



Université du Québec  
à Rimouski

**Effets sous-létaux sur la Moule bleue (*Mytilus edulis*) et sa  
progéniture d'une exposition chronique à trois pétroles  
(classiques et bitumes dilués) en condition hivernale avec  
couvert de glace**

Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

PAR  
© ANTHONY SCHMUTZ

[décembre 2018]



**Composition du jury :**

**Zhe Lu, président du jury, Université du Québec à Rimouski**

**Richard St-Louis, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Réjean Tremblay, codirecteur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Luc Comeau, examinateur externe, ministère pêches et océans Canada, Moncton**

Dépôt initial le 13 août 2018

Dépôt final le 5 décembre 2018



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.



À ma tante préférée, merci pour ton amour et ta force. À mon frère, courage et continue, tu es sur la bonne voie.

« Hot sand on toes, cold sand in sleeping bags. I've come to know that memories were the best things you ever had. » *Old Pine - Benjamin "Ben" John Howard*





## REMERCIEMENTS

L'ensemble de cette étude n'aurait jamais pu aboutir sans l'implication déterminante de plusieurs personnes.

Merci tout d'abord à mes directeurs, Richard St-Louis et Réjean Tremblay, pour leur supervision et leur soutien financier. Merci pour votre disponibilité et compréhension tout au long de ces dernières années ainsi que pour les opportunités d'apprentissages et votre confiance, qui m'ont permis d'acquérir une expérience inestimable tout au long de mes études et par le biais de congrès scientifiques.

Un chaleureux merci aux gens qui m'ont épaulé lors de la phase de laboratoire. Nathalie Gauthier et Nathalie Morin avec leur expertise et disponibilité à toute épreuve malgré la froideur de l'eau dans laquelle nous effectuions les analyses. Mataëlle Onapin pour son professionnalisme, son efficacité et sa joie de vivre bien agréable après ces longues journées de laboratoire. Merci également à Gabriel Dubé et Gabriel Bardaxoglou pour leur courage et leur détermination lors des phases de nettoyage qui représentait tout un défi.

Un merci rempli d'amour à ma famille. Bien qu'étant loin j'ai toujours grandement apprécié votre soutien qui m'a permis de me rendre au bout malgré les hauts et les bas. Merci à ma mère, Christine, et mon père, Gérard, pour votre soutien inconditionnel malgré les questionnements. Merci à mon frère, Alexandre, et ma sœur, Aurélie-Anne, pour la camaraderie et votre appui, chacun à votre façon. Merci à toi mon petit cœur, Claudie, pour ton support moral à toute épreuve et pour tes mots doux que j'affectionne toujours autant. Merci également à ma grand-mère, Annie, pour son amour sans fin et qui malgré son âge vénérable, a toujours été curieuse de ce que je faisais, je crois que je tiens cela de toi. À mon oncle et ma tante, Guy et Marie-Laure, et mes cousines, Charlotte et Aure-Line, bien que nous ne nous voyions plus autant qu'avant, je vous porte toujours autant dans mon cœur. À mes amis Karell, Gauthier, Teva, Baptistin, Philippe, Jocelyn, mes collègues de classe, ainsi

que mes coéquipiers de l'équipe de soccer universitaire de l'UQAR, vous avez su rendre les moments agréables mémorables et les moments difficiles plus faciles.

À vous tous, vous avez été d'une aide inestimable et faites partie de la réussite de ce projet.

J'aimerais remercier le Fond québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FRQNT) pour leur soutien monétaire. La Fondation de l'UQAR ainsi que le regroupement Québec Océan ont également été déterminants grâce à leurs bourses de mobilité.

Pour finir, je tiens également à remercier mon comité d'évaluation, Zhe Lu et Luc Comeau, pour votre temps et votre disponibilité. En espérant que vous aurez autant de plaisir à me lire que j'en ai eu à rédiger.



## RÉSUMÉ

La voie maritime du St-Laurent est perçue comme un exutoire optimal pour acheminer le bitume issu des sables bitumineux canadiens, sous sa forme diluée, vers les marchés internationaux. À notre connaissance, aucune étude ne porte actuellement sur la toxicité d'un potentiel déversement hivernal en milieu marin de ce type de pétrole brut. La moule bleue (*Mytilus edulis*), espèce d'importance économique, a donc été sélectionnée pour mesurer les impacts d'un déversement sous couvert de glace. Dans un mésocosme de 3 500 litres, 288 individus adultes furent exposés à un pétrole classique (Heidrun) et deux bitumes dilués (AWB et CLB). La bioaccumulation d'hydrocarbures ainsi que la réponse physiologique des individus (stress cellulaire, respirométrie, taux de filtration, assimilation de la nourriture, budget énergétique, gamétogénèse) furent suivies dans les semaines suivant l'exposition. Au printemps, les effets sur la qualité de la ponte et des larves produites ont également été relevés. La présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dans les tissus a été détectée après 3 jours d'exposition, avec de plus fortes concentrations totales (TPAHs) induites par le pétrole classique ( $5,49 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ) que les bitumes dilués ( $0,91 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ ;  $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ). Malgré une rapide dépuración couplée à une bonne résilience des adultes exposés, des effets négatifs sur la gamétogénèse ainsi que sur le développement et la survie larvaire ont été remarqués. Des effets toxiques plus importants furent observés chez les individus, adultes et larves, associées aux traitements des bitumes dilués. Les conditions hivernales rudes ainsi que la présence d'un couvert de glace permanent contribuent également à expliquer la toxicité différentielle entre les types de pétrole en influençant les caractéristiques physico-chimiques de ces derniers en plus de modifier les processus de biodisponibilité et d'accumulation. La plus forte toxicité observée dans le cas des bitumes dilués pourrait provenir de la composition chimique des diluants utilisés, composés en grande majorité d'hydrocarbures de faibles poids moléculaires, dont l'évaporation habituellement rapide a pu être influencée par la présence d'une barrière physique comme la glace.

*Mots clés : bitumes dilués, sables bitumineux, HAPs, moule bleue, déversement pétrole hivernal, couvert de glace*



## ABSTRACT

The St. Lawrence estuary, characterized by an important ice cover in winter, is an optimal way for the transport of Canadian crude oil in its diluted form (dilbit). To our knowledge, impact on blue mussels (*Mytilus edulis*), particularly during winter condition, and his offspring following an acute exposition to unconventional oil has never been conducted. Thus, a small-scale oil spill was simulated in an outdoor 3,500-liter mesocosm filled with sea water from the St. Lawrence estuary. Adults mussels (n = 288) were exposed to one conventional crude oil (Heidrun) and two dilbits (CLB, AWB) for seven days under a persistent layer of ice and then kept alive for several months until the spawning season. During the post-exposition period in winter, bioaccumulation, filtration rate, oxygen uptake and organic matter assimilation were monitored concomitantly with cellular stress and gametogenesis development. In spring, several months after the winter exposure, spawning was induced to characterize larval development. The bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in adults was detected after only three days of exposure with higher total PAHs (TPAHs) concentration related to the conventional oil ( $5.49 \pm 0.12 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ) than the dilbits ( $0.91 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$ ;  $0.51 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ). Despite a rapid depuration combined with good resilience of exposed genitors, significant negative effects were noted on female oogenesis, gamete production and larval development and fitness. Higher negative impacts were observed on individuals, adults and larvae, related with dilbits treatments. Most important toxicity observed with dilbits crudes, could be related to the chemical composition of diluent used, mainly composed of low molecular weight hydrocarbons (including PAHs congeners). Environmental winter condition and the omnipresence of an ice layer could also partially explain the toxicity variability between crudes oils tested. Low molecular weights hydrocarbons from diluent usually quickly vanished in atmosphere but the physical barrier imposed by ice can have influenced related exposure mechanisms.

*Keywords: diluted bitumen, PAHs, blue mussel, winter oil spill, ice oil spill*

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
TABLE DES MATIÈRES.....	xv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 Effets sous-létaux sur la Moule bleue ( <i>Mytilus edulis</i> ) et sa progéniture d'une exposition chronique à trois pétroles (classiques et bitumes dilués) en condition hivernale avec couvert de glace : précisions sur la méthodologie appliquée à l'usage de pétroles bruts.....	21
1.1    METHODOLOGIE GENERALE RATTACHEE AU PROJET ET L'USAGE DE PETROLES BRUTS EN CONDITION HIVERNALE AVEC COUVERT DE GLACE.....	21
1.2    DEROULEMENT DE L'EXPOSITION.....	22
1.3    POST EXPOSITION.....	25
CHAPITRE 2 Ice cover crude oil spill (conventional crude and diluted bitumen) consequences on physiological resilience of blue mussel and their offspring's.....	26
2.1    INTRODUCTION.....	26
2.2    METHODOLOGY.....	30
2.2.1    Experimental design.....	30
2.2.2    Exposure.....	31
2.2.3    Post-exposure sampling period.....	32

2.2.4	Monitoring of bioaccumulation: extraction and analysis of hydrocarbons .....	33
2.2.5	Post-exposure adults' physiological monitoring: Condition index .....	34
2.2.6	Post-exposure adults' physiological monitoring: Scope for growth (SFG) .....	34
2.2.7	Post-exposure adults' physiological monitoring: Lysosomal membrane stability .....	36
2.2.8	Post-exposure adults' physiological monitoring: Byssus diameter .....	37
2.2.9	Post-exposure adults' physiological monitoring: Histology analysis of gametic tissue .....	37
2.2.10	Post-exposure spring breeding success .....	38
2.2.11	Statistical analysis .....	39
2.3	RESULTS .....	40
2.3.1	Abiotic seawater condition during treatments .....	40
2.3.2	Hydrocarbons monitoring: tissue bioaccumulation .....	40
2.3.3	Adults biological response .....	42
2.3.4	Larval biological response .....	55
2.4	DISCUSSION .....	60
2.4.1	Petroleum hydrocarbons bioaccumulation .....	61
2.4.2	Adults mussel biologic response – individual integrity and resilience .....	63
2.4.3	Breeding processes and offspring biological response – ecological integrity and resilience .....	67
2.4.4	Differential toxic effects – Conventional oil v.s. diluted bitumen (dilbit) .....	69
2.5	CONCLUSION .....	71
	DISCUSSION - CONCLUSION GÉNÉRALE .....	73
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	81



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Résumé de la composition chimique des pétroles bruts testés : Heidrun (classique), Cold Lake Blend et Access Western Blend (bitumes dilués). Issue de Crude Monitor (2018).....	9
Table 2. Chemical summary of the three crude oils tested: Heidrun (classic), Cold Lake Blend and Access Western Blend (diluted bitumen). Adapted from Crude Monitor (2018).....	31
Table 3. Abiotic conditions during the 7-days exposure period for each treatment. ....	32

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Tracé des pipelines canadiens et américains actuels et projetés. Issue de Alberta Oil Sand Industry (2017).....	2
Figure 2. Illustration structurale de certains composés hydrocarbonés retrouvés dans les pétroles bruts.....	7
Figure 3. Estimation (en rouge) de la couverture de glace hivernale dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. Image issue de National Aeronautics and Space Administration (2018). .....	11
Figure 4. Illustration du potentiel d'interaction engendré par la présence de glace en comparaison à un déversement sans présence de glace. Issue de Wilkinson et al., (2017). .....	14
Figure 5. Variation du taux de filtration ( $L h^{-1} g^{-1}$ ) après 2h et 72h suivant un choc thermique en relation avec la température d'acclimatation et de transfert. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (S.E.). Adapté de Cusson et al., (2005). .....	16
Figure 6. Proportion de mâles (A, C et E) et femelle (B, D et F) de <i>Mytilus</i> spp. à différents stades de leur cycle reproductif de juin à novembre 2003. Adapté de Lemaire et al., (2006). .....	17
Figure 7. Illustration du schéma expérimental avec récapitulatif de l'ensemble des analyses et échantillonnages effectués. ....	22
Figure 8. Photo du mésocosme expérimental permettant de recréer un déversement pétrolier en conditions environnementales hivernales avec une couverture de glace. ....	24
Figure 9. Anatomical description of byssal thread sections.....	37
Figure 10. Bioaccumulation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) in adult's mussels' whole tissue during and after the exposure. Data are expressed in $\mu g g^{-1}$ of dry weight. ....	41

- Figure 11. Bioaccumulation of total carbazoles and dibenzothiophenes in adult mussels' whole tissue during and after the exposure. Data are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of dry weight. ....42
- Figure 12. Adult cellular stress immediately after the exposure and one month later. Data are expressed in proportion (%) of affected cells compared to total analyzed cells. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, "post exposure" appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period. ....43
- Figure 13. Adult maximum clearance rate ( $\text{L h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ),  $\text{VO}_2$  ( $\text{mL O}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), assimilation efficiency (%) and total scope for growth values ( $\text{J h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, "post exposure" appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period. ....45
- Figure 14. Regression prediction of adult clearance rate ( $\text{L h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) and respiration rate ( $\text{VO}_2 \text{ max, mL O}_2 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) against TPAHs tissue accumulation after exposure. ....47
- Figure 15. Adult byssus thread width ( $\mu\text{m}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, "post exposure" appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period. ....48
- Figure 16. Cross section of female gonads sampled immediately after the winter exposure (within 12 hours), 200X. Examples of atretic oocytes are marked with an arrow and hemocyte infiltration of follicles are marked with \*. Hematoxylin and eosin (Ehrlich solution) staining, section of  $5\mu\text{m}$ . ....49
- Figure 17. Cross section of female gonads sampled after the winter exposure (within 12 hours), 200X. Examples of atretic oocytes are marked with an arrow. Hematoxylin and eosin (Ehrlich solution) staining, section of  $5\mu\text{m}$ . ....50
- Figure 18. Adult gamete volume fraction (GVF; %), atresia volume fraction (AVF; %) and viable oocytes diameter ( $\mu\text{m}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, "post exposure" appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period. ....52

Figure 19. Spermatozoid viability (%), spermatozoid total production (spermatozoids mL<sup>-1</sup>) and eggs total production (eggs mL<sup>-1</sup>) for each treatment during the spring spawning. Different letters represent significant variation from posteriori test..... 54

Figure 20. Visual representation of density and D-veliger larvae proportion 2 days post-fertilization from each treatment, 100X. .... 56

Figure 21. Proportion (%) of larvae at D-veliger stage 2 days post-fertilization. Different letters represent significant variation from posteriori test. .... 57

Figure 22. Larvae density (larvae mL<sup>-1</sup>) at days 4, 7 and 9 post-fertilization. Different letters represent significant variation from posteriori test..... 58

Figure 23. Larvae size growth (µm) from fertilization to 9-days post-fertilization..... 59





## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### Dépendance énergétique mondiale et réalité canadienne

La demande pétrolière mondiale actuelle ne cesse de grandir. En plus des pays industrialisés, les pays émergents asiatiques deviennent de plus en plus gourmands de cet or noir. Selon le rapport 2017 de l'Agence Internationale de l'Énergie, la demande mondiale en pétrole devrait augmenter de 12% d'ici 2040. Majoritairement causée par une demande grandissante (+9,3 millions de barils par jours) provenant de la Chine et de l'Inde, qui représentent à eux seuls 85% de l'augmentation projetée d'ici 2040 (Brandvik et Faksness, 2009; Canadian Association of Petroleum Producers, 2018; De Castro et al., 2009; Tsoskounoglou et al., 2008). En plus de l'augmentation de la demande, une diminution des réserves de pétroles classiques est observée. L'avancement technologique couplée à la diminution des coûts d'exploitation favorise cependant une transition vers l'exploitation de gisements non classiques. Le Canada possède ainsi un atout économique de taille puisqu'il est assis sur la plus grande réserve de pétrole non classique au monde, sous forme de sables bitumineux (ensemble des gisements Athabasca, Cold Lake et Peace River) (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Ce dernier se classe du même coup comme la troisième plus grande réserve pétrolifère mondiale prouvée après l'Arabie Saoudite et le Venezuela (Crosby et al., 2013; Dupuis et Ucan-Marin, 2015; King et al., 2014). En 2017, la production pétrolière canadienne atteignait 4,2 millions de barils par jour, majoritairement engendré par les sables bitumineux à hauteur de 65%. Ces derniers étant perçus comme le principal levier à l'économie pétrolière canadienne permettant de soutenir une croissance continue durant les prochaines décennies. Les investissements en capitaux des dernières années ont d'ailleurs été substantiels (cumulatif > 100 milliards \$CAN) et semblent encore prévus à la hausse, permettant de propulser les projets d'exploration, exploitation et d'exportation (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018; Crosby et al., 2013). La

production des sables bitumineux est ainsi passée de 1,9 million de barils en 2009 à 2,65 millions de barils par jour en 2017 tout en étant projetée à 4,2 millions de barils produits par jour en 2035 (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Une fois extrait et amélioré (dilution préalable au transport) le brut provenant des sables bitumineux est centralisé vers Edmonton ou Hardisty avant d’être distribué par oléoducs au niveau national ou international. Actuellement, les oléoducs existants comportent deux contraintes majeures pouvant ralentir l’expansion de l’exportation des sables bitumineux de l’Athabasca : (1) une étendue limitée couplée à une dépendance envers les États-Unis comme importateur principal et (2) la saturation de la capacité de transport des oléoducs actuels (Figure 1).



Figure 1. Tracé des pipelines canadiens et américains actuels et projetés. Issue de Alberta Oil Sand Industry (2017).

(1) La majorité (60%) de la capacité canadienne de raffinage est située dans la partie est du Canada (Ontario, Québec et Maritimes). Ces raffineries ne sont cependant pas reliées



efficacement au réseau d'oléoducs domestiques canadiens et dépendent encore majoritairement, voire totalement, d'importation de pétrole brut des États-Unis. La ligne 9 d'Enbridge s'arrêtant au niveau de Montréal, les raffineries ou infrastructures portuaires davantage à l'Ouest (ex. : St-John, Nouveau-Brunswick) ne sont pas desservies. Les importations américaines sont majoritairement dirigées vers le centre-ouest tandis que le sud des États-Unis (golfe du Mexique) n'est que très peu desservi (< 0,3 million de barils par jour) même si la majorité du potentiel de raffinage américain s'y retrouve (9,4 millions de barils par jour) (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Actuellement, les producteurs sud-américains (Mexique et Venezuela) dominent les exportations de pétrole lourd vers le golfe du Mexique. La chute de production de ces derniers, entraînés par une diminution de la ressource et/ou un contexte sociopolitique instable, ouvre cependant ce marché aux compagnies canadiennes. En plus des États-Unis, les marchés asiatiques et même européens représentent une opportunité de taille pour l'exportation de pétrole brut canadien encore limité par le manque de développement des voies d'acheminement. La Chine soutient d'ailleurs l'expansion des sables bitumineux par le biais d'investissement monétaire conséquent depuis plusieurs années (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018; Crosby et al., 2013). L'Europe demeure quant à elle incertaine due aux législations européennes strictes en matière de développement durable en lien avec le caractère polluant relié à l'exploitation des sables bitumineux et ne représentent donc pas actuellement, un marché prioritaire.

(2) L'ensemble des oléoducs existants disponibles, dont les principaux sont Mainline d'Enbridge, l'Express d'Enbridge, Trans Mountain de Kinder Morgan et Keystone de TransCanada, représentent actuellement une capacité totale moyenne (tous pétroles confondus) de 4,022 millions de barils par jour. Leur capacité potentielle disponible pour l'exportation de pétroles bruts issue des sables bitumineux est estimée à 3,364 millions de barils par jour (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Ces chiffres étant inférieurs à ceux de la production annuelle canadienne totale ainsi que de la production canadienne provenant des sables bitumineux, les producteurs de pétrole doivent actuellement

se tourner vers des moyens de transport alternatifs par voie ferroviaire ou maritime, ce qui engendre entre autres, une augmentation des coûts de production.

Pour atteindre les objectifs d'exportation futurs, la mise à niveau d'oléoducs existants ainsi que la construction de nouveaux sont des projets prioritaires. Après la mise en attente du projet Trans Canada Énergie Est en 2017, trois projets demeurent activement en développement soit le remplacement de la ligne 3 d'Enbridge (Edmonton vers les terminaux pétroliers/portuaires du lac Supérieur), l'expansion du TransMountain de Kinder Morgan (Edmonton vers Burnaby) ainsi que Keystone XL de TransCanada (Hardisty vers Steele City) (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). La nouvelle ligne 3 d'Enbridge permettrait d'augmenter le flux de pétroles bruts vers les raffineries et terminaux portuaires canadiens de l'est (Ontario, Québec et provinces maritimes) en plus de l'est des États-Unis. Le projet d'expansion TransMountain a pour but d'augmenter la capacité vers la Colombie-Britannique et ainsi d'ouvrir l'exportation par voie maritime vers les marchés américains de l'Ouest (Washington et Californie) et asiatiques. Quant au projet Keystone XL, il permettrait d'augmenter la capacité de pétrole brut canadien exporté vers le golfe du Mexique, fortement pourvu de raffineries et terminaux portuaires/pétroliers.

En 2017, 23% de la production de brut (environ 1 million de barils par jour) demeure au pays et plus des trois quarts (3,4 millions de barils par jour) sont exportés vers un unique pays, les États-Unis (99% des exportations de brut canadien). Les autres exportations internationales ne représentant qu'un maigre 30 000 barils par jour (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Les expansions et modernisations projetées devraient donc non seulement permettre une sortie plus importante (+1,4 million de barils par jour ; augmentation de 33%) de pétrole brut canadien, mais également d'atteindre des marchés éloignés jusqu'ici peu ou pas desservis. Une ouverture vers les marchés internationaux asiatiques, de l'Ouest (Californie, Washington), du Sud (golfe du Mexique) et de l'Est des États-Unis en plus de favoriser le marché domestique des provinces de l'Est (Ontario, Québec et Maritimes) est donc projetée. Cette transition d'un modèle économique réduit vers une expansion internationale nécessite inévitablement l'augmentation du transit de pétroles bruts

premièrement par voie terrestre (oléoducs et ferroviaires), mais également par voie maritime (pétroliers). Pour soutenir la demande croissante avant la finalisation des projets d'expansion d'oléoducs actuels, mais également pour soutenir les exportations grandissantes vers les marchés nord-américains côtiers et asiatiques, le transport ferroviaire et maritime prendra de l'importance (Crosby et al., 2013; King et al., 2014, 2015). Tandis que des pétroliers transportent déjà du pétrole brut canadien vers la Chine, la construction de nouveaux terminaux devrait drastiquement augmenter le transit maritime dans les eaux canadiennes, américaines et internationales. À l'ouest du Canada, selon les prédictions de l'industrie, l'augmentation du nombre de pétroliers par année pourrait atteindre 300 pour le port de Vancouver, 500 pour le détroit de Juan de Fuca et 500 additionnels au niveau du détroit de Puget (Crosby et al., 2013). À l'est du Canada, bien que le projet Énergie Est de TransCanada ait été mis en attente, en partie due à l'opposition sociale, ce projet demeure dans les plans de l'industrie pétrolière (Figure 1). D'autant plus qu'il s'agit du seul tronçon pouvant directement acheminer les pétroles albertains vers l'est du Canada, ouvrant du même coup les marchés transatlantiques et de l'est des États-Unis par le biais entre autres de la voie navigable du Saint-Laurent. Des quatre projets d'envergure planifiés, Énergie Est de TransCanada est celui qui a subi le plus d'opposition sociale et politique durant les dernières années tout en visant un marché encore incertain (Europe), en plus de représenter la plus importante construction de nouvelles infrastructures. Dans ce contexte, il semble donc que l'industrie pétrolière ait décidé de se focaliser sur les trois autres projets d'envergure, reléguant le projet Énergie Est en second plan. Les ports du Québec, du Nouveau-Brunswick et des Maritimes demeurent tout de même potentiellement sollicités pour la construction de nouveaux terminaux pétroliers permettant, entre autres, la sortie du pétrole albertain (Gonzalez et al., 2015). L'ouverture depuis 2012 du tronçon Québec-Montréal aux navires de taille Post-Panamax (>290 mètres de longueur) témoigne également de cette volonté d'employer le Saint-Laurent comme voie maritime pour atteindre les marchés internationaux (Gonzalez et al., 2015). Une augmentation du transit et de l'ensemble des activités de manutention et transbordement reliées implique inévitablement une augmentation des risques potentiels de déversements.

### **Caractéristiques propres aux pétroles bruts provenant des sables bitumineux**

De manière générale, les pétroles bruts sont des mélanges complexes et hétérogènes d'hydrocarbures pouvant aisément atteindre 20 000 molécules distinctes en plus d'inclure d'autres composés comme du soufre ou des métaux lourds. Quatre classes distinctes d'hydrocarbures sont retrouvées dans les pétroles bruts soit les saturés, les aromatiques, les résines et les asphaltènes. Les saturés représentent des chaînes carbonées de forme simple et de poids moléculaire faible (ex. : décane, hexadécane, cyclohexane). Les aromatiques peuvent être mono- ou polycycliques et lié à d'autres groupements (ex : méthyle) ou non. Les asphaltènes et les résines possèdent quant à eux des structures complexes (agrégats) en plus d'un poids moléculaire supérieur aux classes précédentes (voir la figure 2 pour une illustration d'exemples de molécules).

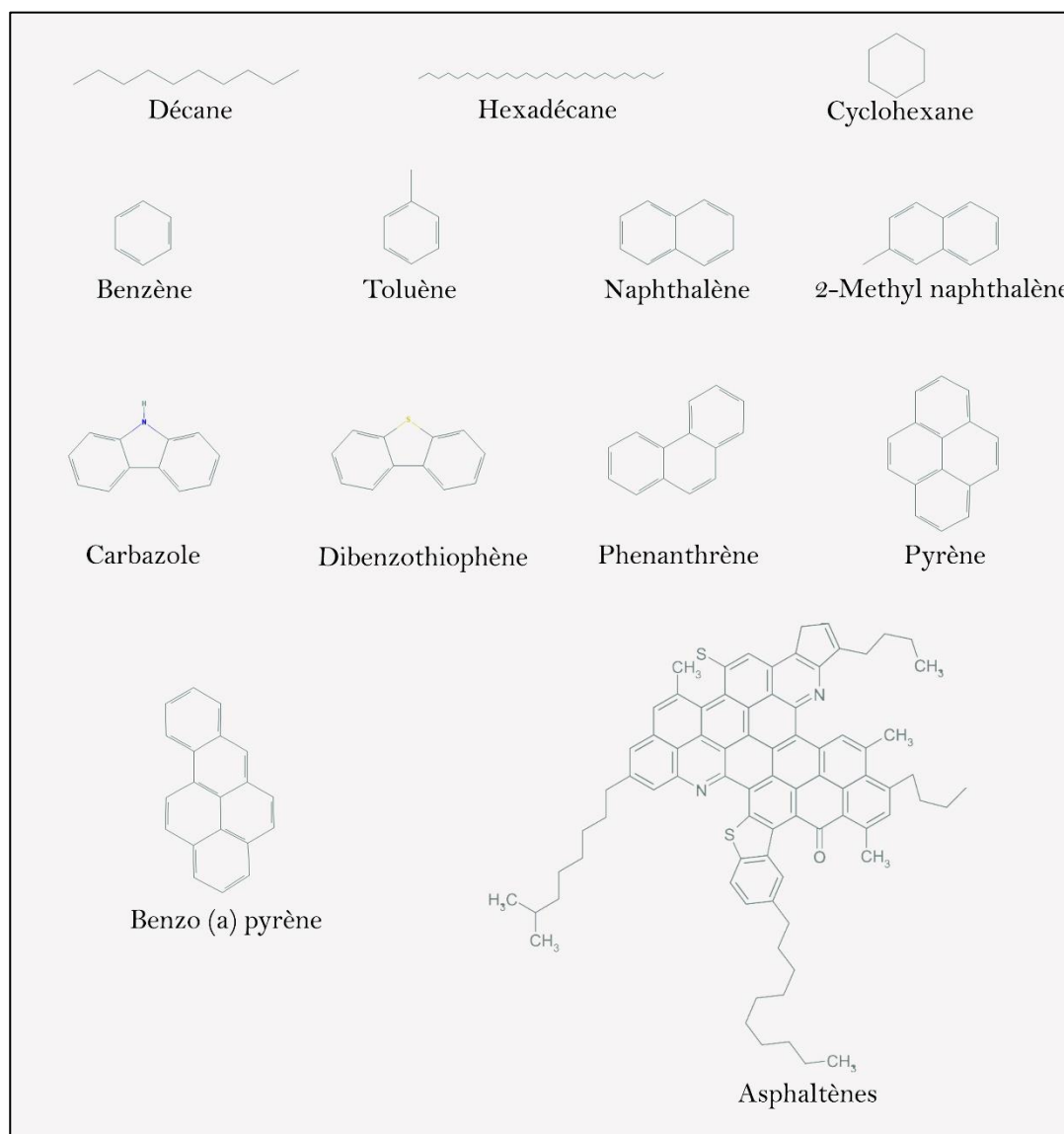


Figure 2. Illustration structurale de certains composés hydrocarbonés retrouvés dans les pétroles bruts.

