

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES**

**TOXICITE SUBLETALE DU TETRACHLOROETHYLENE
SUR LA CREVETTE DES MARAIS**

PALAEMONETES VARIANS

P. LASSUS, D. CHAGOT, L. MIOSSEC,

G. BOCQUENE & P. TRUQUET



DERO-90-01-MR

IFREMER
CENTRE DE NANTES
B.P n° 1049
4037 NANTES CEDEX 01

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES
DEPARTEMENT MILIEU ET RESSOURCES - NANTES

<p>AUTEUR (S) :</p> <p>LASSUS (P.), CHAGOT (D.), MIOSSEC (L.), BOCQUENE (G.), TRUQUET (P.).</p>	<p>CODE :</p> <p>N° <u>DERO-90-01-MR</u></p>
<p>TITRE</p> <p>TOXICITE SUBLETALE DU TETRACHLOROETHYLENE SUR LA CREVETTE DES MARAIS <i>PALAEEMONETES VARIANS</i></p>	<p>date : Février 1990</p> <p>tirage nb : 25</p> <p>Nb pages : 15 Nb figures : 17 Nb photos : 12</p>
<p>CONTRAT (intitulé)</p> <p>N° _____</p>	<p>DIFFUSION</p> <p>libre <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>restreinte <input type="checkbox"/></p> <p>confidentielle <input type="checkbox"/></p>

RESUME : Le tétrachloroéthylène est un solvant chloré détecté à la sortie de la station d'épuration de Toulon-Est. Sa toxicité sublétales a été testée en flux continu pendant 31 jours au centre d'aquaculture de Pen Bron sur des crevettes des marais *Palaemonetes varians*. Dans les conditions expérimentales : variations naturelles de température et salinité, valeur normales de pH, ammoniac et oxygène dissous, les concentrations de tétrachloroéthylène utilisées (10, 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$) n'ont pas entraîné de mortalités ni de modifications dans les fréquences de mue des individus testés. L'histologie branchiale des animaux en contact avec le contaminant fait apparaître plusieurs altérations non spécifiques, aussi bien chez les témoins que chez les individus contaminés. Cependant les taux de nécroses paraissent augmenter au cours du temps en présence de tétrachloroéthylène, proportionnellement à la concentration et dès la teneur : 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ qui est comparable aux concentrations trouvées à proximité du rejet.

ABSTRACT : Tetrachloroethylene, a chlorinated solvent, is detected in the plume of East-Toulon domestic wastes treatment plant. Its sublethal toxicity was tested during 31 days in a flow-through system at Pen Bron aquaculture centre, using swampshrimp *Palaemonetes varians* as test organism. Under experimental conditions : natural variations in temperature and salinity, normal pH, ammonia and dissolved oxygen values, running tetrachloroethylene concentrations (10, 100 and 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$) induced neither mortalities nor any change in molting frequencies of experimented animals. Histology of gills in contaminated animals showed several non specific deteriorations which could be observed either in control or assay animals. Necrosis levels nevertheless, seem to increase in time and proportionally to tetrachloroethylene concentrations, as of 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ which is a concentration similar to those observed in the vicinity of urban wastes discharge.

Mots-clés : *Palaemonetes varians*, crustacés, tetrachloroethylene, flux continu, rejets urbains, histologie, nécroses.

Key-words : *Palaemonetes varians*, crustacees, tetrachloroethylene, flow through system, urban wastes, histology, necrosis.

<p style="text-align: center;">TOXICITE SUBLETALE DU TETRACHLOROETHYLENE SUR LA CREVETTE DES MARAIS <i>PALAEEMONETES VARIANS</i></p>

LASSUS. P, CHAGOT. D, MIOSSEC. L, BOCQUENE. G, TRUQUET. P.

I. INTRODUCTION

Dans le cadre du projet "Rejet Urbain" une étude de la toxicité létale du Tetrachloroéthylène sur la crevette des marais (*Palaemonetes varians*) avait déjà été entreprise en 1988 (MIOSSEC et al, 1987) afin d'évaluer la CL50 de ce contaminant volatile. En effet, le Tetrachloroéthylène, solvant chloré détecté à la sortie de la station d'épuration de Toulon-Est à des teneurs de l'ordre de 11 à 34 $\mu\text{g l}^{-1}$ a été très peu étudié en écotoxicologie marine. Les résultats obtenus en 1988 faisaient état d'une CL50-96h de 2,37 mg.l^{-1} traduisant ainsi une sensibilité accrue des crustacés par rapport à d'autres espèces marines exposées à ce contaminant. Néanmoins le protocole expérimental utilisé (circuit ouvert avec un débit de 2 l/h), bien que stabilisant la dose reçue par bac expérimental, ne permettait pas des essais à long terme à des teneurs proches de celles rencontrées sur le rejet. C'est pourquoi des essais de toxicité sublétales ont été réalisés dans une serre expérimentale du centre d'aquaculture de Pen Bron avec une alimentation plus importante en eau de mer et pendant plusieurs semaines.

Cette seconde étape a donc pour but de mettre en évidence les effets anatomo-pathologiques du Tetrachloroéthylène au cours d'une exposition prolongée sur des crevettes des marais en bassin.

II - MATERIELS ET METHODES

Installation expérimentale

Un circuit en flux continu a été mis en place dans les locaux de la station de Pen Bron (fig. 1), qui appartient au Lycée professionnel de Guérande. Trois concentrations sublétales ont été testées : 10, 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, sachant que 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ représentent la concentration maximale rencontrée à la station d'épuration de Toulon-Est en juin 1986. Ces concentrations ont été testées pendant un mois sur des lots de 30 crevettes, chaque crevette étant isolée des autres dans un système de clayette du type de celles utilisées pour l'élevage larvaire des homards. Un lot témoin a été testé dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en flux continu d'eau de mer filtrée 250 μm à la température du milieu naturel.

