Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau mollusquicide organique

Histopathological study of the gill of Dreissena polymorpha Pallas exposed to a new organic molluscicide

Laure Giamberini⁽¹⁾, François Guerold⁽¹⁾,
Marie-Noëlle Beauvais⁽¹⁾, Jean-Claude Pihan⁽¹⁾

(1) Laboratoire d'Ecotoxicologie, Université de Metz. BP 4116, 57040 Metz Cedex 01.

Résumé. — Face à la colonisation croissante de nouveaux milieux d'eau douce par le Bivalve *Dreissena polymorpha* et afin de lutter contre les dommages engendrés au niveau des prises d'eau et des canalisations des ouvrages industriels, différentes stratégies ont à ce jour été utilisées. Ces composés pouvant avoir des effets indésirables sur des organismes autres que la Dreissène, un nouveau produit, le MEXEL 432, est aujourd'hui testé. Les effets, de ce composé organique, sur la branchie de Dreissène ont été appréhendés par une étude histologique et cytologique de cet organe. Les dommages se traduisent par une histopathologie de la branchie, caractérisée par une dégénérescence de l'épithélium branchial, une dilatation des espaces sanguins qui s'accompagne d'une vacuolisation des cellules endothéliales, d'une perte de cils et d'une dilatation des espaces intercellulaires.

Mots clés. — Mollusquicide, *Dreissena polymorpha*, branchie, histopathologie

Abstract. — As a result of *Dreissena polymorpha* proliferation in water intake pipes, a variety of chemicals has been proposed as agent for limiting or controlling zebra mussel populations. Because of these treatments have a significant toxicity to non-target organisms and can induce the formation of undesirable by-products, a new alternative method, the Mexel 432, has been tested. Effects of this organic agent on the gill of *D. polymorpha* were studied. Microscopic examination has shown that gills are strongly affected. The lesions are characterized by an inflammatory reaction, blood space dilation, vacuolation of endothelial cells and loss of cilia.

Key words. — Molluscicide, *Dreissena polymorpha*, gill, histopathology

Abredged English version : The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) is a widespread species in Europe. It is a Mollusc originating from the Black Sea and the Caspian Sea basins. During the last decades, *D. polymorpha* has colonized most of the European rivers and lakes. Recently the zebra mussel has invaded North America large water bodies such as Lac Erie, and densities of over 500,000/m² in some near-shore areas, have been observed. Colonization and infestation of water intake pipes cause severe fouling problems to the nuclear and electric power industries and affect municipal water plants. A variety of chemicals has been proposed as agents for controlling the mussels, but these molluscicides can also affect non-target organisms and their use can induce the formation of environmentally incompatible by-products. For these reasons, the Nuclear power station of Cattenom located along the Moselle river (Northeastern France) has tested a new organic agent : the MEXEL 432.

The aim of this paper was to examine the histopathological effects of this molluscicide on principal target organ, the gill of the zebra mussel.

Acute toxicity tests were performed with adult mussels (18-22 mm shell length). Four concentrations : 2.5, 4.0, 5.0 and 7.0 mg l⁻¹ were tested. Zebra mussels were sampled after 24, 48, 96 and 120 hours for each concentration. For each time and each concentration gills were removed from a minimum of five organisms. For light microscopy examination gills were

fixed in Bouin-Holland, dehydrated in an alcohol series and embedded in paraffin. Sections were cut at 5-6 microns and stained with Toluidin-blue. Gills were also prepared for ultrastructural examination. Fixation was performed in 2% glutaraldehyde buffered with Sørensen and post-fixed with 1% osmium buffered with Sørensen. Tissues were dehydrated, embedded in Epon-Araldite resin. Ultra-thin sections (60-80 nm) were stained with uranyl-acetat and lead-citrate and viewed with a Jeol CX 100 electron microscope.

The MEXEL 432 was toxic to adult mussels under the variety of concentrations tested. Histopathological change chronology was not related to MEXEL 432 concentrations. However, the time of lesion apparition and the severity of damages caused by the agent were dose-responsive.

A typical inflammatory reaction of gill tissues was observed. It was characterized by a blood space dilation and by a migration of granular hemocytes into these spaces. At the apex of gill filaments, the ciliated epithelium was separated from the basement membrane and detached from the chitinous rod. Ultrastructural examination has revealed widespread vacuoles in ciliated epithelial cells and endothelial cells. The frontal cells which are also the most exposed to the toxicant were first affected and had loosened their cilia.

