



HAL
open science

Évaluation écotoxicologique des éléments terres-rares : approches cellulaires chez différentes espèces aquatiques

Emmanuel Fleurbaix

► **To cite this version:**

Emmanuel Fleurbaix. Évaluation écotoxicologique des éléments terres-rares : approches cellulaires chez différentes espèces aquatiques. Ecotoxicologie. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0324 . tel-03717971

HAL Id: tel-03717971

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03717971v1>

Submitted on 8 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnement Continentaux
LIEC CNRS – Metz



École Doctorale Science et Ingénierie
des Ressources Naturelles
SIRENa n° 607 - Nancy

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Mention : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Emmanuel Fleurbaix
Le jeudi 9 décembre 2021

**Évaluation écotoxicologique des éléments terres-rares : approches cellulaires chez
différentes espèces aquatiques**

Membres du jury :

Directeur de thèse	Carole Cossu-Leguille	Professeur, Université de Lorraine, LIEC, Metz
Co-directeur de thèse	Marc Parant	Maître de Conférences, Université de Lorraine, LIEC, Metz
Président de jury / Rapporteur	Frank Le Foll	Professeur, Université Le Havre, Normandie, SEBIO, Le Havre
Rapporteur	Catherine Mouneyrac	Professeur, Université Catholique de l'Ouest, MMS, Angers
Examineur	Matthieu Marin	Maître de Conférences, Université de Lille, UGSF, Lille



*A mes parents, Claudine et Émile,
Ce travail est en partie le leur...
Sans qui rien n'aurait été possible...*

Remerciements

*Je voudrais remercier, en premier lieu, **Carole Cossu-Leguille**, Professeur à l'Université de Lorraine et directrice de ma thèse. Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour m'avoir encadré depuis mon arrivé à Metz lors de mon Master 2 jusqu'à la fin de cette thèse. Je ne saurais exprimer en quelques mots le profond respect que j'ai pour elle, pour sa bienveillance à mon égard, sa gentillesse, sa bonne humeur, sa disponibilité, et ses conseils qui m'ont été d'une aide précieuse. La deuxième personne vers qui iront mes remerciements est pour **Marc Parant**, Maître de Conférences à l'Université de Lorraine et co-Directeur de ma thèse. Pour sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse, et l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Je vous suis à tous les deux reconnaissant pour m'avoir accordé votre confiance et l'autonomie nécessaire pour mener à bien ces recherches. J'ai énormément appris tant sur le plan scientifique que personnel à votre contact et qui fait de moi une personne davantage accomplie.*

Je suis très sensible à l'honneur que me font les membres du jury qui ont pris le temps de lire et d'évaluer ce travail de thèse.

*Je tiens à remercier les membres de mon comité de pilotage de leurs conseils et du regard neuf apporté à mes travaux lors de chaque réunion annuelle d'état d'avancement de la thèse. Merci donc à **Florence Géret** (Centre Universitaire de Formation et de Recherche Jean-François Champollion), **Yann Landkocz** (Université du Littoral Côte d'Opale), et à **Simon Devin** (Université de Lorraine).*

*Un grand merci à la direction **Laure Giamberini** et **Simon Devin** pour m'avoir accueilli au laboratoire LIEC, sans quoi, il n'aurait pas été possible d'accomplir cette thèse.*

*Ces travaux n'auraient pas été possibles sans la participation de **Bénédicte Sohm**, **Justine Flayac** et de **Clément Bojic** qui ont toujours accepté de bien vouloir m'aider en culture cellulaire. Merci aussi pour ces petits moments à discuter de choses et d'autres durant les quelques expérimentations en commun et de m'avoir fait peur à quelques reprises par inadvertance en salle blanche ! Je tiens également à remercier particulièrement pour ces travaux **Armand Maul**. Tout d'abord pour ses encouragements, sa bienveillance, sa gentillesse,*

ses anecdotes, sa disponibilité et pour avoir énormément appris sur des questionnements scientifiques fondamentales et améliorer mes compétences dans le domaine de la statistique. Merci à **Etienne**, qui veille à la gestion des stocks en magasin et sans qui la réalisation des manips en salle blanche n'aurait pas eu lieu, faute de consommables. Il sera de ton devoir de trouver un nouveau client n°1 pour vider les stocks de ton magasin !

Toute ma reconnaissance à l'ensemble du personnel du laboratoire, **Catherine** et **Romuald** pour votre aide dans le labyrinthe administratif. Merci également à **Nathalie**, pour ton sourire, ta bonne humeur, et nos petites discussions chaque matin devant la salle blanche, idéales pour démarrer la journée pied au plancher.

Un merci à nos deux anciens « **P** » du laboratoire qui ont mérité une douce et belle retraite. Tout d'abord, merci à **Philippe Wagner**, pour ton aide lors des sorties de terrain par temps froid, et m'avoir fait découvrir la région Lorraine ! Merci à **Philippe Rousselle**, pour sa bonne humeur et les superbes sorties astronomie qui m'ont permis de naviguer parmi les constellations ! Je tenais à remercier également toute l'équipe du LIEC, notamment **Davide**, **Vincent**, **Éric**, **Paule**, **Elisabeth**, **Laetitia**, **Danièle**, **Sylvie**, **Sandrine**, **Mickael**, **Florence**, **Maxime**, **Quentin**, qui ont toujours eu un petit mot gentil quand je les croise dans le couloir ou à mon bureau. Une pensée aux autres doctorants de mon bureau **Rodrigue**, **Vinita**, **Eva**, et **Joey** en post-doctorat pour tous ces agréables moments passés en votre compagnie, à s'encourager mutuellement, à énoncer nos plans pour l'avenir (n'est-ce pas Rodrigue ?) et à qui je leur souhaite le meilleur pour la suite de leurs aventures ! Je n'en oublie pas moins les autres doctorants **Miriam**, **Ziming**, **Claudia**. Une mention spéciale à **Vincent Baillard**, qui m'a précédé pour soutenir sa thèse et avec qui nous avons partagé des bons moments durant cette fameuse semaine de séminaire dans les Vosges ! J'ai eu l'occasion d'encadrer des stagiaires et notamment **Ludovic Meyer** qui est devenu un très bon ami. Merci de ton enthousiasme, ta bonne humeur, ta dévotion aux manips même durant les weekends. Je t'ai vu grandir et évoluer, toi le jeune padawan durant ton stage de Master 1 et qui poursuit à présent sa formation en thèse afin de devenir chevalier. Enfin, je tiens à souligner que cette thèse n'aurait pas été pareille sans **Nicolas Lachaux**, un autre et courageux doctorant (alias le chevalier blanc espagnol), devenu l'un de mes plus proches amis ! De notre surnom, les brothers, merci pour ces moments passés au laboratoire, mais surtout en dehors à profiter des petits plaisirs de la vie en ta présence, mais aussi avec **Lara** et bien évidemment le tigre **Puffy** !

