

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Centre Eau Terre Environnement

**Etude comparée de la toxicité de pétroles conventionnels et de bitumes dilués sur les premiers stades de développement d'un salmonidé modèle, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)**

Par  
Magali Schiano Di Lombo

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître des sciences (M.Sc.)  
en sciences de l'eau

**Jury d'évaluation**

Président du jury et Examineur interne	Claude Fortin INRS-ETE
Examineur externe	Monique Boily Pavillon des Sciences Biologiques Université du Québec à Montréal
Examineur externe	Stephane Le Floch CEDRE
Directeur de recherche	Patrice Couture INRS-ETE
Codirectrice de recherche	Valérie Langlois INRS-ETE
Codirecteur de recherche	Jérôme Cachot Université de Bordeaux, EPOC-EA

# Remerciements

---

Tout d’abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche de l’Université de Bordeaux, Jérôme Cachot. Il m’a permis de découvrir le monde de la recherche, et m’a également énormément encouragée à prendre mes propres décisions. Son soutien, ses encouragements et sa dynamique m’ont permis d’acquérir de l’autonomie et de découvrir de nombreuses choses sur moi et mes capacités en recherche. Pour les mêmes raisons, je remercie mes deux directeurs de l’INRS, Patrice Couture et Valérie Langlois. Sans eux, ce projet qui m’a tant permis de grandir à la fois personnellement et professionnellement n’aurait jamais eu lieu.

Je tiens également à remercier le personnel de laboratoire qui m’a aidée dans l’intégralité de mes travaux. A la fois Shannon Weeks, Christelle Clérendeau, Bettie Cormier et Corentin de l’Université de Bordeaux, mais également Elyas, Anthony, Mackenzie, Pauline et Roxanne de l’équipe de Patrice Couture, ainsi que l’intégralité de l’équipe de Valérie Langlois (Lucie, Géraldine, Charles, Sarah, Lara, Paisley, Julie, Mélanie, Catherine, Pierre-Alexandre et Molly). Le personnel de l’INRS et des laboratoires m’a également aidée et conseillée, avec le prêt de matériel mais également les formations de laboratoire.

Merci également à toutes les personnes dont j’ai croisé le chemin, même sans travailler avec eux. Je pense ici à Laura, Maxime, Marie, Clément, Mariem et plein d’autres, vous avez rendu cette année et cette expérience riches en saveurs et en plaisirs.

Pour finir, je tiens à dire un grand merci à ma famille et mes amis les plus proches pour m’avoir soutenue lors de ces deux dernières années, à la fois pendant mes périodes de doute mais également pendant les meilleures périodes du séjour, et ce malgré la distance pour ceux qui étaient restés en Europe.

## Résumé

---

La production de pétrole augmente au fil des années, tout comme son transport, ce qui entraîne un risque plus fort de relargage des composés pétroliers dans les écosystèmes aquatiques. Dans la présente étude, deux pétroles conventionnels (Arabian Light et Lloydminster) et deux bitumes dilués (dilbits, Bluesky et Clearwater) ont été utilisés afin de comparer la toxicité des deux familles de pétrole. Les extraits aqueux des pétroles ont été préparés (WAF ; water-accommodated fraction) puis dilués dans de l'eau de source à 10 et 50%. Des embryons de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont été exposés à ces WAF à l'obscurité, de leur éclosion jusqu'à la résorption de leur vésicule vitelline (16 à 17 jours à 12 °C). Les deux types de pétrole ont entraîné l'apparition d'hémorragies et de dommages à l'ADN, mais également une augmentation de l'activité EROD et une surexpression du gène *cyp1a*. Seuls les pétroles conventionnels ont induit une diminution de la taille des larves, alors que seuls les dilbits ont entraîné une augmentation des malformations totales et squelettiques. Aucun pétrole n'a induit de mortalité ou de stress oxydatif, et aucune modification du comportement natatoire n'a été observée. Le Bluesky était le pétrole le plus toxique, suivi par le Clearwater, l'Arabian Light puis le Lloydminster.

Mots-clés : pétroles conventionnels, dilbits, WAF, stades précoces de développement, truite arc-en-ciel, biomarqueurs

## Abstract

---

The production and transport of petroleum keep rising throughout the years, leading to an increase in the risk of an oil spill in aquatic ecosystems. In this study, two conventional oils (Arabian Light and Lloydminster) and two diluted bitumens (dilbits; Bluesky and Clearwater) were used to compare the toxicity of both petroleum families. The oils' water-accommodated fractions (WAF) were prepared and diluted in mountain spring water at 10 and 50%. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae were exposed in the dark from hatching until the complete desorption of their yolk sac (16 days at 12 °C). Both the conventional and unconventional oils induced the formation of hemorrhages and DNA damage, alongside with an induction of the EROD activity and an over-expression of the *cyp1a* gene. The conventional oils were the only oils that lowered the size of the larvae, and the dilbits were the only oils leading to the apparition of total and skeletal anomalies. None of the oils induced mortality nor oxidative stress, and no modification in the swimming behavior was observed. The most toxic oil was the Bluesky, followed by the Clearwater and the Arabian Light, and the less toxic one was the Lloydminster.

Key words : conventional oils, dilbits, WAF, early development stages, rainbow trout, biomarkers

# Table des matières

---

REMERCIEMENTS .....	II
RESUME .....	III
ABSTRACT .....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX .....	XI
LISTE DES ANNEXES .....	XII
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. LES PETROLES ET LEUR TOXICITE .....	2
1.1.1. <i>Pétroles : production et transport</i> .....	2
1.1.2. <i>Les pétroles d'intérêt</i> .....	3
1.1.3. <i>Toxicité des composés pétroliers</i> .....	5
1.2. LE MODELE BIOLOGIQUE, LA TRUITE ARC-EN-CIEL.....	7
1.2.1. <i>Présentation du modèle choisi</i> .....	7
1.2.2. <i>Toxicité des pétroles sur la truite arc-en-ciel</i> .....	9
1.3. BIOMARQUEURS D'INTERET .....	12
1.3.1. <i>Biomarqueurs de développement</i> .....	12
1.3.2. <i>Biomarqueur de comportement</i> .....	12
1.3.3. <i>Biomarqueur de contamination et de détoxification</i> .....	13
1.3.4. <i>Biomarqueur de l'intégrité cellulaire</i> .....	13
1.3.5. <i>Biomarqueurs de stress oxydatif</i> .....	15
1.3.6. <i>Biomarqueurs d'expression génique</i> .....	16
1.4. OBJECTIFS DU PROJET .....	17
1.5. HYPOTHESES .....	18
<b>2. METHODOLOGIE .....</b>	<b>19</b>
2.1. EXPOSITIONS DES TRUITES ARC-EN-CIEL.....	19
2.1.1. <i>Exposition n°1 : Pétroles conventionnels</i> .....	19

2.1.2.	<i>Exposition n°2 : bitumes dilués (dilbits)</i> .....	22
2.2.	BIOMARQUEURS .....	23
2.2.1.	<i>Biomarqueurs de développement (9 individus/répétition)</i> .....	23
2.2.2.	<i>Biomarqueur de comportement (9 individus/répétition)</i> .....	24
2.2.3.	<i>Biomarqueurs de contamination et de détoxication (4 individus/répétition)</i> .....	24
2.2.4.	<i>Biomarqueur de l'intégrité cellulaire (5-6 individus/répétition)</i> .....	25
2.2.5.	<i>Biomarqueurs de stress oxydatif (4-6 larves/répétition)</i> .....	27
2.2.5.1.	<i>Extraction et dosage des protéines</i> .....	27
2.2.5.2.	<i>Dosage de peroxydation des lipides : TBARS</i> .....	28
2.2.5.3.	<i>Dosage des protéines carbonylées</i> .....	28
2.2.6.	<i>Biomarqueurs d'expression génique (5 individus/répétition)</i> .....	29
2.2.6.1.	<i>Extraction de l'ARN total</i> .....	30
2.2.6.2.	<i>Intégrité de l'ARN</i> .....	31
2.2.6.3.	<i>Rétro-transcription en ADN complémentaire</i> .....	32
2.2.6.4.	<i>Mesure de l'expression génique</i> .....	33
2.3.	ANALYSES CHIMIQUES.....	34
2.4.	ANALYSES STATISTIQUES.....	34
<b>3.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>35</b>
3.1.	ANALYSES CHIMIQUES.....	35
3.2.	TOXICITE AIGUE .....	35
3.3.	EFFETS SUR LE DEVELOPPEMENT .....	37
3.3.1.	<i>Biométrie</i> .....	37
3.3.2.	<i>Malformations</i> .....	39
3.4.	EFFETS SUR LE COMPORTEMENT NATATOIRE .....	43
3.5.	EFFETS SUR L'ACTIVE EROD.....	47
3.6.	EFFETS SUR L'INTEGRITE DE L'ADN .....	49
3.7.	STRESS OXYDATIF .....	52
3.8.	EFFETS SUR LA TRANSCRIPTION DE GENES D'INTERET .....	54
<b>4.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERENCES</b> .....	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>ANNEXES</b> .....	<b>63</b>

5.1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EAU DE SOURCE LAQUEUILLE UTILISEE DANS LE PROJET .....	63
5.2. COMPOSITION DES FRACTIONS AQUEUSES EN C10-C50 .....	64
5.3. COMPOSITION DES FRACTIONS AQUEUSES EN HYDROCARBURES .....	64
5.4. CARACTERISATION DES HAP DANS LES FRACTIONS AQUEUSES .....	65
5.5. CARACTERISATION DES COV DANS LES FRACTIONS AQUEUSES.....	66
5.6. ACTIVITE EROD DES ECHANTILLONS « CONTROLES » .....	66
5.7. PROTEINES (MG/MG DE TISSU) DANS LES LARVES ISSUES DES EXPOSITIONS AUX PETROLES CONVENTIONNELS ET BITUMES DILUES.....	67
5.8. VALEURS TBARS (NMOL MDA/MG PROTEINES) OBTENUES POUR LES LARVES « CONTROLES » SUR LES DEUX EXPOSITIONS .....	68

# Liste des figures

---

<b>FIGURE 1 :</b> PROVENANCE DES PETROLES CONVENTIONNELS ET DES BITUMES DILUES UTILISES DANS L'ETUDE. A. REPRESENTATION DES PROVINCES DE L'ALBERTA ET DE LA SASKATCHEWAN AU CANADA. B. REPRESENTATION DU CONTINENT AFRICAIN ET D'UNE PARTIE DE L'EUROPE.....	4
<b>FIGURE 2 :</b> MECANISME SIMPLIFIE DE DETOXICATION DES HAP .....	5
<b>FIGURE 3:</b> STADES PROTEGES ET NON PROTEGES DANS LE CADRE DE LA LEGISLATION EUROPEENNE (D'APRES EMBRY ET AL., 2010).....	7
<b>FIGURE 4:</b> TRUITE ARC-EN-CIEL .....	8
<b>FIGURE 5:</b> STADES PRECOCES DE DEVELOPPEMENT DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL (WARREN PHOTOGRAPHIC, 2013).....	9
<b>FIGURE 6:</b> ACTIVATION DE AHR PAR LES HAP; HSP90, P23 ET XAP-2 SONT LES MOLECULES CHAPERONNES ET DRE EST LE MOTIF DE RECONNAISSANCE (TRADUIT DEPUIS BALL AND TRUSKEWYCZ, 2013). .....	11
<b>FIGURE 7:</b> PHOTOGRAPHIE DE NOYAUX CELLULAIRES INTEGRES (RONDS, FLECHE ROUGE) OU ENDOMMAGES (NOYAUX AVEC COMETES, FLECHE BLEUE) OBSERVABLES APRES AVOIR REALISE UN TEST DES COMETES SUR DES CELLULES SANGUINES DE TRUITE ARC-EN-CIEL.....	14
<b>FIGURE 8:</b> EXEMPLE D'UNE CELLULE HERISSON OBTENUE REVELEE PAR LE TEST DES COMETES SUR UNE LARVE DE TRUITE ARC-EN-CIEL EXPOSEE A 50% DE WAF BLUESKY .....	14
<b>FIGURE 9:</b> MECANISME DE PEROXYDATION DES LIPIDES PAR LES RADICAUX LIBRES (D'APRES TIM VICKERS, 2001).....	15
<b>FIGURE 10:</b> MECANISME DE CARBONYLATION DES PROTEINES (D'APRES CHRISTOPHE BAILLY, 2003).....	16
<b>FIGURE 11 :</b> SCHEMA D'EXPOSITION ET BIOMARQUEURS ETUDIES DANS LE CADRE DE LA PREMIERE EXPOSITION (PETROLES CONVENTIONNELS, MAI 2018) .....	21
<b>FIGURE 12:</b> EXEMPLE DE NANO CHIP UTILISEE POUR VERIFIER L'INTEGRITE DE L'ARN (D'APRES AGILENT TECHNOLOGIES). 31	
<b>FIGURE 13 :</b> MORTALITE CUMULEE (MOYENNE + ECART TYPE) OBSERVEE APRES EXPOSITION DES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL PENDANT 17 JOURS AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE).....	36
<b>FIGURE 14:</b> TAILLE DE LA TETE D'UNE LARVE (MM, MOYENNE + ECART TYPE) MESUREE APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE). .....	38
<b>FIGURE 15:</b> PROPORTION DE LARVES MALFORMEES (% , MOYENNE + ECART TYPE) APRES UNE EXPOSITION DE 17 AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET DE 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION	



N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE). .....	39
<b>FIGURE 16:</b> HEMORRAGIE OCULAIRE ET CRANIO-FACIALE OBSERVEE CHEZ UNE LARVE DE TRUITE ARC-EN-CIEL EXPOSEE PENDANT 16 JOURS A 10% DE WAF CLEARWATER.....	40
<b>FIGURE 17:</b> PROPORTION D'HEMORRAGIES (% , MOYENNE + ECART TYPE) OBSERVEES APRES EXPOSITION DES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL PENDANT 17 JOURS AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE). .....	41
<b>FIGURE 18:</b> EXEMPLE DE MALFORMATION CRANIO-FACIALE CHEZ UNE LARVE DE TRUITE ARC-EN-CIEL EXPOSEE A 50% DE WAF ARABIAN LIGHT .....	42
<b>FIGURE 19:</b> PROPORTION DE MALFORMATIONS CRANIO-FACIALES DES LARVES DE TRUITES ARC-EN-CIEL (% , MOYENNE + ECART TYPE) OBSERVES APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE).....	42
<b>FIGURE 20:</b> DISTANCE PARCOURUE PENDANT LA NUIT 1 (CM, MOYENNE + ECART TYPE) PAR LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION PENDANT 17 JOURS AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE). .....	44
<b>FIGURE 21:</b> MOBILITE DES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL A L'OBSCURITE (NUIT 1, S, MOYENNE + ECART TYPE) MESURE APRES EXPOSITION PENDANT 17 JOURS AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE). .....	45
<b>FIGURE 22:</b> TEMPS DE FORTE MOBILITE DES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL (NUIT 2, S, MOYENNE + ECART TYPE) APRES EXPOSITION PENDANT 17 JOURS AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET 16 JOURS AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE).....	46
<b>FIGURE 23:</b> LOG <sub>10</sub> DE L'ACTIVITE EROD (% RELATIF DE LA MOYENNE) (MOYENNE + ECART TYPE) MESUREE CHEZ LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE).....	48
<b>FIGURE 24:</b> PROPORTION DE DOMMAGES A L'ADN (% , MOYENNE + ECART TYPE) CHEZ LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS	

D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE)..... 50

**FIGURE 25:** NOMBRE DE CELLULES HERISSON (MOYENNE + ECART TYPE) COMPTABILISEES APRES EXPOSITION DES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE)..... 51

**FIGURE 26:** PROPORTION DE TBARS (% RELATIF AU TEMOIN, MOYENNE + ECART TYPE) DANS LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3. STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (P < 0,05, A,B : EFFET DU PETROLE; A,B : EFFET DE LA DOSE; A,B : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE)..... 53

# Liste des tableaux

---

<b>TABLEAU 1:</b> PROTOCOLE DE PREPARATION DES WAF SUIVI DANS LE CADRE DE LA PREMIERE EXPOSITION (PETROLES CONVENTIONNELS, MAI 2018) .....	20
<b>TABLEAU 2:</b> SOLUTIONS DE CONTAMINATION UTILISEES DANS LE CADRE DE LA PREMIERE EXPOSITION (PETROLES CONVENTIONNELS, MAI 2018) .....	20
<b>TABLEAU 3:</b> PROTOCOLE DE PREPARATION DES WAF SUIVI DANS LE CADRE DE LA SECONDE EXPOSITION (BITUMES DILUES, DECEMBRE 2018).....	22
<b>TABLEAU 4:</b> SOLUTIONS DE CONTAMINATION UTILISEES DANS LE CADRE DE LA SECONDE EXPOSITION (BITUMES DILUES, DECEMBRE 2018).....	22
<b>TABLEAU 5:</b> GENES UTILISES DANS NOTRE ETUDE, ACCOMPAGNES DE LEURS NUMEROS D'ACCES, AMORCES DIRECTES (A) ET INVERSES (B), TEMPERATURES D'HYBRIDATION ET CONCENTRATIONS OPTIMALES D'AMORCES .....	30
<b>TABLEAU 6:</b> PROTOCOLE DE QPCR. LES ETAPES MARQUEES D'UNE * CORRESPONDENT AU CYCLE D'HYBRIDATION INDIQUE AU TABLEAU 5, ELLES SONT REPETEES 40 FOIS.....	33
<b>TABLEAU 7:</b> EXPRESSION DES GENES ETUDIES (MOYENNE $\pm$ ECART TYPE) CHEZ LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL TMOIN (N = 4) ET EXPOSEES (N = 3) AUX FRACTIONS AQUEUSES DES PETROLES CONVENTIONNELS ARABIAN LIGHT ET LLOYDMINSTER. LES VALEURS D'EXPRESSION DES GENES D'INTERET SONT NORMALISEES PAR LA MOYENNE DES EXPRESSIONS DES GENES DE REFERENCE ( <i>EF1A</i> ET <i>RPL8</i> ). STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (A,B,C : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE) .....	54
<b>TABLEAU 8:</b> EXPRESSION DES GENES ETUDIES (MOYENNE $\pm$ ECART TYPE) CHEZ LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL TMOIN (N = 4) ET EXPOSEES (N = 3) AUX FRACTIONS AQUEUSES DES BITUMES DILUES BLUESKY ET CLEARWATER. LES VALEURS D'EXPRESSION DES GENES D'INTERET SONT NORMALISEES PAR LA MOYENNE DES EXPRESSIONS DES GENES DE REFERENCE ( <i>EF1A</i> ET <i>RPL8</i> ). STATISTIQUES : ANOVA 2 FACTEURS (A,B,C : EFFET COMBINE PETROLE/DOSE) .....	55
<b>TABLEAU 9:</b> SPECTRE DE TOXICITE OBTENU DANS LE CADRE DE CETTE ETUDE POUR CHAQUE PETROLE A CHACUNE DE SES CONCENTRATIONS DE WAF. LES CASES VERTES MONTRENT LES BIOMARQUEURS NON AFFECTES, LES CASES ROUGES MONTRENT LES BIOMARQUEURS AFFECTES. ....	57

# Liste des annexes

---

<b>ANNEXE I :</b> COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DE SOURCE DE MONTAGNE LAQUEUILLE, EAU DE SOURCE UTILISEE COMME TEMOIN ET POUR DILUER LES SOLUTIONS DE CONTAMINATION PENDANT CE PROJET	63
<b>ANNEXE II :</b> CONCENTRATIONS (N = 1, MG/ML) DE C10-C50 MESUREES DANS LES FRACTIONS AQUEUSES UTILISEES DANS CETTE ETUDE .....	64
<b>ANNEXE III:</b> CONCENTRATIONS D'HYDROCARBURES TOTAUX (COV, HAP, C6-C10, N = 1, MG/L) MESUREES DANS LES FRACTIONS AQUEUSES UTILISEES DANS CETTE ETUDE .....	64
<b>ANNEXE IV:</b> CONCENTRATIONS (N = 1, MG/L) DES HAP PRINCIPAUX MESURES DANS LES FRACTIONS AQUEUSES UTILISEES DANS CE PROJET.....	65
<b>ANNEXE V:</b> CONCENTRATIONS (N = 1, MG/L) DES PRINCIPAUX COV MESURES DANS LES FRACTIONS AQUEUSES UTILISEES DANS CE PROJET.....	66
<b>ANNEXE VI :</b> ACTIVITES EROD (PMOL/LARVE/MINUTE) OBTENUES LORS DES DEUX EXPOSITIONS (1: PETROLES CONVENTIONNELS, 2: BITUMES DILUES) POUR LES LARVES TEMOINS .....	66
<b>ANNEXE VII :</b> PROTEINES (MG/ML DE CUVE), MOYENNE + ECART TYPE) DANS LES LARVES DE TRUITE ARC-EN-CIEL APRES EXPOSITION AUX PETROLES CONVENTIONNELS (A) ET AUX BITUMES DILUES (B). TEMOIN N = 4, CONDITIONS D'EXPOSITION N = 3.....	67
<b>ANNEXE VIII :</b> TBARS (NMOL MDA/MG DE PROTEINE) OBTENUES LORS DES DEUX EXPOSITIONS (1: PETROLES CONVENTIONNELS, 2: BITUMES DILUES) POUR LES LARVES TEMOINS .....	68

# 1. Introduction

---

Le pétrole est une des énergies les plus utilisées par l'Homme, son utilisation étant classée deuxième derrière celle du charbon (Ball and Truskewycz, 2013). Le pétrole est utilisé dans 94% des cas pour la combustion, surtout dans les secteurs industriels, commerciaux, résidentiels et routiers. Sa production est en hausse d'année en année, avec une augmentation d'environ 1,5 à 2% par an. Les pétroles sont généralement transportés par des pipelines, par train ou par bateau. Ces moyens de transport passent généralement par des écosystèmes variés, qu'ils soient aquatiques ou terrestres. Les transports étant nombreux et fréquents, les risques de fuite le sont également, ce qui entraîne un risque pour les écosystèmes.

Les pétroles sont des mélanges complexes de familles de composés chimiques différentes, telles que les hydrocarbures aromatiques ou saturés, les composés organiques volatils, mais également les alcanes ou les métaux (Dew et al., 2015). On retrouve deux familles de pétroles différentes, d'une part les pétroles conventionnels, et de l'autre les pétroles non conventionnels. Les pétroles non conventionnels sont des pétroles qui, dans certains cas, se présentent sous forme visqueuse et qui ont ainsi besoin de chauffage ou de dilution pour permettre leur extraction et leur transport par les pipelines. Chez les pétroles non conventionnels, on retrouve, entre autres, les bitumes ou sables bitumineux. La dilution des bitumes peut mener à la production de bitumes dilués (dilbit), dilués avec des condensats de gaz naturel (20-30% v/v) ou de bitumes synthétiques (synbits) dilués à 50%. Ce sont généralement les bitumes qui sont transportés par le biais des pipelines, étant donné que leur dilution et/ou leur chauffage le permettent. On retrouve des différences chimiques assez nombreuses entre les pétroles conventionnels et les pétroles non conventionnels. Par exemple, les bitumes sont constitués de plus de résines (produit pouvant être naturel ou synthétique, polymère pouvant avoir des propriétés physiques très variées) et d'asphaltènes (composés aromatiques avec un grand squelette Carbone, distribution de masse moléculaire 400-1500 u) et de moins d'hydrocarbures saturés que les pétroles conventionnels. La seule fraction chimique qui soit similaire en proportion entre les deux types de pétroles est la fraction aromatique (Woods et al., 2008).

La composition complexe des pétroles entraîne également une plus grande difficulté à estimer ou prévoir les effets délétères des pétroles ou de leurs dérivés sur la faune et la flore, qu'elles soient aquatiques ou terrestres (Dew et al., 2015). C'est pour cette raison que de nombreuses équipes de

chercheurs ont lancé des études sur le thème des pétroles, de leur composition, mais également de leur toxicité.

## **1.1. Les pétroles et leur toxicité**

### **1.1.1. Pétroles : production et transport**

La pollution maritime par le biais du pétrole liquide est une importante source de pollution des écosystèmes marins (Perrichon et al., 2016). La pollution pétrolière est issue de nombreuses sources, à commencer par les fuites pétrolières, mais également les décharges chroniques par le biais du transport maritime, des exploitations pétrolières et des fuites naturelles. Les pétroles sont des mélanges complexes de milliers de composés différents, dont 75% d'hydrocarbures en moyenne. Parmi ces derniers, on retrouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Le Canada est le 5<sup>e</sup> producteur de pétrole au monde, produisant à la fois des pétroles lourds, mais également des condensats et des bitumes dilués, issus de sables bitumineux (Alsaadi et al., 2018a). Les sables bitumineux sont la source de 97% de la production de pétrole au Canada. A travers les provinces canadiennes, c'est la province de l'Alberta qui produit la majorité des pétroles (80%), et c'est également celle qui produit le plus de pétroles issus des sables bitumineux au monde. Au Canada, on retrouve également plus de 840 000 km de pipelines qui permettent de transporter les pétroles entre les sites d'extraction, les marchés et les raffineries. Cependant, comme dit précédemment, les pipelines ne sont pas les seuls moyens de transport des pétroles, étant donné que l'on retrouve également du transport par bateau ou par train. Il faut prendre en compte que plus la quantité de pétrole transporté augmente, plus les risques de fuites et d'accidents font de même. C'est par exemple ce qu'il s'est passé en 2010 au niveau de la rivière Kalamazoo au Michigan, où un pipeline s'est rompu et a déversé 4,5 millions de litres de pétrole dans Talmadge Creek, un affluent direct de la rivière.

Les pétroles ont de nombreuses propriétés physiques et chimiques qui auront un impact sur le comportement du pétrole une fois dans les écosystèmes aquatiques (Alsaadi et al., 2018a; Sturla Lompré et al., 2018). Parmi les propriétés des pétroles, on retrouve des propriétés physiques telles que la viscosité ou la densité. Les propriétés chimiques du pétrole sont considérées comme plus complexes que leurs propriétés physiques. En effet, les pétroles ont des propriétés chimiques variées et difficiles à estimer à cause de la présence des milliers de molécules qui les composent. Également,

il faut considérer le fait qu'une fois dans l'eau, les pétroles vont subir un vieillissement causé par des phénomènes physiques et chimiques, ce qui peut causer la perte de composés chimiques et ainsi une modification de la composition. Ils peuvent en effet se disperser ou réaliser une émulsion (phénomènes physiques), mais également subir une photo-dégradation et biodégradation (phénomènes chimiques). Il est également fréquent que certains composés volatils s'évaporent, et que certains composés hydrophobes tels que les HAP s'adsorbent sur la matière organique (en suspension ou dissoute) et que certains composés lipophiles s'accumulent dans les organismes vivants. Cependant, plusieurs propriétés physico-chimiques de l'eau (par exemple : salinité, pH ou turbidité) vont impacter le comportement et ainsi le devenir du pétrole dans les écosystèmes aquatiques.

