-Beck A, Sloan CA, Gardner LD, Block BA & Scholz NL (2013). Exxon Valdez to Deepwater Horizon: comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquat Toxicol*, 142-143, 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.011>
- Incardona JP, Carls MG, Holland L, Linbo TL, Baldwin DH, Myers MS, Peck KA, Tagal M, Rice SD & Scholz NL (2015) Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring. *Scientific Reports* 5(1):13499.
- Incardona JP, Gardner LD, Linbo TL, Brown TL, Esbaugh AJ, Mager EM, Stieglitz JD, French BL, Labenia JS, Laetz CA, Tagal M, Sloan CA, Elizur A, Benetti DD, Grosell M, Block BA & Scholz NL (2014) *Deepwater Horizon* crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(15):E1510-E1518.
- Incardona JP, Linbo TL & Scholz NL (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicology and Applied Pharmacology* 257(2):242-249.
- Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK & Scholz NL (2009) Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering. *Environmental Science & Technology* 43(1):201-207.
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK & Scholz NL (2005) Aryl Hydrocarbon Receptor-Independent Toxicity of Weathered Crude Oil during Fish Development. *Environmental Health Perspectives* 113(12):1755-1762.
- Incardona JP, Collier TK & Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196(2):191-205.
- Isabel RR, Sandra GA, Rafael VP, Carmen MV, Josefina CE, del Carmen CE, Rocío GM, Francisco AH & Elena CS (2012) Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol Mech Methods* 22(3):170-183.
- Ivanova NO, Xu Z, Liu Q & Masliyah JH (2017) Surface forces in unconventional oil processing. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 27:63-73.

- Jeziarska B, Ługowska K & Witeska M (2009) The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiol Biochem* 35(4):625-640.
- Ji Z, Zhang L, Guo W, McHale CM & Smith MT (2009) The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis* 24(4):367-372.
- Jung J-H, Kim M, Yim UH, Ha SY, Shim WJ, Chae YS, Kim H, Incardona JP, Linbo TL & Kwon J-H (2015) Differential Toxicokinetics Determines the Sensitivity of Two Marine Embryonic Fish Exposed to Iranian Heavy Crude Oil. *Environmental science & technology* 49(22):13639-13648.
- Karchner SI, Franks DG & Hahn ME (2005) AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem J* 392(Pt 1):153-161.
- Karchner SI, Franks DG, Kennedy SW & Hahn ME (2006) The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: Role of the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(16):6252-6257.
- Karmakar P, Balajee AS & Natarajan AT (2001) Analysis of repair and PCNA complex formation induced by ionizing radiation in human fibroblast cell lines. *Mutagenesis* 16(3):225-232.
- Kayal S & Connell DW (1995) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Biota from the Brisbane River Estuary, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 40(5):475-493.
- Keller W, Yan ND, Gunn JM & Heneberry J (2007) Recovery of Acidified Lakes: Lessons From Sudbury, Ontario, Canada. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 7(1):317-322.
- Kelman Z (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14(6):629-640.
- Kennedy CJ & Farrell AP (2005) Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 323(1):43-56.
- King T, Toole P, Robinson B, Ryan S, Lee K, Boufadel M, Li H & Clyburne J (2019) Influence of Climatic Parameters on Changes in the Density and Viscosity of Diluted Bitumen after a Spill.
- King TL, Mason J, Thamer P, Wohlgeschaffen G, Lee K & Clyburne J (2017) Composition of Bitumen Blends Relevant to Ecological Impacts and Spill Response in Fortieth AMOP Technical Seminar (*Environment and Climate Change Canada, Ottawa, ON*), p 463-475.
- King TL, Robinson B, Cui F, Boufadel M, Lee K & Clyburne JAC (2017) An oil spill decision matrix in response to surface spills of various bitumen blends. *Environmental science. Processes & impacts* 19(7):928-938.
- Kocan RM, Hose JE, Brown ED & Baker TT (1996) Pacific herring (*Clupea pallasii*) embryo sensitivity to Prudhoe Bay petroleum hydrocarbons: laboratory evaluation and in situ exposure at oiled and unoiled sites in Prince William Sound. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(10):2366-2375.
- Köhle C & Bock KW (2006) Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochemical Pharmacology* 72(7):795-805.
- Köhle C & Bock KW (2007) Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochemical Pharmacology* 73(12):1853-1862.
- Kosmachevskaya OV, Shumaev KB & Topunov AF (2019) Electrophilic Signaling: The Role of Reactive Carbonyl Compounds. *Biochemistry (Mosc)* 84(Suppl 1):S206-S224.
- Kozłowski H, Kolkowska P, Watly J, Krzywoszynska K & Potocki S (2014) General Aspects of Metal Toxicity. *Current Medicinal Chemistry* 21(33):3721-3740.