The histological changes reported herein are similar to those mentioned in others studies on gill of *D. polymorpha* and *Mytilus edulis* exposed res-

pectively to KH_2PO_4 (molluscicide) and different metallic salts. All these observed lesions could lead to the disruption of the essential physiological functions (nutrition, respiration and ionoregulation) of the gill. Further investigations on the effects of the MEXEL432 on non-target organisms (e.g. aquatic insects, fishes, algae, zooplanktonic species), are need to provide a better knowledge on the toxicity of this agent and to test its suitability as a non detrimental molluscicide for others biota.

INTRODUCTION

La moule zébrée, *Dreissena polymorpha* Pallas (1771), est un bivalve d'eau douce aujourd'hui très répandu sur le continent européen (Leglizet et Ollivier, 1981). Venue des bassins de la mer Caspienne et de la mer Noire, elle a progressivement colonisé la majorité des cours d'eau et des lacs d'Europe, d'autant plus facilement que sa larve véligère est libre et nageuse, caractéristique unique chez les bivalves d'eau douce (Morton, 1969). Par ailleurs, sa fécondité élevée, la capacité de dérive bysso-pélagique des juvéniles et son aptitude à se fixer sur des substrats inoccupés par d'autres bivalves sont autant de facteurs biologiques favorables à sa dispersion rapide. Des activités humaines liées à la pêche et à la navigation, sont également impliquées dans les processus de colonisation de nouveaux milieux (Griffiths *et al.*, 1991). Les populations de *D. polymorpha* peuvent

atteindre 500 000 individus/m² sur les rives de certains lacs d'Amérique du Nord, phénomène qui conduit alors à un déséquilibre des peuplements benthiques, telle que l'exclusion d'autres bivalves (Mackie, 1991). En se développant dans des systèmes artificiels tels que les prises d'eau et les canalisations d'installations industrielles, agricoles et de distribution d'eau potable, la Dreissène est alors considérée comme étant une salissure biologique dommageable (Mackie, 1991; McMahon *et al.*, 1993). Ainsi, elle engendre des problèmes de colmatage et est, par l'intermédiaire des points d'attache de son byssus, à l'origine de phénomènes de corrosion (Barton, 1993).

Afin de lutter contre ces problèmes, différents moyens ont été proposés dans les pays concernés (sels de potassium, chloration, agents oxydants) (Fisher *et al.*, 1991; Jenner et Janssen-Mommen, 1993; Van Benschoten *et al.*, 1993). Ces méthodes n'apparaissent cependant pas efficaces pour lutter uniquement contre l'envahissement par *D. polymorpha*, et elles peuvent également avoir des effets indésirables sur d'autres organismes, ne serait-ce que par le biais de molécules néoformées ou résultant de la dégradation des agents chimiques utilisés (A.O.X. et chloramines). Toutefois face aux problèmes grandissants, la recherche de nouveaux produits et de nouvelles stratégies moins polluantes, plus efficaces et économiquement plus rentables se développe (Klerks *et al.*, 1993; Claudi et Evans, 1993).

Ainsi le Centre de Production Nucléaire de Cattenom (Moselle), site non épargné par la prolifération de *D. polymorpha*, teste un nouveau mollusquicide organique filmant et tensio-actif à propriétés anti-salissures, anti-corrosive et anti-tartre : le MEXEL 432 (Khalanski, 1993).

Dans ce contexte, la présente étude a pour but de décrire les effets histopathologiques engendrés par cette molécule au niveau de l'organe cible principal de la Dreissène, à savoir, la branchie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le composé testé, commercialisé sous le nom de MEXEL 432 (Société MEXEL, Haubourdin France) se présente en solution sous la forme de micelles de polyamines primaires et secondaires stabilisées par des amines tertiaires en suspension dans un solvant à base d'amino-alcools.

Des tests de toxicité aiguë ont été réalisés sur des Dreissènes d'une taille de 18 à 22 mm, provenant de la rivière Moselle. Au préalable les individus ont été acclimatés dans des bacs expérimentaux durant une période de 24 heures, temps nécessaire à l'organisme pour se fixer au support. Des concentrations de 2,5; 4; 5 et 7 mg l⁻¹, préconisées en milieu industriel, ont été testées avec prélèvement des individus après 24, 48, 96 et 120 heures. Ces concentrations peuvent être rencontrées ponctuellement à l'intérieur des circuits de refroidis-

sement déjà colonisés par les Dreissènes. Cependant, il est prévu d'utiliser ce composé à des concentrations beaucoup plus faibles dans les purges de ces circuits.