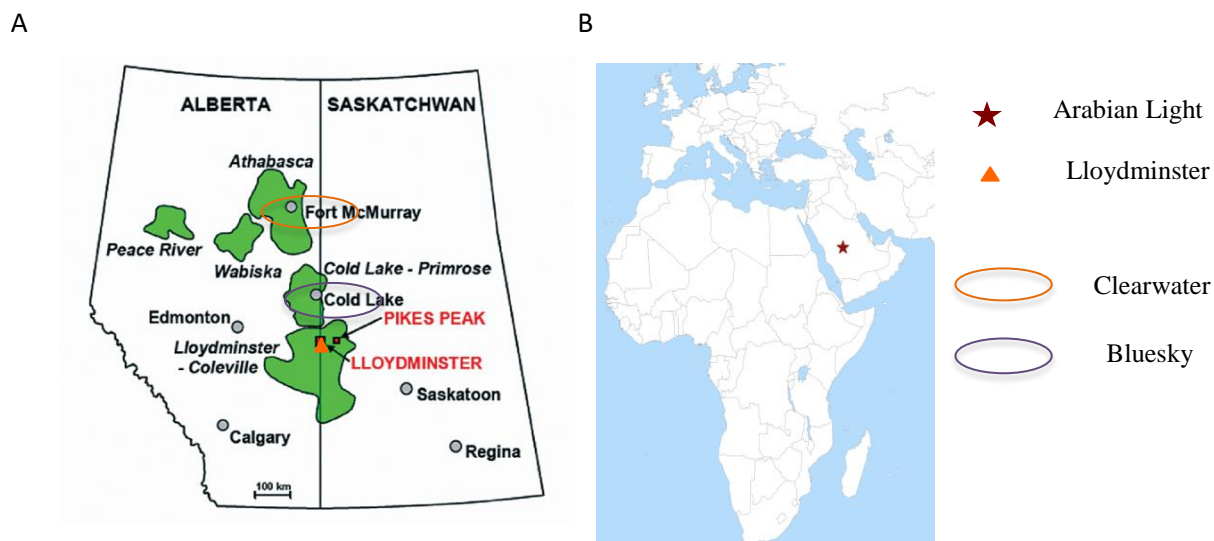
### 1.1.2. Les pétroles d'intérêt

Quatre pétroles ont été utilisés dans cette étude. Le premier est un pétrole conventionnel, l'Arabian Light, produit en Arabie Saoudite (Dussauze et al., 2015; Wang et al., 2003). Plusieurs analyses chimiques ont mis en avant le fait qu'il est composé de 75,5% d'hydrocarbures saturés, de 15,2% d'hydrocarbures aromatiques, de 5,7% de résines, de 3,6% d'asphaltènes, et de 2,7% de cires. Sa densité est de 0,88 g/mL, sa viscosité dynamique est de 32,6 cP à 0 °C et sera bien plus faible à 15 °C avec une viscosité de 13 cP. Une fois dans l'environnement, un vieillissement sera observable et les composés les plus légers vont pouvoir s'évaporer, modifiant ainsi la composition chimique et les propriétés du pétrole. Ce pétrole est utilisé dans de nombreux tests toxicologiques en réponse aux pollutions pétrolières remarquées dans le golfe d'Arabie (Youssef, 2002).

Le deuxième pétrole utilisé est un également considéré comme étant conventionnel, le Lloydminster. Ce dernier est produit dans la province de l'Alberta, qui constitue une des plus grandes réserves de pétrole au monde. En effet, le territoire pétrolier s'étend sur 142 000 km<sup>2</sup> et fait du Canada la troisième plus grande réserve de pétrole au monde (Philibert et al., 2016). Le pétrole Lloydminster a une densité de 0,91 g/mL, elle est donc équivalente à celle de l'Arabian Light, mais sa viscosité est bien plus forte, avec une viscosité de 180 cP à 0 °C et une viscosité de 36 cP à 25 °C (Brooks et al., 1988). Avant le vieillissement environnemental, ce pétrole est constitué de 68% d'hydrocarbures saturés, de 22% d'hydrocarbures aromatiques, de 4% de résines, de 6% d'asphaltènes et de 5% de cires. Sa composition est donc équivalente à celle de l'Arabian Light, sauf que l'on y retrouve moins d'hydrocarbures saturés et plus d'hydrocarbures aromatiques. Ce pétrole est, tout comme l'Arabian Light, utilisé dans de nombreux tests de toxicologie, l'intérêt pour la toxicité des pétroles ayant augmenté suite à plusieurs fuites pétrolières.

Le troisième pétrole utilisé est cette fois un dilbit, le Bluesky. Ce dernier est également produit en Alberta, au niveau des gisements de la région de Cold Lake. C'est un pétrole dont la composition théorique a également été étudiée (Brooks et al., 1988). Ce pétrole, avant vieillissement, est composé de 12,3% d'hydrocarbures saturés, de 29,4% d'hydrocarbures aromatiques, de 8,5% de résines, 46,5% d'asphaltènes et 3,3% d'autres composés tels que les alcanes, les métaux, ou les cires. Une différence de composition est déjà remarquable entre les pétroles conventionnels et les dilbits, avec bien moins d'hydrocarbures saturés et plus de composés tels que les asphaltènes et les résines.

Pour finir, le dernier pétrole utilisé dans cette étude est un deuxième dilbit, le Clearwater. Ce dernier est également produit en Alberta, mais au niveau des gisements de Fort McMurray, dans la zone d'Athabasca. Avant vieillissement, ce dilbit est composé de 15,2% d'hydrocarbures saturés, de 31,5% d'hydrocarbures aromatiques, 20,2% de résines, 29,3% d'asphaltènes et 3,8% d'autres composés tels que les cires, les alcanes, ou les métaux. Peu d'études renseignent sur la toxicité des deux dilbits étudiés ici. En effet, la plupart des études écotoxicologiques traitent uniquement des sables bitumineux, et non pas des bitumes dilués issus de certains de ces sables. La localisation et la provenance des pétroles utilisés dans cette étude sont présentées dans la **Figure 1**.



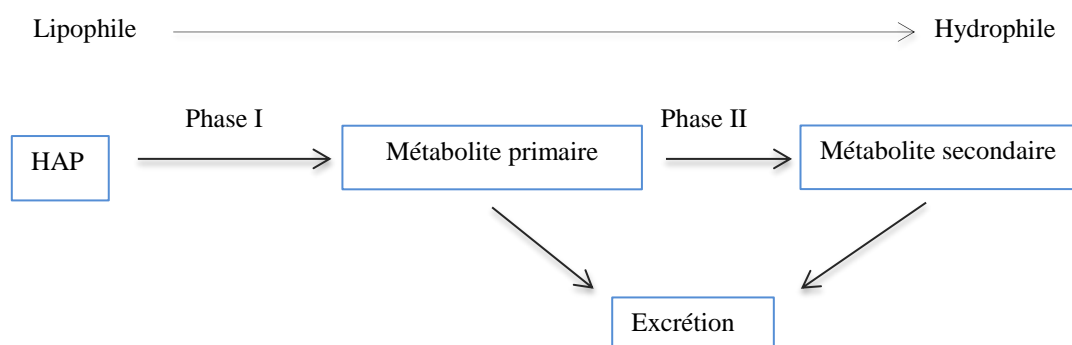
**Figure 1** : Provenance des pétroles conventionnels et des bitumes dilués utilisés dans l'étude. A. Représentation des provinces de l'Alberta et de la Saskatchewan au Canada. B. Représentation du continent africain et d'une partie de l'Europe



### 1.1.3. Toxicité des composés pétroliers

La contamination des vertébrés aquatiques peut se faire par trois voies distinctes (Ronda et al., 2019). Il peut y avoir contamination par voie directe, comme par exemple par contact avec un sédiment contaminé, par voie trophique en se nourrissant d'une proie préalablement contaminée et par voie maternelle, lorsqu'un adulte reproducteur contamine sa descendance au moment de la reproduction ou de la gestation par le biais d'une contamination des gamètes. Il est compréhensible que les pétroles puissent avoir des effets toxiques sur les organismes vivants, étant donné que la grande variété des voies de pénétration des organismes permet aux composés pétroliers de pénétrer dans les organismes vivants.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont une des familles principales de composés pétroliers et ces derniers ont une bonne capacité de pénétration dans les organismes vivants (Alsaadi et al., 2018a; Jasperse et al., 2019; Ronda et al., 2019). Une fois que les HAP ont pénétré dans l'organisme, on observe la mise en marche des processus de détoxification. En effet, les HAP sont des hydrocarbures possédant au moins deux cycles de benzène, ce sont donc des molécules hydrophobes qui ne peuvent donc pas être excrétées naturellement et qui nécessitent la mise en route du système de détoxification. Les HAP vont être biotransformés lors de la phase I de détoxification par le biais d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse pour les rendre plus solubles, puis la phase II permettra leur conjugaison. A la fin de la phase I, on parle de métabolites primaires, alors qu'à la fin de la phase II, on parle de métabolites secondaires. Un processus de détoxification simplifié est présenté dans la **Figure 2**.



**Figure 2** : Mécanisme simplifié de détoxification des HAP

Une fois ces deux phases terminées, les métabolites plus solubles que les HAP peuvent être excrétés plus facilement que les HAP originaux (Alsaadi et al., 2018a; Jasperse et al., 2019; Ronda et al., 2019). Cependant, un des risques de la détoxification est la formation de composés plus toxiques que les composés parents, on parle alors de bioactivation. Également, au cours des mécanismes de biotransformation, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont formées et libérées. Ces dernières doivent être prises en charge par les mécanismes de défense antioxydants pour éviter le stress oxydatif. Cependant, en présence d'une trop grande quantité de contaminants, la quantité d'ERO formée augmente et les mécanismes de défense antioxydants ne sont pas toujours suffisants. Cela peut entraîner des désordres cellulaires qui peuvent mener à la mort cellulaire.

Plusieurs études traitent de la toxicité des HAP (Alsaadi et al., 2018a, 2018b; Cachot et al., 2007; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Ronda et al., 2019). Parmi les effets toxiques des HAP les plus fréquents, on retrouve une augmentation des anomalies développementales, aussi nommées « blue-sac disease » (BSD). Le BSD consiste en l'apparition de malformations cranio-faciales, d'œdèmes péricardiques ou vitellins, mais également d'hémorragies. Le BSD n'est pas une pathologie considérée comme mortelle de façon directe, mais elle peut l'être indirectement si les hémorragies formées sont trop fortes ou si les malformations empêchent l'individu de se déplacer pour se nourrir ou se cacher. Ces effets ont été observés chez des espèces de poissons telles que le medaka japonais (*Oryzias latipes*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), ainsi que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*). Parmi les effets observés, une excitation du poisson peut être remarquée à faible concentration, avant d'observer un état proche de la léthargie à forte concentration d'HAP. La quantité de dommages à l'ADN a également augmenté, et l'expression de certains gènes est modifiée, avec par exemple une surexpression de gènes tels que *cyp1a*, qui a un rôle important dans la détoxification. Sur l'ombrine ocellée (*Sciaenops ocellatus*), une étude a démontré des impacts directs sur le comportement, mais également des effets toxiques au niveau histologique (Magnuson et al., 2018).

Parmi les autres composés présents dans les pétroles, on retrouve les composés organiques volatils (COV), les résines, les alcanes et les asphaltènes (Adams et al., 2014; Bornstein et al., 2014; Robidoux et al., 2018). Les COV ont montré une toxicité sur différentes espèces. En effet, il est mis en avant que plus les pétroles sont riches en COV, plus on observe une toxicité aiguë, étant donné que certains pétroles riches en COV entraînaient une immobilité et une mortalité plus fortes chez les daphnies que les pétroles pauvres en COV (Robidoux et al., 2018). Cette même étude a mis en avant une mortalité chez la truite arc-en-ciel et une diminution nette du poids sec chez le mené à grosse tête (*Pimephales promelas*). Une autre étude a également mis en avant le fait que les asphaltènes et les

résines ne participent pas à la toxicité embryonnaire. En effet, il semblerait que ces composés aient une toxicité faible voire inexistante quand on la compare à celle d'autres composés pétroliers. Par ailleurs, une étude réalisée par Bornstein en 2014 basée sur le fractionnement des pétroles, a mis en avant une toxicité très faible des fractions contenant uniquement des cires et des alcanes de petite taille, montrant que ces composés ne semblent pas participer à la toxicité des pétroles.

## 1.2. Le modèle biologique, la truite arc-en-ciel

### 1.2.1. Présentation du modèle choisi

Dans le cadre de la législation REACH (enRegistrement, Evaluation et Autorisation des produits CHimiques) créée en 2006, de plus en plus d'analyses toxicologiques et écotoxicologiques sont réalisées et de plus en plus d'animaux sont utilisés à ces fins. En 1959, la règle des 3R « *Reduce, Refine, Replace* » a été éditée par Russel et Burch (Russell, 1959). Cette dernière demande la réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale, mais également l'amélioration des conditions et techniques de laboratoire. Le dernier R, « *Replace* », consiste à se tourner vers un remplacement de l'expérimentation animale par le biais d'outils alternatifs. Par exemple les cultures cellulaires, la modélisation *in silico*, ou des bioessais sur tissus ou stades de vie non protégés par la législation animale peuvent être utilisés. La **Figure 3** montre les stades de développement protégés et non protégés par la législation européenne dans le cas de la truite arc-en-ciel. Cette espèce est non protégée par la législation jusqu'à la fin de la résorption de la vésicule vitelline, c'est-à-dire qu'elle n'est pas protégée tant que le scientifique n'a pas besoin d'intervenir dans sa nutrition.



**Figure 3:** Stades protégés et non protégés dans le cadre de la législation européenne (d'après Embry et al., 2010)

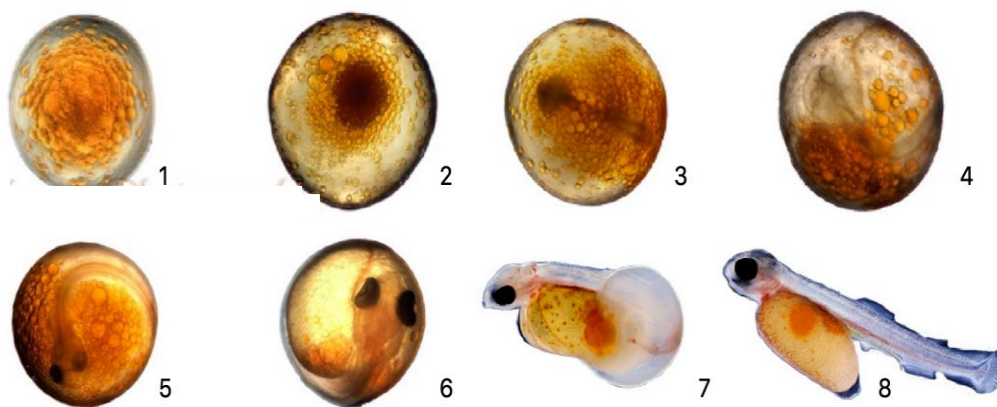
La truite arc-en-ciel est le poisson sélectionné comme modèle biologique dans le cadre de cette étude. Cette espèce, présentée dans la **Figure 4**, est un salmonidé appartenant à la sous-famille des *Salmoninae* (Jalabert and Fostier, 2010). Son nom lui vient de sa bande longitudinale irisée sur les flancs et sa couleur varie suivant le milieu et son âge. Elle recherche une eau très oxygénée dont la

température se situe entre 10 et 16 °C et ces faibles exigences lui confèrent une grande capacité d'adaptation, permettant ainsi un élevage maîtrisé de cette espèce. On la retrouve généralement dans les eaux douces, les rivières et les lacs et elle est originaire de la côte Ouest de l'Amérique du Nord, où on la retrouve de l'Alaska jusqu'au nord du Mexique. A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, elle a été introduite dans le reste du globe, même dans des îles telles que celle de la Réunion. Cette introduction sur plusieurs continents était motivée par la production de nourriture, mais également par l'idée de « repeupler » les écosystèmes. Cette espèce est très utilisée en laboratoire pour les tests toxicologiques pour plusieurs raisons (Le Bihanic et al., 2014a; Santos et al., 2019). En effet, la mortalité basale de l'espèce en laboratoire est assez faible et l'espèce est commercialement disponible, son développement est très documenté et elle est sensible à de nombreux polluants. Ses stades précoces de développement sont également très utilisés dans les laboratoires étant donné qu'ils sont généralement plus sensibles que les stades adultes, mais également car leur développement se fait dans le gravier (bien oxygéné) jusqu'au stade larvaire. En effet, la femelle va pondre les œufs dans le sédiment, et les individus ne pourront en sortir qu'une fois qu'ils auront une capacité natatoire suffisante. Étant donné que les pétroles sont en partie constitués de molécules hydrophobes, ces molécules risquent de s'accumuler dans les sédiments et donc d'affecter les embryons et larves présents dans ces derniers.



**Figure 4:** Truite arc-en-ciel

D'autres avantages de la truite arc-en-ciel en laboratoire sont ses stades précoces de développement. En effet, les œufs ont une taille assez importante et une pigmentation particulière, ce qui permet de pouvoir facilement distinguer les œufs morts ou en retard de développement. Les différents stades de développement sont présentés dans la **Figure 5**.



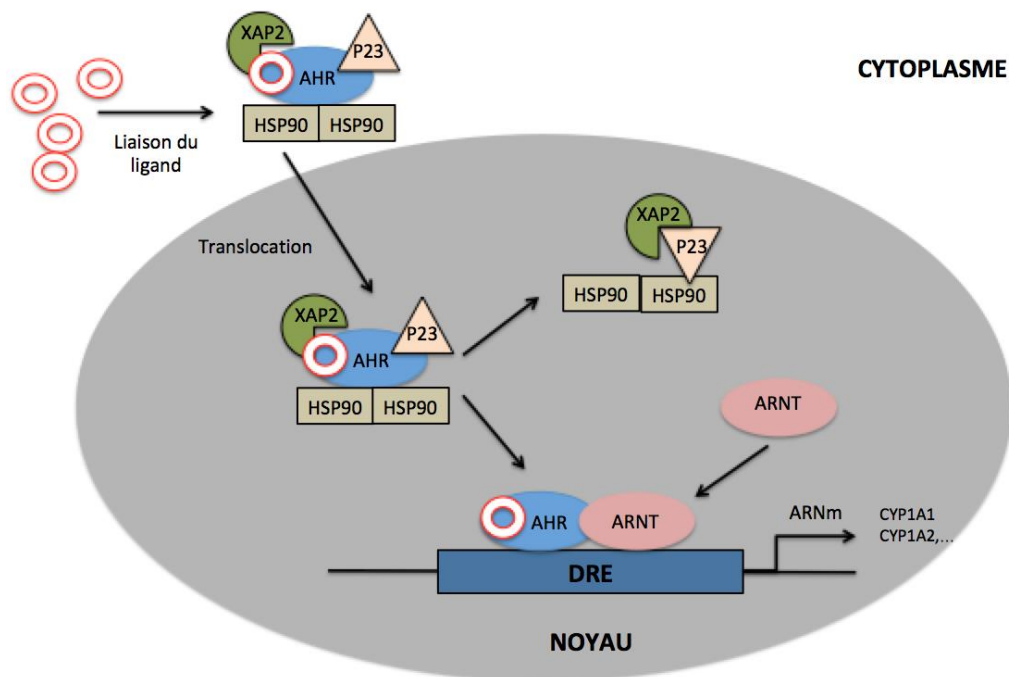
**Figure 5:** Stades précoces de développement de la truite arc-en-ciel (Warren Photographic, 2013)

On considère huit étapes majeures dans le développement embryonnaire des truites arc-en-ciel (Le Bihanic et al., 2014a; Vardy et al., 2013). Le développement et l'âge des truites sont comptés en degrés jour ( $^{\circ}\text{J}$ ; nombre de jours  $\times$  température moyenne de la journée), car la température est un facteur clé dans leur développement. Entre 0 et 150  $^{\circ}\text{J}$ , la segmentation est observée (stade 1), ainsi que le stade morula (stade 2), la fin de la gastrulation (stade 3), puis la formation d'un bourgeon caudal et le développement de la queue et les battements du cœur (stade 4). Le stade 5 apparaît en moyenne à 180  $^{\circ}\text{J}$ , où l'embryon mesure environ 7 mm de long. Ce stade est nommé stade œillé, car les yeux de la truite sont visibles à travers le chorion. Le stade 6 apparaît à 280  $^{\circ}\text{J}$ , où le développement des nageoires dorsales et anales est visible. L'éclosion a lieu entre 280 et 350  $^{\circ}\text{J}$ . On considère que l'individu est demi-éclos si le corps n'est pas complètement sorti du chorion (l'enveloppe de l'œuf, stade 7). Le dernier stade apparaît entre 350 et 400  $^{\circ}\text{J}$ , le stade de prolarve (stade 8). La larve est complètement sortie du chorion et le vitellus est très pigmenté. L'alimentation reste majoritairement endogène jusqu'au stade prolarve inclus. Le terme de larve n'est employé que lorsque le sac vitellin est complètement résorbé (540  $^{\circ}\text{J}$ ). Les embryons ne sont généralement pas manipulés pendant les quatre premiers stades de développement, car leur blastoderme n'est pas complètement refermé, ce qui les rend particulièrement vulnérables. Ils sont généralement manipulés à partir du stade œillé.

### 1.2.2. Toxicité des pétroles sur la truite arc-en-ciel

Comme dit précédemment, la toxicité des pétroles dépend entre autre de leur fraction aromatique (HAP) et de leur fraction volatile (COV) (Ball and Truskewycz, 2013; McNeill et al., 2012). Dans le cas d'un vertébré aquatique comme la truite arc-en-ciel, il existe un récepteur nommé AhR

(aryl-hydrocarbon receptor ; récepteur aux hydrocarbures aromatiques) sur lequel des polluants comme certains HAP (ex. : benzo[a]pyrène) peuvent se fixer. Plusieurs études ont mis en avant la liaison du récepteur AhR à deux protéines chaperonnes hsp90 (heat shock protein-90) accompagnées de la protéine co-chaperonne P23 et de l'homologue d'immunophiline XAP2. C'est lorsque le contaminant va se fixer sur le récepteur AhR que le processus de biotransformation va commencer. La fixation au récepteur AhR va en effet entraîner la formation du complexe Polluant-AhR, complexe qui va ensuite se déplacer dans le noyau. Une fois dans le noyau, une dimérisation avec un récepteur nucléaire, l'ARNT (AhR nuclear translocator, agent de translocation nucléaire AhR) aura lieu. Cette dernière aura lieu sur un DRE, c'est-à-dire un motif de reconnaissance des molécules comme les dioxines (DRE, dioxin response element). Ce mécanisme est schématisé dans la **Figure 6**. Ce complexe pourra ensuite se fixer sur le promoteur de nombreux gènes pour permettre leur transcription et la métabolisation des HAP. Plusieurs études ont prouvé que cette fixation avait lieu, car les auteurs ont observé une augmentation significative de l'activité EROD (éthoxyrésorufine-O-dééthylase) au niveau du foie ou de l'organisme entier. Cette augmentation est causée par celle de l'activité du cytochrome P450-1A, qui entre en jeu dans la détoxification (Ball and Truskewycz, 2013; McNeill et al., 2012). Cette augmentation de l'activité EROD est souvent liée à une modification de l'expression génique de *cyp1a* car ce gène est lié à au cytochrome P450-1A (Madison et al., 2015, 2017).



**Figure 6:** Activation de AhR par les HAP; hsp90, P23 et XAP-2 sont les molécules chaperonnes et DRE est le motif de reconnaissance (traduit depuis Ball and Truskewycz, 2013).

Lorsque les truites sont exposées à des bitumes dilués non vieillis, une grande mortalité est observée sous 24 h, alors qu'après vieillissement, cette mortalité n'est pas observée (Robidoux et al., 2018). Pour la toxicité chronique, il a été observé que des HAP tels que le BaP (benzo[a]pyrène), le fluoranthène ou le pyrène entraînent une augmentation des dommages à l'ADN, ainsi qu'une diminution du glutathion (GSH) qui montre ainsi un stress oxydatif (Yazdani, 2018). Ces mêmes HAP entraînent également une diminution de l'intégrité de la membrane cellulaire, ce qui peut représenter un danger pour la cellule (augmentation des morts et suicides cellulaires). Une autre étude a mis en avant des effets délétères sur le développement, avec des corps et des têtes plus petits chez les larves exposées à un pétrole conventionnel comme l'Arabian Light (Le Bihanic et al., 2014a). Cette même étude a mis en avant des malformations telles que des anomalies squelettiques, des œdèmes, et des hémorragies. Ces anomalies étaient généralement précédées par des temps d'éclosion plus longs que pour les embryons n'ayant pas été exposés aux fractions aqueuses des pétroles. Une dernière étude met en avant un impact des HAP au niveau génique, avec une surexpression de plusieurs gènes impliqués dans la transcription comme *ahr2a* (aryl-hydrocarbon receptor 2 alpha), *ahrr* (aryl-hydrocarbon receptor repressor) ou *ntf3* (neurotrophin 3). Certains gènes impliqués dans la croissance de la cellule ont également été surexprimés, comme *csk* (tyrosine-protein kinase CSK) ou *lgi1* (Leucine-rich glioma-inactivated protein 1). Pour finir, des gènes impliqués dans l'apoptose ont

montré une modification de leur expression, comme les gènes *ahr2a* et *gsn* (gelsolin) (Vehniäinen et al., 2016). Cette étude a également mis en avant une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques comme *cyp1a* (cytochrome P450 1A), *cyp1b1* (cytochrome P450 1B1) et *fads2* (Acyl-CoA 6-desaturase).

### **1.3. Biomarqueurs d'intérêt**

#### **1.3.1. Biomarqueurs de développement**

Les premiers biomarqueurs sélectionnés pour étudier la toxicité des pétroles dans cette étude sont les biomarqueurs liés au développement, c'est-à-dire la biométrie et les malformations. La biométrie correspond à plusieurs traits physiques tels que la taille de la larve et de sa tête, mais également le diamètre de son œil. Le rapport entre la taille de la tête et la taille du corps est également calculé. Plusieurs études ont mis en avant une modification de ces paramètres après une exposition à différents polluants comme les pesticides ou les pétroles chez différentes espèces comme le medaka japonais et la truite arc-en-ciel (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b; Santos et al., 2019).

Le développement est également analysé par le biais de l'étude des malformations. Ces dernières sont souvent recherchées après une exposition à des pétroles ou à des contaminants pétroliers tels que les HAP. Le nombre de malformations est généralement calculé et un spectre des anomalies observées est généralement réalisé en comptabilisant les malformations squelettiques, cranio-faciales, mais également les hémorragies ou les œdèmes (Alderman et al., 2018; Alsaadi et al., 2018b; Incardona et al., 2013; Le Bihanic et al., 2014a, 2014a; McDonnell et al., 2019). Plusieurs études ont montré une augmentation significative des malformations après exposition à des pétroles.

