

MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES DES BRANCHIES DE LA CREVETTE (*PALAEMON SERRATUS*) SOUMISE A L'EFFET DES DISPERSANTS ET EMULSIONS PETROLIERES

par

Catherine Papineau et Geneviève Chèze

Laboratoire de Biologie Appliquée
Université de Bretagne Occidentale - Brest

Résumé

Notre étude histologique a permis de mettre en évidence des modifications morphologiques des branchies de crevettes (*Palaemon serratus*) soumises à des doses sublétale de dispersants et d'émulsions pétrolières. L'observation de coupes de branchies en microscopie photonique permet de détecter les effets sublétaux des polluants notamment des difficultés circulatoires et des détériorations membranaires.

Introduction

Nous avons étudié l'effet des dispersants et des émulsions formées de pétrole et de dispersant sur les branchies de *Palaemon serratus* en utilisant des techniques histologiques. Quelques travaux déjà anciens ont mis en évidence des altérations de l'épithélium des poissons d'eau douce soumis à des détergents (Schmid et Mann, 1962; Lemke et Mount, 1963; Abel et Skidmore, 1975). L'action des dispersants et du pétrole sur les branchies d'animaux marins a été étudiée. Un gonflement des filaments branchiaux a été mis en évidence chez des poissons pour une exposition aux dispersants (Swedmark *et al.*, 1971) et au pétrole (Blanton et Robinson, 1973). Chez les crustacés, Wildish (1970) a observé un œdème branchial chez un amphipode *Gammarus oceanicus* exposé à une dose sublétale de dispersant. Enfin Nuwayhid *et al.* (1980) ont décelé par la microscopie électronique des altérations de la structure de l'épithélium des branchies de *Patella vulgata* soumis aux dispersants et au pétrole.

Nous avons étudié l'effet des dispersants et des émulsions pétrolières sur la surface branchiale à l'aide des techniques de microscopie électronique à balayage et sur la structure des branchies par une recherche histologique en microscopie photonique. L'animal test est la crevette *Palaemon serratus* dont l'intérêt commercial dans la région est relativement important et sur laquelle aucune étude de cette nature n'a été antérieurement réalisée.

Les polluants étudiés sont les dispersants et les emulsions qu'ils ferment avec le pétrole. La technique de dispersion des produits pétroliers consiste à diviser en fines gouttelettes le pétrole répandu à la surface de la mer pour éventuellement en favoriser la biodégradation. Les dispersants sont un mélange de deux constituants :

— un ou plusieurs éléments tensioactifs assurant la dispersion des hydrocarbures;

— un ou plusieurs solvants servant à conditionner la partie active et en permettre la diffusion dans l'eau et les hydrocarbures.

Les dispersants que nous avons retenus pour notre étude sont le BP 1100 WD, BP 1100 X, Finasol OSR₂, les émulsions étudiées sont formées de pétrole BAL 150 et de dispersants : Dasic slichgone LTD ou DN 400. Les doses utilisées sont des doses sublétale qui ne provoquent pas de mortalité.

A notre connaissance, aucune étude morphologique de l'appareil branchial de l'espèce retenue n'a été réalisée. Dans ce domaine l'étude de nos préparations a été faite à la lumière des travaux déjà anciens d'Allen (1892) et Cuenot (1895) et d'autres plus récents de Debaisieux (1971), Foster et Howse (1978) et Dtughtie et Ranga Rao (1979). Les résultats présentés sont relatifs à une recherche comparative de branchies de crevettes témoins et traitées.

Le but de ce travail est d'étudier la possibilité de détecter les effets sublétaux des dispersants et des émulsions pétrolières par une approche en microscopie à balayage et en microscopie photonique. Parallèlement à cette étude une méthode biochimique utilisant la Na^+ K^+ Mg^{++} ATPase des branchies a été mise en œuvre dans les mêmes conditions expérimentales (Papineau et Le Gal, sous presse).

