

# Effets de composés fluorés (NaF, CaF<sub>2</sub> et phosphogypse) sur un gastéropode et un bivalve marins

Bioaccumulation  
Fluorures  
Phosphogypse  
*Haliotis Mytilus*  
Bioaccumulation  
Fluorides  
Phosphogypsum  
*Haliotis Mytilus*

J. L. MARTIN<sup>a</sup>, M. MARTOJA<sup>b</sup>, M. TRUCHET<sup>c</sup>, R. MARTOJA<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Centre de Recherche en Écologie marine et Aquaculture de l' Houmeau, 17137 Nieul-sur-Mer.

<sup>b</sup> Institut Océanographique, 195, rue Saint-Jacques, 75005 Paris.

<sup>c</sup> Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée, UA 680 du CNRS, Université Pierre-et-Marie-Curie, 12, rue Cuvier, 75005 Paris.

Reçu le 15/2/85, révisé le 21/5/85, accepté le 28/5/85.

## RÉSUMÉ

La surcharge de l'eau de mer en ions F<sup>-</sup>, libérés par le fluorure de sodium ou par les résidus d'engrais phosphatés appelés « phosphogypses », n'entraîne aucune accumulation de fluor dans les tissus de *Mytilus edulis*. Chez *Haliotis tuberculata*, au contraire, la glande digestive, le tissu lymphoïde, le tissu nerveux et la coquille concentrent une part importante du fluor, le reste étant éliminé par voie intestinale. Les particules de fluorure de calcium ainsi que le fluor insoluble issu du phosphogypse sont phagocytés par les cellules digestives et les amœbocytes de *Mytilus*. Dans ce cas, le stockage est important, mais les particules demeurent intactes dans les cellules sans libérer de fluor assimilable. Certains constituants mineurs des phosphogypses, V, Cr, Ni, sont assimilés par la moule et piégés dans les concrétions du rein tandis que d'autres, Ti, Cd, sont retenus dans les cellules digestives et les amœbocytes. Aucun des composés chimiques étudiés ne provoque de lésion anatomique ou histologique.

*Oceanol. Acta*, 1985, 8, 4, 461-469.

## ABSTRACT

Some effects of fluorine-containing components (NaF, CaF<sub>2</sub> and phosphogypsum) on a marine gastropod and bivalve

An increase in seawater of free fluorine ions originating from sodium fluoride or from industrial wastes termed "phosphogypsum" does not lead to an accumulation of fluorine in the tissues of *Mytilus edulis*. In contrast, *Haliotis tuberculata* stores fluorine in the digestive gland, the lymphoid tissue, the nervous tissue and the shell, whereas a great part of fluorine is excreted by the intestine.

Particles of calcium fluorine and particles in close association with phosphogypsum are stored in the digestive cells and in the amoebocytes of *Mytilus*; the particles remain unchanged in the cells and do not release free fluorine.

Some of the minor components of the phosphogypsum (V, Cr, Ni) are assimilated by mussels and stored in the concretions of the kidney; others (Ti, Cd) accumulate in the digestive cells and in the amoebocytes.

Which ever pollutant is involved (NaF, CaF<sub>2</sub>, phosphogypsum), no tissue lesion is observed.

*Oceanol. Acta*, 1985, 8, 4, 461-469.

## INTRODUCTION

Les rejets en milieu marin des résidus de fabrication d'engrais phosphatés communément appelés phosphogypses, posent le problème de leurs effets sur l'environ-

nement et sur les êtres vivants. La toxicité des phosphogypses, exprimée en terme de létalité, semble faible. En effet, pour la plupart des invertébrés et vertébrés, les concentrations létales dépassent le gramme par litre (Pautsch *et al.*, 1975; Darmoul, Vitiello, 1978; 1980), ce

qui correspond à des conditions extrêmes, rencontrées uniquement à proximité immédiate des rejets. Il semblerait d'ailleurs que cette toxicité aiguë soit imputable à des effets physiques, tels que le colmatage des branchies, inhérents à la forte concentration de particules en suspension dans l'eau.

La recherche des effets chroniques des phosphogypses a été abordée surtout par l'étude de la toxicité du fluor (Hemens, Warwick, 1972; Malewicz *et al.*, 1973; Hemens *et al.*, 1975; Oliveira *et al.*, 1978), et en particulier, de la teneur de l'eau de mer en fluor dissocié (Harbo *et al.*, 1974; Darmoul, Vitiello, 1980; Martin, Salvadori, 1983). Cependant, au fluor assimilable libéré par les phosphogypses s'ajoutent du fluor particulaire, du phosphate et du sulfate de calcium, de la silice, ainsi que des constituants mineurs, notamment alumine, oxyde de fer, Ti, V, Cr, Ni, Pb (Chesterikoff, 1975). Il est alors impossible d'attribuer à des constituants particuliers du polluant les troubles divers qu'il provoque : baisse d'activité de la tyrosinase, dégénérescence des ovaires et des neurones, retard de la métamorphose pour les crustacés, inhibition du développement embryonnaire pour les poissons (voir Pautsch, 1978). D'autre part, la bioaccumulation des divers constituants demeure inconnue.

Nous nous sommes proposé d'évaluer les effets d'une intoxication par les phosphogypses en adoptant comme critères d'appréciation, d'une part l'accumulation globale et cellulaire du fluor et des constituants mineurs, d'autre part les effets histopathologiques de la contamination. Compte tenu de l'importance de la forme physico-chimique d'un élément dans les processus d'intoxication et d'accumulation, nous avons utilisé, dans notre expérimentation, du fluor dissocié, du fluor particulaire et du phosphogypse. Nous avons réalisé cette étude sur deux espèces comestibles de mollusques, choisies en fonction de leur régime alimentaire, le gastéropode, *Haliotis tuberculata* L. (ormeau), macrophage brouteur d'algues et le bivalve, *Mytilus edulis* L. (moule), microphage filtreur de particules.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Choix des contaminants

La recherche d'un protocole expérimental cohérent nous a conduits à préciser la quantité d'ions fluor libérés par divers composés chimiques. Nous avons retenu le fluorure de calcium, le fluorure de sodium et le phosphogypse lui-même.

Le fluorure de calcium, qui est peu soluble dans l'eau pure (16 mg/l), ne libère pas d'ions  $F^-$  dans l'eau de mer normale (salinité 33 g/l); après une addition d'une quantité de fluorure de calcium correspondant à 6 mg/l de fluor, la teneur en ions  $F^-$  de l'eau de mer n'augmente pas de façon significative (tableau 1). Au contraire, la dissolution du fluorure de sodium est totale pour des ajouts correspondant à 3 et 6 mg/l de fluor. Si l'on augmente la quantité de sel de sodium sous forme NaF, la concentration en fluor dissocié atteint une limite située aux environs de 120 mg/l (fig.

Tableau 1

Concentrations en  $F^-$  (en mg/l) de l'eau de mer témoin et de l'eau de mer additionnée de NaF et  $CaF_2$ , et évolution des concentrations en fonction du temps.