#### **1.3.2. Biomarqueur de comportement**

Le comportement natatoire est un facteur à prendre en compte après une exposition à des contaminants tels que le pétrole. En effet, certains contaminants peuvent entraîner des modifications dans le comportement natatoire. Quand ce facteur est analysé, plusieurs paramètres peuvent être étudiés. Par exemple, la distance parcourue, la vitesse de nage et la mobilité peuvent être étudiées. Aussi, il peut être intéressant d'étudier la position dans le puits étant donné que, dans la nature, la plupart des poissons ont tendance à se cacher pour éviter d'être victimes de prédation (Lari et al., 2016; Le Bihanic et al., 2014b; Philibert et al., 2016). Plusieurs études ont montré une modification du



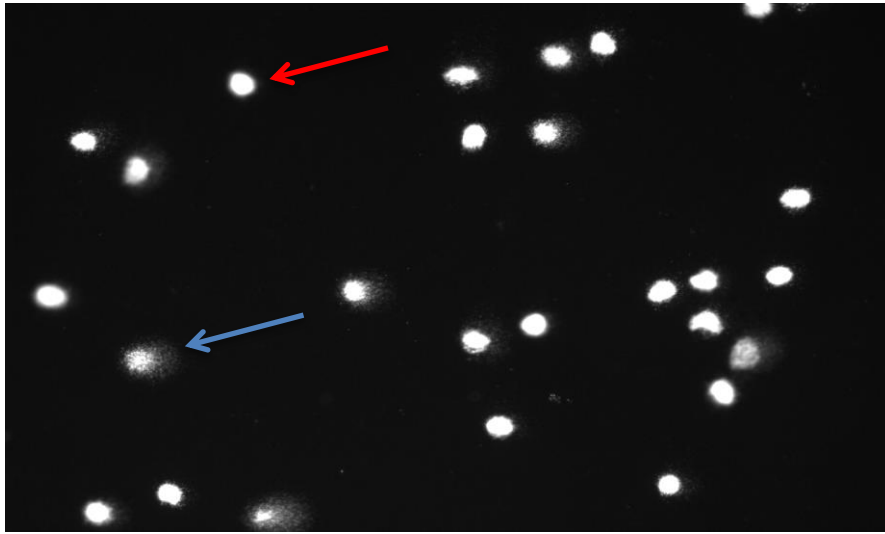
comportement natatoire après exposition à des pétroles, par le biais de poissons ne se cachant plus et d'une mobilité fortement réduite chez certains individus. Il reste important de noter que cette diminution de mobilité peut parfois être causée par l'apparition de malformations, comme présenté dans la partie 1.3.1.

### 1.3.3. Biomarqueur de contamination et de détoxication

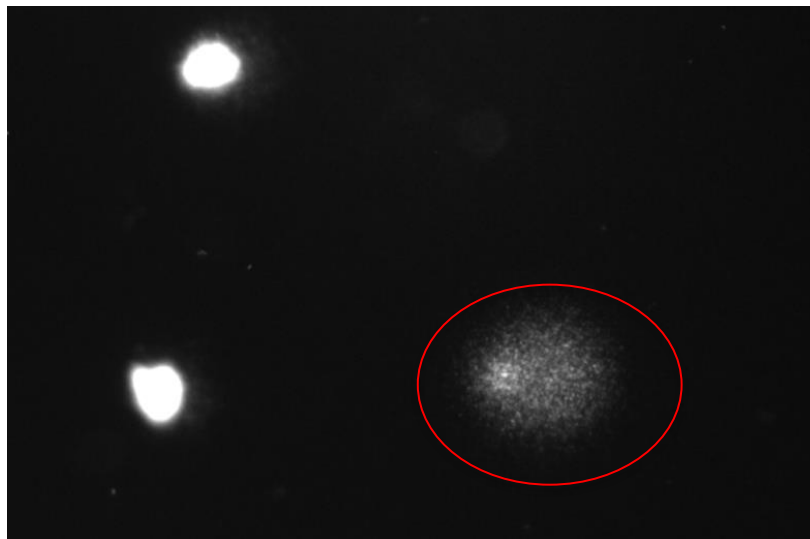
Comme dit précédemment, certains composés pétroliers comme les HAP peuvent pénétrer dans les cellules par voie passive et activer le récepteur AhR et les mécanismes qui y sont associés. Une fois dans la cellule et dans le noyau, les molécules de reconnaissance prendront en compte la contamination et le système de détoxication rentrera en jeu. Plusieurs cytochromes tels que les cytochromes P450-1A ont un rôle pendant la détoxication et l'activité de ces derniers est mesurable par le biais de l'analyse de l'activité EROD (Brinkmann et al., 2013; Leggieri et al., 2019; McNeill et al., 2012). Cette activité est mesurable par fluorescence. En effet, le milieu de contamination des poissons est remplacé par du 7-ER (7-éthoxyrésorufine). Une fois dans l'organisme, le 7-ER sera métabolisé par les organismes en résorufine, qui est fluorescente. La mesure fluorescente de cette molécule permet donc de mesurer l'activité des cytochromes impliqués dans la détoxication (Le Bihanic et al., 2013). Plusieurs études ont montré une induction de l'activité EROD après exposition à des pétroles.

### 1.3.4. Biomarqueur de l'intégrité cellulaire

Les cellules peuvent être affectées par les pétroles, à commencer par l'intégrité de la membrane cellulaire. Cependant, l'ADN peut également être affecté et dégradé (Gagné et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). Cet impact s'observe par le biais de formation de dommages à l'ADN mais également par l'apparition de micronoyaux. Un moyen pour observer les dommages à l'ADN de manière générale est le test des comètes. Suite à plusieurs traitements et à une électrophorèse, des cellules par exemple sanguines peuvent être lues grâce à un marqueur fluorescent, et l'état des cellules peut être observé. Généralement, le pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète (**Figure 7**) est considéré comme correspondant au pourcentage de dommages à l'ADN. Les cellules « hérissons », qui sont considérées comme étant apoptotiques ou comme ayant une quantité de dommages trop élevée sont également comptabilisées. Un exemple de cellule apoptotique est présenté dans la **Figure 8**.



**Figure 7:** Photographie de noyaux cellulaires intègres (ronds, flèche rouge) ou endommagés (noyaux avec comètes, flèche bleue) observables après avoir réalisé un test des comètes sur des cellules sanguines de truite arc-en-ciel.

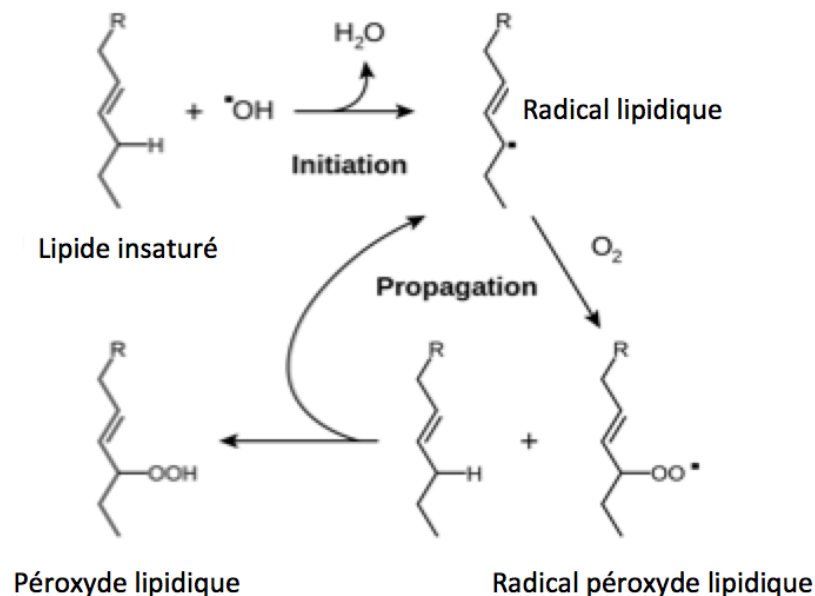


**Figure 8:** Exemple d'une cellule hérisson obtenue révélée par le test des comètes sur une larve de truite arc-en-ciel exposée à 50% de WAF Bluesky

Plusieurs études ont montré l'impact des pétroles au niveau des cellules par le biais de l'augmentation des dommages à l'ADN, c'est pourquoi ce biomarqueur a été sélectionné dans notre étude (Gagné et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a).

### 1.3.5. Biomarqueurs de stress oxydatif

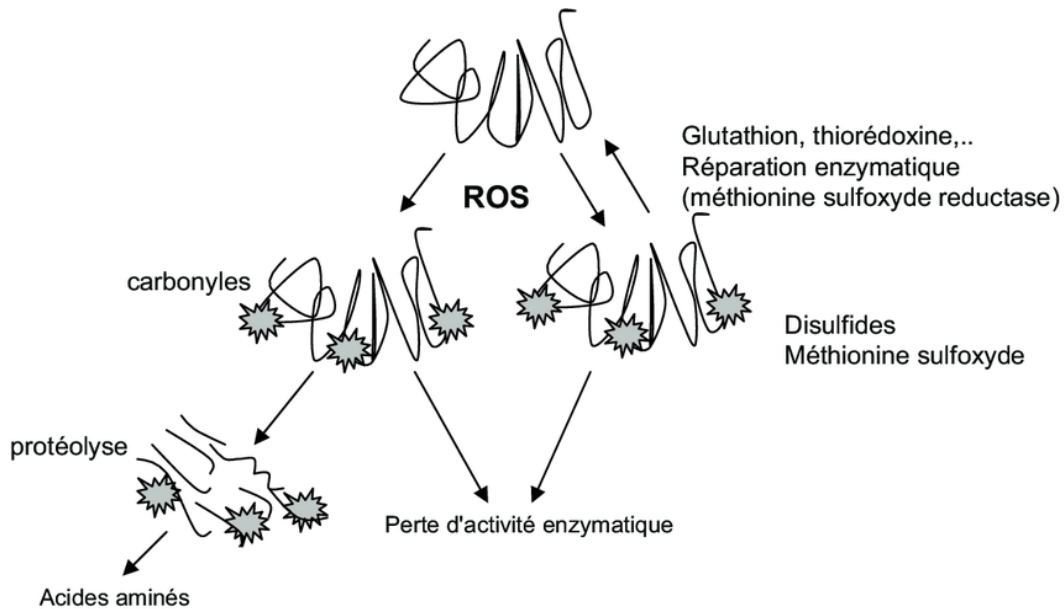
L'exposition de poissons à des contaminants tels que les pétroles ou les produits pétroliers peut entraîner du stress oxydatif à cause de la production d'espèces réactives de l'oxygène au moment de la détoxification. Ces espèces réactives peuvent par exemple entraîner des dommages au niveau des lipides, avec par exemple la peroxydation des lipides (**Figure 9**) (Li et al., 2010; Tkachenko et al., 2015). La mesure des protéines carbonylées permet également de vérifier la présence d'un stress oxydatif, mais cette fois au niveau des protéines. Même s'il n'y a pas d'études prouvant l'impact des pétroles sur les protéines carbonylées, plusieurs études ont montré cet effet par le biais d'autres contaminants comme les pesticides, par exemple.



**Figure 9:** Mécanisme de peroxydation des lipides par les radicaux libres (d'après Tim Vickers, 2001)

Une autre macromolécule pouvant être affectée par les espèces réactives de l'oxygène est la protéine. En effet, on peut observer une carbonylation des protéines après exposition à certains polluants (Li et al., 2010; Tkachenko et al., 2015). Comme présenté dans la **Figure 10**, les espèces réactives de l'oxygène peuvent créer des fonctions carbonyles sur les protéines, ce qui peut par exemple mener à une perte de l'activité enzymatique. Dans certains cas, cette carbonylation peut amener la protéine à se scinder en plusieurs acides aminés si la protéolyse est enclenchée. Tout comme la peroxydation des lipides, aucune étude ne montre d'induction des protéines carbonylées

après exposition à des pétroles ou composés pétroliers. Cependant, plusieurs études ont montré que certains polluants tels que les pesticides induisent la carbonylation de protéines.



**Figure 10:** Mécanisme de carbonylation des protéines (d'après Christophe Bailly, 2003).

### 1.3.6. Biomarqueurs d'expression génique

L'étude de l'expression génique permet d'identifier les processus ayant lieu au niveau biomoléculaire. Un gène peut être sous-exprimé ou surexprimé après exposition d'un individu à un contaminant (McDonnell et al., 2019). Dans cette étude, sept gènes ont été sélectionnés, dont deux gènes de référence, *ef1α* (elongation factor 1-alpha) et *rpl8* (60S ribosomal protein L8-A). Pour réaliser une analyse génique, sélectionner des gènes de référence est impératif pour réaliser une normalisation des données. Un gène peut être considéré comme un gène de référence si son expression ne varie pas entre les différentes conditions d'exposition, c'est-à-dire si le contaminant choisi n'induit pas de sous- ou surexpression du gène.

Les cinq autres gènes sélectionnés dans cette étude sont des gènes d'intérêt, et ont été choisis par rapport aux biomarqueurs sélectionnés plus haut et par rapport à la littérature (Madison et al., 2015, 2017; McDonnell et al., 2019). Par exemple, les gènes *ahr2* et *arnt* (aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator) ont été sélectionnés pour mesurer l'activité du récepteur AhR et du translocateur ARNT. L'étude de ces deux gènes permet donc de vérifier si des contaminants pétroliers tels que les

HAP ont pénétré dans la cellule, et surtout s'ils ont activé le récepteur AhR et les mécanismes qui y sont associés pour pénétrer dans le noyau. Le gène *cyp1a* a également été sélectionné étant donné qu'il est lié à l'activité EROD, qui est généralement induite par l'exposition à différents pétroles (McNeill et al., 2012). Le gène *p53* (cellular tumor antigen p53) a également été sélectionné, et est lié à l'activité de la protéine P53. Cette dernière est inscrite dans le cycle cellulaire et va permettre de savoir si une cellule est endommagée et doit réaliser une apoptose (suicide cellulaire), ou si cette cellule est saine et peut démarrer la division cellulaire. Cette protéine permet donc de garder un environnement cellulaire sain. Étant donné que plusieurs études ont montré l'augmentation des dommages à l'ADN, l'utilisation du gène *p53* est pertinente (Gagné et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). Pour finir, le gène *nfe2.1* (nuclear factor erythroid 2 related factor 1) a été sélectionné. Il s'agit d'un gène précurseur du stress oxydatif. Si ce gène est surexprimé, d'autres gènes liés au stress oxydatif comme *gst* (glutathione S-transferase), *cat* (catalase) ou *sod* (superoxide dismutase) peuvent également être surexprimés. Cependant, si l'expression de ce gène n'est pas modifiée, cela peut indiquer une absence de stress oxydatif dans l'individu au moment de la mesure.

#### **1.4. Objectifs du projet**

Le premier objectif est d'étudier la toxicité de quatre pétroles différents sur la truite arc-en-ciel afin d'en savoir plus sur leurs spectres et profils de toxicité. Le deuxième est de comparer la toxicité des pétroles conventionnels (Arabian Light et Lloydminster) et celle des bitumes dilués (Bluesky et Clearwater) étant donné que ce sont deux familles de pétroles différentes, ce qui entraîne des différences au niveau de leurs compositions chimiques.

Egalement, les compositions chimiques des solutions seront analysées dans le cadre d'un dernier objectif. Cette analyse permettra de mettre en avant un potentiel lien entre la composition chimique des solutions de contamination et leur toxicité. Cette analyse permettra également de lier certains effets toxiques aux familles de composés chimiques responsables de cette toxicité.

## 1.5. Hypothèses

Le premier a comme premier objectif d'étudier la toxicité des quatre pétroles sur la truite arc-en-ciel à ses premiers stades de développement. La première hypothèse est que l'exposition aux pétroles entrainera une augmentation de la mortalité. Une seconde hypothèse est que différents biomarqueurs considérés comme sub-létaux seront impactés de différentes manières. La croissance des larves pourrait être diminuée, et la présence de malformations et de dommages à l'ADN pourrait être augmentée. Une dernière hypothèse est que l'activité EROD sera induite par l'exposition aux quatre pétroles.

Le deuxième objectif de cette étude est de comparer la toxicité des pétroles conventionnels et des bitumes dilués. L'hypothèse associée à cet objectif est que les bitumes dilués (dans les conditions de notre étude) seraient plus toxiques que les pétroles conventionnels.

## 2. Méthodologie

---

### 2.1. Expositions des truites arc-en-ciel

Les deux expositions des truites arc-en-ciel aux solutions de contamination pétrolières ont été réalisées en France à l'Université de Bordeaux, au laboratoire EPOC, équipe Écotoxicologie Aquatique, sous la direction du professeur Jérôme Cachot. La première exposition a eu lieu en Mai 2018 et la seconde a eu lieu en Décembre 2018.

#### 2.1.1. Exposition n°1 : Pétroles conventionnels

La première exposition a été réalisée avec les deux pétroles conventionnels, l'Arabian Light et le Lloydminster. Le but de cette expérience était d'exposer les truites aux extraits aqueux des pétroles à différentes concentrations afin d'évaluer et caractériser leur toxicité. Pour cela, des WAF (water-accommodated fractions) ont été extraites pour chacun des deux pétroles et des dilutions ont ensuite été réalisées. La concentration des WAF était de 156 mg/L dans de l'eau de source, celle-ci ayant été sélectionnée car c'est une concentration que l'on peut retrouver sur un site à la suite d'une fuite de pétrole. Pour la préparation des WAF, 156 mg de pétrole ont été ajoutés à 1 L d'eau de source, sous agitation à 300-350 rpm pendant 24 h à l'obscurité. La solution a ensuite été transvasée dans une ampoule à décanter pour permettre sa décantation pendant 1 h à l'obscurité. A la fin de cette décantation, la phase aqueuse (la phase inférieure) a été récupérée et diluée à 10 et 50% avec de l'eau de source. L'eau de source utilisée tout au long de la préparation est l'eau de source de montagne Laqueuille et sa composition chimique est présentée dans l'**Annexe I**. La préparation des WAF est présentée dans le **Tableau 1** et la composition des différentes solutions de contamination est présentée dans le **Tableau 2**.

**Tableau 1:** Protocole de préparation des WAF suivi dans le cadre de la première exposition (pétroles conventionnels, Mai 2018)

	<b>Arabian Light</b>	<b>Lloydminster</b>
<b>Homogénéisation du pétrole</b>	Vortex pendant 10 sec	Chauffage à 30°C dans un bain à ultrasons puis vortex pendant 10 sec
<b>Volume à prélever</b>	190 µL	325 µL
<b>Temps et vitesse d'agitation</b>	300 - 350 rpm pendant 24 h à l'obscurité	300 - 350 rpm pendant 24 h à l'obscurité
<b>Décantation</b>	1 h dans une ampoule à décanter à l'obscurité	1 h dans une ampoule à décanter à l'obscurité

**Tableau 2:** Solutions de contamination utilisées dans le cadre de la première exposition (pétroles conventionnels, Mai 2018)

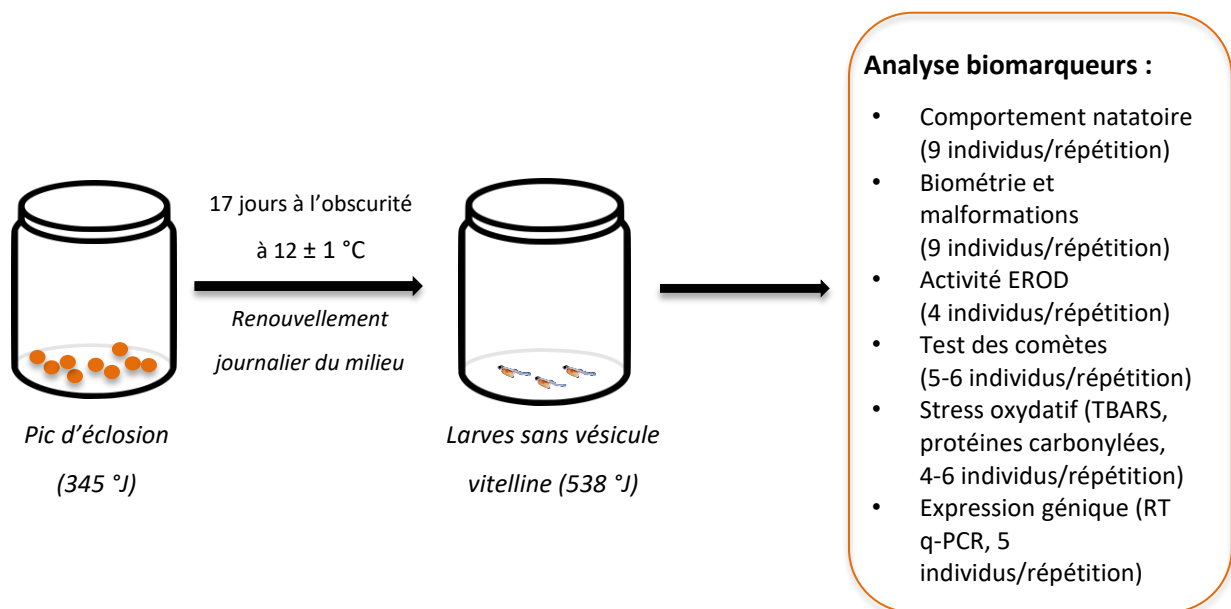
<b>Condition</b>	<b>Volume WAF (mL)</b>	<b>Volume eau de source (mL)</b>	<b>Nombre de répétitions</b>
<b>Témoin</b>	0	2000	4
<b>Arabian Light 10% WAF</b>	150 (Arabian Light)	1350	3
<b>Arabian Light 50% WAF</b>	750 (Arabian Light)	750	3
<b>Lloydminster 10% WAF</b>	150 (Lloydminster)	1350	3
<b>Lloydminster 50% WAF</b>	750 (Lloydminster)	750	3

Les embryons de truite arc-en-ciel ont été fournis par la pisciculture expérimentale INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) des Monts d'Arrée (INRA-PEIMA). Ils ont été livrés dans un délai maximal 24 h dans une glacière en polystyrène, dans un bocal entouré de plusieurs poches de glace afin de conserver les embryons à une température assez faible (4 °C). Une fois reçus, ils ont été acclimatés dans des aquariums pendant une nuit avant d'être transposés dans des jarres en



verre dans lesquelles il n'y avait que de l'eau de source en attendant de commencer l'expérimentation. A l'arrivée, les embryons étaient au stade œillé et étaient âgés de 280 °J.

Les expositions ont été réalisées à l'obscurité à  $12 \pm 1$  °C dans une enceinte thermo-régulée (THIRODE) et des bacs de glace ont été ajoutés dans cette même enceinte afin de s'assurer que la température reste à 12 °C. Chacune des répétitions était réalisée dans un pot en verre de 700 mL fermé par un couvercle dans lequel 500 mL de solution de contamination ont été ajoutés, ainsi que 25 embryons et larves de truite arc-en-ciel au moment du pic d'éclosion (345 °J). Un bulleur (EHEIM 200) était également ajouté, relié par un tube et une pipette Pasteur en verre afin d'assurer l'oxygénation constante et permanente des solutions. Lors de cette expérience, les solutions étaient renouvelées à 80% tous les jours par des solutions fraîchement préparées et l'oxygène dissous était mesuré au moment du renouvellement du milieu (Fibox 3, PreSens). Lors de toute l'exposition, la concentration d'oxygène dissous était conservée au-dessus de 80%. La mortalité était également suivie tous les jours, et les embryons et larves morts étaient comptabilisés et retirés pour éviter toute contamination du milieu. Afin de s'assurer de ne pas avoir de contamination par le biais de champignons ou de bactéries, un fongicide 5 a été ajouté (20 µL, concentration finale 40 ppm) tous les jours une heure avant le renouvellement du milieu. Le schéma d'exposition et les biomarqueurs étudiés sont présentés dans la **Figure 11**.



**Figure 11** : Schéma d'exposition et biomarqueurs étudiés dans le cadre de la première exposition (pétroles conventionnels, Mai 2018)

### 2.1.2. Exposition n°2 : bitumes dilués (dilbits)

La seconde exposition a été réalisée avec les deux dilbits, le Bluesky et le Clearwater. Pour celle-ci aussi, le but était d'étudier la toxicité de leurs fractions aqueuses sur les premiers stades de développement de la truite arc-en-ciel. Pour cela, les WAF des deux pétroles ont été extraites en suivant le même protocole et en utilisant la même eau de source que dans l'exposition n°1. Le protocole de préparation des WAF est présenté dans le **Tableau 3**, et la composition des différentes solutions de contamination est présentée dans le **Tableau 4**.

**Tableau 3:** Protocole de préparation des WAF suivi dans le cadre de la seconde exposition (bitumes dilués, Décembre 2018)

	<b>Bluesky</b>	<b>Clearwater</b>
<b>Homogénéisation du pétrole</b>	Vortex pendant 15 sec	Vortex pendant 20 sec
<b>Volume à prélever</b>	220 µL	228 µL
<b>Temps et vitesse d'agitation</b>	300 - 350 rpm pendant 24 h à l'obscurité	300 - 350 rpm pendant 24 h à l'obscurité
<b>Décantation</b>	1 h dans une ampoule à décanter à l'obscurité	1 h dans une ampoule à décanter à l'obscurité

**Tableau 4:** Solutions de contamination utilisées dans le cadre de la seconde exposition (bitumes dilués, Décembre 2018)

<b>Condition</b>	<b>Volume de fraction aqueuse (mL)</b>	<b>Volume eau de source (mL)</b>	<b>Nombre de répétitions</b>
<b>Témoin</b>	0	2000	4
<b>Bluesky 10% WAF</b>	150 (Bluesky)	1350	3
<b>Bluesky 50% WAF</b>	750 (Bluesky)	750	3
<b>Clearwater 10% WAF</b>	150 (Clearwater)	1350	3
<b>Clearwater 50% WAF</b>	750 (Clearwater)	750	3

Le protocole d'exposition utilisé est le même que celui de la première exposition (pétroles conventionnels). Les seules différences notables entre les deux sont l'enceinte thermo-régulée utilisée et la durée de l'exposition. En effet, l'enceinte d'exposition a été remplacée par l'enceinte Snijders Scientific™ ECD01, étant donné que celle utilisée ne permettait plus de conserver les larves à 12 °C. L'éclosion ayant eu lieu plus tard que prévu, l'exposition n'a duré que 16 jours, ayant commencé lorsque les larves étaient âgées de 364 °J et terminé lorsqu'elles étaient âgées de 544 °J. Les biomarqueurs étudiés et la quantité de larves utilisées pour les étudier sont les mêmes que pour la première exposition.

## **2.2. Biomarqueurs**

A la suite des expositions, lorsque les larves avaient atteint la résorption complète de leur vésicule vitelline (538 °J pour la première exposition et 544 °J pour la deuxième), différents biomarqueurs ont été étudiés sur ces larves.

### **2.2.1. Biomarqueurs de développement (9 individus/répétition)**

Neuf individus par répétition ont été sélectionnés pour étudier leur développement. À cette fin, ils ont été observés et photographiés à l'aide du logiciel ToupView 3.7 et du microscope Leica MZ75. Pour faciliter la photographie, les larves ont été mises dans de la glace et de l'eau faiblement enrichie en eau gazeuse (0,5 mL d'eau gazeuse dans 2 mL d'eau de source) juste avant de les photographier.