- Kreitsberg R, Baršienė J, Freiberg R, Andreikėnaitė L, Tammaru T, Rumvolt K & Tuvikene A (2013) Biomarkers of effects of hypoxia and oil-shale contaminated sediments in laboratory-exposed gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:227-235.
- Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J & Bradfield CA (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(19):10442-10447.
- Landau G, Kodali VK, Malhotra JD & Kaufman RJ (2013) Chapter Fourteen - Detection of Oxidative Damage in Response to Protein Misfolding in the Endoplasmic Reticulum. *Methods in Enzymology*, Cadenas E & Packer L (Édit.) Academic Press, Vol 526. p 231-250.
- Langheinrich U, Vacun G & Wagner T (2003) Zebrafish embryos express an orthologue of HERG and are sensitive toward a range of QT-prolonging drugs inducing severe arrhythmia. *Toxicol Appl Pharmacol* 193(3):370-382.
- Langley AR, Smith JC, Stemple DL & Harvey SA (2014) New insights into the maternal to zygotic transition. *Development* 141(20):3834-3841.
- Lapointe D & Couture P (2009) Influence of the Route of Exposure on the Accumulation and Subcellular Distribution of Nickel and Thallium in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57(3):571.
- Lara-Jacobo LR, Gauthier C, Xin Q, Dupont F, Couture P, Triffault-Bouchet G, Dettman HD & Langlois VS (2021) Fate and Fathead Minnow Embryotoxicity of Weathering Crude Oil in a Pilot-Scale Spill Tank. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40(1):127-138.
- Larigot L, Juricek L, Dairou J & Coumoul X (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* 7:1-9.
- Laurel BJ, Copeman LA, Iseri P, Spencer ML, Hutchinson G, N ordtug T, Donald CE, Meier S, Allan SE, Boyd DT, Ylitalo GM, Cameron JR, French BL, Linbo TL, Scholz NL & Incardona JP (2019) Embryonic Crude Oil Exposure Impairs Growth and Lipid Allocation in a Keystone Arctic Forage Fish. *iScience* 19:1101-1113.
- Le H-GT, Dowling JE & Cameron DJ (2012) Early retinoic acid deprivation in developing zebrafish results in microphthalmia. *Visual Neuroscience* 29(4-5):219-228.
- Lee K, Boufadel M, Chen B, Foght J, Hodson P, Swanson S & Venosa A (2015) The behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments. . *Ottawa: The Royal Society of Canada*.
- Lee S, Shin W-H, Hong S, Kang H, Jung D, Yim UH, Shim WJ, Khim JS, Seok C, Giesy JP & Choi K (2015b) Measured and predicted affinities of binding and relative potencies to activate the AhR of PAHs and their alkylated analogues. *Chemosphere* 139:23-29.
- Lepers C, André V, Dergham M, Billet S, Verdin A, Garçon G, Dewaele D, Cazier F, Sichel F & Shirali P (2014) Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA adducts generated by particulate matter pollution in BEAS-2B cell line: geographical and seasonal influence. *J Appl Toxicol* 34(6):703-713.
- Lewis SS, Weber GJ, Freeman JL & Sepúlveda MS (Molecular Epigenetic Changes Caused by Environmental Pollutants. *Toxicology and Epigenetics*, <https://doi.org/10.1002/9781118349045.ch5>. p 73-109.
- Li Z, Lee K, King T, Boufadel MC & Venosa AD (2010) Effects of temperature and wave conditions on chemical dispersion efficacy of heavy fuel oil in an experimental flow-through wave tank. *Marine Pollution Bulletin* 60(9):1550-1559.

- Lie KK, Meier S, Sørhus E, Edvardsen RB, Karlsen Ø & Olsvik PA (2019) Offshore Crude Oil Disrupts Retinoid Signaling and Eye Development in Larval Atlantic Haddock. *Frontiers in Marine Science* 6(368).
- Lim J & Luderer U (2018) Glutathione deficiency sensitizes cultured embryonic mouse ovaries to benzo[a]pyrene-induced germ cell apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 352:38-45.
- Lin F, Osachoff HL & Kennedy CJ (2020) Physiological disturbances in juvenile sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) exposed to the water-soluble fraction of diluted bitumen. *Aquatic Toxicology* 220:105383.
- Lister KN, Lamare MD & Burritt DJ (2015) Pollutant resilience in embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* reflects maternal antioxidant status. *Aquatic Toxicology* 161:61-72.
- Logeshwaran P, Megharaj M, Chadalavada S, Bowman M & Naidu R (2018) Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology and Innovation* 10:175-193.
- Łuczaj W & Skrzydlewska E (2003) DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett* 8(2):391-413.
- Lushchak V (2010) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 101:13-30.
- Lynam MM, Dvonch JT, Barres JA, Morishita M, Legge A & Percy K (2015) Oil sands development and its impact on atmospheric wet deposition of air pollutants to the Athabasca Oil Sands Region, Alberta, Canada. *Environ Pollut* 206:469-478.
- Ma Q & Baldwin KT (2000) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem* 275(12):8432-8438.
- Ma Q, Kinneer K, Bi Y, Chan JY & Kan YW (2004) Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377(Pt 1):205-213.
- Madison BN, Hodson PV & Langlois VS (2017) Cold Lake Blend diluted bitumen toxicity to the early development of Japanese medaka. *Environmental Pollution* 225:579-586.
- Mager EM, Esbaugh AJ, Stieglitz JD, Hoenig R, Bodinier C, Incardona JP, Scholz NL, Benetti DD & Grosell M (2014) Acute Embryonic or Juvenile Exposure to Deepwater Horizon Crude Oil Impairs the Swimming Performance of Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*). *Environmental Science & Technology* 48(12):7053-7061.
- Marentette JR, Frank RA, Bartlett AJ, Gillis PL, Hewitt LM, Peru KM, Headley JV, Brunswick P, Shang D & Parrott JL (2015) Toxicity of naphthenic acid fraction components extracted from fresh and aged oil sands process-affected waters, and commercial naphthenic acid mixtures, to fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Aquatic Toxicology* 164:108-117.
- Martins M & Costa PM (2015) The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. *Mutagenesis* 30(1):89-106.
- Marty GD, Hinton DE, Short JW, Heintz RA, Rice SD, Dambach DM, Willits NH & Stegeman JJ (1997) Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A

- induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. *Canadian Journal of Zoology* 75(6):989-1007.
- Mathew LK, Sengupta SS, Ladu J, Andreasen EA & Tanguay RL (2008) Crosstalk between AHR and Wnt signaling through R-Spondin1 impairs tissue regeneration in zebrafish. *FASEB J* 22(8):3087-3096.
- Mazzeo DE, Fernandes TC & Marin-Morales MA (2011) Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere* 85(1):13-18.
- Mazzeo DEC, Levy CE, de Angelis DdF & Marin-Morales MA (2010) BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *The Science of the total environment* 408(20):4334-4340.
- McDonnell D, Madison BN, Baillon L, Wallace SJ, Brown SR, Hodson PV & Langlois VS (2019) Comparative toxicity of two diluted bitumens to developing yellow perch (*Perca flavescens*). *Sci Total Environ* 655:977-985.
- Middaugh DP, Shelton ME, McKenney CL, Jr., Cherr G, Chapman PJ & Courtney LA (1998) Preliminary observations on responses of embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil. *Archives of environmental contamination and toxicology* 34(2):188-196.
- Mu J, Wang J, Jin F, Wang X & Hong H (2014) Comparative embryotoxicity of phenanthrene and alkyl-phenanthrene to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Marine Pollution Bulletin* 85(2):505-515.
- Munkittrick KR, Arens CJ, Lowell RB & Kaminski GP (2009) A review of potential methods of determining critical effect size for designing environmental monitoring programs. *Environ Toxicol Chem* 28(7):1361-1371.
- Murphy KA, Quadro L & White LA (2007) The Intersection Between the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)- and Retinoic Acid-Signaling Pathways. *Vitamins & Hormones*, Academic Press, Vol 75. p 33-67.
- Murphy KA, Villano CM, Dorn R & White LA (2004) Interaction between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Retinoic Acid Pathways Increases Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279(24):25284-25293.
- National Academies of Sciences E & Medicine (2016) *Spills of Diluted Bitumen from Pipelines: A Comparative Study of Environmental Fate, Effects, and Response*. The National Academies Press, Washington, DC. 166 p. <https://www.nap.edu/catalog/21834/spills-of-diluted-bitumen-from-pipelines-a-comparative-study-of>
- National Energy Board. Canada's pipelin transportation system. <https://www.nbe-one.gc.ca/nrg/ntgrtd/trnsprtn/2016/cnds-ppln-trnsprtn-systm-eng.html>. Consulté le 17 janvier 2018.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB & Gonzalez FJ (2004) Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer*. *Journal of Biological Chemistry* 279(23):23847-23850.
- Negrato E, Vascellari M, Capolongo F, Binato G, Da Dalt L, Boscolo Papo M, Gioacchini G, Carnevali O, Bertotto D, Radaelli G & Pascoli F (2013) Expression of 8-OHdG in Zosterisessor ophiocephalus from the Venetian lagoon, Italy. *Eur J Histochem* 57(1):e8.
- Niaz K, Bahadar H, Maqbool F & Abdollahi M (2015) A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI J* 14:1167-1186.
- Nilsson CB & Håkansson H (2002) The Retinoid Signaling System — A Target in Dioxin Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 32(3):211-232.

- Novák J, Beníšek M & Hilscherová K (2008) Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environment International* 34(6):898-913.
- Office national de l'énergie (ONÉ), 2018. Sécurité et environnement, Bilan du rendement sur le plan de la sécurité – mise à jour trimestrielle, [en ligne] <http://www.neb-one.gc.ca/sftnvrnmnt/sft/dshbrd/dshbrd-fra.html>. Page consulté le 08 juillet 2018.
- Oliveira M, Ahmad I, Maria VL, Ferreira CSS, Serafim A, Bebianno MJ, Pacheco M & Santos MA (2010) Evaluation of oxidative DNA lesions in plasma and nuclear abnormalities in erythrocytes of wild fish (*Liza aurata*) as an integrated approach to genotoxicity assessment. *Mutation research* 703(2):83-89.
- Ortmann AC, Cobanli SE, Wohlgeschaffen G, MacDonald J, Gladwell A, Davis A, Robinson B, Mason J & King TL (2020) Measuring the fate of different diluted bitumen products in coastal surface waters. *Marine Pollution Bulletin* 153:111003.
- Ott FS, Harris RP & O'Hara SCM (1978) Acute and sublethal toxicity of naphthalene and three methylated derivatives to the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*. *Marine Environmental Research* 1(1):49-58.
- Page LM & Burr BM (1991). A Field Guide to Freshwater Fishes: North America North of Mexico. Houghton Mifflin Company, Boston, Massachusetts.
- Parrott JL, Raine JC, McMaster ME & Hewitt LM (2019) Chronic toxicity of oil sands tailings pond sediments to early life stages of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Heliyon* 5(9):e02509.
- Pelka KE, Henn K, Keck A, Sapel B & Braunbeck T (2017) Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 185:1-10.
- Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T & Harvey RG (1996) Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol* 9(1):84-92.
- Perera RT, Fleming AM, Johnson RP, Burrows CJ & White HS (2015) Detection of benzo[a]pyrene-guanine adducts in single-stranded DNA using the α -hemolysin nanopore. *Nanotechnology* 26(7):074002.
- Peters LE, MacKinnon M, Van Meer T, van den Heuvel MR & Dixon DG (2007) Effects of oil sands process-affected waters and naphthenic acids on yellow perch (*Perca flavescens*) and Japanese medaka (*Orizias latipes*) embryonic development. *Chemosphere* 67(11):2177-2183.
- Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE & Irons DB (2003) Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* 302(5653):2082-2086.
- Peterson DR (1994) Calculating the aquatic toxicity of hydrocarbon mixtures. *Chemosphere* 29(12):2493-2506.
- Philibert DA, Lyons D, Philibert C & Tierney KB (2019) Field-collected crude oil, weathered oil and dispersants differentially affect the early life stages of freshwater and saltwater fishes. *Sci Total Environ* 647:1148-1157.
- Philibert DA, Lyons DD & Tierney KB (2021) Comparing the effects of unconventional and conventional crude oil exposures on zebrafish and their progeny using behavioral and genetic markers. *Science of The Total Environment* 770:144745.
- Philibert DA, Philibert CP, Lewis C & Tierney KB (2016) Comparison of Diluted Bitumen (Dilbit) and Conventional Crude Oil Toxicity to Developing Zebrafish. *Environmental Science & Technology* 50(11):6091-6098.