*Je tenais à remercier aussi mes amis extérieurs au monde scientifique sans qui il m'aurait été difficile de garder un point d'ancrage dans le monde « normal ». Tout d'abord un grand merci à mes amis de Lille, notamment, **Benjamin**, **Samuel**, les seigneurs **Anthony**, **Nicolas**, **Jérôme**, le prospect **Robin**, à **Marc** au Havre, et à **Nico** à Bayonne. Un autre grand merci à tous mes amis du tennis, en particulier, **Oliver** (n'oublie pas un transat quand je viendrais te voir en Nouvelle-Calédonie), **Rémy**, **Van**, **Duc**, **Maxime**, **Mattéo**, **Matthieu**, et notre entraîneur vedette **Pierre**. Une dédicace spéciale à **Hugo** (alias Bunny), un de mes plus proches amis et toujours partant pour un tennis, un trial, une pause gourmande, ou des sessions « try hard » sur counter-strike. Promis à l'avenir je serais plus souriant, plus optimiste, et solide sur les appuis.*

*Mes derniers remerciements s'adressent à ma famille, en particulier à mes parents **Claudine** et **Emile**, sans qui cette aventure n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir supporté, encouragé, épaulé dans les moments difficiles, et merci de m'avoir poussé à croire en moi ce qui m'a permis de devenir l'Homme que je suis devenu.*

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	7
Chap. I - Généralités sur les Lanthanides	9
1. Découverte et nomenclature des Lanthanides	9
2. Abondance, gisement, et répartition des Lanthanides	10
3. Production des Lanthanides.....	13
4. Chimie des Lanthanides.....	14
5. Utilisation des Lanthanides	15
6. Évolution de la demande mondiale en Lanthanides	17
7. Recyclage des Lanthanides.....	18
Chap. II - Voies et processus de transfert des Lanthanides vers les écosystèmes aquatiques	20
1. Sources de contamination des écosystèmes aquatiques par les Lanthanides	20
2. Processus de transfert des Lanthanides : notion de biodisponibilité et de spéciation.	23
Chap. III - Transfert des Lanthanides vers les organismes aquatiques.....	26
1. Généralités sur le transfert des composés vers les organismes aquatiques.....	26
2. Bioaccumulation des Lanthanides par les organismes aquatiques.....	28
Chap. IV - Toxicité <i>in vivo</i> des Lanthanides en milieu aquatique.....	30
1. Toxicité individuelle des nanoparticules de Lanthanides	30
2. Toxicité individuelle des oxydes de Lanthanides	33
3. Toxicité individuelle des sels de Lanthanides.....	35
4. Toxicité des sels de Lanthanides en mélanges.....	37

Chap. V - Toxicité <i>in vitro</i> des Lanthanides sur différents modèles cellulaires ..	40
1. Mécanisme de détoxification cellulaire	40
2. Toxicité des Lanthanides sur des modèles cellulaires humains et murins	42
3. Toxicité des Lanthanides sur des modèles cellulaires de poissons	46
Matériels et Méthodes	49
Chap. I – Matériels biologiques	51
1. Lignées cellulaires de poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>).....	51
2. Lignée cellulaire de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	52
3. Cultures primaires de glandes digestives du bivalve <i>Corbicula fluminea</i>	53
Chap. II – Protocoles de culture des modèles cellulaires	57
1. Culture des lignées cellulaires de poissons	57
2. Cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	62
Chap. III – Essais menés sur les lignées cellulaires de poissons.....	65
1. Évaluation de la toxicité des Lanthanides	65
2. Mesure des concentrations de Lanthanides.....	77
Chap. IV – Essais menés sur les cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>.....	80
1. Évaluation de la toxicité des Lanthanides	80

Chap. V – Traitements statistiques	87
1. Analyses de la toxicité des Lanthanides sur les lignées cellulaires de poissons	87
2. Analyse de la toxicité des Lanthanides sur les cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	89
Résultats	91
Chap. I – Étude de la toxicité individuelle et en mélange des Lanthanides sur différentes lignées cellulaires de poissons (ARTICLE)	93
Chap. II – Étude de la détoxification de trois Lanthanides (Nd³⁺, Gd³⁺, et Yb³⁺) dans les cellules ZF4 de <i>Danio rerio</i>	141
1. Impact des solvants sur la viabilité cellulaire ZF4.....	141
2. Impact des inhibiteurs de MRP-like sur la toxicité du Nd ³⁺ , du Gd ³⁺ , et de l'Yb ³⁺ dans le cas des cellules ZF4	142
3. Impact de l'acide éthacrynique, inhibiteur des GST, sur la toxicité du Gd ³⁺ dans le cas des cellules ZF4.....	149
Chap. III – Développement et application des cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	152
1. Développement et identification des cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	152
2. Validation de la sensibilité des cultures primaires de <i>Corbicula fluminea</i>	155
3. Évaluation de la toxicité des Lanthanides	157
Discussion	160
1. Toxicité <i>in vitro</i> des sels de Lanthanides sur des lignées cellulaires de poissons	163
2. Détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 de <i>Danio rerio</i>	167
3. Cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	169

Conclusion et perspectives.....	174
Références bibliographiques.....	180
Annexes	229
Communications et activités scientifiques.....	236

Liste des figures

Figure 1. Échelle de temps relatant de la découverte des Lanthanides entre le XVIII ^{ème} et le XX ^{ème} siècle (Charles et al., 2021).....	9
Figure 2. Classification périodique de Mendeleïev présentant les Éléments Terres-Rares qui regroupent les Lanthanides, l'yttrium, et le scandium.	10
Figure 3. Répartition des ressources en Lanthanides entre les différents pays du monde (Roskill et al., 2015).....	12
Figure 4. Organigramme simplifié des étapes nécessaires à la purification des Lanthanides (Peiró et Méndez, 2013).....	14
Figure 5. Classification des Lanthanides d'après la littérature (Chakhmouradian et Wall, 2012 ; Weng et al., 2013).	15
Figure 6. Utilisation et fonction des Lanthanides dans les différents secteurs industriels. Adapté de Haque et al. (2014) et du National Energy Technology Laboratory (2017).	16
Figure 7. Évolution de la production mondiale des oxydes de Lanthanides (Charles et al., 2021).	17
Figure 8. Conceptualisation des processus de précipitation et de complexation des Lanthanides à différents composés dans la fraction dissoute et particulaire (Adapté de Buffle et al., 1988 ; Urien, 2015).	24
Figure 9. Conceptualisation des interactions entre les composés et les organismes montrant le processus de bioaccumulation (modifié de Campbell, 1995).	27
Figure 10. Conceptualisation des différentes phases de la détoxification cellulaire (Bard, 2000).	41

Figure 11. Lignée cellulaire ZF4 de poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).....	51
Figure 12. Lignée cellulaire ZFL de poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).....	52
Figure 13. Lignée cellulaire RTgill-W1 de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).....	52
Figure 14. <i>Corbicula fluminea</i> ou la palourde asiatique.	53
Figure 15. Coupe longitudinale de <i>Corbicula fluminea</i> mettant en évidence le tube digestif à l'intérieur de la masse viscérale (Britton et Morton, 1982).	54
Figure 16. Dispositif pour l'acclimatation des bivalves <i>Corbicula fluminea</i> en conditions contrôlées au laboratoire (photo prise par Emmanuel Fleurbaix, 2018).	56
Figure 17. Procédure d'amplification des cellules ZF4 et ZFL de <i>Danio rerio</i> , et RTgill-W1 d' <i>Oncorhynchus mykiss</i>	61
Figure 18. Protocole détaillé mis en œuvre pour le développement des cultures primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	64
Figure 19. Essai de cytotoxicité : MTT – Première étape du protocole pour l'ensemencement des cellules.	69
Figure 20. Essai de cytotoxicité : MTT – Deuxième étape du protocole mis en œuvre lors du lancement des expositions.	70
Figure 21. Essai de cytotoxicité : MTT – Troisième étape du protocole après arrêt des expositions et révélation au test MTT.	71