Matériel et méthodes

Les animaux sont péchés dans la rade de Brest et acclimatés au moins 8 jours au laboratoire à une température de 15°C avant d'être exposés aux polluants.

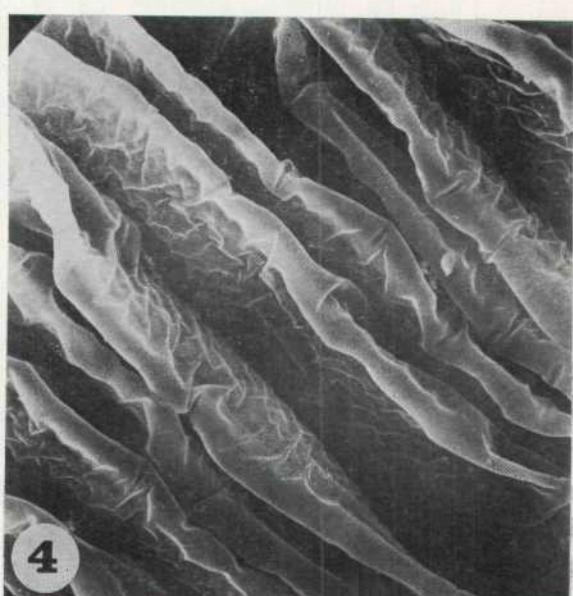
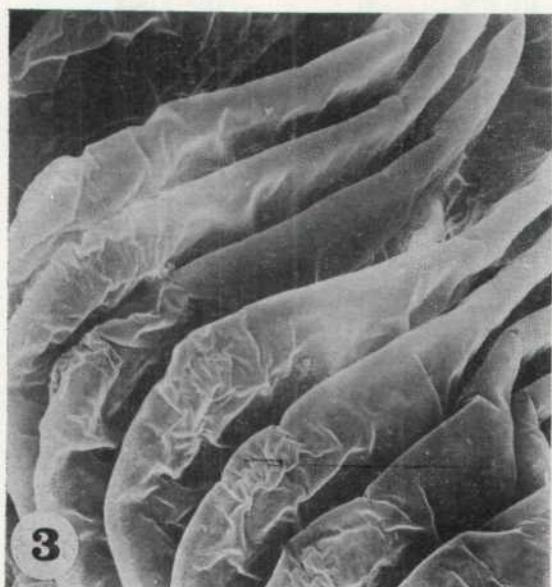
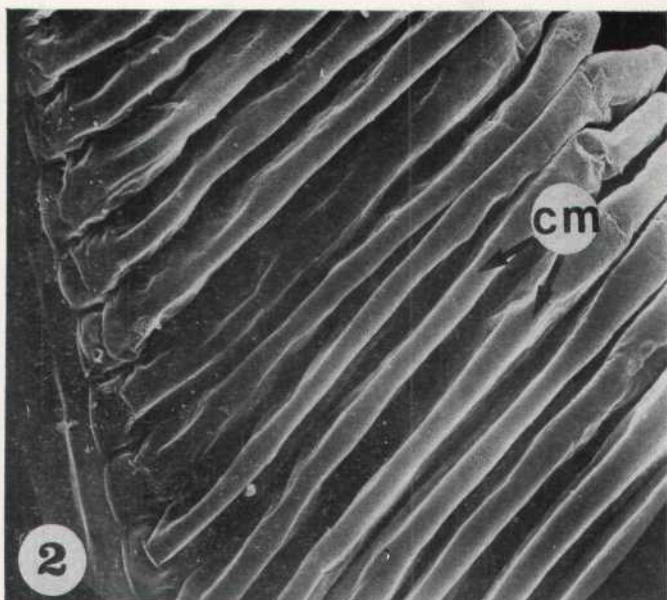
Les crevettes séjournent dans le polluant 96 heures pour le dispersant utilisé seul et 24 heures pour l'émulsion formée de pétrole et de dispersant. Le rapport dispersant/pétrole est le double de la concentration efficace (CE) du dispersant établi par l'I.F.P. (ISTPM, Lassus, 1981).