Les sables bitumineux sont classés comme gisement d'hydrocarbures de type non classiques ou non-conventionnel, c'est-à-dire qu'ils nécessitent des technologies et techniques d'exploitation d'avantages complexes, risquées et onéreuses. Les caractéristiques d'un pétrole sont reliées directement à son gisement et les bruts résultants de l'exploitation des sables bitumineux possèdent donc des caractéristiques qui les distinguent de leurs cousins

classiques. Le terme sable bitumineux est un terme générique utilisé pour décrire ces gisements composés d'un mélange d'argile, de sable, d'eau et de bitume. Ce bitume tant convoité est composé d'hydrocarbures déjà fortement biodégradés par les microorganismes indigènes présents au niveau du réservoir. Il en résulte donc une très faible proportion d'hydrocarbures de poids moléculaires faibles (sensibles à la biodégradation) couplée à une forte proportion d'hydrocarbures de poids moléculaires élevés (résistants à la biodégradation) (Alsaadi et al., 2017; Crosby et al., 2013; Dupuis et al., 2015; King et al., 2014). Comparativement aux pétroles classiques, les bitumes albertains comportent d'avantages de résines et d'asphaltènes (hydrocarbures lourds) et moins d'aromatiques et de saturés (hydrocarbures légers). Cette composition affecte directement la viscosité et la densité des bitumes les rendant très visqueux, semblable à de la mélasse autour de 20°C, et rend obligatoire leur dilution avant leur transport (Tableau 1). Cette étape de « mise à niveau » (upgrading en anglais) est le processus par lequel les bitumes (ou autres pétroles lourds) sont convertis en pétroles bruts légers en favorisant leur rapport d'hydrogène sur carbone (H/C). Les diluants employés sont généralement composés d'hydrocarbures de poids moléculaire faible, comme les condensats de gaz (H/C=4/1), tandis que leur composition exacte demeure inconnue et variable selon les saisons (Alsaadi et al., 2017; Crosby et al., 2013; Dupuis et al., 2015; King et al., 2014). Le produit obtenu est donc un bitume dilué ou « dilbit » à hauteur de 70:30 (bitume:diluant) possédant une densité et une viscosité diminuées permettant leur transport. L'exploitation des sables bitumineux est encore relativement onéreuse et nécessite un prix du baril assez élevé pour justifier son exploitation. Bien que les technologies aient progressé, diminuant les coûts de production, ces types de pétroles sont relativement nouveaux sur le marché. De par leur densité et viscosité particulière, le comportement de ces pétroles lors d'un déversement est encore incertain. Leur densité est supérieure à celle de l'eau douce, mais légèrement inférieure à celle de l'eau de mer, ne permettant pas de statuer précisément sur leur devenir lors d'un déversement en milieu marin. D'autant plus que les paramètres abiotiques du lieu de déversement influencent grandement le comportement du pétrole déversé. La température, la matière organique en suspension, les courants ou encore la présence de glace à la surface sont plusieurs facteurs qui pourraient influencer la densité

du pétrole et ainsi jouer sur son potentiel maintient en surface, entre deux eaux ou sa descente vers le fond (Atlas et al., 1978; Brandvik et al., 2009; Hannam et al., 2010; Yang et al., 2015, 2009).

Tableau 1. Résumé de la composition chimique des pétroles bruts testés : Heidrun (classique), Cold Lake Blend et Access Western Blend (bitumes dilués). Issue de Crude Monitor (2018).

	Heidrun	Cold Lake Blend (CLB)	Access Western Blend (AWB)
Origine	Mer du Nord	Alberta	Alberta
Degree API	25.0°	20.9°	21.7°
Densité à 15°C (g mL <sup>-1</sup> )	0.8833	0.9249	0.9253
Densité à 0°C (g mL <sup>-1</sup> )	0.8942	0.9376	0.9399
Viscosité à 0°C (cP)	35	803	1300
Nickel (ppm)	2.5	65	73
Vanadium (ppm)	12	168	192
Hydrocarbures saturés	55	45	38
Hydrocarbures aromatiques	35	30	30

## Système hydrographique du Saint-Laurent

Le Saint-Laurent demeure un écosystème biologique clef possédant une biodiversité inestimable caractérisé par la transition entre le milieu terrestre et marin (Archambault et al., 2010). Cette richesse écologique permet d'ailleurs de soutenir plusieurs secteurs économiques comme la pêche, l'aquaculture ou le tourisme, entraînant des retombées monétaires considérables. Elle profite également à revitaliser l'économie rurale d'une multitude de ville et village qui repose bien souvent sur le Saint-Laurent comme source majeure de revenu. L'industrie touristique canadienne et québécoise dépend fortement de ses ressources naturelles, l'immensité et la diversité de sa nature sont une véritable image de marque promulguée à l'international. Selon un rapport du Ministère québécois du Tourisme, le tourisme est considéré comme un secteur économique d'importance engendrant des

retombées économiques de 12,4 milliards \$CAN en 2011. Il est d'ailleurs noté qu'il y un intérêt croissant des touristes pour des activités respectueuses de l'environnement effectuées dans un cadre de pérennité des écosystèmes, de sensibilisation, d'éducation et de recherche scientifique. Les principales menaces de l'industrie touristique reliée au Saint-Laurent étaient reliées à la fragilité et vulnérabilité du territoire, des berges, des écosystèmes et des paysages qui le compose. Un conflit d'usage est à prévoir entre un transport maritime en croissance et un nombre de touristes grandissant (Ministère du Tourisme du Québec, 2014). Le secteur des pêcheries retire également énormément des ressources biologiques disponibles grâce au Saint-Laurent. En 2016, la valeur totale des débarquements de la pêche commerciale (côte atlantique) était légèrement inférieure à 3 milliards de \$CAN (Statistiques Canada, 2016). Le domaine aquacole, principalement la conchyliculture représentait des retombées économiques en 2015 d'une valeur totale de plus de 90 millions \$CAN. Cette production était constituée à 64% de moule bleue (*Mytilus edulis*) et se trouvait polarisée majoritairement dans l'est du Canada (Statistiques Canada, 2015). L'écosystème du Saint-Laurent, et les espèces biologiques qui le composent représentent un environnement fortement dynamique avec une saison estivale très productive opposée à une saison hivernale rude. Les conditions environnementales retrouvées en hiver engendrent des températures fortement négatives et une couverture de glace importante durant plusieurs mois par années (Figure 3). Ces conditions hivernales imposent d'ailleurs aux organismes un stress énergétique conséquent qui influence leur vulnérabilité face à d'éventuelles perturbations tant environnementales qu'anthropiques. Dans un contexte d'augmentation du transit pétrolier au niveau de la voie navigable du Saint-Laurent, des conflits d'intérêts seront à prévoir sans oublier l'éventualité d'un déversement qui aurait un impact direct sur les communautés biologiques présentes et les secteurs économiques qui en dépendent.



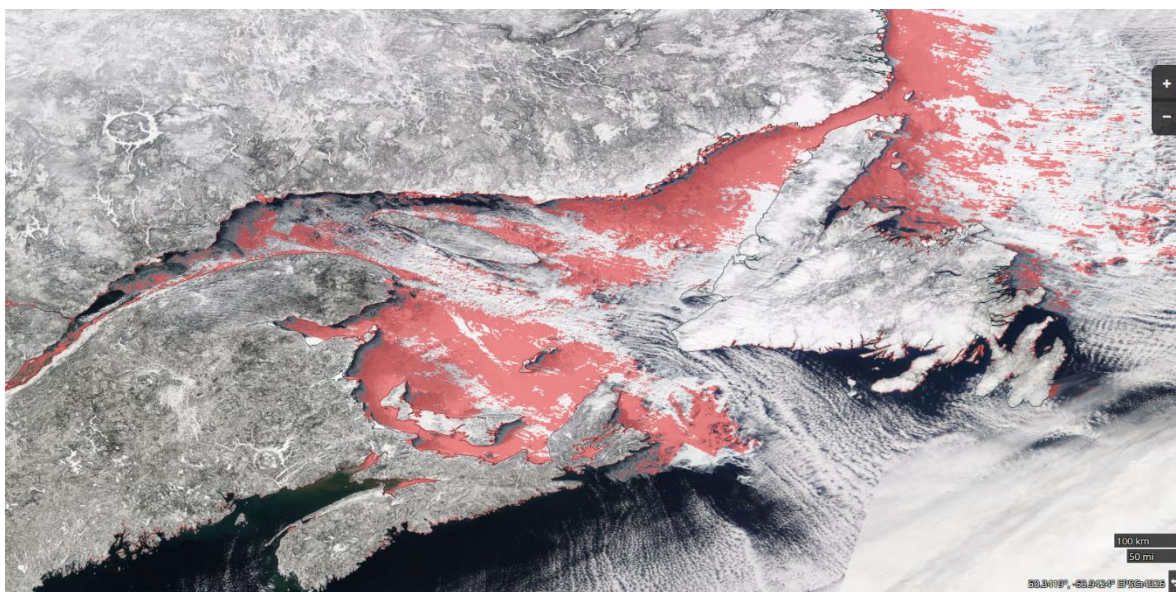


Figure 3. Estimation (en rouge) de la couverture de glace hivernale dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent. Image issue de National Aeronautics and Space Administration (2018).

### **Déversement pétrolier et risques environnementaux**

Les gisements pétroliers étant souvent très localisés, l'expansion de l'industrie et l'ouverture vers les marchés internationaux nécessitent inévitablement des moyens d'acheminement efficaces, pouvant assurer un approvisionnement en continu de grandes quantités d'hydrocarbures. Différents moyens de transport existent et seront adaptés à des contextes particuliers : le transport par camion, le transport ferroviaire, le transport maritime et les oléoducs. De manière générale les transports par camion sont réservés aux transports ponctuels sur de courtes distances tandis que les autres types seront réservés aux transports de grandes quantités sur de longues distances. Le transport par oléoducs est généralement privilégié par l'industrie puisqu'il est moins coûteux et risqué que le transport ferroviaire ou maritime (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018). Cependant, il se limite à un transport terrestre ce qui n'est pas toujours adapté pour atteindre certains marchés internationaux. Dans l'ensemble des cas, des risques de déversements sont associés à l'ensemble des activités entourant le transport de produits pétroliers. Les pétroles bruts sont

composés d'une grande diversité de molécules, elles ne possèdent cependant pas toutes un potentiel de toxicité. Pour entraîner un effet toxique, elles doivent premièrement être biodisponibles puis assimilées par les organismes vivants. Les classes des saturés et aromatiques sont généralement de taille et poids moléculaire inférieur aux résines et asphaltènes et pourront plus aisément franchir les barrières de protection biologique des organismes. Plus précisément dans la classe des aromatiques, ce sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) qui ont majoritairement été associés à des effets toxiques sur les organismes vivants. Ces derniers posent un risque important pour les écosystèmes marins puisqu'ils sont persistants, bioaccumulables et toxiques. La présence et l'accumulation des HAPs a bien été documentée chez les organismes marins en plus d'être associées à une multitude d'effets toxiques tant chez les mammifères, oiseaux, poissons et invertébrés (Balcioglu, 2016; Franci et al., 2014; Jackson, 2017; Matkin et al., 2008; Mearns et al., 2017; Nikolaou et al., 2009.; Penela-Arenaz et al., 2009.; Taylor et al., 2007; Wolska, 2011). Par le passé plusieurs déversements pétroliers en milieu marin ont engendré des catastrophes écologiques et environnementales conséquentes. Plusieurs études scientifiques ont d'ailleurs effectué des suivies post-déversement de ces catastrophes majeures comme l'Exxon Valdez en 1989 (Harwell et Gentile, 2006; Peterson et al., 2003), l'Érika en 1999 (Geffard et Budzinski, 2004), le Prestige en 2002 (Baussant et al., 2011; Labarta et al., 2005; Penela-Arenaz et al., 2009; Peteiro et al., 2006) ou encore Deep Water Horizon en 2010 (Beyer et al., 2016, 2017, Vignier et al., 2015, 2016). Plusieurs constats alarmants ont d'ailleurs été émis quant aux effets néfastes de ces déversements de pétrole de type classique sur les écosystèmes touchés. À l'opposé de ces connaissances scientifiques approfondies sur ces pétroles bruts et leurs effets toxiques, les bitumes dilués provenant de l'Alberta n'ont été que très peu étudiés principalement à leur nouveauté sur le marché. À ce jour, seul un déversement d'importance s'est produit aux États-Unis au niveau de la rivière Kalamazoo (Philibert et al., 2016). Possédant une densité supérieure à l'eau douce, le pétrole brut déversé a donc tapissé la totalité des sédiments tout en s'écoulant dans la rivière. Leur comportement en cas de déversement ainsi que leurs effets toxiques sur les individus et écosystèmes demeurent encore largement inconnus (Alsaadi et al., 2017). Seulement

quelques études (6 articles publiés à ce jour) se sont penchées sur le sujet de leur toxicité et presque exclusivement sur des espèces d'eau douce (une seule étude sur une espèce marine tempérée, *Americamysis bahia*) ou un stade de vie en eau douce d'espèce anadrome (ex. : saumon). La majorité de ces six articles ont été réalisés sur les stades de vie embryonnaires ou juvéniles et sur une courte période d'échantillonnage inférieure à un mois (Alderman et al., 2017; Alderman et al., 2017; Barron et al., 2018; Colavecchia et al., 2004; Madison et al., 2015; Philibert et al., 2016). Des effets toxiques néfastes au niveau de la reproduction et des embryons ont été remarqués incluant des malformations (Barron et al., 2018), une plus forte activité des gènes associés à la détoxification et à la réponse au stress oxydatif (Madison et al., 2015), une modulation des protéines associées aux réponses immunitaires et inflammatoires (Alderman et al., 2017; Alderman et al., 2017) ainsi qu'une modification des capacités de nages et du comportement (Philibert et al., 2016).

### **Milieux tempérés v.s. milieux froids**

Les conséquences d'un déversement en milieu tempéré sont relativement bien documentées à l'inverse des milieux froids, subarctiques et arctiques. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs effectué le même constat concernant le manque criant de connaissance écotoxicologique en milieu froid (Brandvik et al., 2009; Camus et Olsen, 2008; Chapman et Riddle, 2003, 2005; Fingas et Hollebone, 2003; Hannam et al., 2010; Jörundsdóttir et al., 2014). Ces milieux sont davantage sensibles et moins résilients aux perturbations que les milieux tempérés étant donné les conditions extrêmes imposées par les faibles températures (Chapman et al., 2005, 2003, Yang et al., 2015, 2009). En plus d'influencer la résilience des communautés, les températures froides, particulièrement sous couvert de glace, jouent un rôle sur les caractéristiques physiques et chimiques du pétrole comme sa viscosité, son évaporation, sa dilution ou sa dégradation (Atlas et al., 1978; Brandvik et al., 2009; Faksness et Brandvik, 2008; Hannam et al., 2010; King et al., 2014; Yang et al., 2009). La présence de glace impose des caractéristiques nouvelles et une matrice supplémentaire à celle de l'eau et des sédiments pouvant interférer avec le comportement du pétrole (Faksness et al., 2011;

Yang et al., 2009). La couverture de glace peut également influencer l'évaporation des composants volatiles (Brandvik et al., 2009; Faksness et al., 2008; Yang et al., 2015) ainsi que le déplacement et la dérive des nappes (Atlas et al., 1978; Faksness et al., 2011) (Figure 4).

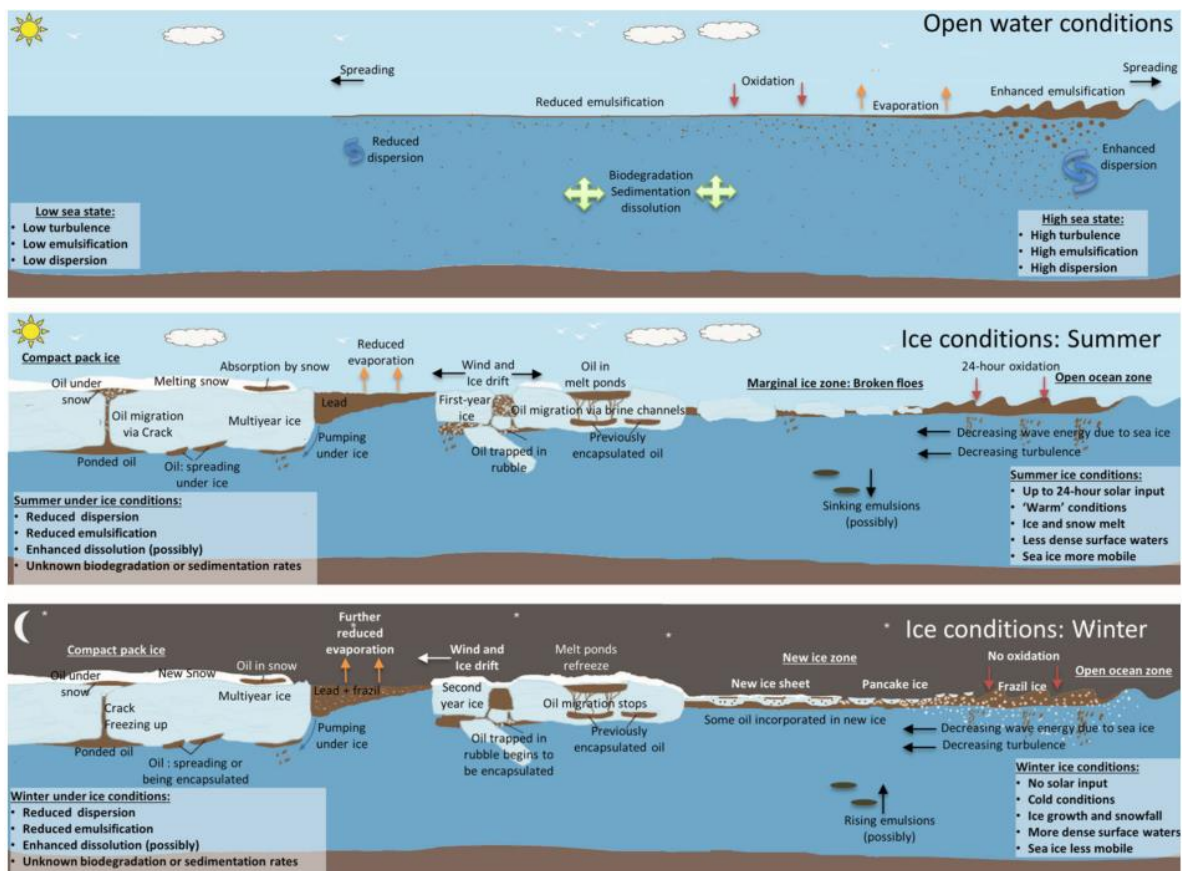


Figure 4. Illustration du potentiel d'interaction engendré par la présence de glace en comparaison à un déversement sans présence de glace. Issue de Wilkinson et al., (2017).

### **Espèce sentinelle : la moule bleue**

La moule bleue est un organisme amplement utilisé lors d'études écotoxicologiques et de suivi de contaminants (ex. : Mussel watch program) (Goldberg et al., 1978). Cette espèce possède des traits fonctionnels lui permettant d'être qualifié d'espèce sentinelle de son milieu (Beyer et al., 2017). Leur capacité à filtrer d'important volume d'eau engendre une bioaccumulation de contaminants au niveau tissulaire et offre un proxy adéquat sur l'amplitude de contamination d'un milieu. Leur mode de vie sessile, leur taille adulte ainsi que leur résistance permettent de les employer aisément tant en suivi in situ qu'en laboratoire (Beyer et al., 2017; Costa et al., 2013; Kasiotis et Emmanouil, 2015).

Au point de vue écologique dans le contexte du Saint-Laurent en hiver, la moule bleue subit un stress nutritionnel lié à la faible concentration en phytoplancton. Ce qui entraîne une diminution de son taux de respiration et de filtration pour maintenir exclusivement son métabolisme basal ce qui influence à la baisse (jusqu'à 10 fois à 0°C) sont taux d'épuration (Cusson et al., 2005; Hatcher et al., 1997; Pernet et al., 2007). Bien que les températures négatives influencent à la baisse le taux de filtration, les individus maintiennent tout de même une activité de filtration sous zéro degré (figure 5). Dans le cas d'un déversement de pétrole hivernal avec température négative, si des moules bleues se retrouvent à proximité, il est donc juste d'assumer que ces dernières filtreront activement et pourront donc être exposées à la fraction dissoute provenant du pétrole.

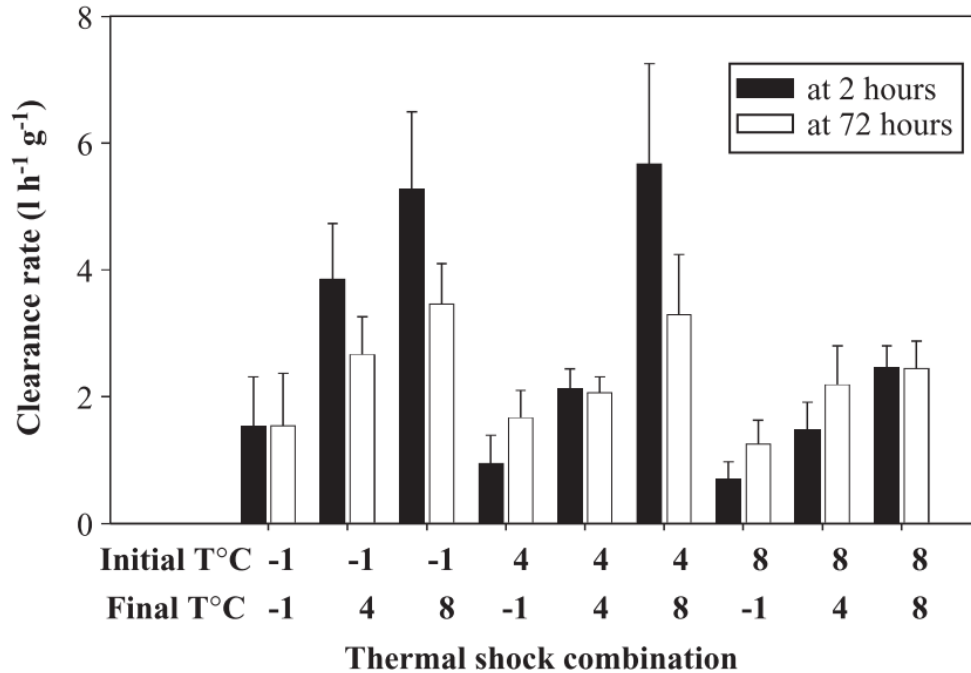


Figure 5. Variation du taux de filtration ( $\text{L h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) après 2h et 72h suivant un choc thermique en relation avec la température d'acclimatation et de transfert. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (S.E.). Adapté de Cusson et al., (2005).

Préalablement à la période hivernale, les individus adultes accumulent un maximum de réserve énergétique durant l'été et l'automne pour soutenir leurs besoins de base ainsi que la gamétogénèse durant l'hiver (Lemaire et al., 2006). Étant donné la longueur de la période hivernale, l'accumulation de réserve au préalable est nécessaire pour pouvoir survivre à l'hiver en plus d'entrer en période de reproduction, avec des gamètes mûrs, immédiatement lors de l'arrivée du printemps (Maloy et al., 2003). Au début de l'été, il sera donc possible d'observer une majorité d'individus, tant mâle que femelle, à des stades gamétiques avancés (mûre pour les mâles et post-vitelogenic pour les femelles) ou même déjà en ponte (figure 6).



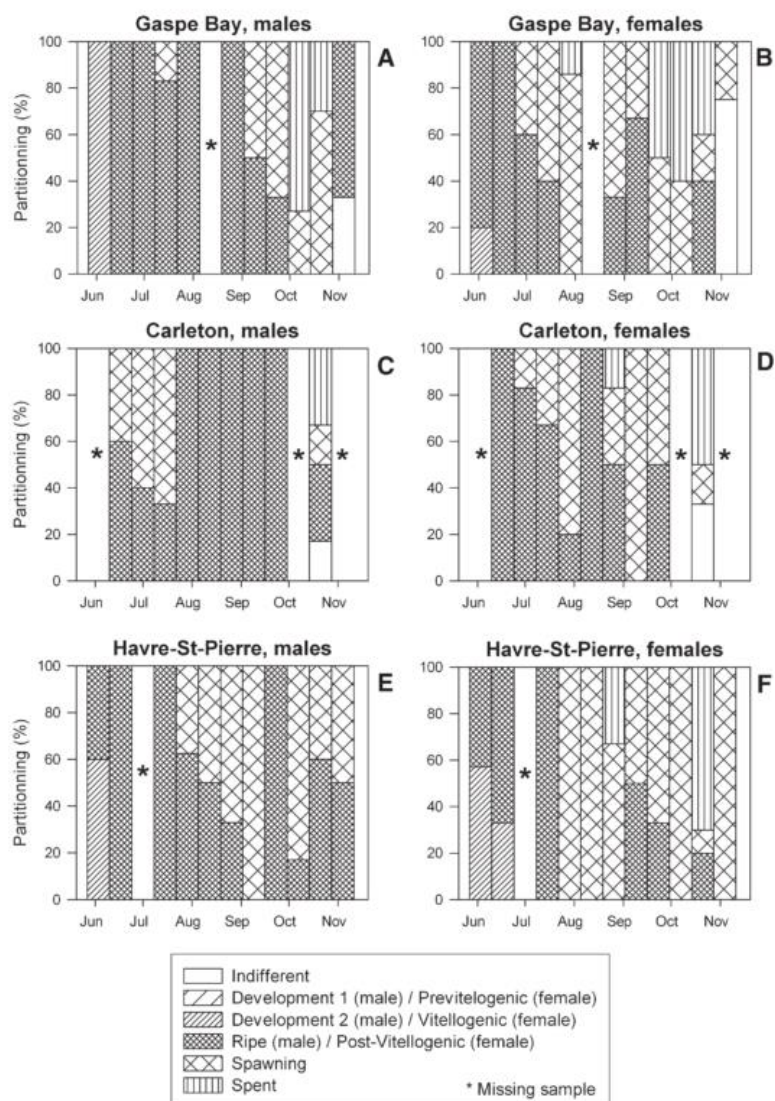


Figure 6. Proportion de mâles (A, C et E) et femelle (B, D et F) de *Mytilus* spp. à différents stades de leur cycle reproductif de juin à novembre 2003. Adapté de Lemaire et al., (2006).

Étant donné les caractéristiques environnementales imposées aux pétroles ainsi que le contexte physiologique des moules, dans le cas d'un déversement hivernal, les processus de bioaccumulation seront assurément influencés. Cette étape déterminante influencera inévitablement la suite de l'étude puisque selon le niveau d'exposition aux hydrocarbures associés aux pétroles testés, l'ampleur des conséquences biologiques pourra fortement varier.

Dans différents contextes, la toxicité d'hydrocarbures d'intérêts pour la moule bleue a déjà été démontrée. Une multitude d'effets toxiques ont été recensés en lien avec une exposition et/ou accumulation d'HAPs chez les bivalves comme : un stress oxydatif (Beyer et al., 2017; Hannam et al., 2010), perturbation au niveau endocrinien (Baussant et al., 2011; Frouin et al., 2007; Ortiz-Zarragoitia et Cajaraville, 2006), immunosuppression (Camus et al., 2003; Frouin et al., 2007; Hannam et al., 2010; Hwang et al., 2008; Jeong et Cho, 2005; Kang et al., 2014; Karac et al., 2009; Martins et al., 2005; Widdows et al., 1982), altération des processus bioénergétiques (González-Fernández et al., 2016; Karac et al., 2009; Kim et al., 2007; McDowell et al., 1999; Peteiro et al., 2006; Redmond et al., 2016; Sureda et al., 2011; Toro et al., 2003; Widdows et al., 1997, 1985, 1982), génotoxicité et cytotoxicité (Axiak et George, 1987; Baussant et al., 2009; Camus et al., 2003; Kim et al., 2007; Pérez-Cadahia et al., 2004; Stainken, 1977) ainsi que des pathologies et lésions des organes et tissus (Aarab et al., 2011; Berthou et al., 1987; Ruiz et al., 2011). Des effets néfastes sur la reproduction ont également été relevés comme l'altération des gonades (Aarab et al., 2011; Baussant et al., 2011; Berthou et al., 1987; González-Fernández, Lacroix, et al., 2016; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011, 2006; Ruiz et al., 2011), une diminution du succès reproducteur (Vignier et al., 2017) ou encore sur le métabolisme, le développement ou la survie des larves (Geffard, 2003; Labarta et al., 2005; Pelletier et al., 2000; Toro et al., 2003; Vignier et al., 2015, 2016, 2017). Un transfert maternel associé à des effets toxiques transgénérationnels a également été observé chez des larves pélagiques provenant de bivalves benthiques (*Mulinia lateralis*) exposés à des sédiments contaminés (Pelletier et al., 2000, 1997). Pour déceler ce genre de perturbation, certains biomarqueurs permettent d'évaluer les conséquences sous-létales d'un déversement à différents niveaux physiologiques (cellulaire, biochimique et moléculaire). Plus précisément, ils permettent de quantifier la portion d'hydrocarbures accumulés en plus de mesurer l'ampleur de la réponse biologique (Kasiotis et al., 2015). La sélection des biomarqueurs a été pensée pour assurer une évaluation adéquate de la réponse sur le court et long terme et ainsi obtenir un suivi allant d'un ralentissement physiologique hivernal jusqu'au conditionnement physiologique pré-ponte printanier en plus de s'attarder à la qualité de cette dernière. Le budget énergétique par la méthode du potentiel de croissance, l'indice



de stabilité lysosomale, la qualité des filaments de byssus, le stade gamétogénique ainsi que la qualité des larves émises par des géniteurs exposés seront étudiés.