- Pierron F, Normandeau E, Defo MA, Campbell PGC, Bernatchez L & Couture P (2011) Effects of chronic metal exposure on wild fish populations revealed by high-throughput cDNA sequencing. *Ecotoxicology* 20(6):1388-1399.
- Pillai MC, Vines CA, Wikramanayake AH & Cherr GN (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons disrupt axial development in sea urchin embryos through a β -catenin dependent pathway. *Toxicology* 186(1):93-108.
- Polaris, 2013. A Comparison of the Properties of Diluted Bitumen Crudes with Other Oils. Polaris Applied Sciences Inc., Kirkland, WA USA, p. 26.
http://crrc.unh.edu/sites/crrc.unh.edu/files/comparison_bitumen_other_oils_polaris_2014.pdf.
- Pollenz RS, Necela B & Marks-Sojka K (2002) Analysis of rainbow trout Ah receptor protein isoforms in cell culture reveals conservation of function in Ah receptor-mediated signal transduction. *Biochemical Pharmacology* 64(1):49-60.
- Pyle GG, Kamunde CN, McDonald DG & Wood CM (2003) Dietary sodium inhibits aqueous copper uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 206(Pt 3):609-618.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- Rana R, Nanda S, Kozinski JA & Dalai AK (2018) Investigating the applicability of Athabasca bitumen as a feedstock for hydrogen production through catalytic supercritical water gasification. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(1):182-189.
- Rasmussen J, Gunn J, Sherwood G, Iles A & Gagnon A (2008) Direct and Indirect (Foodweb Mediated) Effects of Metal Exposure on the Growth of Yellow Perch (*Perca flavescens*): Implications for Ecological Risk. *Human and Ecological Risk Assessment - HUM ECOL RISK ASSESSMENT* 14.
- Ray PD, Huang BW & Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981-990.
- Recabarren-Villalón T, Ronda AC & Arias AH (2019) Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and potential biomarkers in a native South American marine fish. *Regional Studies in Marine Science* 29:100695.
- Rigaud C, Eriksson A, Rokka A, Skaugen M, Lihavainen J, Keinänen M, Lehtivuori H & Vehniäinen E-R (2020) Retene, pyrene and phenanthrene cause distinct molecular-level changes in the cardiac tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae, part 2 – Proteomics and metabolomics. *Science of The Total Environment* 746:141161.
- Roberts ES, Vaz AD & Coon MJ (1992) Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol Pharmacol* 41(2):427-433.
- Robidoux PY, Virginie B, Judith L & Marc D (2018) Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf* 164:331-343.
- Robidoux PY, Virginie B, Judith L & Marc D (2018) Assessment of acute and chronic toxicity of unweathered and weathered diluted bitumen to freshwater fish and invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf* 164:331-343.
- Ron AH, Stanley DR, Alex CW, Robert FB, Frank PT, John EJ & Jeffrey WS (2000) Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. *Marine Ecology Progress Series* 208:205-216.

- Roose P, Van Thuyne G, Belpaire C, Raemaekers M & Brinkman UAT (2003) Determination of VOCs in yellow eel from various inland water bodies in Flanders (Belgium). *Journal of Environmental Monitoring* 5(6):876-884.
- Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC & De Luca LM (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80(3):1021-1054.
- Rousseau ME, Sant KE, Borden LR, Franks DG, Hahn ME & Timme-Laragy AR (2015) Regulation of Ahr signaling by Nrf2 during development: Effects of Nrf2a deficiency on PCB126 embryotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 167:157-171.
- Rufli H, Fisk PR, Girling AE, King JMH, Länge R, Lejeune X, Stelter N, Stevens C, Suteau P, Tapp J, Thus J, Versteeg DJ & Niessen HJ (1998) Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile, and Unstable Substances and Interpretation and Use of Data. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39(2):72-77.
- Rushing SR & Denison MS (2002) The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 403(2):189-201.
- Salimi A, Talatappe BS & Pourahmad J (2017) Xylene Induces Oxidative Stress and Mitochondria Damage in Isolated Human Lymphocytes. *Toxicological Research* 33(3):233-238.
- Santana MS, Sandrini-Neto L, Filipak Neto F, Oliveira Ribeiro CA, Di Domenico M & Prodocimo MM (2018) Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution* 242:449-461.
- Santos C & Bueno dos Reis Martinez C (2020) Biotransformation in the fish *Prochilodus lineatus*: An organ-specific approach to cypla gene expression and biochemical activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 80:103467.
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC & Bradfield CA (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6731-6736.
- Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM & Hausen P (1996) β -catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mechanisms of Development* 57(2):191-198.
- Scott JA & Hodson PV (2008) Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and α -naphthoflavone. *Aquatic Toxicology* 88(3):200-206.
- Scott JA, Incardona JP, Pelkki K, Shepardson S & Hodson PV (2011) AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquatic Toxicology* 101(1):165-174.
- Sehring IM, Jahn C & Weidinger G (2016) Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration? *Curr Opin Genet Dev* 40:48-56.
- Serafin J, Guffey SC, Bosker T, Griffitt RJ, De Guise S, Perkins C, Szuter M & Sepúlveda MS (2019) Combined effects of salinity, temperature, hypoxia, and Deepwater Horizon oil on *Fundulus grandis* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 181:106-113.
- Shankar P, Dasgupta S, Hahn ME and Tanguay RL (2020). A Review of the Functional Roles of the Zebrafish Aryl Hydrocarbon Receptors. *Toxicol Sci* 178(2): 215-238.
- Shankar K & Mehendale HM (2014) Cytochrome P450. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Wexler P (Édit.) Academic Press, Oxford <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00299-2>. p 1125-1127.