1. Microscopie à balayage

Les branchies de *Palaemon serratus* ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (marque Jeol, modèle JMS 35). Les branchies sont fixées au glutaraldehyde puis rincées dans un tampon cacodylate. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans différents bains d'alcool éthylique présentant un gradient croissant de concentration. Les branchies sont métallisées après réalisation du point critique au CO₂.

2. Microscopie photonique

Les crevettes vivantes, témoins ou traitées, sont plongées dans le Bouin aqueux et fixées durant 24 heures. Les branchies sont ensuite



C. PAPINEAU et G. CHEZE

PLANCHE I

Microscopie électronique à balayage.

1: Phyllobranchie de crevette témoin (x 30)

Deux ensembles de lamelles (lb) sont insérés sur un axe.

2: Lamelles branchiales de crevette témoin (x 200)

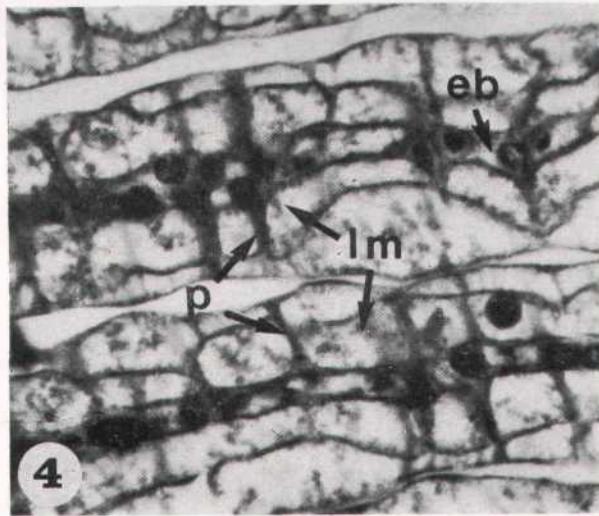
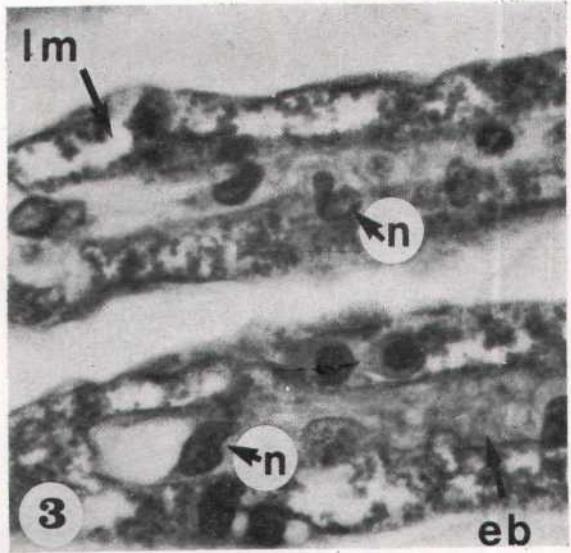
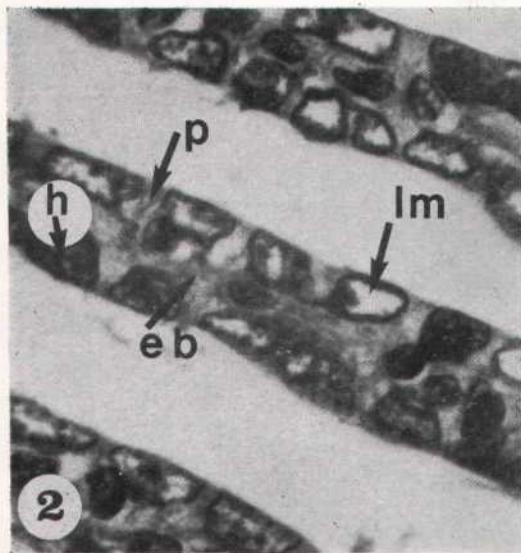
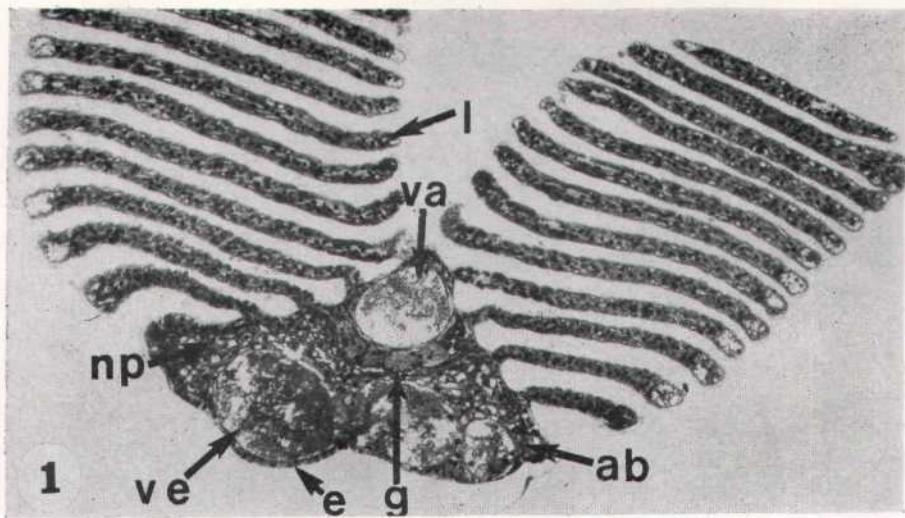
Les membranes limitant le canal marginal (cm) ont un aspect uniformément fissé.