- Figure 22.** Protocole pour la mesure par ICP-MS des concentrations nominales en Nd^{3+} , en Gd^{3+} , et en Yb^{3+} dans le milieu de culture des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss* (conditions biotique et abiotique), immédiatement après la supplémentation (T_0) et après 96 h (T_{96}) d'incubation. 79
- Figure 23.** Protocole mis en œuvre pour les expositions des cellules primaires de *Corbicula fluminea* au peroxyde d'hydrogène. 81
- Figure 24.** Protocole détaillé des expositions aux Lanthanides des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. 83
- Figure 25.** Protocole détaillé pour la mise en œuvre du double marquage des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* par la méthode Ca-AM / IP en cytométrie de flux. 85
- Figure 26.** Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h au (A) néodyme (Nd^{3+}), (B) au gadolinium (Gd^{3+}), et (C) à l'ytterbium (Yb^{3+}) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence (rouge) et en absence (noir) de 100 μM de MK571. 144
- Figure 27.** Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h au (A) néodyme (Nd^{3+}), (B) au gadolinium (Gd^{3+}), et (C) à l'ytterbium (Yb^{3+}) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence (rouge) et en absence (noir) de 2 mM de probénécide. 145
- Figure 28.** Viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h à 672 μM de néodyme (Nd^{3+} ; en noir), 849 μM de gadolinium (Gd^{3+} ; en bleu), et 576 μM d'ytterbium (Yb^{3+} ; en rouge) en présence de différentes concentrations de (A) MK571 (0 à 100 μM) ou de (B) probénécide (0 à 2 000 μM). 146
- Figure 29.** Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 96 h à 235 μM de néodyme (Nd^{3+} ; en noir), 290 μM de gadolinium (Gd^{3+} ; en bleu), et 209 μM d'ytterbium (Yb^{3+} ; en rouge) en présence de différentes concentrations de (A) MK571 (0 à 100 μM) ou de (B) probénécide (0 à 2 000 μM). 147

- Figure 30.** Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées pendant 96 h au gadolinium (Gd^{3+}) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence et en absence de 10 μM d'acide éthacrynique. 149
- Figure 31.** Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 96 h à 849 μM de gadolinium (Gd^{3+}) en présence de multiples concentrations d'acide éthacrynique. 150
- Figure 32.** Observation et « identification » des principaux types cellulaires d'une culture primaire de glandes digestives de *Corbicula fluminea* (J_0) au microscope inversé à contraste de phase et fluorescence (grossissement x 40) (photo prise par Emmanuel Fleurbaix, 2018). .. 153
- Figure 33.** Numération de la viabilité cellulaire (A) et du nombre total de cellules (B) pour les 7 essais de cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. 154
- Figure 34.** Analyse en cytométrie de flux d'une culture primaire de glandes digestives de *Corbicula fluminea* selon la taille et la granulométrie des cellules (A), et en estimant le nombre de cellules viables (B), mortes (C), et doublement marquées (D) par Ca-AM / IP. 155
- Figure 35.** Courbes dose-réponse ajustées sur les données de rapport de densité des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* exposées pendant 30 minutes au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture. 156

Article

- Fig. 1.** (A) Concentration (mg/L) of Ytterbium (Yb^{3+}) under abiotic and biotic conditions after the supplementation (T_0) and after 96 h (T_{96h}) of exposure in the media of ZF4 cells. (B) percentage of nominal concentration considering all tested conditions under abiotic and biotic conditions after the supplementation (T_0) and after 96 h (T_{96h}) of exposure in the media regardless of Lanthanides, Lanthanides concentration (alone or in mixtures) and cell lines. Data are expressed as the mean \pm one standard deviation ($n = 3$) per condition. 106
- Fig. 2.** Dose-response curves for the viability of ZF4 cells exposed for 24 to 96 h to Neodymium (A), Gadolinium (B) and Ytterbium (C) at nominal concentrations ranging from 0.5 to 3000 μM . Data are expressed as the mean \pm one standard deviation ($n = 3$) per condition. 107

Fig. 3. (A) Three-dimensional response surface plot (3D) showing the combined effect of the Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) mixtures on the viability of ZF4 cells after 96 h of exposure; (B) Two-dimensional level contour plots (2D), i.e. isobologram showing the relationship between combinations of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) concentrations to attain predetermined values of ZF4 cell viability after 96 h of exposure (print in color).. 112

Fig. 4. Three-dimensional response surface plots (3D) showing the combined effect of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) mixtures on the viability of ZFL (A) and RTgill-W1 (C) cells after 96 h of exposure. Two-dimensional contour plots (2D) i.e. isobolograms showing the relationship between combinations of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) concentrations to attain predetermined values of ZFL (B) and RTgill-W1 (D) cell viability after 96 h of exposure (print in color)..... 116

Liste des tableaux

Tableau 1. Abondance naturelle des Lanthanides dans la croûte terrestre d'après Bonnet (2006), Keith et al. (2010), et Haque et al. (2014).	11
Tableau 2. Présentation des différentes méthodes de recyclage des Lanthanides.	18
Tableau 3. Études relatant de l'absence de toxicité des nCeO ₂ sur la survie de différents organismes aquatiques.....	31
Tableau 4. Études relatant des effets sublétaux des nCeO ₂ sur différents organismes aquatiques.	32
Tableau 5. Études relatant de l'absence de toxicité des oxydes de Lanthanides sur la survie de différents organismes aquatiques.	34
Tableau 6. Études relatant de la toxicité <i>in vitro</i> des nanoparticules de Lanthanides sur différentes lignées cellulaires.	43
Tableau 7. Caractéristiques des lots de cellules ZF4 et ZFL de <i>Danio rerio</i> , et RTgill-W1 d' <i>Oncorhynchus mykiss</i> , et composition des milieux complets nécessaires à leur culture.....	57
Tableau 8. Conditions d'incubation des lignées cellulaires ZF4 et ZFL de <i>Danio rerio</i> , et RTgill-W1 d' <i>Oncorhynchus mykiss</i>	58
Tableau 9. Solution de trypsine utilisée pour chaque lignée cellulaire lors de la procédure d'amplification.	58
Tableau 10. Densité d'ensemencement des cellules ZF4 et ZFL de <i>Danio rerio</i> , et RTgill-W1 d' <i>Oncorhynchus mykiss</i>	59