*F<sup>-</sup> concentrations (mg/l) in control seawater and in seawater with NaF, CaF<sub>2</sub> added, and time evolution of the concentrations.*

Composé fluoré	Quantité de fluor ajouté	Temps			
		1 heure	1 jour	2 jours	13 jours
—	Témoin	1,41	1,40	1,39	—
$CaF_2$	6 mg/l	—	1,43	1,29	—
NaF	3 mg/l	3,57	4,09	4,23	4,26
NaF	6 mg/l	3,89	5,81	6,19	7,27

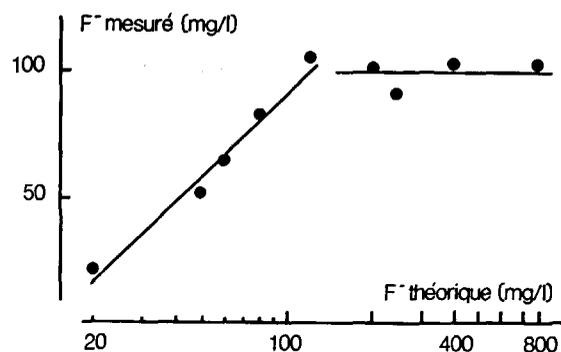


Figure 1

Courbe de dissociation et de dilution de NaF. Concentrations de  $F^-$  mesurées en fonction de  $F^-$  théorique ajouté à l'eau de mer.

*Dissociation and dilution curve for NaF in seawater. X-axis, concentration of fluorine added to seawater; Y-axis, measured  $F^-$  concentrations.*

1). Enfin, la quantité d'ions  $F^-$  libérée par le phosphogypse est proportionnelle à sa concentration dans l'eau de mer, et, pour une même concentration, à son temps de séjour (tableau 2).

Ainsi, la contamination par le fluorure de calcium permet de suivre le transit et l'accumulation, par un animal, d'un composé du fluor particulaire non dissocié dans l'eau de mer et les résultats peuvent être extrapolés à la fraction la plus importante du phosphogypse. Le fluorure de calcium se présente sous forme de particules, dont la taille va de 0,15 à 1,3  $\mu m$ . En conséquence, seules les moules, capables de se nourrir de particules en suspension, ont été exposées à son action, la dose choisie étant de 250 mg par litre d'eau de mer. Au contraire du fluorure de calcium, le fluorure de sodium fournit des quantités importantes de fluor dissocié et

Tableau 2

Concentrations en  $F^-$  (en mg/l) de l'eau de mer additionnée de phosphogypse et évolution des concentrations en fonction du temps.

*F<sup>-</sup> concentrations (mg/l) in seawater with phosphogypsum added, and time evolution of the concentrations.*

Quantité de phosphogypse ajouté à l'eau de mer	Temps						
	6 h	1 j	2 j	5 j	12 j	28 j	42 j
0 = témoin	1,6	1,4	1,3	1,6	—	—	—
1 g/l	2,8	3,7	3,8	4,2	4,5	5,2	6,1
10 g/l	5,8	7,0	8,4	9,9	16,0	17,5	26,5
50 g/l	9,4	11,1	14,9	20,8	32,5	42,5	49,9
100 g/l	14,1	16,8	20,3	26,5	35,0	41,0	50,0

assimilable. La contamination par ce sel amplifie donc les effets du phosphogypse imputables à la fraction de fluorure dissociable qu'il contient. Les expériences ont été conduites avec une gamme de concentration de  $F^-$  dont la plus basse, 3 mg/l, correspond à celles qui ont été mesurées en baie de Seine, à proximité d'Honfleur (Martin, Salvadori, 1983) et dont la plus élevée, 120 mg/l, se situe à la limite de dissociation.

Pour le phosphogypse, la dose de 1 g/l nous a paru suffisante pour libérer une quantité appréciable d'ions  $F^-$  sans qu'il y ait un excès de matériel en suspension. Son utilisation offre l'avantage d'apporter tous les constituants du polluant, notamment les éléments présents en quantité minime qu'il comporte et de juger leurs effets, par comparaison avec les animaux traités aux fluorures. Comme pour le fluorure de calcium, seules les moules ont été soumises à l'action du phosphogypse.

### Protocoles de contamination

De jeunes ormeaux mesurant de 15 à 25 mm ont été placés à raison de 40 par bac, dans de l'eau de mer de salinité normale et acclimatés pendant 3 jours avant d'être contaminés. Le fluorure de sodium a été ajouté de manière à libérer des quantités de fluor allant de 3 à 120 mg/l. L'expérience a été poursuivie pendant 66 jours. Les moules, d'une taille comprise entre 3 et 4,5 cm, ont elles aussi subi une acclimatation de 3 jours. Les additions de fluorure de sodium ont été effectuées de manière à libérer des quantités de fluor allant de 3 à 60 mg/l pendant 30 jours. Le phosphogypse et le fluorure de calcium ont été ajoutés à raison de 1 g/l et 250 mg/l respectivement. Les expériences ont été prolongées pendant 20 jours.

L'eau et les contaminants ont été renouvelés tous les jours. Pendant toute la durée des expériences, les ormeaux ont été nourris avec l'algue macrophyte *Rhodomenia palmata*, et les moules avec l'algue unicellulaire *Tetraselmis suessica*.

### Dosage du fluor

Les dosages ont été effectués sur l'eau de mer filtrée à 0,45  $\mu$ m immédiatement après le prélèvement, par la méthode d'électrode spécifique du fluor mesurant une différence de potentiel au cours d'ajouts dosés. Le pH d'analyse a été ajusté par une solution 0,01 M de NaF (Aminot, 1983). Les animaux ont été rincés à l'eau de mer, et extraits de leur coquille. Après séchage, les échantillons ont été minéralisés par voie humide (Wright, Davison, 1975) au moyen d'acide nitrique. Après minéralisation et évaporation complète de l'acide, le résidu de minéralisation a subi une dilution adéquate. Après ajustage du pH, les analyses ont été effectuées selon le même principe que pour l'eau.

### Histologie et microanalyse

Pour la microscopie photonique et la microanalyse, les pièces ont été fixées par le mélange de Carnoy, incluses dans la paraffine et coupées à 5 ou 7  $\mu$ m. Les coupes

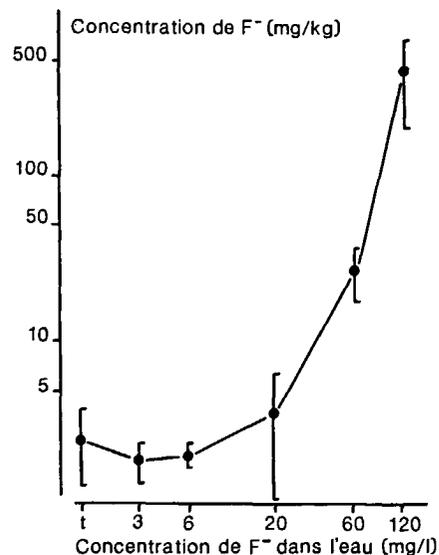


Figure 2

Concentrations en fluor (en mg/kg de poids sec) des tissus mous d'*Haliotis tuberculata* après 45 jours de contamination par NaF.