Pour chaque dose et chaque prélèvement, les branchies de 5 individus sont fixées au Bouin-Hollande, incluses classiquement, coupées et colorées au bleu de toluidine et étudiées en microscopie optique.

Des préparations ont également été réalisées en vue d'une étude en microscopie électronique à transmission. Pour cela des fragments de branchies sont fixés dans un mélange glutaraldéhyde à 2% / tampon de Sørensen à 0,05 M et pH 7,2. Après avoir été postfixés par le tétroxyde d'osmium et inclus dans un mélange Epon-Araldite, les échantillons sont coupés, contrastés et observés sur un microscope électronique à transmission JEOL CX 100.

RÉSULTATS

La chronologie des effets histopathologiques du produit MEXEL 432 est identique quelque soit la dose testée. Toutefois, le temps d'apparition de lésions ainsi que leur étendue dépendent de la concentration du produit. L'observation comparative entre les branchies des individus témoins (pl. I. fig. 1, 2, 3) et individus exposés au produit montre que la première réponse visible est une réaction inflammatoire typique, caractérisée par une dilatation des espaces sanguins et par

la migration des hémocytes granuleux à ce niveau (pl. I. fig. 4, 5, 6). La réaction de la branchie est rapide et se traduit par des lésions de l'épithélium branchial dès le premier jour pour la plus faible concentration testée. Une dégénérescence totale de cet épithélium est observée après 24 heures d'exposition à la concentrations maximale de 7 mg l^{-1} . (pl. I. fig. 7).

A l'extrémité du filament branchial, une distension de l'épithélium cilié induit sa séparation de la lame basale et de la baguette chitineuse sous-jacentes (pl. II. fig. 1), laissant ainsi une extrémité frontale nue (pl. II. fig. 2, 6). Le stade ultime des altérations tissulaires résulte en un détachement complet de l'endothélium du support chitineux qui seul persiste, entouré de débris cellulaires (pl. I. fig. 7).

Sur le plan cytologique, des phénomènes de vacuolisation des cellules endothéliales et des cellules épithéliales ciliées accompagnés d'une dilatation des espaces intercellulaires (pl. II. fig. 1, 3, 4, 5, 6) sont clairement visibles au niveau des extrémités des tissus branchiaux. Les cellules frontales qui sont les plus exposées au flux d'eau sont affectées en premier (pl. II. fig. 2). Les cellules latéro-frontales caractérisées par une ciliature plus longue, montrent une ultrastructure perturbée (pl. II. fig. 5). Ainsi les cellules sont gonflées et bien que la membrane plasmique soit encore en place, seuls les mitochondries et le noyau sont encore observables.

DISCUSSION

De part les fonctions essentielles qu'elle assure (nutrition, respiration et régulation ionique) mais aussi en raison de son contact direct et permanent avec l'environnement liquide, la branchie des mollusques bivalves représente, à l'instar de nombreux organismes aquatiques, un organe cible pour les contaminants. A ce titre, les pathologies de la branchie générées par des polluants, peuvent être considérées comme indices de stress et d'état de santé de l'organisme (Viarango et Canesi, 1991).

L'étude histopathologique de cet organe montre clairement que *D. polymorpha* apparaît très sensible au MEXEL432. Des réactions similaires de type inflammatoire ont été décrites par Sunila (1988) au niveau de la branchie de *Mytilus edulis* confrontée à des contaminants métalliques tels que CdCl_2 , CuCl_2 , PbO_2 , AgNO_3 . Par ailleurs chez la même espèce exposée à des composés organiques du type PCB, l'auteur rapporte des phénomènes de dilatation des espaces intercellulaires et la perte des cils latéraux. Dans le cadre d'une étude de l'impact d'un mollusquicide (KH_2PO_4) sur *D. polymorpha*, Fisher *et al.* (1991) observent l'apparition d'une pathologie de la branchie, caractérisée par une distension de l'épithélium branchial, accompagnée d'une séparation de la basale et d'une importante vacuolisation des cellules endothéliales.

L'étude des effets du mollusquicide testé montre, sans ambiguïté, que son action se traduit par une dégénérescence tissulaire de la branchie, entraînant ainsi par voie de conséquence une perturbation des fonctions physiologiques qui lui sont dévolues. Un simple effet filmant ne peut à lui seul expliquer les pathologies observées, si l'on considère les résultats très proches exposés dans d'autres études basées sur la toxicité de contaminants non filmant. Afin d'appréhender les mécanismes de toxicité, il conviendra de considérer les propriétés tensio-actives et amphipathiques de la molécule (voire de ses résidus de dégradation) pouvant mener à une perte de l'intégrité des membranes et de leurs fonctions.