Tableau 11. Volume d'inhibiteur ajouté dans le milieu d'exposition ($V_f = 20$ mL) des cellules ZF4 de <i>Danio rerio</i>	66
Tableau 12. Concentrations nominales des Lanthanides testées individuellement et en mélanges binaires sur les cellules ZF4.	73
Tableau 13. Conditions d'exposition des cellules ZF4 de <i>Danio rerio</i> à différentes concentrations d'inhibiteurs et de Lanthanides testées seules et en mélanges.	75
Tableau 14. Conditions d'exposition des cellules ZF4 de <i>Danio rerio</i> à différentes concentrations d'acide éthacrynique et de gadolinium (Gd^{3+}) testées seules et en mélanges..	76
Tableau 15. Concentrations effectives induisant 5 % (CE_5) et 10 % (CE_{10}) d'effet sur la viabilité cellulaire ZF4 avec leurs intervalles de confiance à 95 % entre crochets.	143
Tableau 16. Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 24, 48, 72, et 96 h à 672 μM de néodyme (Nd^{3+}), 849 μM de gadolinium (Gd^{3+}), et 576 μM d'ytterbium (Yb^{3+}) en absence et en présence de 100 μM de MK571 ou de 2 000 μM de probénécide.	148
Tableau 17. Concentrations effectives induisant 5 % (CE_5) et 10 % (CE_{10}) d'effet sur la viabilité cellulaire ZF4 avec leurs intervalles de confiance à 95 % entre crochets.	150
Tableau 18. Viabilité des cellules ZF4 exposées durant 24, 48, 72, et 96 h à 849 μM de gadolinium (Gd^{3+}) en absence et en présence de 10 μM d'acide éthacrynique.	151
Tableau 19. Concentrations effectives induisant 50 % (CE_{50}) d'effet cytotoxique du peroxyde d'hydrogène sur les cellules primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i> avec les intervalles de confiance 95 % entre crochets.	157
Tableau 20. Effet cytotoxique induit par chaque Lanthanide (La^{3+} au Lu^{3+}) à une concentration finale de 1 mM après 96 h d'exposition de ces éléments sur les cellules primaires de glandes digestives de <i>Corbicula fluminea</i>	158

Article

Table 1. Nominal Lanthanide concentrations tested alone and in mixtures on ZF4 cells. Bold text represents the conditions tested on ZFL and RTgill-W1 cells. 101

Table 2. Effective concentrations (with associated 95 % confidence intervals between square brackets) inducing 50 % (EC₅₀) of the effect on ZF4 cell viability. Values were calculated from dose-response curves obtained after 96 h of exposure to fourteen Lanthanides. 108

Table 3. ZF4 cell viability calculated after 96 h of exposure to Neodymium (Nd³⁺), Gadolinium (Gd³⁺), and Ytterbium (Yb³⁺) tested alone and in mixtures. Experiments were repeated three times with six replicates per condition. The percentage of cell viability corresponding to each condition was expressed as the mean ± one standard deviation in parentheses. 110

Table 4. Effective concentrations (with associated 95 % confidence intervals in brackets) inducing 50 % (EC₅₀) loss in cell viability in ZF4, ZFL, and RTgill-W1 cell lines exposed to Neodymium and Ytterbium. Values were calculated from dose-response curves after 24, 48, 72, and 96 h of exposure to Neodymium and Ytterbium. 113

Table 5. ZFL and RTgill-W1 cell viability calculated after 96 h of exposure to Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺), tested alone and in mixtures. Experiments were repeated three times with six replicates per condition. The percentage of cell viability corresponding to each condition was expressed as the mean ± one standard deviation in parentheses. 114

Liste des abréviations

A

ABC : protéines transporteurs à cassettes liant l'ATP (ATP-binding cassette)

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA : analyse de la variance

ANR : Agence Nationale de la Recherche en France

AOP : Adverse Outcome Pathway

APX : ascorbate peroxydase

ATB : antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : adénosine triphosphate

B

β_1 , β_2 , et β_{12} : coefficients de régression du modèle WLR

BAF : facteur de bioaccumulation

BALB/c 3T3 : lignée cellulaire fibroblastique d'embryon murin

BEAS-2B : lignée cellulaire épithéliale de poumon humain

C

C3A : lignée cellulaire hépatique humaine

Ca-AM : calcéine-AM (calcein acetoxymethyl ester)

CAT : catalase

CDF : fonction de distribution cumulative

CE₅ : concentration effective induisant 5 % d'effet

CE₁₀ : concentration effective induisant 10 % d'effet

CE₅₀ : concentration effective induisant 50 % d'effet

Ce : cérium

Ce³⁺ : ion cérium trivalent

CeCl₃ : sel de chlorure de cérium

CeO₂ : oxyde de cérium

CeCl₃-7H₂O : sel de chlorure de cérium (III) heptahydraté

Cl⁻ : ion chlorure

CO₂ : dioxyde de carbone

CO₃⁻ : ion carbonate

COST : European Cooperation in Science and Technology

CYP : cytochrome P450

D

DCFH-DA : 2,7-dichlorofluoroscein diacetate

Di : didyme

DMSO : diméthylsulfoxyde

Dy : dysprosium

Dy³⁺ : ion dysprosium trivalent

Dy(NO₃)₃-6H₂O : sel de nitrate de dysprosium (III) hexahydraté

E

ECOTREE : Ecotoxicology of Rare Earth Elements in Aquatic Systems

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique (2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo)tetraacetic acid)

Er : erbium

Er³⁺ : ion erbium trivalent

Er(NO₃)₃-5H₂O : sel de nitrate d'erbium (III) pentahydraté

Eu : europium

Eu³⁺ : ion europium trivalent

Eu₂O₃ : oxyde d'europium

EuCl₃-6H₂O : sel de chlorure d'europium (III) hexahydraté

F

[(Ce, La) (CO₃) F] : fluorocarbonate d'oxydes de lanthane et de cérium

F⁻ : ion fluorure

FCC : craquage catalytique en lit fluidisé

FL1 : intensité relative de fluorescence du canal 1

FL3 : intensité relative de fluorescence du canal 3

FSC-A : forward scatter

G

Gd : gadolinium

Gd³⁺ : ion gadolinium trivalent

GdCl₃ : sel de chlorure de gadolinium

GdCl₃-6H₂O : sel de chlorure de gadolinium (III) hexahydraté

GSH : glutathion

GST : glutathion-S-transférase

H

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HCO₃⁻ : ion bicarbonate

HEK 293 : lignée cellulaire rénale d'embryon humain

HepG2 : lignée cellulaire hépatique humaine

Hela : lignée cellulaire épithéliale d'utérus humaine

HEPES : acide éthane sulfonique (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid)

HL-60 : lignée cellulaire leucémique humaine

HNO₃ : acide nitrique

Ho : holmium

Ho³⁺ : ion holmium trivalent

HoCl₃-6H₂O : sel de chlorure d'holmium (III) hexahydraté

HUCPV : culture primaire de cellules périvasculaires du cordon ombilical humain

I

IC : intervalle de confiance

ICP-MS : spectrophotométrie de masse à plasma par couplage inductif

IOCG : complexe d'oxydes de fer-cuivre-or

IP : iodure de propidium (3,8-Diamino-5-(3-(diethyl(methyl)ammonio)propyl)-6-phenylphenanthridin-5-ium iodide)