- Shih TW, Lin TH, Shealy YF & Hill DL (1997) Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *Drug Metab Dispos* 25(1):27-32.
- Shipp LE & Hamdoun A (2012) ATP-binding cassette (ABC) transporter expression and localization in sea urchin development. *Dev Dyn* 241(6):1111-1124.
- Short J (2003) Long-Term Effects of Crude Oil on Developing Fish: Lessons from the Exxon Valdez Oil Spill. *Energy Sources* 25(6):509-517.
- Sikkema J, De Bont JA & Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269(11):8022-8028.
- Sikkema J, de Bont JA & Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59(2):201-222.
- Singer MM, Aurand D, Bragin GE, Clark JR, Coelho GM, Sowby ML & Tjeerdema RS (2000) Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. *Marine Pollution Bulletin* 40(11):1007-1016.
- Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, Thompson DC & Vasiliou V (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biology and Medicine* 56:89-101.
- Slaninova A, Smutna M, Modra H & Svobodova Z (2009) A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol Lett* 30 Suppl 1:2-12.
- Songe MM, Willems A, Sarowar MN, Rajan K, Evensen Ø, Drynan K, Skaar I & van West P (2016) A thicker chorion gives ova of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) the upper hand against Saprolegnia infections. *Journal of Fish Diseases* 39(7):879-888.
- Sørensen L, Hansen BH, Farkas J, Donald CE, Robson WJ, Tonkin A, Meier S & Rowland SJ (2019) Accumulation and toxicity of monoaromatic petroleum hydrocarbons in early life stages of cod and haddock. *Environ Pollut* 251:212-220.
- Sørhus E, Incardona JP, Furmanek T, Goetz GW, Scholz NL, Meier S, Edvardsen RB & Jentoft S (2017) Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *eLife* 6:e20707.
- Sørhus E, Incardona JP, Karlsen Ø, Linbo T, Sørensen L, Nordtug T, van der Meeren T, Thorsen A, Thorbjørnsen M, Jentoft S, Edvardsen RB & Meier S (2016) Crude oil exposures reveal roles for intracellular calcium cycling in haddock craniofacial and cardiac development. *Scientific Reports* 6(1):31058.
- Stachel SE, Grunwald DJ & Myers PZ (1993) Lithium perturbation and gooseoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* 117(4):1261-1274.
- Subramanian S, Simon S & Sjöblom J (2016) Asphaltene Precipitation Models: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology* 37(7):1027-1049.
- Tanguay RL, Andreasen EA, Walker MK & Peterson RE (2003) Dioxin toxicity and aryl hydrocarbon receptor signaling in fish. *Dioxins and Health* :603-628.
- Tharanivasan AK, Svrcek WY, Yarranton HW, Taylor SD, Merino-Garcia D & Rahimi PM (2009) Measurement and Modeling of Asphaltene Precipitation from Crude Oil Blends. *Energy & Fuels* 23(8):3971-3980.
- Thorne RE & Thomas GL (2007) Herring and the “Exxon Valdez” oil spill: an investigation into historical data conflicts. *ICES Journal of Marine Science* 65(1):44-50.

- Tichy ED (2011) Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Experimental Biology and Medicine* 236(9):987-996.
- Tierney KB, Kennedy CJ, Gobas F, Gledhill M & Sekela M (2013) 1 - Organic Contaminants and Fish. *Fish Physiology*, Tierney KB, Farrell AP & Brauner CJ (Édit.) Academic Press, Vol 33. p 1-52.
- Tremblay L, Kohl SD, Rice JA & Gagné J-P (2005) Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. *Marine Chemistry* 96(1):21-34.
- Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Matsuda T, Chiba T, Takeuchi S, Yasukawa F, Moroi Y & Furue M (2012) Identification of Ketoconazole as an AhR-Nrf2 Activator in Cultured Human Keratinocytes: The Basis of Its Anti-Inflammatory Effect. *Journal of Investigative Dermatology* 132(1):59-68.
- Tzortzaki EG, Dimakou K, Neofytou E, Tsikritsaki K, Samara K, Avgousti M, Amargianitakis V, Gousiou A, Menikou S & Siafakas NM (2012) Oxidative DNA Damage and Somatic Mutations: A Link to the Molecular Pathogenesis of Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Chest* 141(5):1243-1250.
- Vignet C, Frank RA, Yang C, Wang Z, Shires K, Bree M, Sullivan C, Norwood WP, Hewitt LM, McMaster ME & Parrott JL (2019) Long-term effects of an early-life exposure of fathead minnows to sediments containing bitumen. Part I: Survival, deformities, and growth. *Environmental Pollution* 251:246-256.
- Vines CA, Robbins T, Griffin FJ & Cherr GN (2000) The effects of diffusible creosote-derived compounds on development in Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Aquatic Toxicology* 51(2):225-239.
- Wang X & Seed B (2003) A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 31(24):e154.
- Wang X, Sperkova Z & Napoli JL (2001) Analysis of mouse retinal dehydrogenase type 2 promoter and expression. *Genomics* 74(2):245-250.
- Webb E, Moon J, Dyrzka L, Rodriguez B, Cox C, Patisaul H, Bushkin S & London E (2018) Neurodevelopmental and neurological effects of chemicals associated with unconventional oil and natural gas operations and their potential effects on infants and children. *Reviews on Environmental Health* 33(1):3-29.
- Wehner D, Cizelsky W, Vasudevaro MD, Ozhan G, Haase C, Kagermeier-Schenk B, Röder A, Dorsky RI, Moro E, Argenton F, Kühl M & Weidinger G (2014) Wnt/ β -catenin signaling defines organizing centers that orchestrate growth and differentiation of the regenerating zebrafish caudal fin. *Cell Rep* 6(3):467-481.
- Wen J, Zhang J, Wang Z & Zhang Y (2016) Correlations between emulsification behaviors of crude oil-water systems and crude oil compositions. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 146:1-9.
- Whysner J, Vijayaraj RM, Ross PM, Mohan M & Lax EA (2004) Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutation Research/reviews in Mutation Research*, 566(2), 99–130. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(03\)00053-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(03)00053-x)
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ & Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30(4):347-570.
- Wickham *et al.*, (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686, <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
- Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