CONCLUSION

Si le composé MEXEL 432 semble efficace pour lutter contre l'envahissement d'ouvrages de prise d'eau et de canalisation par *D. polymorpha*, il est essentiel avant de l'utiliser dans une stratégie de lutte anti-salissures biologiques d'évaluer sa toxicité sur les autres organismes susceptibles d'être affectés.

Dans l'eau de la Moselle, le produit à une demi-vie de 20 heures (sans bullage). La disparition du composé est attribuée essentiellement à son dépôt sur les surfaces (film) et à sa dégradation. Dans ce dernier cas, il est évidemment nécessaire d'identifier les produits de dégradation et/ ou des

Fig. 1. – Histologie (G $\times$ 160), section d'une lamelle branchiale témoin.

Fig. 1. – Histology (G $\times$ 160), section of gill lamella from a control mussel.

Fig. 2. – Microscopie électronique (G $\times$ 5000), extrémité frontale d'un filament branchial chez une Dreissène témoin. Baguette chitineuse (bc), granulocyte (g).

Fig. 2. – Electronic microscopy (G $\times$ 5000), apical epithelium of a single gill filament from a control mussel. Chitinous rod (bc), granulocyte (g).

Fig. 3. – Histologie (G $\times$ 400), section semi-fine de deux filaments branchiaux témoins.

Fig. 3. – Histology (G $\times$ 400), semi thin section of control gill filaments.

Fig. 4. – Histologie (G $\times$ 400), section semi-fine de deux filaments branchiaux dont le vaisseau sanguin (vs) est dilaté. *Dreissena* exposée 2 jours à 7 mg l⁻¹.

Fig. 4. – Histology (G $\times$ 400), semi thin section of gill filament with dilated blood vessel (vs). Exposed mussel 2 days, 7 mg l⁻¹.

Fig. 5. – Histologie (G $\times$ 250), section d'une lamelle branchiale chez *Dreissena* exposée 3 jours à 2,5 mg l⁻¹ de Mexel. Infiltration de granulocytes dans les espaces sanguins (flèches).

Fig. 5. – Histology (G $\times$ 250), section of gill from *Dreissena* exposed for 3 days to 2.5 mg l⁻¹ Mexel. Infiltration of granulocytes in blood spaces (arrows).

Fig. 6. – Histologie (G $\times$ 250), dilatation des espaces sanguins (vs) d'une lamelle branchiale d'une Dreissène exposée 2 jours à 2,5 mg l⁻¹ de Mexel.

Fig. 6. – Histology (G $\times$ 250), dilation of blood spaces (vs) of gill lamella from *Dreissena* exposed for 2 days to 2.5 mg l⁻¹ Mexel.

Fig. 7. – Histologie (G $\times$ 250), section semi-fine d'une lamelle branchiale dont les cellules épithéliales sont détachées de la baguette chitineuse (bc). *Dreissena* exposée 1 jour à 7 mg l⁻¹ de Mexel.

Fig. 7. – Histology (G $\times$ 250), semi thin section of gill lamella without epithelia cells on chitinous rod (bc). *Dreissena* exposed for 1 day to 7 mg l⁻¹ Mexel.

composés néoformés et d'établir leur toxicité vis à vis des divers compartiments biologiques. Des études allant dans ce sens sont actuellement en cours.