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

J

Jurkat : lignée cellulaire de lymphocyte humain

K

K, K₁, K₂, et K₃ : constante d'équilibre pour la formation d'espèces

L

L929 : lignée cellulaire fibroblastique du tissu adipeux murin

La : lanthane

La³⁺ : ion lanthane trivalent

La₂O₃ : oxyde de lanthane

LaCl₃ : sel de chlorure de lanthane

LaCl₃·7H₂O : sel de chlorure de lanthane (III) heptahydraté

LDH : lactate déshydrogénase

LIEC : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux

LPO : peroxydation lipidique

LTD₄ : récepteur leucotriène D₄

Lu : lutétium

Lu³⁺ : ion lutétium trivalent

LuCl₃·6H₂O : sel de chlorure de lutétium (III) hexahydraté

M

M^{Z+} : métal en solution

MC3T3-E1 : lignée cellulaire ostéoblastique murine

MCF-7 : lignée cellulaire de glande mammaire humaine

MDA : malondialdéhyde

MG63 : lignée cellulaire de l'ostéosarcome humaine

MK571 : sel de sodium hydraté (5-(3-(2-(7-Chloroquinolin-2-yl)ethenyl)phenyl)-8-dimethylcarbamyl-4,6-dithiaoctanic acid sodium salt hydrate)

MRP-like : protéines membranaires de multi-résistance (multidrug resistance protein)

MTT : sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium)

M-L : complexe en solution

M-X : complexe de surface

N

Na-K-Cl : co-transporteur sodium-potassium-chlorure

NaOH : hydroxyde de sodium

NB4 : lignée cellulaire leucémique humaine

nCeO₂ : nanoparticule d'oxyde de cérium

Nd : néodyme

Nd³⁺ : ion néodyme trivalent

Nd₂O₃ : oxyde de néodyme

Nd(NO₃)₃-6H₂O : sel de nitrate de néodyme (III) hexahydraté

nDy₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de dysprosium

nGd₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de gadolinium

nLa₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de lanthane

nSm₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de samarium

nTb₂O₃ : nanoparticule d'oxyde de terbium

O

OAT : polypeptides transporteurs d'anions organiques

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques

OMC : Organisation Mondiale du Commerce

P

[(Ce, La, Nd, Th) (PO₄)] : orthophosphate d'oxydes de lanthane, de cérium, de néodyme, et de thorium

[YPO₄] : orthophosphate d'oxyde d'yttrium

P-gp : P-glycoprotéines

PBS : solution de tampon salin stérile

PLHC-1 : lignée cellulaire fibroblastique de *Poeciliopsis lucida*

Pm : prométhium

PO₂ : pression partielle en dioxygène

Pr : praséodyme

Pr³⁺ : ion praséodyme trivalent

Pr(NO₃)₃-6H₂O : sel de nitrate de praséodyme (III) hexahydraté

Probénécide : acide benzoïque (4-[(Dipropylamino) sulfonyl] benzoic acid)

PRTH : culture primaire d'hépatocytes d'*Oncorhynchus mykiss*

PSM : poste de sécurité microbiologique

Q

QSP : quantité suffisante pour x volumes

R

RAW 264.7 : lignée cellulaire de macrophage de souris

REACH : Registration Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RSM : méthode des surfaces de réponses

RTgill-W1 : lignée cellulaire branchiale d'*Oncorhynchus mykiss*

RT-PCR : réaction en chaîne par polymérase par transcriptase inverse

S

SBS : solution de tampon salin stérile à 2,32 g/L de NaCl

Sc : scandium

SiO₂ : dioxyde de silicium

SLC : protéines membranaires de support de soluté

Sm : samarium

Sm³⁺ : ion samarium trivalent

Sm(NO₃)₃-6H₂O : sel de nitrate de samarium (III) hexahydraté

SO₄²⁻ : ion sulfate

SOD : superoxyde dismutase

SSC-A : side scatter

STEP : station d'épuration des eaux usées

SVF : sérum de veau fœtal

T

Tb : terbium

Tb³⁺ : ion terbium trivalent

Tb₂O₃ : oxyde de terbium

TbCl₃-6H₂O : sel de chlorure de terbium (III) hexahydraté

Th : thorium

Tm : thulium

Tm³⁺ : ion thulium trivalent

Tm(NO₃)₃·5H₂O : sel de nitrate de thulium (III) pentahydraté

Tukey HSD : test de Tukey (différence significative honnête)

U

UGT : UDP-glucuronosyltransférase

USGS : United States Geological Survey

V

V79-4 : lignée cellulaire fibroblastique de poumon du hamster chinois

Vero : lignée cellulaire rénale humaine

v/v : volume/volume

W

WLR : modèle de régression linéaire log-logistique pondérée

WTS-8 : 2-2-methoxy-4-nitrophenyl-3-4-nitrophenyl-5-2,4-disulfophenyl-2H-tetrazolium, monosodium salt

w/s : masse/surface

X

X-cell : ligand de la membrane cellulaire

X-M : complexe métallique à la surface de la membrane cellulaire

Y

Y : yttrium

Yb : ytterbium

Yb³⁺ : ion ytterbium trivalent

YbCl₃ : sel de chlorure d'ytterbium

YbCl₃·6H₂O : sel de chlorure d'ytterbium (III) hexahydraté

Z

Z : numéro atomique

ZF4 : lignée cellulaire fibroblastique de *Danio rerio*

ZFL : lignée cellulaire hépatique de *Danio rerio*

Introduction

Les Lanthanides sont une famille de 15 éléments allant du lanthane ($Z = 57$) au lutétium ($Z = 71$) (Holden et Coplen, 2004). Ces éléments présentent des propriétés physiques et chimiques très proches (Yoshida et al., 1997). Ils sont largement utilisés dans les technologies modernes liées à l'industrie (He et al., 2009 ; Çelik et al., 2015), la médecine (Cabella et al., 2006), ou encore l'agriculture (Pang et al., 2002 ; Li et al., 2010). Au cours des dernières décennies, l'utilisation croissante des Lanthanides a contribué à d'importants rejets de ces composés vers les écosystèmes aquatiques (Weltje et al., 2002). Il est généralement accepté que les eaux de surface sont une voie importante de transport des Lanthanides et de distribution de ces métaux vers les autres compartiments de l'écosystème et ainsi que vers les organismes qui y vivent (Verplanck et al., 2010 ; Kulaksiz et Bau, 2011). En raison de ces contaminations anthropiques, des concentrations anormalement élevées allant du ng au μg de Lanthanide par litre ont été détectées à l'échelle mondiale dans les écosystèmes aquatiques (Bau et Dulski, 1996 ; Kulaksiz et Bau, 2013 ; Klaver et al., 2014 ; Hatje et al., 2016 ; Perrat et al., 2017 ; Schmidt et al., 2019 ; Itoh et al., 2021). Jusqu'à présent, seuls les Pays-Bas ont établi des seuils réglementaires pour le rejet de quelques Lanthanides (yttrium, lanthane, cérium, praséodyme, néodyme, samarium, gadolinium, et dysprosium). Par exemple, dans les eaux de surface en milieu continental, les concentrations maximales admissibles sont comprises entre 1,8 $\mu\text{g/L}$ pour le Nd et 22,1 $\mu\text{g/L}$ pour le Ce, tandis qu'en milieu marin elles sont comprises entre 0,28 $\mu\text{g/L}$ pour le Ce et 3,8 $\mu\text{g/L}$ pour le Dy (Sneller et al., 2000).