Pour la biométrie, le logiciel ToupView 3.7 a été utilisé pour mesurer la taille du corps entier de la larve et de sa tête, ainsi que le diamètre de son œil. Le rapport entre la taille de la tête et celle du corps de la larve a été calculé. Pour les malformations et anomalies liées au développement, les observations ont été réalisées en deux fois. Les larves malformées ont d'abord été comptabilisées à l'œil nu parmi toutes les larves ayant survécu à l'exposition. Ensuite, les photographies des 9 individus/répétition ont été analysées pour réaliser un spectre des malformations causées par l'exposition aux solutions de contamination pétrolières. Les lésions recherchées étaient les œdèmes, les hémorragies et les malformations cranio-faciales et squelettiques.

### **2.2.2. Biomarqueur de comportement (9 individus/répétition)**

La mesure du comportement natatoire a été réalisée sur les mêmes individus que les analyses de biométrie et de malformations. Ces mesures ont été réalisées dans des chambres d'observation DanioVision (Noldus) thermo-régulées à 12 °C (Huber Pilot ONE, température réglée sur 8 °C). Dans des microplaques en plastique à 6 puits (diamètre d'un puits : 3,6 cm), une larve était disposée dans chaque puits dans 2 mL de son milieu d'exposition. Les microplaques étaient ensuite disposées dans les deux appareils DanioVision afin de permettre une acclimatation des larves pendant 10 minutes à l'obscurité. L'analyse des réponses photo-motrices des larves a été réalisée sur une période de 30 minutes divisée en trois sous-périodes de 10 minutes (10 minutes Nuit - 10 minutes Jour - 10 minutes Nuit) avec le logiciel EthoVision XT12.

Les vidéos ont été traitées automatiquement par le logiciel. Les données finales ont permis de quantifier la vitesse de déplacement des larves sur des périodes d'une minute. Sur chaque période de 10 min, c'est la distance parcourue, la position dans le puits et la fréquence de mobilité qui ont été étudiées. La fréquence de mobilité est estimée en mesurant quel pourcentage de l'aire de la larve est modifiée sur les 10 minutes. Si moins de 20% de l'aire est modifiée, on parle de faible mobilité, alors que si c'est 20 à 60% de l'aire qui est modifiée, on parle de mobilité normale. Quand plus de 60% de l'aire est modifiée, on parle de forte mobilité.

### **2.2.3. Biomarqueurs de contamination et de détoxification (4 individus/répétition)**

L'activité EROD (activité enzymatique éthoxyrésorufine-O-dééthylase) a été mesurée en utilisant une gamme d'étalonnage préparée le matin même à l'aide d'une solution de résorufine (200 mM) pour obtenir la gamme de concentrations suivantes : 0 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 et 10 nM. Le protocole utilisé a été mis au point par Le Bihanic en 2013, puis modifié par Gaaied en 2019 (Gaaied et al., 2019; Le Bihanic et al., 2013). Quelques modifications y ont été apportées.

Deux heures avant la première mesure, des larves non contaminées ont été exposées à du BaP à 100 nM pendant une heure afin de réaliser le témoin positif de l'expérience et de s'assurer du fonctionnement du test. Une heure avant la première mesure, dans une plaque de 24 puits, une larve a été disposée dans un puits, et son milieu d'exposition a été remplacé par 1,2 mL de solution de 7-ER. Les plaques ont ensuite été mises en incubation à 12 °C à l'obscurité.

Une heure plus tard, la solution de 7-ER a été entièrement renouvelée. Deux échantillons de 100 µL de cette solution ont été retirés et placés dans deux puits d'une microplaque de 96 puits afin d'avoir des duplicats de mesure. Les solutions d'étalonnage ont également ajoutées dans des volumes similaires, et les plaques ont été lues par fluorescence grâce au lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA et aux logiciels OPTIMA et OPTIMA-Data Analysis. Cette mesure était considérée comme étant la mesure à t = 0 h.

Quatre heures plus tard, 2 x 100 µL ont à nouveau été prélevés dans les puits, sans renouvellement de la solution de 7-ER, et les prélèvements ont été disposés dans deux puits d'une nouvelle microplaque de 96 puits. La fluorescence a directement été mesurée de la même manière, et cela a permis d'obtenir la fluorescence à t = 4 h. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir des mesures de standard à t = 0 h et t = 4 h. L'activité EROD est calculée à partir des données de fluorescence à t = 4 h, et les résultats sont exprimés en % d'activité EROD relative au témoin.

Resorufine produite (nM) = fluorescence / pente de la courbe des standards

Resorufine produite (pmoles/puits) = resorufine produite x 0,0001 x 1000

*(x 0,0001 car quantité présente dans les puits, 1000 pour passer de nmoles à pmoles)*

Activité EROD (pmol/larve/minute) = resorufine produite par puits/1/240

#### **2.2.4. Biomarqueur de l'intégrité cellulaire (5-6 individus/répétition)**

Les larves ont été mises dans de l'eau gazeuse diluée (0,5 mL dans 2 mL d'eau de source) et le contenant a été mis dans de la glace afin de ralentir le métabolisme des larves. Leur tête a été sectionnée afin d'avoir accès au cœur qui est présent au niveau de leur cou. De l'héparine (10 µL) a été ajoutée au niveau du cœur afin de permettre de prélever le sang avec une micropipette tout en évitant toute coagulation. Le sang a ensuite été mis dans 200 µL de liquide de cryoconservation et le

tube a immédiatement été plongé dans de l'azote liquide. Cette méthode de stockage a déjà été décrite par Barillet et Bony, et a été validée au laboratoire pour les cellules sanguines de truite arc-en-ciel (Barillet et al., 2005; Bony et al., 2008). Le protocole suivi pour le test des comètes a été mis au point par Singh en 1988 puis modifié par Santos en 2019 (Santos et al., 2019; Singh et al., 1988).

La veille du test des comètes, les lames de verre ont été recouvertes de gel d'agarose à 0,8%. Elles ont ensuite été mises à sécher à l'abri de la lumière et de la poussière. Le jour des analyses, les échantillons de sang ont été sortis de l'azote liquide et mis dans de la glace pour une décongélation lente afin de limiter les risques d'altération des cellules. Le sang (50 µL) a été ajouté à 100 µL de LMPA (low melting point agarose) à 0,75%. La solution a ensuite été vortexée et deux gouttes de 50 µL ont été déposées sur une lame puis recouvertes par des lamelles en verre 18 x 18 mm. Les gels ont été mis à solidifier au frigo pendant 15 min, puis remis à température ambiante pour la suite de la préparation. Les lamelles ont été délicatement retirées puis 50 µL de LMPA à 1% ont été déposés sur les gels qui ont ensuite été recouverts par de nouvelles lamelles 18 x 18 mm. Les lames ont été remises au frigo pendant 15 minutes pour permettre la solidification des gels. Pendant la solidification, 40 mL de DMSO et 4 mL de Triton X-100 ont été ajoutés à la solution de lyse déjà préparée (58,44 g de NaCl, 200 mL d'EDTA, 4 mL de Tris-HCl, volume total = 400 mL, pH 10). Une fois les gels solidifiés, les lamelles ont été retirées avant de plonger les lames dans la solution de lyse pendant 1 h 30. Les lames ont ensuite été séchées et mises dans le bain d'électrophorèse à 4 °C à l'obscurité pendant 25 minutes afin de permettre le déroulement alcalin. L'électrophorèse a ensuite été lancée à 25 V et 300 mL pour réaliser la migration des cellules. Les lames ont à nouveau été séchées et plongées dans une solution de neutralisation (400 mL Tris-HCl, pH 7,5, volume total = 1 L) pendant 15 minutes. Cette solution a été renouvelée toutes les 5 minutes. Pour finir, les lames ont été plongées dans l'éthanol absolu pendant 20 minutes pour déshydrater les cellules et stopper toute réaction. Elles ont ensuite été mises à sécher à l'obscurité et à l'abri de la poussière pendant une nuit entière.

Avant la lecture des gels, 20 µL de BET (Bromure d'Ethidium) à 20 µg/mL ont été déposés sur un des gels, et ce dernier a été recouvert d'une lamelle 22 x 22 mm. Le gel a ensuite été analysé avec un microscope à épifluorescence Olympus BX51 couplé à un système d'analyses d'images. Cent cellules ont été comptées par le logiciel Comet Assay IV et l'intensité de la queue de la comète (% d'ADN présent à l'intérieur) a automatiquement été calculée par le logiciel. Les cellules « hérissons » (de l'anglais « hedgehog cells ») ont été comptées manuellement.

### 2.2.5. Biomarqueurs de stress oxydatif (4-6 larves/répétition)

Les têtes de larves ont été disposées individuellement dans des microtubes. Les corps sans sac vitellin ont été individuellement déposés dans d'autres tubes. Ils ont ensuite été conservés à -80 °C jusqu'à analyse et extraction des protéines.

#### 2.2.5.1. *Extraction et dosage des protéines*

L'extraction a été réalisée sur des pools de 2 corps de larves décongelés sans sac vitellin. Les deux larves ont été pesées et 250 µL de tampon phosphate 100 mM (pour 1 L, 8,705 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 6,8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ont été ajoutés. Les corps ont ensuite été broyés au mini-potter (MoBiTec, G50 Tissue Grinder) à 3000 rpm jusqu'à obtention d'une solution homogène. Le tampon phosphate a été ajouté (900 µL) et les tubes ont été mis à centrifuger à 4 °C et 10 000 rpm pendant 25 minutes. Le surnageant a été récupéré puis mis dans un autre tube, c'est la fraction S9. Après avoir vortexé le S9, 20 µL ont été dilués dans 1 mL d'eau distillée pour le dosage des protéines totales. Deux tubes ont ensuite été remplis avec 500 µL chacun pour les analyses des TBARS et des protéines carbonylées. Ces deux tubes ont été conservés à -80 °C en attendant les analyses, alors que le dosage des protéines a été fait directement (sans congélation).

Le dosage des protéines a été réalisé sur la fraction S9 diluée dans 1 mL d'eau distillée en suivant la méthode mise en place par Lowry en 1951 (Lowry et al., 1951). Ce dosage a été réalisé grâce à une gamme standard de protéines BSA (Albumine de sérum bovin) aux concentrations suivantes : 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 mg/mL. Dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits, 90 µL d'un échantillon de S9 ou de gamme standard ont été ajoutés, ainsi que 30 µL de soude (4,5 g NaOH, 8,5 g NaHCO<sub>3</sub>, volume 100 mL), 90 µL de CuSO<sub>4</sub> (100 mg CuSO<sub>4</sub>, 200 mg tartrate double Na,K, volume 100 mL) et 60 µL de folin (20 mL folin, volume total 100 mL). Pour chaque échantillon, 4 puits ont été utilisés. Les solutions ont été délicatement mélangées avec une multi-pipette tout en évitant la formation de bulles d'air. La plaque a ensuite été disposée pendant 30 minutes à l'obscurité. La plaque a ensuite été lue pour obtenir l'absorbance à 750 nm grâce au lecteur BIO-TEK Synergy HT et au logiciel KC4 3.3 Rev 10. Les quantités de protéines ont automatiquement été calculées par le logiciel. Les résultats sont exprimés en mg de protéines/mg de tissu.

#### 2.2.5.2. *Dosage de peroxydation des lipides : TBARS*

Le dosage de peroxydation de lipides (TBARS) a été réalisé sur un des échantillons de 500 µL de S9 en suivant le protocole mis en place par Buege en 1978 puis adapté par Santos en 2019 (Buege and Aust, 1978; Santos et al., 2019).

Une gamme standard de MDA (Malondialdéhyde plasmatique) a été utilisée aux concentrations : 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 15 nmol/mL. Le TCA-BHT (500 µL ; TCA 20% : 20 g pour 100 mL, BHT : 200 mg dans 10 mL d'éthanol) a été ajouté aux 500 µL de S9 pendant la décongélation. La gamme standard a été préparée (500 µL de gamme et 500 µL de TCA-BHT) pendant que les échantillons décongelaient. Tous les tubes ont été vortexés puis mis à centrifuger pendant 10 minutes à 10 000 rpm à 4 °C. Dans des microtubes neufs, 120 µL de HCl à 0,6 N (5,09 HCl RP dans 100 mL d'eau distillée) ont été disposés, ainsi que 600 µL de surnageant et 480 µL de TRIS base-TBA (302,75 mg TRIS, 1,441 g TBA, pH 7,4, volume total : 100 mL). Les tubes ont ensuite été placés au bain-marie à 80 °C pendant 15 minutes avant d'être disposés dans de l'eau froide pendant 3 minutes. Les solutions finales ont été disposées dans une microplaque de 96 puits (370 µL ; 3 répétitions par échantillon). La microplaque a été lue à 530 et 590 nm sur le logiciel KC4 3.3 Rev 10. Les résultats sont calculés en nmol MDA/mg de protéines puis exprimés en % relatif du témoin.

#### 2.2.5.3. *Dosage des protéines carbonylées*

Les protéines carbonylées ont été dosées sur le deuxième échantillon de 500 µL de S9 en suivant le protocole mis au point par Augustyniak en 2015, puis adapté par Santos en 2019 (Augustyniak et al., 2015; Santos et al., 2019).

Une solution de streptimicine (50 µL ; 0,55 g dans 5 mL de tampon phosphate) a été ajoutée aux protéines décongelées. La solution résultante a été vortexée et laissée à incuber pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 6000 rcf (relative centrifugal force) pendant 10 minutes. Puis, 200 µL du surnageant ont été ajoutés dans un tube « contrôle » ainsi que 800 µL d'HCl à 2,5 M (21 mL d'HCl 37%, volume total 100 mL). Dans un autre tube « essai », 200 µL de surnageant ont été ajoutés ainsi que 800 µL de DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine, 198 mg DNPH pour 100 mL). Les tubes ont ensuite été vortexés et laissés en incubation pendant une heure durant laquelle les échantillons étaient vortexés toutes les 15 minutes. Du TCA 20% (1 mL, 20 g TCA, 100 mL) a été ajouté avant que le tube ne soit vortexé puis laissé dans la glace pendant 5 minutes. Le tube a



ensuite été centrifugé à 10 000 rcf pendant 10 minutes. Le culot a été conservé puis remis en suspension dans 1 mL de TCA 10% (10 g TCA, 100 mL). Une nouvelle centrifugation à 10 000 rcf pendant 10 minutes a été réalisée après avoir laissé les tubes dans la glace pendant 5 minutes. Le culot a cette fois été remis en suspension dans 1 mL d'éthanol/acétate d'éthyle (50%, v/v). La solution a été centrifugée à 10 000 rcf pendant 10 minutes et le surnageant a été retiré. Cette étape a été répétée deux fois afin d'assurer un bon rinçage du culot. Après la dernière centrifugation, le surnageant a été retiré et remplacé par 500 µL de guanine hydrochloride à 6 M (57,32 g dans 100 mL). Une dernière centrifugation de 10 minutes à 10 000 rcf a été réalisée et c'est cette fois le surnageant qui a été conservé. Deux échantillons de 220 µL de tube « contrôle » ont été ajoutés dans deux puits d'une microplaque de 96 puits et 2 échantillons de 220 µL du tube « essai » dans deux autres puits. La plaque a été lue à 370 nm grâce au logiciel KC4 3.3 Rev 10. Les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéines.

#### 2.2.6. Biomarqueurs d'expression génique (5 individus/répétition)

Les analyses géniques sont les seules analyses de biomarqueurs réalisées à l'INRS-ETE à Québec, dans le laboratoire de Valérie Langlois. Elles ont été réalisées en quatre étapes : extraction de l'ARN, vérification de son intégrité par BioAnalyzer, rétro-transcription des échantillons avec une intégrité suffisante en ADN complémentaire, puis l'analyse de l'expression génique par RT q-PCR (PCR quantitative précédée par une rétro-transcription). Les gènes étudiés, les amorces correspondantes et les températures d'hybridation utilisées sont présentés dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5:** Gènes utilisés dans notre étude, accompagnés de leurs numéros d'accès, amorces directes (a) et inverses (b), températures d'hybridation et concentrations optimales d'amorces

Gene	Accession number	Primer (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Concentration d'amorces optimale (µM)	Design
<i>ef1α</i>	KJ175158	CTGTTGCCTTTGTGCCCATC <sup>a</sup> TTCCATCCCTTGAACCAGCC <sup>b</sup>	60	0,35	Design du laboratoire
<i>rpl8</i>	AB889392	CTGCTGTCTGGAGGAGAAGC <sup>a</sup> TTCCATCCCTTGAACCAGCC <sup>b</sup>	60	0,35	Design du laboratoire
<i>ahr2</i>	XM_021586301	GGGGCTGTTACGTTTTGCAC <sup>a</sup> GGTGGCTGGTTAGAGTGGAC <sup>b</sup>	62	0,25	Design du laboratoire
<i>arnt</i>	NM_001124710	AAGCACCTGATCCTGGAAGC <sup>a</sup> AAGAACAGGGGTCAGGGAGT <sup>b</sup>	62	0,40	Design du laboratoire
<i>cyp1a</i>	AF015660	GATGTCAGTGGCAGCTTTGA <sup>a</sup> TCCTGGTCATCATGGCTGTA <sup>b</sup>	60	0,35	Design du laboratoire
<i>nfe2.1</i>	XM_021565933	ACAGCTTCTACCCATTGCC <sup>a</sup> GTGGTCAAGCGGAGCCATGT <sup>b</sup>	56	0,15	Design du laboratoire
<i>p53</i>	NM_001124692	GAATCAAACGTGCTATGAAGGA <sup>a</sup> CCCTCGAATCTGAAGAGTGTAG <sup>b</sup>	56	0,35	(Aegerter et al., 2004)

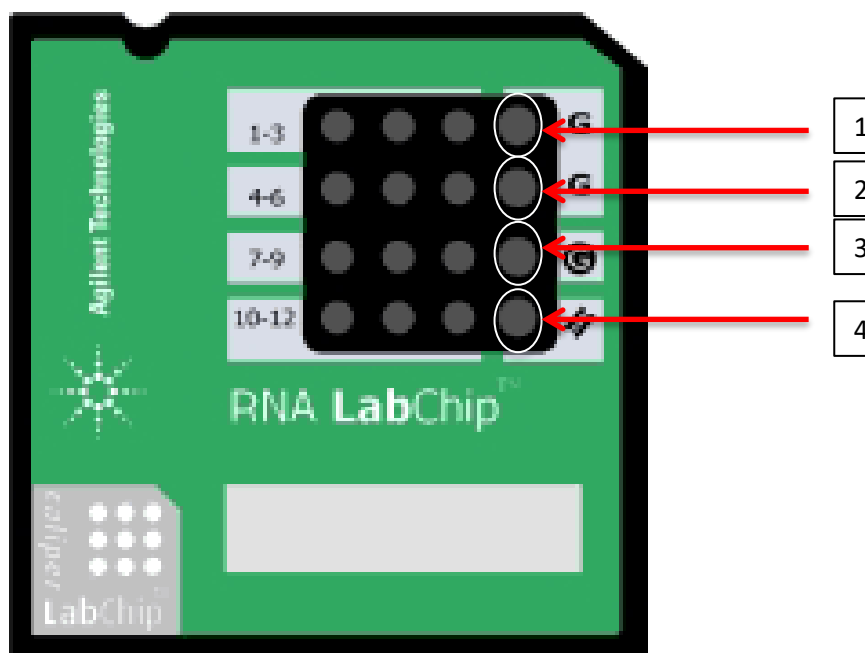
#### 2.2.6.1. Extraction de l'ARN total

Les truites entières ont été disposées dans un tube de 2 mL dans lequel 750 µL de TRIzol® ont été ajoutés. Deux billes de métal ont été disposées dans le tube avant de broyer les truites pour homogénéiser la solution résultante avec un broyeur (Retsch MM400) programmé à la fréquence 30 Hz pendant 30 sec. Une première centrifugation a été réalisée (Eppendorf Centrifuge 5424R, 12000 xg, 15 min, 4 °C). Les tissus et les graisses étaient présents dans le culot. Le surnageant a été récupéré et disposé dans un nouveau tube de 2 mL. Une incubation de 5 min à température ambiante a ensuite été réalisée avant d'ajouter 150 µL de chloroforme au surnageant. Les tubes ont été agités pendant 15 sec avant de les laisser incuber pendant 3 minutes. Une nouvelle centrifugation a été réalisée (12000 xg, 15 min, 4 °C). Après la centrifugation, deux phases ont été observées, une première rose, présente en bas du tube, et une seconde plus translucide en haut. La phase supérieure contenait l'ARN total ainsi qu'une partie de l'ADN résiduel. C'est donc cette phase qui a été récupérée et mise

dans un nouveau tube de 2 mL. L'isopropanol a ensuite été ajouté (375 µL) avant de réaliser une incubation de 10 min à température ambiante, avant de centrifuger les échantillons (12000 xg, 10 min, 4 °C). Le surnageant a été retiré et 750 µL d'éthanol à 80% ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 7500 xg pendant 5 min à 4 °C, avant que le culot ne soit retiré et rincé à l'éthanol à 80% une nouvelle fois. Après la dernière centrifugation, le surnageant a été retiré et le culot a été laissé à sécher pendant environ 5 min. De l'eau sans ARN et ADN (30 µL) a été ajoutée pour dissoudre le culot. La solution résultante a ensuite été analysée au NanoDrop (1 µL, Thermo Scientific, NanoDrop 2000) pour mesurer la concentration en ARN et sa qualité. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80 °C.

#### 2.2.6.2. Intégrité de l'ARN

L'intégrité de l'ARN a été mesurée et vérifiée pour tous les échantillons après l'extraction de l'ARN. Un exemple de puce utilisée pour tester 12 échantillons est présenté dans la **Figure 12**.



**Figure 12:** Exemple de Nano Chip utilisée pour vérifier l'intégrité de l'ARN (d'après Agilent Technologies)

Après avoir laissé tous les réactifs s'équilibrer à température ambiante pendant 30 min, 550 µL de la matrice de gel (Agilent RNA 6000 kit) ont été disposés dans un tube adapté fourni dans le kit avant de réaliser une centrifugation à 1500 xg. Plusieurs échantillons (65 µL) de ce gel ont ensuite été prélevés et distribués dans différents tubes qui pouvaient ensuite être stockés à 4 °C. Un

de ces tubes a été conservé à température ambiante pour utilisation. Après avoir vortexé le colorant (Agilent RNA 6000 kit) pendant 10 secondes, 1  $\mu\text{L}$  a été ajouté au gel avant de le vortexer et de le centrifuger pendant 10 min à 13 000  $\text{xg}$  à température ambiante. Pendant la centrifugation, les échantillons d'ARN ont été sortis du congélateur et dilués dans de l'eau sans ARN ni ADN pour obtenir une concentration variant entre 5 et 500  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Après centrifugation du gel, 9  $\mu\text{L}$  ont été prélevés et ajoutés dans le puits **(3)** (**Figure 12**). La seringue fournie dans le pack a été vissée à la station de la puce, puis le piston a été poussé jusqu'à être tenu par le clip intégré à la seringue. Après avoir attendu 30 sec, le clip a été relâché. Après avoir vérifié que le piston de la seringue dépassait la marque des 0,3 mL sur la seringue, le piston a été remonté manuellement jusqu'à 1 mL. Après avoir rouvert la station tenant la puce, 9  $\mu\text{L}$  du gel ont été ajoutés aux puits **(1)** et **(2)** (**Figure 12**). Le marqueur (4  $\mu\text{L}$ , Agilent RNA 6000 Nano Kit) a ensuite été ajouté dans tous les puits sauf les puits **(1)**, **(2)** et **(3)**. Les échantillons dilués ont ensuite été chauffés à 70 °C pendant 2 min avant de les centrifuger. Chaque échantillon d'ARN dilué a été disposé dans un des puits (1  $\mu\text{L}$ , un échantillon par puits, sauf puits **(1)**, **(2)**, **(3)**, **(4)**). La puce a ensuite été fixée sur l'adaptateur du vortex (IKA vortex mixer, Agilent) et a été vortexée pendant 60 sec à 2400 rpm. La puce a ensuite été récupérée et déposée dans le BioAnalyzer (Agilent Technologies) pour mesure de l'intégrité de l'ARN. Les échantillons possédant un numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) supérieur ou égal à 6 ont été conservés pour la suite des analyses.

#### 2.2.6.3. *Rétro-transcription en ADN complémentaire*

Pour la rétro-transcription de l'ARN en ADN complémentaire, les échantillons ont été laissés à décongeler avant de les diluer dans de l'eau sans ARN ou ADN (4  $\mu\text{L}$  d'ARN dans 10  $\mu\text{L}$  d'eau) dans des tubes de 200  $\mu\text{L}$ . Un mélange de DNase (2  $\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  DNase + 1,5  $\mu\text{L}$  tampon DNase, BIO-RAD) a ensuite été ajouté, ce qui a permis d'éliminer l'ADN résiduel. C'est ce qui a permis d'avoir uniquement de l'ADN complémentaire dans les PCR. Les échantillons ont été centrifugés pendant quelques secondes puis disposés dans l'appareil à PCR (Eppendorf MasterCycle) pour réaliser la digestion de l'ADN résiduel (5 min à 25 °C, 5 min à 75 °C). La quantité d'ADNc a une nouvelle fois été mesurée à l'aide du NanoDrop. Chaque échantillon a ensuite été dilué dans de l'eau afin d'obtenir un total de 1000 ng d'ARN dans 16  $\mu\text{L}$  d'échantillon. L'iScript Reverse Transcription Supermix (4  $\mu\text{L}$ , BIO-RAD) a été ajouté à cet ARN. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant quelques secondes puis disposés dans la PCR pour réaliser la rétro-transcription (5 min à 25 °C, 20 min à 46 °C, 1 min à 95 °C). L'ADN complémentaire a été conservé à - 20 °C.

#### 2.2.6.4. Mesure de l'expression génique

Pour la qPCR, les échantillons ont été dilués à 1/40 dans de l'eau sans trace d'ARN ni d'ADN. Une solution d'étalonnage a été réalisée à partir de 4 µL de chaque échantillon non dilué. Avec ce pool, une gamme d'étalonnage a été réalisée en cascade (1/4 ; 1/16 ; 1/64 ; 1/256 ; 1/1024 ; 1/4096 et 0). La qPCR a été réalisée dans des tubes blancs de 200 µL et la qPCR (BIO-RAD CFX96 Real-Time System) peut contenir jusqu'à 96 tubes.

La première étape de la qPCR était de réaliser un mélange de qPCR. Ce dernier contenait du SYBR® Green Master Mix (BIO-RAD, 1000 µL) ainsi que de l'eau et les amorces directes et inverses correspondant au gène étudié. Ce mix (16 µL) a été ajouté dans chaque tube, puis 4 µL de la gamme d'étalonnage ou de l'échantillon ont été ajoutés au mélange. Avant d'ajouter l'échantillon, ce dernier a été vortexé et centrifugé. Les tubes ont été centrifugés avant d'être disposés dans la qPCR. Le protocole est présenté dans le **Tableau 6**. Les résultats ont ensuite été traités avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1. Les quantités initiales d'ARN ont été calculées automatiquement par le logiciel depuis la gamme d'étalonnage. L'expression relative des gènes a ensuite été calculée et les gènes d'intérêt ont été normalisés par la moyenne des expressions relatives des gènes de référence. Les amorces possédaient toutes une efficacité de  $100 \pm 10\%$  et la courbe standard possédait un  $R^2 > 0,980$ .