Fluorine concentrations (mg/kg DW) in the soft tissues of *Haliotis tuberculata* contaminated for 45 days with NaF.

destinées à l'examen histologique ont été colorées par le trichrome de Prenant-Gabe ou par le rouge solide picro-indigocarmin. Celles qui étaient destinées à la microanalyse élémentaire ont été étalées sur support d'or poli, déparaffinées et étudiées au moyen d'un analyseur ionique (Castaing, Slodzian, 1962) CAMECA SMI 300, dans les conditions précédemment définies (Truchet, 1975). L'analyse moléculaire a été réalisée sur des coupes à la paraffine, à l'aide de la microsonde Mole (Instruments J.A.; Truchet, 1982).

Pour la microscopie électronique, des fragments de masse viscérale ont été fixés au glutaraldehyde (solution à 4% dans un tampon phosphate, pH 7,4), postosmiés (solution à 1% dans un tampon véronal, pH 7,4), puis traités par l'acétate d'uranyle à 0,5% avant inclusion.

## RÉSULTATS

### Effets du fluor libéré par NaF

#### Accumulation globale

Chez l'ormeau *Haliotis tuberculata*, les dosages de  $F^-$  ont été effectués après 45 jours de contamination. Pour les concentrations de 3, 6 et 20 mg/l d'ions  $F^-$  ajoutés dans l'eau de mer, le taux de fluor de l'organisme (1,8, 2,0 et 3,6  $\mu$ g/g) n'est que peu différent de celui des témoins (2,6  $\mu$ g/g). Une augmentation significative apparaît à la concentration de 60 mg/l dans l'eau. La quantité de fluor accumulé dans les tissus mous atteint 443  $\mu$ g/g (poids sec) pour la concentration de 120 mg/l dans l'eau (fig. 2).

La cinétique de l'accumulation a été étudiée pendant 66 jours à la concentration de 60 mg/l dans l'eau. Les résultats diffèrent sensiblement pour les tissus mous et pour la coquille. L'accumulation de fluor dans les tissus mous n'est pas immédiate : jusqu'au 22<sup>e</sup> jour de conta-

mination, les concentrations sont peu différentes les unes des autres et ne sont pas supérieures à celles des témoins. A partir de ce moment, le taux de fluor augmente très rapidement dans les tissus. Dans la coquille, au contraire, la quantité de fluor accumulé augmente dès les concentrations les plus faibles en fluor ajouté. En outre, elle est proportionnelle au temps de séjour de l'animal dans la solution contaminante (fig. 3 et 4).

Chez les moules ayant séjourné pendant 14 et 30 jours dans de l'eau de mer additionnée de 3, 6, 20, 60 mg/l d'ions F<sup>-</sup>, le fluor a été recherché dans les tissus mous. Aucun résultat significatif n'a été obtenu, ni par rapport au temps de contamination, ni par rapport à la dose de contaminant. Ainsi, après 30 jours de contamination par une dose de 20 mg/l d'ions F<sup>-</sup>, la concentration de fluor dans les tissus est inférieure à celle des témoins et pour une dose de 6 mg/l, elle est moindre après 30 jours qu'après 14 jours de contamination (tableau 3). Les seules variations sont d'ordre individuel.

*Histopathologie et microanalyse*

Les tissus mous d'*Haliotis tuberculata* ont été fixés après 6 et 66 jours de contamination par une dose de 60 mg/l d'ions F<sup>-</sup> ajoutés. Tous les organes essentiels, énumérés dans le tableau 4, ont été examinés et analysés (voir la monographie de Crofts, 1929, pour la description anatomique et histologique).

Aucun des animaux ne présentait de lésion, ni d'anomalie histopathologique. Des accumulations de fluor n'ont été décelées que dans les cellules de la glande digestive et du tissu lymphoïde, ainsi que dans le tissu nerveux. Dans la glande digestive, l'accumulation atteint rapidement un plafond et s'y maintient. Au contraire, dans les tissus lymphoïde et nerveux, la teneur en fluor progresse avec le temps de contamination. Les muscles, seule partie comestible, restent indemnes de contamination (tableau 4). Le contenu du tube digestif se surcharge de façon importante quand la durée de l'exposition au fluorure se prolonge et c'est le fluor concentré dans la zone postérieure de l'intestin qui constitue la majeure partie de cette accumulation (fig. 5). Bien que destiné à être éliminé et n'ayant, de ce fait, aucune incidence sur la santé de l'animal, ce fluor est intéressant à considérer puisqu'il influe sur le dosage global. Il est accompagné de nombreux autres éléments : Na, Mg, Al, Si, Cl, K, Ca, Ti, Fe, Cu, Br, Sr et Ba.

Pour *Mytilus edulis*, l'étude a été effectuée sur des animaux soumis pendant 14 jours à la dose de 60 mg/l d'ions F<sup>-</sup>. Tous les organes analysés paraissent sains et la microanalyse ne montre aucune accumulation de fluor.

**Effets des formes particulières non dissociées : CaF<sub>2</sub> et phosphogypse.**

*Accumulation globale*

Les moules ont été contaminées pendant 20 jours avec du CaF<sub>2</sub> à la concentration de 0,25 g/l, et avec du phosphogypse à la concentration de 1 g/l. Dans les

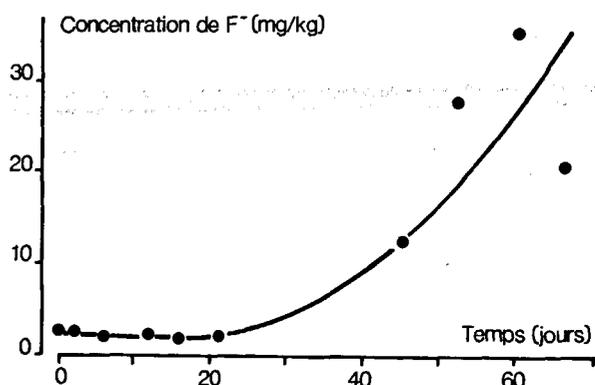


Figure 3 Concentrations en fluor (en mg/kg de poids sec) des tissus mous d'*Haliotis tuberculata* en fonction du temps, pour une concentration de 60 mg/l de F<sup>-</sup> ajouté sous forme de NaF à l'eau de mer. Chaque analyse porte sur un lot de 4 animaux. Time response curve for fluorine concentrations (mg/kg DW) in the soft tissues of *Haliotis tuberculata* contaminated with 60 mg/l of F<sup>-</sup> added as NaF in seawater. Each analysis concerns 4 animals.

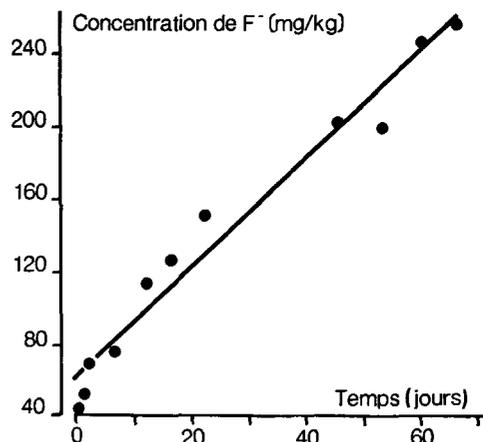


Figure 4 Concentrations en fluor (en mg/kg de poids sec) de la coquille d'*Haliotis tuberculata* en fonction du temps (mêmes conditions de contamination que précédemment, Fig. 3). Chaque analyse porte sur 4 coquilles. Time response curve for fluorine concentrations (mg/kg DW) in the shell of *Haliotis tuberculata* contaminated with NaF (the same dose as before, Fig. 3). Each analysis concerns 4 shells.