3: Lamelles branchiales de crevette exposée à une dose sublétale de dispersant OSR₂ (2 500 ppm) (x 200)

Chaque lamelle présente un aspect fripé et le canal marginal paraît dilaté.

4: Lamelles branchiales de crevette exposée à une dose sublétale de dispersant BP 1100 X (5 000 ppm) (x 200)

La membrane lamellaire a un aspect fripé.



détachées et placées dans l'alcool à 70°. La déshydratation est effectuée par passage dans différents bains d'alcools à 90° et 100°.

L'inclusion est réalisée dans la paraffine après imprégnation au butanol. Les coupes d'une épaisseur de 7 μ subissent deux types de coloration : une coloration de routine polychrome, le trichrome de Masson (Martoja, 1967) et une coloration histochimique à l'acide périodique-Schiff (PAS) associée à l'hématoxyline de Groat et au picroindigocarmine (Martoja, 1967).

L'illustration photographique a été réalisée au microscope Leitz équipé du dispositif orthomat.

RÉSULTATS

1. Observations en microscopie à balayage (Planche I)

La figure 1 montre la morphologie branchiale d'une crevette témoin. Nous observons la présence de deux ensembles lamellaires constitués d'éléments parallèles insérés sur un axe central : il s'agit d'une phyllobbranchie. Les lamelles ont une surface décroissante vers l'apex de la branchie. La surface lamellaire présente un léger relief marqué par un certain nombre de zones déprimées séparées par des plis.

Chaque lamelle montre un bourrelet périphérique qui correspond à la lacune marginale dans laquelle circule l'hémolymph (Figure 2). La surface uniformément granuleuse laisse entrevoir les villosités de la membrane des cellules branchiales.

Chez les crevettes traitées, la morphologie branchiale se distingue peu de celle décrite chez les témoins. Nous observons cependant chez quelques individus un phénomène de dilatation d'importance variable, localisé au niveau du canal marginal de certaines lamelles. En outre,

PLANCHE II

Microscopie photonique.

1 : Coupe transversale d'une branchie de crevette témoin (x 100)
L'axe branchial (ib) et les lamelles (l) sont bordés par un épithélium (e). Dans l'axe branchial s'observent les **vaisseaux** afférent (va) et éfferent (ve) au voisinage desquels se situent glandes (g) et amas de néphrocytes (np).