**Tableau 6:** Protocole de qPCR. Les étapes marquées d'une \* correspondent au cycle d'hybridation indiqué au tableau 5, elles sont répétées 40 fois

Température (°C)	Temps (min)	Gradient de température
95	3	
95*	0:15	
Température d'hybridation*	1	
95	0:10	
65	0:05	
95		0,5 °C/cycle

### 2.3. Analyses chimiques

Les WAF des quatre pétroles utilisés dans l'étude (Arabian Light, Lloydminster, Bluesky et Clearwater) ont été réalisés à l'INRS-ETE dans les mêmes conditions que lors des expositions en France. Un échantillon de 800 mL a été disposé dans une bouteille en verre ambré pour les analyses des HAP et des HAP alkylés et 3 bouteilles de 40 mL ont été remplies afin de réaliser les analyses des COV, de la fraction C6-C10 (composés possédant 6 à 10 atomes de carbone) et de la fraction C10-C50 (composés possédant entre 10 et 50 atomes de carbone).

Les échantillons ont ensuite été amenés au Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) où les analyses chimiques ont été réalisées par GC-MS. Ces analyses permettent ont ainsi permis d'obtenir une caractérisation des solutions de contamination, avec les concentrations d'hydrocarbures légers, hydrocarbures lourds, mais également des composés organiques volatils.

### 2.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel RStudio. La moyenne et les écarts-types ont été calculés sur chaque répétition. La condition témoin a été traitée avec  $n = 4$  répétitions et les autres conditions avec  $n = 3$  répétitions. La normalité des résidus a été vérifiée par le biais du test de Shapiro-Wilks ( $p > 0,01$ ) et l'homogénéité de la variance a été vérifiée par le biais du test de Levene ( $p > 0,01$ ).

Etant donné que deux facteurs indépendants sont étudiés dans ce projet, le test statistique ANOVA à deux facteurs ( $p > 0,05$ ) a été utilisé, avec pour facteur le type de pétrole utilisé (indiqué par le facteur « pétrole ») et la concentration de pétrole dans les solutions (indiqué par le facteur « dose »). Quand cela était nécessaire, le test post-hoc de Tukey HSD ( $p > 0,05$ ) a été utilisé afin d'obtenir des informations sur quelles conditions étaient différentes entre elles. Pour comparer deux moyennes entre elles, c'est le test « t » de Student ( $p > 0,05$ ) qui a été utilisé. Les deux expositions (pétroles conventionnels et bitumes dilués) ont été traitées séparément étant donné que les témoins associés à chacune des expositions n'étaient pas statistiquement équivalents (test « t » de Student,  $p < 0,05$ ).

## 3. Résultats et discussion

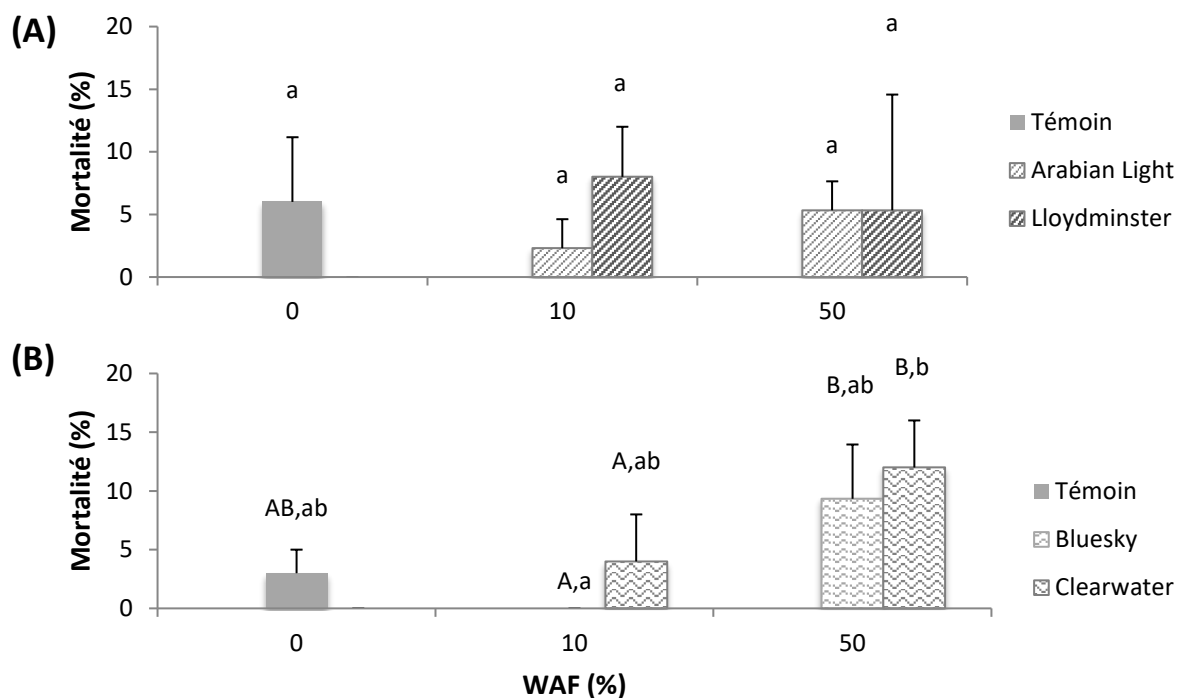
---

### 3.1. Analyses chimiques

Les résultats des analyses chimiques des pétroles sont présentés dans les **Annexes II à V**. La composition chimique du WAF Bluesky n'étant pas complète à ce jour (du à des difficultés techniques), les analyses chimiques ont uniquement été mises en annexe. Donc, l'analyse des données de ce mémoire est basée sur les compositions théoriques extraites de la littérature, présentées dans la partie 1.1.2.

### 3.2. Toxicité aigue

Chaque jour, au moment du renouvellement de l'eau, les individus morts étaient comptabilisés et retirés. A la fin de l'expérience, la mortalité cumulée a été calculée et la toxicité a ainsi pu être mesurée par le biais de statistiques réalisées sur les résultats cumulés. La mortalité observée à la fin des deux expositions est présentée dans la **Figure 13**. L'exposition aux pétroles conventionnels n'a pas eu d'influence significative sur la mortalité ( $p > 0,05$ ), alors que l'exposition aux deux dilbits a entraîné une augmentation de la mortalité entre 10 et 50% de WAF (effet de la dose,  $p < 0,01$ ). Cependant, aucune condition n'est statistiquement différente du témoin ( $p > 0,05$ ). Ces analyses ont également mis en évidence une mortalité significativement plus forte à 50% du WAF Clearwater qu'à 10% du WAF Bluesky ( $p = 0,02$ ).



**Figure 13** : Mortalité cumulée (moyenne + écart type) observée après exposition des larves de truite arc-en-ciel pendant 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

Cette étude nous montre donc une absence d'effet significatif des deux types de pétroles sur de la mortalité par rapport au témoin. Plusieurs études ont montré une augmentation de la mortalité avec la concentration du pétrole, et ce sur plusieurs espèces de poissons comme le poisson zèbre, la truite et le saumon (Alderman et al., 2018; Philibert et al., 2016; Robidoux et al., 2018). Ceci peut faire un lien avec l'effet de la dose observé dans le cas des bitumes dilués entre 10 et 50%. Malgré tout, les concentrations d'exposition utilisées dans nos études sont plus faibles que celles utilisées dans les études citées plus haut (ratio pétrole:eau = 1:10 ou concentrations = 10 g/L). Cela peut justifier l'absence d'induction de la mortalité par rapport au témoin.



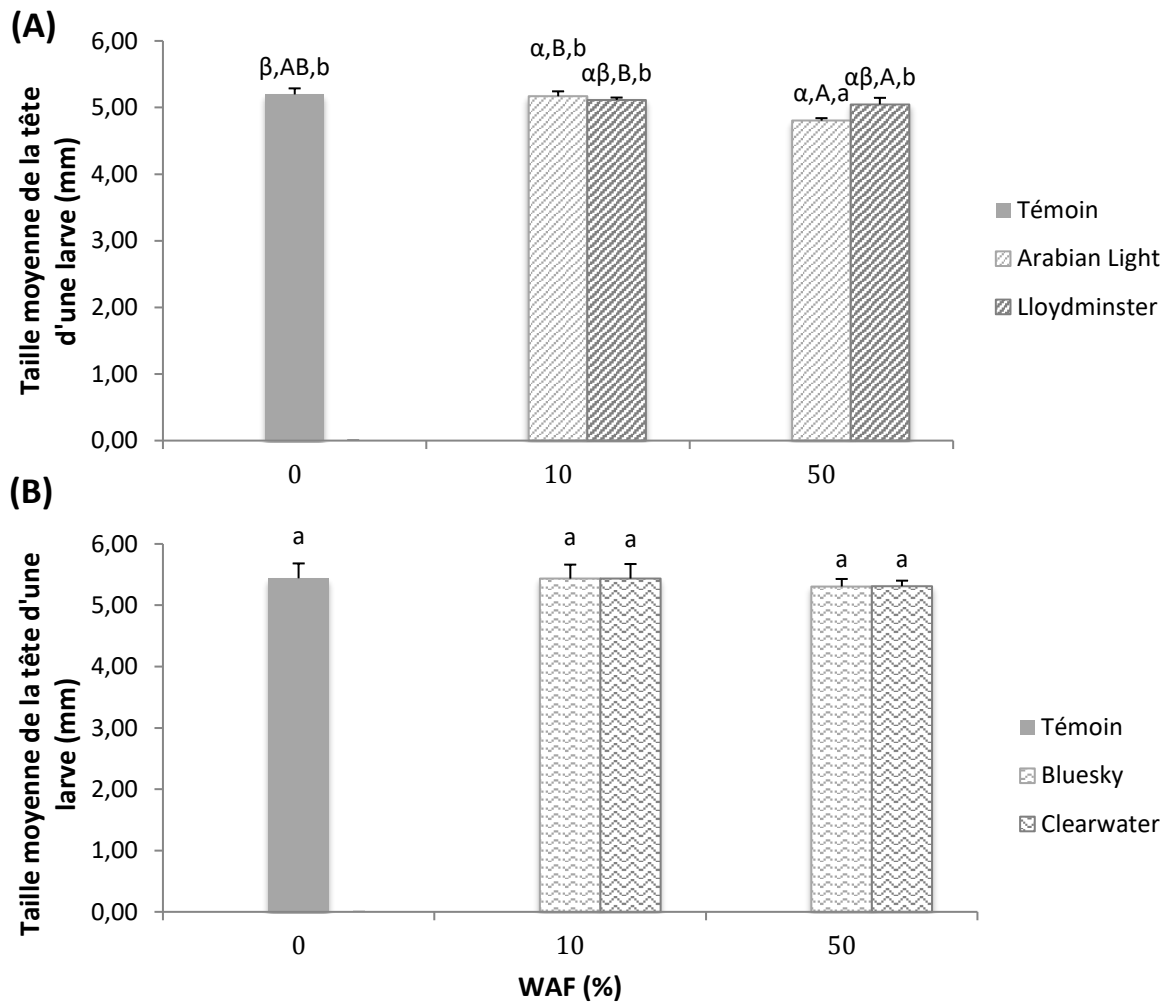
### 3.3. Effets sur le développement

#### 3.3.1. Biométrie

Les larves ont été mesurées juste après les expositions aux pétroles conventionnels et bitumes dilués. Les paramètres analysés étaient la taille de la tête et du corps de la larve, ainsi que le diamètre de son œil. Pour compléter ces analyses, le rapport entre la taille de la tête et la taille du corps des larves a également été calculé. Les tailles de la tête obtenues chez les larves de truite arc-en-ciel sont présentées dans la **Figure 14**. Les pétroles conventionnels et les dilbits présentent une toxicité différente dans le cas de la biométrie. En effet, les bitumes dilués n'ont pas affecté la biométrie des larves de truite arc-en-ciel, alors que les pétroles conventionnels ont induit une diminution de la biométrie au niveau de plusieurs paramètres. Les têtes des larves exposées aux fractions aqueuses du pétrole Arabian Light sont significativement plus petites que les larves témoin (effet du pétrole, **p < 0,01**). Egalement, un effet de la dose est observable avec des têtes plus petites à 50% de WAF par rapport à 10% de WAF (**p < 0,01**). Pour finir, un effet combiné du pétrole et de la dose est observable dans le cas des larves exposées à l'Arabian Light à 50% de WAF, qui ont une tête significativement plus petites que les larves témoins et les larves exposées à tous les autres pétroles (**p < 0,05**).

Les mêmes effets ont été observés dans le cas du rapport entre la tête et le corps des larves, avec un effet du pétrole Arabian Light par rapport au témoin (**p < 0,01**) et un effet de la dose entre 10 et 50% (**p = 0,01**). Cependant, les effets combinés montrent une diminution du rapport après exposition à l'Arabian Light à 50% par rapport aux larves des conditions témoin et Arabian Light à 10% de WAF (**p < 0,05**). Seul un effet de la dose a été observé au niveau de la taille du corps, avec des corps plus petits à 50% de WAF qu'à 10% (**p = 0,01**).

Aucun des deux types de pétroles (conventionnel ou bitume) n'a entraîné de modifications du diamètre de l'œil.



**Figure 14:** Taille de la tête d'une larve (mm, moyenne + écart type) mesurée après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A, B : effet de la dose; a, b : effet combiné pétrole/dose).

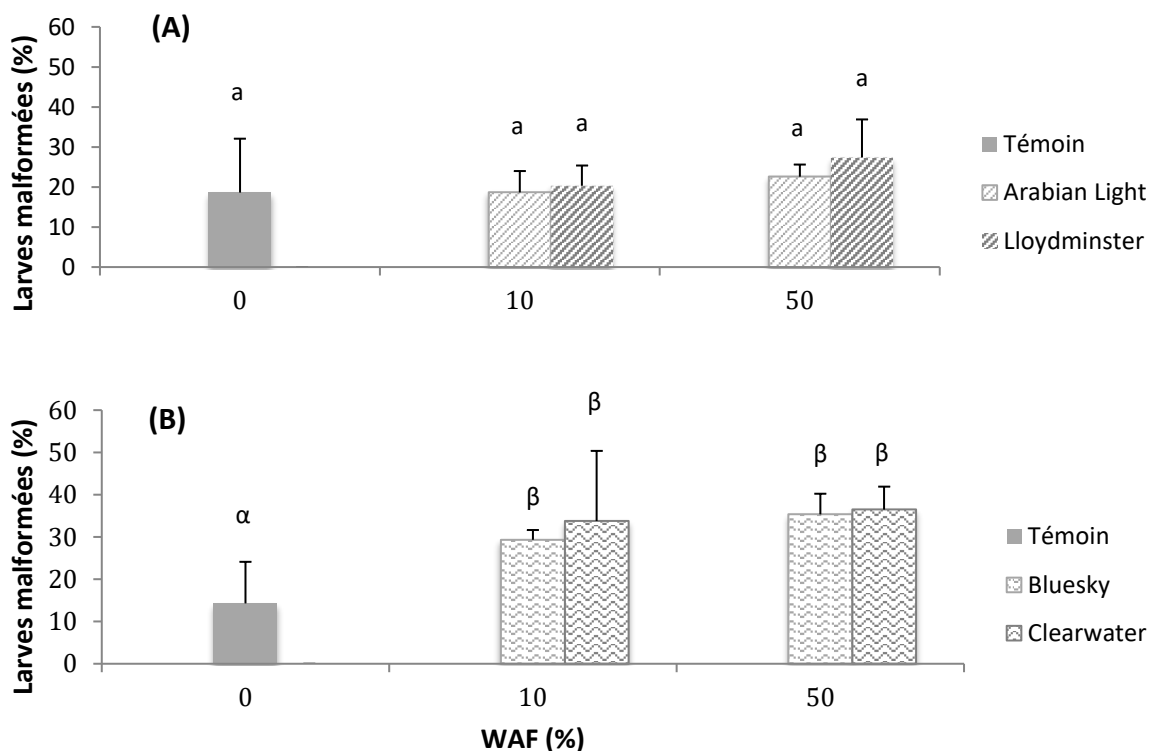
Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs études ont mis en évidence le fait que certains pétroles conventionnels tels que l'Arabian Light entraînaient une diminution de la taille des larves et de leur tête (Le Bihanic et al., 2014a, 2014b). Pour ce qui est des bitumes dilués, seule une étude mentionne les effets sur la biométrie des larves (Alderman et al., 2018). Cette étude a été réalisée sur le saumon, où la taille totale des larves avait diminué. Cependant, les concentrations utilisées dans cette étude sont bien plus hautes que celles utilisées dans notre étude (jusqu'à 100  $\mu\text{g/L}$  d'HAP totaux).

Les différences observées entre les pétroles conventionnels et les dilbits peuvent être liées à leurs différences de composition chimique. Comme vu précédemment, les compositions (issues de la

littérature) des pétroles conventionnels et des dilbit sont très différentes (Brooks et al., 1988; Wang et al., 2003). Par exemple, les compositions des pétroles montrent des proportions plus fortes d'hydrocarbures saturés chez les pétroles conventionnels que chez les bitumes dilués. De plus, il semblerait que le pétrole Arabian Light soit le pétrole avec la plus grande proportion d'hydrocarbures saturés. Il est donc possible que les hydrocarbures saturés soient les composés entraînant une variation dans la biométrie.

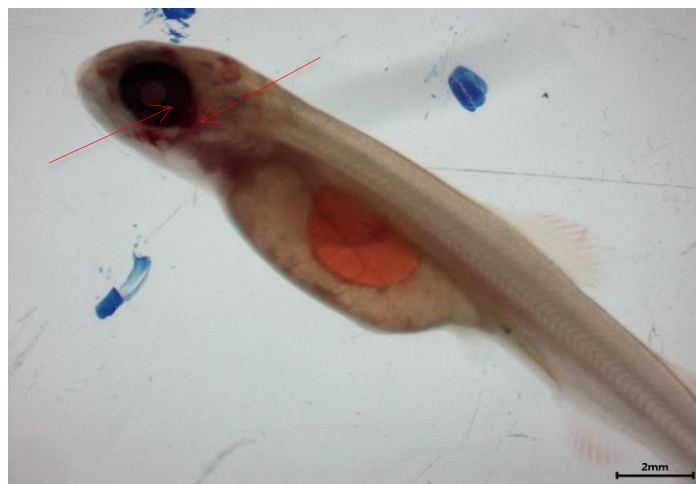
### 3.3.2. Malformations

Les larves malformées ont été comptabilisées à l'œil nu à la fin des expositions. La proportion de malformations générales est présentée dans la **Figure 15**. Seuls les bitumes dilués ont affecté la fréquence d'apparition de malformations, avec un effet des pétroles mis en avant par les analyses statistiques (Bluesky-Témoin  $p = 0,03$ , Clearwater-Témoin  $p = 0,01$ ). Cependant, aucun effet de la dose et aucun effet combiné n'ont été observés.

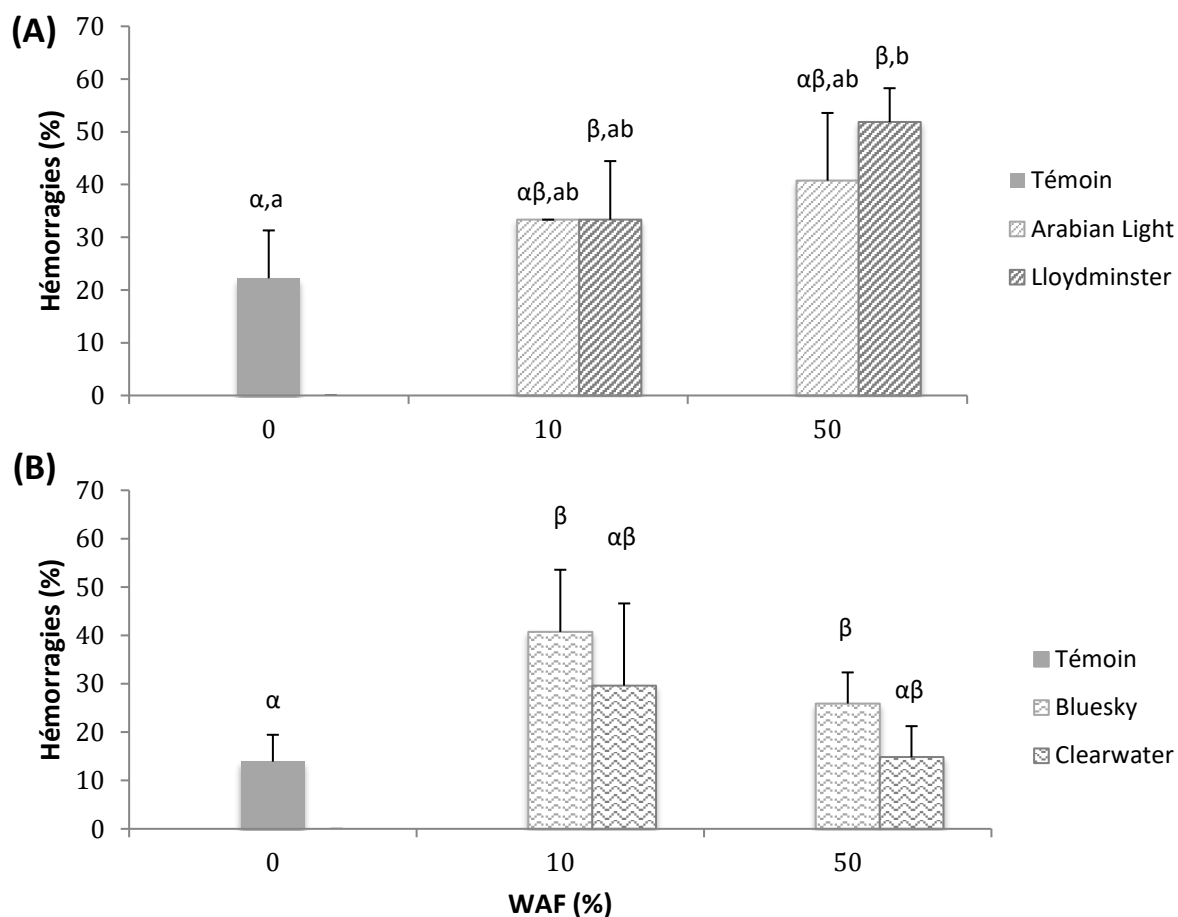


**Figure 15:** Proportion de larves malformées (% , moyenne + écart type) après une exposition de 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et de 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A, B : effet de la dose; a, b : effet combiné pétrole/dose).

Deux types de malformations ont ensuite été observés au microscope sur 9x3 individus par condition. En premier lieu, les hémorragies ont été comptabilisées. Un exemple d'hémorragies est présenté dans la **Figure 16**, et les fréquences d'apparition sont présentées dans la **Figure 17**. La proportion d'hémorragies a été affectée par les deux types de pétroles. Le pétrole conventionnel Lloydminster augmente la formation d'hémorragies (Lloydminster-Témoin  $p = 0,01$ ) et un effet dose est observé chez les larves exposées à 50% de WAF Lloydminster par rapport aux larves témoin ( $p = 0,02$ ). Pour les bitumes dilués, c'est uniquement un effet du pétrole qui est observé, avec le pétrole Bluesky qui induit la formation d'hémorragies (Bluesky-Témoin  $p = 0,03$ ). Les hémorragies oculaires, quant à elles, ont uniquement été affectées par les pétroles conventionnels, avec un effet des deux pétroles Arabian Light et Lloydminster par rapport au témoin ( $p < 0,01$ ) et un effet dose qui montre que plus d'hémorragies sont retrouvées chez les larves contaminées (toutes les conditions) que chez les larves témoins ( $p < 0,05$ ).



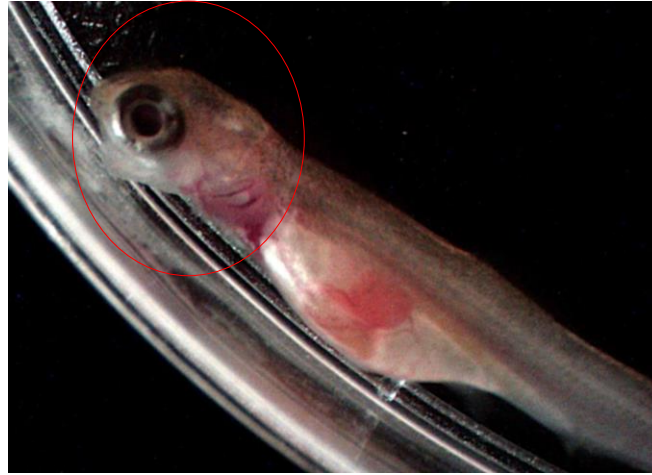
**Figure 16:** Hémorragie oculaire et cranio-faciale observée chez une larve de truite arc-en-ciel exposée pendant 16 jours à 10% de WAF Clearwater



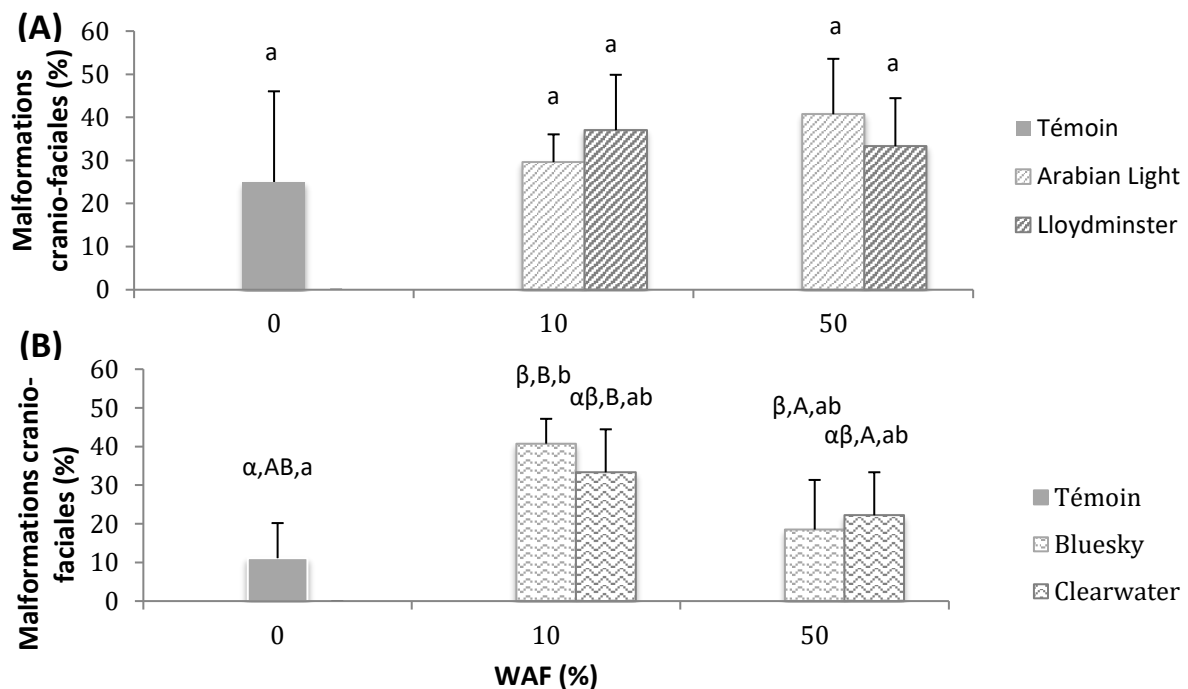
**Figure 17:** Proportion d'hémorragies (% , moyenne + écart type) observées après exposition des larves de truite arc-en-ciel pendant 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole;  $A, B$  : effet de la dose;  $a, b$  : effet combiné pétrole/dose).