Tableau 3 Concentrations en fluor (en mg/kg de poids sec) des tissus mous de *Mytilus edulis* contaminées par NaF, en fonction de la concentration de F<sup>-</sup> dans l'eau de mer et de la durée d'exposition.

Fluorine concentrations (mg/kg DW) in the soft tissue of *Mytilus edulis* contaminated with NaF, according to dose and to exposure duration.

Temps de contamination	Contamination				
	témoin	3 mg/l	6 mg/l	20 mg/l	60 mg/l
14 jours (5 × 4 animaux)	0,7	1,4	3,4	1,2	2,4
30 jours (5 × 5 animaux)	3,0 ± 1,4	1,7 ± 0,3	1,7 ± 1,2	2,2 ± 0,7	4,7 ± 2,4

deux cas, le fluor s'accumule de façon importante dans l'organisme. Les concentrations sont respectivement 400 fois et 120 fois supérieures à celles des témoins (tableau 5).

Tableau 4

Intensités d'émission ionique (en ampères) du fluor (masse  $19^-$ ) dans divers organes d'*Haliotis tuberculata* contaminés pendant 6 et 66 jours par l'eau de mer à 60 mg/l d'ions  $F^-$ .

Les conditions analytiques étant identiques pour toutes les mesures, les fluctuations des intensités sont attribuées aux variations de teneur en fluor des organes, mais ne donnent pas d'indications quantitatives absolues.

*Secondary ion emission intensities (in Amperes) of fluorine (Mass  $19^-$ ) in several organs of *Haliotis tuberculata*, for 6 and 66 days of contamination in marine water containing 60 mg/l of  $F^-$  ions.*

*Analytical conditions are similar for all measures; thus, variations in intensities are attributed to differences in concentrations, but do not indicate absolute concentrations.*

Organes	Durée d'exposition		Commentaires
	6 jours	66 jours	
Muscle	$1.10^{-17}$	1 à $2.10^{-17}$	Valeurs peu différentes de celles d'un témoin et/ou variant peu de 6 à 66 jours : la contamination de l'eau par le fluor n'enrichit pas ces tissus.
Glande hypobranchiale	$8.10^{-17}$	5 à $6.10^{-17}$	
Branchies	0,5 à $2.10^{-17}$	3 à $4.10^{-17}$	
Rein droit	0,5 à $2.10^{-17}$	$5.10^{-17}$	
Rein gauche	0,5 à $2.10^{-17}$	$5.10^{-17}$	
Cœur	?	4 à $9.10^{-17}$	
Ovaire	$1.10^{-17}$	?	
Glande digestive	$1.10^{-16}$	$1.10^{-16}$	Valeurs très supérieures à celles d'un témoin, mais ne variant pas de 6 à 66 jours : la glande digestive se charge rapidement en fluor, puis se maintient à une valeur-limite.
Tissu nerveux	$0,5.10^{-17}$	5 à $6.10^{-17}$	Valeurs peu supérieures à celles d'un témoin au bout de 6 jours, mais augmentant considérablement ensuite : la contamination de l'eau par le fluor enrichit progressivement ces tissus.
Tissu lymphoïde	$5.10^{-17}$	4 à $5.10^{-16}$	
Contenu œsophage-estomac	3 à $4.10^{-17}$	$1.10^{-16}$	
Contenu rectum	$4.10^{-14}$	$5.10^{-14}$	
	points isolés	totalité du contenu	
Tous organes d'animal témoin	0,5 à $2.10^{-17}$		

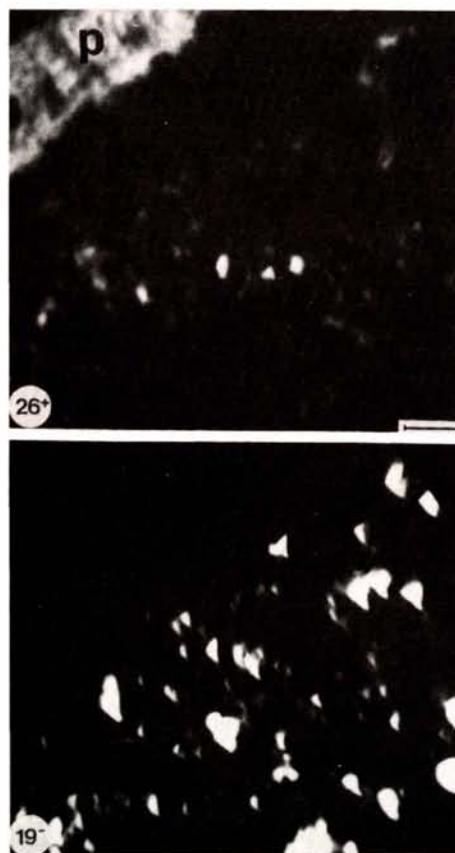


Figure 5

Images ioniques de localisation des ions secondaires de masse  $26^+$  (CN) et  $19^-$  (F) dans le rectum d'*Haliotis tuberculata* contaminé par NaF. Remarquer l'absence de fluor dans la paroi P du rectum (barre : 25  $\mu$ m).

*Distribution of  $^{26}CN$  and  $^{19}F$  obtained with the ion analyzer in the rectum of *Haliotis tuberculata* contaminated with NaF. Note the absence of calcium in the rectum wall (P); (bar: 25  $\mu$ m).*

Tableau 5

Concentrations en fluor (en mg/kg de poids sec) des tissus mous de *Mytilus edulis* après 20 jours de contamination par le phosphogypse et par le fluorure de calcium.

*Fluorine concentrations (mg/kg DW) in the soft tissues of *Mytilus edulis* contaminated for 20 days with phosphogypsum and  $CaF_2$ .*

Contamination	Concentration de fluor
Témoin (10 animaux)	1,9
Phosphogypse (1 g/l) (10 animaux)	223
$CaF_2$ (0,25 g/l) (10 animaux)	761

#### Histopathologie et microanalyse

Aucun des deux contaminants ne provoque d'anomalie histologique. Tous les organes étaient d'apparence saine. En particulier, la surface des branchies qui comporte un film muqueux était exempte de particules de phosphogypse.

La localisation histologique et la dégradation des particules de  $CaF_2$  ont été recherchées à l'échelle structurale et ultrastructurale. La lumière de l'estomac et celle des diverticules digestifs sont remplies d'une suspension de ces particules (fig. 6 et 7). Celles-ci sont absorbées par les cellules digestives (fig. 13 a) et par les amœbocytes mais n'y sont pas dégradées. Elles conservent le même aspect que les particules de l'échantillon ayant servi à la contamination et les spectres Raman sont identiques à tous les niveaux de l'appareil digestif (fig. 8 et 9). Conformément aux données classiques sur la physiologie des bivalves (Morton, 1983), elles sont véhiculées dans tout l'organisme par les amœbocytes.