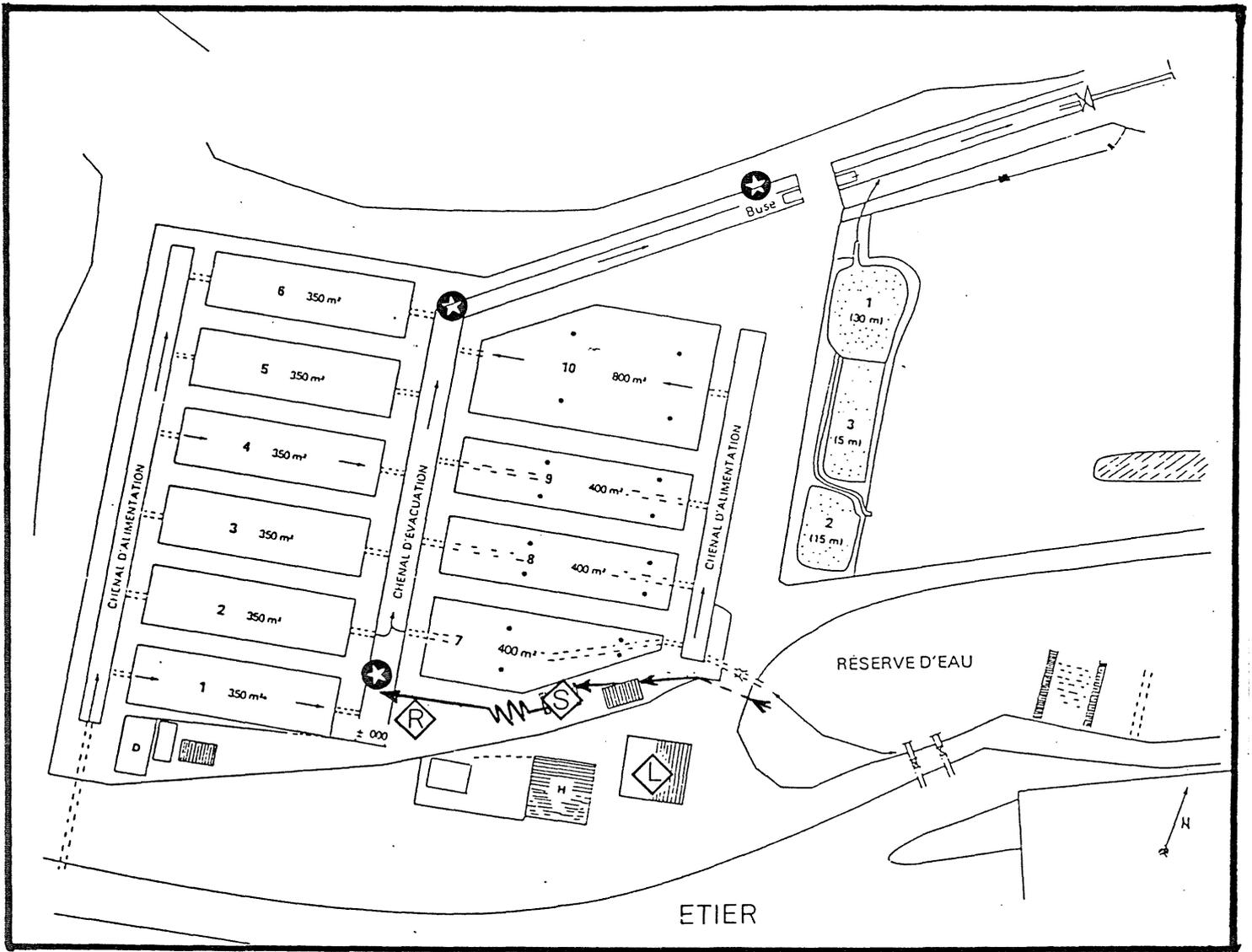


Fig. 1 : Plan des installations de Pen Bron (d'après BITAUD et HERVE, 1987). L : Laboratoire ; S : Serre dans laquelle se déroulent les expériences ; R : Rejet d'eau de mer chargée en Tétrachloroéthylène.

* : points d'analyse du TTCE après rejet.

Les mues et mortalités de chaque individu ont été relevées quotidiennement et chaque semaine 5 crevettes "essais" et "témoins" ont été sacrifiées pour examens histologiques. La solution mère saturée de $C_2 Cl_4$ était injectée par pompe microdoseuse ISMATEC dans des bacs de 60 l contenant les casiers à crevettes (fig. 2) et un système d'épuration complet (barbotage, chauffage, évaporation sur plan incliné de 15 m) permettait de réduire à 0 toute trace de $C_2 Cl_4$ dans le chenal d'évacuation.

Paramètres physicochimiques

Une fois par semaine, et en début d'expérience, plusieurs paramètres ont été mesurés : ammoniac, oxygène dissous et pH. La température de l'eau des bacs ainsi que les teneurs en $C_2 Cl_4$ ont été mesurées quotidiennement. L'ammoniac a été dosé par la méthode de KOROLEFF (1976), l'oxygène dissous par la méthode de WINKLER et le pH a été mesuré avec un pH mètre portatif.

Examens histologiques

Les animaux ont été fixés *in toto*, au liquide de Bouin, puis déshydratés et stockés dans l'acétate d'isoamyle.

A leur arrivée au laboratoire, ils sont coupés transversalement à la jonction abdomen céphalothorax. Puis le céphalothorax est coupé longitudinalement et débarassé de la cuticule, du rostre et des péréïopodes. Après imprégnation à la paraffine, des coupes d'une épaisseur de 3 μm sont effectuées et colorées par l'hématoxyline d'Ehrlich éosine.

Dosages du Tétrachloroéthylène

Le laboratoire de la station de Pen Bron a été équipé pendant la durée des expériences d'un chromatographe en phase gazeuse VARIAN 3300 et d'un intégrateur INTERSMAT CR3A. Les teneurs en $C_2 Cl_4$ ont été suivies journallement dans les quatre bacs et au rejet, et, à deux reprises, en trois points du chenal d'évacuation (fig. 1) afin de vérifier la dilution du contaminant. La Tétrachloroéthylène dans l'eau de mer a été analysé par extraction liquide/liquide du produit, puis dosage en CPG-ECD. La courbe d'étalonnage a été réalisée pour des concentrations variant de 0 à 30 $\mu g.l^{-1}$ de $C_2 Cl_4$ dans l'hexane, avec les conditions opératoires suivantes pour le CPG : colonne CPSil 8 CB L, températures four : 60°C, injecteur : 140°C, détecteur = 300°C, gaz vecteur : Helium pression 12 ps, make-up : azote, quantité injectée : 1 μl . La concentration en mg/l de Tétrachloroéthylène dans l'échantillon d'eau de mer est donnée par : $C = (Hec \times Cet \times Vpe / Het \times Vesc) \times f / 1\ 000$ avec :

Vpe = volume de la prise d'essai d'eau de mer en ml, Vex = volume de solvant d'extraction en ml, Hec = hauteur du pic dans l'échantillon, Het = hauteur du pic dans la solution étalon, Cet = concentration de la solution étalon en $\mu g.l^{-1}$, f = facteur de dilution (LUCON, 1986).

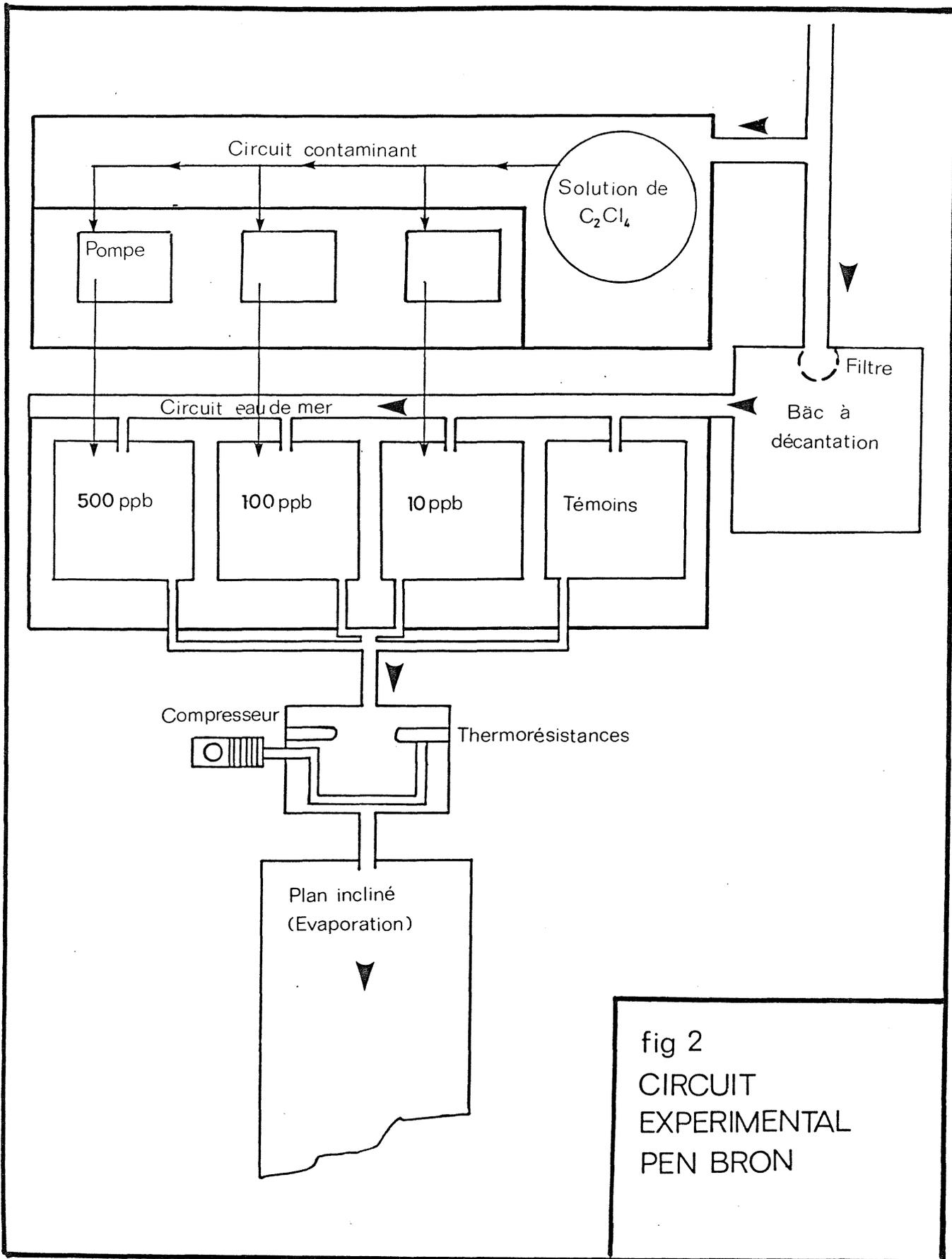


fig 2
 CIRCUIT
 EXPERIMENTAL
 PEN BRON

III - RESULTATS

Les crevettes ont été triées de façon à avoir des animaux de taille et d'âge homogènes, soit une longueur de céphalothorax = $12 \pm 1,41$ mm et les différents lots, témoins et essais, ont été suivis du 28 septembre au 17 novembre 1987.