Eclipsé par des considérations géopolitiques et économiques associées à l'exploitation et à l'utilisation des Lanthanides, le questionnement de l'impact toxique de ces métaux sur les organismes aquatiques n'a réellement été pris en compte que récemment (Gałuszka et Migaszewski, 2014 ; McLellan et al., 2014). Actuellement, la littérature relatant de la toxicité des Lanthanides est principalement ciblée sur les Lanthanides Légers, et les études traitant des Lanthanides en mélanges sont peu nombreuses (Gonzalez et al., 2014 ; Herrmann et al., 2016 ; Romero-Freire et al., 2019 ; Hanana et al., 2021). Bien que des effets indésirables des Lanthanides aient été mis en évidence, il n'existe aucun consensus concernant leur toxicité individuelle, leur toxicité en mélange, et leurs mécanismes d'action moléculaire.

Dans ce contexte, le programme « Ecotoxicology of Rare Earth Elements in Aquatic Systems (ECOTREE) », soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en France et par le Fonds National de la Recherche au Luxembourg vise à comprendre l'écotoxicité des Lanthanides en étudiant : 1) la dynamique des Lanthanides dans les écosystèmes d'eau douce,

2) le lien entre la spéciation et la biodisponibilité des Lanthanides, leur bioaccumulation et leur toxicité sur les organismes aquatiques, 3) les effets toxiques à des niveaux inférieurs d'organisation biologique (i.e., cellulaire et moléculaire) et s'ils sont pertinents pour évaluer le risque des Lanthanides, et 4) le cycle de vie de ces éléments *via* une approche AOP (Adverse Outcome Pathway) axée sur les effets indésirables mesurés. Dans le cadre du projet ANR ECOTREE, les travaux de cette thèse avaient comme objectifs d'apporter des nouvelles connaissances concernant la toxicité *in vitro* des Lanthanides et leurs mécanismes d'action.

La première partie de ce travail a consisté à évaluer la toxicité cellulaire des Lanthanides. Pour cette recherche, l'évaluation de la toxicité des Lanthanides a été réalisée en utilisant trois lignées cellulaires de poissons, i.e., la lignée cellulaire fibroblastique de poisson zèbre *Danio rerio* ZF4 (ATCC[®], CRL-2050[™]), la lignée cellulaire hépatique de poisson zèbre *Danio rerio* ZFL (ATCC[®], CRL-2643[™]), et la lignée cellulaire branchiale RTgill-W1 (ATCC[®], CRL-2523[™]) issue de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Tout d'abord, les effets toxiques individuels des 14 Lanthanides ont été déterminés sur les cellules ZF4. Ensuite, 3 éléments communs à l'ensemble du projet ANR ECOTREE, i.e., le néodyme (Nd³⁺), le gadolinium (Gd³⁺), et l'ytterbium (Yb³⁺) ont été testés individuellement et en mélanges sur les trois lignées cellulaires. Ces 3 Lanthanides ont été retenus parce qu'ils présentent des concentrations anormalement élevées dans les milieux aquatiques. L'intérêt porté à ces éléments s'inscrit également dans une démarche d'étude de l'écotoxicité des Lanthanides en sélectionnant un Lanthanide Léger (néodyme), Intermédiaire (gadolinium), et Lourd (ytterbium).

La seconde partie de ce travail visait à identifier les mécanismes de détoxification cellulaire des Lanthanides. Pour cela, les rôles des glutathion-S-transférases (GST) et des protéines membranaires de type multidrug resistance protein (MRP-like) ont été étudiés sur la lignée cellulaire fibroblastique ZF4 de poisson zèbre *Danio rerio*. Intervenant respectivement en phase II et III du cycle de détoxification cellulaire, ces acteurs de la détoxification cellulaire participent activement au transport d'une multitude de molécules endogènes et exogènes, mais aussi d'ions métalliques à travers la membrane cellulaire (Cole et al., 1992 ; Jedlitschky et al., 1994 ; Keppler, 2011 ; Whitlock et Leslie, 2020). Notre recherche s'est articulée autour d'une approche utilisant des inhibiteurs spécifiques, i.e., l'acide éthacrynique pour les GST et le MK571 et le probénécide pour les protéines MRP-like. Les effets toxiques individuels du Nd³⁺, du Gd³⁺, et de l'Yb³⁺ ont été déterminés sur les cellules ZF4 en présence ou non de ces inhibiteurs.

La dernière partie de ce travail était plus exploratoire et a porté sur le développement de cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Après avoir défini l'ensemble des paramètres permettant d'assurer une viabilité des cultures primaires pendant plusieurs jours, leur sensibilité a été évaluée à l'aide du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui a servi de témoin positif. Les effets toxiques des 14 Lanthanides ont ensuite été évalués sur les cultures primaires.

Dans ce manuscrit de thèse, nous commencerons par présenter les Lanthanides et leurs effets toxiques à travers une analyse bibliographique. Nous développerons dans la partie « Matériels et Méthodes » la description des modèles cellulaires utilisés, ainsi que les différentes expérimentations qui ont permis d'évaluer la toxicité des Lanthanides et d'identifier leurs mécanismes de détoxification cellulaire. Les résultats associés à ces expériences seront décrits, en analysant : (i) les effets toxiques individuels et en mélanges des Lanthanides sur les lignées cellulaires de poissons, (ii) l'impact d'inhibiteurs de protéines MRP-like et des GST sur des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides, et (iii) les résultats du développement des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* et de leur utilisation pour évaluer la toxicité des Lanthanides. L'ensemble des résultats obtenus fera l'objet d'une discussion en les confrontant aux données de la littérature, et nous conclurons en faisant un bilan du danger que représentent les Lanthanides pour les organismes aquatiques.

Synthèse bibliographique

Chap. I - Généralités sur les Lanthanides

1. Découverte et nomenclature des Lanthanides

Les Lanthanides ont été décrits pour la première fois en 1787 par le chimiste suédois Carl Axel Arrhenius, à partir d'un échantillon de roche noir extrait d'une carrière (Ytterby, Suède). Ce n'est que quelques années plus tard, en 1803, que le cérium fut le premier élément à être isolé et identifié, avant la découverte successive des autres éléments pendant la fin du XVIII^{ème} jusqu'au XX^{ème} siècle (Fernandez, 2017) (Figure 1).