Pour les moules contaminées au phosphogypse, les particules emplissent également la cavité de l'estomac

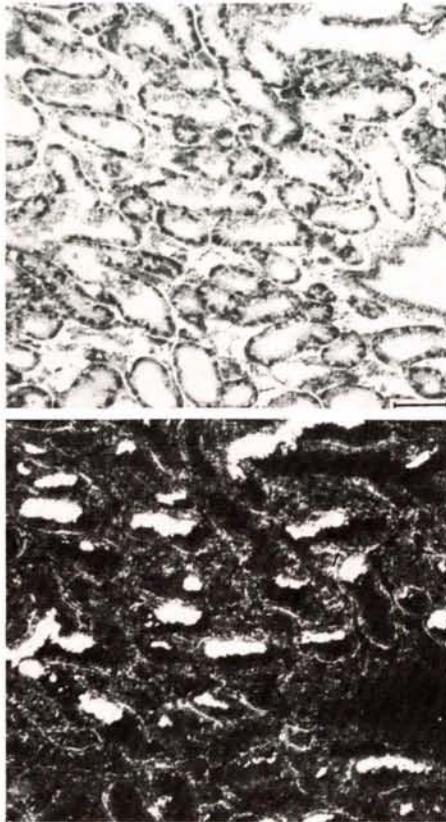


Figure 6  
Diverticules digestifs de *Mytilus edulis* contaminée par  $\text{CaF}_2$ . Remarquer, sur la coupe photographiée en fond noir, l'abondance de fluorure dans la lumière des diverticules (barre : 150  $\mu\text{m}$ ).  
*Digestive tubules of Mytilus edulis contaminated with  $\text{CaF}_2$ . Note, on the slide observed in dark field microscopy, the abundance of  $\text{CaF}_2$  in the lumen of the tubules (bar: 150  $\mu\text{m}$ ).*

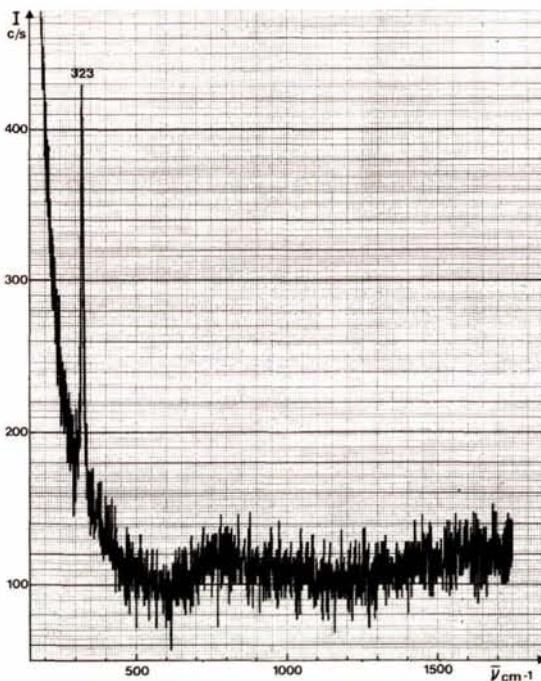


Figure 8  
Spectre Raman d'un échantillon de fluorure de calcium. Laser : 514,5 nm, 500 mW; fentes : 600  $\mu\text{m}$ ; diaphragme de champ : 10  $\mu\text{m}$ , environ; comptage :  $10^2$  c.s.<sup>-1</sup>, 1s; enregistrement : 500 mV, 50  $\text{cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ , 1000  $\text{cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Notez la raie caractéristique du composé à 323  $\text{cm}^{-1}$ .  
*Raman spectrum of pure calcium fluoride. Laser: 514.5 nm, 500 mW; slits: 600  $\mu\text{m}$ ; aperture diaphragm: 10  $\mu\text{m}$ , approximately; photon counter:  $10^2$  c.s.<sup>-1</sup>, 1s; recorder: 500 mV, 50  $\text{cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ , 1000  $\text{cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Note the characteristic line at 323  $\text{cm}^{-1}$ .*

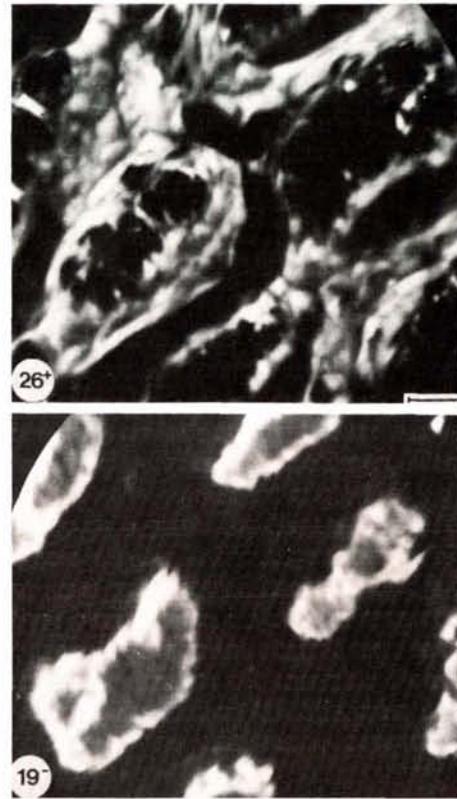


Figure 7  
Images ioniques de localisation des ions secondaires de masse 26<sup>+</sup> (CN) et 19<sup>-</sup> (F) dans les diverticules digestifs de *Mytilus edulis* contaminée par  $\text{CaF}_2$ . L'image CN montre la paroi des diverticules, l'image F la lumière (barre : 25  $\mu\text{m}$ ).  
*Distribution of  $^{26}\text{CN}$  and  $^{19}\text{F}$  in the digestive tubules of Mytilus edulis contaminated with  $\text{CaF}_2$ . The CN image shows the wall of the tubules, the F image shows the lumen (bar: 25  $\mu\text{m}$ ).*