### **Raison d'être du projet**

Cette étude se veut une collaboration entre des chercheurs de l'Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER) et le Groupe National Consultatif sur les Contaminants (GNCC) chapeauté par le Ministère des Pêches et Océans Canada (MPO). Ce projet a été sélectionné à la suite d'un appel de candidatures du MPO pour obtenir des connaissances scientifiques solides et approfondies quant aux devenir d'un déversement de pétrole classique ou non classique en milieu marin en conditions hivernales avec un couvert de glace. Cette demande découle directement d'un constat généralisé quant au manque criant de connaissances scientifiques robustes portant sur (1) le comportement de pétroles (tant classiques que non classiques) dans un contexte de déversement en milieu marin en conditions hivernales avec couvert de glace et (2) sur la toxicité des pétroles non classiques (bitume dilué) provenant de l'Alberta. Ce projet s'insère parfaitement dans le contexte économique canadien actuel, qui voit un désir d'expansion de l'industrie pétrolière pour acheminer le pétrole brut canadien vers les marchés internationaux. Nécessitant inévitablement (1) l'augmentation du transport de pétroles bruts non classiques (bitume dilué) ainsi que (2) l'expansion de voies d'exportation maritime reliant les marchés internationaux. Les directeurs de recherche rattachés au projet, Richard St-Louis et Réjean Tremblay, apportent respectivement leur expertise concernant la dimension écotoxicologique et chimique ainsi que biologique et mytilicole rattachée au maintien et à la physiologie de la moule bleue et de sa progéniture.

## **Objectifs**

L'objectif général est d'étudier les effets sous-létaux sur la moule bleue d'une exposition chronique (7 jours) à trois types de pétroles (classiques et bitumes dilués) en condition hivernale avec couvert de glace. Plus précisément il s'agit de (1) mesurer l'accumulation tissulaire d'hydrocarbures d'intérêts (HAPs), (2) mesurer l'impact de cette exposition sur la survie, la physiologie ainsi que la résilience des moules adultes et (3) mesurer l'effet sur la qualité de leur reproduction et des larves produites.

## **Hypothèses**

Bien que la demande énergétique de la moule bleue diminue en hiver, cette dernière maintient tout de même un taux de filtration minimal pour couvrir ses besoins métaboliques. Ce taux de filtration serait suffisant pour accumuler différents hydrocarbures possédant un potentiel de toxicité et retrouvé dans la fraction dissoute provenant des trois pétroles auxquels les moules seront exposées. Nous testerons l'hypothèse qu'en condition hivernale, l'exposition et l'accumulation d'hydrocarbures provenant de la fraction dissoute entraîneront une perturbation de l'équilibre énergétique et physiologique mesuré au niveau biochimique, cellulaire et physiologique jusqu'à nuire à la reproduction et la qualité des larves produites une fois le printemps arrivé.

**CHAPITRE 1**

**EFFETS SOUS-LETAUX SUR LA MOULE BLEUE (*MYTILUS EDULIS*) ET SA  
PROGENITURE D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE A TROIS PETROLES  
(CLASSIQUES ET BITUMES DILUES) EN CONDITION HIVERNALE AVEC  
COUVERT DE GLACE : PRECISIONS SUR LA METHODOLOGIE  
APPLIQUEE A L'USAGE DE PETROLES BRUTS**

**1.1 METHODOLOGIE GENERALE RATTACHEE AU PROJET ET L'USAGE DE PETROLES  
BRUTS EN CONDITION HIVERNALE AVEC COUVERT DE GLACE**

Pour reproduire le plus fidèlement possible un déversement de pétrole hivernal, sans toutefois contaminer directement le milieu naturel, le choix d'effectuer les expositions en mésocosme de 3 500 litres a été fait. Ce type de réservoir contenant un volume d'eau important permet de maintenir aisément une grande quantité d'individus vivants. Sa forme allongée (hauteur de 3,5 mètres) permet adéquatement de suspendre les boudins, d'allouer un volume suffisant d'eau salée pour maintenir les individus vivants tout en assurant l'apparition d'un couvert de glace de dimensions importantes (figure 7).

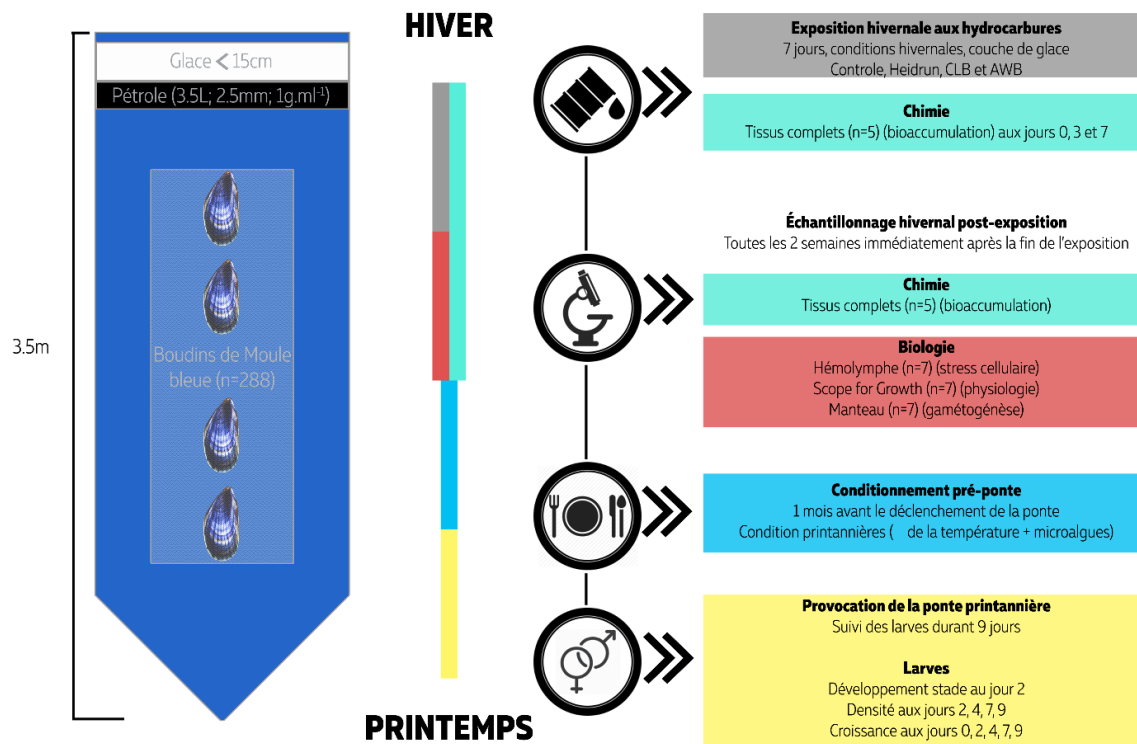


Figure 7. Illustration du schéma expérimental avec récapitulatif de l'ensemble des analyses et échantillonnages effectués.

## 1.2 DEROULEMENT DE L'EXPOSITION

Préalablement au début de l'exposition des différents traitements, l'eau provenant de l'estuaire était directement pompée dans le mésocosme. Un tuyau en PVC (diamètre : ~30cm, longueur : ~60cm), était suspendu au centre du bassin et immergé à mi-hauteur. Ce dernier permettait de conserver une voie d'accès par la surface (usage de sondes, échantillonnages des moules, etc.) tandis que le couvert de glace s'épaississait en pourtour. De l'air sous pression était injecté au travers d'une roche poreuse située au fond du bassin pour assurer en saturation adéquate en oxygène dissoute mais également pour permettre un brassage de la colonne d'eau. Après quelques jours d'attentes et l'effet des conditions environnementales, la présence d'un couvert de glace conséquent signifiait le début de l'exposition. Les moules disposées au nombre de 16 par boudin pour un total de 288 individus étaient premièrement

insérées au travers de la glace puis suspendues dans la colonne d'eau. Une fois les moules en place, le pétrole était injecté sous la glace à l'aide d'une pompe péristaltique. Étant donné l'effet de la température sur la viscosité des pétroles, le maintien des pétroles en bain-marie a assuré leur injection dans des délais raisonnables. Pour efficacement mesurer l'effet toxique de la fraction dissoute, l'ensemble des manipulations reliées à l'exposition ont été méticuleusement réalisées afin d'éviter tous contacts directs entre le pétrole et les moules. Une fois l'exposition débutée, les conditions abiotiques du mésocosme (conductivité, oxygène dissous, température, profondeur) étaient suivies tous les jours à l'aide d'une sonde multiparamétrique (EXO2, YSI) tandis que des moules furent échantillonnées après 72h pour suivre la bioaccumulation des hydrocarbures durant l'exposition (figure 8).



Figure 8. Photo du mésocosme expérimental permettant de recréer un déversement pétrolier en conditions environnementales hivernales avec une couverture de glace.

### 1.3 POST EXPOSITION

Après les sept jours d'exposition, les individus étaient extraits du mésocosme puis transférés dans un mésocosme intérieur propre en s'assurant d'utiliser de nouveaux boudins pour limiter tout transfert d'hydrocarbures. De premiers individus étaient aléatoirement sélectionnés pour effectuer la première batterie d'échantillonnages et d'analyses (mortalité, bioaccumulation, respirométrie, taux de filtration, assimilation de la nourriture, stress cellulaire, gamétogénèse, byssus) qui serait par la suite répétée toutes les deux semaines. Il était ensuite nécessaire de nettoyer le mésocosme extérieur préalablement aux expositions subséquentes. De l'eau chaude sous pression ainsi que des savons et dégraissants spécifiques aux hydrocarbures étaient employés avec l'usage de laine d'acier pour déloger les résidus. L'ensemble de la glace et de l'eau souillée furent conservées sécuritairement puis filtrées sur charbon activé en suivant par fluorescence la concentration en hydrocarbures (Sonde Cyclops 7 équipé du capteur « O » spécialisé pour la détection de pétrole brut, Turner Design, USA). Une fois propre, le mésocosme était de nouveau rempli avec de l'eau non contaminée et un profil vertical de fluorescence des hydrocarbures dans la colonne d'eau était effectué pour s'assurer de l'absence d'hydrocarbure avant de commencer les expositions suivantes.

## **CHAPITRE 2**

### **ICE COVER CRUDE OIL SPILL (CONVENTIONAL CRUDE AND DILUTED BITUMEN) CONSEQUENCES ON PHYSIOLOGICAL RESILIENCE OF BLUE MUSSEL AND THEIR OFFSPRING'S.**

#### **2.1 INTRODUCTION**

Worldwide oil demand is still on the rise due to increased need from international markets, mainly developing countries, promoting exploration of new oil deposit and the use of novel extraction technology (Brandvik et al., 2009; De Castro et al., 2009; Tsoskounoglou et al., 2008). Bitumen find in Athabasca, mainly know as tar sand, represent the biggest unconventional oil field in the world. This immense deposit place Canada as the third world largest proved oil reserve behind Saudi Arabia and Venezuela. (Crosby et al., 2013; Dupuis et al., 2015; King et al., 2014). Bitumen extraction is expensive and was not considered lucrative in the past, but with the high international demand, the barrel price and emerging cost-effective extraction methods, commercial exploitation became viable. Oil sand deposit represents highly biodegraded hydrocarbons from indigenous oil-degrading microorganisms. Low weight hydrocarbons being more sensitive to biodegradation, bitumen crudes contain greater proportion of high weight hydrocarbons, such as resins and asphaltenes (Alsaadi et al., 2017; Crosby et al., 2013). Density and viscosity are therefore directly affected and dilution is mandatory prior to pipeline transit (Alsaadi et al., 2017; Dupuis et al., 2015; King et al., 2015). The diluents used are mainly composed of light molecular weight hydrocarbons mixed with the bitumen resulting in a diluted bitumen “dilbit”, a flowing petroleum mixture. Exact diluent’s chemical composition is kept secret by oil companies but is known to be variable depending on availability of diluents and season (King et al., 2014). Gaz condensate are often used to obtain dilbit in proportion of 30% diluent and 70% bitumen (Alsaadi et al.,



2017; Crosby et al., 2013; Dupuis et al., 2015). With potential oil sand industries expansion from 1.9 million barrels produced per day in 2009 to a planned 4.2 million barrel per day in 2035 (Crosby et al., 2013), increasing oil tankers exportation is expected (King et al., 2014, 2015). The St-Lawrence hydrographic system, with its strategical location and harbors infrastructures, is considered as an optimal gateway to supply international markets. This subarctic cold marine environment is dominated by harsh winter conditions including low temperature and an important ice cover and is also an important biological hotspot (Archambault et al., 2010) supporting major economic sector as tourism, fisheries and aquaculture. Canadian shellfish aquaculture generates important economic gain with 90 million CAN\$ in 2015 depending mostly on mussel farming of *Mytilus edulis*, which account for 64% of whole Canadian shellfish production (Statistiques Canada, 2015). Compared to temperate ecosystems, cold environment and their species have been less widely addressed by ecotoxicity studies (Brandvik et al., 2009; Camus et al., 2008; Chapman et al., 2003, 2005; Fingas et al., 2003; Gerdes et al., 2005; Hannam et al., 2010; Jörundsdóttir et al., 2014). However, those ecosystems are generally considered more sensitive and less resilient than temperate ones, mainly due to the harsh environmental conditions induced by low temperatures, when facing contaminant stress (Chapman et al., 2003, 2005, Yang et al., 2015, 2009). Furthermore, low temperatures coupled with important ice coverage will impact physical and chemical properties like viscosity, density, evaporation, dilution or degradation of spilled oil (Atlas et al., 1978; Brandvik et al., 2009; Faksness et al., 2008; Hannam et al., 2010; Yang et al., 2015, 2009). A complete ice cover can physically separate seawater from atmosphere and potentially affect the first stages of oil weathering like evaporation of low molecular weight hydrocarbons (Brandvik et al., 2009; Faksness et al., 2011, 2008, Yang et al., 2015, 2009) or even slick movement (Atlas et al., 1978; Faksness et al., 2011). Ecotoxicological studies on field or laboratory exposure rarely include the presence of ice and its potential incidence on bioavailability and toxicity on chemical contaminants tested.

Oil spill harmful consequences and toxicity of associated hydrocarbons have been widely addressed in the case of conventional crudes oil in contrast to emerging diluted bitumen mixtures. Presence and accumulation values of petroleum hydrocarbons of interests

like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), has been studied in marine environment and linked to various toxic effects amongst many living marine organisms (Balcioglu, 2016; Jackson, 2017; Mearns et al., 2009; Nikolaou et al., 2009; Taylor et al., 2007; Wolska, 2011) like mammals (Matkin et al., 2008), seabirds (Franci et al., 2014; Penela-Arenaz et al., 2009), fishes (Board, 2015; Langanen et al., 2017) and invertebrates (Kasiotis et al., 2015).

Opposed to that refine knowledge, diluted bitumen being newly used by oil industries, their environmental fate and effects are largely unknown (Alsaadi et al., 2017). In addition to their physical behaviour and chemical proprieties weathering just starting to be studied (Hua et al., 2018; King et al., 2015; Lee et al., 2015; Yang et al., 2015, 2016). Only few publications cover the potential biological and ecological effects of toxic compounds associated with a dilbit oil spill. Most toxic assessment studies used freshwater species (Barron et al., 2018; Colavecchia et al., 2004; Madison et al., 2015; Philibert et al., 2016) or freshwater life stage of anadrome species (Alderman et al., 2017) with analysis lacking on adults/genitors, advanced life stages or in an longer sampling approach as also highlighted by Alsaadi et al., (2017). Additional knowledge is therefore needed in a more global and longer perspective to increase understanding on immediate direct effects of a diluted bitumen spill coupled with the delayed indirect effects on the environment and biologic communities. Even more, with expansion project planned in cold marine environment, spill consequences on cold marine ecosystem must be addressed quickly. Low molecular weight and volatile hydrocarbons composing diluted bitumen can experience fast weathering rate (King et al., 2014) inducing a rapid discharge of toxic compounds in the environment. Cold winter temperature will reduce evaporation capacity of lighter hydrocarbons while an important ice cover can potentially stop it. Therefore, sessile communities can be exposed, even for a reduced period, to highly complex, toxic and bioavailable petroleum hydrocarbons mixture.

Blue mussel use was motivated by its key role in the St-Lawrence marine ecosystem added to the fact that this specie exhibit adequate traits for ecotoxicological studies as being able to filter high volume of seawater resulting in efficient bioaccumulation and proxy for bioavailable contaminants. Their sessile nature, adult's size and robustness allow easy in situ

monitoring while being also suitable for laboratory exposure studies (Beyer et al., 2017; Costa et al., 2013; Kasiotis et al., 2015). Exposure to an oil spill and associated toxic compounds can be brief, depending on spilled volume and oil characteristic in addition to the biotic and abiotic environmental conditions. Brief oil exposure can still induce major physiological perturbation with immediate consequences coupled with delayed toxic effects several months later.

Our study had been divided into two axes, monitoring: (i) the direct effects of oil exposure and PAHs bioaccumulation on the physiological resilience of adult mussels during winter months followed by (ii) the indirect effects of oil exposure and PAHs bioaccumulation in mussels on reproduction processes and larvae produced. These effects have been measured on adult mussels exposed to conventional crude oil and two commercial dilbits. We tested the hypothesis that the three crudes oils affect largely the physiology of mussels during ice cover exposure reflecting some month later on decreased larval production, fitness and development.

## 2.2 METHODOLOGY

### 2.2.1 Experimental design

Cultivated commercial size (5-6 cm) mussels, *Mytilus edulis*, were sampled in St-Peter's Bay (Prince Edward Island, Canada), an area characterized by agriculture without urbanization with a small harbour. This area is known as the biggest production site in Canada and mussels were shipped in less than 24h on seawater ice until reception at the aquaculture facilities of Université du Québec à Rimouski (Pointes-aux-Pères, Québec, Canada). Transfer permits of Fisheries and Oceans Canada have been obtained for mussels and the study did not involve endangered or protected species. Mussel maintenance and oil exposure were conducted using 50µm (sand media) filtered seawater without food addition other than the particulate matter naturally present. Over 4 weeks acclimation period in flow thru condition in two 200L tanks (400 mussels per tank), exposures were realized in 3.5 m<sup>3</sup> closed system mesocosm situated outside to replicate the winter environmental condition. During exposure, mussels were disposed in vexar mesh bags (5 mm) and suspended in the water column (16 individuals per bag). At the end of exposure, mussels were transferred in new mesh bags and kept inside the facility in similar mesocosm as used for outside exposure, until the spring breeding season.

Three different oils were tested under their crude form without any alteration. One is considered a conventional oil from the North Sea, known as the Heidrun, and two are referred as unconventional oil, more precisely diluted bitumen: cold lake blend (CLB) and the access western blend (AWB), both originating from the Athabasca oil sand deposit in Alberta (Canada). Summary of the chemical characteristics and differences between crudes can be seen in table 2.

Table 2. Chemical summary of the three crude oils tested: Heidrun (classic), Cold Lake Blend and Access Western Blend (diluted bitumen). Adapted from Crude Monitor (2018).

	Heidrun	Cold Lake Blend (CLB)	Access Western Blend (AWB)
Origine	North Sea	Alberta	Alberta
Degree API	25.0°	20.9°	21.7°
Density at 15°C (g.mL <sup>-1</sup> )	0.8833	0.9249	0.9253
Density at 0°C (g.mL <sup>-1</sup> )	0.8942	0.9376	0.9399
Viscosity at 0°C (cP)	35	803	1300
Nickel (ppm)	2.5	65	73
Vanadium (ppm)	12	168	192
Saturated hydrocarbons	55	45	38
Aromatics hydrocarbons	35	30	30

### 2.2.2 Exposure

Technical particularities related to the experimental design didn't allow us to start all treatments at the same time. A unique mesocosm was available for winter exposure and therefore treatments were done in a consecutive manner, with cleaning between each exposure. However, all treatments exposures were completed in less than two months. To assure consistency and repeatability, a strict and extensive experimental protocol was respected, including diverse environmental and biomarker monitoring to obtain a clear overall biologic response. Abiotic conditions during exposure were also strictly monitored to assure comparability between each treatment (Table 3).

For each treatment (control, Heidrun, CLB and AWB), 288 adult size mussels were randomly selected and exposed during a 7-day period at winter condition including thick ice cover on the top of mesocosm. Sixteen mussels' bags were stabilized in the water column before injecting the crude oil under the ice with a peristaltic pump. Crude oils were added at the concentration of 1 g mL<sup>-1</sup> (around 3.5L, oil slick thickness of 2.5 mm) in the mesocosm. To prevent the formation of hypoxic or anoxic layer and to homogenous water column, air was injected in the tanks from the bottom during the whole exposure period. Samples of whole mussels' tissue (n = 7) were collected on the first day (t = 0d exp.), after three days (t

= 3d exp.) and on the last day (t = 7d exp.) to monitor the bioaccumulation of hydrocarbons. Every day, water parameters (dissolved oxygen, temperature, conductivity, depth) was characterized with a multiparameter probe (EXO 2, YSI) and dissolved hydrocarbons with a fluorescence probe (fluorometric sensor Cyclops 7, Turner Design, USA) equipped with sensor “O” specialized for crude oil detection with both an excitation wavelength of 325/120 nm and an emission wavelengths 410-600 nm. This sensor was coupled with an external unit, the DataBank (Turner Design, USA), recording high-frequency data allowing. The sensor and the external unit were calibrated before any sampling with a solution of 1,3,6,8-pyrene tetrasulfonic acid tetrasodium salt with a concentration of 100 ug L<sup>-1</sup> (Turner Design, USA), results are formulated in PTSA ug L<sup>-1</sup> equivalent. Water samples were collected at three depths (subsurface, middle and bottom), each day for dissolved hydrocarbons analysis (1L).

Table 3. Abiotic conditions during the 7-days exposure period for each treatment.

Starting date	Ending date	Exposure period	Treatment	Seawater temperature (mean; °C)	Salinity (mean; PSU)	Oxygen saturation (mean; %)
2016-01-29	2016-02-05	7-days	Control	-1.55	27.34	88.11
2016-02-09	2016-02-16	7-days	Heidrun	-2.1	29.14	94.84
2016-02-29	2016-03-07	7-days	CLB	-1.8	33.81	87.8
2016-03-22	2016-03-29	7-days	AWB	-1.35	29.78	86.88

### 2.2.3 Post-exposure sampling period

After exposure, mussels were transferred in clean mesh bags and maintained inside mesocosm maintained in flow through condition, until the beginning of spawning season in early spring. Mussels sampling (t = 0w post-exp.) started immediately after the 7-day exposure period and was repeated every two weeks (t = xw post-exp.). A sampling event consisted by measure of survival, followed by cellular (lysosomal membrane stability; neutral red assay), physiological (condition index, scope for growth, gonad histology) and biochemical (bioaccumulation of hydrocarbons) analyses on mussels. Nineteen individuals

were randomly selected and byssus threads from five mussels were randomly collected (n = 5). Five mussels were dedicated to monitor the bioaccumulation of hydrocarbons (n = 5), seven were used to analyze the condition index and the scope for growth (n = 7) and seven more were tested for the cellular stress and the gonad development (n = 7).

#### **2.2.4 Monitoring of bioaccumulation: extraction and analysis of hydrocarbons**

Whole mussel tissues were dehydrated and crushed and 300 mg of powder tissues were mixed with 5 g of tetramethylammonium hydroxide (TMAH, 25% water, Sigma Aldrich) in 12mL glass tube with teflon top. The mixture was then heat (60°C) for one hour with manual agitation every fifteen minutes to allow an appropriate alkaline digestion of the biological matrix. After cool down, 1mL of deionized water, 1 g of NaCl and 4mL of hexane:toluene mixture (1:1) were added before an agitation period of one hour (Wrist Action Shaker). The Mixture was then centrifuged (3000 RPM) allowing collection of the organic layer and repetition of the extraction with 4mL of hexane:toluene solution (1:1). The whole organic extract was then cleaned on silica columns topped with sodium sulfate before being evaporated with pressurized nitrogen at room temperature. A mixture of internal deuterated standard for polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic was added to the extract before being injected. Organic extracts were analyzed by gas chromatography (Trace GC, Thermo, USA) coupled with a mass spectrometer equipped with an ion trap (Polaris Q, USA). A capillary column (VB-5MS, 30mmx0.25mm i.d.; Valcobond) and high purity grade helium as carrier gas were used. Detection and quantification of hydrocarbons (aliphatic, monoaromatic alkylated, polycyclic aromatic relatives and methyl derivatives, heterocyclic aromatic carbazole and dibenzothiophenes and methyl derivatives) were done in scan mode including mass/charge ratio intervals of 50 to 500 amu with positive ions detection. Management of the instruments and both the acquisition and analysis were done on the Xcalibur software (1.3 version). Method blanks and analysis of certified samples (mussel tissue, organic contaminants) was completed. Relative standard error (n = 5) for the

quantitative analysis of thirteen PAHs, from the certified mixture, and two deuterated PAHs (added as hardening) varied between 5 and 20% (median= 11%). The median value for the recuperation ratio was equivalent to 82% (41-118%), results presented were not corrected.

### 2.2.5 Post-exposure adults' physiological monitoring: Condition index

Physiological conditions of mussels were determined on mussels used for scope for growth estimation. We used the condition index described by Bodoy et al., (1986) based upon the dry weight and the shell length cubed.

$$\text{Condition Index (CI)} = \frac{\text{Whole tissue dry weigh} \times 100}{\text{Shell length}^3}$$

Shell length was measured and tissues dry weight determined at 65°C for 72h (Baxter, Scientific Products, Canada).

### 2.2.6 Post-exposure adults' physiological monitoring: Scope for growth (SFG)

Scope for growth (SFG) is used as physiological energetic index of filter-feeding animals and was obtained by subtracting both energy respired and excreted from the energy assimilated from food and illustrates the mussels energy budget (Tremblay et al., 1998; Widdows and Johnson, 1988).

$$\text{Scope for growth (SFG)} = P = A - (R + U)$$

*P* = energy transformed into somatic growth and gametic production

*A* = energy absorbed from the food =  $C \times Ab$

$$C \times Ab = [\text{clearance rate } (L \times g^{-1} \times h^{-1}) \times \text{POM } (mg \times L^{-1}) \times 23 \text{ J} \times mg^{-1}] \\ \times [Ab = \text{absorption efficiency}]$$

$$R = \text{energy catabolized} = V_{O_2} (mL O_2 \times g^{-1} \times h^{-1}) \times 20.33 \text{ J} \times mL^{-1} O_2$$



$$U = \text{energy excreted} = (mg \text{ NH}_4 \times g^{-1} \times h^{-1}) \times 19.4J \times mg \text{ NH}_4^{-1}$$

As the energy excreted being minimal (<5% of the energy budget) (Pernet et al., 2008) with low inter-individual variation (Bayne, 1999), this parameter was not monitored. Measurements were realized simultaneously on seven mussels and one control (empty shell) at every sampling event for all treatments and seawater salinity and temperature were noted along with the atmospheric pressure. Firstly, oxygen consumption was determined as a measure of energy catabolized, in a closed individual experimental chamber (Plexiglas cylinders of 1357mL) filled with ultra filtered (0.02µm) and UV sterilized seawater and equipped with a magnetic stirrer for water circulation. Experimental chambers were maintained in temperature-controlled water bath and mussels were acclimated to experimental chamber condition during one hour before starting the monitoring. The oxygen depletion was measured during an hour by a polarographic electrode (YSI model 5775) using 2 mil membrane model paired to a biological oxygen monitor (YSI, model 5300A, USA), and a chart recorder (Cole Parmer, model 102, Canada). Respiration was then expressed as mL O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> tissue dry mass h<sup>-1</sup> and then converted into energy equivalents using the conversion factor 1mL O<sub>2</sub>=20.33 J (Widdows et al., 1988).

Same experimental chambers were kept open and used for clearance rate analysis. Air bubble injection was done to obtain adequate mixing of microalgae with limiting faeces resuspension. The empty shell control was used to determine the sedimentation level of microalgae in the experimental chamber. Mussels were acclimated for an hour, then 60 cell µL<sup>-1</sup> of *Tisochrysis lutea* was added and counted every fifteen minutes for one hour period using an electronic particle counter (Beckman Coulter Counter Z2, Canada). The clearance rate (L h<sup>-1</sup>) was then used in conjunction with the algal biomass (mg mL<sup>-1</sup>) to estimate the amount of ingested energy, assuming that the energy content of the diet was 23.5 J mg<sup>-1</sup> (Widdows et al., 1988).

To estimate absorption efficiency, mussels were individually disposed in 250mL plexiglass jar disposed in 30L open system tanks. A peristaltic pump allowed continuous feeding ( $2\text{mL min}^{-1}$ ) during 24-48 hours with  $60\text{ cell } \mu\text{L}^{-1} \text{ ind}^{-1}$  of *Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros muelleri* (1:1:1). Assimilation defined as the product of ingested energy and absorption efficiency was estimated using the Conover ratio (Conover, 1966) where food and faecal samples were filtered onto pre-combusted and pre-weighed GFC filters (47 mm for faeces and 25 mm for food), then rinsed with isotonic ammonium formate (3.2%), dried at  $65^{\circ}\text{C}$  for 72 h, cooled to room temperature in a desiccator, and re-weighed. Afterwards, they were combusted overnight at  $450^{\circ}\text{C}$  for 4 h, cooled to room temperature in a desiccator, and finally weighed again. This procedure provided estimates of the organic and inorganic fractions contained in the food and faeces.

$$\text{Assimilation} = \frac{(F-E)}{(1-E) \times F} \times 100$$

Where F is for the microalgae (food) ash-free dry weight divided by dry weight and E stand for the faeces.