Un contrôle quotidien des teneurs au rejet (R) pendant toute la durée de l'expérience a permis de vérifier que la concentration moyenne de Tétrachloroéthylène atteignait $8,13 \pm 3,57 \mu\text{g.l}^{-1}$. Par ailleurs des contrôles effectués le 29 octobre et le 4 novembre dans le chenal d'évacuation ont montré que la dilution du rejet rendait le contaminant indétectable ($\leq 0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$) dans le milieu récepteur.

1 - Paramètres physicochimiques

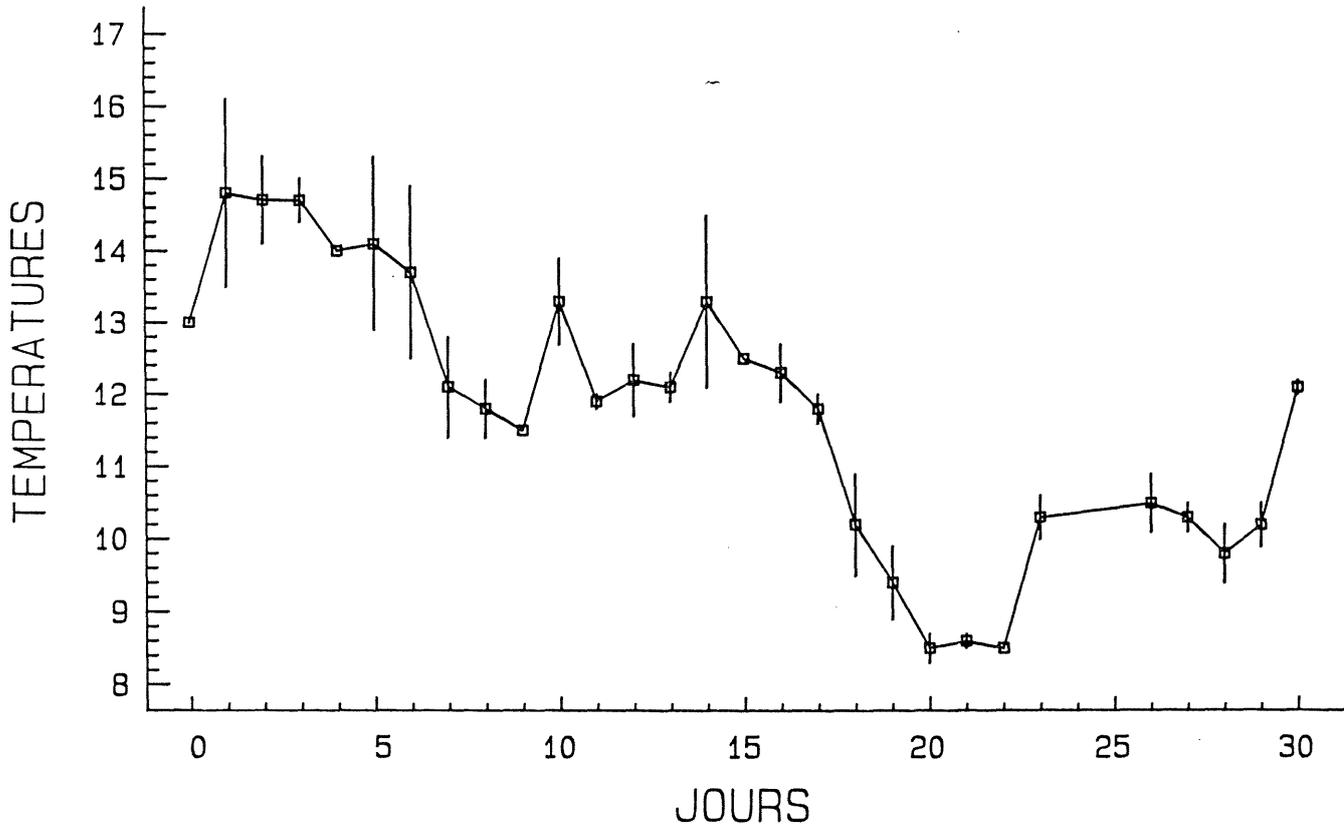
Les écarts entre les quatre bacs expérimentaux ont été très faibles. La salinité a été de l'ordre de 27 à 28, 10^{-3} g.l^{-1} pendant la durée de l'expérience excepté le 7 novembre où une remontée à $30 \cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$ est notée.

Dates de mesure	NH4 ($\mu\text{atg. l}^{-1}$)	S. % (g.p. mille)	pH	O2 (mg. l-1)
17 octobre	6,92	28	7,87	-
24 octobre	$3,51 \pm 0,14$	27	8,20	$10 \pm 0,08$
31 octobre	$7,99 \pm 0,83$	28	$7,71 \pm 0,02$	$9,35 \pm 0,78$
7 novembre	$3,22 \pm 0,20$	30	$7,87 \pm 0,008$	$9,72 \pm 0,21$
14 novembre	-	27	$7,87 \pm 0,01$	$8,65 \pm 0,16$

Tableau 1 : valeurs moyennes et écarts types des différents paramètres physicochimiques mesurés dans les 4 bacs expérimentaux.

Le pH varie peu (7,71 à 8,20) et dans un intervalle compatible avec l'élevage d'animaux marins, de même que l'ammoniac et l'oxygène dissous. La température a été suivie quotidiennement (fig. 3) pendant 30 jours et montre une relative stabilité entre le 6^e et 16^e jour (12°C) après avoir chuté de 3°C en début d'expérience, puis chute à nouveau de 8,5°C entre le 20^e et le 22^e jour pour se stabiliser autour de 10°C pendant les derniers jours de suivi.

Fig. 3 : Variations journalières de température de l'eau du circuit expérimental.



2 - Mortalités et fréquences de mue

Aucune mortalité n'a été enregistrée pendant la durée de l'expérience aussi bien chez les individus témoins que chez ceux exposés à 10, 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de Tétrachloroéthylène. Si l'on examine les fréquences cumulées de mues (fig. 4) on ne constate pas de différence significative jusqu'à 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ entre le rythme de mue des témoins et des individus exposés au Tétrachloroéthylène, en dépit du refroidissement important de la température de l'eau en milieu d'expérience.

3 - Evolution des teneurs en Tétrachloroéthylène

Deux à trois mesures journalières de C_2Cl_4 ont été effectuées aussi bien dans le bac témoin que dans les trois bacs d'essai. Les résultats de ces analyses sont représentés dans la fig. 5. La contamination du bac témoin par les vapeurs de C_2Cl_4 se traduit dans les faits par un faible apport de contaminant : entre 0 et 1,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$. L'évolution moyenne des concentrations dans les bacs essais correspond respectivement à 10,1 \pm 1,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 100,4 \pm 16,9 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 473,3 \pm 57,7 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Des variations plus importantes de la concentration sont décelables respectivement aux 4^e et 1^{er} jour pour 10 et 100 d'une part, 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ d'autre part. Ces brusques et brèves variations ne se sont pas jamais reproduites pendant le reste de l'expérience.

4 - Lectures microscopiques

4.1 - Problèmes de fixation.