2: Coupe transversale de lamelles branchiales de crevette témoin (X 600)
L'épithélium branchial (eb) est bordé par des lacunes (lm) remplies d'hémolymph (h). Des expansions cellulaires ou piliers (p) limitent ces lacunes.

3: Coupe transversale de lamelles branchiales de crevette exposée 96 h à une dose sublétale de BP 1100 WD (500 ppm) (x 700)
Les lacunes marginales (lm) sont dilatées, l'épithélium (eb) est déformé et certains noyaux (n) ont des aspects pycnotiques.

4: Coupe transversale de lamelles branchiales de crevette exposée 24 h à une dose létale de BP 1100 WD (x 500)
Les lacunes marginales (lm) sont boursouflées et l'épithélium branchial (e) est tirailé par la distension des pilier (p).

la membrane lamellaire revêt un aspect fripé particulièrement net sous l'effet de certains dispersants : OSR₂ (2 500 ppm) (Figure 3) et BP 1 100 X (5 000 ppm) (Figure 4) utilisés à des doses sublétales.

2. Observations en microscopie photonique (Planches II et III)

Histologie branchiale de la crevette témoin

— Axe branchial (Planche II : Figure 1)

L'axe de la phyllobranchie de section triangulaire est limité par un épithélium prismatique recouvert d'une cuticule. Il est traversé par deux vaisseaux assurant la circulation de l'hémolymph : les vaisseaux afférent et efférent. Le vaisseau afférent qui cède l'hémolymph aux lamelles est localisé dorsalement. Le vaisseau efférent qui recueille l'hémolymph en provenance des lamelles occupe la région ventrale. En outre, le parenchyme axial comporte de nombreuses glandes et amas de néphrocytes entre lesquels se situent des lacunes sanguines. Ces glandes sont constituées de cellules pyramidales qui convergent vers un canal central, elles renferment un produit de sécrétion PAS⁺. Ces formations glandulaires peuvent présenter deux aspects : un aspect granuleux est en effet observable dans des glandes abondantes autour du vaisseau afférent alors qu'un aspect clair se remarque dans d'autres glandes moins abondantes que les précédentes et plus dispersées dans l'axe.

Les formations glandulaires granuleuses pourraient s'apparenter à celles dont Dtugtchie (1979) a réalisé une étude ultrastructurale. Cet auteur décrit en effet chez *Palaemonetes pugio* de telles glandes granuleuses auxquelles il attribue un rôle dans l'élaboration de la cuticule.

Enfin, de nombreux amas de néphrocytes sont localisés autour du vaisseau efférent. Ces cellules renferment une ou plusieurs vacuoles plus ou moins importantes dont le contenu a un aspect clair. En

PLANCHE III

Microscopie photonique.

1 : Coupe transversale d'une lamelle branchiale de crevette exposée 24 h à une dose sublétale (200 ppm) d'émulsion pétrolière formée de pétrole (BAL 150) et de dispersant (DN 400) (X 600)