Remerciements : Cette étude fait partie d'un programme d'expérimentation du produit Mexel réalisé au C. P. N. de Cattenom sous la direction de M. Khalanski (E.D.F.-D.E.R).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barton L.K., 1993. Control program for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) at the Perry nuclear power plant, Lake Erie. In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Claudi R. & Evans D.W., 1993. Chemical addition strategies for zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) control in once-through service water systems. In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Fisher S.W., Stromberg P., Bruner K.A. & Boulet L.D., 1991. Molluscicidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* : toxicity and mode of action. *Aquatic Toxicology* 20 : 219-234.
- Griffiths R.W., Schloesser D.W., Leach J.H. & Kovalak W.P., 1991. Distribution and dispersal of the zebra mussel
- Fig. 1.** – Microscopie électronique (G × 2000), l'épithélium cilié frontal, fortement vacuolisé (*), d'un filament branchial est décollé de la baguette chitineuse (bc). *Dreissena* exposée 2 jours à 7 mg l⁻¹.
- Fig. 1.** – Electronic microscopy (G × 2000), apical epithelium of a single gill filament from *Dreissena* exposed to 7 mg l⁻¹ for 2 days. Cells contain cytoplasmic vacuoles (*). Apical ciliated cells are separated from chitinous rod.
- Fig. 2.** – Histologie (G × 250), section semi-fine de deux filaments branchiaux dont l'extrémité frontale est arrachée (flèches). *Dreissena* soumise 4 jours à 7 mg l⁻¹ de Mexel.
- Fig. 2.** – Histology (G × 250), semi thin section of two gill filaments without apical ciliated cells (arrow). *Dreissena* exposed to 7 mg l⁻¹ Mexel for 4 days.
- Fig. 3.** – Microscopie électronique (G × 20000), dilatation des espaces intercellulaires (*) entre les cellules endothéliales. Exposition à 2,5 mg l⁻¹ de Mexel pendant 2 jours.
- Fig. 3.** – Electronic microscopy (G × 20000), dilation of intercellular spaces between endothelial cells. *Dreissena* exposed to 2.5 mg l⁻¹ Mexel for 2 days.
- Fig. 4.** – Microscopie électronique (G × 15000), vacuole cytoplasmique (*) dans une cellule endothéliale. Exposition à 7 mg l⁻¹ pendant 1 jour.
- Fig. 4.** – Electronic microscopy (G × 15000), cytoplasmic vacuole in an endothelial cell. *Dreissena* exposed to 7 mg l⁻¹ Mexel for 1 day.
- Fig. 5.** – Microscopie électronique (G × 2500), cellules épithéliales frontales fortement vacuolisées (*). Cellule latérofrontale dilatée (clf), baguette chitineuse (bc). Exposition à 2,5 mg l⁻¹ de Mexel pendant 2 jours.
- Fig. 5.** – Electronic microscopy (G × 2500), apical epithelial ciliated cells contain large vacuoles (*). Laterofrontal cell (clf) appears to be dilated. Chitinous rod (bc). Mussel exposed to 2,5 mg l⁻¹ Mexel for 2 days.
- Fig. 6.** – Histologie (G × 250), section semi-fine d'une lamelle branchiale dont l'ensemble de l'épithélium paraît vacuolisé (*). Les extrémités frontales des filaments sont détachées (flèches). Exposition à 2,5 mg l⁻¹ de Mexel pendant 1 jour.
- Fig. 6.** – Histology (G × 250), semi thin section of gill lamella with vacuolated epithelium (*). Filament without apical ciliated cells (arrows). Mussels exposed to 2.5 mg l⁻¹ Mexel for 1 day.

- (*Dreissena polymorpha*) in the great lakes region. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48 : 1381-1388.
- Jenner H.A. & Janssen-Mommen J.P., 1993. Monitoring and control of *Dreissena polymorpha* and other macrofouling bivalves in the Netherlands. In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Khalanski M., 1993. Testing of five methods for the control of zebra mussels in cooling circuits of power plants located on the Moselle River. Proceedings : Third international zebra mussel conference, Toronto, Ontario, Canada., 1993. EPRI, TR-10 2077 : 3-1/3-20.
- Klerks P.L., Fraleigh P.C. & Stevenson R.C., 1993. Controlling zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) veligers with three oxidizing chemicals : chlorine, permanganate, and peroxide + iron. In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Leglise L. & Ollivier M., 1981. Mise au point bibliographique sur la biologie et l'écologie de *Dreissena polymorpha* Pallas (1771). Répartition géographique en France et dans les pays limitrophes. EDF/DER Rapport HE/31-81.37.
- Mackie G.L., 1991. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. *Hydrobiologia* 219 : 251-268.
- McMahon R.F., Shipman B.N., Long D.P., 1993. Laboratory efficacies of nonoxidizing molluscicides on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the asian clam (*Corbicula fluminea*). In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Morton B., 1969. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pallas I. General anatomy and morphology. *Proc. malac. Soc. Lond.* 38 : 301-321.
- Sunila I., 1988. Acute histological response of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *J. Invert. Pathology* 52 : 137-141.
- Van Benschoten J.E., Jensen J.N., Lewis D. & Brady T.J., 1993. Chemical oxidants for controlling zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) : a synthesis of recent laboratory and field studies. In : zebra mussels : biology, impacts and control. Napela T.F., Schloesser D.W. (Eds), Boca Raton : Lewis Publications. 810 pp.
- Viarengo A., Canesi L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94 : 225-243.