Lors de l'observation microscopique des coupes, une lyse massive des hépatopancréas est mise en évidence, aussi bien chez les animaux témoins (fig. 6) que chez les animaux exposés au Tétrachloroéthylène (fig. 7). Cette anomalie résulte manifestement d'un protocole de fixation incorrect. En effet, l'exosquelette des crevettes, essentiellement chitineux, est pratiquement imperméable et empêche la pénétration du fixateur dans les tissus lorsque la fixation est pratiquée par immersion. BELL et LIGHTNER (1988) donnent une technique adéquate de fixation comprenant une perfusion par le fixateur, une dissection, puis l'immersion.

Les tissus branchiaux, plus superficiels, ont pu être observés sous réserve d'artéfacts liés à la fixation.

4.2 - Histologie des branchies des animaux témoins

La branchie est constituée de filaments primaires qui se subdivisent en filaments secondaires. Chaque filament secondaire comprend une paroi cuticulaire, à l'intérieur de laquelle sont présentes des cellules épithéliales de soutien dont les prolongements relient les côtés opposés de la paroi. Entre les cellules sont réparties des lacunes où circule

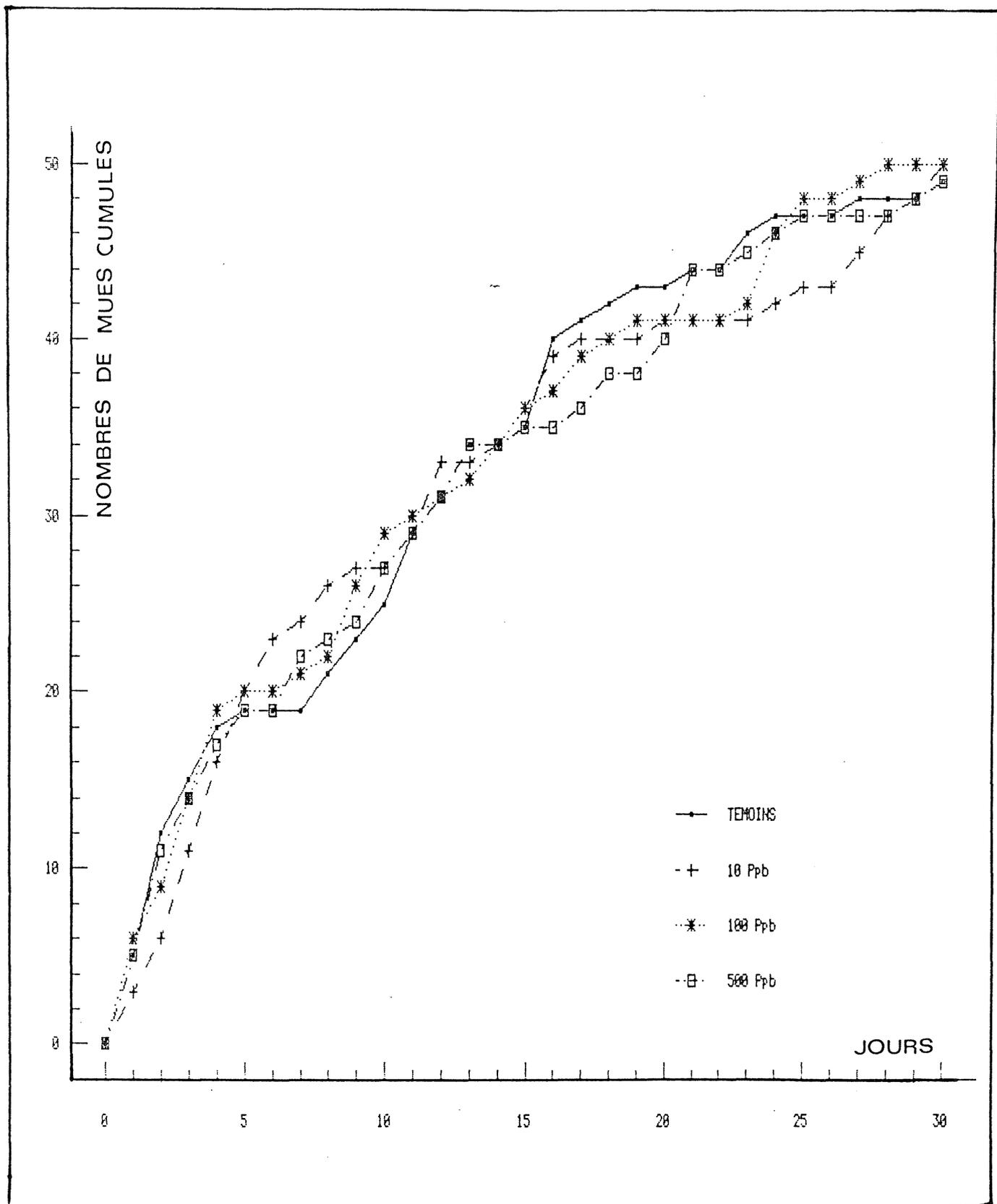


Fig. 4 : Nombres de mues cumulées chez *Palaemonetes varians* au cours des 30 jours d'expérimentation et dans les quatre lots testés.