### **2.2.7 Post-exposure adults' physiological monitoring: Lysosomal membrane stability**

The methods described by Wyatt and collaborators (2013) for neutral red retention assay was adapted in this study. Each sampling event, seven mussels were randomly selected ( $n = 7$ ) and  $700\mu\text{L}$  of hemolymph was extracted from their posterior adductor muscle with a 1mL syringe coupled at a 22.5-gauge needle already containing  $300\mu\text{L}$  of saline phosphate buffered saline (PBS; to avoid cell aggregation). A volume of  $200\mu\text{L}$  of the extracted solution was then pipetted in a  $1500\mu\text{L}$  siliconized Eppendorf tube already containing  $200\mu\text{L}$  of filtered intervalvular fluid. From this Eppendorf,  $40\mu\text{L}$  was then pipetted on a charged microscope slide and kept for fifteen minutes in a light-proof humidity chamber. A working solution of neutral red was obtained from a stock solution (28.8 g of neutral red in 1mL of

dimethyl sulfoxide (DMSO)) by mixing 8.5 $\mu$ L with 500 $\mu$ L of filtered intervalvular fluid. An aliquot of 20 $\mu$ L was then pipetted on the charged microscope slide before a second incubation of fifteen minutes in lightproof humidity chamber. Finally, charged microscope slide was cover before the last incubation period of one hour. Cells analysis was done at 400X (Olympus BX-41, Olympus, Canada) for the characterization of fifty individuals cells between stressed or normal based on the coloration of the lysosome. Pictures were taken with the camera coupled with the microscope (Evolution VF Color, MediaCybernetics, USA) and analyzed with Image Pro Plus software (MediaCybernetics).

### 2.2.8 Post-exposure adults' physiological monitoring: Byssus diameter

Two byssus threads were collected on five different mussels and kept in plastic bags before width and color analysis by digital microscope (VHX-2000, Keyence digital microscope system, Japan) mounted with the lens 250-2500X (VH-Z250R). The threads were rehydrated, flat secured on microscope slide and analyzed at five different locations on the distal section (figure 9).



Figure 9. Anatomical description of byssal thread sections.

### 2.2.9 Post-exposure adults' physiological monitoring: Histology analysis of gametic tissue

Gametogenesis development was determined in mantle mussels' tissue preserved in 20mL Davidson fixative solution (Shaw Barbara L and Battle Helen I, 1957) changed after 24h post-sampling. Prior to analysis, tissues were gradually dehydrated in ethanol (75%,

70%, 90%, 95%) then infiltrated and embedded with methacrylate based embedding solution (kit JB-4, Sigma-Aldrich). When the embedded mantle tissues were solidified, sections of five  $\mu\text{m}$  thickness were done with a Supercut Reichert-Jung model 2050 (Cambridge Instruments GmbH, Germany). Sections were mounted on glass slides and colored with a bichromatic stained (hematoxylin and eosin; Ehrlich solution) before adding permouth solution (Fischer) and a slide cover. Due to gametogenesis heterogeneity inside mantle, four different slices were done at different depths with each mussel sampled. Gametogenesis analysis were done with Olympus BX-41 microscope equipped with the Evolution VF Color camera. General tissue observation (sex identification and maturation stage) was done at 200X while gamete volume measurement was done at 400X. Length, diameter and volume of oocytes or follicles were analyzed with the software Image Pro Plus (MediaCybernetics, USA). Gamete maturation stage was determined based on the Lemaire et al., (2006) description. For each sample slide, four pictures were analyzed for the gamete volume fraction (GVF) and the atresia volume fraction (AVF) coupled with ten diameter measurements resulting in sixteen different values of GVF and AVF and forty diameter values for one individual from one sampling event.

#### **2.2.10 Post-exposure spring breeding success**

One month prior to induce the spawning, sixty exposed mussels from each treatment have been randomly selected and conditioned in open system tanks of 100L and fed *ad libitum* with microalgae (*Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros muelleri*; ratio of 1:1:1) added by a peristaltic pump ( $2\text{mL min}^{-1}$ ) to achieve final concentration of  $120\text{ cell } \mu\text{L}^{-1}\text{ ind}^{-1}$ . Water temperature was gradually increased ( $1^\circ\text{C per day}$ ) to  $15^\circ\text{C}$  and maintained until spawning. Spawning was obtained from thermal stress between  $7$  to  $15^\circ\text{C}$ . Eggs from different females were pooled together, as spermatozoid for males and sampled in five replicates for estimation of eggs size (100 eggs per replicate) and spermatozoids viability as described below. Series of independent larval rearing were obtained from fertilized eggs produced from gametes at a ratio of 20 spermatozoids per oocyte. Larvae were reared at  $18^\circ\text{C}$

with a final concentration of 10 larvae mL<sup>-1</sup> in 1 µm filtered and UV treated seawater renewed each second day. Larval rearing from each treatment was realized in 2.8L Fernbach (Nalgene) used in triplicates until 9 days post-fertilization. Larvae were fed continuously at 30 cells µL<sup>-1</sup> with *Tisochrysis lutea*, *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros muelleri* (1:1:1). At each two days, survival was estimated, and 50 larvae were measured. Eggs size and shell growth rates were measured with the image analysis Image-Pro v5.1 and an Olympus BX41 microscope. Survival rates were expressed as the total number of individuals less than the cumulative amount of empty shells and based on the first sampling timepoint. For each treatment, spermatozoids from several males were pooled and analyzed in triplicate by flow cytometer (Epics Altra, Beckman Coulter, United States) to estimate concentration (ind mL<sup>-1</sup>) and viability (%) by the method adapted from Berney et al. (2007). SYBR green I dye was used for total cell count and viability estimated with propidium iodide to measure damaged cells proportion (%). The spermatozoids suspension of 1mL was done with filtered seawater, mixed gently with 2 µm beads solution (2µL), SYBR green I solution (0.3µL), and propidium iodide solution (10µL; 10 µg mL<sup>-1</sup>) and analyzed after 15 minutes incubation time in the dark.

### 2.2.11 Statistical analysis

The software R and his extension R studio were used for the statistical analysis of data produced. First, values were checked for uniformity of both data distribution and variance with Shapiro-Wilk test (uniformity of distribution) and a visual observation of the variance's distribution. When needed, data were log-transformed to normalize their distribution. Two-ways ANOVA's coupled with Tuckey posteriori tests were used to compare differences between treatments and sampling periods. Statistical significance limit was set to 0.05 for all tests. Error bars in plots display the standard error (SE).

## 2.3 RESULTS

### 2.3.1 Abiotic seawater condition during treatments

During each treatment exposure, the mesocosms temperature were similar the first experimental day ( $-1.4 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ), but slightly different the last day with higher values observed in AWB treatment ( $-1.3^{\circ}\text{C}$ ) and lower in Heidrun ( $-2.5^{\circ}\text{C}$ ). Temperature variation between treatments were minimal with observed values always below  $0^{\circ}\text{C}$ . Salinity measurements showed higher variability between treatments with values comprised between 22 (CLB) and 30 (AWB). Oxygen saturation was stable between time and treatment with values always higher than 80%.

### 2.3.2 Hydrocarbons monitoring: tissue bioaccumulation

During exposure (days 0-7) and winter post-exposure period (days 21-77), the total PAHs bioaccumulation showed lower values for the control at each sampling event. After 3 to 7 days of exposure, all oil treatments showed their higher values, followed by gradual decrease close to the control values on day 77. Mussels exposed to Heidrun treatment systematically showed the highest TPAHs values with a maximal concentration of  $5.49 \mu\text{g g}^{-1}$  during the exposure. The CLB and AWB treatments showed both similar values with a slightly higher accumulation in mussels exposed to CLB (figure 10).

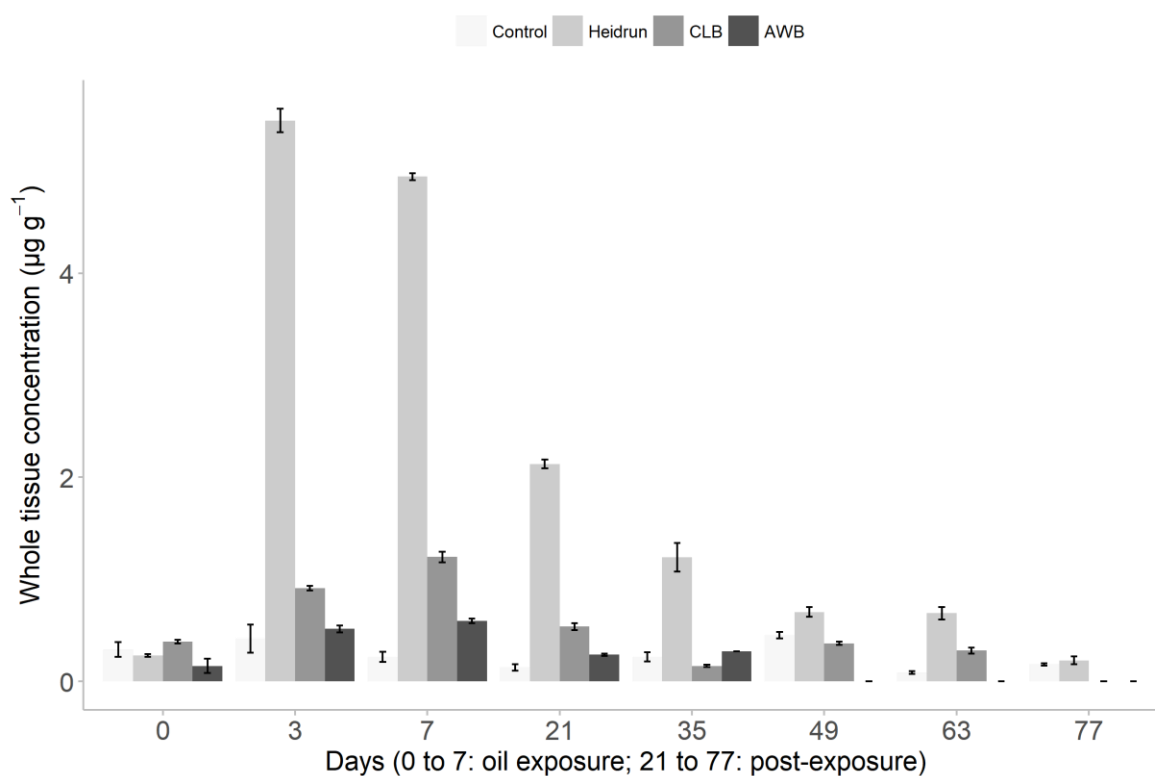


Figure 10. Bioaccumulation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) in adult's mussels' whole tissue during and after the exposure. Data are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of dry weight.

A similar tendency was observed for the carbazoles and dibenzothiophenes bioaccumulation with lower values observed in control and higher in mussels exposed to Heidrun, CLB and AWB treatments. The higher concentration values being observed during the exposure followed by a gradual depletion during the post-exposure period (figure 11).

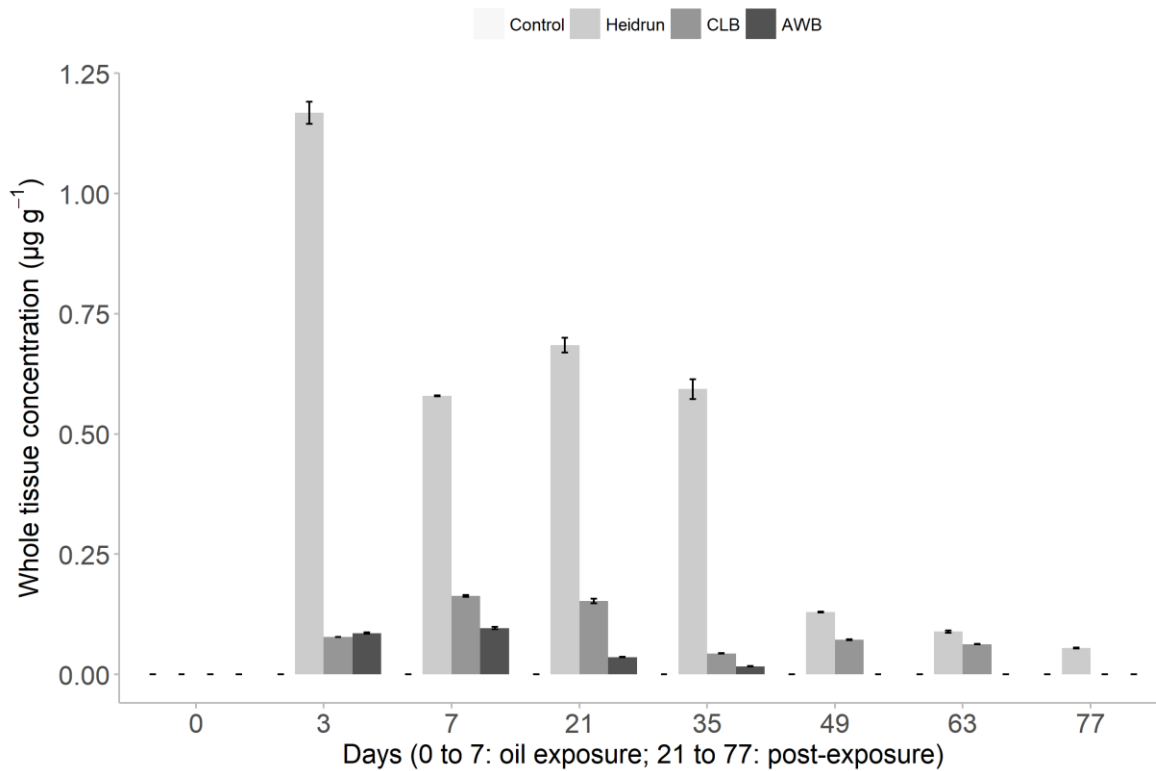


Figure 11. Bioaccumulation of total carbazoles and dibenzothiophenes in adult mussels' whole tissue during and after the exposure. Data are expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  of dry weight.

### 2.3.3 Adults biological response

#### *Mortality*

Mortality of adults' mussel was higher for the three oil treatments compared to the control but never higher than 20% of exposed individuals. Control showed 3.5% of mortality followed by the Heidrun with 9.4%, the CLB with 13.2%, and the AWB with 15.6%. Unconventional oils (CLB and AWB) treatments induced an higher mortality when compared to conventional oil (Heidrun).



### Cellular stress

Immediately after the exposure, cellular stress was higher for the three oil treatments when compared to the control with means close to 60% opposed to 30% for the control. Significant differences were not observed one month after the exposure while the control kept the lowest cellular stress mean of all treatments (Treatment x Time, DF= 3 and 47, F= 5.883, p= 0.0017) (figure 12).

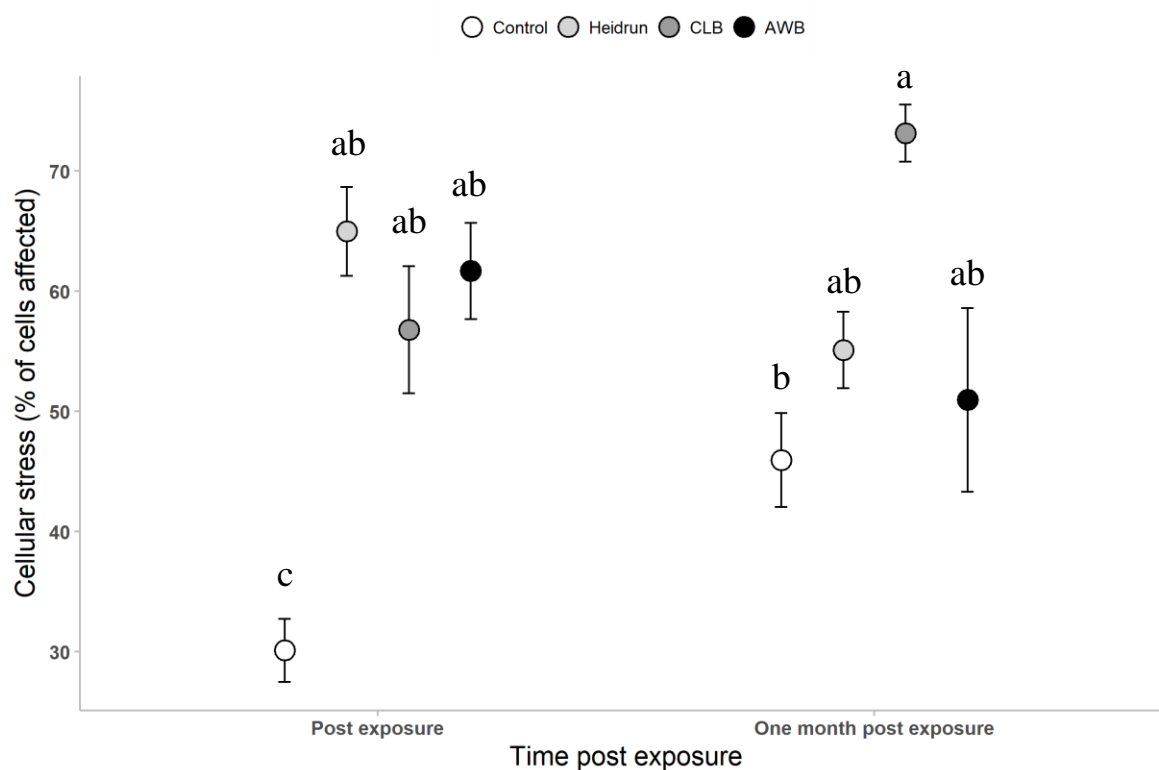


Figure 12. Adult cellular stress immediately after the exposure and one month later. Data are expressed in proportion (%) of affected cells compared to total analyzed cells. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, “post exposure” appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period.

*Scope for growth – clearance rate, VO<sub>2</sub>, assimilation efficiency and total SFG*

Post-exposure, mussel's filtration rate of control and AWB treatments showed the highest mean with values higher than  $1\text{L h}^{-1}\text{ g}^{-1}$ . The Heidrun and the CLB treatment showed similar filtration rate means with respectively  $0.23\text{L h}^{-1}\text{ g}^{-1}$  and  $0.18\text{L h}^{-1}\text{ g}^{-1}$ . While no significant difference was found between the control and the AWB immediately after the exposure, both the Heidrun and the CLB were distinct from the control (Treatment, DF= 3 and 48, F= 8.432, p= 0.000132). One month after the exposure, significant differences were not observed anymore between control and any of the oil treatments. The Heidrun and CLB treatments display an improved filtration rate (Time, DF= 1 and 48, F= 51.382, p= <0.0001).

The highest VO<sub>2</sub> mean was observed for control and CLB treatment immediately after the exposure. The Heidrun and AWB treatments showed the lowest means values. One month later, no significant differences were found between treatments (Treatment x Time, DF= 3 and 48, F= 7.269, p<0.001).

The lowest mean of assimilation efficiency immediately after the exposure was observed with the control while the Heidrun, CLB and AWB treatments displayed higher values. Significant differences were found between the control and both the CLB and AWB treatments. These differences disappeared after one-month post-exposure with all treatments displaying values close to 90% (Treatment x Time, DF= 3 and 37, F= 5.272, p= 0.0040).

Lower significant SFG values were only observed with the CLB treatment immediately after the exposure. After one month, no significant differences were still visible between treatments (Treatment x Time, DF= 3 and 47, F= 7.421, p<0.001) (figure 13).

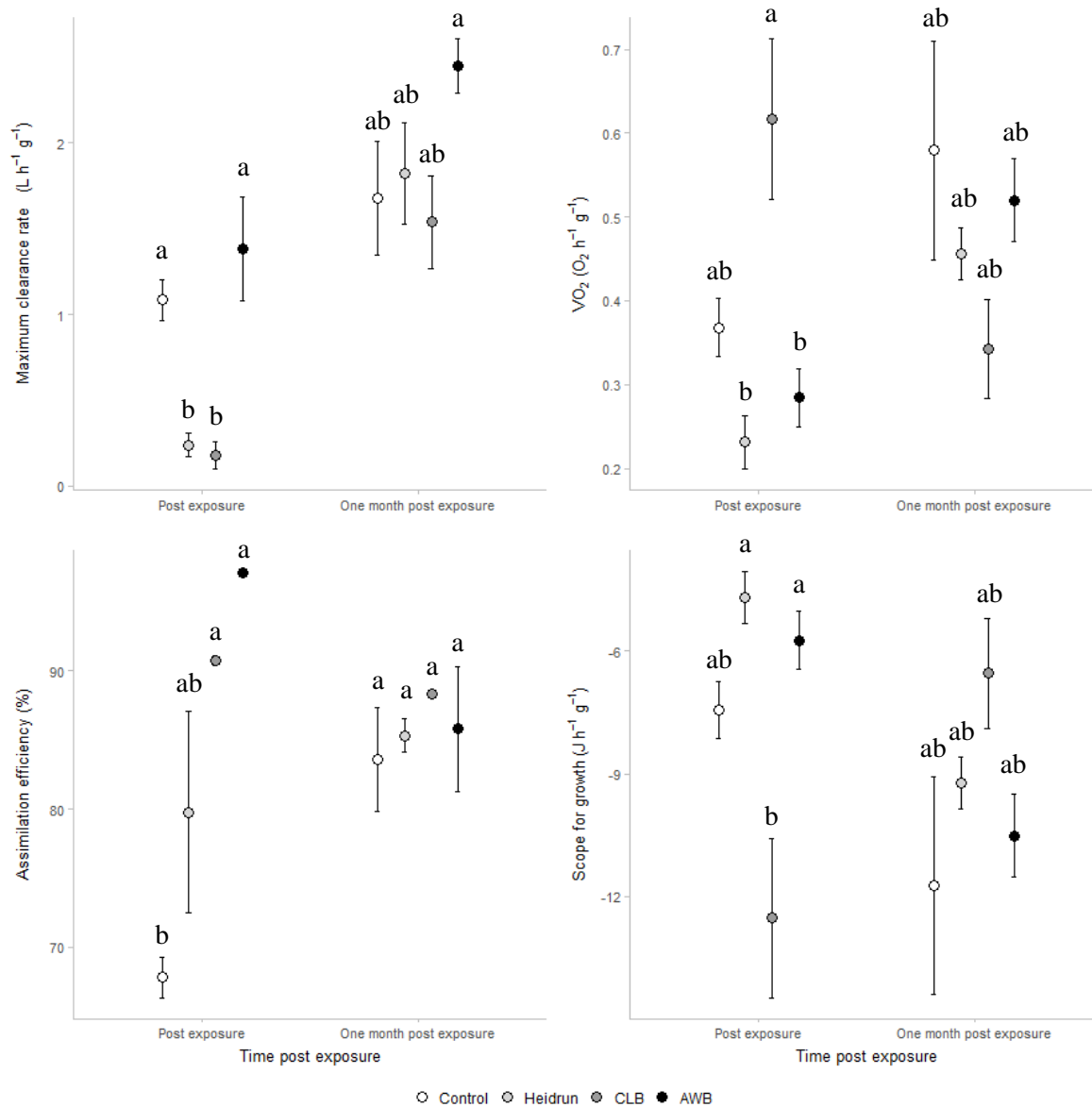


Figure 13. Adult maximum clearance rate ( $L h^{-1} g^{-1}$ ),  $VO_2$  ( $mL O_2 h^{-1} g^{-1}$ ), assimilation efficiency (%) and total scope for growth values ( $J h^{-1} g^{-1}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, “post exposure” appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period.

*Clearance rate and  $VO_2$  against PAHs concentration*

After the winter exposure to the different treatments, adult mussels show a significant negative correlation between their clearance rate and their PAHs tissue accumulation (DF= 1 and 10, F= 6.129, p= 0.032). However, no significant correlation was observed with respiration rate of mussels (DF= 1 and 10, F= 2.91, p= 0.118) (Figure 14).

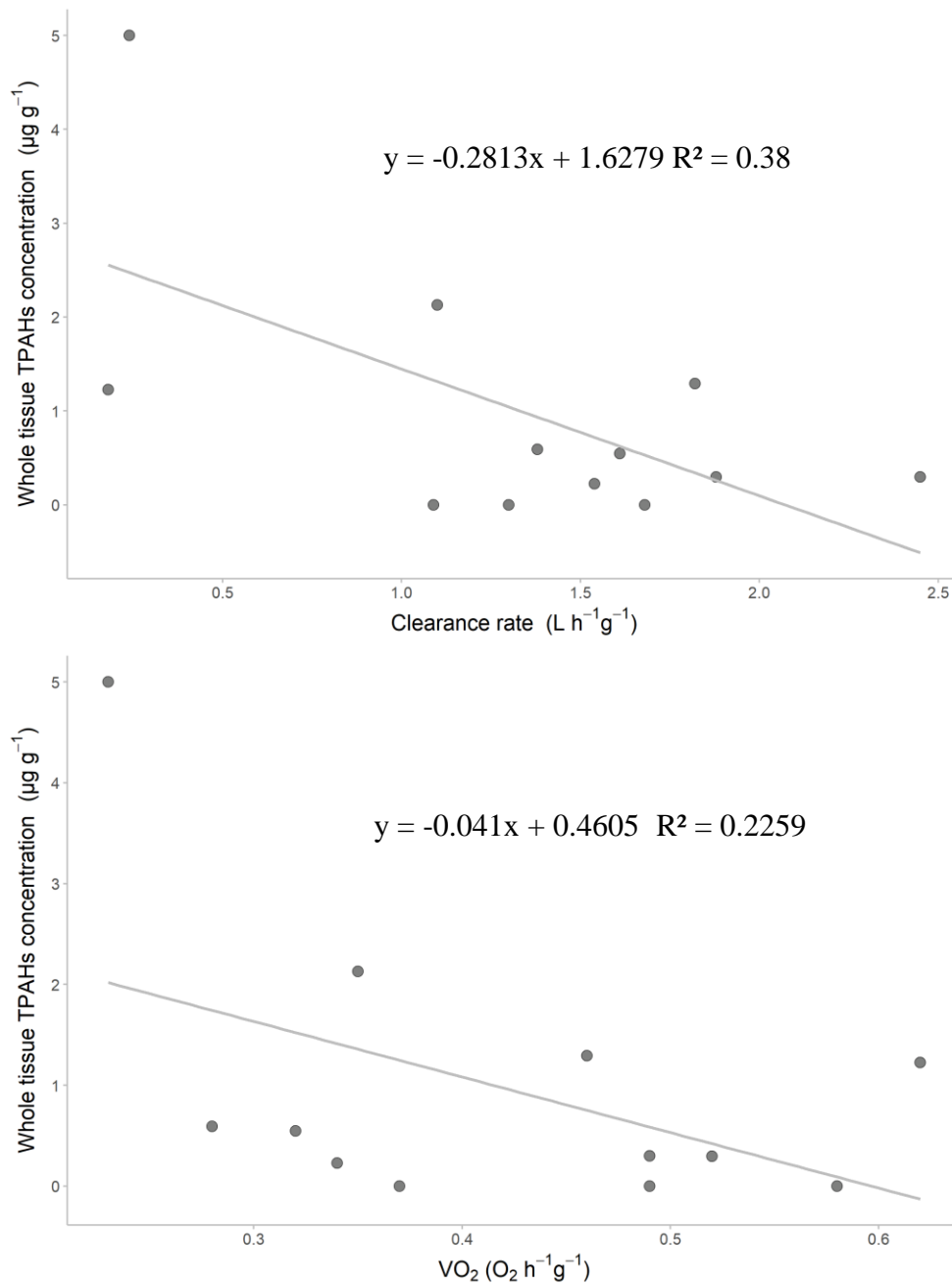


Figure 14. Regression prediction of adult clearance rate ( $\text{L h}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) and respiration rate ( $\text{VO}_2$  max,  $\text{mL O}_2 \text{ h}^{-1}\text{g}^{-1}$ ) against TPAHs tissue accumulation after exposure.

*Byssus thread*

After the exposure, byssus thread width showed significant lower values for each oil treatment compared to control, with width over 10% lower in AWB treatment. After one-month, similar trend was observed except that the most impacted treatments were CLB and AWB with width byssus thread over 25% lower than the control (Treatment x Time, DF= 6 and 1788, F= 11.08,  $p < 0.001$ ) (figure 15).

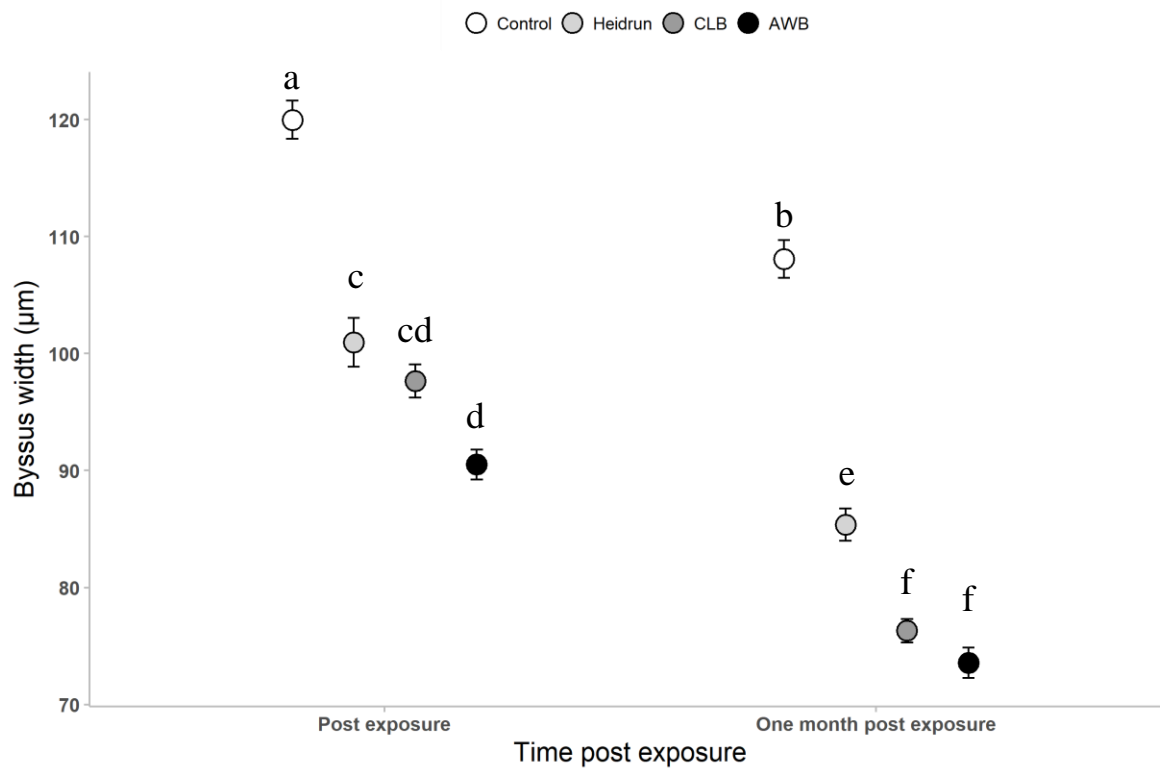


Figure 15. Adult byssus thread width ( $\mu\text{m}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, “post exposure” appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period.