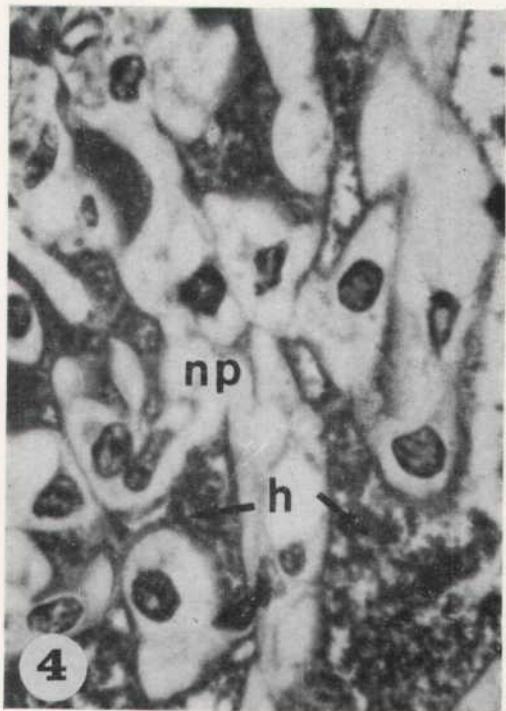
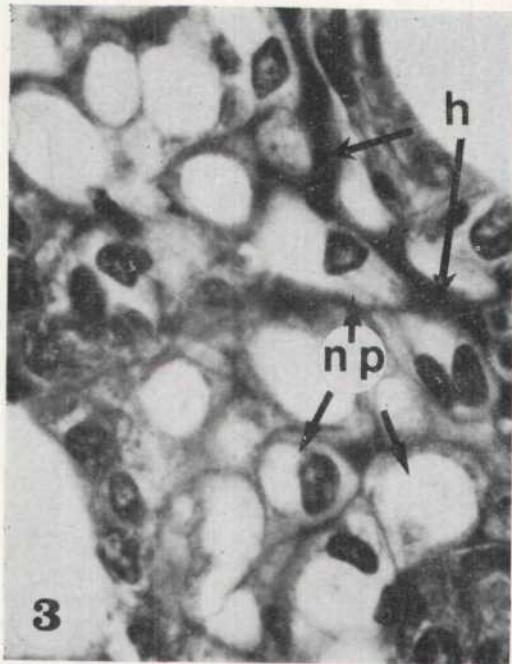
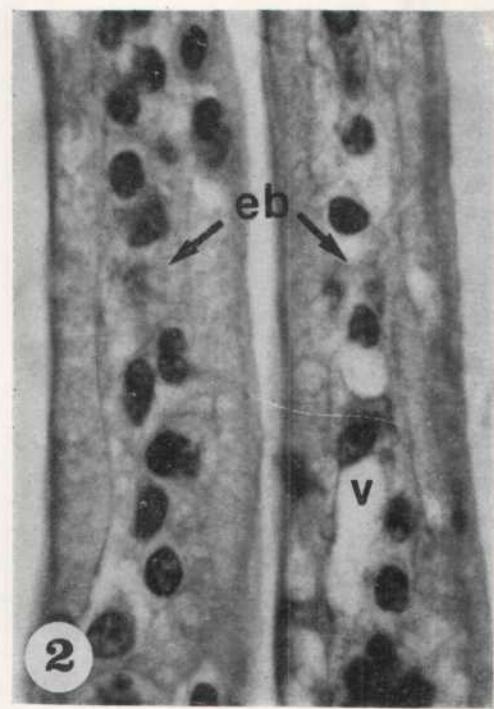
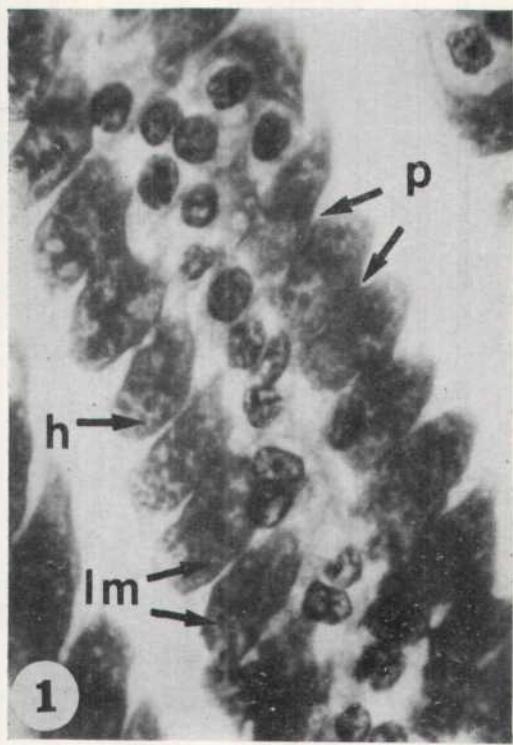
Les lacunes marginales (lm) sont particulièrement dilatées; elles forment des hernies séparées par les piliers (p) où semble s'être accumulée l'hémolymph (h).