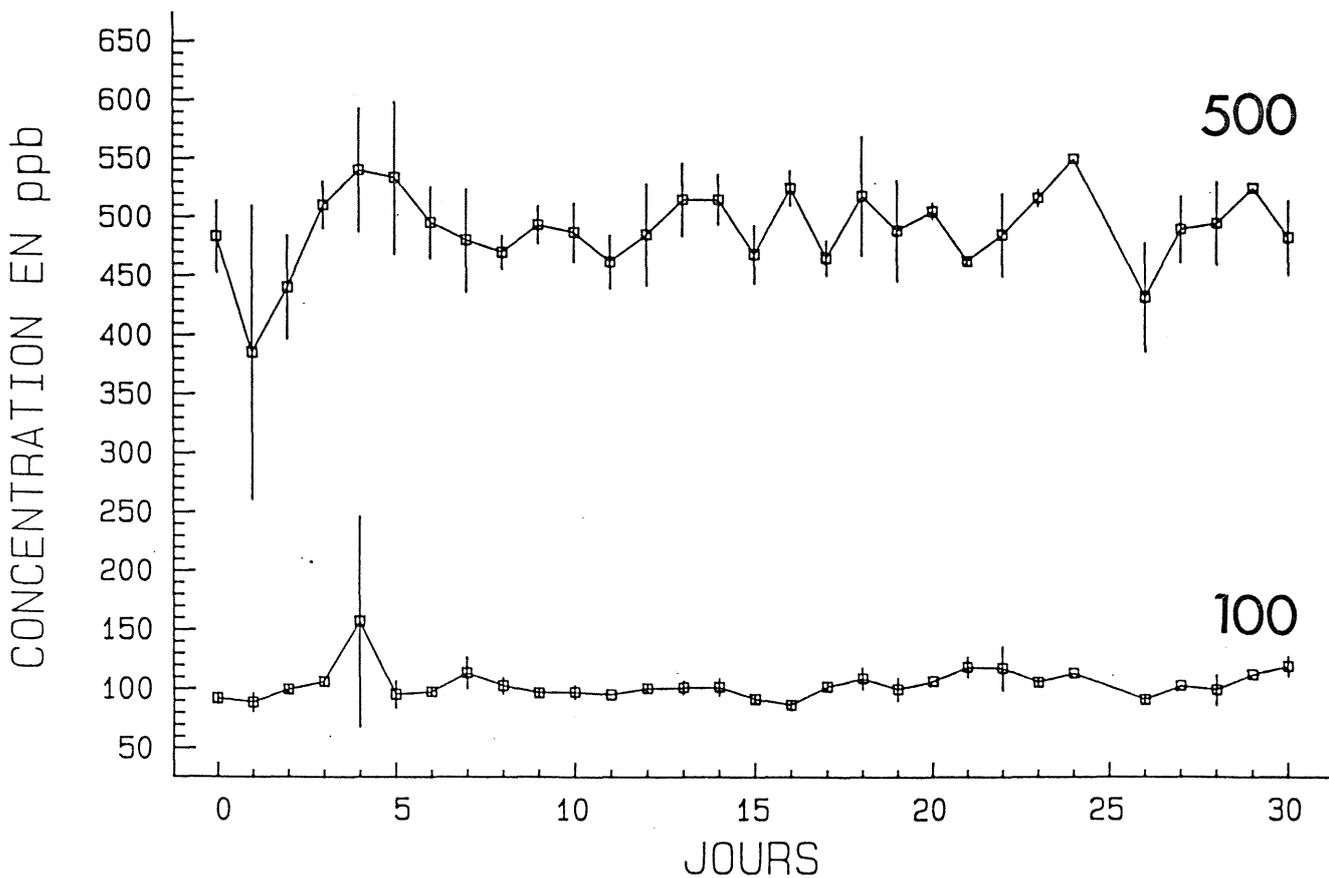
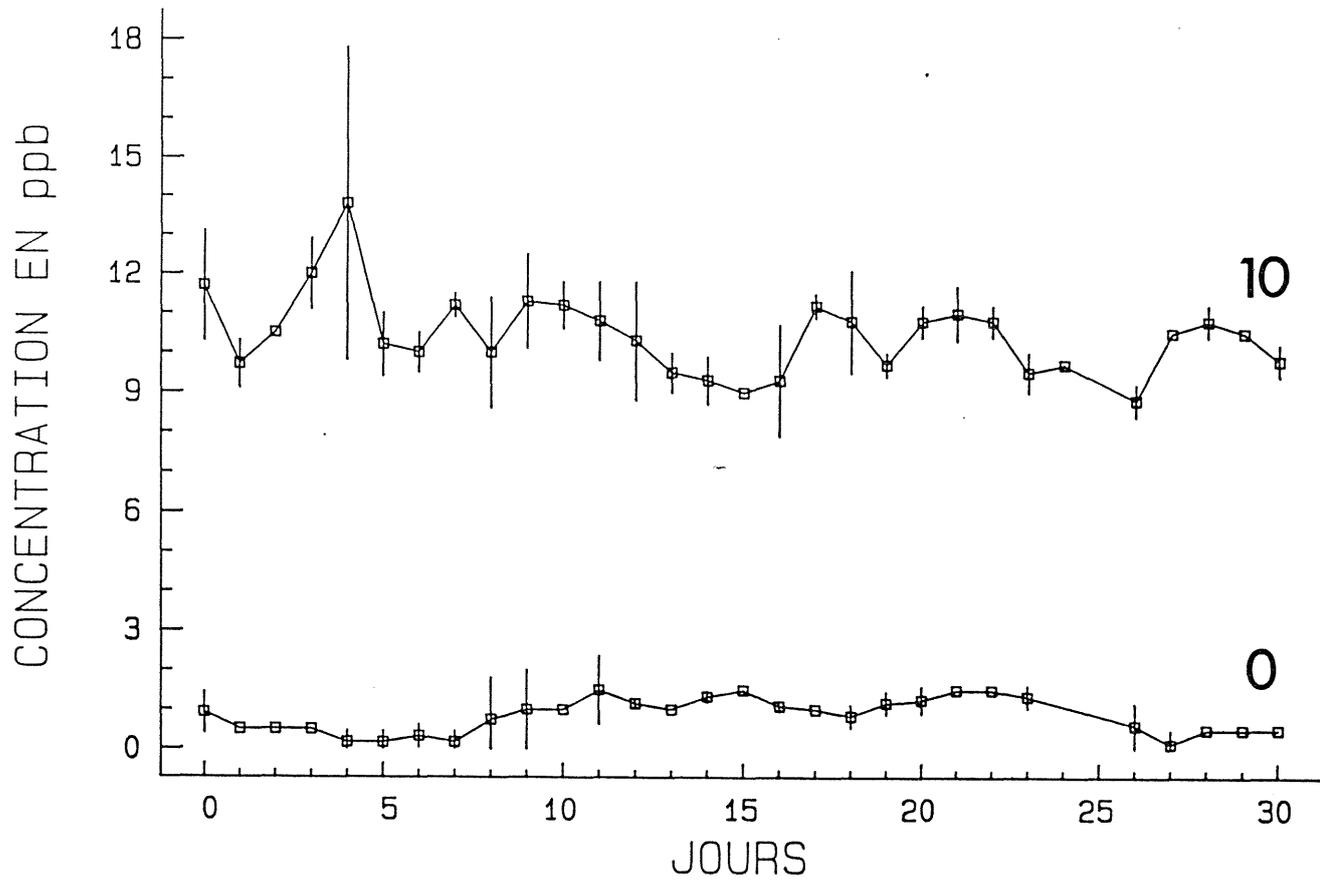


Fig. 5 : Variations de la concentration journalière de Tétrachloroéthylène dans les quatre bacs expérimentaux (0, 10, 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$).

Fig. 6 : Hépatopancréas (hep) d'un animal témoin sacrifié à 8 jours. La zone nécrosée (nc) est généralisée au centre de l'organe (x 120).

Fig. 7 : Hépatopancréas d'un animal ayant reçu 10 ppb sacrifié à 8 jours. Même nécrose centrale.
Ht : Tubule de l'hépatopancréas (x 120).