### *Histology analysis of female gonads*

Visual observation of female gonads cross section gives great insight of oil exposure effects on gametogenesis. The gonads from control treatment, follicles and individual oocytes display normal development with low occurrence of atretic oocyte. In contrast, oil exposed female mussel showed high gonad atresia level with hemocyte infiltration of gametic tissue. AWB displayed early stage atretic oocyte while CLB showed late stage atretic oocyte mainly already degraded, as observed after the 7-day exposure and one month later (figure 16 and figure 17).

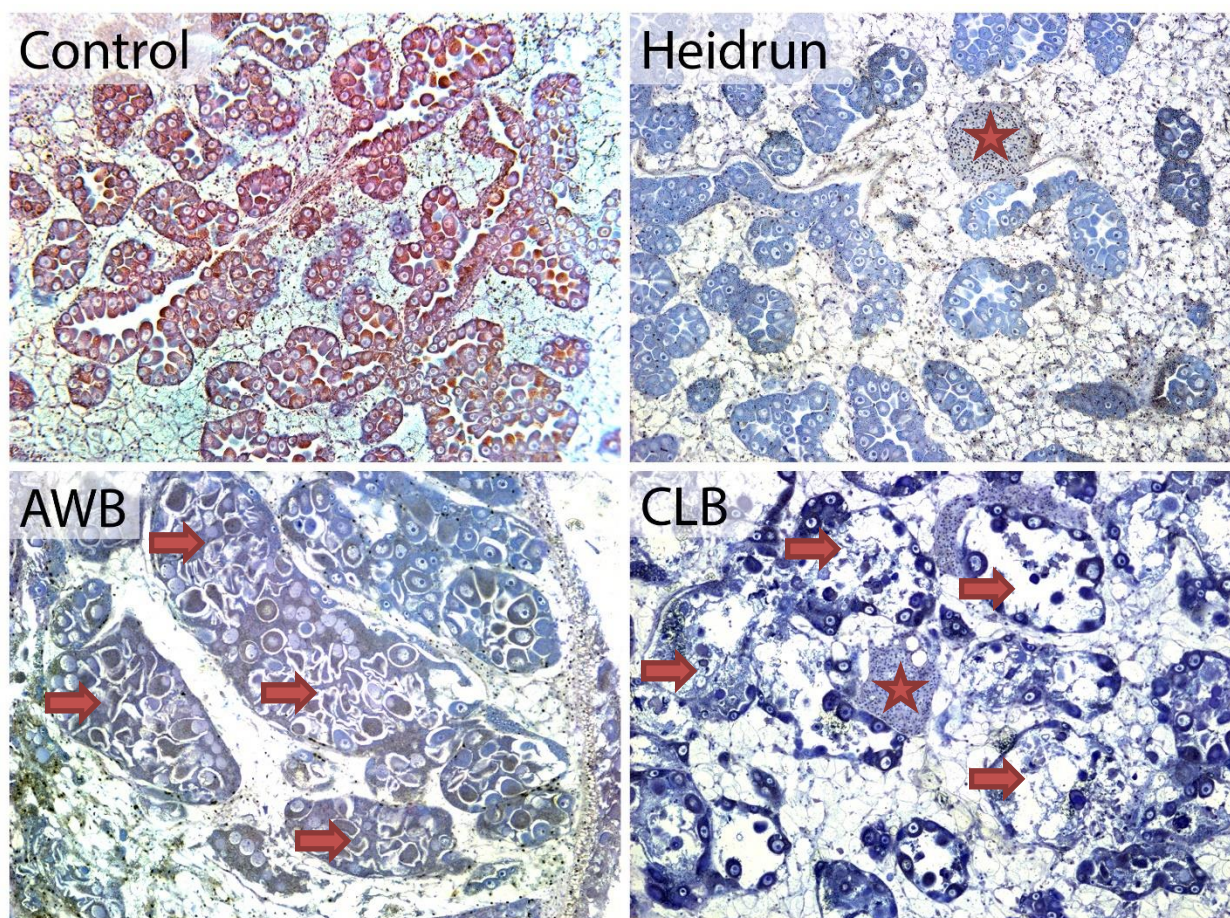


Figure 16. Cross section of female gonads sampled immediately after the winter exposure (within 12 hours), 200X. Examples of atretic oocytes are marked with an arrow and hemocyte infiltration of follicles are marked with \*. Hematoxylin and eosin (Ehrlich solution) staining, section of 5 $\mu$ m.



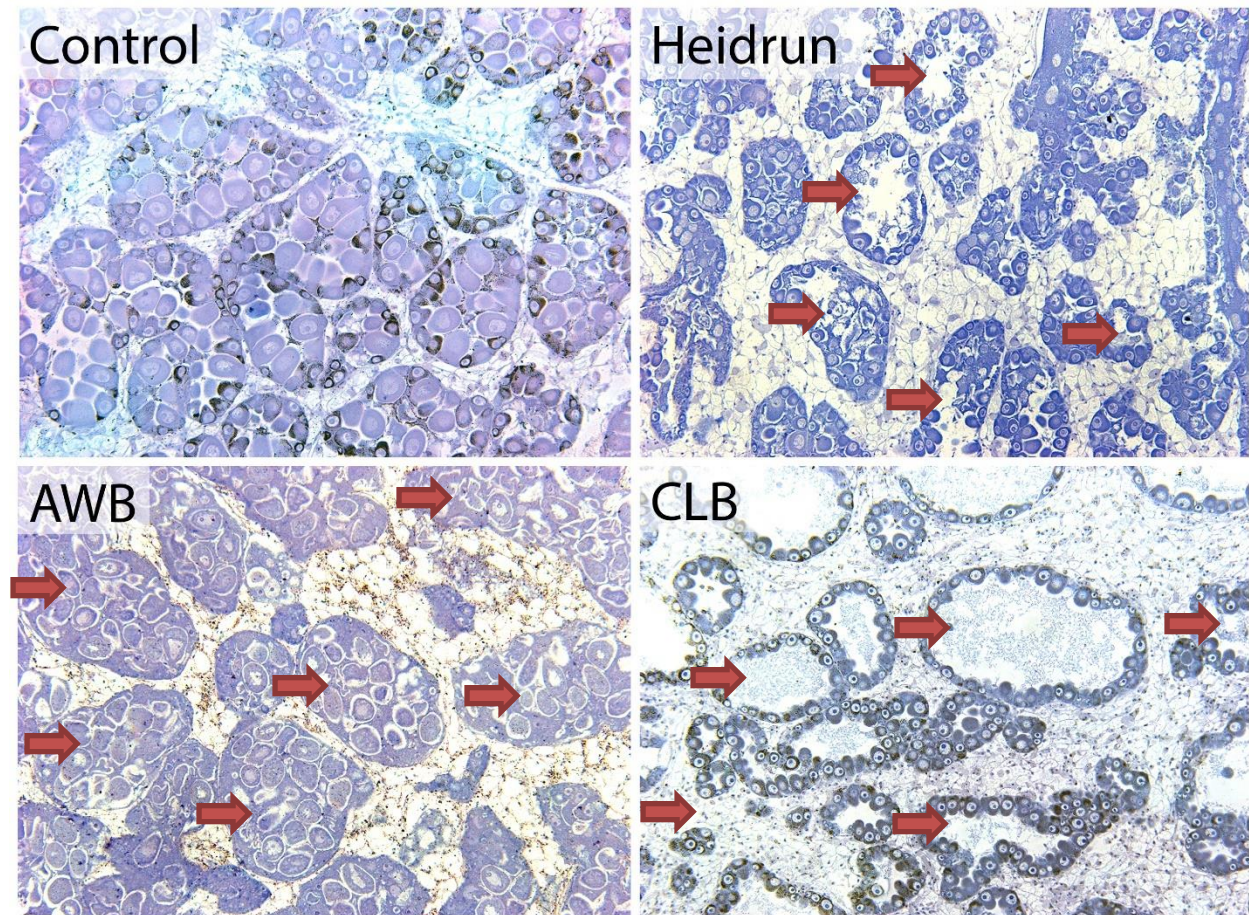


Figure 17. Cross section of female gonads sampled after the winter exposure (within 12 hours), 200X. Examples of atretic oocytes are marked with an arrow. Hematoxylin and eosin (Ehrlich solution) staining, section of 5 $\mu$ m.

*Gonad volume fraction (GVF), atresia volume fraction (AVF) and oocytes diameter from gonad histology*

The gamete volume fraction (GVF) indicator showed the highest values for the control treatment (> 66%). Oil treatments displayed lower GVF values, with means all under 50%. Immediately after the exposure, CLB treatment showed the lower value with 28%. All treatments had an increase in GVF between the two sampling events but CLB and AWB treatments showed significant lower values one-month later comparatively to control and



Heidrun treatments. (Treatment x Time, DF= 3 and 340, F= 4.062, p= 0.00742). The atresia volume fraction (AVF) indicator showed the lowest values from the control mussels with means of 1.73% immediately after the exposure and 4.05% one month later. All oil treatments showed significant higher values. Mussels exposed to unconventional oil (CLB and AWB) showed the higher values with means over 22% after the exposure and one month later (Treatment x Time, DF= 3 and 340, F= 14.41, p<0.001). The highest oocyte diameter mean was found in the control treatment one month after exposure. One month after the exposure, oocytes of each treatment showed a significant increase in diameter, but oil treatments still showed oocytes diameter 25% lower than the control (Treatment x Time, DF= 3 and 1232, F= 6.265, p<0.001) (figure 18).

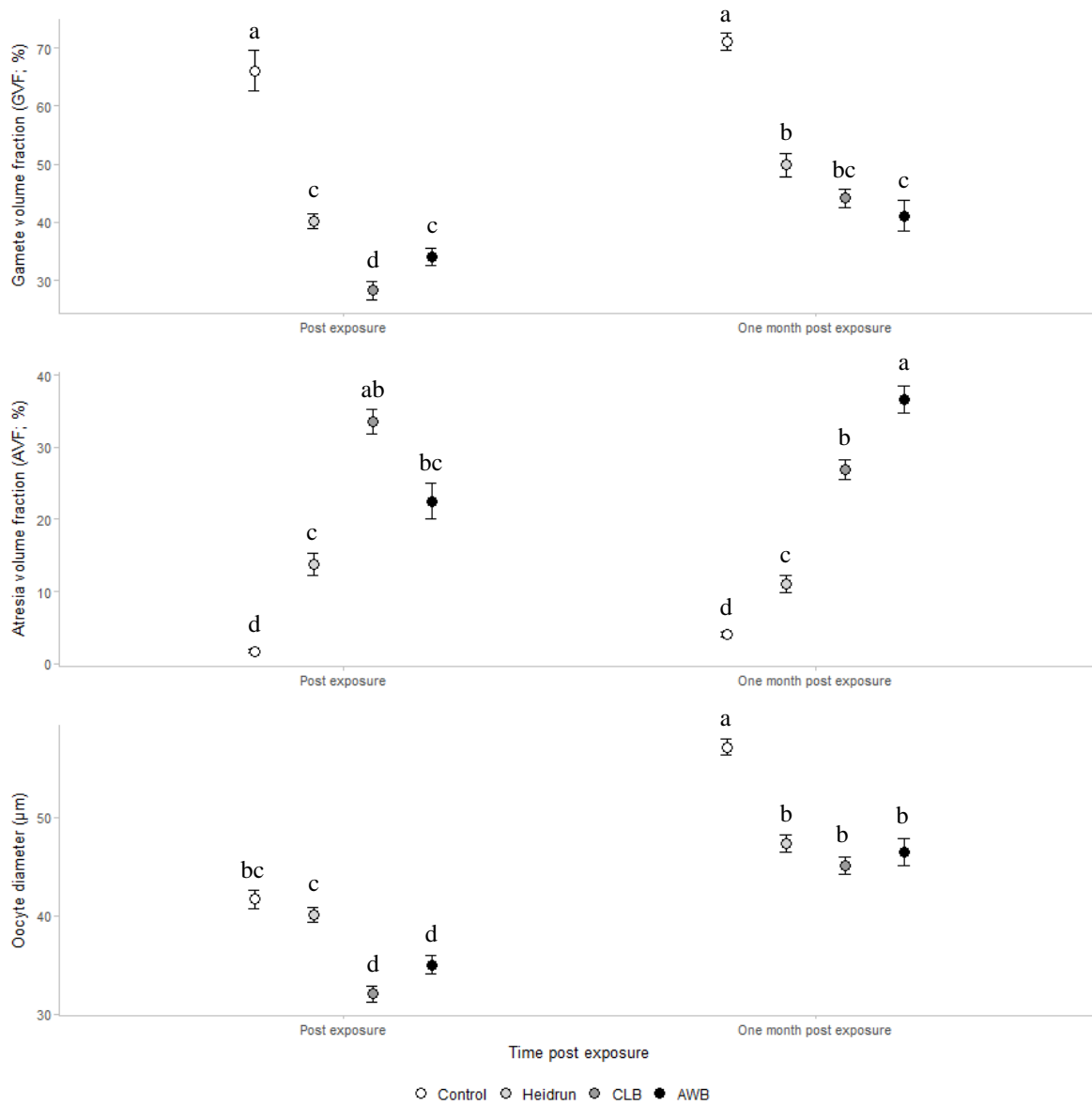


Figure 18. Adult gamete volume fraction (GVF; %), atresia volume fraction (AVF; %) and viable oocytes diameter ( $\mu\text{m}$ ) immediately after the exposure and one month later. Different letters represent significant variation from posteriori test. Considering the time post exposure axis, “post exposure” appellation account for samples analyzed within 12 hours after the ending of the 7-day exposure period.

*Gametes produced: spermatozoids viability and total production in addition to eggs total production*

No significant differences have been found between oil treatments and the control but an important variability had been observed for the Heidrun and AWB treatments, indicating differential intraspecific impact on male mussel. (Treatment, DF= 3 and 12, F= 1.272, p= 0.328). The CLB and AWB treatments displayed depleted total spermatozoids values, 35% lower than the control (Treatment, DF= 3 and 8, F= 47.23, p<0.001). A significant difference was found between the control and each oil treatments in term of total egg production with the more important impact observed with the Heidrun treatment showing 80% less eggs production (Treatment, DF= 3 and 8, F= 791.1, p<0.001) (figure 19).

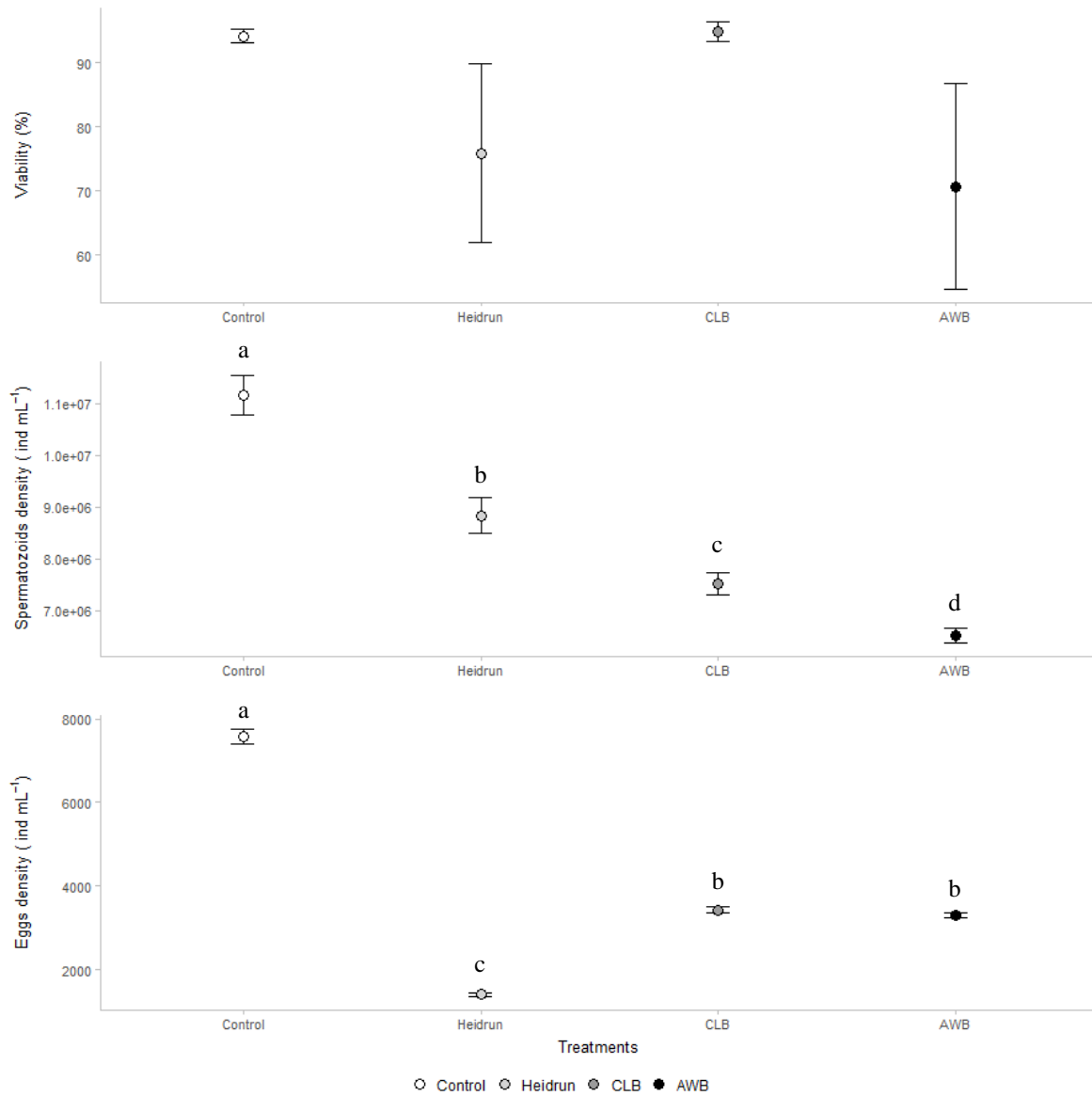


Figure 19. Spermatozoid viability (%), spermatozoid total production (spermatozoids mL<sup>-1</sup>) and eggs total production (eggs mL<sup>-1</sup>) for each treatment during the spring spawning. Different letters represent significant variation from posteriori test.

### **2.3.4 Larval biological response**

#### *Visual comparison of treatments*

Visual observation of standardized volume sample from each treatment after 2 days post fertilization shows the differences in both larval density and d-veliger larvae proportion. The control treatment showed higher density with a majority of d-veliger larvae. The Heidrun treatment showed the lower density with a majority of larvae remaining at the trochophore stage. Considering the two diluted bitumen treatments, both display a low larval density with low occurrence of D-veliger larvae, as seen for the Heidrun. (Figure 20).

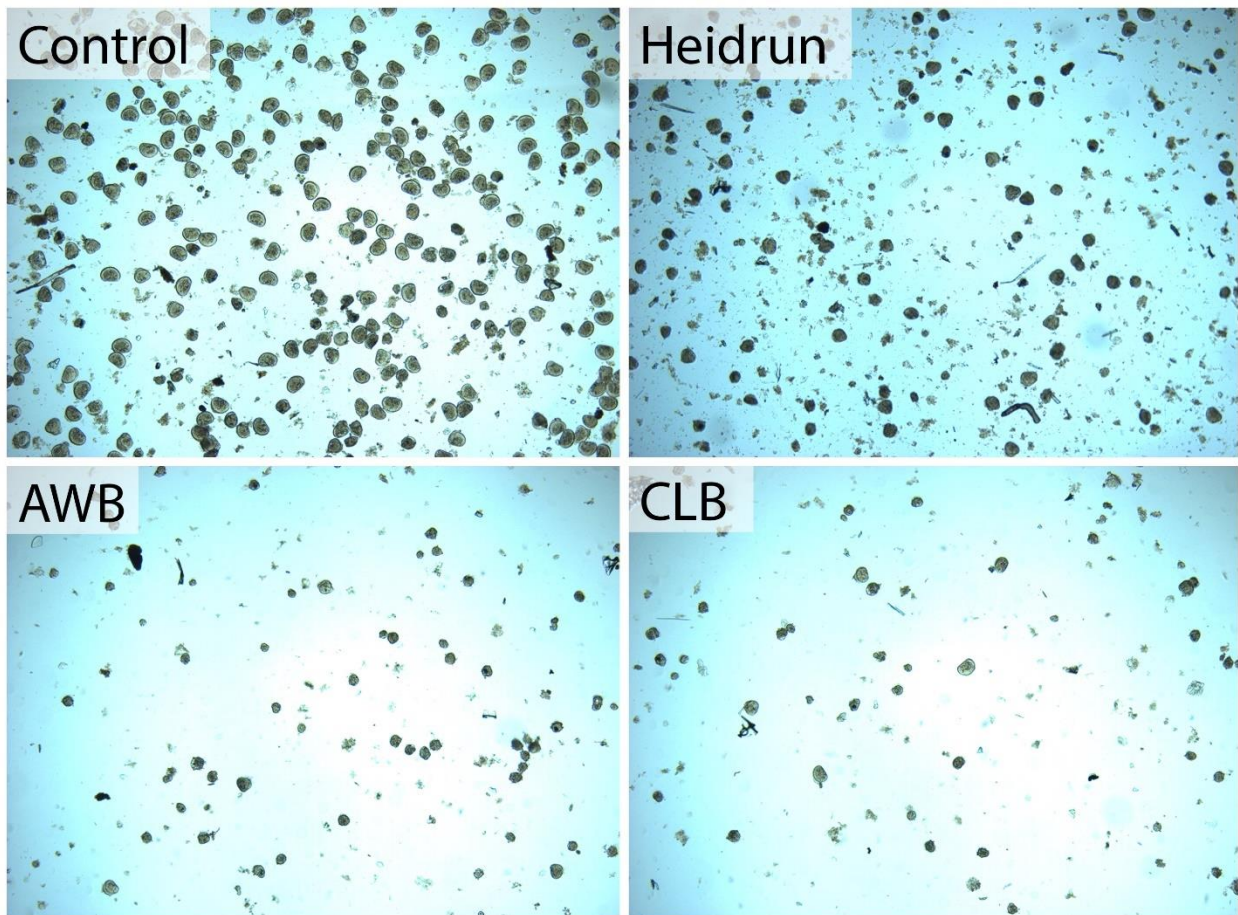


Figure 20. Visual representation of density and D-veliger larvae proportion 2 days post-fertilization from each treatment, 100X.

#### *D-veliger development success*

The proportion of D-veliger larvae found 2 days post-fertilization was the highest for the control treatment with a mean of 60 % comparatively to all oil's treatments with means under 25 %. AWB treatment showed the lowest proportion of D-veliger with 4,9% (Treatment, DF= 3 and 12, F= 15.82, p= 30.00018) (figure 21).

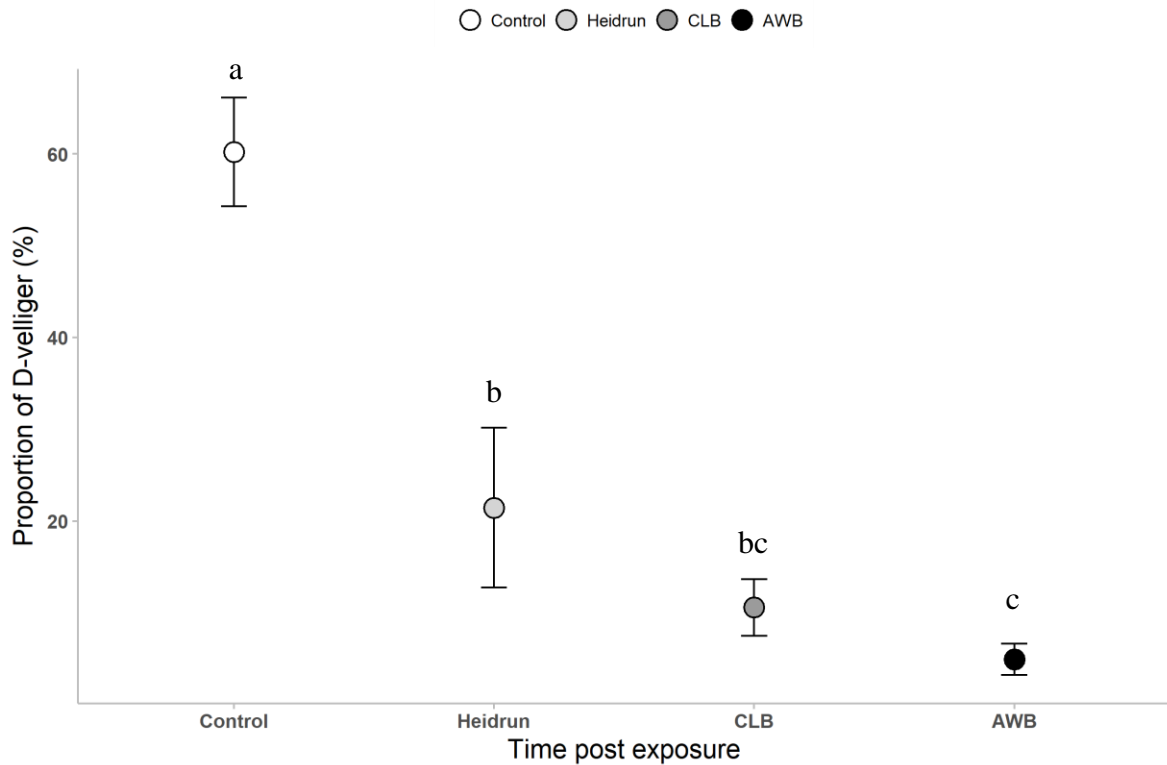


Figure 21. Proportion (%) of larvae at D-veliger stage 2 days post-fertilization. Different letters represent significant variation from posteriori test.

#### *Density from day 4 to 9 post-fertilization*

During their development until day-9 post fertilization, control and Heidrun treatments larvae showed higher final larvae density opposed to dilbits treatments. After 9 days of development, no significant differences were found between the control and the Heidrun treatments ( $p = 1$ ) and between the two unconventional oil treatments ( $p = 1$ ) while both groups show a significant difference (Treatment x Time, DF= 6 and 36,  $F= 18.55$ ,  $p= <0.001$ ) (figure 22).

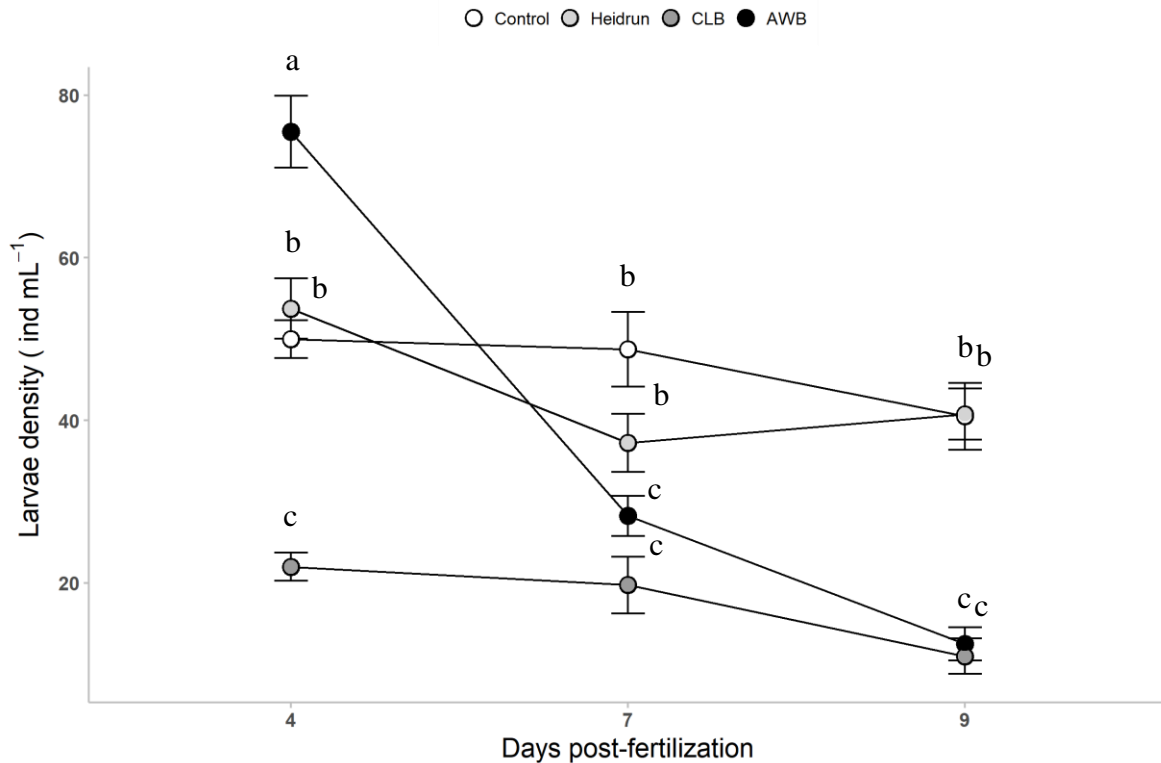


Figure 22. Larvae density (larvae mL<sup>-1</sup>) at days 4, 7 and 9 post-fertilization. Different letters represent significant variation from posteriori test.