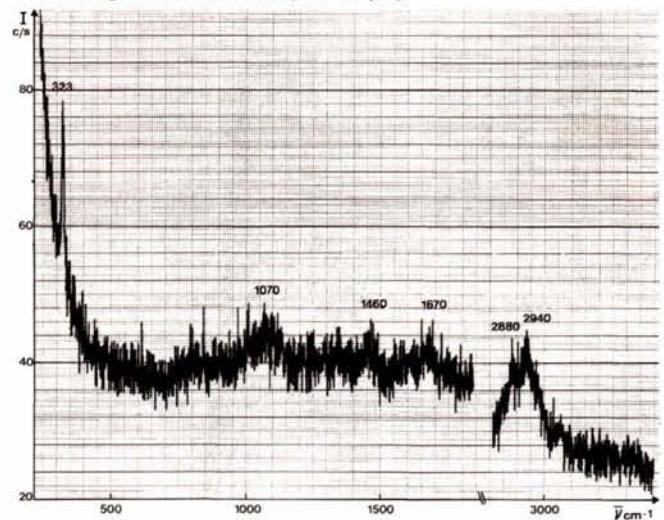


Figure 9  
Spectre Raman du contenu de la lumière d'un diverticule digestif de *Mytilus edulis* contaminée par le fluorure de calcium. Laser : 514,5 nm, 500 mW; fentes : 600  $\mu\text{m}$ ; diaphragme de champ : 5  $\mu\text{m}$ , environ; comptage :  $10^2$  c.s.<sup>-1</sup>, 1s; enregistrement : 100 mV, 50  $\text{cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ , 100  $\text{cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . On reconnaît la raie à 323  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique du fluorure de calcium (voir spectre de référence); les réponses à 1070, 1460, 1670, 2880 et 2940  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées à la matière organique qui enrobe les particules de fluorure.  
*Raman spectrum of dense substances into the lumen of digestive diverticules of Mytilus edulis contaminated with calcium fluoride. Laser: 514.5 nm, 500 mW; slits: 600  $\mu\text{m}$ ; aperture diaphragm: 5  $\mu\text{m}$ , approximately; photon counter:  $10^2$  c.s.<sup>-1</sup>, 1s; recorder: 100 mV, 50  $\text{cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ , 100  $\text{cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . The substance is identified as  $\text{CaF}_2$  by the characteristic line at 323  $\text{cm}^{-1}$ ; peaks at 1,070, 1,460, 1,670, 2,880 and 2,940  $\text{cm}^{-1}$  are attributed to organic components mixed with  $\text{CaF}_2$  particles.*

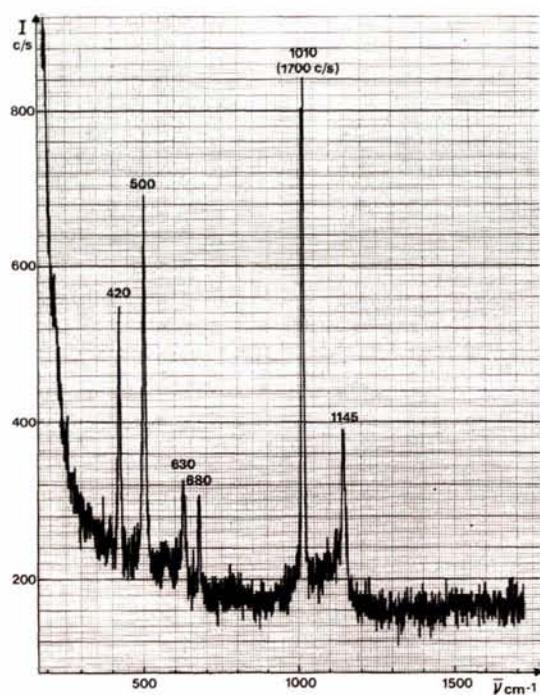


Figure 10

Spectre Raman d'un échantillon de phosphogypse (grain de  $5\mu\text{m}$  de diamètre, environ). Laser : 514,5 nm, 500 mW; fentes :  $600\mu\text{m}$ ; diaphragme de champ :  $10\mu\text{m}$ , environ; comptage :  $10^2\text{ c.s.}^{-1}$ , 1s; enregistrement : 1 V,  $50\text{ cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ ,  $100\text{ cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

*Raman spectrum of pure phosphogypsum (concretion  $5\mu\text{m}$  in diameter, approximately). Laser: 514.5 nm, 500 mW; slits:  $600\mu\text{m}$ ; aperture diaphragm:  $10\mu\text{m}$ , approximately; photon counter:  $10^2\text{ c.s.}^{-1}$ , 1s; recorder: 1 V,  $50\text{ cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ ,  $100\text{ cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .*

(fig. 10 et 11). L'analyse par émission ionique secondaire du contenu stomacal révèle, outre le sodium et le magnésium de l'eau de mer précipités par la fixation anhydre, de nombreux éléments des phosphogypses : F, Al, Si, P, Ca, Cr et Pb. Au contraire, Ti, V, Ni et Cd n'ont pas été décelés. Le polluant, à l'exception des cristaux de gypse, pénètre également dans la lumière des diverticules digestifs (fig. 12) et est absorbé par les cellules digestives (fig. 13 b). On sait que, normalement, les cellules digestives contiennent de nombreux éléments (Martoja *et al.*, 1985). La contamination par l'effluent se traduit par l'apparition de F, Ti et Cd. Quant au rein, qui concentre lui aussi normalement divers éléments (George, Pirie, 1979; Martoja *et al.*, 1985), il se distingue de celui des témoins par la présence de Cr, V et Ni.

Figure 12

Images ioniques de distribution des ions moléculaires de masse  $26^+$  (CN) et  $19^-$  (F) dans les diverticules digestifs de *Mytilus edulis* contaminée par le phosphogypse. Noter l'abondance de la matière organique (CN) dans la paroi et la lumière des diverticules, et l'émission de fluor par le phosphogypse de la lumière (barre :  $25\mu\text{m}$ ).

*Distribution of  $^{26}\text{CN}$  and  $^{19}\text{F}$  in the digestive tubules of *Mytilus edulis* contaminated with phosphogypsum. Note the abundance of organic components (CN) both in the wall and in the lumen of the tubules, and the emission of fluorine from the phosphogypsum located in the lumen (bar:  $25\mu\text{m}$ ).*