La deuxième famille d'anomalies observées est celle des malformations squelettiques et cranio-faciales. La fréquence des malformations squelettiques n'a été affectée que par les bitumes dilués, avec une augmentation de la proportion d'anomalies squelettiques après exposition aux deux pétroles par rapport au témoin (Bluesky-Témoin  $p < 0,01$ , Clearwater-Témoin  $p = 0,01$ ). Les bitumes dilués sont les seuls à avoir affecté l'apparition de malformations cranio-faciales, pour lesquelles plus d'effets statistiques ont été observés par rapports aux autres types d'anomalies. Un exemple de malformation cranio-faciale est présenté dans la **Figure 18** et les fréquences d'apparition sont présentées dans la **Figure 19**. Le pétrole Bluesky a induit la formation d'anomalies cranio-faciales par rapport au témoin ( $p = 0,04$ ), et un effet de la dose est observé avec plus de malformations à 10% qu'à 50% ( $p = 0,04$ ). Pour finir, l'effet combiné entre le pétrole et la dose met en évidence une plus forte

présence des malformations crano-faciales chez les individus ayant été exposés à 10% du WAF Bluesky par rapport aux individus témoins ( $p = 0,04$ ).



**Figure 18:** Exemple de malformation crano-faciale chez une larve de truite arc-en-ciel exposée à 50% de WAF Arabian Light



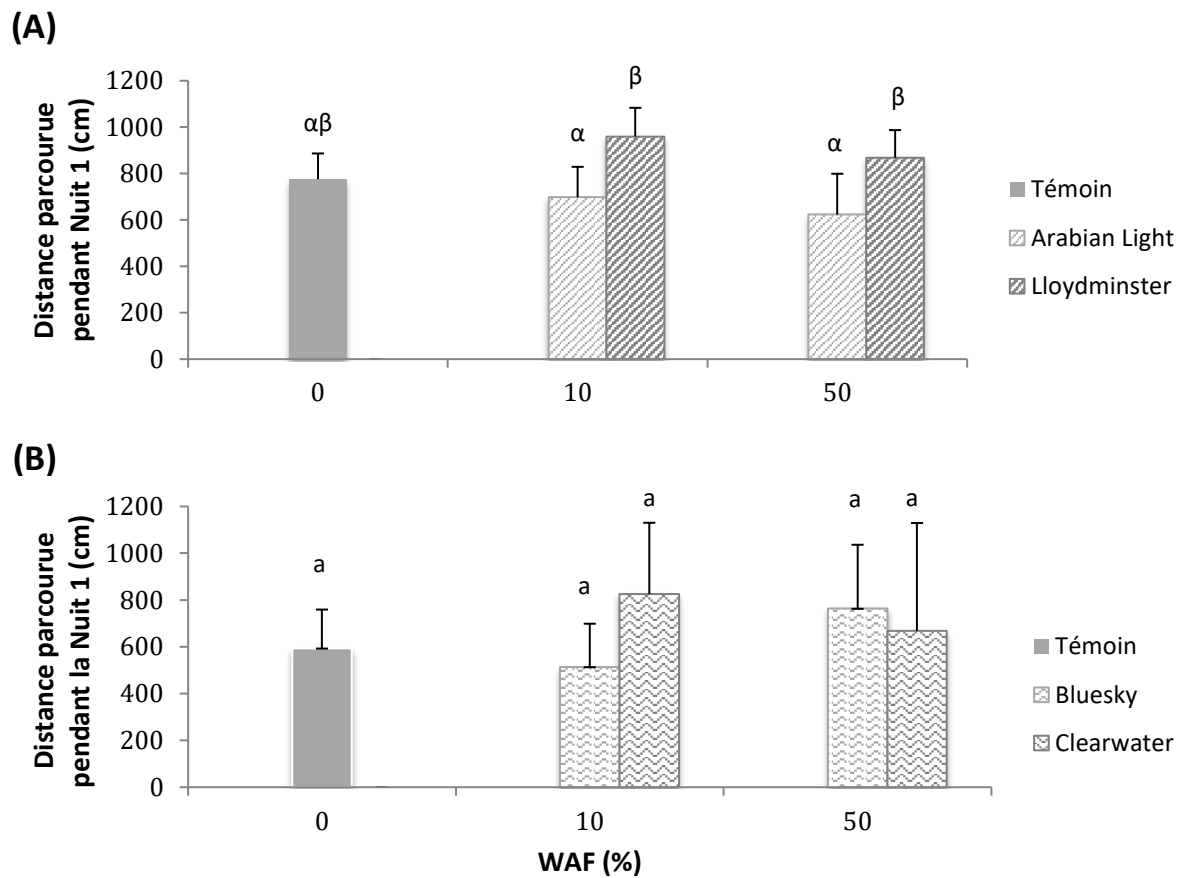
**Figure 19:** Proportion de malformations crano-faciales des larves de truites arc-en-ciel (% , moyenne + écart type) observés après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

Les résultats obtenus sont majoritairement en accord avec la bibliographie dans le cas des dilbits (Alderman et al., 2018; McDonnell et al., 2019). En effet, deux études réalisées sur des embryons et larves de perchaude et de saumon ont mis en avant une augmentation des malformations après exposition à des fractions aqueuses des dilbits. Une différence notable entre la littérature et notre étude est l'absence d'œdèmes dans notre cas. En effet, la littérature mettait en avant une augmentation des œdèmes en plus des inductions d'hémorragies et de malformations squelettiques, ce qui n'est pas le cas dans notre étude (**p > 0,05**). Les résultats obtenus dans le cas des pétroles conventionnels ne sont pas en accord avec la littérature (Adams et al., 2014; Le Bihanic et al., 2014a). En effet, plusieurs études ont mis en avant une augmentation des malformations et des œdèmes, ce qui n'est pas le cas ici, étant donné que les pétroles conventionnels n'ont entraîné une augmentation dans le cas des hémorragies seulement. Cependant, ces différences peuvent être expliquées par différents facteurs, comme par exemple le stade et la durée de l'exposition. Dans la littérature, les expositions démarraient au stade embryonnaire, alors que dans notre cas, elles ont commencé au moment du pic d'éclosion. L'exposition était donc moins longue et l'organogénèse était déjà terminée au début de l'exposition, ce qui pourrait expliquer que le développement soit moins affecté. Pour les différences observées entre les deux types de pétroles, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. En effet, les compositions théoriques des pétroles montrent une plus forte présence de composés légers chez les bitumes dilués que les pétroles conventionnels. On peut donc supposer que les composés plus légers et les HAP alkylés, connus pour leurs propriétés tératogènes, sont ceux qui ont entraîné la formation de malformations chez les larves de truite arc-en-ciel (Incardona et al., 2013).

### 3.4. Effets sur le comportement natatoire

Dans cette étude, le comportement natatoire a été étudié par le biais de paramètres tels que la vitesse de déplacement, la distance parcourue et la mobilité de la larve. Les résultats obtenus montrent que les bitumes dilués n'ont pas affecté l'activité de nage des larves (**p > 0,05**), alors que c'est le cas pour les pétroles conventionnels. Aucun des deux types de pétroles n'a eu d'effet sur la vitesse instantanée de déplacement (cm/s).

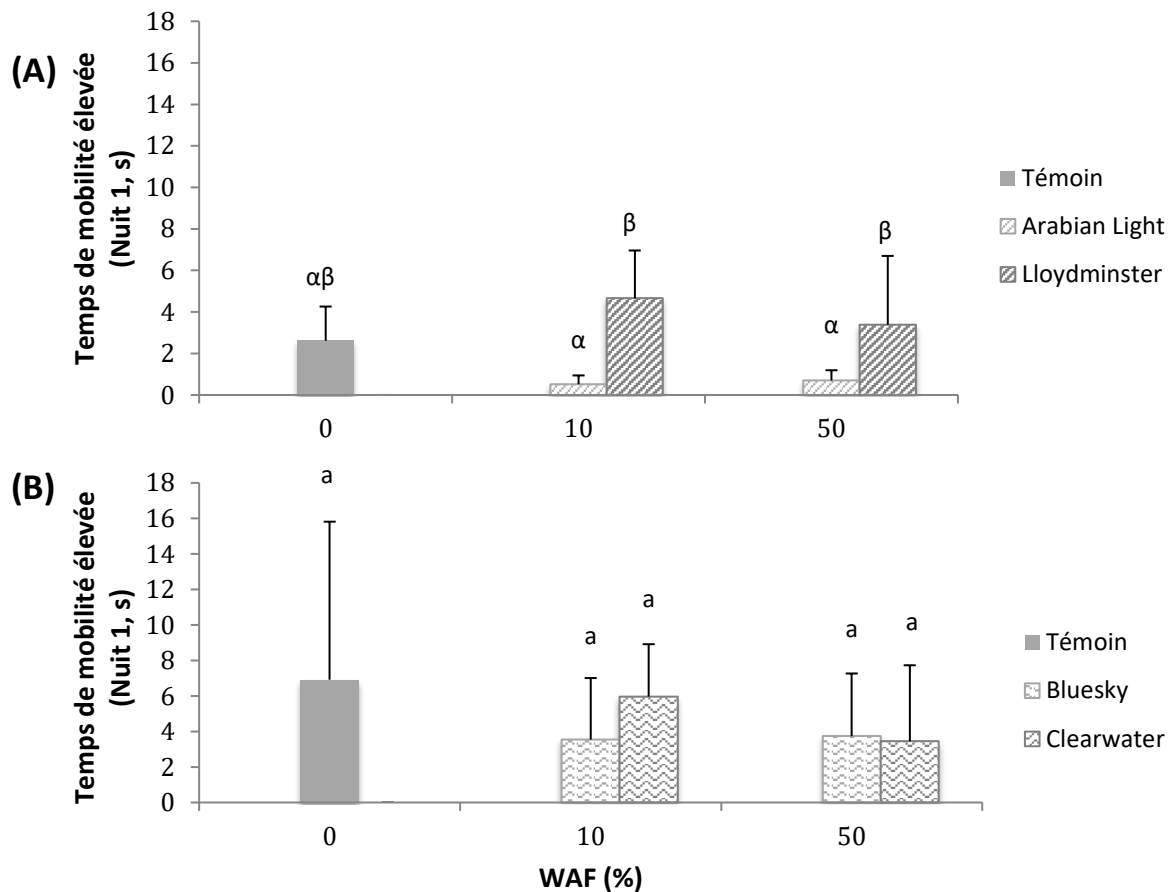
La distance parcourue pendant les deux périodes de nuit (Nuits 1 & 2) a été affectée par les pétroles conventionnels. En effet, la distance parcourue plus basse après exposition à l'Arabian Light par rapport au Lloydminster (**p = 0,04**). La distance parcourue pendant la Nuit 1 est présentée dans la **Figure 20**.



**Figure 20:** Distance parcourue pendant la Nuit 1 (cm, moyenne + écart type) par les larves de truite arc-en-ciel après exposition pendant 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A, B : effet de la dose; a, b : effet combiné pétrole/dose).

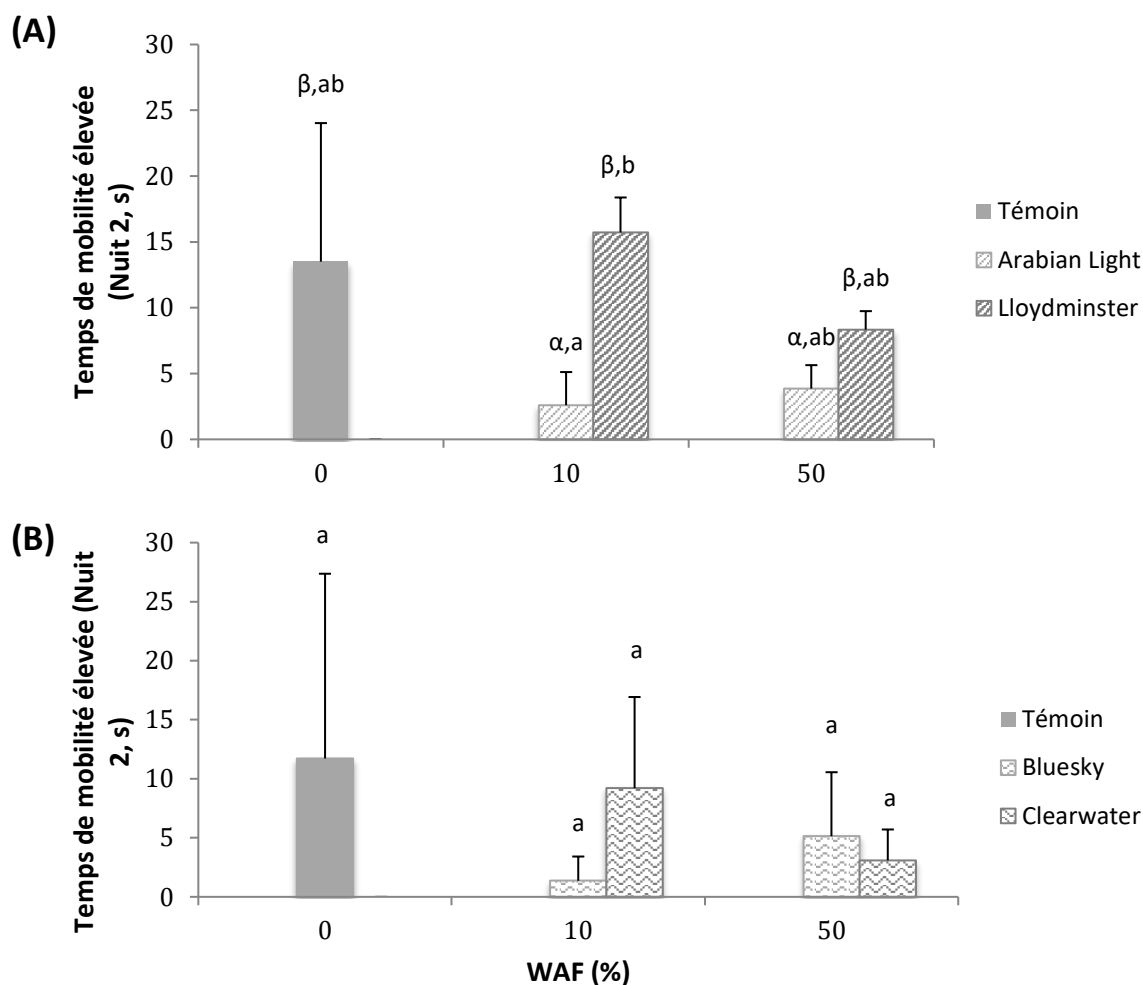
La mobilité des larves a été affectée de plusieurs façons. Par exemple, les larves exposées au pétrole Arabian Light ont une forte mobilité moins élevée que les larves exposées au pétrole Lloydminster. Cette observation a été réalisée sur les périodes Nuit 1 et Jour (Nuit 1  $p = 0,03$  ; Jour  $p = 0,04$ ). Le même effet est observé sur la mobilité moyenne pendant la période Nuit 1 ( $p = 0,03$ ). L'effet observé sur la forte mobilité pendant la Nuit 1 est présenté dans la **Figure 21**.





**Figure 21:** Mobilité des larves de truite arc-en-ciel à l’obscurité (Nuit 1, s, moyenne + écart type) mesuré après exposition pendant 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d’exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

De plus, la mobilité des larves a également été impactée pendant la phase de Nuit 2. L’exposition au pétrole Arabian Light entraîne une moindre mobilité par rapport aux larves témoin ou celles exposées au Lloydminster ( $p = 0,01$ ). Les effets combinés type de pétrole plus concentration montrent également un temps de forte mobilité moins élevé chez les larves exposées à l’Arabian Light 10% que chez les larves exposées à 10% de WAF Lloydminster ( $p = 0,03$ ) (Figure 22). Le temps d’immobilité pendant la période de Nuit 1 est également affecté par les pétroles, avec un temps d’immobilité plus grand chez les larves exposées aux WAF de l’Arabian Light que chez les larves exposées aux WAF du Lloydminster ( $p = 0,02$ ). Les interactions pétrole:dose mettent en avant une immobilité plus longue chez les larves exposées à 10% du WAF Arabian Light par rapport à celles exposées à 10% du WAF Lloydminster ( $p = 0,04$ ).



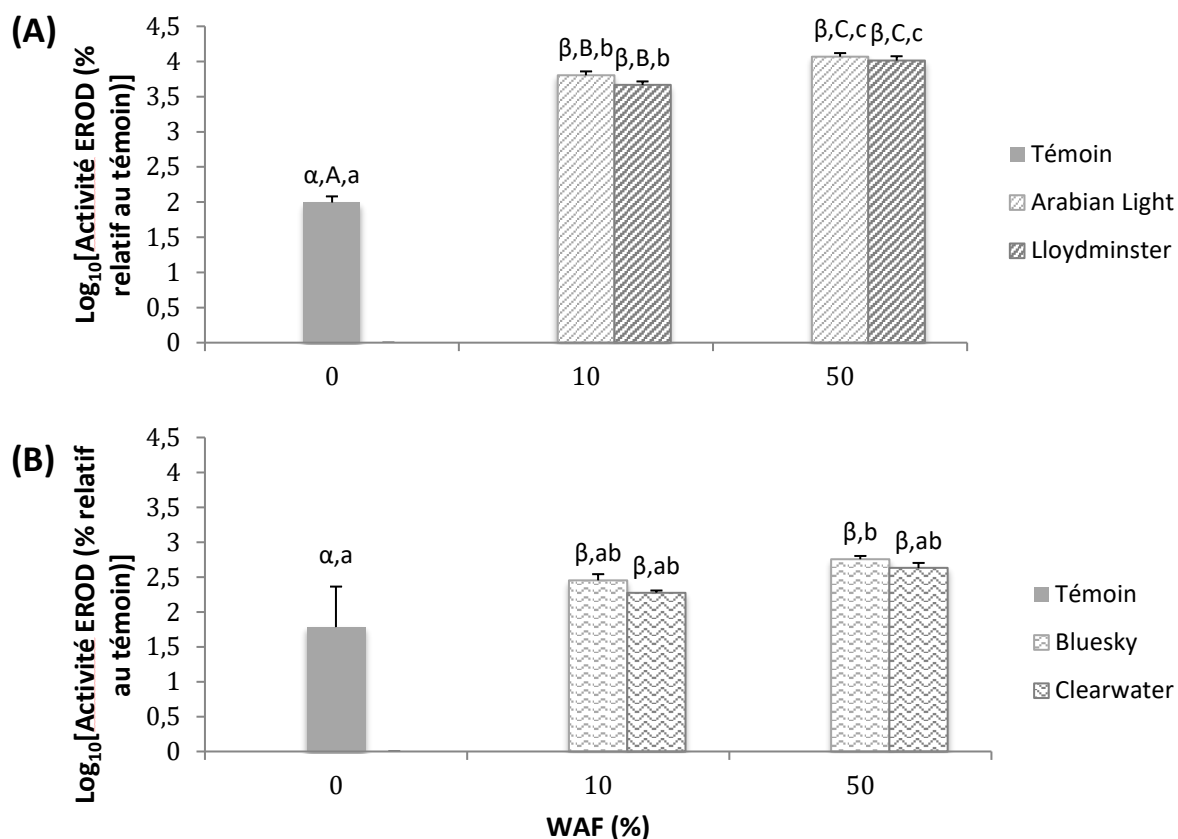
**Figure 22:** Temps de forte mobilité des larves de truite arc-en-ciel (Nuit 2, s, moyenne + écart type) après exposition pendant 17 jours aux pétroles conventionnels (A) et 16 jours aux bitumes dilués (B). Témoins n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A, B : effet de la dose; a, b : effet combiné pétrole/dose).

Les résultats obtenus dans le cas de l'exposition aux pétroles conventionnels sont en accord avec la littérature, même si les effets obtenus dans notre étude sont moins marqués (Le Bihanic et al., 2014b). En effet, une étude réalisée sur le medaka japonais a révélé une diminution de la mobilité des larves exposées à l'Arabian Light. Les résultats obtenus dans le cas des bitumes dilués sont également en accord avec la littérature (Philibert et al., 2016). En effet, dans cette étude, il a été montré que la distance parcourue et la vitesse de mobilité des larves ne sont pas affectées par l'exposition aux fractions aqueuses des bitumes dilués. Cependant, Philibert et collaborateurs avaient malgré tout observé une modification du comportement des larves avec des larves passant moins de temps en périphérie du puits après exposition à des fractions aqueuses de bitumes dilués. Il est cependant important de noter que ces observations ont été faites à des concentrations supérieures à celles

utilisées dans notre étude (ratio pétrole:eau = 1:10). Ici, peu de différences sont observées entre les bitumes dilués et les pétroles conventionnels, étant donné que l'exposition à l'Arabian Light a entraîné une variation de la mobilité dans un seul cas et sur une seule période de temps. Aux vues des similitudes natatoires entre les larves exposées aux deux types de pétrole, il est possible que la toxicité touchant le comportement natatoire soit liée à des composés présents en proportions équivalentes entre les pétroles conventionnels et les dilbits (exemple : fraction aromatique). Parmi les études citées plus haut, certaines avaient fait le lien entre l'apparition de nombreuses malformations chez les larves et les différences de comportement. Il est important de noter qu'ici cela ne peut pas être le cas, étant donné que les larves sélectionnées étaient celles qui présentaient le moins de malformations. Malgré tout, certaines malformations avaient été remarquées, comme présenté dans la partie 3.3.2, mais on peut voir qu'il ne semble pas d'y avoir de lien entre l'apparition des malformations et le comportement. En effet, les malformations sont majoritairement apparues suite à l'exposition des larves aux bitumes dilués, alors que le comportement est seulement modifié lors de l'exposition aux pétroles conventionnels.

### **3.5. Effets sur l'activité EROD**

La mesure EROD *in vivo* a été réalisée à la fin de l'expérience sur 4 individus par répétition. Les résultats obtenus montrent une induction de l'activité EROD par tous les pétroles (**Figure 23**). Les valeurs obtenues pour les témoins des deux expériences sont présentées dans l'**Annexe VI**.



**Figure 23:** Log<sub>10</sub> de l'activité EROD (% relatif de la moyenne) (moyenne + écart type) mesurée chez les larves de truite arc-en-ciel après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoins n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs (p < 0,05, α,β : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

Il est important de noter que dans le cas de l'exposition aux fractions aqueuses des bitumes dilués, certains individus sont morts pendant les 4 h d'incubation avant la deuxième mesure, probablement à cause des conditions drastiques du traitement. La conséquence est que, pour l'exposition aux fractions aqueuses des bitumes dilués, il n'y avait que 2 à 4 individus par répétition. Également, on peut noter que les résultats sont représentés en Log<sub>10</sub> du pourcentage relatif au témoin. L'analyse statistique de ces résultats permet de mettre en évidence une différence d'activité EROD entre traitements, avec une activité EROD qualitativement plus élevée après exposition aux pétroles conventionnels qu'après exposition aux bitumes dilués.

L'exposition des larves aux deux types de pétroles entraîne une augmentation de l'activité EROD, ce qui suggère une pénétration des contaminants dans les cellules et une activation du récepteur AhR. Ces résultats mettent également en avant le fait que les larves ont un système de détoxification des xénobiotiques déjà fonctionnel. Cependant, les effets observés entre les deux types

de pétroles sont différents. Au niveau des pétroles conventionnels, on observe à la fois un effet des deux pétroles par rapport au témoin (Arabian Light et Lloydminster,  $p < 0,01$ ), et un effet de la dose ( $0\% < 10\% < 50\%$ ,  $p < 0,01$ ). Pour finir, on observe un effet combiné de la dose et du pétrole, qui montre que les larves exposées à l'eau de source uniquement (témoin) ont une activité EROD plus faible que les larves exposées à 10% de WAF des pétroles conventionnels, qui elles-mêmes ont une activité EROD plus faible que les larves exposées à 50% de WAF des pétroles conventionnels ( $p < 0,05$ ). Pour les bitumes dilués, on observe également un effet du pétrole pour le Bluesky et le Clearwater par rapport au témoin ( $p < 0,01$ ), mais pas d'effet de la dose ( $p > 0,05$ ). On observe également des effets combinés différents, avec une activité EROD plus forte que celle du témoin dans le cas des larves exposées au Bluesky à 50% de WAF par rapport au témoin uniquement ( $p = 0,03$ ).

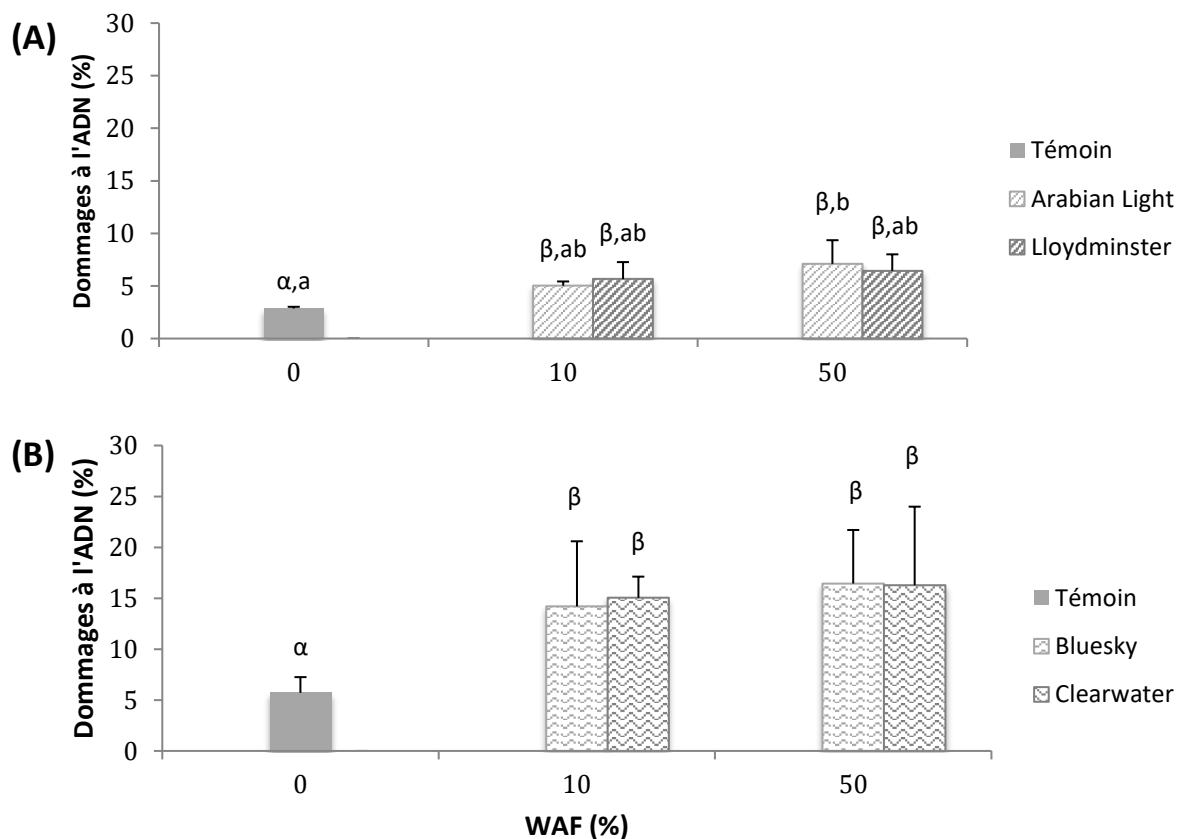
Les résultats obtenus dans le cadre de l'activité EROD sont en accord avec la littérature, à la fois pour les pétroles conventionnels (Brinkmann et al., 2013) et pour les bitumes dilués (Leggieri et al., 2019; McNeill et al., 2012). En effet, plusieurs études ont démontré que l'exposition aux pétroles ou à ses dérivés entraîne une induction de l'activité EROD. En effet, certaines composantes du pétrole comme les HAP ont la capacité de se fixer au récepteur Ah, avec pour conséquence une augmentation de l'expression du gène *cyp1a* et la synthèse de la protéine CYP1A, elle-même responsable de l'activité EROD.