### *Larvae size growth*

Considering the larvae size progression from fertilization until day 9 post-fertilization, the control showed the greatest size growth with a regular increase over time. Oil treatments showed a step-like progression with no significant differences, inside the same treatment, between sampling days 0-2, 2-4 and 7-9 with the only exception for the Heidrun between day 0-2. The only significant progression inside a same oil treatment was between days 4-7 (Treatment x Time, DF= 12 and 2198, F= 23.19,  $p < 0.001$ ) (figure 23).



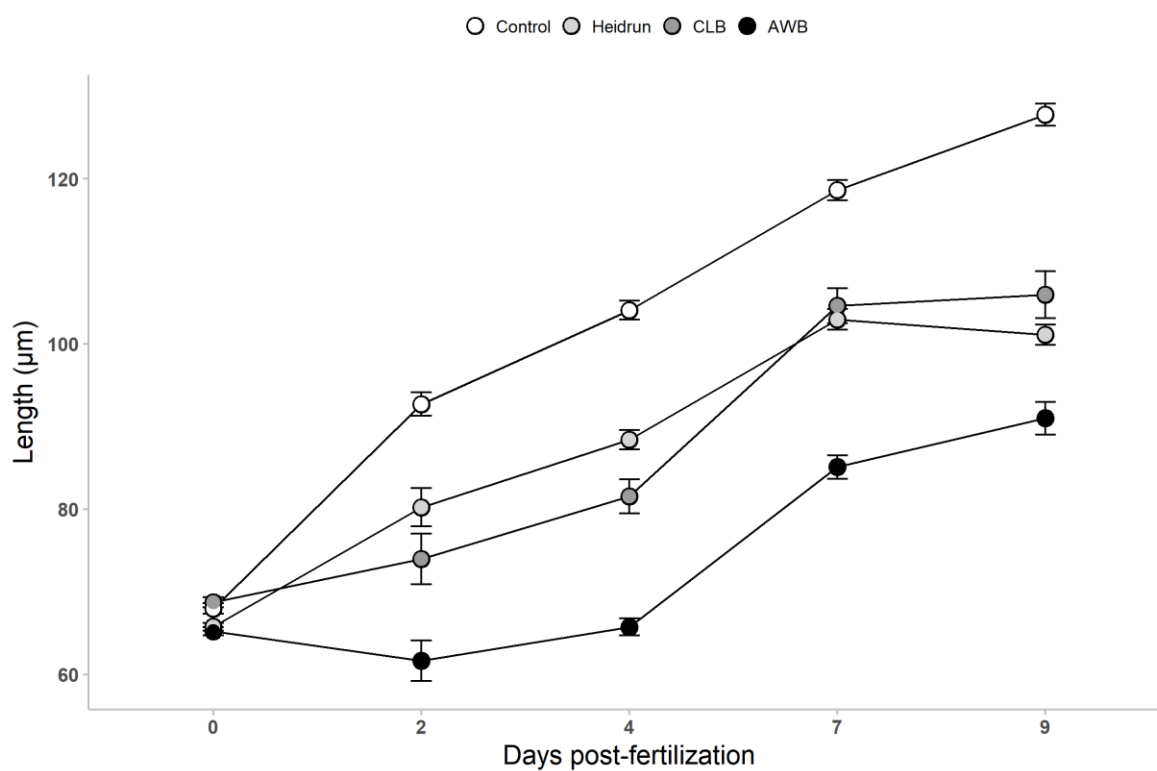


Figure 23. Larvae size growth ( $\mu\text{m}$ ) from fertilization to 9-days post-fertilization.

## 2.4 DISCUSSION

Our results support the hypothesis that oil treatments affected the physiology of adult's mussel during a winter exposure with an ice cover and water temperature below 0°C. The toxic effects are still observable several weeks after oil exposure on reproductive parameter and larvae production. Surprisingly, the toxic effects were greater on unexposed larvae produced than on their exposed genitors with higher negative effects induced with dilbit exposure. Winter marine oil spill consequences can be very unpredictable and challenging due to the freezing temperature and the omnipresence of ice that can strongly interfere with the oil mixtures and shape the bioavailability of hydrocarbons compounds in seawater. The uninterrupted succession of sampling from the winter oil exposure to the self-sufficiency larvae (9 days old), give a global picture of the environmental and ecological consequences of a winter oil spill on bivalve's recruitment processes essential for natural population structure integrity. Our approach diverge from the more divided perspective often used in previous studies on dilbit toxic effects, focusing on short and precise section of adults or offspring life cycle (Alderman et al., 2017; Barron et al., 2018; Madison et al., 2015, 2017; Philibert et al., 2016) allowing less flexibility in term of extrapolation to the natural environment. Unlike conventional crude oil toxic effects being well studied on variety of species and environmental conditions, studies on toxic effects of diluted bitumen are scarce. In this emerging field, the comparative use of both conventional and diluted oil for our exposure, give the ability to use the well-studied oil as a reference to compare toxic effects of the diluted bitumen and resilience of mussels (Philibert et al., 2016). While diluted bitumen toxicity just start to be investigated, previous studies principally focused on freshwater species in temperate regions (Alderman et al., 2017; Barron et al., 2018; Madison et al., 2015, 2017; Philibert et al., 2016), only one study addressed the consequences on a temperate estuarine invertebrate (*Americamysis bahia*) (Barron et al., 2018) and no records were found on cold marine species. Dilbit exposure seems to be associated with greater toxic effect at lower dose on estuarine species than freshwater one (Barron et al., 2018). Furthermore, previous studies indicate higher susceptibility to chemical (including oil related compounds)

for Arctic communities and populations than the temperate ones (Camus et al., 2015; Chapman et al., 2003; Olsen et al., 2007, 2013). Bivalves, mussels in particular, are largely used in ecotoxicity studies (Goldberg et al., 1978) due to their ability to filtrate and accumulate contaminants but surprisingly no literature was found on consequences of diluted bitumen exposure on marine mussels or bivalves.

#### **2.4.1 Petroleum hydrocarbons bioaccumulation**

PAHs bioavailability is related to physical and chemical properties but also on their origin (Hylland, 2006). Partition of toxic compounds to dissolve fraction could be different between conventional oil and diluted bitumen. Bioavailability is distinct inducing differential bioaccumulation of petroleum hydrocarbons between conventional and dilbit in mussels used, the first one leading to values sometimes higher by 10 folds as the bioaccumulation magnitude was AWB < CLB < Heidrun. Marine bivalves are filtering organisms, feeding by removing fine suspended matter from large volume of seawater and therefore can be exposed through different pathways (Fossato and Canzonier, 1976). Passive exposition via the passage of water through the mantle cavity, via food ingestion (Axelman et al., 1999; Axiak et al., 1987; Fong, 1976; Redmond et al., 2016) or via passive diffusion at gill epithelium (Baussant et al., 2001; Redmond et al., 2016). As temperature influence physiological state of bivalves, winter marked a metabolic slowdown for the blue mussel (Camus et al., 2003; Fossato et al., 1976) and lower filtration rate. However, we observed that mussels still accumulate hydrocarbons in their tissue at high dose (up to  $5 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$ ). Studies on mussel bioaccumulation following the Erika spill (heavy crude oil) on French coast monitored maximal accumulation of  $3 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$  (Vignet et al., 2015) and up to  $14.4 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$  from the Exxon Valdez wreckage (Payne et al., 2008). Bioaccumulation was pretty fast with highest values being already recorded on the first sampling event after three days of exposure. A depuration period followed the exposure, while the hydrocarbons accumulated slowly decreased to pre-exposure concentration after more than two months in clean seawater. The

hydrocarbons elimination process followed an exponential pattern with fast depuration rate immediately after the exposure (more than half the accumulated hydrocarbons were eliminated in the first two weeks) gradually slowing down afterwards. As remarked by Fossato and Canzonier (1976), mussels can exhibit a pretty rapid depuration rate for the first 15-20 days post-exposure subsequently followed by a lower elimination rate which allow us to monitor hydrocarbons as long as 70 days after the end of the exposure. No strong mussel mortality event was monitored during and after oil exposure. However, oil treatments had higher mortality than the control, conventional oil being less lethal than unconventional oil (Control < Heidrun < CLB < AWB). PAHs pose a great threat to both marine individuals and community due to their persistence, bioaccumulation potential and toxicity (Jackson, 2017; Wolska, 2011). Complementary to laboratory exposure, diverse literature cover past life size major oil spill, and their environmental/biological consequences like, among others, the Exxon Valdez (1989) (Harwell et al., 2006; Peterson et al., 2003), the Erika (1999) (Geffard and Budzinski, 2004), the Prestige (2002) (Baussant et al., 2011; Labarta et al., 2005; Penela-Arenaz et al., 2009; Peteiro et al., 2006) or Deep Water Horizon (2010) (Beyer et al., 2016; Vignier et al., 2015, 2016, 2017). Considering bivalves, PAHs exposure have been linked with bioaccumulation and multiple negative effects observed on adults as oxidative stress (Beyer et al., 2017; Hannam et al., 2010), endocrine disrupting characteristic (Baussant et al., 2011; Frouin et al., 2007; Ortiz-Zarragoitia et al., 2006), immunosuppression (Camus et al., 2003; Frouin et al., 2007; Hannam et al., 2010; Hwang et al., 2008; Jeong et al., 2005; Kang et al., 2014; Karac et al., 2009; Martins et al., 2005; Widdows et al., 1982), bioenergetic and biosynthetic processes alterations (González-Fernández et al., 2016; Karac et al., 2009; Kim et al., 2007; McDowell et al., 1999; Peteiro et al., 2006; Redmond et al., 2016; Sureda et al., 2011; Toro et al., 2003; Widdows et al., 1982, 1997, 1985), genotoxicity (Axiak et al., 1987; Jeong and Cho, 2007; Pérez-Cadahia et al., 2004; Stainken, 1977), cytotoxicity (Baussant et al., 2009; Camus et al., 2003), tissue pathologies and lesions (Aarab et al., 2011; Berthou et al., 1987; Ruiz et al., 2011). Negative effects on reproduction has also been observed and associated with adults gonads alteration (Aarab et al., 2011; Baussant et al., 2011; Berthou et al., 1987; González-Fernández et al., 2016; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011, 2006; Ruiz et al.,

2011), fecundation success (Vignier et al., 2017) and impaired larvae metabolism, development or survival (Geffard, 2003; Labarta et al., 2005; McDowell et al., 1999; Pelletier et al., 2000; Vignier et al., 2015, 2016, 2017). Maternal transfer and transgenerational toxic effects have also been recorded with benthic adults bivalves (*Mulinia lateralis*) exposed to contaminated sediments and producing pelagic un-exposed larvae (Pelletier et al., 1997, 2000).

Considering diluted bitumen, some toxic effects have been documented in the six articles published to date. Embryotoxicity effects of dilbit exposure are evident, including reproduction and embryos development impairment (Barron et al., 2018), embryos malformations, higher gene activity related to detoxification enzymes and oxidative stress response (Madison et al., 2015), modulation of proteins associated with immune and inflammatory response, reduced swimming performance (Alderman et al., 2017) and behaviour modification (Philibert et al., 2016).

#### **2.4.2 Adults mussel biologic response – individual integrity and resilience**

We used adult's size mussels for our exposure, generally considered to be more sensitive, adaptive and recovering from exposure than smaller individuals (Redmond et al., 2016). We observed limited physiological consequences of exposure with both conventional and unconventional oil on adult mussels, as scope for growth were relatively similar to control. The only significant variation was observed with the CLB adult's clearance rate immediately after the exposure. One month after the exposure, the biomarkers response was more homogenous between treatments with no significant differences noted, as physiological performances recovery was dependent of the accumulated hydrocarbons depuration (Widdows et al., 1982). These physiological markers, generally largely used, indicate that adult mussels show a good physiological resilience to low concentration and short petroleum hydrocarbons exposure. Time and concentration of hydrocarbons exposure are key characteristics for bivalves as noted by Jeong and Cho (2007). When low level PAHs

exposure was prolonged, damage to metabolism could be as severe as individuals exposed to high level of PAHs. Overall, the clearance rate (CR) seems to be the more sensitive of the physiological biomarker used in this study, showing a slight negative correlation with PAHs tissue concentration. Diminution of CR induced by contaminants/PAHs exposure had already been recorded (Kim et al., 2007; Toro et al., 2003; Widdows et al., 1982, 1983, 1985, 1988). Widdows and Johnson (1988) also reported a relationship between declining CR and increasing concentration of aromatics hydrocarbons in the body tissues of *Mytilus edulis*, their lowest concentration inducing no variation of CR. This dose dependence adjustment of the CR was also recorded in our study, as the bioaccumulation magnitude was AWB < CLB < Heidrun. An increase CR can be due to depuration purpose (Kim et al., 2007) while it is not clear if the physiological reaction of slowing down the CR is induced by a variation of ciliary activity due to narcotic effects of PAHs (Donkin et al., 1989) or if it is a biological response to minimize the PAHs intrusion (Jeong et al., 2007; Kim et al., 2007). As noted by Redmond et al., (2016), exposure to diluted hydrocarbons induce an important portion of non-filtering individuals as seen in our study. We observed individuals with CR less than  $0.1 \text{ L h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  with the Heidrun and CLB treatments, contrary to control and the AWB.

Respiration rate ( $\text{VO}_2$ ) biomarker show no significant influence of the oil treatments when compared to control mussels. The lowest mean was observed within the Heidrun treatment which also induced the higher total PAHs bioaccumulation. Camus et al., (2003) recorded similar low  $\text{VO}_2$  variations between control and oil-contaminated sediments with *Mya truncata* in cold water, mentioning that those observations seem strategic for polar bivalves facing long starvation period. Observation of low  $\text{VO}_2$  can be also partially explained by the high proportion of closed individuals (Widdows et al., 1988) as already mentioned for the CR and the reduced metabolism of mussels at temperature below  $0^\circ\text{C}$ .

The assimilation efficiency (AE) biomarker was the only one showing a similar response from each oil treatments, displaying higher values than the control mussels with significant differences with the two dilbit (CLB and AWB). However, based on observations from different authors, the AE should reduce with important petroleum hydrocarbons

exposure (Jeong et al., 2007; Redmond et al., 2016; Strohmeier et al., 2012; Toro et al., 2003). As exposed by Jeong and Cho (2007), absorption efficiency is highly connected with assimilation of food and fluid in digestive diverticula of bivalves while PAHs exposure can induce pathologic changes in digestive gland and lysosomal membrane stability (Lowe et al., 1981; Lowe and Clarke, 1989; Moore, 1988; Toro et al., 2003). Redmond et al., (2016) also mentioned that healthy mussels had AE values ranging from 60% to 100%, regardless of treatment, all our values were in this range. Our hypothesis is that really low seawater temperature during the first sampling event induced lower AE values for the control treatment (-2.5°C comparatively to -1°C for oil treatments).

The total SFG biomarker showed no significant differences between oil treatments and control. Overall, negative values found for all treatments is normal due to the energy request caused by the low temperature. SFG is highly affected in proportion to the degree of pollution (Toro and Palma-Fleming, 2003) or more precisely PAHs exposure (Jeong et al., 2007; Kim et al., 2007; Widdows et al., 1988). Being a dose dependent biomarker, it is possible that the dissolved hydrocarbons concentration was too low to induce a significant impact on the SFG values from the oil treatments. Another hypothesis is that during winter with really cold seawater temperature, physiological parameters monitored by the SFG analysis showed minimal variation probably due to the winter metabolism slowdown undergo by bivalves. Punctual and short winter exposure to low concentration of petroleum hydrocarbons could induce subtle variation being difficult to detected with the high inter-group variation.

On cellular level, adult's mussels show a response immediately after the exposure for all oil treatments, indicating significant level of stress. However, one month after the exposure, treatment effects were not observed. Neutral red retention assay has been classified as useful and efficient screening technique able to discriminate polluted from clean sites relying on its capacity to respond to chemical challenges (Martins et al., 2005) and oil exposure (Hwang et al., 2008). Lysosomal activity being directly related to immunoreactivity in bivalves (lysosomes playing a key role in degradation of phagocytosed materials) their effectiveness is vital to protect the animals against diseases, which can potentially induce

adverse effects, such as histopathological, developmental, and reproductive abnormalities or worst mortality and population decline (Grundy et al., 1996; Hwang et al., 2008; Martins et al., 2005). Lipophilic compounds, as PAHs, will likely enter the lipid bilayers impacting the membrane permeability and fluidity (Moore and Viarengo, 1987). With *Mytilus edulis* exposed to phenanthrene (PAHs), destabilizing effects on the lysosomal membrane seems to be triggered by a critical concentration accumulated by the lysosome (Moore et al., 1987). This can explain the significant lysosomal destabilization observed right after the exposure opposed to the absence of response one month later, when the mussels had already eliminated more than half of their accumulated hydrocarbons.

Byssus thread width show an important effect of treatment and time, the control mussels always having the higher byssal thickness compared to oil treatments. Byssus secretion is a dynamic process influenced by both exogenous and endogenous factors and can induce high energy needs that can compete with other physiological functions in term of energetic demand (Babarro and Reiriz, 2010; Zardi et al., 2007). Energy allocation towards byssogenesis can represent a limiting action for mussels with weak energy status and experiencing stressful events (ex: spawning) (Babarro et al., 2010; Lachance et al., 2008). A decrease in byssal thickness indicates a potential individual energy trade-off to more important metabolic pathways potentially related to oil exposure (ex: hydrocarbons depuration). Byssal thread play an important role to anchor mussels in their environment and while their shrinkage can be a direct effect of the winter oil exposure on energy allocation strategy, the potential detachment of mussels from their substrate can be seen as indirect harmful consequences of an oil spill. As byssus thickness morphology secreted under different endogenous conditions is the major parameter to explain variability in attachment force (Babarro et al., 2010) tinier byssal thread can provoke easier mussel detachment. In addition, loosen mussels have been observed increasing their metabolic and physiological functions to produce new byssal thread when exposed to contaminants (Rajagopal et al., 2005). Considering that a winter oil spill already causes higher energy demand in a harsh period of the year, production of new byssus thread can worsen physiological integrity that had already been battered.



### **2.4.3 Breeding processes and offspring biological response – ecological integrity and resilience**

While adult's mussel's individuals show a good resilience to a seven days winter exposure under ice, the ecological resilience seems strongly at risks. Gametogenesis was seriously impaired for female mussel with omnipresence of atresia (sometimes over 40%) and low proportion of viable oocytes. Even with a pre-breeding conditioning period of genitors (one-month, increased temperature, continuous distribution of food), hard throwback of the seven days winter exposure has been recorded. Bivalves histological analysis can be an useful tool to asses ecotoxicity monitoring in polluted environment (Aarab et al., 2008, 2011; Smolarz et al., 2017). Inflammation, necrosis and atrophy of gonadal cells were some of the effects measured with *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* exposed to crude oil spill (Berthou et al., 1987). Multiple toxic effects on *Mytilus edulis* have also been recorded as haemocytic infiltration of follicles, severe oocyte atresia or neoplasia (Aarab et al., 2011, 2004; Bignell et al., 2011; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011, 2006; Smolarz et al., 2017). Atresia in female gonad is triggered when spawning cope with harsh environmental conditions after gamete ripening occurs and is associated with over-maturation of gametes leading to the end of gametogenic cycle, degeneration and resorption of gonadal tissue (Smolarz et al., 2017). Degeneration of ovaries has also been recorded in fish exposed to PAHs inducing reproductive defects (Vignet et al., 2016).

In addition to gonadal impairment, effects of PAHs were still visible several weeks after spawning occurred. The control treatment showed normal gametes production, with normal larvae development and survival rate. Adults exposed to conventional oil treatment produced less gametes coupled with impaired larvae development, while larvae survival was not affected. In contrast, mussels exposed to dilbit produced fewer gametes, in addition with negative impacts on larvae development and survival. Larvae growth, for all oil treatments, was hardly impacted with larvae size lagging 5-days behind the control treatment after 9-days of growth. Those strong effects of oil exposure, particularly dilbit on adult mussel

several weeks before spawning, proved strong transgenerational effects of a winter oil exposure under ice. Impacts on spawning parameters seem to be directly linked with gametogenesis alterations, however others toxic mechanisms or pathways can be involved. Studies of direct toxic effects of PAHs on adults, eggs, embryos or larvae being widespread, opposed to wider approach from exposed parent to effect on un-exposed offspring, inference regarding transgenerational toxic effects should be cautious. Toxic effects of PAHs to subsequent generations can be induced by environmental exposure, through maternal transfer or both. Embryotoxicity has been linked with direct exposure of gametes, embryos or larvae to petroleum hydrocarbons with fish (Colavecchia et al., 2004; Hodson, 2017; Knecht et al., 2017; Sogbanmu et al., 2016; West et al., 2014) and bivalves (Bellas et al., 2013; Geffard Olivier; Budzinski, 2004; Vignier et al., 2015, 2016, 2017; Wessel et al., 2007). PAHs are known to accumulate in fish eggs, due to their high content in lipids, and being transfer to offspring (Knecht et al., 2017; Sun et al., 2015; West et al., 2014) and in copepods eggs (Hansen et al., 2017). Precise PAHs congeners (fluoranthrene, benzo-a-pyrene) have also been linked to maternal transfer from benthic adults to pelagic larvae inducing toxicity in *Crassostrea gigas* and *Mulinia lateralis* (Choy et al., 2007; Pelletier et al., 2000). In fish, transgenerational PAHs effects on un-exposed offspring were linked to behavioral disruption, physiological changes, reduce larval survival, coupled with severe impact on reproduction success and ovary development (Knecht et al., 2017; Sun et al., 2015; Vignet et al., 2015; White et al., 1999). While in bivalves, transgenerational effects targeted many biological endpoints such as hatching rate, larval growth, abnormal morphogenesis, embryogenic survival and settlement success (Choy et al., 2007; Pelletier et al., 2000). Even in sea urchin (*Evechinus chloroticus*), adults female exposed to PAHs mixture showed increased oxidative protein and lipid damage in gonad tissue coupled with lower fecundity and morphological abnormalities in produced embryos (Lister et al., 2017). Thus, severe impairments on breeding endpoints as seen in our study can be the outcome of different toxic mechanisms such as (i) direct cytotoxic effect on both female gonads or spawned gametes/embryos (ii) an endocrine disrupting effect resulting in alteration of signaling molecule/hormone (iii) DNA damage disrupting effect. While exact mechanism can be hard

to highlight without precise and standardized endpoints measurements, a strong transgenerational toxic effect of PAHs compounds is evident in our study. A cascade effect from the winter exposure and gonadal impairments followed by lower gamete production and impaired larval metamorphosis, survival and growth show the potentially disastrous long-term consequences that oil spill can induce on natural populations. Diluted bitumen exposure resulted in lower bioaccumulation of PAHs but induced higher biological consequences on every single endpoint measured when compared to conventional oil. Essentially, a small (1:1000 crude oil:seawater dilution) and short (7-day exposure) oil exposure during winter followed by months of rehabilitation in clean seawater can still induce strong effects on reproduction and jeopardize the ecological integrity and resilience even if adults individuals seems to recuperate.

#### **2.4.4 Differential toxic effects – Conventional oil v.s. diluted bitumen (dilbit)**

Unlike adult physiological parameters being less reactive, biomarkers linked to breeding showed strong toxic effects of oil exposure with higher impacts from the diluted bitumen oil treatment. Some authors stated that dilbit toxicity can be less or similar to conventional crudes (Philibert et al., 2016). Our results clearly show opposite trends with higher impact of dilbit on reproduction biomarker (gametes, larvae survival, and development). Surprisingly, adults exposed to dilbit several weeks before spawning showed lower bioaccumulation of total PAHs. To understand which toxic compounds found in dilbit could induce this higher effect, it must match some premises as being bioavailable to adult's mussels and interacting with reproduction endpoints. The higher toxicity of dilbit could result of (i) an unmeasured toxic chemical found in dilbit blend or (ii) a distinct PAHs congener/family with higher toxicity found only (or in higher proportion) in dilbit blend. Like other crude oils, dilbit contains numerous chemicals known to be toxic, including metals, naphthenic acids, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Alderman et al., 2017). Proportionally compared to conventional crudes, bitumen will have lower content of

saturates, higher concentration of resins and asphaltenes but similar proportion of aromatics (Woods et al., 2008). It is unlikely that toxicity effects can be associated with heavy molecular weight aromatics (resins, and asphaltenes) due to low potential of crossing biological membranes (Lee et al., 2015). To allow pipeline transport, bitumen will be blend with condensate diluent, generally gas, which result in a complex dilbit mixture (Alderman et al., 2017). The addition of diluents enhances the proportion of low molecular weight hydrocarbons (Alderman et al., 2017), surely affecting both dissolved fraction composition and toxicity. Chemical screening analysis of diluted bitumen already showed that C0- to C3-naphthalene isomers are all detected in appreciable concentrations in the diluted bitumen, being mainly added by the diluent (Yang et al., 2018).

A first potential group of toxic compounds are the naphthenic acids which are find in dilbit and oil sands, in higher proportion than in conventional crudes, and have been associated with toxic effects (Marentette et al., 2015). In fish they can induce endocrine disruption, potentially due to their structural similarities with steroid hormones (Rowland et al., 2011) but also reduced fecundity (Kavanagh et al., 2012) gill inflammation and structural changes (He et al., 2012). With early life stage assays, naphtenic acids showed toxic effects on multiple species embryos and larvae, as mortality and developmental abnormalities (Marentette et al., 2015).

A second potential group of toxic compounds are the alkylated PAHs congeners. The 3-5 ringed Alkylated-PAHs, are components of oil that were related to chronic embryotoxicity (Hodson, 2017), while some studies on unweathered dilbit associated fish embryotoxicity effects to, among others, alkyl-PAHs (Hodson, 2017; Madison et al., 2015). Within a family of PAHs compounds, an increase of toxicity severity was associated with the number of alkyl carbon atoms; while different significant effects on embryotoxicity between different PAHs congeners was also correlated with the pattern of alky substitution (Hodson, 2017). In dilbit blend, alkylated PAHs congeners were found to be more abundant than non-alkylated PAHs ones in the dissolved water fraction, often equal to an 10-100 folds increase (Yang et al., 2018).

Bitumen seems not to be more toxic than conventional oil in their unmixed form, mainly due to the lower proportion of potential bioavailable toxic compounds. They include toxic compounds but with low possibility to find them in the dissolved water fraction, their potential toxicity to aquatic species is minimal. In contrast, the addition of diluent to allow flowing bitumen, not only spiked the final blend with known toxic compounds but also allows the rapid discharge of those highly toxic compounds to aquatic environments. Those low molecular weight hydrocarbons pose a strong threat to biota in the case of spill because they will be the first to solubilize or evaporate with the rapid weathering of dilbit, sometimes in less than 48h (King et al., 2017). While the added PAHs fraction from diluent is very complex, diverse and variable, some congeners seem to stand out more than others due to their greater proportion than in others crude and in term of deleterious effects on reproduction: the naphthenic acids and alkylated PAHs. Even if our study lacks direct and standardized methods to assess the toxic effects of those suspected congeners, limiting our cause-effect assumption, those PAHs probably play a relevant part in the exacerbates toxic effects induce by dilbit exposure. Coupled with the noxious potency of diluent, the presence of an ice layer separating the oil from direct contact with air, could have impact oil evaporative mechanisms. Therefore, modelling bioavailability of light weight petroleum hydrocarbons, which generally quickly vanish after spill.

## **2.5 CONCLUSION**

Actual expansion desire from the Canadian oil industry to reach new domestic and international markets, increase spill pressure on ecosystems. Tankers traffic is foreseen on the rise to sustain actual and future growing market demand, which also increase spill risk. In eastern Canada, the St-Lawrence waterway is seen as a perfect way out for the unconventional crude oil produce from the oil sand. The St-Lawrence is also a rich and diverse ecosystem sustaining many major economics activities as tourism or aquaculture and characterized by a rude winter season inducing cold temperatures and an important ice cover.

In the case of a winter oil spill with an ice cover, our study help understands the potential environmental consequences on both exposed individuals and their offspring's. While during a physiological slowdown period for adult's mussels, bioaccumulation was remarked after only 72h with higher values induced by conventional oil over diluted bitumen. Even with a good resilience of physiological parameter (clearance rate,  $VO_2$ , SFG) from exposed adults, hemocytes cellular stress, byssal thread shrinkage and gametogenesis impairment show important toxic consequences that can strongly affect population integrity over time. Several weeks later in spring, breeding was induced, and toxic effects were still visible even with plenty of recovery time allow to genitors. Impacts on gametes as well as on larvae survival and development were evident for both oil classes but stronger with the two diluted bitumen crudes. In the case of a winter oil spill with an ice cover, potential biological and ecological disastrous effects must be expected. Even if adult's individual's resilience seems to be good, effects on energy budget, immune system and gametogenesis are evident and put at risk more than the individuals but the entire population and community. Important transgenerational effects observed on breeding processes and larvae produced support that those emerging crude oils pose great threats to the entire population, community and ecosystem resilience and their integrity over time.