- Wise JP, Jr., Wise JTF, Wise CF, Wise SS, Gianios C, Jr., Xie H, Thompson WD, Perkins C, Falank C & Wise JP, Sr. (2014) Concentrations of the genotoxic metals, chromium and nickel, in whales, tar balls, oil slicks, and released oil from the gulf of Mexico in the immediate aftermath of the deepwater horizon oil crisis: is genotoxic metal exposure part of the deepwater horizon legacy? *Environmental science & technology* 48(5):2997-3006.
- Wiseman S & Vijayan MM (2011) Aroclor 1254 disrupts liver glycogen metabolism and enhances acute stressor-mediated glycogenolysis in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 154(3):254-260.
- Wu G, Huang C & Yu Y-T (2015) Chapter Ten - Pseudouridine in mRNA: Incorporation, Detection, and Recoding. *Methods in Enzymology*, He C (Édit.) Academic Press, Vol 560. p 187-217.
- Xiao T, Shoeb M, Siddiqui MS, Zhang M, Ramana KV, Srivastava SK, Vasiliou V & Ansari NH (2009) Molecular Cloning and Oxidative Modification of Human Lens ALDH1A1: Implication in Impaired Detoxification of Lipid Aldehydes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72(9):577-584.
- Xu G (2018) Atmospheric Benzo[a]pyrene and vanadium evidence for the presence of petroleum coke dust in the Athabasca Oil Sands Region, Alberta, Canada. *Journal of Cleaner Production* 171:592-599.
- Yang Z, Hua Y, Mirnaghi F, Hollebone BP, Jackman P, Brown CE, Yang C, Shah K, Landriault M & Chan B (2018) Effect of evaporative weathering and oil-sediment interaction on the fate and behavior of diluted bitumen in marine environments. Part 2. The water accommodated and particle-laden hydrocarbon species and toxicity of the aqueous phase. *Chemosphere* 191:145-155.
- Yasui M, Kanemaru Y, Kamoshita N, Suzuki T, Arakawa T & Honma M (2014) Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair (Amst)* 15:11-20.
- Yueh M-F, Huang Y-H, Hiller A, Chen S, Nguyen N & Tukey RH (2003) Involvement of the Xenobiotic Response Element (XRE) in Ah Receptor-mediated Induction of Human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *Journal of Biological Chemistry* 278(17):15001-15006.
- Zhang L, Jin Y, Huang M & Penning TM (2012) The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Front Pharmacol* 3:193.
- Zhang QY, Dunbar D & Kaminsky L (2000) Human cytochrome P-450 metabolism of retinals to retinoic acids. *Drug Metab Dispos* 28(3):292-297.
- Zinflou C & Rochette PJ (2017) Ultraviolet A-induced oxidation in cornea: Characterization of the early oxidation-related events. *Free Radical Biology and Medicine* 108:118-128.
- Zocche JJ, Damiani AP, Hainzenreder G, Mendonça RÁ, Peres PB, Santos CEId, Debastiani R, Dias JF & Andrade VMd (2013) Assessment of heavy metal content and DNA damage in *Hypsiboas faber* (anuran amphibian) in coal open-casting mine. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(1):194-201.
- Zvinavashe E, van den Berg H, Soffers AEMF, Vervoort J, Freidig A, Murk AJ, & Rietjens IMCM (2008). QSAR Models for Predicting in Vivo Aquatic Toxicity of Chlorinated Alkanes to Fish. *Chemical Research in Toxicology*, 21(3), 739-745. doi:10.1021/tx700367c

7 Annexe

7.1 Protocoles expérimentaux détaillés

7.1.1 Préparation des WAF

Les WAF de cette étude ont été préparés en suivant les protocoles standardisés de Singer *et al.* (2020) et ont été décrit dans le deuxième chapitre de la thèse. Les photographies des figures Figure S7.1 et Figure S7.2 démontrent le type de contenant utilisé pour les expositions de mené à grosse tête et de la truite arc-en-ciel. Dans les deux cas, les contenants étaient en verre, avec un couvercle pouvant sceller complètement le contenant. Malgré la présence du couvercle, les pots étaient scellés à nouveau avec du parafilm pour assurer l'étanchéité. Les mélanges étaient préparés sous la hotte, puis placés dans le noir, dans la salle d'exposition pour que les WAF soient préparés à la même température que les expositions.

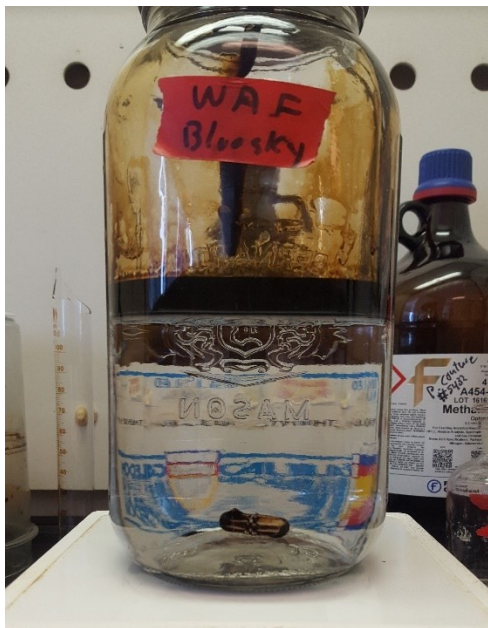


Figure S7.1. Exemple de préparation des WAF lors de l'exposition du mené à grosse tête.



Figure S7.2. Exemple de préparation des WAF lors de l'exposition de la truite arc-en-ciel.

7.1.2 Détails des expositions

Les figures S7.3 à S7.5 présentent des photographies des contenants et des salles utilisés lors des expositions. Dans les trois chapitres, les contenants étaient placés de manière aléatoire dans l'espace, soit dans un bac en plastique avec couvercle branché dans le système d'aération (Figure S7.3) ou dans les salles environnementales aérées (Figures S7.4 et S7.5).



Figure S7.3. Photographie d'une section de l'exposition des mené à grosse tête. Les larves ont été placées par groupe de 50 dans des pots de 500 mL. Les pots étaient placés aléatoirement dans un bac en plastique branché directement dans le système de ventilation.