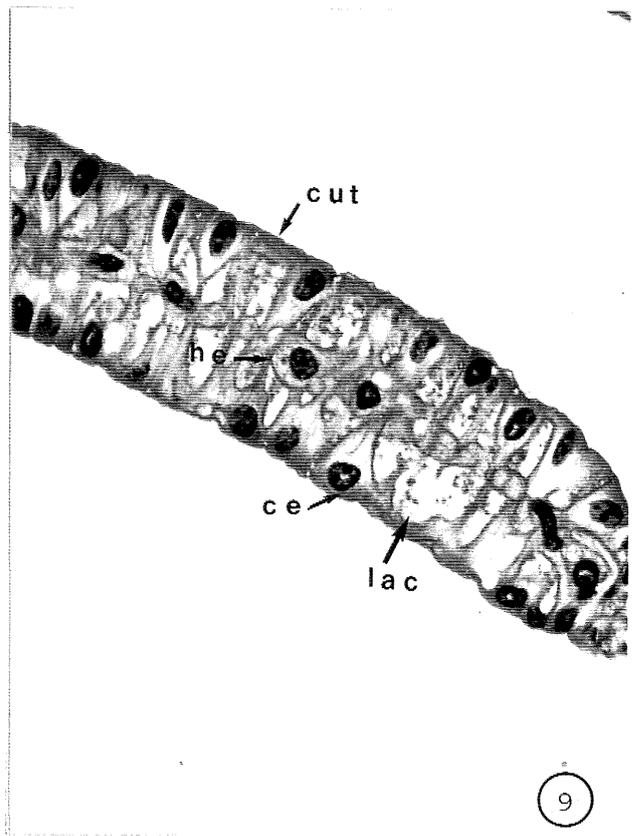
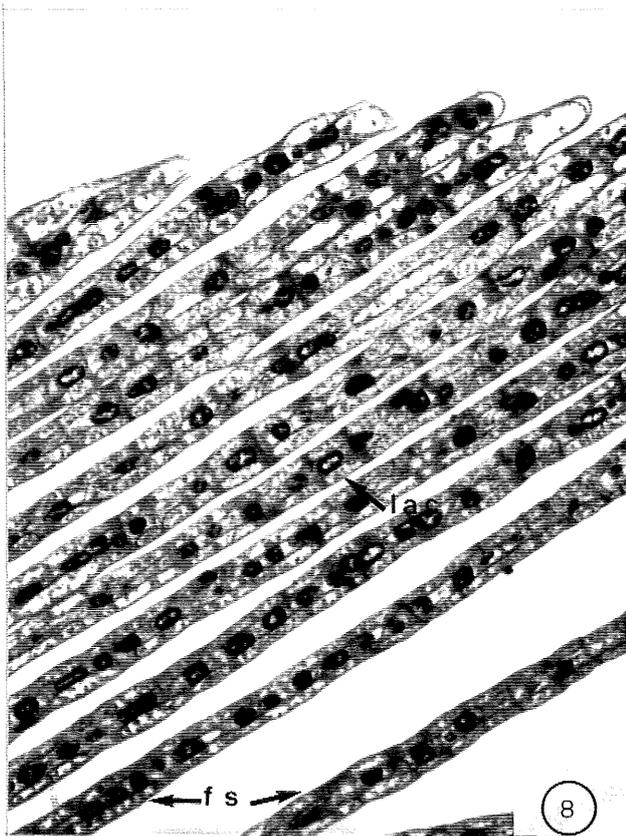
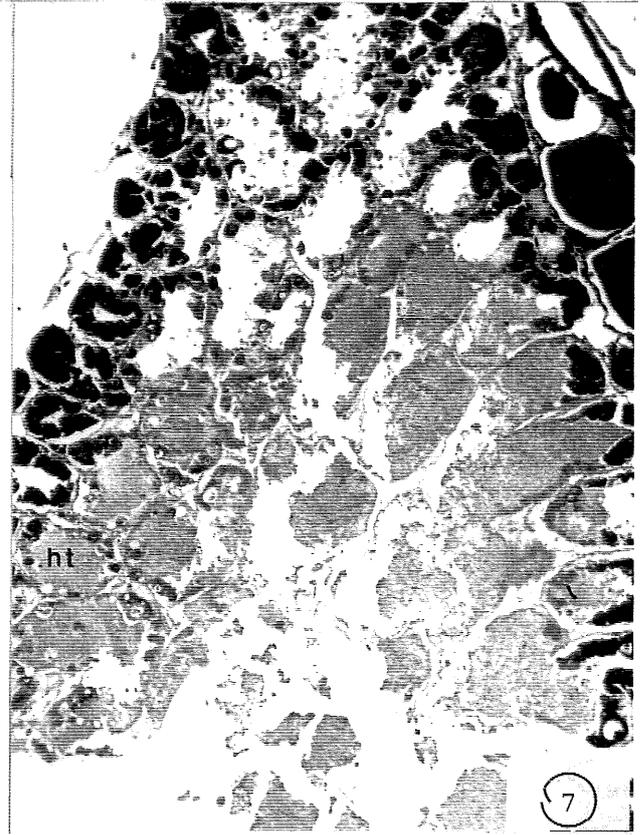
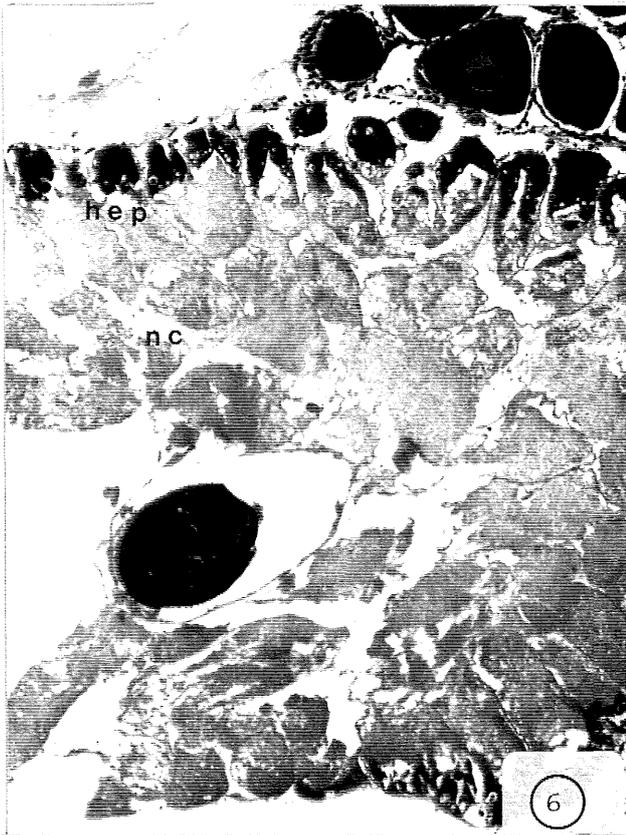


Fig. 8 : Branchie normale d'animal témoin (8 j).
Fs = Filament secondaire.
Lac = Lacune (x 480).

Fig. 9 : Détail d'un filament secondaire normal d'animal témoin (8 j).
Cut = Cuticule. Lac = Lacune.
Ce = Cellule épithéliale. He = Hémocyte (x 720).

l'hémolymphe (fig. 8/9). Une partie seulement des animaux témoins ont un aspect histologique normal. Certains tissus branchiaux présentent des anomalies : lacunes dilatées (fig. 10), contenant un matériel fortement éosinophile (fig. 11), aspect désorganisé, prénérotique (fig. 12). Certains animaux sont infectés par des protozoaires (fig. 13).

4.3 - Histologie des branchies des animaux exposés au Tétrachloroéthylène

Les modifications histopathologiques observées sont globalement les mêmes que celles observées chez les témoins : lacunes dilatées, remplies ou non d'un matériel éosinophile qui pourrait être issu de la précipitation ou de la coagulation des protéines de l'hémolymphe, désorganisation et nécrose tissulaire.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 en nombre d'animaux porteurs d'anomalies en fonction de la dose de polluant et du temps.

Histopathologie \ Jours	Jours				
	8	14	21	28	31
Témoins :					
1 - Lacunes dilatées	1/4	3/5	1/4	2/3	3/5
2 - Lacunes contenant du matériel éosinophile	2/4	3/5	3/4	2/3	3/5
3 - Nécrose	0/4	0/4	1/4	1/3	0/5
10 ppb :					
1 - Lacunes dilatées	1/5	5/5	4/4	4/4	5/5
2 - Lacunes contenant du matériel éosinophile	5/5	5/5	4/4	5/5	5/5
3 - Nécrose	0/5	0/5	1/4	2/4	5/5
100 ppb :					
1 - Lacunes dilatées	1/3	5/5	4/4	5/5	5/5
2 - Lacunes contenant du matériel éosinophile	3/3	5/5	4/4	5/5	5/5
3 - Nécrose	0/3	2/5	1/4	5/5	5/5
500 ppb :					
1 - Lacunes dilatées	2/4	3/3	2/2	3/3	3/3
2 - Lacunes contenant du matériel éosinophile	4/4	3/3	2/2	3/3	3/3
3 - Nécrose	0/4	1/3	0/2	3/3	3/3

Tableau 2 : Anomalies constatées chez les témoins et les individus exposés au Tétrachloroéthylène en fonction du temps et de la concentration. Estimations sur des lots de 2 à 5 individus.

Les figures 9 à 12 illustrent les types de lésions mises en évidence.

Fig. 10 : Animal témoin (3 s).
Lac d = Lacunes dilatées.

Du matériel éosinophile particulière est présent dans certaines lacunes (x 480).

Fig. 11 : Animal témoin (3 s).

Présence de matériel éosinophile très dense (mat. eo) dans les lacunes (x 480).