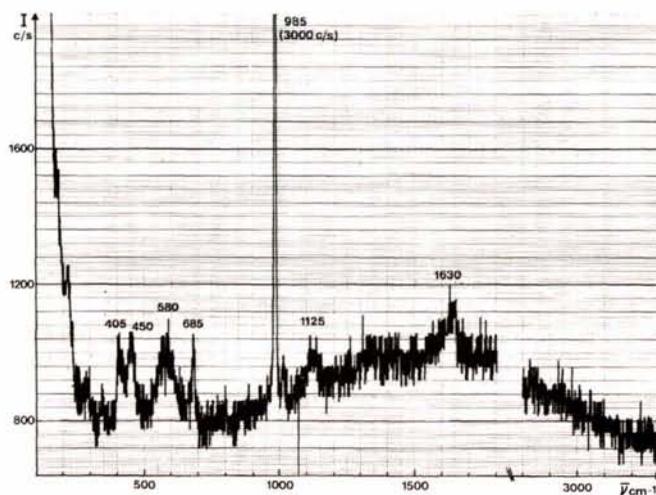


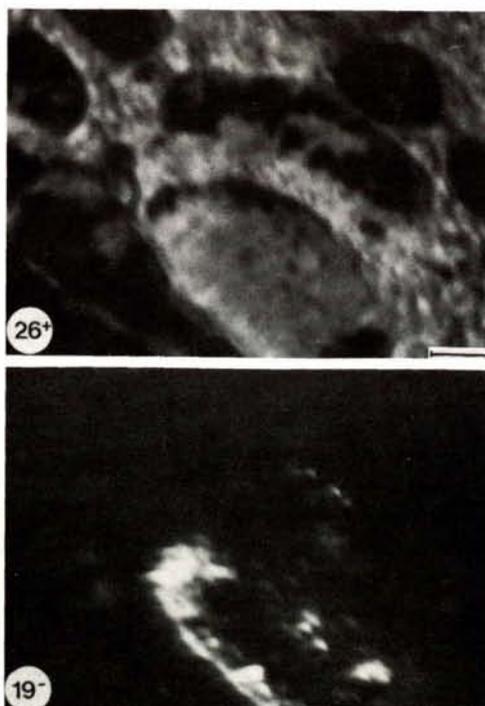
Figure 11

Spectre Raman d'un cristal situé dans le tube digestif de *Mytilus edulis* contaminée au phosphogypse. Laser : 514,5 nm, 700 mW; fentes :  $600\mu\text{m}$ ; diaphragme de champ :  $20\mu\text{m}$ , environ; comptage :  $10^3\text{ c.s.}^{-1}$ , 1s; enregistrement : 200 mV,  $50\text{ cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ ,  $100\text{ cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Noter la grande similitude de ce spectre avec celui de l'échantillon de référence de phosphogypse. La raie de vibration symétrique à  $1010\text{ cm}^{-1}$  et celle à  $685\text{ cm}^{-1}$  sont légèrement décalées vers les basses fréquences; dans la région des vibrations intermoléculaires, les raies à 420, 500 et  $630\text{ cm}^{-1}$  sont moins intenses, élargies, et décalées considérablement vers les basses fréquences, indiquant un début de modification du phosphogypse dans le bol alimentaire. La réponse vers  $1630\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à la matière organique du bol (enzymes?); en revanche, il n'y a pas de réponse dans la région des vibrateurs CH, vers  $3000\text{ cm}^{-1}$ .

*Raman spectrum of a crystal into the lumen of digestive tract of a *Mytilus edulis* contaminated with phosphogypsum. Laser: 514.5 nm, 700 mW; slits:  $600\mu\text{m}$ ; aperture diaphragm:  $20\mu\text{m}$ , approximately; photon counter:  $10^3\text{ c.s.}^{-1}$ , 1s; recorder: 200 mV,  $50\text{ cm}^{-1}.\text{mn}^{-1}$ ,  $100\text{ cm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .*

*This spectrum is very similar to the standard one; symmetric scattering frequency at  $1010$ , and at  $685\text{ cm}^{-1}$  are slightly displaced near low frequencies. In intermolecular scattering region, peaks at 420, 500 and  $630\text{ cm}^{-1}$  are less intense, wider and displaced near low frequencies; this is likely to indicate a modification of the molecule in the digestive bolus. Despite the lack of response in the  $3000\text{ cm}^{-1}$  region (non specific CH scattering), the response at  $1630$  is attributed to the organic matrix (enzymes?).*



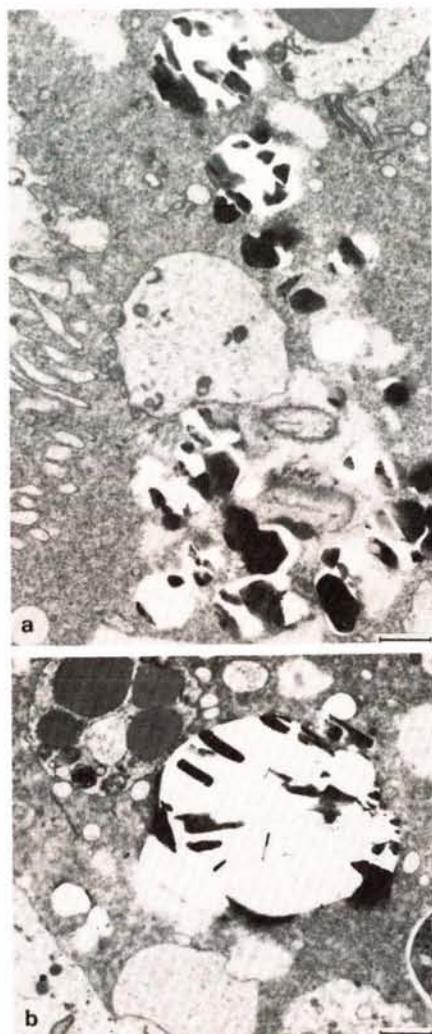


Figure 13

Système vacuolaire des cellules digestives de *Mytilus edulis* contaminée par  $\text{CaF}_2$  (Fig. a) et par le phosphogypse (Fig. b). Dans la plupart des vacuoles, les particules des polluants sont arrachées par le rasoir du microtome (barres : 1  $\mu\text{m}$ ).

Vacuolar system in the digestive cells of *Mytilus edulis* contaminated with  $\text{CaF}_2$  (Fig. a) and with the phosphogypsum (Fig. b). In many vacuoles, the particles of the pollutants are torn out during sectioning (bars: 1  $\mu\text{m}$ ).

## DISCUSSION

La bioaccumulation du fluor varie à la fois en fonction du groupe zoologique et de la forme physico-chimique de l'élément. Il faut, en effet, souligner que les deux espèces étudiées appartiennent à deux classes différentes de Mollusques. C'est ainsi que la surcharge en ions  $\text{F}^-$  n'entraîne chez la moule, et contrairement à l'ormeau, aucune contamination des tissus mous. Or, la dose de 60 mg/l de fluor dissocié administrée pendant 30 jours correspond à des conditions extrêmes de pollution puisque, dans le Golfe de Gabès par exemple, des concentrations supérieures à 10 mg/l n'existent qu'à proximité immédiate des rejets (Darmoul, Vitiello, 1980), et qu'en baie de Seine, la concentration maximale à proximité des rejets n'est que de 6 mg/l (Martin, Salvadori, 1980). L'ormeau accumule du fluor, mais seulement si la concentration égale ou dépasse 60 mg/l. Cette différence entre les deux espèces pourrait correspondre en

partie à une différence éthologique, la moule étant microphage et l'ormeau macrophage. Les ormeaux, en effet, se sont nourris d'algues qui, dans les bacs expérimentaux, avaient elles-mêmes subi une contamination. Dans ce cas, l'accumulation ne témoignerait plus d'une contamination directe, mais d'une accumulation consécutive à l'ingestion du fluor incorporé dans la nourriture. Les études histologiques et la microanalyse confortent cette hypothèse dans la mesure où le fluor est retrouvé pour une grande part dans le segment terminal du tube digestif.

L'accumulation du fluor dans la glande digestive de l'ormeau pourrait être liée à la constitution de réserves minérales. Il est en effet connu que le métabolisme du fluor est d'autant plus actif que le métabolisme calcique d'un organe est plus important. Le fait que le calcium et le fluor suivent une même voie d'utilisation explique également le rôle de la coquille en tant que structure d'accumulation. La quantité de fluor concentrée dans la glande digestive et dans l'organe lymphoïde évolue différemment. La glande digestive, où la concentration devient stationnaire au bout de quelques jours, se présente comme un organe de transit. L'organe lymphoïde, où l'accumulation progresse constamment, apparaît au contraire, comme un organe de stockage. Dans les limites du temps de nos expériences, soit plus de 2 mois, aucun mécanisme de régulation suffisamment efficace n'est intervenu pour limiter cette progression. L'abondance du fluor dans le segment terminal du tube digestif montre qu'une grande part du métalloïde ingéré est rejeté sans avoir pénétré dans le milieu intérieur. Ce rejet est le seul mécanisme de défense que nous ayons pu mettre en évidence. Enfin, l'absence constante de contamination du muscle pédieux, seul organe consommé par l'homme, est à souligner.