Those results show strong toxic potential from already well documented conventional oil but also for newly study diluted bitumen coming from the Canadian oil sand. Even worse, diluted bitumen were associated with stronger negative effects on majority of biomarkers studied. Diluent being used by industry and composed of lighter hydrocarbons is the first suspect for this augmented toxicity, but further exploration is needed. Toxic assays using precise isolated fraction of crudes oil can help understand and identify which hydrocarbons fraction can induce this higher toxic potential.

## DISCUSSION - CONCLUSION GÉNÉRALE

La volonté actuelle de l'industrie pétrolière canadienne d'étendre ses moyens d'acheminements de pétroles bruts vers de nouveaux marchés nationaux et internationaux est réelle. Des investissements conséquents en capitaux permettent de soutenir plusieurs grands projets d'exportation pour sortir efficacement et en grande quantité les produits bruts des sables bitumineux par l'Est, l'Ouest, le Sud et le Nord du pays. En plus des projets d'oléoducs terrestres, le transport maritime de bitume dilué est favorisé pour atteindre les marchés asiatiques où la demande énergétique est prévue à la hausse. Déjà qu'une potentielle interférence avec d'autres activités nautiques est à prévoir, les risques de déversement sont réels et augmenteront conséquemment avec la hausse du transit pétrolier (Canadian Association of Petroleum Producers, 2018; Crosby et al., 2013; King et al., 2014). Le contexte environnemental canadien, et de ses voies navigables, impliquent obligatoirement de considérer avec attention l'éventualité d'un déversement en pleine saison froide. Bien qu'un déversement en période estivale représenterait tout autant une catastrophe majeure, les connaissances scientifiques quant aux conséquences toxicologiques néfastes sur l'environnement d'un tel événement sont davantage abouties et solides. À l'inverse dans le cas d'un déversement pétrolier hivernal, bien peu de connaissances scientifiques existent, les principales ayant été obtenues grâce au suivi mis en place après la tragédie de l'Exxon Valdez. Ce fait peut paraître contre-intuitif puisque les communautés retrouvées en milieux froids sont davantage fragiles et moins résilientes, conséquence directe des conditions environnementales rudes (Brandvik et al., 2009; Chapman et al., 2003, 2005; Fingas et al., 2003; Gerdes et al., 2005; Hannam et al., 2010; Jörundsdóttir et al., 2014). Sans oublier que la présence de glace en surface influencera nécessairement le comportement d'un pétrole déversé en plus d'influencer la fraction d'hydrocarbures biodisponibles et les patrons d'exposition et d'accumulation des organismes vivants (Atlas et al., 1978; Faksness et al., 2008; Yang et al., 2009, 2015). Donc, dans l'éventualité d'un déversement de bitume dilué

albertain en condition hivernale, nous serions totalement dans l'inconnu quant au devenir de la nappe d'hydrocarbure et de ses effets toxiques directs et indirects sur l'environnement et les écosystèmes touchées.

### **Caractéristiques propres à l'exposition**

Afin de réaliser cette étude dans des conditions les plus proches du milieu naturel dans lesquelles un déversement hivernal pourrait se produire, l'exposition aux différents pétroles testés s'est déroulée en mésocosme. Situé à seulement quelques dizaines de mètres de l'Estuaire maritime à la station aquicole de Pointes-aux-pères, ce dernier était rempli d'eau provenant directement du milieu naturel. L'exposition aux mêmes conditions météorologiques qui s'abattaient sur le Saint-Laurent a permis l'apparition d'un couvert de glace important et d'effectuer l'ensemble des expositions aux différents pétroles dans un contexte environnemental extrêmement fidèle à la réalité tout en évitant toute contamination du milieu naturel. Les conditions environnementales rudes ont également fortement influencé les activités de nettoyages, particulièrement dans le cas des bitumes dilués, dont la viscosité était décuplée par les températures fortement négatives. Bien que le pétrole Heidrun (classique) ait été aisément nettoyé à l'aide d'eau chaude sous pression, les bitumes dilués (CLB et AWB) ont engendré un report des expositions subséquentes dû à la complexité de leur nettoyage. L'eau chaude sous pression ne suffisant plus, il était nécessaire d'appliquer une puissante solution dégraissante en plus d'appliquer une forte action abrasive (laine d'acier) sur l'ensemble pour déloger les dépôts. D'autant plus que la surface intérieure lisse du mésocosme limitait tout de même beaucoup l'adhérence du pétrole. Sans même s'attarder encore aux effets toxiques engendrés par un déversement de bitumes dilués, la charge de travail associée au nettoyage de ces pétroles bruts était considérablement plus importante que le pétrole conventionnel, la même observation a d'ailleurs été formulé par King et al., (2017). Sans oublier que le déversement provoqué dans le cadre de notre étude ne représentait qu'un « maigre » volume de 3,5 litres, lorsque l'on s'attarde aux capacités de transport par oléoducs ou par pétroliers, il s'agit de volumes bien plus importants dépassant aisément le



million de barils (1 baril = 159 litres) par navire ou jour dans les cas des oléoducs. Si ce genre de déversement venait à se produire en milieu naturel, les coûts, la main-d'œuvre ainsi que le temps nécessaire pour compléter le nettoyage seraient totalement hors-normes, sans même encore considérer les conséquences économiques et environnementales subséquentes associées aux effets toxiques de ce déversement. Les bitumes dilués dont la composition chimique a été altérée (évaporation ou dilution des composés les plus légers) durant les premiers jours ont laissé place à un bitume très dense et extrêmement collant. Les hydrocarbures les plus légers s'évaporent très rapidement, généralement dans les premières 48 heures (King et al., 2017, 2015). Fort probablement dépouillée des hydrocarbures associés au diluant, la fraction résiduelle présente au nettoyage était possiblement composée en forte proportion par des hydrocarbures volumineux comme les résines et asphaltènes. Le tout était bien sûr fortement amplifié par les conditions environnementales froides qui influencent directement la densité et viscosité des produits pétroliers. Les bitumes dilués sont d'ailleurs vulnérables à de rapides changements de leur viscosité ce qui influence et complexifie la sélection des options associées à une réponse post-déversement (King et al., 2017). Pour éviter toutes contaminations du milieu environnant, l'ensemble de l'eau contaminée associée à l'exposition et au nettoyage en plus de la glace a été filtré sur charbon activé en suivant attentivement la concentration en hydrocarbures de l'exutoire (suivie de la fluorescence des hydrocarbures avec la sonde Cyclops 7 et son capteur « O », Turner Design, USA). Il est également important de noter que la filtration des eaux souillées provenant des expositions aux bitumes dilués a également été davantage fastidieuse que dans le cas du pétrole classique. Une plus grande quantité de charbon activé a été nécessaire pour obtenir une eau décontaminée dans le cas du CLB et du AWB. La densité élevée du bitume résiduel après son altération a entraîné par moment l'entrée de pétrole directement dans le système de filtration situé au point le plus profond du mésocosme, ce qui a engendré l'arrêt immédiat de la filtration, le nettoyage du filtre en plus de nécessiter l'usage de nouvelle fraction de charbon activé.

Les conditions particulières d'exposition ont impliqué l'emploi d'un système fermé pour la totalité des sept jours d'exposition pour éviter toute contamination à l'extérieur du

mésocosme. Dans ce contexte il a été fort agréable de remarquer la réussite d'une exposition sous-létale dans ces conditions complexes. En effet, bien qu'une plus forte mortalité ait été associée aux traitements d'exposition aux pétroles, elle n'a jamais dépassé le 20%. À l'inverse, un manque total de réponse due soit à un comportement d'évitement des individus (fermeture des valves) ou une sous-estimation de la quantité de pétrole nécessaire aurait également pu se produire.

### **Modèle d'étude**

La moule bleue s'est également révélée un excellent modèle d'étude, une fois de plus, dans un contexte écotoxicologique. En plus de justifier son utilisation de par son importance économique et sa caractéristique d'être une espèce ingénieure et sentinelle de l'écosystème maritime du Saint-Laurent. Capable de filtrer activement de grand volume d'eau, la moule tolère relativement bien la présence de contaminants tout en métabolisant difficilement les hydrocarbures ce qui permet un suivi adéquat des concentrations de contaminants dans le milieu et leurs effets toxiques, sans toutefois subir trop de mortalité (Beyer et al., 2017; Cuevas et al., 2015; Kasiotis et al., 2015; Ortiz-Zarragoitia et al., 2011; Smolders et al., 2003). Sa facilité de maintien en laboratoire, d'échantillonnage ainsi que de sa reproduction ont également été un atout de taille pour mener à bien cette étude. Au regard des résultats obtenus tant sur les individus adultes que sur leurs larves, les individus exposés ont réagi tel qu'espéré. Une période d'exposition complexifiée par la présence de glace et les conditions environnementales rudes aurait pu découler sur une absence totale de réponse ou encore la perte de la totalité des individus exposés. À l'inverse, une faible mortalité a permis d'assurer le bon déroulement de la succession des périodes d'échantillonnages jusqu'à la reproduction et la finalité avec les larves produites. Le tout couplé à des effets sous-létaux notables permettant de statuer avec assurance sur la toxicité de ces pétroles dans un contexte de déversement pétrolier hivernal. Dans le contexte écologique du St-Laurent, la moule bleue subit un stress thermique et nutritionnel durant la période froide qui l'amène à réduire ses besoins énergétiques (Pernet et al., 2007). En plus de devoir assurer ses fonctions basales, les

moules débutent également leur gamétogénèse (Lemaire et al., 2006). Dans ce contexte difficile, toutes modifications du budget énergétique, aussi petites soient-elles, peuvent engendrer des répercussions physiologiques importantes. Une exposition de courte durée à des contaminants aurait donc pu se solder par un manque de réponse totale si les individus avaient décidé d'éviter passivement la présence d'hydrocarbures en se refermant durant la totalité de l'exposition. Ou encore à l'extrême par une mortalité de masse si la quantité de pétrole employée avait été surévaluée. Les individus exposés ont également pu être aisément maintenus en système ouvert par la suite tout en permettant la récolte d'une multitude d'échantillons à différents niveaux physiologiques, durant tout le suivi hivernal. Au printemps, plusieurs semaines après l'exposition aux pétroles, lors de la préparation à la reproduction encore une fois le maintien des individus ainsi que leur échantillonnage durant la ponte et par la suite sur les larves a été relativement simple et efficace.

La moule bleue est également une espèce fortement étudiée que ce soit dans un contexte semblable au nôtre en écotoxicologie ou tout autre domaine, assurant des connaissances scientifiques abouties sur cette espèce. D'autant plus que cette dernière demeure un animal relativement simple, mais suffisamment complexe, pour se prêter à ce genre d'étude. Cette solide littérature scientifique a donc permis de sélectionner une diversité de biomarqueurs pour adéquatement mesurer les effets toxiques d'une exposition hivernale à un déversement pétrolier. De la cellule seule jusqu'à l'individu tout en passant par les tissus et organes, une multitude d'analyses a permis de cibler les différents niveaux hiérarchiques du vivant. L'analyse du stress cellulaire des hématocytes par la méthode du rouge neutre a permis de mettre en évidence un effet toxique rapide des pétroles sur la réponse immunitaire des moules. En suivant les paramètres physiologiques primordiaux comme la respirométrie, le taux de filtration et l'assimilation de la nourriture, il a été possible de calculer le budget énergétique des individus et de remarquer un effet des pétroles sur ces biomarqueurs. La récolte de filaments de byssus par la suite analysé en microscopie a démontré un effet négatif sur la largeur de ces derniers suffisamment importants pour mettre en péril la capacité de maintien des individus. L'échantillonnage, le montage puis l'analyse histologique de tissus gamétique a permis de suivre le développement gamétogénique hivernale et de découvrir

d'importants effets toxiques sur l'ovogenèse présageant le pire pour la reproduction à venir. Le suivi de la reproduction à partir des gamètes produits puis des larves jusqu'à l'âge de neuf jours a permis de remarquer des effets toxiques transgénérationnels au niveau de la survie et du développement de ces dernières. Cette batterie d'analyses sur différents biomarqueurs a non seulement offert un portrait général de l'intégrité des individus étudiés en plus de permettre de recentrer le tout dans un cadre plus général de résilience et pérennité des populations et communautés. Cette approche a permis de remarquer des effets toxiques préoccupants et tardifs qui aurait pu aisément passer sous radar si le suivie avait été de plus courte durée et exclusivement sur les individus adultes. Si un déversement pétrolier se produisait en hiver avec présence de glace, ce ne serait donc pas seulement les adultes exposés qui en subiront les impacts, mais également les générations subséquentes mettant à risque la pérennité de ces communautés.

### **Lacune de l'étude**

L'usage d'un unique mésocosme pour effectuer les expositions a été critiqué lors de la présentation du projet à la communauté scientifique de l'Institut des Sciences de la Mer de Rimouski (ISMER). Cette lacune représentait notre principal défi concernant cette étude et a donc été adéquatement calculée et intégrée dans la planification expérimentale. L'usage d'un mésocosme d'exposition pour chaque traitement, en plus d'une réplication des expositions pour chaque traitement, aurait été souhaitable. Cependant, la réalité économique, temporelle et concernant la main-d'œuvre ne le permettait pas. Avec les subventions rattachées au projet, seules deux avenues étaient envisageables pour pouvoir répliquer les expositions. (1) La diminution du volume des bassins employés et du nombre d'individus aurait été possible en limitant l'étendue de l'extrapolation sur l'écosystème du St-Laurent tout en dénaturant fortement le désir de reproduire le plus fidèlement possible un déversement d'importance. (2) L'allègement du plan d'échantillonnage et des analyses subséquentes aurait certes permis un plan expérimental avec répliques des expositions, mais aurait grandement nui à la précision ainsi qu'à la qualité des livrables de cette étude. Après réflexion, il a donc été décidé

de maintenir une exposition sans réplication tout en renforçant le plan d'échantillonnage et d'analyses pour assurer une confiance, une reproductibilité ainsi qu'une comparabilité que nous avons jugé suffisante. Un suivi strict des conditions abiotiques pendant l'exposition a permis de s'assurer que ces dernières se sont toutes déroulées dans des conditions environnementales équivalentes. La diversification des biomarqueurs analysés permet de déceler plus aisément un signal diffus tout en permettant une validation croisée des méthodes et résultats lorsque différents biomarqueurs réagissent de pair avec une direction et une amplitude comparable. Finalement, l'application d'un protocole stricte avec une réplication des individus analysés à chaque période d'échantillonnage et d'analyse assure la perception d'un signal clair engendré par le traitement tout en limitant au maximum les interférences potentielles reliées à la variabilité intraspécifique.

### **Conclusion et Perspectives**

Cette étude a permis l'obtention de données scientifiques solides sur les conséquences d'un déversement de pétrole en condition hivernale avec couverture de glace, sur la moule bleue ainsi que sa progéniture. Une bioaccumulation d'hydrocarbures après seulement 72h en période de ralentissement physiologique hivernale a engendré une multitude d'effets toxiques mesurés. Une bioaccumulation différentielle a été premièrement remarquée entre les classes de pétrole avec une forte accumulation d'hydrocarbures engendré par le pétrole classique contrastant avec les bitumes dilués. Cependant, malgré cette plus faible bioaccumulation, les bitumes dilués albertains ont engendré des effets toxiques plus importants sur la majorité des biomarqueurs ciblés. Bien qu'au premier abord, une bonne résilience des individus adultes a été observée, des effets marqués sur le stress cellulaire, la largeur des byssus et la gamétogénèse laissent présager le pire. En effet, plusieurs semaines plus tard au printemps, des effets toxiques transgénérationnels importants ont été remarqués sur les gamètes ainsi que sur la survie et le développement des larves produites. L'ensemble de ces résultats montrent clairement le potentiel toxique déjà bien documenté pour les pétroles classiques, mais relativement nouveaux dans le cas des pétroles émergents comme

les bitumes dilués. Dans le cas d'un déversement pétrolier hivernal avec présence d'un couvert de glace sur la moule bleue, les effets immédiats sur les individus exposés sont remarquables quoique moins dramatiques que ceux reliés au maintien d'une communauté dans le temps. Les effets toxiques indirects remarqués sur le système immunitaire, le budget énergétique ou encore sur la reproduction, la survie et le développement des larves mettent fortement à risque l'intégrité et la résilience des populations et communautés qui occupent cet écosystème complexe qu'est le Saint-Laurent.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarab, N., B. F. Godal, and R. K. Bechmann. 2011. "Seasonal Variation of Histopathological and Histochemical Markers of PAH Exposure in Blue Mussel (*Mytilus Edulis* L.)." *Marine Environmental Research* 71(3):213–17.
- Aarab, N., C. Minier, S. Lemaire, E. Unruh, P. D. Hansen, B. K. Larsen, O. K. Andersen, and J. F. Narbonne. 2004. "Biochemical and Histological Responses in Mussel (*Mytilus Edulis*) Exposed to North Sea Oil and to a Mixture of North Sea Oil and Alkylphenols." *Marine Environmental Research* 58(2–5):437–41.
- Aarab, N., D. M. Pampanin, A. Nævdal, K. B. Øysæd, L. Gastaldi, and R. K. Bechmann. 2008. "Histopathology Alterations and Histochemistry Measurements in Mussel, *Mytilus Edulis* Collected Offshore from an Aluminium Smelter Industry (Norway)." *Marine Pollution Bulletin* 57(6–12):569–74.
- Alberta Oil Sand Industry. 2017. "Oil Sands Industry Quarterly Update." Retrieved from [http://www.albertacanada.com/files/albertacanada/AOSID\\_QuarterlyUpdate\\_Summer2018.pdf](http://www.albertacanada.com/files/albertacanada/AOSID_QuarterlyUpdate_Summer2018.pdf)
- Alderman, S. L., L. A. Dindia, C. J. Kennedy, A. P. Farrell, and T. E. Gillis. 2017. "Proteomic Analysis of Sockeye Salmon Serum as a Tool for Biomarker Discovery and New Insight into the Sublethal Toxicity of Diluted Bitumen." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 22(April):157–66.
- Alderman, S. L., F. Lin, A. P. Farrell, C. J. Kennedy, and T. E. Gillis. 2017. "Effects of Diluted Bitumen Exposure on Juvenile Sockeye Salmon: From Cells to Performance." *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(2):354–60.
- Alsaadi, F., P. V. Hodson, and V. S. Langlois. 2017. "An Embryonic Field of Study: The

- Aquatic Fate and Toxicity of Diluted Bitumen.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 0(0):0.
- Archambault, P., P. V. R. Snelgrove, J. A. D. Fisher, J. M. Gagnon, D. J. Garbary, M. Harvey, E. L. Kenchington, V. Lesage, M. Levesque, C. Lovejoy, D. L. Mackas, C. W. McKindsey, J. R. Nelson, P. Pepin, L. Piché, and M. Poulin. 2010. “From Sea to Sea: Canada’s Three Oceans of Biodiversity.” *PLoS ONE* 5(8).
- Atlas, R. M., A. Horowitz, and M. Busdosh. 1978. “Prudhoe Crude Oil in Arctic Marine Ice, Water, and Sediment Ecosystems: Degradation and Interactions with Microbial and Benthic Communities.” *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35(5):585–90.
- Axelman, J., K. Naes, C. Naf, and D. Broman. 1999. “Accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Semipermeable Membrane Devices and Caged Mussels (*Mytilus Edulis* L.) in Relation to Water Column Phase Distribution.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2454–61.
- Axiak, V. and J. J. George. 1987. “Bioenergetic Responses of the Marine Bivalve *Venus Verrucosa* on Long-Term Exposure to Petroleum Hydrocarbons.” *Marine Environmental Research* 23(1):33–47.
- Babarro, J. M. F. and M. J. F. Reiriz. 2010. “Secretion of Byssal Threads in *Mytilus Galloprovincialis*: Quantitative and Qualitative Values after Spawning Stress.” *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 180(1):95–104.
- Balcioğlu, E. B. 2016. “Potential Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Marine Foods on Human Health: A Critical Review Potential Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Marine Foods on Human Health: A Critical Review.” 9543(August).
- Barron, M. G., R. N. Conmy, E. L. Holder, P. Meyer, G. J. Wilson, V. E. Principe, and M.



- M. Willming. 2018. "Toxicity of Cold Lake Blend and Western Canadian Select Dilbits to Standard Aquatic Test Species." *Chemosphere* 191:1–6.
- Baussant, T., R. K. Bechmann, I. C. Taban, B. K. Larsen, A. H. Tandberg, A. Bjørnstad, S. Torgrimsen, A. Nævdal, K. B. Øysæd, G. Jonsson, and S. Sanni. 2009. "Enzymatic and Cellular Responses in Relation to Body Burden of PAHs in Bivalve Molluscs: A Case Study with Chronic Levels of North Sea and Barents Sea Dispersed Oil." *Marine Pollution Bulletin* 58(12):1796–1807.
- Baussant, T., M. Ortiz-Zarragoitia, M. P. Cajaraville, R. K. Bechmann, I. C. Taban, and S. Sanni. 2011. "Effects of Chronic Exposure to Dispersed Oil on Selected Reproductive Processes in Adult Blue Mussels (*Mytilus Edulis*) and the Consequences for the Early Life Stages of Their Larvae." *Marine Pollution Bulletin* 62(7):1437–45.
- Baussant, T., S. Sanni, G. Jonsson, A. Skadsheim, and J. F. Børseth. 2001. "Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Compounds: 1. Bioconcentration in Two Marine Species and in Semipermeable Membrane Devices during Chronic Exposure to Dispersed Crude Oil." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6):1175–84.
- Bayne, B. L. 1999. "Physiological Components of Growth Differences between Individual Oysters (*Crassostrea Gigas*) and a Comparison with *Saccostrea Commercialis*." *Physiological and Biochemical Zoology : PBZ* 72(6):705–13.
- Bellas, J., L. Saco-álvarez, Óscar Nieto, J. M. Bayona, J. Albaigés, and R. Beiras. 2013. "Evaluation of Artificially-Weathered Standard Fuel Oil Toxicity by Marine Invertebrate Embryogenesis Bioassays." *Chemosphere* 90(3):1103–8.
- Berney, M., F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann, and T. Egli. 2007. "Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry." *Applied and Environmental Microbiology* 73(10):3283–90.
- Berthou, F., G. Balouët, G. Bodennec, and M. Marchand. 1987. "The Occurrence of

- Hydrocarbons and Histopathological Abnormalities in Oysters for Seven Years Following the Wreck of the Amoco Cadiz in Brittany (France).” *Marine Environmental Research* 23(2):103–33.
- Beyer, J., N. W. Green, S. Brooks, I. J. Allan, A. Ruus, T. Gomes, I. L. N. Bråte, and M. Schøyen. 2017. “Blue Mussels (*Mytilus Edulis* Spp.) as Sentinel Organisms in Coastal Pollution Monitoring: A Review.” *Marine Environmental Research* 130:338–65.
- Beyer, J., H. C. Trannum, T. Bakke, P. V. Hodson, and T. K. Collier. 2016. “Environmental Effects of the Deepwater Horizon Oil Spill: A Review.” *Marine Pollution Bulletin* 110(1):28–51.
- Bignell, J. P., G. D. Stentiford, N. G. H. Taylor, and B. P. Lyons. 2011. “Histopathology of Mussels (*Mytilus* Sp.) from the Tamar Estuary, UK.” *Marine Environmental Research* 72(1–2):25–32.
- Board, B. P. 2015. “Finnish Zoological and Botanical Publishing Board Responses of Fish to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).” 32(3):295–309.
- Bodoy, A., J. Prou, and J.-P. Berthome. 1986. “Etude Comparative de Différents Indices de Condition Chez l’huitre Creuse (*Crassostrea Gigas*).” *Haliois* 15:173–82.
- Brandvik, P. J. and L. G. Faksness. 2009. “Weathering Processes in Arctic Oil Spills: Meso-Scale Experiments with Different Ice Conditions.” *Cold Regions Science and Technology* 55(1):160–66.
- Camus, L., S. R. Birkely, M. B. Jones, J. F. Børseth, B. E. Grøsvik, B. Gulliksen, O. J. Lønne, F. Regoli, and M. H. Depledge. 2003. “Biomarker Responses and PAH Uptake in *Mya Truncata* Following Exposure to Oil-Contaminated Sediment in an Arctic Fjord (Svalbard).” *Science of the Total Environment* 308(1–3):221–34.
- Camus, L., S. Brooks, P. Geraudie, M. Hjorth, J. Nahrgang, G. H. Olsen, and M. G. D. Smit. 2015. “Comparison of Produced Water Toxicity to Arctic and Temperate Species.”

*Ecotoxicology and Environmental Safety* 113:248–58.

Camus, L. and G. H. Olsen. 2008. “Embryo Aberrations in Sea Ice Amphipod *Gammarus Wilkitzkii* Exposed to Water Soluble Fraction of Oil.” *Marine Environmental Research* 66(1):221–22.

Canadian Association of Petroleum Producers. 2018. “2018 Crude Oil Forecast.”

De Castro, C., L. J. Miguel, and M. Mediavilla. 2009. “The Role of Non Conventional Oil in the Attenuation of Peak Oil.” *Energy Policy* 37(5):1825–33.

Chapman, P. M. and M. J. Riddle. 2003. “Missing and Needed: Polar Marine Ecotoxicology.” *Marine Pollution Bulletin* 46(8):927–28.

Chapman, P. M. and M. J. Riddle. 2005. “Polar Marine Toxicology - Future Research Needs.” *Marine Pollution Bulletin* 50(9):905–8.

Choy, E. J., Q. Jo, H. B. Moon, C. K. Kang, and J. C. Kang. 2007. “Time-Course Uptake and Elimination of Benzo(a)Pyrene and Its Damage to Reproduction and Ensuing Reproductive Outputs of Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*.” *Marine Biology* 151(1):157–65.

Colavecchia, M. V, S. M. Backus, P. V Hodson, and J. L. Parrott. 2004. “Toxicity of Oil Sands to Early Life Stages of Fathead Minnows (*Pimephales Promelas*).” *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 23(7):1709–18.

Conover, R. J. 1966. “The Assimilation Organic By Zooplankton and Question The.” *Limnology and Oceanography* 11(3):364–354.

Costa, P. M., S. Carreira, M. H. Costa, and S. Caeiro. 2013. “Development of Histopathological Indices in a Commercial Marine Bivalve (*Ruditapes Decussatus*) to Determine Environmental Quality.” *Aquatic Toxicology* 126:442–54.

Crosby, S., R. Fay, C. Groark, A. Kani, J. Smith, and T. Sullivan. 2013. “Transporting

- Alberta's Oil Sands Products: Defining the Issues and Assessing the Risks." *NOAA Technical Memorandum NOS OR&R 44* (September):153.
- Cuevas, N., I. Zorita, P. M. Costa, J. Franco, and J. Larreta. 2015. "Development of Histopathological Indices in the Digestive Gland and Gonad of Mussels: Integration with Contamination Levels and Effects of Confounding Factors." *Aquatic Toxicology* 162:152–64.
- Cusson, M., R. Tremblay, G. Daigle, and M. Roussy. 2005. "Modeling the Depuration Potential of Blue Mussels (*Mytilus* Spp.) in Response to Thermal Shock." *Aquaculture* 250(1–2):183–93.
- Donkin, P., J. Widdows, S. V. Evans, C. M. Worrall, and M. Carr. 1989. "Quantitative Structure-Activity Relationships for the Effect of Hydrophobic Organic Chemicals on Rate of Feeding by Mussels (*Mytilus Edulis*)." *Aquatic Toxicology* 14(3):277–93.
- Dupuis, A. and F. Ucan-Marin. 2015. "A Literature Review on the Aquatic Toxicology of Petroleum Oil: An Overview of Oil Properties and Effects to Aquatic Biota." *DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document* 2015/007(April):51.
- Faksness, L. G. and P. J. Brandvik. 2008. "Distribution of Water Soluble Components from Oil Encapsulated in Arctic Sea Ice: Summary of Three Field Seasons." *Cold Regions Science and Technology* 54(2):106–14.
- Faksness, L. G., P. J. Brandvik, R. L. Daae, F. Leirvik, and J. F. Børseth. 2011. "Large-Scale Oil-in-Ice Experiment in the Barents Sea: Monitoring of Oil in Water and MetOcean Interactions." *Marine Pollution Bulletin* 62(5):976–84.
- Fingas, M. F. and B. P. Hollebone. 2003. "Review of Behaviour of Oil in Freezing Environments." *Marine Pollution Bulletin* 47(9–12):333–40.
- Fong, W. C. 1976. "Uptake and Retention of Kuwait Crude Oil and Its Effects on Oxygen Uptake by the Soft-Shell Clam, *Mya Arenaria*." *Journal of the Fisheries Research*

*Board of Canada* 33(12).