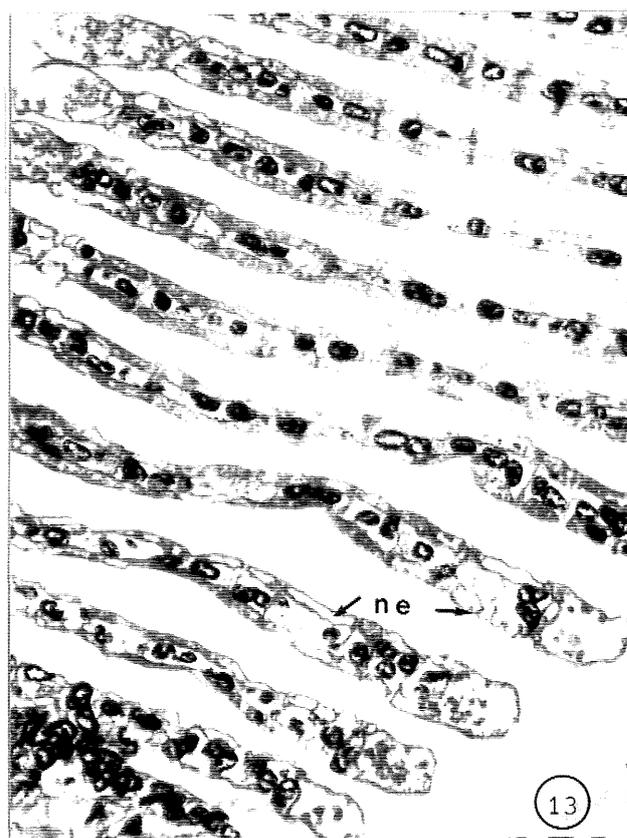
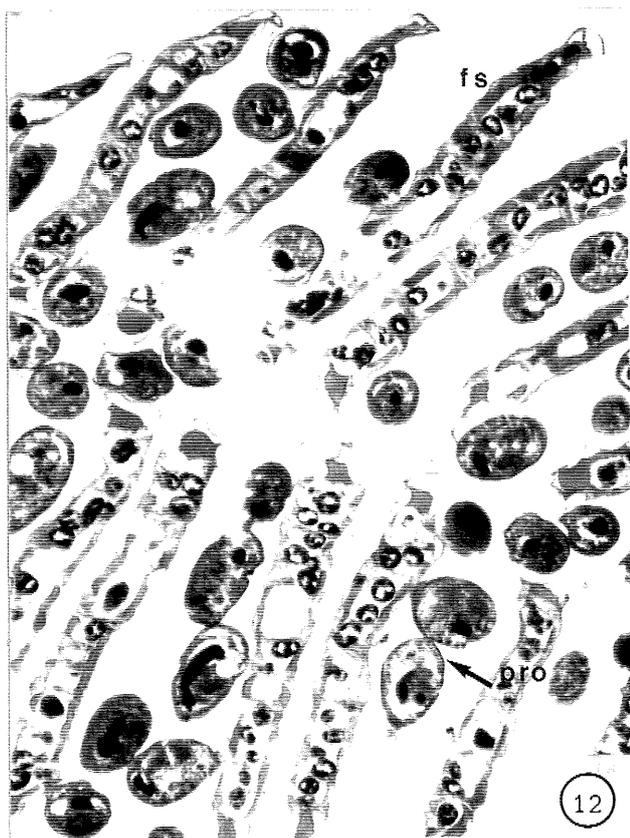
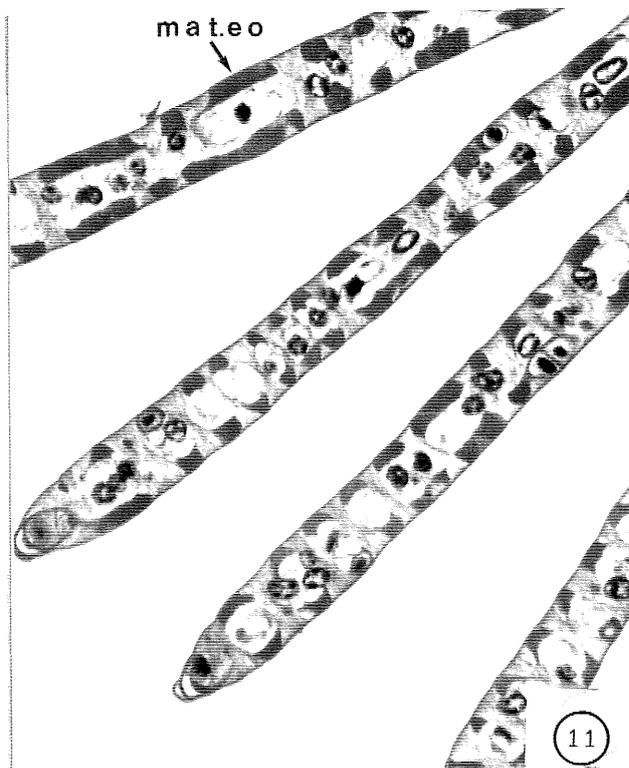
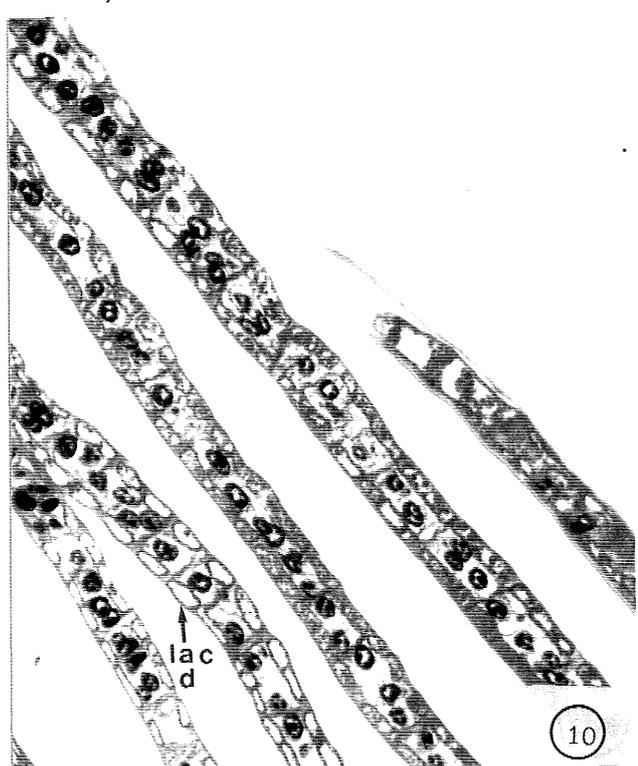


Fig. 12 : Animal témoin (2 s) montrant de nombreux protozoaires (pro) accolés aux filaments secondaires (fs) x 480.

Fig. 13 : Animal témoin (3 s) montrant des zones nécrotiques (ne) sur certaines parties des filaments branchiaux x 480.

Fig. 14 : Animal traité (100 ppb, 3 s) montrant des lacunes fortement dilatées x 480.

Fig. 15 : Animal traité (10 ppb, 8 j) dont les lacunes branchiales contiennent du matériel coagulé éosinophile x 480.