### 3.6. Effets sur l'intégrité de l'ADN

Le test des comètes a permis de quantifier les cassures simple et double brin de l'ADN en mesurant la quantité de fragments d'ADN endommagés présents dans la queue de la comète. Certaines larves avaient également été exposées à un témoin positif, le benzo[a]pyrène, composé connu pour induire la formation de dommages à l'ADN, pendant une heure. Dans notre étude et dans le cas des deux familles de pétroles, plus de dommages à l'ADN étaient observés après exposition au BaP ( $p < 0,05$ ).

Les résultats de dommages à l'ADN obtenus dans cette étude sont présentés dans la **Figure 24**. Dans le cas des deux expérimentations, les dommages à l'ADN au niveau des cellules sanguines des larves témoin n'excèdent pas 10%, ce qui est conforme aux données obtenues précédemment (Le Bihanic et al., 2014a; Santos et al., 2019). Les résultats statistiques mettent en évidence une induction

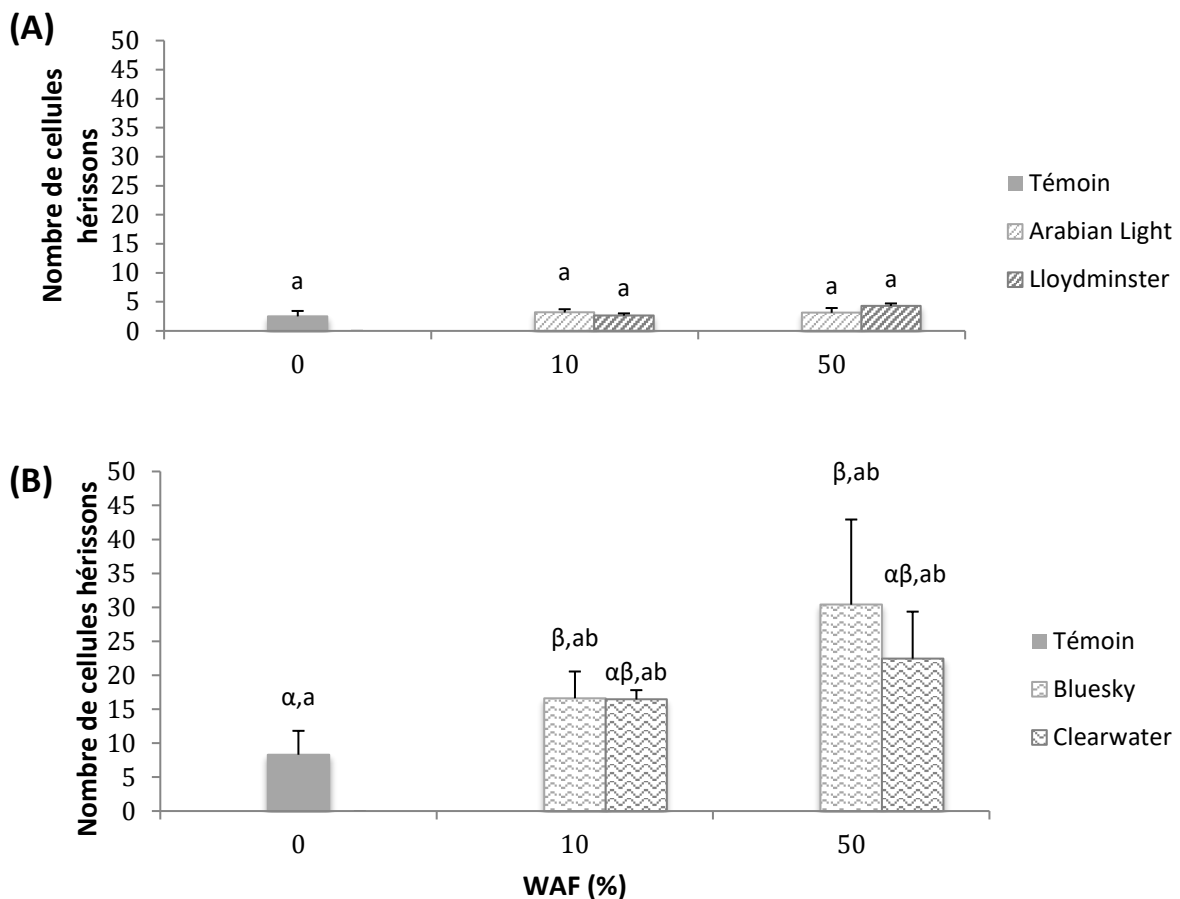
des dommages à l'ADN par les deux types de pétroles. L'exposition aux fractions aqueuses des pétroles conventionnels entraîne un effet du pétrole pour l'Arabian Light et le Lloydminster comparé au témoin (Arabian Light et Lloydminster/Témoin  $p = 0,01$ ). Un effet combiné est également observable avec les larves exposées à 50% de WAF d'Arabian Light qui présentent plus de dommages à l'ADN que les larves témoin ( $p = 0,03$ ). Au niveau des bitumes dilués, on observe uniquement un effet des deux dilbits par rapport au témoin (Bluesky et Clearwater/Témoin  $p = 0,03$ ). Aucun effet de la dose et aucun effet combiné du pétrole et de la dose n'ont été révélés.



**Figure 24:** Proportion de dommages à l'ADN (% , moyenne + écart type) chez les larves de truite arc-en-ciel après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

Un autre paramètre analysé avec le test des comètes est le nombre de cellules « hérissons » (de l'anglais « hedgehog cells »). Ces cellules très endommagées sont soit en phase de nécrose (effet cytotoxique) soit en phase apoptotique (suicide cellulaire programmé). Dans notre étude, les cellules hérissons n'ont été induites que par les bitumes dilués, et on remarque qu'elles sont qualitativement

plus retrouvées qu'après exposition aux pétroles conventionnels. Effectivement, une induction par le pétrole Bluesky par rapport au témoin ( $p = 0,01$ ) est observée, ainsi qu'un effet combiné du pétrole et de la dose, avec les larves exposées à 50% du WAF Bluesky qui présentent plus de cellules hérissons dans leurs cellules sanguines que les larves témoins ( $p = 0,02$ ) (Figure 25).



**Figure 25:** Nombre de cellules hérisson (moyenne + écart type) comptabilisées après exposition des larves de truite arc-en-ciel aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoin  $n = 4$ , conditions d'exposition  $n = 3$ . Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A, B : effet de la dose; a, b : effet combiné pétrole/dose).

Les résultats obtenus en termes de dommages à l'ADN sont conformes aux données de la littérature (Gagné et al., 2011; Le Bihanic et al., 2014a). Par contre, aucun article ne fait mention d'une augmentation des cellules hérissons lors d'exposition de poissons à des fractions aqueuses des pétroles. En revanche, plusieurs articles ont en effet mis en avant l'augmentation des dommages à l'ADN après exposition d'embryons et larves de poisson à des pétroles ou dérivés pétroliers. N'observant pas de différence marquante entre les deux types de pétrole sauf au niveau de l'effet

combiné entre le pétrole et la dose, il est possible que les dommages à l'ADN soient causés par des familles de composés telles que les HAP, qui sont la fraction chimique la plus souvent similaire entre les deux types de pétroles (Dew et al., 2015). Comme expliqué dans plusieurs des publications citées précédemment, les dommages à l'ADN peuvent être des dommages directs (causés par la molécule ayant pénétré dans l'organisme) ou des dommages indirects (causés par les espèces réactives de l'oxygène formée pendant la détoxification de l'organisme). Même si le test des comètes ne permet pas de distinguer les dommages directs et indirects, la présence de dommages indirects peut être supposée. Or, comme ces derniers sont causés par des composés chimiques créés pendant la détoxification, il serait possible d'observer une corrélation entre les dommages à l'ADN (en général) et l'activité EROD présentée dans la partie 3.5. Au niveau des dommages à l'ADN, comme expliqué précédemment, il n'y a pas d'effet de la dose, mais simplement un effet du pétrole. Au niveau de l'activité EROD, il y a à la fois un effet du pétrole et de la dose. La différence de statistiques entre ces deux biomarqueurs indique que même s'il y a des dommages indirects parmi les dommages mesurés, ces derniers ne semblent pas être majoritaires.

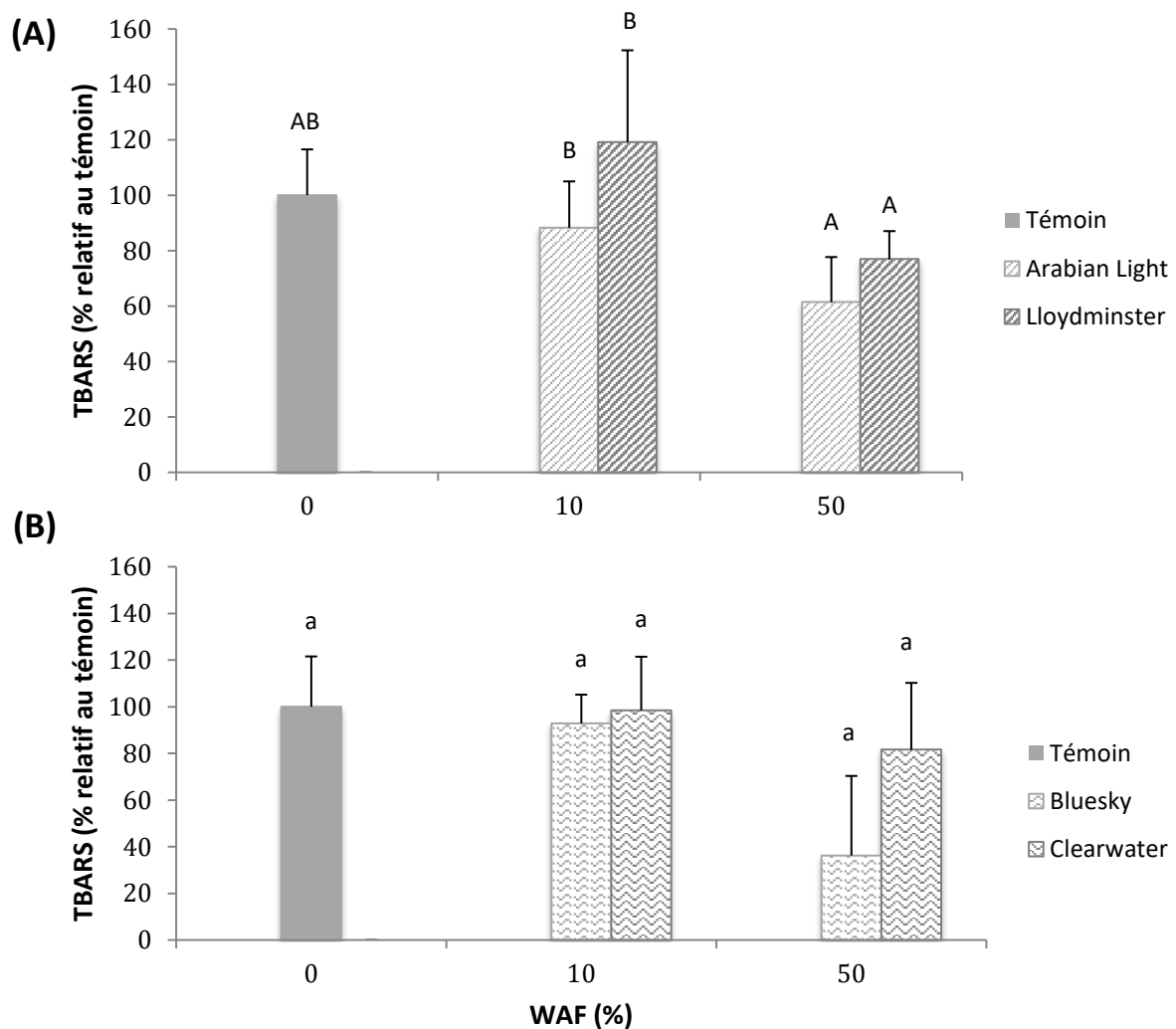
### 3.7. Stress oxydatif

Deux biomarqueurs du stress oxydatif ont été utilisés dans cette étude : le dosage de la peroxydation des lipides par le biais du test des TBARS et le dosage des protéines carbonylées. Le dosage de protéines pour les larves des deux expositions a montré que l'exposition au pétrole n'entraînait pas de différences dans les quantités de protéines (**Annexe VII**). Les valeurs de TBARS obtenues pour les larves témoins pendant les deux expériences sont présentées en **Annexe VIII**. Aucun de ces tests n'a révélé de différences significatives entre pétroles et témoin quelle que soit la nature du pétrole (**p > 0,05**). Cependant, une variation des TBARS avec la dose a été observée lors de l'exposition aux pétroles conventionnels (**p = 0,03, Figure 26**).

L'absence d'induction de peroxydation des lipides et de protéines carbonylées ne permet pas d'écarter la présence de stress oxydatif, étant donné que le test TBARS est basé sur l'analyse du malondialdéhyde (MDA) alors que d'autres produits d'oxydation des lipides peuvent être générés en cas de stress oxydatif. Par ailleurs, d'autres macromolécules biologiques comme l'ADN peuvent également être oxydées (Li et al., 2010; Tkachenko et al., 2015). Cependant, aucune étude n'a révélé d'induction de TBARS ou de protéines carbonylées suite à l'exposition aux fractions aqueuses des pétroles. Étant donné que le stress oxydatif est généralement causé par la formation d'espèces



réactives de l'oxygène, un lien est parfois observable entre l'activité EROD et le stress oxydatif. Cependant, dans ce cas, il n'y en a pas étant donné qu'aucune des conditions n'est différente du témoin, alors que c'est le cas pour l'activité EROD. Les résultats obtenus ici semblent confirmer l'hypothèse faite sur les résultats au niveau des dommages à l'ADN, c'est-à-dire qu'il ne semble pas que la formation d'espèces réactives de l'oxygène ai des effets toxiques notables ou majoritaires sur les larves.



**Figure 26:** Proportion de TBARS (% relatif au témoin, moyenne + écart type) dans les larves de truite arc-en-ciel après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoin n = 4, conditions d'exposition n = 3. Statistiques : ANOVA 2 facteurs ( $p < 0,05$ ,  $\alpha, \beta$  : effet du pétrole; A,B : effet de la dose; a,b : effet combiné pétrole/dose).

### 3.8. Effets sur la transcription de gènes d'intérêt

La variation des deux gènes de référence a été vérifiée. Aucun d'eux ne présentait de variations significatives entre les conditions d'exposition, ce qui a permis de valider leur utilisation comme gènes de référence. Ainsi, les valeurs d'expression relatives des gènes d'intérêt ont été normalisées par la moyenne des expressions relatives des gènes de référence.

Pour les gènes d'intérêt, l'exposition aux deux pétroles conventionnels n'a entraîné que peu de variations (**Tableau 7**). Comme on peut le voir, le seul gène dont l'expression a été modifiée par l'exposition aux fractions aqueuses des pétroles conventionnels est le gène *cyp1a*. Les analyses statistiques réalisées sur ce gène mettent en avant un effet du pétrole Arabian Light par rapport au Lloydminster et au témoin (**p < 0,01**) et un effet de la dose (0-10% **p = 0,02** ; 0-50% **p = 0,03** ; 10-50% **p < 0,01**). Cependant, l'analyse de l'effet combiné pétrole/dose montre que seule l'expression génique des larves exposées à 50% de WAF Arabian Light est significativement supérieure aux expressions de toutes les autres conditions d'exposition (**p < 0,01**). On peut voir ici que les résultats montrent une induction de l'expression génique de *cyp1a*, tout comme une induction de l'activité EROD.

**Tableau 7:** Expression des gènes étudiés (moyenne ± écart type) chez les larves de truite arc-en-ciel témoin (n = 4) et exposées (n = 3) aux fractions aqueuses des pétroles conventionnels Arabian Light et Lloydminster. Les valeurs d'expression des gènes d'intérêt sont normalisées par la moyenne des expressions des gènes de référence (*ef1a* et *rp18*). Statistiques : ANOVA 2 facteurs (a,b,c : effet combiné pétrole/dose)

Gène	Témoin	10% WAF	50% WAF	10% WAF	50% WAF
		Arabian Light	Arabian Light	Lloydminster	Lloydminster
<i>ef1a</i>	1,00 ± 0,55	1,14 ± 0,53	1,06 ± 0,44	0,87 ± 0,56	0,56 ± 0,47
<i>rp18</i>	1,00 ± 0,38	1,07 ± 0,20	1,03 ± 0,36	0,93 ± 0,60	0,61 ± 0,43
<i>ahr2</i>	1,00 ± 0,24	1,06 ± 0,43	1,10 ± 0,30	1,03 ± 0,43	1,47 ± 0,76
<i>arnt</i>	1,00 ± 0,66	0,81 ± 0,35	0,67 ± 0,15	0,92 ± 0,53	1,17 ± 0,53
<i>cyp1a</i>	1,00 ± 0,37 <sup>a</sup>	11,58 ± 4,59 <sup>a</sup>	65,68 ± 35,11 <sup>b</sup>	7,34 ± 4,92 <sup>a</sup>	14,30 ± 11,36 <sup>a</sup>
<i>p53</i>	1,00 ± 0,27	1,00 ± 0,53	1,32 ± 0,45	1,12 ± 0,42	1,23 ± 0,57
<i>nfe2.1</i>	1,00 ± 0,35	1,01 ± 0,21	1,03 ± 0,25	0,93 ± 0,4	0,69 ± 0,35

Les effets observés après exposition aux fractions aqueuses des bitumes dilués sont présentés dans le **Tableau 8**. Les gènes différemment exprimés sont plus nombreux que lors de l'exposition des

larves de truite aux pétroles conventionnels. Les gènes *p53* et *arnt* n'ont pas montré de variation de leur expression entre les conditions (**p > 0,05**). Par contre, le gène *nfe2.1* a montré un effet de la dose (**p = 0,02**), mais les tests de comparaisons multiples (post-hoc) ne donnent pas d'informations sur quelles doses sont statistiquement différentes l'une de l'autre. Les bitumes dilués ont également un impact sur l'expression du gène *ahr2* (Clearwater-Bluesky **p = 0,04**) et son expression après une exposition à 50% du WAF Bluesky est significativement supérieure à celle observée après une exposition à 50% de WAF Clearwater (**p = 0,03**). Cependant, aucune différence significative avec le témoin n'est observée. Le gène ayant montré le plus de variations de son expression est le gène *cyp1a*, tout comme dans le cas des pétroles conventionnels. On peut tout d'abord remarquer que les valeurs atteintes sont qualitativement plus faibles après exposition aux bitumes dilués qu'après exposition aux pétroles conventionnels. Un effet du pétrole est observable pour les deux pétroles Bluesky et Clearwater par rapport au témoin (**p < 0,01**) ainsi qu'un effet de la dose (0-10% ; 10-50%, 0-50% **p < 0,01**). Les effets combinés montrent également des différences entre plusieurs conditions. L'expression de *cyp1a* après exposition à 50% de WAF Bluesky est supérieure à celles de toutes les autres conditions d'exposition (**p < 0,01**). Par ailleurs, l'expression génique de *cyp1a* après exposition à 50% de WAF Clearwater est supérieure à celles des conditions témoin (**p = 0,04**) et 10% de WAF Clearwater (**p = 0,01**). Il semblerait qu'ici aussi, il y ait un lien entre l'activité EROD et l'induction du gène *cyp1a*.

**Tableau 8:** Expression des gènes étudiés (moyenne  $\pm$  écart type) chez les larves de truite arc-en-ciel témoin (n = 4) et exposées (n = 3) aux fractions aqueuses des bitumes dilués Bluesky et Clearwater. Les valeurs d'expression des gènes d'intérêt sont normalisées par la moyenne des expressions des gènes de référence (*ef1a* et *rpl8*). Statistiques : ANOVA 2 facteurs (a,b,c : effet combiné pétrole/dose)

Gène	Témoin	10% WAF	50% WAF	10% WAF	50% WAF
		Bluesky	Bluesky	Clearwater	Clearwater
<i>ef1a</i>	1,00 $\pm$ 0,48	1,38 $\pm$ 0,61	1,24 $\pm$ 0,73	1,05 $\pm$ 0,45	1,33 $\pm$ 0,22
<i>rpl8</i>	1,00 $\pm$ 0,35	1,22 $\pm$ 0,48	1,17 $\pm$ 0,44	1,06 $\pm$ 0,37	1,20 $\pm$ 0,20
<i>ahr2</i>	1,00 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	1,00 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>	1,35 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	0,94 $\pm$ 0,41 <sup>ab</sup>	0,87 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
<i>arnt</i>	1,00 $\pm$ 0,52	0,93 $\pm$ 0,30	1,07 $\pm$ 0,72	0,74 $\pm$ 0,28	0,77 $\pm$ 0,24
<i>cyp1a</i>	1,00 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>	4,37 $\pm$ 0,82 <sup>c</sup>	0,59 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	2,18 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>
<i>p53</i>	1,00 $\pm$ 0,31	0,95 $\pm$ 0,30	1,17 $\pm$ 0,47	0,85 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,33
<i>nfe2.1</i>	1,00 $\pm$ 0,18	0,99 $\pm$ 0,40	1,39 $\pm$ 0,42	1,06 $\pm$ 0,33	1,22 $\pm$ 0,27

Différentes études moléculaires réalisées sur le medaka japonais et la perchaude ont confirmé certains des résultats obtenus dans le cadre de ce projet. Par exemple, trois études ont révélé l'absence de dérégulation des gènes *ahr2* et *arnt* suite à l'exposition à des pétroles et dérivés pétroliers (Madison et al., 2015, 2017; McDonnell et al., 2019). Ces mêmes études ont toutes mis en avant une augmentation significative de l'expression du gène *cyp1a*. Cependant, ces études ont également mis en évidence des résultats différents de ceux observés dans notre étude. Par exemple, elles ont montré une augmentation significative de l'expression génique de *p53* et une absence de variation de l'expression génique de *nfe2.1*. L'absence de variation de l'expression du gène *nfe2.1* est similaire aux résultats obtenus dans notre étude, étant donné que malgré l'effet de la dose, les tests post-hoc ne mettent pas en avant de différences entre les doses. Cependant, notre étude ne montre pas de variations du gène *p53*, alors qu'une induction est observée dans la littérature (Madison et al., 2015; McDonnell et al., 2019). Cette différence de résultats peut être liée au fait que ce gène intervient dans de nombreux processus cellulaires, ce qui entraîne une régulation très fine de son expression.

## 4. Conclusion et perspectives

Le but du projet était d'étudier la toxicité de quatre pétroles et de comparer ces toxicités entre elles. Un bilan des profils et spectres de toxicité obtenus pour chacune des fractions aqueuses des pétroles est présenté dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9:** Spectre de toxicité obtenu dans le cadre de cette étude pour chaque pétrole à chacune de ses concentrations de WAF. Les cases vertes montrent les biomarqueurs non affectés, les cases rouges montrent les biomarqueurs affectés.

Pétrole	Arabian Light (conventionnel)		Lloydminster (conventionnel)		Bluesky (dilbit)		Clearwater (dilbit)	
	10	50	10	50	10	50	10	50
Mortalité	Vert							
Biométrie	Vert		Vert		Vert		Vert	
Malformations	Vert		Vert		Vert		Vert	
Hémorragies	Vert		Vert		Vert		Vert	
Malformations squelettiques	Vert		Vert		Vert		Vert	
Comportement	Vert		Vert		Vert		Vert	
Activité EROD	Vert		Vert		Vert		Vert	
Dommages à l'ADN	Vert		Vert		Vert		Vert	
Stress oxydatif	Vert		Vert		Vert		Vert	
Expression génique <i>cyp1a</i>	Vert		Vert		Vert		Vert	

Plusieurs points intéressants sont ici constatables. En premier lieu, il est visible que les pétroles ont chacun une toxicité unique, étant donné qu'aucun des pétroles n'a exactement la même toxicité qu'un autre. Également, ce tableau nous permet de classer les pétroles du plus au moins toxique dans les conditions de notre étude. Ici, il est visible que le pétrole Bluesky est le pétrole le plus toxique, avec six biomarqueurs affectés sur dix. Ensuite, le Clearwater et l'Arabian Light ont tous les deux une toxicité équivalente avec cinq biomarqueurs affectés sur dix, mais étant donné que le Clearwater a une toxicité

plus précoce, avec la plupart de ses biomarqueurs (sauf l'expression de *cyp1a*) affectés dès 10% de WAF, on peut considérer que le Clearwater est plus toxique que l'Arabian Light. La toxicité de l'Arabian Light est donc classée en troisième position, directement suivie par celle du Lloydminster, qui a affecté quatre biomarqueurs sur dix.

Une des conclusions de cette étude est donc que les dilbits semblent plus toxiques que les pétroles conventionnels dans les conditions de notre étude. Aussi, il semblerait que les deux dilbits (Bluesky et Clearwater) ainsi que le Lloydminster présentent une toxicité dès la dose la plus faible, étant donné que la majorité de leurs biomarqueurs sont affectés dès 10% de WAF, alors que l'Arabian Light affecte la majorité des biomarqueurs (trois sur cinq) à 50% de WAF seulement.