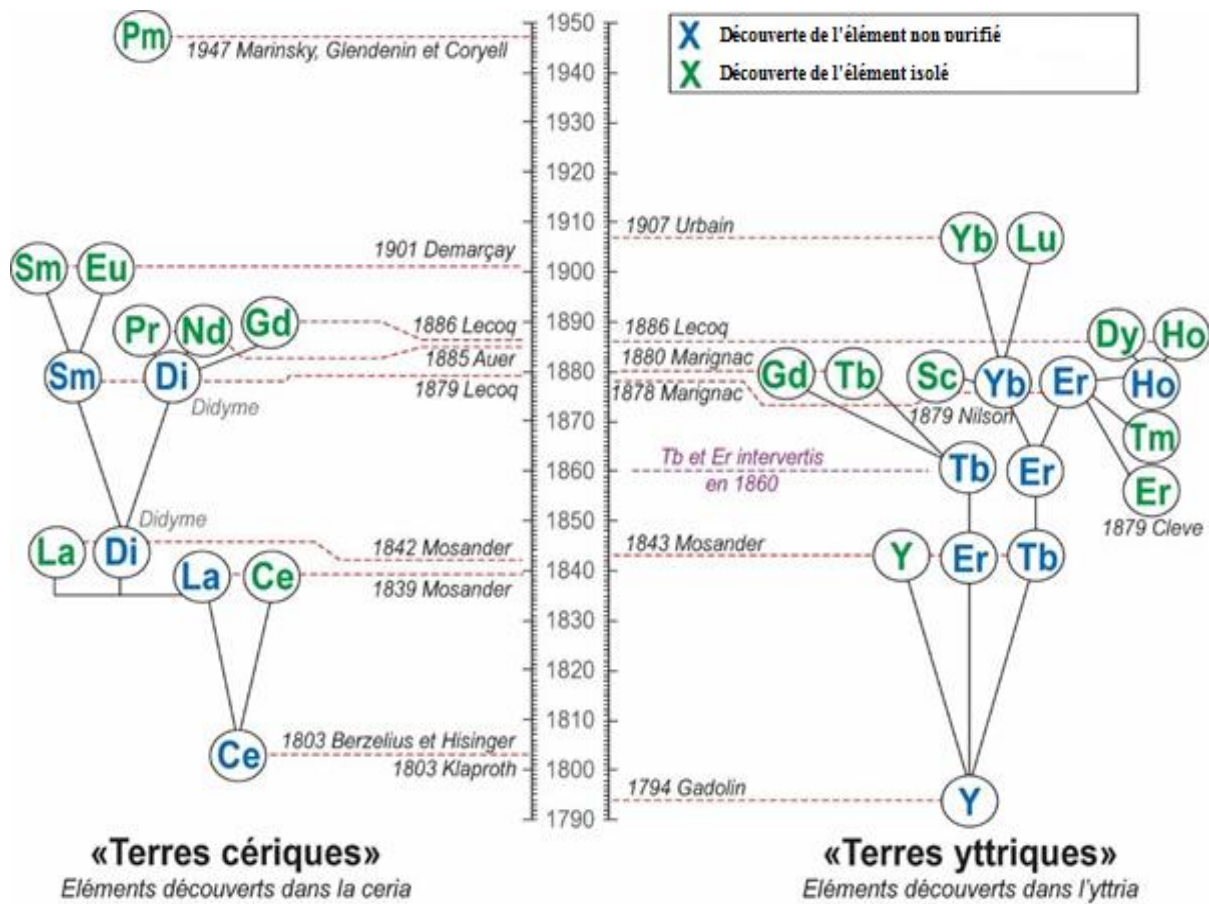


Figure 1. Échelle de temps relatant de la découverte des Lanthanides entre le XVIII^{ème} et le XX^{ème} siècle (Charles et al., 2021).

Des années plus tard, en 1930, ces éléments ont été regroupés sous l'appellation de Lanthanides. Cette famille est composée de 15 éléments métalliques allant du lanthane ($Z = 57$) au lutétium ($Z = 71$), et compose avec l'yttrium ($Z = 39$) et le scandium ($Z = 21$) le groupe des

Éléments Terres-Rares (Figure 2). Parmi eux, le prométhium est le seul élément radioactif, il n'est pas trouvé naturellement dans la croûte terrestre (Jaireth et al., 2014 ; Liang et al., 2014).

Figure 2: Classification périodique de Mendeleïev. Les éléments Terres-Rares (Scandium, Yttrium, Lanthanides) sont mis en évidence par une bordure rouge. Les autres éléments sont classés par couleur selon leur nature chimique.

Groupes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	H 1,008																		He 4,003
2	Li 6,941	Be 9,012												B 10,81	C 12,01	N 14,01	O 16	F 19	Ne 20,18
3	Na 22,99	Mg 24,31												Al 26,98	Si 28,09	P 30,97	S 32,07	Cl 35,45	Ar 39,95
4	K 39,10	Ca 40,08	Sc 44,96	Ti 47,88	V 50,94	Cr 52	Mn 54,94	Fe 55,85	Co 58,93	Ni 58,69	Cu 63,55	Zn 65,38		Ga 69,72	Ge 72,64	As 74,92	Se 78,96	Br 79,9	Kr 83,8
5	Rb 85,47	Sr 87,62	Y 88,91	Zr 91,22	Nb 92,91	Mo 95,94	Tc 99	Ru 101,1	Rh 102,9	Pd 106,4	Ag 107,9	Cd 112,4		In 114,8	Sn 118,7	Sb 121,8	Te 127,6	I 126,9	Xe 131,3
6	Cs 132,9	Ba 137,3	La 138,9	Hf 178,5	Ta 180,9	W 183,8	Re 186,2	Os 190,2	Ir 192,2	Pt 195,1	Au 197	Hg 200,6		Tl 204,4	Pb 207,2	Bi 209	Po 209	At 210	Rn 222
7	Fr 223	Ra 226	Ac	Rf 261	Db 262	Sg 266	Bh 268	Hs 277	Mt 288	Ds 289	Rg 290	Uub 286	Uut 288	Uuq 289	Uup 288	Uuh 288	Uus 286	Uuo 284	
6				Ce 140,1	Pr 140,9	Nd 144,2	Pm (147)	Sm 150,4	Eu 152	Gd 157,3	Tb 158,9	Dy 162,5	Ho 164,9	Er 167,3	Tm 168,9	Yb 173	Lu 175		
7				Th 232	Pa (231)	U (238)	Np (237)	Pu (244)	Am (243)	Cm (247)	Bk (247)	Cf (251)	Es (252)	Fm (257)	Md (258)	No (259)	Lr (260)		

Figure 2. Classification périodique de Mendeleïev présentant les Éléments Terres-Rares qui regroupent les Lanthanides, l'yttrium, et le scandium.

(Site internet : <http://www.rareelementresources.com/rare-earth-elements#.X-H8a1VKiUk>)

2. Abondance, gisement, et répartition des Lanthanides

D'un point de vue géologique, les Lanthanides sont abondamment présents dans la croûte terrestre, bien qu'ils soient dispersés à sa surface (Kim et al., 2018). Leur abondance naturelle est au moins équivalente à celles du cuivre (55 ppm) ou du zinc (70 ppm), et bien moins rare que d'autres métaux comme l'argent (0,075 ppm) ou l'or (0,004 ppm) (Keith et al., 2010 ; Haque et al., 2014 ; Van Gosen et al., 2014). D'après la littérature, il est montré que les données d'abondance des Lanthanides varient en fonction des gisements recensés par les exploitants. Au regard des données, il est à souligner que le lanthane, le cérium, et le néodyme sont les Lanthanides les plus abondamment présents dans la croûte terrestre.

Tableau 1. Abondance naturelle des Lanthanides dans la croûte terrestre d'après Bonnet (2006), Keith et al. (2010), et Haque et al. (2014). Les données d'abondance sont exprimées en partie par million (ppm). ND : données non disponibles.