Figure S7.4. Photographie de la salle d'exposition de la truite arc-en-ciel. Les œufs ont été placés par groupe de 30 dans des pots de 500 mL. Les pots étaient placés aléatoirement sur une des deux tables et étaient branchés au système d'oxygénation. De plus, pour éviter l'évaporation des hydrocarbures dans l'air de la salle, chaque pot possédait un filtre de charbon et de laine de verre.

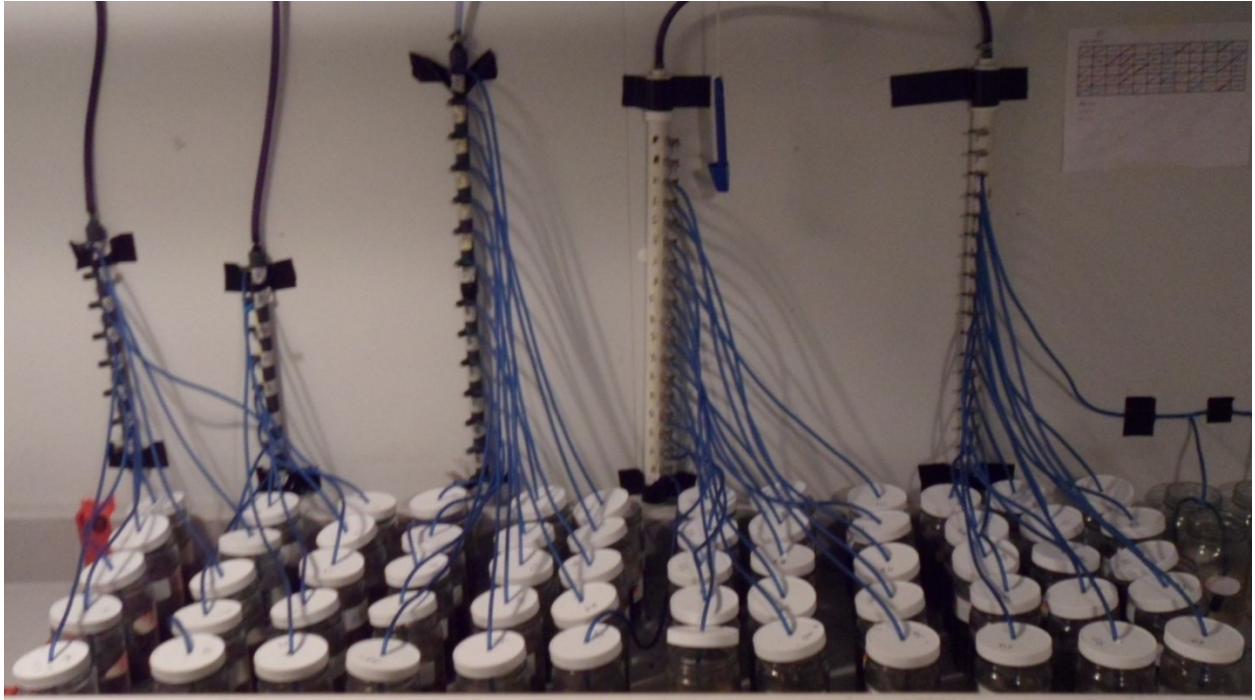


Figure S7.5. Photographie d'une section de l'exposition du saumon atlantique. Les œufs ont été placés par groupe de 30 dans des pots de 500 mL. Les pots étaient placés aléatoirement sur une des deux tables et étaient branchés au système d'oxygénation.

7.2 Résultats supplémentaires

Les concentrations de métaux des pétroles et des WAF ont été mesurées pour chacun des chapitres de cette thèse, cependant ces résultats n'ont pas été présentés dans les articles, car ils ne permettaient pas de tirer des conclusions sur la toxicité des pétroles. Les tableaux S7.1 à S7.3 présentent les concentrations de métaux obtenues dans les trois expositions.

Tableau S7.1. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans les WAF de 1, 10 et 75 % des trois pétroles, lors des expositions du mené à grosse tête.

WAF	Bluesky			Clearwater			Lloydminster		
	1%	10%	75%	1%	10%	75%	1%	10%	75%
<i>Aluminium</i>	0.021	0.022	0.018	0.016	0.022	0.017	0.012	0.04	0.016
<i>Arsenic</i>	0.0002	NA	NA	0.0012	0.0004	0.0016	NA	NA	NA
<i>Baryum</i>	NA	NA	0.008	NA	0.001	NA	NA	NA	NA
<i>Béryllium</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0008	NA	NA
<i>Bore</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.004	NA	NA
<i>Cadmium</i>	NA	NA	NA	NA	0.0005	NA	0.0005	NA	NA
<i>Calcium</i>	11.25	12.00	11.40	11.60	11.38	12.18	9.57	10.12	10.67
<i>Chrome</i>	0.0024	0.0025	0.0028	0.003	0.0049	0.002	0.0014	0.0012	0.0009
<i>Cobalt</i>	NA	NA	NA	NA	0.001	0.0029	0.0007	NA	NA
<i>Cuivre</i>	0.003	0.003	0.0175	0.0075	0.01025	0.00625	0.002	NA	0.0105
<i>Étain</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Fer</i>	0.021	0.04	0.0415	0.035	0.045	0.04	NA	NA	NA
<i>Lithium</i>	NA	NA	NA	0.004	0.0045	0.004	0.001	NA	0.001
<i>Magnésium</i>	2.35	2.40	2.37	4.35	3.88	5.70	2.80	3.04	4.37
<i>Manganèse</i>	0.0010	0.0010	0.0015	0.0013	0.0047	0.0010	0.0015	NA	0.0011
<i>Mercure</i>	0.0004	NA	NA	0.002	0.0045	0.0015	NA	NA	NA
<i>Nickel</i>	0.0015	0.002	0.0015	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Plomb</i>	NA	NA	NA	NA	0.0035	0.001	NA	NA	NA
<i>Potassium</i>	1.45	1.55	1.50	1.93	1.45	2.20	1.40	1.23	2.07
<i>Sélénium</i>	0.0025	0.0030	0.0015	0.0055	0.0075	0.0063	NA	NA	NA
<i>Sodium</i>	17.5	18.1	17.1	16.00	20.4	15.83	17.1	17.33	33.8
<i>Strontium</i>	NA	NA	NA	0.07	0.03	0.10	NA	NA	NA
<i>Vanadium</i>	NA	NA	NA	NA	0.0049	0.0009	NA	NA	NA
<i>Zinc</i>	0.013	0.013	0.014	0.019	0.019	0.021	0.007	NA	0.023

Tableau S7.2. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans toutes les concentrations de WAF des deux pétroles, lors des expositions de la truite arc-en-ciel.