Cette étude met donc en évidence des différences notables entre les toxicités de nos quatre pétroles. Compte tenu de ces observations, il sera intéressant de terminer les analyses chimiques (les premiers résultats sont présentés dans les **Annexes II à V**) afin de vérifier s'il existe en effet un lien entre la toxicité des fractions aqueuses et leurs compositions chimiques. Si un lien est mis en évidence, plusieurs tests statistiques tels que les ACP (analyses en composantes principales) pourraient permettre d'avoir plus d'informations sur quelles fractions chimiques entraînent l'induction de tel ou tel marqueur de toxicité. Également, d'autres indicateurs de toxicité pourraient être étudiés. En effet, les pétroles sont connus pour être perturbateurs endocriniens et immunotoxiques (Kennedy and Smith, 2015). Ainsi, étudier ces toxicités par le biais de coupes histologiques et par le biais d'analyses géniques (biopuce) pourrait permettre d'étudier la toxicité des pétroles plus précisément. Ainsi, d'autres différences ou similitudes présentes entre les pétroles conventionnels et les dilbits pourraient être mises en avant. Pour finir, étant donné que le développement a été affecté par le pétrole Arabian Light et qu'un profil de toxicité est visible au niveau du comportement (pour les pétroles conventionnels), il pourrait être intéressant de réaliser des analyses géniques supplémentaires sur des gènes impliqués dans la contraction musculaire ou le développement, pour étudier l'impact des pétroles au niveau génique plus précisément. Également, comme expliqué dans l'introduction, un dilbit correspond à du bitume dilué dans une coupe pétrolière. Même si la toxicité des dilbits est de plus en plus étudiée, il serait intéressant d'étudier la toxicité du bitume brut et celle de la coupe pétrolière (utilisée pour diluer le bitume et permettre son transport dans les pipelines) pour voir quelle fraction du dilbit est la plus toxique.

## Références

---

- Adams, J., Bornstein, J.M., Munno, K., Hollebone, B., King, T., Brown, R.S., and Hodson, P.V. (2014). Identification of compounds in heavy fuel oil that are chronically toxic to rainbow trout embryos by effects-driven chemical fractionation. *Environ. Toxicol. Chem.* *33*, 825–835.
- Aegerter, S., Jalabert, B., and Bobe, J. (2004). Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* *67*, 127–135.
- Alderman, S.L., Lin, F., Gillis, T.E., Farrell, A.P., and Kennedy, C.J. (2018). Developmental and latent effects of diluted bitumen exposure on early life stages of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Aquat. Toxicol.* *202*, 6–15.
- Alsaadi, F., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2018a). An Embryonic Field of Study: The Aquatic Fate and Toxicity of Diluted Bitumen. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *100*, 8–13.
- Alsaadi, F.M., Madison, B.N., Brown, R.S., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2018b). Morphological and molecular effects of two diluted bitumens on developing fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* *204*, 107–116.
- Augustyniak, E., Adam, A., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Willetts, R., Korkmaz, A., Atalay, M., Weber, D., Grune, T., Borsa, C., et al. (2015). Validation of protein carbonyl measurement: A multi-centre study. *Redox Biol.* *4*, 149–157.
- Ball, A., and Truskewycz, A. (2013). Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact ambiguity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 4311–4326.
- Barillet, S., Buet, A., Adam, C., and Devaux, A. (2005). Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* *40*, S175–S181.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., and Devaux, A. (2008). Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* *89*, 197–203.
- Bornstein, J.M., Adams, J., Hollebone, B., King, T., Hodson, P.V., and Brown, R.S. (2014). Effects-driven chemical fractionation of heavy fuel oil to isolate compounds toxic to trout embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* *33*, 814–824.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J.P., Schäffer, A., et al. (2013). How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat. Toxicol.* *128–129*, 13–24.
- Brooks, P.W., Fowler, M.G., and Macqueen, R.W. (1988). Biological marker and conventional organic geochemistry of oil sands/heavy oils, Western Canada basin. *Org. Geochem.* *12*, 519–538.

Buege, J.A., and Aust, S.D. (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*, S. Fleischer, and L. Packer, eds. (Academic Press), pp. 302–310.

Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., and Winn, R. (2007). Characterization of Toxic Effects of Sediment-Associated Organic Pollutants Using the  $\lambda$  Transgenic Medaka. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 7830–7836.

Dew, W.A., Hontela, A., Rood, S.B., and Pyle, G.G. (2015). Biological effects and toxicity of diluted bitumen and its constituents in freshwater systems, *Journal of Applied Tox*, *35*, 1219-1227.

Dussauze, M., Pichavant-Rafini, K., Floch, S.L., Lemaire, P., and Theron, M. (2015). Acute toxicity of chemically and mechanically dispersed crude oil to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Absence of synergistic effects between oil and dispersants, *Env. Tox. and Chem.*, *34*, 1543-1551.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., and Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* *97*, 79–87.

Gaaied, S., Oliveira, M., Le Bihanic, F., Cachot, J., and Banni, M. (2019). Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. *Chemosphere* *224*, 289–297.

Gagné, F., André, C., Douville, M., Talbot, A., Parrott, J., McMaster, M., and Hewitt, M. (2011). An examination of the toxic properties of water extracts in the vicinity of an oil sand extraction site. *J. Environ. Monit.* *13*, 3075–3086.

Incardona, J.P., Swarts, T.L., Edmunds, R.C., Linbo, T.L., Aquilina-Beck, A., Sloan, C.A., Gardner, L.D., Block, B.A., and Scholz, N.L. (2013). Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquat. Toxicol.* *142–143*, 303–316.

Jalabert, B., and Fostier, A. (2010). *La truite arc-en-ciel: De la biologie à l'élevage* (Editions Quae), 336p.

Jasperse, L., Levin, M., Rogers, K., Perkins, C., Bosker, T., Griffitt, R.J., Sepúlveda, M.S., and Guise, S.D. (2019). Transgenerational effects of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* *38*, 638–649.

Lari, E., Abtahi, B., and Hashtroudi, M.S. (2016). The effect of the water soluble fraction of crude oil on survival, physiology and behaviour of Caspian roach, *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870). *Aquat. Toxicol.* *170*, 330–334.

Le Bihanic, F., Couillard, C.M., Rigaud, C., and Légaré, B. (2013). A simple and reliable in vivo EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. *Mar. Environ. Res.* *84*, 17–23.

Le Bihanic, F., Morin, B., Cousin, X., Le Menach, K., Budzinski, H., and Cachot, J. (2014a). Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *21*, 13720–13731.

Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Le Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X., and Cachot, J. (2014b).



Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *21*, 13732–13743.

Leggieri, L.R., De Anna, J.S., Cárcamo, J.G., Cerón, G.A., Darraz, L.A., Panebianco, A., and Luquet, C.M. (2019). Gills CYP1A of *Oncorhynchus mykiss* as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *67*, 61–65.

Li, Z.-H., Zlabek, V., Grabic, R., Li, P., Machova, J., Velisek, J., and Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on intestine-related biochemical responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chem. Biol. Interact.* *185*, 241–246.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.

Madison, B.N., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2015). Diluted bitumen causes deformities and molecular responses indicative of oxidative stress in Japanese medaka embryos. *Aquat. Toxicol.* *165*, 222–230.

Madison, B.N., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2017). Cold Lake Blend diluted bitumen toxicity to the early development of Japanese medaka. *Environ. Pollut.* *225*, 579–586.

Magnuson, J.T., Khursigara, A.J., Allmon, E.B., Esbaugh, A.J., and Roberts, A.P. (2018). Effects of Deepwater Horizon crude oil on ocular development in two estuarine fish species, red drum (*Sciaenops ocellatus*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *166*, 186–191.

McDonnell, D., Madison, B.N., Baillon, L., Wallace, S.J., Brown, S.R., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. (2019). Comparative toxicity of two diluted bitumens to developing yellow perch (*Perca flavescens*). *Sci. Total Environ.* *655*, 977–985.

McNeill, S.A., Arens, C.J., Hogan, N.S., Köllner, B., and van den Heuvel, M.R. (2012). Immunological impacts of oil sands-affected waters on rainbow trout evaluated using an in situ exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *84*, 254–261.

Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., and Bustamante, P. (2016). Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Sci. Total Environ.* *568*, 952–966.

Philibert, D.A., Philibert, C.P., Lewis, C., and Tierney, K.B. (2016). Comparison of Diluted Bitumen (Dilbit) and Conventional Crude Oil Toxicity to Developing Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* *50*, 6091–6098.

Robidoux, P.Y., Virginie, B., Judith, L., and 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.

Ronda, A.C., Oliva, A.L., Arias, A.H., Orazi, M.M., and Marcovecchio, J.E. (2019). Biomarker Responses to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Native Fish *Ramnogaster arcuata*, South America. *Int. J.*

Environ. Res. *13*, 77–89.

Russell WMS, Burch RL (1959). The principles of humane experimental techniques. Methuen, London, 238p

Santos, S.W., Cachot, J., Gourves, P.-Y., Clérandeau, C., Morin, B., and Gonzalez, P. (2019). Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *170*, 778–788.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* *175*, 184–191.

Sturla Lompré, J., Nievas, M., Franco, M., Grossi, V., Ferrando, A., Militon, C., Gilbert, F., Cuny, P., Stora, G., Sepúlveda, M., et al. (2018). Fate of petroleum hydrocarbons in bioturbated pristine sediments from Caleta Valdés (Patagonia Argentina): An ex situ bioassay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *162*, 673–682.

Tkachenko, H., Kurhaluk, N., and Grudniewska, J. (2015). Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defences as indicators of different disinfectants exposure in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.* *46*, 679–689.

Vardy, D.W., Oellers, J., Doering, J.A., Hollert, H., Giesy, J.P., and Hecker, M. (2013). Sensitivity of early life stages of white sturgeon, rainbow trout, and fathead minnow to copper. *Ecotoxicology* *22*, 139–147.

Vehniäinen, E.-R., Bremer, K., Scott, J.A., Junttila, S., Laiho, A., Gyenesei, A., Hodson, P.V., and Oikari, A.O.J. (2016). Retene causes multifunctional transcriptomic changes in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *41*, 95–102.

Wang, Z., Hollebone, B., Fingas, M., Fieldhouse, B., Sigouin, L., Landriault, M., Smith, P., Noonan, J., and Thouin, J. (2003). Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. US EPA, 58-69

Woods, J., Kung, J., Kingston, D., Kotlyar, L., Sparks, B., and McCracken, T. (2008). Canadian Crudes: A Comparative Study of SARA Fractions from a Modified HPLC Separation Technique. *Oil Gas Sci. Technol. - Rev. IFP* *63*, 151–163.

Yazdani, M. (2018). Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. *Drug Chem. Toxicol.* *0*, 1–8.

Youssef, T. (2002). Evidence for reduced post-spill recovery by the halophyte *Sporobolus iocladius* (Nees ex Trin.) Nees in oil-contaminated sediments. *Mar. Pollut. Bull.* *44*, 334–339.

## 5. Annexes

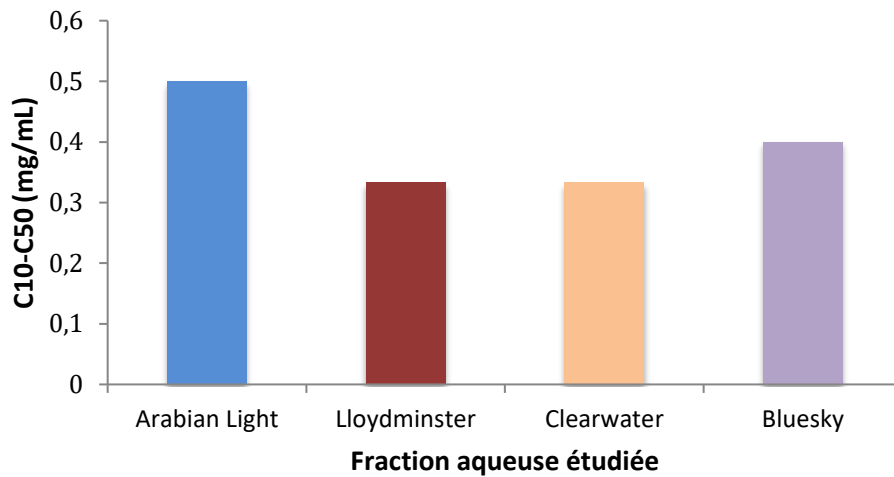
---

### 5.1. Propriétés physico-chimiques et composition chimique de l'eau de source Laqueuille utilisée dans le projet

Paramètre mesuré	Eau de source de montagne Laqueuille (mg/L, pH sans unité)
Calcium	4,7
Magnésium	1,8
Sodium	5,9
Potassium	2,8
Hydrogénocarbonates	40,3
Chlorures	1,2
Sulfates	0,2
Nitrates	0,5
Résidu sec à 180 °C	74
pH	7,5

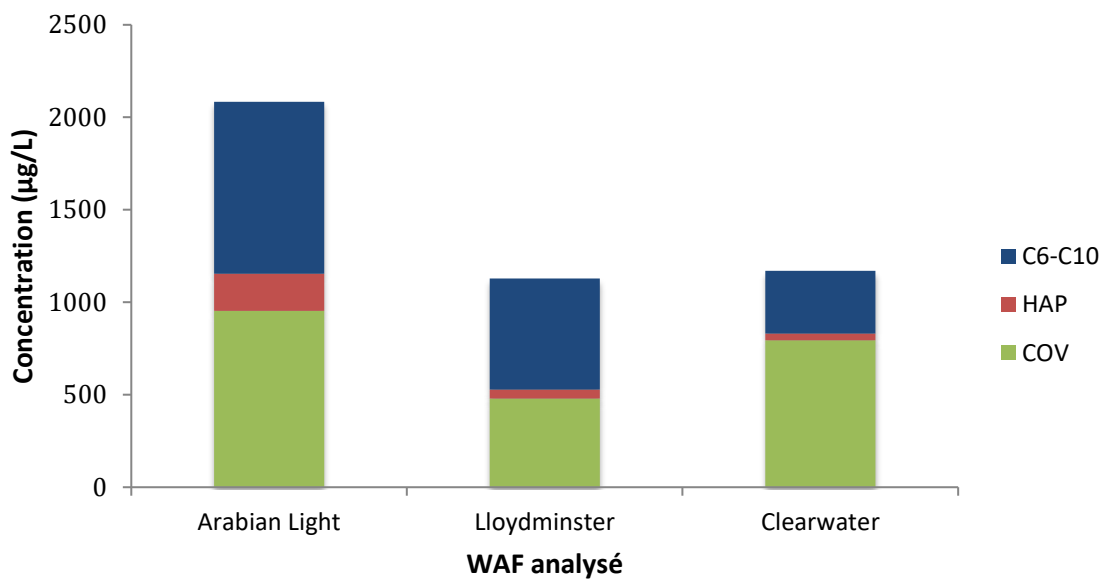
**Annexe I :** Composition chimique et propriétés physico-chimiques de l'eau de source de montagne Laqueuille, eau de source utilisée comme témoin et pour diluer les solutions de contamination pendant ce projet

## 5.2. Composition des fractions aqueuses en C10-C50



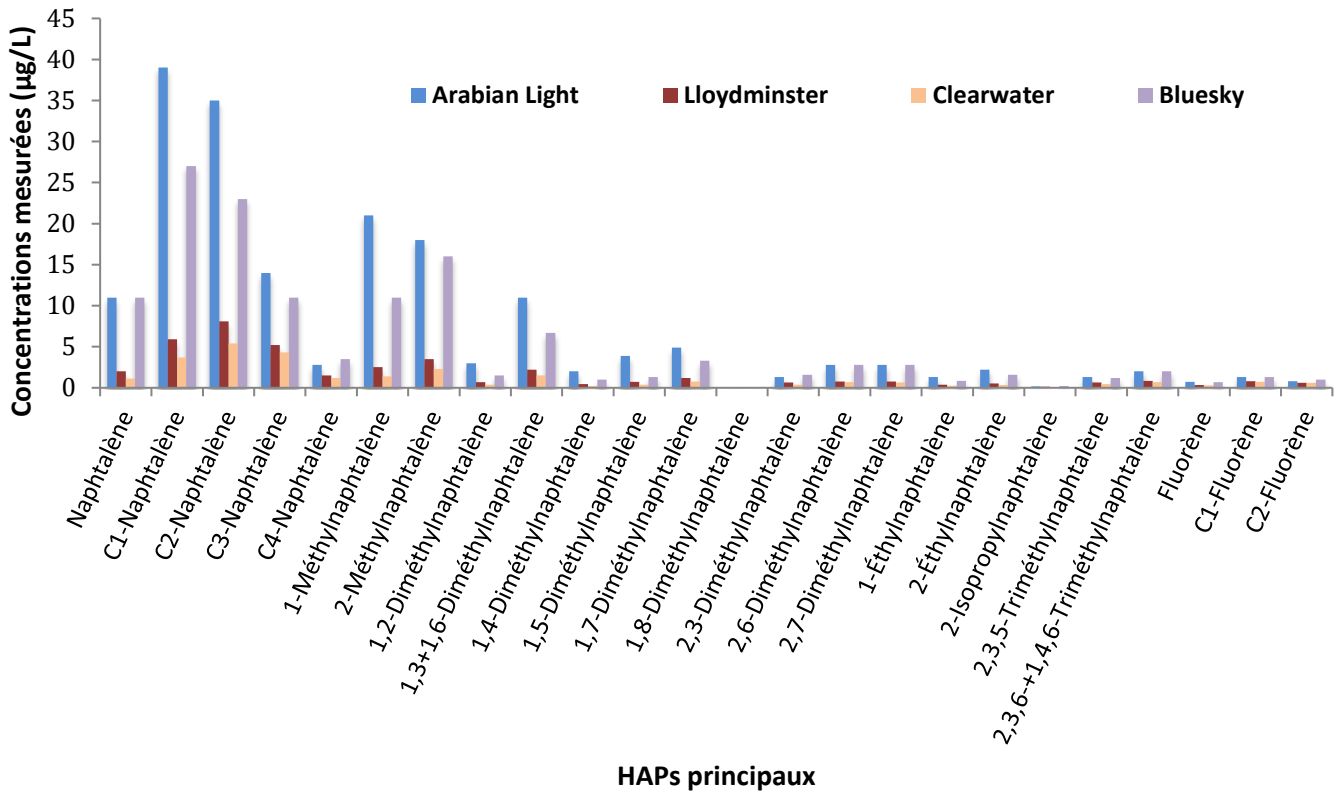
**Annexe II :** Concentrations (n = 1, mg/mL) de C10-C50 mesurées dans les fractions aqueuses utilisées dans cette étude

## 5.3. Composition des fractions aqueuses en hydrocarbures



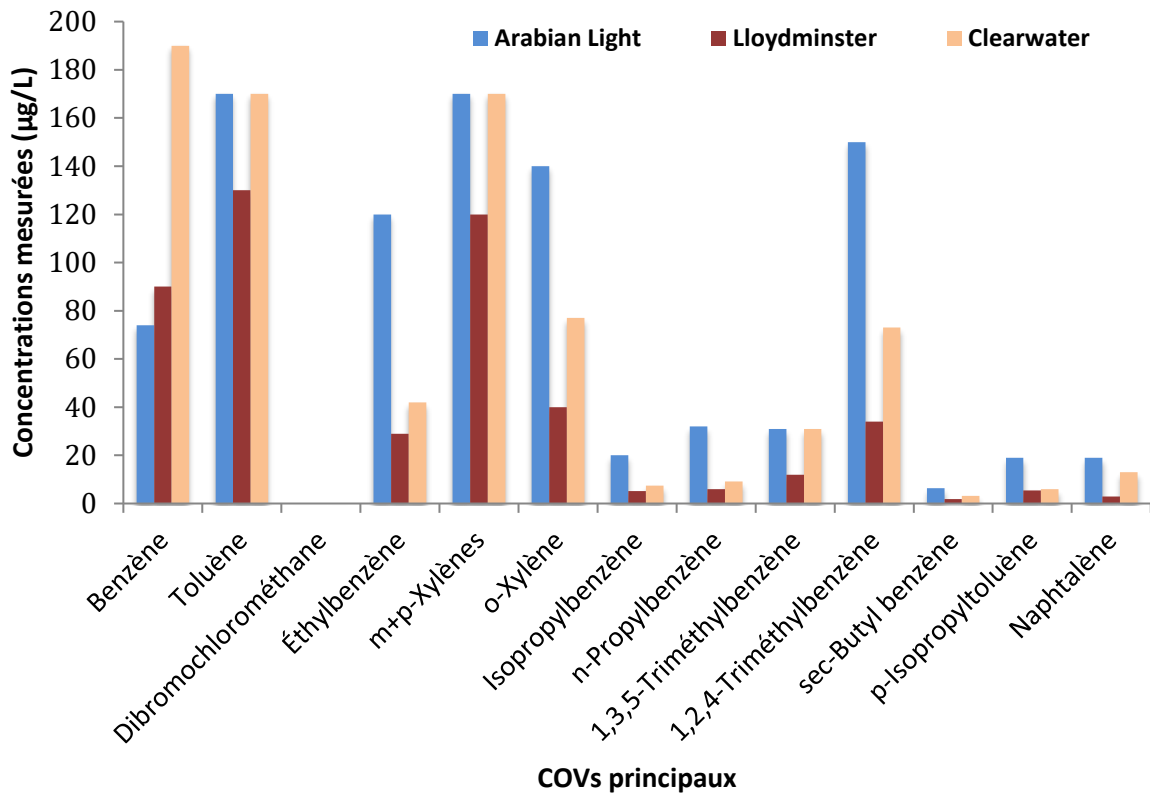
**Annexe III:** Concentrations d'hydrocarbures totaux (COV, HAP, C6-C10, n = 1, µg/L) mesurées dans les fractions aqueuses utilisées dans cette étude

## 5.4. Caractérisation des HAP dans les fractions aqueuses



**Annexe IV:** Concentrations (n = 1, µg/L) des HAP principaux mesurés dans les fractions aqueuses utilisées dans ce projet

## 5.5. Caractérisation des COV dans les fractions aqueuses



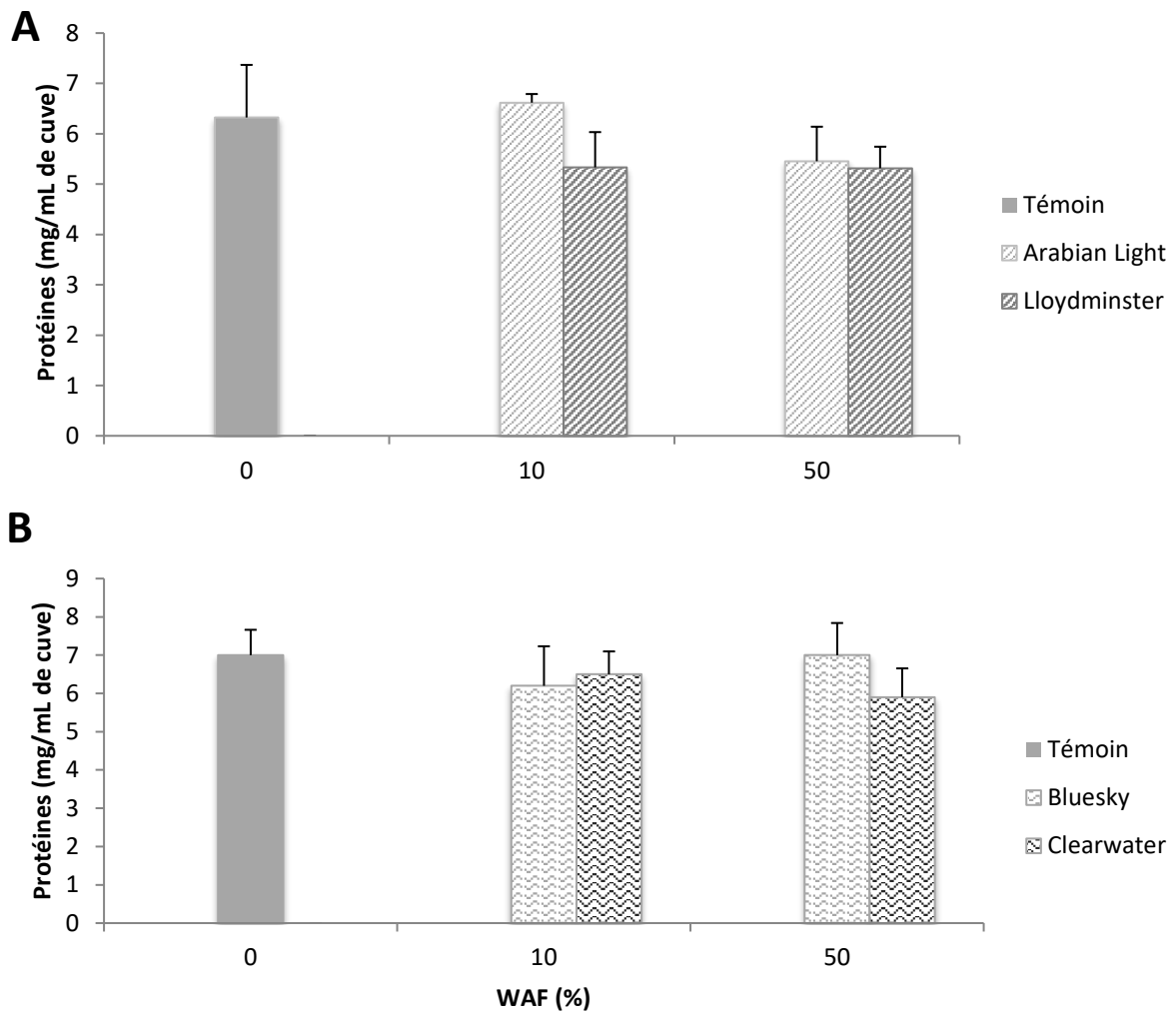
**Annexe V:** Concentrations (n = 1, µg/L) des principaux COV mesurés dans les fractions aqueuses utilisées dans ce projet

## 5.6. Activité EROD des échantillons « contrôles »

Répétition	Activité EROD exposition 1 (pmol/larve/minute)	Activité EROD exposition 2 (pmol/larve/minute)
Témoin-1	$(7,94 \pm 4,45) \times 10^{-5}$	$(48,51 \pm 6,29) \times 10^{-4}$
Témoin-2	$(8,17 \pm 4,06) \times 10^{-5}$	$(2,85 \pm 0,6) \times 10^{-4}$
Témoin-3	$(11,09 \pm 4,32) \times 10^{-5}$	$(49,43 \pm 5,89) \times 10^{-4}$
Témoin-4	$(11,68 \pm 2,01) \times 10^{-5}$	$(11,23 \pm 2,51) \times 10^{-4}$

**Annexe VI :** Activités EROD (pmol/larve/minute) obtenues lors des deux expositions (1: pétroles conventionnels, 2: bitumes dilués) pour les larves témoins

### 5.7. Protéines (mg/mg de tissu) dans les larves issues des expositions aux pétroles conventionnels et bitumes dilués



**Annexe VII** : Protéines (mg/mL de cuve), moyenne + écart type) dans les larves de truite arc-en-ciel après exposition aux pétroles conventionnels (A) et aux bitumes dilués (B). Témoins n = 4, conditions d'exposition n = 3.

## 5.8. Valeurs TBARS (nmol MDA/mg protéines) obtenues pour les larves « contrôles » sur les deux expositions

Répétition	TBARS exposition 1 (nmol MDA/mg de protéine)	TBARS exposition 2 (nmol MDA/mg de protéine)
Témoin-1	0,24 ± 0,03	0,93 ± 0,73
Témoin-2	0,21 ± 0,05	1,59 ± 0,50
Témoin-3	0,25 ± 0,14	0,67 ± 0,67
Témoin-4	0,17 ± 0,01	1,31 ± 0,48

**Annexe VIII :** TBARS (nmol MDA/mg de protéine) obtenues lors des deux expositions (1: pétroles conventionnels, 2: bitumes dilués) pour les larves témoins