- Fossato, V. U. and W. J. Canzonier. 1976. "Hydrocarbon Uptake and Loss by the Mussel *Mytilus Edulis*." *Marine Biology* 36(3):243–50.
- Franci, C. D., M. Guillemette, É. Pelletier, O. Chastel, S. Bonnefoi, and J. Verreault. 2014. "Endocrine Status of a Migratory Bird Potentially Exposed to the Deepwater Horizon Oil Spill: A Case Study of Northern Gannets Breeding on Bonaventure Island, Eastern Canada." *Science of the Total Environment* 473–474:110–16.
- Frouin, H., J. Pellerin, M. Fournier, E. Pelletier, P. Richard, N. Pichaud, C. Rouleau, and F. Garnerot. 2007. "Physiological Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soft-Shell Clam *Mya Arenaria*." *Aquatic Toxicology* 82(2):120–34.
- Geffard, O. 2003. "Assessment of the Bioavailability and Toxicity of Sediment-Associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heavy Metals Applied to *Crassostrea Gigas* Embryos and Larvae." 46:481–90.
- Geffard Olivier; Budzinski, H. L. K. 2004. "Chemical and Ecotoxicological Characterization of the ' Erika ' Petroleum: Bio-Tests Applied to Petroleum Water-Accommodated Fractions and Natural Contaminated Samples." *Aquatic Living Resources* 17(3):289–96.
- Gerdes, B., R. Brinkmeyer, G. Dieckmann, and E. Helmke. 2005. "Influence of Crude Oil on Changes of Bacterial Communities in Arctic Sea-Ice." *FEMS Microbiology Ecology* 53(1):129–39.
- Goldberg, E. D., V. T. Bowen, J. W. Farrington, G. Harvey, J. H. Martin, P. L. Parker, R. W. Risebrough, W. Robertson, E. Schneider, and E. Gamble. 1978. "The Mussel Watch." *Environmental Conservation* 5(2):101–25.
- González-Fernández, C., M. Albentosa, J. A. Campillo, L. Viñas, A. Franco, and J. Bellas. 2016. "Effect of Mussel Reproductive Status on Biomarker Responses to PAHs:

- Implications for Large-Scale Monitoring Programs.” *Aquatic Toxicology* 177:380–94.
- González-Fernández, C., C. Lacroix, I. Paul-Pont, F. Le Grand, M. Albentosa, J. Bellas, L. Viñas, J. A. Campillo, H. Hegaret, and P. Soudant. 2016. “Effect of Diet Quality on Mussel Biomarker Responses to Pollutants.” *Aquatic Toxicology* 177:211–25.
- Gonzalez, P., S. Trabelsi, and S. Jacques-Barma. 2015. “Bilan Des Connaissances Transport Des Hydrocarbures Par Modes Terrestres Au Québec.”
- Grundy, M. M., N. A. Ratcliffe, and M. N. Moore. 1996. “Immune Inhibition in Marine Mussels by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Marine Environmental Research* 42(1–4):187–90.
- Hannam, M. L., S. D. Bamber, A. J. Moody, T. S. Galloway, and M. B. Jones. 2010. “Ecotoxicology and Environmental Safety Immunotoxicity and Oxidative Stress in the Arctic Scallop *Chlamys Islandica* : Effects of Acute Oil Exposure.” *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73(6):1440–48.
- Hansen, B. H., A. M. Tarrant, I. Salaberria, D. Altin, T. Nordtug, and I. B. Øverjordet. 2017. “Maternal Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Transfer and Effects on Offspring of Copepods Exposed to Dispersed Oil with and without Oil Droplets.” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 80(16–18):881–94.
- Harwell, M. A. and J. H. Gentile. 2006. “Ecological Significance of Residual Exposure and Effects from the Exxon Valdez Oil Spill.” *Integrated Environmental Assessment and Management* 2(3):204–46.
- Hatcher, A., J. Grant, and B. Schofield. 1997. “Seasonal Changes in the Metabolism of Cultured Mussels (*Mytilus Edulis* l.) from a Nova Scotian Inlet: The Effects of Winter Ice Cover and Nutritive Stress.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 217(1):63–78.
- He, Y., S. B. Wiseman, N. Wang, L. A. Perez-Estrada, M. G. El-Din, J. W. Martin, and J. P.

- Giesy. 2012. "Transcriptional Responses of the Brain-Gonad-Liver Axis of Fathead Minnows Exposed to Untreated and Ozone-Treated Oil Sands Process-Affected Water." *Environmental Science and Technology* 46(17):9701–8.
- Hodson, P. V. 2017. "The Toxicity to Fish Embryos of PAH in Crude and Refined Oils." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 73(1):12–18.
- Hua, Y., F. S. Mirnaghi, Z. Yang, B. P. Hollebone, and C. E. Brown. 2018. "Effect of Evaporative Weathering and Oil-Sediment Interactions on the Fate and Behavior of Diluted Bitumen in Marine Environments. Part 1. Spill-Related Properties, Oil Buoyancy, and Oil-Particulate Aggregates Characterization." *Chemosphere* 191:1038–47.
- Hwang, H. M., T. L. Wade, and J. L. Sericano. 2008. "Residue-Response Relationship between PAH Body Burdens and Lysosomal Membrane Destabilization in Eastern Oysters (*Crassostrea Virginica*) and Toxicokinetics of PAHs." *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43(12):1373–80.
- Hylland, K. 2006. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Ecotoxicology in Marine Ecosystems." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 69(1–2):109–23.
- Jackson, V. A. 2017. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation." *Environmental Management* 0–1.
- Jeong, W. and S. Cho. 2005. "Effects of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons on Hemocyte Characteristics of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*." *Journal of Shellfish Research* 24(2):451–56.
- Jeong, W. G. and S. M. Cho. 2007. "Long-Term Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon on Physiological Metabolisms of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*." *Aquaculture* 265(1–4):343–50.

- Jörundsdóttir, H. Ó., S. Jensen, K. Hylland, T. F. Holth, H. Gunnlaugsdóttir, J. Svavarsson, Á. Ólafsdóttir, H. El-Taliawy, F. Rigét, J. Strand, E. Nyberg, A. Bignert, K. S. Hoydal, and H. P. Halldórsson. 2014. “Pristine Arctic: Background Mapping of PAHs, PAH Metabolites and Inorganic Trace Elements in the North-Atlantic Arctic and Sub-Arctic Coastal Environment.” *Science of the Total Environment* 493:719–28.
- Kang, H. J., S. Y. Lee, J. Y. Roh, U. H. Yim, W. J. Shim, and J. H. Kwon. 2014. “Prediction of Ecotoxicity of Heavy Crude Oil: Contribution of Measured Components.” *Environmental Science and Technology* 48(5):2962–70.
- Karac, B., O. S. Okay, B. Henkelmann, S. Bernhöft, and K. Schramm. 2009. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Effects on Marine Organisms in the Istanbul Strait.” 35:599–606.
- Kasiotis, K. M. and C. Emmanouil. 2015. “Advanced PAH Pollution Monitoring by Bivalves.” *Environmental Chemistry Letters* 13(4):395–411.
- Kavanagh, R. J., R. A. Frank, B. K. Burnison, R. F. Young, P. M. Fedorak, K. R. Solomon, and G. Van Der Kraak. 2012. “Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*) Reproduction Is Impaired When Exposed to a Naphthenic Acid Extract.” *Aquatic Toxicology* 116–117:34–42.
- Kim, M., S. Cho, and W. Jeong. 2007. “Short-Term Physiological Response of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas*, on Exposure to Varying Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon.” 1612–18.
- King, T. L., B. Robinson, M. Boufadel, and K. Lee. 2014. “Flume Tank Studies to Elucidate the Fate and Behavior of Diluted Bitumen Spilled at Sea.” *Marine Pollution Bulletin* 83(1):32–37.
- King, T., B. Robinson, M. Boufadel, K. Lee, F. Cui, and J. A. C. Clyburne. 2017. “An Oil Spill Decision Matrix in Response to Surface Spills of Various Bitumen Blends.” *Environ. Sci.: Processes Impacts* 19:928–38.



- King, T., B. Robinson, C. McIntyre, P. Toole, S. Ryan, F. Saleh, M. C. Boufadel, and K. Lee. 2015. "Fate of Surface Spills of Cold Lake Blend Diluted Bitumen Treated with Dispersant and Mineral Fines in a Wave Tank." *Environmental Engineering Science* 32(3):250–61.
- Knecht, A. L., L. Truong, S. W. Marvel, D. M. Reif, A. Garcia, C. Lu, M. T. Simonich, J. G. Teeguarden, and R. L. Tanguay. 2017. "Transgenerational Inheritance of Neurobehavioral and Physiological Deficits from Developmental Exposure to Benzo[a]Pyrene in Zebrafish." *Toxicology and Applied Pharmacology* 329:148–57.
- Labarta, U., M. J. Fernández-Reiriz, J. L. Garrido, J. M. F. Babarro, J. M. Bayona, and J. Albaigés. 2005. "Response of Mussel Recruits to Pollution from the 'Prestige' Oil Spill along the Galicia Coast. A Biochemical Approach." *Marine Ecology Progress Series* 302:135–45.
- Lachance, A. A., B. Myrand, R. Tremblay, V. Koutitonsky, and E. Carrington. 2008. "Biotic and Abiotic Factors Influencing Attachment Strength of Blue Mussels *Mytilus Edulis* in Suspended Culture." *Aquatic Biology* 2(2):119–29.
- Langangen, E. Olsen, L. C. Stige, J. Ohlberger, N. A. Yaragina, F. B. Vikebø, B. Bogstad, N. C. Stenseth, and D. Hjermann. 2017. "The Effects of Oil Spills on Marine Fish: Implications of Spatial Variation in Natural Mortality." *Marine Pollution Bulletin* 119(1):102–9.
- Lee, K., M. Boufadel, B. Chen, J. Foght, P. Hodson, S. Swanson, and A. Venosa. 2015. "The Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments." *The Royal Society of Canada Expert Panel* (November):489.
- Lemaire, N., J. Pellerin, M. Fournier, L. Girault, E. Tamigneaux, S. Cartier, and E. Pelletier. 2006. "Seasonal Variations of Physiological Parameters in the Blue Mussel *Mytilus* Spp. from Farm Sites of Eastern Quebec." *Aquaculture* 261(2):729–51.
- Lister, K. N., M. D. Lamare, and D. J. Burritt. 2017. "Maternal Antioxidant Provisioning

- Mitigates Pollutant-Induced Oxidative Damage in Embryos of the Temperate Sea Urchin *Evechinus Chloroticus*.” *Scientific Reports* 7(1):1–10.
- Lowe, D. M. and K. R. Clarke. 1989. “Contaminant-Induced Changes in the Structure of the Digestive Epithelium of *Mytilus Edulis*.” *Aquatic Toxicology* 15(4):345–58.
- Lowe, D. M., M. N. Moore, and K. R. Clarke. 1981. “Effects of Oil on Digestive Cells in Mussels: Quantitative Alterations in Cellular and Lysosomal Structure.” *Aquatic Toxicology* 1(3–4):213–26.
- Madison, B. N., P. V. Hodson, and V. S. Langlois. 2017. “Cold Lake Blend Diluted Bitumen Toxicity to the Early Development of Japanese Medaka.” *Environmental Pollution* 225:579–86.
- Madison, B. N., P. V. Hodson, and V. S. Langlois. 2015. “Diluted Bitumen Causes Deformities and Molecular Responses Indicative of Oxidative Stress in Japanese Medaka Embryos.” *Aquatic Toxicology* 165:222–30.
- Maloy, A. P., B. J. Barber, and P. D. Rawson. 2003. “Gametogenesis in a Sympatric Population of Blue Mussels, *Mytilus Edulis* and *Mytilus Trossulus* from Cobscook Bay ( USA ).” *Journal of Shellfish Research* 22:119–23.
- Marentette, J. R., R. A. Frank, A. J. Bartlett, P. L. Gillis, L. M. Hewitt, K. M. Peru, J. V. Headley, P. Brunswick, D. Shang, and J. L. Parrott. 2015. “Toxicity of Naphthenic Acid Fraction Components Extracted from Fresh and Aged Oil Sands Process-Affected Waters, and Commercial Naphthenic Acid Mixtures, to Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*) Embryos.” *Aquatic Toxicology* 164:108–17.
- Martins, L. K. P., I. A. Nascimento, G. Fillmann, R. King, A. J. A. Evangelista, J. W. Readman, and M. H. Depledge. 2005. “Lysosomal Responses as a Diagnostic Tool for the Detection of Chronic Petroleum Pollution at Todos Os Santos Bay, Brazil.” *Environmental Research* 99(3):387–96.

- Matkin, C. O., E. L. Saulitis, G. M. Ellis, P. Olesiuk, and S. D. Rice. 2008. "Ongoing Population-Level Impacts on Killer Whales *Orcinus Orca* Following the 'Exxon Valdez' Oil Spill in Prince William Sound, Alaska." *Marine Ecology Progress Series* 356(1983):269–81.
- McDowell, J. E., B. a. Lancaster, D. F. Leavitt, P. Rantamaki, and B. Ripley. 1999. "The Effects of Lipophilic Organic Contaminants on Reproductive Physiology and Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs." *Limnology and Oceanography* 44:903–9.
- Mearns, A. J., D. J. Reish, P. S. Oshida, A. M. Morrison, M. A. Rempel-Hester, C. Arthur, N. Rutherford, and R. Pryor. 2017. "Effects of Pollution on Marine Organisms." *Water Environment Research* 89(10):1704–98.
- Ministère du tourisme du Québec. 2014. "État Des Lieux Touristiques : Saint-Laurent Touristique 2014-2020."
- Moore, M. 1988. "Cytochemical Responses of the Lysosomal System and NADPH-Ferrihemoprotein Reductase in Molluscan Digestive Cells to Environmental and Experimental Exposure to Xenobiotics." *Marine Ecology Progress Series* 46:81–89.
- Moore, M. N. and A. Viarengo. 1987. "Lysosomal Membrane Fragility and Catabolism of Cytosolic Proteins: Evidence for a Direct Relationship." *Experientia* 43(3):320–23.
- Nikolaou, A., M. Kostopoulou, G. Lofrano, S. Meric, A. Petsas, and M. Vagi. 2009. "Levels and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediments."
- Olsen, G. H., M. L. Carroll, P. E. Renaud, W. G. Ambrose, R. Olsson, and J. Carroll. 2007. "Benthic Community Response to Petroleum-Associated Components in Arctic versus Temperate Marine Sediments." *Marine Biology* 151(6):2167–76.
- Olsen, G. H., C. Klok, A. J. Hendriks, P. Geraudie, L. De Hoop, F. De Laender, E. Farmen, B. E. Grøsvik, B. H. Hansen, M. Hjorth, C. R. Jansen, T. Nordtug, E. Ravagnan, K. Viaene, and J. Carroll. 2013. "Toxicity Data for Modeling Impacts of Oil Components

- in an Arctic Ecosystem.” *Marine Environmental Research* 90:9–17.
- Ortiz-Zarragoitia, M. and M. P. Cajaraville. 2006. “Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disrupters.” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50(3):361–69.
- Ortiz-Zarragoitia, M., L. Garmendia, M. C. Barbero, T. Serrano, I. Marigómez, and M. P. Cajaraville. 2011. “Effects of the Fuel Oil Spilled by the Prestige Tanker on Reproduction Parameters of Wild Mussel Populations.” *Journal of Environmental Monitoring : JEM* 13:84–94.
- Payne, J. R., W. B. Driskell, J. W. Short, and M. L. Larsen. 2008. “Long Term Monitoring for Oil in the Exxon Valdez Spill Region.” *Marine Pollution Bulletin* 56(12):2067–81.
- Pelletier, M. C., R. M. Burgess, M. G. Cantwell, J. R. Serbst, K. T. Ho, and S. A. Ryba. 2000. “Importance of Maternal Transfer of the Photoreactive Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene from Benthic Adult Bivalves to Their Pelagic Larvae.” *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11):2691–98.
- Pelletier, M. C., R. M. Burgess, K. T. Ho, A. Kuhn, R. A. McKinney, and S. A. Ryba. 1997. “Phototoxicity Of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons And Petroleum To Marine Invertebrate Larvae And Juveniles.” 16(10):2190–99.
- Penela-Arenaz, M., J. Bellas, and E. Va. 2009. “Effects of the Prestige Oil Spill on the Biota of NW Spain : 5 Years of Learning.” 56(09).
- Pérez-Cadahia, B., B. Laffon, P. Eduardo, and J. Méndez. 2004. “Evaluation of PAH Bioaccumulation and DNA Damage in Mussels (*Mytilus Galloprovincialis*) Exposed to Spilled Prestige Crude Oil.” *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 138(4):453–60.
- Pernet, F., R. Tremblay, L. Comeau, and H. Guderley. 2007. “Temperature Adaptation in Two Bivalve Species from Different Thermal Habitats: Energetics and Remodelling of

- Membrane Lipids.” *Journal of Experimental Biology* 210(17):2999–3014.
- Pernet, F., R. Tremblay, I. Redjah, J.-M. Sevigny, and C. Gionet. 2008. “Physiological and Biochemical Traits Correlate with Differences in Growth Rate and Temperature Adaptation among Groups of the Eastern Oyster *Crassostrea Virginica*.” *Journal of Experimental Biology* 211(6):969–77.
- Peteiro, L. G., J. M. F. Babarro, U. Labarta, and M. J. Fernández-Reiriz. 2006. “Growth of *Mytilus Galloprovincialis* after the Prestige Oil Spill.” *ICES Journal of Marine Science* 63(6):1005–13.
- Peterson, C. H., S. D. Rice, J. W. Short, D. Esler, J. L. Bodkin, B. E. Ballachey, and D. B. Irons. 2003. “Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill.” *Science* 302(5653):2082–86.
- Philibert, D. A., C. P. Philibert, C. Lewis, and K. B. Tierney. 2016. “Comparison of Diluted Bitumen (Dilbit) and Conventional Crude Oil Toxicity to Developing Zebrafish.” *Environmental Science and Technology* 50(11):6091–98.
- Rajagopal, S., G. Van Der Velde, M. Van Der Gaag, and H. A. Jenner. 2005. “Byssal Detachment Underestimates Tolerance of Mussels to Toxic Compounds.” *Marine Pollution Bulletin* 50(1):20–29.
- Redmond, K. J., M. Berry, S. Sanni, and O. K. Andersen. 2016. “Effect of Dispersed Crude Oil on the Feeding Activity, Retention Efficiency, and Filtration Rate of Differently Sized Blue Mussels (*Mytilus Edulis*).” *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 79(13–15):658–74.
- Rowland, S. J., C. E. West, D. Jones, A. G. Scarlett, R. A. Frank, and L. M. Hewitt. 2011. “Steroidal Aromatic Naphthenic Acids in Oil Sands Process-Affected Water: Structural Comparisons with Environmental Estrogens.” *Environmental Science and Technology* 45(22):9806–15.

- Ruiz, Y., P. Suarez, A. Alonso, E. Longo, A. Villaverde, and F. San Juan. 2011. "Environmental Quality of Mussel Farms in the Vigo Estuary: Pollution by PAHs, Origin and Effects on Reproduction." *Environmental Pollution* 159(1):250–65.
- Shaw Barbara L and Battle Helen I. 1957. "The Gross and Microscopic Anatomy of the Digestive Tract of the Oyster *Crassostrea Virginica* (Gmelin)." *Can. J. Zool.* 35:325–47.
- Smolarz, K., A. Hallmann, S. Zabrzańska, and A. Pietrasik. 2017. "Elevated Gonadal Atresia as Biomarker of Endocrine Disruptors: Field and Experimental Studies Using *Mytilus Trossulus* (L.) and 17-Alpha Ethinylestradiol (EE2)." *Marine Pollution Bulletin* 120(1–2):58–67.
- Smolders, R., L. Bervoets, V. Wepener, and R. Blust. 2003. "A Conceptual Framework for Using Mussels as Biomonitors in Whole Effluent Toxicity." *Human and Ecological Risk Assessment* 9(3):741–60.
- Sogbanmu, T. O., E. Nagy, D. H. Phillips, V. M. Arlt, A. A. Otitolaju, and N. R. Bury. 2016. "Lagos Lagoon Sediment Organic Extracts and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induce Embryotoxic, Teratogenic and Genotoxic Effects in *Danio Rerio* (Zebrafish) Embryos." *Environmental Science and Pollution Research* 23(14):14489–501.
- Stainken, D. M. 1977. "Effects of Uptake and Discharge of Petroleum Hydrocarbons on the Respiration of the Soft-Shell Clam, *Mya Arenaria*." *Proceedings of the Symposium on JF - "JF - Recovery Potential of Oiled Marine Northern EnvironmentsJF - "JF - Held at Halifax, Nova Scotia, October 10-14.* 637–47.
- Statistiques Canada. 2015. "Aquaculture Statistics." *Catalogue No. 23-222-X (23).*
- Strohmeier, T., Ø. Strand, M. Alunno-Bruscia, A. Duinker, and P. J. Cranford. 2012. "Variability in Particle Retention Efficiency by the Mussel *Mytilus Edulis*." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 412:96–102.

- Sun, L., Z. Zuo, M. Chen, Y. Chen, and C. Wang. 2015. "Reproductive and Transgenerational Toxicities of Phenanthrene on Female Marine Medaka (*Oryzias Melastigma*)." *Aquatic Toxicology* 162:109–16.
- Sureda, A., A. Box, S. Tejada, A. Blanco, J. Caixach, and S. Deudero. 2011. "Biochemical Responses of *Mytilus Galloprovincialis* as Biomarkers of Acute Environmental Pollution Caused by the Don Pedro Oil Spill (Eivissa Island, Spain)." *Aquatic Toxicology* 101(3–4):540–49.
- Taylor, P., J. W. Anderson, R. F. Lee, J. W. Anderson, and R. F. Lee. 2007. "Human and Ecological Risk Assessment: Use of Biomarkers in Oil Spill Risk Assessment in the Marine Environment Use of Biomarkers in Oil Spill Risk Assessment." (January 2015):37–41.
- Toro, B., J. M. Navarro, and H. Palma-Fleming. 2003. "Relationship between Bioenergetics Responses and Organic Pollutants in the Giant Mussel, *Choromytilus Chorus* (Mollusca: Mytilidae)." *Aquatic Toxicology* 63(3):257–69.
- Toro, B., J. M. Navarro, and H. Palma-Fleming. 2003. "Use of Clearance Rate in *Choromytilus Chorus* (Bivalvia: Mytilidae) as a Non-Destructive Biomarker of Aquatic Pollution." *Revista Chilena de Historia Natural* 76(2):267–74.
- Tremblay, R., B. Myrand, J. M. Sevigny, P. Blier, and H. Guderley. 1998. "Bioenergetic and Genetic Parameters in Relation to Susceptibility of Blue Mussels, *Mytilus Edulis* (L.) to Summer Mortality." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 221(1):27–58.
- Tsoskounoglou, M., G. Ayerides, and E. Tritopoulou. 2008. "The End of Cheap Oil: Current Status and Prospects." *Energy Policy* 36(10):3797–3806.
- Vignet, C., L. Joassard, L. Lyphout, T. Guionnet, M. Goubeau, K. Le Menach, F. Brion, O. Kah, B. C. Chung, H. Budzinski, M. L. Bégout, and X. Cousin. 2015. "Exposures of Zebrafish through Diet to Three Environmentally Relevant Mixtures of PAHs Produce

- Behavioral Disruptions in Unexposed F1 and F2 Descendant.” *Environmental Science and Pollution Research* 22(21):16371–83.
- Vignet, C., T. Larcher, B. Davail, L. Joassard, K. Le Menach, T. Guionnet, L. Lyphout, M. Ledevin, M. Goubeau, H. Budzinski, M.-L. Bégout, and X. Cousin. 2016. “Fish Reproduction Is Disrupted upon Lifelong Exposure to Environmental PAHs Fractions Revealing Different Modes of Action.” *Toxics* 4(4):26.
- Vignier, J., L. Donaghy, P. Soudant, F. L. E. Chu, J. M. Morris, M. W. Carney, C. Lay, M. Krasnec, R. Robert, and A. K. Volety. 2015. “Impacts of Deepwater Horizon Oil and Associated Dispersant on Early Development of the Eastern Oyster *Crassostrea Virginica*.” *Marine Pollution Bulletin* 100(1):426–37.
- Vignier, J., P. Soudant, F. L. E. Chu, J. M. Morris, M. W. Carney, C. R. Lay, M. O. Krasnec, R. Robert, and A. K. Volety. 2016. “Lethal and Sub-Lethal Effects of Deepwater Horizon Slick Oil and Dispersant on Oyster (*Crassostrea Virginica*) Larvae.” *Marine Environmental Research* 120:20–31.
- Vignier, J., A. K. Volety, A. Rolton, N. Le Goïc, F. L. E. Chu, R. Robert, and P. Soudant. 2017. “Sensitivity of Eastern Oyster (*Crassostrea Virginica*) Spermatozoa and Oocytes to Dispersed Oil: Cellular Responses and Impacts on Fertilization and Embryogenesis.” *Environmental Pollution* 225:270–82.
- Wessel, N., S. Rousseau, X. Caisey, F. Quiniou, and F. Akcha. 2007. “Investigating the Relationship between Embryotoxic and Genotoxic Effects of Benzo[a]Pyrene, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Endosulfan on *Crassostrea Gigas* Embryos.” *Aquatic Toxicology* 85(2):133–42.
- West, J. E., S. M. O’Neill, G. M. Ylitalo, J. P. Incardona, D. C. Doty, and M. E. Dutch. 2014. “An Evaluation of Background Levels and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Naturally Spawned Embryos of Pacific Herring (*Clupea Pallasii*) from Puget Sound, Washington, USA.” *Science of the Total Environment* 499:114–24.



- White, P. A., S. Robitaille, and J. B. Rasmussen. 1999. "Heritable Reproductive Effects of Benzo[a]Pyrene on the Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*)." *Environmental Toxicology & Chemistry* 18(8):1843–47.
- Widdows, J., T. Bakke, B. L. Bayne, P. Donkin, D. R. Livingstone, D. M. Lowe, M. N. Moore, S. V. Evans, and S. L. Moore. 1982. "Responses of *Mytilus Edulis* on Exposure to the Water-Accommodated Fraction of North Sea Oil." *Marine Biology* 67(1):15–31.
- Widdows, J., P. Donkin, and S. V. Evans. 1985. "Recovery of *Mytilus Edulis* L. from Chronic Oil Exposure." *Marine Environmental Research* 17(2–4):250–53.
- Widdows, J. and D. Johnson. 1988. "Physiological Energetics of *Mytilus Edulis* : Scope for Growth." *Marine Ecology* 46:113–21.
- Widdows, J., S. L. Moore, K. R. Clarke, and P. Donkin. 1983. "Uptake, Tissue Distribution and Elimination of [1-14C] Naphthalene in the Mussel *Mytilus Edulis*." *Marine Biology* 76(2):109–14.
- Widdows, J., C. Nasi, and V. U. Fossato. 1997. "Effects of Pollution on the Scope for Growth of Mussels (*Mytilus Galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy." *Marine Environmental Research* 43(1–2):69–79.
- Wilkinson, J., C. Beegle-Krause, K. U. Evers, N. Hughes, A. Lewis, M. Reed, and P. Wadhams. 2017. "Oil Spill Response Capabilities and Technologies for Ice-Covered Arctic Marine Waters: A Review of Recent Developments and Established Practices." *Ambio* 46(s3):423–41.
- Wolska, L. 2011. "Critical Reviews in Environmental Science and Technology Sources and Fate of PAHs and PCBs in the Marine Environment." (September 2014):37–41.
- Woods, J., D. Kung, L. Kingston, L. Kotlyar, B. Sparks, and T. McCracken. 2008. "Enhanced Oil Recovery-an Overview." *Oil & Gas Science and Technology-Revue ...* 63(1):9–19.
- Wyatt, J., S. Kenny, K. D. Hobbs, T. Mills, H. D. Marshall, and H. M. Murray. 2013. "The

- Effect of Extended Wet-Storage on the Condition, Physiology and Stress Response of Cultured Blue Mussels (*Mytilus Edulis* L. 1758) during Summer and Fall in Northeastern Newfoundland.” *Aquaculture* 372–375:111–18.
- Yang, M., F. Khan, V. Garaniya, and S. Chai. 2015. “Multimedia Fate Modeling of Oil Spills in Ice-Infested Waters: An Exploration of the Feasibility of Fugacity-Based Approach.” *Process Safety and Environmental Protection* 93(May):206–17.
- Yang, S.-Z., H.-J. Jin, Z. Wei, R.-X. He, Y.-J. Ji, X.-M. Li, and S.-P. Yu. 2009. “Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review.”
- Yang, Z., B. P. Hollebone, C. E. Brown, C. Yang, Z. Wang, G. Zhang, P. Lambert, M. Landriault, and K. Shah. 2016. “The Photolytic Behavior of Diluted Bitumen in Simulated Seawater by Exposed to the Natural Sunlight.” *Fuel* 186:128–39.
- Yang, Z., Y. Hua, F. Mirnaghi, B. P. Hollebone, P. Jackman, C. E. Brown, C. Yang, K. Shah, M. Landriault, and B. Chan. 2018. “Effect of Evaporative Weathering and Oil-Sediment Interaction on the Fate and Behavior of Diluted Bitumen in Marine Environments. Part 2. The Water Accommodated and Particle-Laden Hydrocarbon Species and Toxicity of the Aqueous Phase.” *Chemosphere* 191:145–55.
- Zardi, G. I., C. D. McQuaid, and K. R. Nicastro. 2007. “Balancing Survival and Reproduction: Seasonality of Wave Action, Attachment Strength and Reproductive Output in Indigenous *Perna Perna* and Invasive *Mytilus Galloprovincialis* Mussels.” *Marine Ecology Progress Series* 334:155–63.