La contamination des moules par le fluorure de calcium et par le phosphogypse montre l'importance du fluor particulière dans la bioaccumulation réalisée par les suspensivores. Il est remarquable que, en milieu non enrichi (ajout de  $\text{CaF}_2$ ) ou peu enrichi (ajout de phosphogypse libérant 4 mg/l de  $\text{F}^-$ ) en fluor assimilable, les moules en stockent des quantités considérables, alors qu'elles ne se contaminent qu'à partir d'une concentration de 60 mg/l d'ions  $\text{F}^-$  libérés par le fluorure de sodium. L'accumulation du fluor du phosphogypse ne concerne donc que la fraction particulière de l'halogène en suspension dans l'eau. Les analyses histo-chimiques confirment que la totalité du fluor issu de  $\text{CaF}_2$  et du phosphogypse s'accumule sous forme de combinaison non assimilable dans les cellules digestives et les amœbocytes impliqués dans la digestion. Ces deux types cellulaires, qui captent les particules en suspension, accumulent également le titane, vraisemblablement sous forme d'oxyde. L'aluminium, qui s'y trouve lui aussi concentré, pourrait provenir de l'effluent, mais il est impossible de le distinguer de celui des particules préexistantes (Martoja *et al.*, 1985). Quant au cadmium, constituant mineur du phosphogypse, il pourrait pénétrer dans les vacuoles digestives sous forme assimilable et y précipiter sous forme de phosphate. Dans les concrétions des cellules rénales, précipitent trois éléments assimilés par l'organisme, le chrome, le vanadium et le nickel. Or, ces concrétions sont suscep-

tibles d'être rejetées dans la cavité de l'organe elle-même ouverte sur l'extérieur. Le rein des moules constitue ainsi un organe de stockage important, mais temporaire, de composés assimilables des effluents industriels. Les sulfates ne donnent lieu à aucune accumulation. Une constatation identique a été faite au sujet des sulfates provenant des résidus de fabrication de l'oxyde de titane (Martoja *et al.*, 1985). Tous les autres tissus se sont avérés indemnes de contamination; en particulier les branchies, siège d'une forte absorption du cadmium chez les mollusques (Carpene, George, 1981), sont exemptes de contamination par le fluor ou par les particules de phosphogypse.

*En conclusion*, les effets d'une intoxication à faible dose, prolongée pendant 20 jours, par les phosphogypses sont restreints et n'entraînent pas de lésions histopathologiques. Ce résultat n'est pas en contradiction avec les données antérieures qui démontrent la toxicité du

polluant (voir Pautsch, 1978), celle-ci s'étant manifestée à des doses très supérieures à celles que nous avons utilisées (jusqu'à 10 g/l). Une accumulation directe du fluor à partir des particules en suspension se produit chez les microphages alors que, chez les macrophages, le fluor assimilable transite, au moins en partie, par la nourriture.

#### Remerciements

Les échantillons ont été préparés par H. Moysan. L'étude a été réalisée avec le concours du Service d'accueil de Microscopie électronique de l'Université Paris VI et du Service commun de Microanalyse appliquée à la Biologie, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et SC 27 de l'Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM); elle a bénéficié d'un soutien financier de l'IFREMER (contrat CNEXO 81/2417).

#### RÉFÉRENCES

- Aminot A., 1983. Dosage de l'ion fluorure par électrode spécifique, in : Manuel des analyses chimiques en milieu marin, CNEXO, Éd., 395 p.
- Carpene E., George S.G., 1981. Absorption of cadmium by gills of *Mytilus edulis* (L.), *Molecul. Physiol.*, **1**, 23-34.
- Castaing R., Slodzian G., 1962. Microanalyse par émission ionique secondaire, *J. Microbiol.*, **1**, 395-410.
- Chesterikoff A., 1975. Étude de pollution en baie de Seine, *Rapp. Agence de Bassin Seine-Normandie*, 17 p.
- Crofts D.R., 1929. *Haliotis*, *Liverpool Mar. Biol. Com. Mem.*, **29**, 173 p.
- Darmoul B., Vitiello P., 1978. Étude expérimentale de la toxicité des rejets de phosphogypse de la région de Gabès sur deux isopodes, *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **55**, 4, 455-460.
- Darmoul B., Vitiello P., 1980. Recherches expérimentales sur la toxicité aigüe des rejets de phosphogypse sur quelques organismes benthiques marins, *Bull. Inst. Nat. Sci. Tech. Océanogr. Pêche Salammbô*, **7**, 63-89.
- George S.G., Pirie B.J.S., 1979. The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. The use of electron microprobe analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 234-244.
- Harbo R.M., McComas F.T., Thompson J.A.J., 1974. Fluoride concentrations in two pacific coast inlets: an indication of industrial contamination, *J. Fish. Res. Bd Can.*, **31**, 1151-1154.
- Hemens J., Warwick R.J., 1972. The effects of fluorure on estuarine organisms, *Wat. Res.*, **6**, 1301-1308.
- Hemens J., Warwick R.J., Oliff W.D., 1975. Effect of extended exposure to low fluoride concentration on estuarine fish and crustacea, *Progr. Wat. Technol.*, **7**, 579-585.
- Malewicz B., Bojanowski R., Poplawski C., 1973. Effects of fluoride on the growth of some green algae, *Rozpr. Wydz. Nauk Med. Pol. Akad.*, **9**, 215-223.
- Martin J.-M., Salvadori F., 1980. Le fluor de l'estuaire et la baie de Seine, *Rapp. CNEXO*, 32 p.
- Martin J.-M., Salvadori F., 1983. Fluoride pollution in french rivers and estuaries, *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, **17**, 231-242.
- Martoja R., Martin J.-L., Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.Y., Truchet M., 1985. Effets d'un effluent de fabrication du bioxyde de titane sur un Mollusque (*Mytilus edulis*). Comparaison d'animaux traités expérimentalement et prélevés à proximité d'un rejet d'usine, *Mar. Environ. Res.* (sous presse).
- Morton B.E., 1983. Feeding and digestion in bivalvia, in: *The Mollusca*, edited by K.M. Wilbur, Acad. Press. New York, **5**, 65-147.
- Oliveira L., Antia N.J., Bisalputra T., 1978. Culture studies on the effects from fluoride pollution on the growth of marine phytoplankters, *J. Fish. Res. Bd Can.*, **35**, 1500-1504.
- Pautsch F., 1978. Review of experiments on the chronic toxicity exerted by some pollutants on animal species from the Bay of Gdansk, *Kiel. Meeresforsch.*, **4**, 335-359.
- Pautsch F., Bomirski A., Dabrowska T., Drewa G., Kawinska E.K., Lawinski L., Kleineder J.T., Zbytowski L., Wrzolkowa T.Z., Ciszewska L., Dominiczak T., Skorkowski E.F., Najdrowska J.S., Turoboyski K., 1975. Studies of the toxicity of phosphogypsum, *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **22**, 3, 449-476.
- Truchet M., 1975. Application histologique de la microanalyse par émission ionique secondaire, *J. Microbiol. Cell*, **22**, 465-474.
- Truchet M., 1982. Étude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman; méthodologie et exemples d'application, *Thèse Doct. État, Univ. Paris VI*, 440 p.
- Wright D.A., Davison A.W., 1975. The accumulation of fluoride by marine and intertidal animals, *Environ. Pollut. Bull.*, **8**, 1-13.