2: Coupe transversale de lamelles branchiales de crevette exposée à une dose sublétale (200 ppm) d'émulsion pétrolière (BAL 150 et DN 400) (X 500). Un important phénomène de vacuolisation (v) de l'épithélium (eb) est observable en certains points.

3: Coupe transversale de l'axe branchial de crevette témoin (X 650) On remarque la présence d'un groupe de néphrocytes (np) entre lesquels circule librement l'hémolymph.

4: Coupe transversale de l'axe branchial de crevette exposée 24 h à une dose sublétale (800 ppm) d'émulsion pétrolière (BAL 150 + Dasic slichgone LTD) (X 650)

Les amas néphrocytaires (np) inondés par l'hémolymph (h) présentent un aspect coalescent.



C. PAPINEAU et G. CHEZE

conséquence, le cytoplasme et le noyau sont refoulés à la périphérie. L'ensemble de ces néphrocytes constitue le rein branchial d'après Cuenot (1895). Les néphrocytes accumulent des substances dans les vacuoles; leur activité selon Drach (1930) pourrait être en rapport avec la mue.

— *Lamelles branchiales (Planche II : Figure 2)*

La lamelle branchiale recouverte par la cuticule, est constituée essentiellement par un épithélium axial bordé par des lacunes hémolymphatiques qui communiquent avec le canal marginal. Les lacunes sont formées par des espaces intercellulaires limités par des expansions cellulaires épithéliales qui forment des piliers.

Histologie branchiale des crevettes traitées

L'étude histologique comparative nous a permis de faire les observations suivantes :

— Chez des crevettes exposées à une dose létale de dispersant BP 1100 WD (5 000 ppm), nous constatons, dans certaines lamelles, une détérioration de l'épithélium. Cette détérioration se traduit par une rupture des piliers. Celle-ci entraîne l'apparition de lacunes hémolymphatiques importantes limitées par une membrane distendue formant des hernies (Planche II : Figure 4). Ce phénomène est également observable mais se présente sous un aspect atténué chez des crevettes exposées à une dose sublétale du même dispersant 500 ppm (Planche II : Figure 3). Les émulsions pétrolières (pétrole BAL 150 + DN 400) appliquées à des doses sublétale (200 ppm) provoquent également des phénomènes de dilatation des lacunes marginales avec tension des piliers. Quant aux cellules épithéliales, elles montrent une importante vacuolisation (Planche III : Figure 2).

— Chez des crevettes traitées par les dispersants BP 1100 X et BP 1100 WD, la détérioration de l'épithélium se traduit également par des altérations nucléaires. De nombreux noyaux déformés et pycnotiques se rencontrent en effet dans les lamelles (Planche II : Figure 3). Enfin, dans l'axe branchial, sous l'influence des émulsions pétrolières s'observe un développement des lacunes hémolymphatiques dans lesquelles baignent les néphrocytes qui forment en certains points des amas coalescents (Planche III : Figure 4).

DISCUSSION ET CONCLUSION

La microscopie à balayage et plus particulièrement la réalisation de coupes de branchies observées en microscopie optique nous ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'anomalies morphologiques chez les crevettes traitées :

— au niveau lamellaire, nous notons une dilatation des lacunes hémolymphatiques, des phénomènes de détérioration membranaire et des altérations nucléaires;

— au niveau axial, nous observons le même phénomène de dilatation lacunaire, accompagné d'un aspect parfois anormal des néphrocytes.

Nos observations relatives au gonflement des lamelles branchiales confirment les résultats donnés par la bibliographie (Swedmark *et al.*, 1971; Abel et Skidmore, 1975), plus précisément ceux de Wildish (1970) qui décèle chez un crustacé, *Gammarus oceanicus*, soumis à une dose sublétale de dispersant, un œdème branchial. Cette dilatation de la lacune marginale et l'important phénomène de stase qui l'accompagne sont vraisemblablement le témoignage de sérieuses difficultés circulatoires liées à des perturbations de l'osmorégulation.