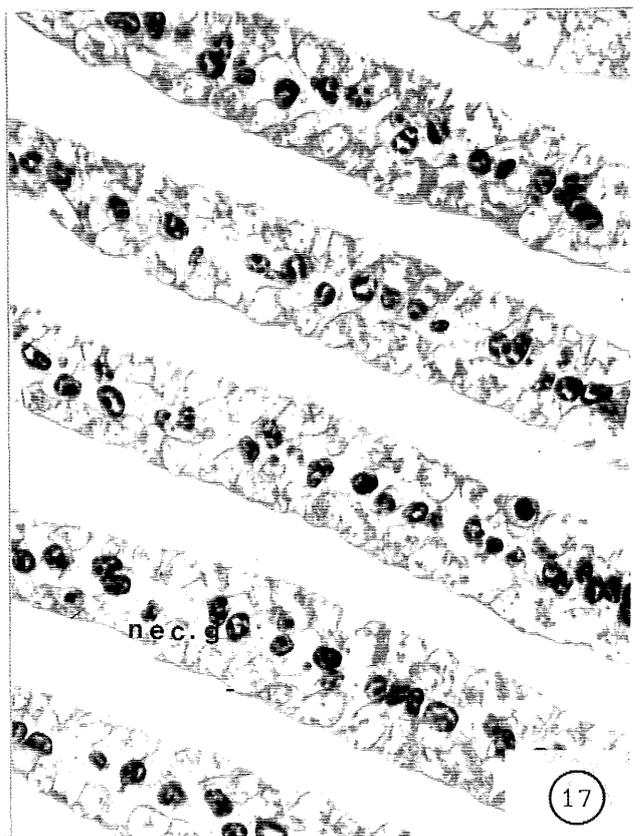
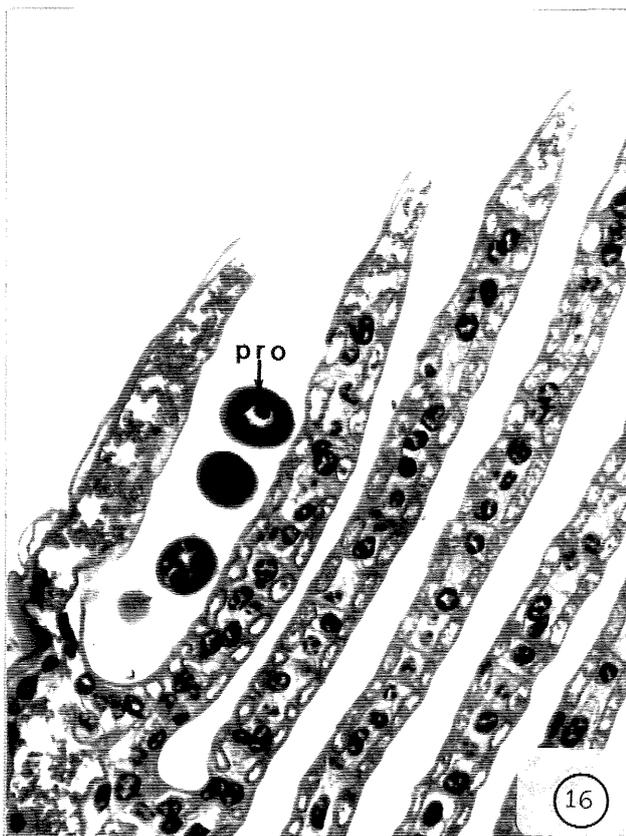
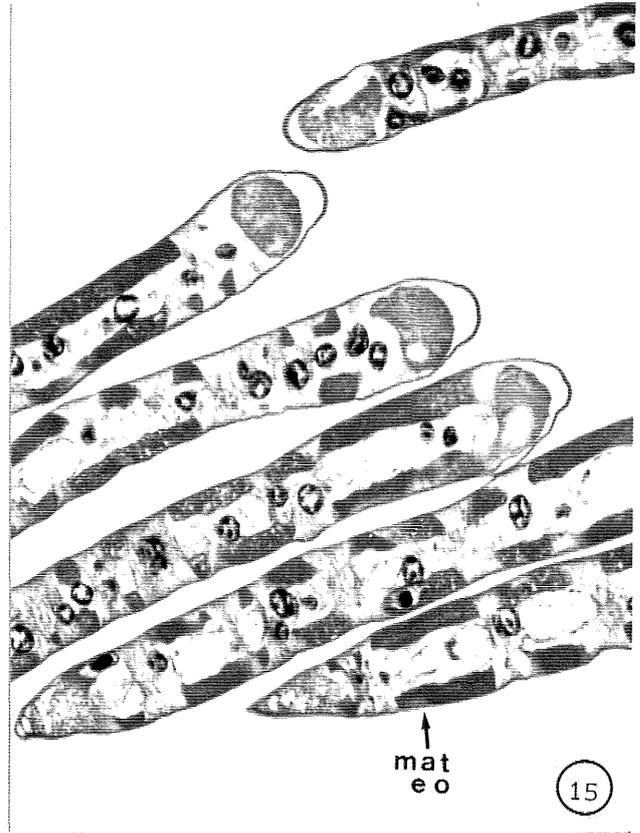
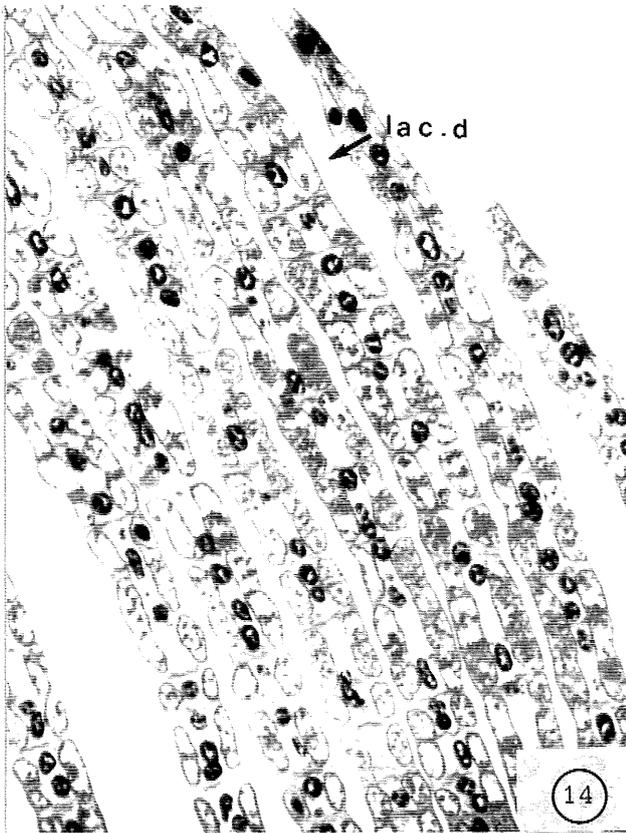


Fig. 16 : Animal traité (10 ppb, 8 j) porteur de protozoaires. Les lacunes apparaissent dilatées et certaines contiennent du matériel éosinophile x 480.

Fig. 17 : Filaments branchiaux d'animal traité (100 ppb, 4 s) montrant une structure désorganisée et un aspect nécrotique général (nec. g.) x 480.

V - CONCLUSIONS

Le suivi expérimental des effets d'une exposition chronique de Tétrachloroéthylène sur des crevettes des marais adultes (*Palaemonetes varians*) a été réalisé pendant 31 jours en flux continu et aux teneurs sublétales de 10, 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Cet organisme estuarien a été soumis à des variations de salinité naturelles (27 à 30 g.p. mille) et les paramètres physicochimiques du milieu (Ammoniac, pH, oxygène dissous) sont restés à des teneurs ne pouvant interférer avec la survie des individus. En revanche la température a considérablement chuté en 20 jours puisqu'elle est passée de 14 à 8,5°C, ce qui est normal compte tenu de la période expérimentale. Aucune mortalité n'a été enregistrée pendant la durée de l'expérience et de même, on ne constate pas de différence significative jusqu'à 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ entre le rythme de mue des témoins et celui des individus contaminés. C'est donc au niveau des tissus branchiaux qu'une attention particulière a été portée.

Les dilatations des lacunes sanguines et leur colmatage par du matériel éosinophile apparaissent très tôt chez tous les animaux exposés quelle que soit la dose. Les nécroses semblent plus rapides chez les animaux exposés à 100 et 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$ que chez ceux exposés à 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Cependant, l'existence des mêmes anomalies chez certains animaux témoins interdit de conclure à un effet caractéristique du Tétrachloroéthylène. La présence de protozoaires sur les tissus branchiaux chez une partie des animaux témoins ou exposés pose le problème de savoir si leur présence est secondaire aux lésions ou s'ils interviennent dans le développement de celles-ci. D'autre part, l'absence presque totale de données sur l'effet des xénobiotiques sur les branchies de crustacés rend difficile la référence à des travaux antérieurs.

Il faut souligner qu'une interprétation correcte des modifications histopathologiques dépend en tout premier lieu d'une fixation irréprochable, les artéfacts qui surviennent lors de cette étape de travail étant irréversibles.

En résumé, il semble que l'histopathologie branchiale chez *Palaemonetes varians* et dans le cas des effets du Tétrachloroéthylène, ne soit pas un critère vraiment spécifique du contaminant. Parmi les 3 types de lésions observées, seules les nécroses, rares ou absentes chez les témoins, paraissent augmenter au cours du temps et proportionnellement à la concentration. Ce phénomène est sensible dès la concentration de 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$, ce qui devrait orienter les études sur des expositions plus longues et la prise en compte de critères histologiques plus spécifiques, observés à partir d'autres organes que les branchies (effets sur le foie de *Poecilia sphenops*. LOEKLE et al, 1983).

BIBLIOGRAPHIE

KOROLEFF. F, 1976. Determination of ammonia in : Methods of sea water analysis (GRASSMOLFDF - Ed) Verlag - Chemie, Weinheim RFA, : 126-133.

LOEKLE. D.M, SCHECTER. A.J, CHRISTIAN. J.J, 1983. Effects of chloroform, Tetrachloroéthylène and Trichloroéthylène on survival, growth, and liver of *Poecilia sphenops*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30 (2) : 199-205.

LUCON. M, 1986. Dosage du Tétrachloréthylène dans l'eau de mer. Rapport interne. 8 pp.

MIOSSEC. L, BOCQUENE. G, TRUQUET. P, 1987. Toxicité aiguë du Tétrachloroéthylène sur la crevette des marais *Palaemonetes varians*. Rapport interne IFREMER DERO-88-05-MR.