WAF	Clearwater					Lloydminster				
	0.32%	1%	3.2%	10%	32%	0.32%	1%	3.2%	10%	32%
Aluminium	0.0025	0.0025	0.0025	0.0076	0.0025	0.0025	0.0025	0.0067	0.2415	0.0088
Antimoine	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
Arsenic	0.00013	0.0002	0.00017	0.00025	0.00013	0.0001	0.00013	0.0001	0.0002	0.0001
Baryum	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	0.005	0.0035	0.0035	0.0035	0.006	0.0044
Béryllium	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Bismuth	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
Bore	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Cadmium	0.0001	0.00017	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.00017	0.0001333	0.0001
Calcium	14.33	14.73	14.33	15.03	15.87	14.53	14.70	14.40	14.70	14.34
Chrome	0.0005	0.0011	0.0008	0.0003	0.0003	0.0008	0.0008	0.0005	0.0012	0.0003
Cobalt	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025
Cuivre	0.0015	0.0013	0.002	0.001	0.0005	0.002	0.0012	0.001	0.0037	0.0014
Étain	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
Fer	0.07	0.11	0.11	0.01	0.01	0.10	0.06	0.07	0.06	0.05
Lithium	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0017	0.0005
Magnésium	6.93	7.02	6.91	6.39	6.55	6.99	7.11	6.93	6.62	6.31
Manganèse	0.0005	0.001	0.0012	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	0.0008
Mercure	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Molybdène	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
Nickel	0.0013	0.0007	0.0007	0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0007	0.001	0.0005
Plomb	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.001	0.0005
Potassium	1.47	1.47	1.43	1.25	1.40	1.57	1.5	1.433	1.37	1.32
Sélénium	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0007	0.0007	0.0005
Sodium	15.30	15.63	15.37	14.28	15.10	15.63	15.73	15.37	14.80	14.18
Strontium	0.007	0.01	0.01	0.014	0.02	0.01	0.01	0.007	0.013	0.012
Titane	0.0018	0.0018	0.0018	0.005	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018	0.0041
Vanadium	0.00025	0.0006	0.0005	0.00025	0.00025	0.0003	0.0004	0.0003	0.0009	0.00025
Zinc	0.0047	0.0033	0.0047	0.0169	0.0037	0.0033	0.0033	0.0257	0.0075	0.0113

Tableau S7.3. Concentrations (mg/L) des différents métaux mesurés dans toutes les concentrations de WAF des deux pétroles, lors des expositions du saumon atlantique.

WAF	Clearwater						Lloydminster					
	0	0.32%	1%	3.2%	10%	32%	0.32%	1%	3.2%	10%	32%	
Aluminium	0.056	0.02	0.018	0.013	0.017	11.44	0.015	6.24	0.013	9.46	0.013	
Antimoine	0.008	0.004	0.003	0.002	0.072	0.0005	0.0005	0.0005	0.025	0.033	0.0005	
Arsenic	0.0003	0.0002	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002	0.0006	0.074	0.0003	0.002	
Béryllium	0.0002	0.0002	0.0001	0.0001	0.0012	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
Bismuth	0.003	0.001	0.001	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	
Bore	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	1.22	0.02	
Cadmium	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0007	0.0003	0.0003	0.0001	0.00035	0.0001	
Calcium	14.63	14.5	14.63	14.47	14.53	14.4	14.5	14.53	14.4	14.8	14.6	
Chrome	0.014	0.005	0.003	0.0007	0.0015	0.0004	0.001	0.0005	0.36	0.62	0.0006	
Cobalt	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.00025	0.01	0.00025	0.00025	0.00025	0.0004	0.0004	
Cuivre	0.0018	0.0032	0.0025	0.0018	1.19	0.023	0.0025	0.95	0.0022	0.004	0.0035	
Étain	0.0037	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	
Fer	0.017	0.01	0.01	0.01	1.32	0.01	0.01	0.01	0.01	6.91	0.01	
Lithium	0.001	0.001	0.0007	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	
Magnésium	2.00	1.99	2.02	1.99	1.99	1.98	1.96	2.00	1.96	1.97	2.00	
Manganèse	0.0012	0.0012	0.0008	0.0007	0.0115	0.54	0.0007	0.0005	0.0007	0.0013	0.0007	
Mercure	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
Molybdène	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.084	0.077	0.0025	0.0025	
Nickel	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.002	0.0007	0.061	0.003	0.13	0.0005	
Plomb	0.013	0.007	0.005	0.001	0.001	0.0005	0.0007	0.0005	0.0005	0.0018	0.0005	
Potassium	0.93	0.9	0.93	0.97	640	0.9	0.9	0.93	323	0.95	0.93	
Sélénium	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.076	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	
Sodium	18.37	18.10	18.43	18.37	18.17	12678	18.37	18.40	18.07	17.8	18.43	
Strontium	0.067	0.063	0.063	0.063	0.063	45.37	0.063	0.063	0.063	0.065	0.063	
Titane	0.01	0.005	0.005	0.005	0.063	0.005	0.005	0.03	0.005	0.10	0.005	
Vanadium	0.0017	0.0018	0.0014	0.0009	0.0003	0.13	0.00025	0.064	0.055	0.00025	0.0031	
Zinc	0.018	0.019	0.015	0.014	0.02	0.017	0.016	0.015	0.018	0.019	0.044	