Par ailleurs, les anomalies relevées au niveau de l'épithélium branchial, rupture des piliers cellulaires, hernies cellulaires et aspect coalescent de certains groupes néphrocytaires suggèrent des phénomènes d'atteinte membranaire que devraient préciser les études ultérieures réalisées en microscopie électronique à transmission.

Pour des doses sublétale, soit des concentrations en polluant ne provoquant pas de mortalité, notre étude a donc permis de déterminer des effets décelables en microscopie photonique notamment : difficultés circulatoires et agression membranaire.

Summary

The sublethal effect of dispersants and mixtures of oil and dispersants on the gills of *Palaemon serratus* can be detected by light microscopy. The observation by light microscopy revealed cellular damages of gills: deterioration of the membrane and difficulties of blood circulation.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABEL, P.D. et SKIDMORE, J.F., 1975. — Toxic effects of an anionic detergent on the gills of rainbow trout. *Water Research*, 9, pp. 759-765.
- ALLEN, E.J., 1892. — On the minute structure of gills of *Palaemonetes varions*. *Quart. Journ. Microscop. Sciences*, 34, pp. 75-84.
- BLANTON, W.G. et ROBINSON, M.C., 1973. — Some acute effects of low-boiling petroleum fractions on the cellular structures of fish gills under field conditions. In: "The microbial degradation of oil pollutants". Ed. Ah.
- CUENOT, L., 1895. — Etudes physiologiques sur les crustacés décapodes. *Arch. Biol.*, 13, pp. 245-303.
- DEBAISIEUX, p., 1971. — Appareil branchial de *Crangon vulgaris* (Décapode nageur). Anatomie et Histologie. *La Cellule*, 69 (1), pp. 65-78.
- DRACH, p., 1930. — Etude sur le système branchial des crustacés décapodes. *Arch. Anat. Microscop. Morph. Exp.*, 26, pp. 83-133.
- DTUGHTIE, D.G. et RANGA RAO, K., 1979. — Ultrastructure of an exocrine dermal gland in the gills of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: occurrence of transitory ciliary axonemes associated with the sloughing and reformation of the ductule. *J. Morph.*, 161, pp. 281-308.
- FOSTER, C.A. et HOWSE, H.D., 1978. — A morphological study on gills of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Tissue and Cell*, 10 (1), pp. 77-92.
- LASSUS, P., 1981. — Communication personnelle (ISTPM).
- LEMKE, A.E. et MOUNT, D.I., 1963. — Some effects of alkyl benzene sulfonate on the bluegill. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 92 (4), pp. 372-378.

- MARTOJA, R. et MARTOJA, M., 1967. — Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie Ed., Paris.
- NUWAYHID, M.A., DAVIES, P.S. et ELDER, H.Y., 1980. — Changes in the ultrastructure of the gill epithelium of *Patella vulgata* after exposure to north sea crude oil and dispersants. *J. Mar. Ass. U.K.*, 60, pp. 439-448.
- PAPINEAU, C. et LE GAL, Y., 1983. — Effet sublétal des dispersants et des émulsions pétrolières sur l'ATPase des branchies *Palaemon serratus*. *Rev. Intern. Oceanogr. Méd.* (sous presse).
- SCHMID, T. et MANN, H., 1962. — Die Emwirkung von Dodecylbenzolsulfonat auf die Kiemen von Forellen. *Arch. Fish. Wiss.*, 13, pp. 41-51.
- SWEDMARK, M., BRAATEN, B., EMANUELSSON, E. et GRANMO, A., 1971. — Biological effects of surface active agents on marine animals. *Mar. Biol.*, 9, pp. 183-201.
- WILDISH, D.J., 1970. — The toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBB) in sea water to *Gammarus oceanicus*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 5 (3) pp. 202-204.