Lanthanide	Bonnet, 2006	Keith et al., 2010	Haque et al., 2014
Lanthane	18,0 ppm	19,3 ppm	32 ppm
Cérium	46,0 ppm	39,2 ppm	68 ppm
Praséodyme	6,0 ppm	3,8 ppm	9,5 ppm
Néodyme	24,0 ppm	15,5 ppm	38 ppm
Prométhium	0,0 ppm	ND	ND
Samarium	6,5 ppm	2,8 ppm	7,9 ppm
Europium	1,0 ppm	0,6 ppm	2,1 ppm
Gadolinium	6,5 ppm	1,7 ppm	7,7 ppm
Terbium	1,0 ppm	0,3 ppm	1,1 ppm
Dysprosium	4,5 ppm	1,7 ppm	6 ppm
Holmium	1,0 ppm	0,4 ppm	1,4 ppm
Erbium	2,5 ppm	1,3 ppm	3,8 ppm
Thulium	0,1 ppm	0,2 ppm	0,48 ppm
Ytterbium	2,5 ppm	0,9 ppm	3,3 ppm
Lutétiem	0,9 ppm	12,3 ppm	ND

Dans la croûte terrestre, les Lanthanides sont retrouvés dans les cristaux de minéraux des roches géologiques constituant les gisements primaires et secondaires (Zhou et al., 2017 ; Balaram, 2019 ; Bhushan et Somani, 2019). Les gisements primaires sont formés lors des processus magmatiques et hydrothermaux. Ils sont composés de carbonatites (Streckeisen, 1980 ; Van Wambeke, 1995 ; Castor, 2008), de complexes alcalins (Richardson et Birkett, 1996 ; Orris et Gauch, 2002), de veines métasomatiques (Jackson et Christiansen, 1993 ; Zharikov et al., 2008), ou de complexes d'oxydes de fer-cuivre-or (IOCG) (Williams et al., 2005). Les gisements secondaires (placers) sont formés lors des processus d'alluvionnement ou par l'érosion naturelle de la roche (Sengupta et Van Gosen, 2016). Bien que plus de 250 minéraux soient recensés dans ces gisements, la bastnäsite, la monazite, et le xénotime sont les minéraux les plus exploités (Balaram, 2019). Ils présentent une meilleure facilité de dissociation et un fort intérêt commercial lié à leur taux élevé d'enrichissement en Lanthanides (Castor et Hedrick, 2006 ; Clamadieu et Butstraen, 2010 ; Chakhmouradia et Wall, 2012 ;

Dushyantha et al., 2020). La bastnäsite est un fluorocarbonate $[(Ce, La) (CO_3) F]$ qui est composé de 70 à 74 % d'oxydes de lanthane et de cérium (Keith et al., 2010). La monazite est un orthophosphate $[(Ce, La, Nd, Th) (PO_4)]$ composé de 35 à 71 % d'oxydes de lanthane, de cérium, de néodyme, et de thorium (Keith et al., 2010). Le xénotime est un autre orthophosphate $[YPO_4]$ qui est constitué de 52 à 67 % d'oxyde d'yttrium (Keith et al., 2010). Depuis les années 1970, les argiles ioniques appelées également argiles latéritiques d'adsorption ionique constituent une autre source importante de Lanthanides (Bao et Zhao, 2008). Extraits principalement des mines chinoises et américaines, les 3 minéraux et les argiles représentent près de 95 % des ressources en Lanthanides (Gupta et Krishnamurthy, 2005 ; Peiró et Méndez, 2013 ; Voßenkaul et al., 2013 ; Weng et al., 2013 ; Jia et Liu, 2020). En 2010, l'United States Geological Survey (USGS) a estimé la réserve mondiale des gisements de Lanthanides à près de 110 millions de tonnes. Celle-ci a augmenté pour atteindre 140 millions de tonnes en 2015, puis 160 millions de tonnes en 2019. L'augmentation des réserves est liée à la découverte successive de nouveaux gisements dans les fonds marins au Sud du Japon, en Afrique du Sud, en Namibie, au Kenya, en Tanzanie, au Malawi, au Kazakhstan, et au Sud du Groenland (Bortolini, 2019 ; Tuduri et al., 2020). Parmi ces gisements, la Chine a découvert en 2013 au large de l'île de Minamitori le plus grand gisement de Lanthanides connu à ce jour (2 500 km², 16 millions de tonnes). D'après les géologues japonais, ce gisement pourrait répondre à la demande mondiale en Lanthanides pendant au moins 400 à 800 ans (Iijima et al., 2016 ; Takaya et al., 2018 ; Tanaka et al., 2020). Actuellement, près de la moitié des réserves mondiales est détenue exclusivement par la Chine (Roskill et al., 2015) (Figure 3).

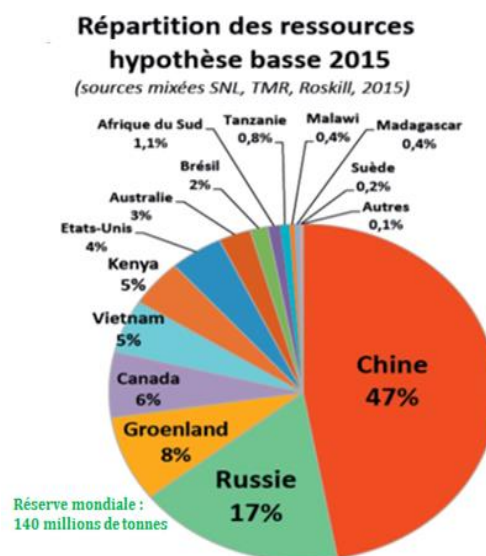


Figure 3. Répartition des ressources en Lanthanides entre les différents pays du monde (Roskill et al., 2015).

3. Production des Lanthanides

3.1. Extraction et enrichissement des Lanthanides

En fonction de la typologie des gisements, deux méthodes sont employées pour extraire les minéraux (Khan et al., 2017). La première méthode, le minage à ciel ouvert ou souterrain consiste à dynamiter la roche pour extraire la bastnäsite (Jackson et Christiansen, 1993). La deuxième méthode, le minage *in situ* est assuré par des procédés de lixiviation pour des gisements sédimentaires non consolidés (i.e., des placers constitués de sables et de boues) contenant de la monazite, du xénotime, et des argiles ioniques (Kanazawa et Kamitani, 2006). Après un broyage des minéraux, une poudre sableuse est obtenue, réduisant ainsi les associations minérales (étape 1, Figure 4). La poudre est raffinée par « cracking » pour obtenir une fraction enrichie de Lanthanides et une fraction résiduelle. Ces fractions sont ensuite séparées par différentes méthodes physiques employant la gravité, le magnétisme, l'électrostatique, ou la flottation (Chi et al., 2001 ; Jordens et al., 2013) (étape 2, Figure 4). Dans la fraction enrichie, les Lanthanides sont séparés des autres éléments par différentes méthodes de lixiviation à l'aide d'un acide fort sulfurique, chlorhydrique, ou nitrique pour la bastnäsite et le xénotime, et par un agent alcalin, l'hydroxyde de sodium (NaOH), pour la monazite (étape 3, Figure 4).

3.2. Individualisation et raffinage des Lanthanides

Les Lanthanides concentrés sont ensuite individualisés (étape 4, Figure 4). La cristallisation (Gupta et Krishnamurty, 2005), l'échange d'ions (Jamrack, 1963 ; Xie et al., 2014), et l'extraction à l'aide de solvant (Gupta et Krishnamurty, 2005 ; Peiravi et al., 2017) sont les méthodes de séparation les plus fréquemment employées. Après l'individualisation, les Lanthanides sont filtrés et passés dans un four pour obtenir des poudres raffinées (étape 5, Figure 4). Dans une dernière étape, les poudres sont purifiées par une électrolyse de sel fondu ou par une fusion sous vide à 1 500 °C (Xiaowei et al., 2016) (étape 6, Figure 4).

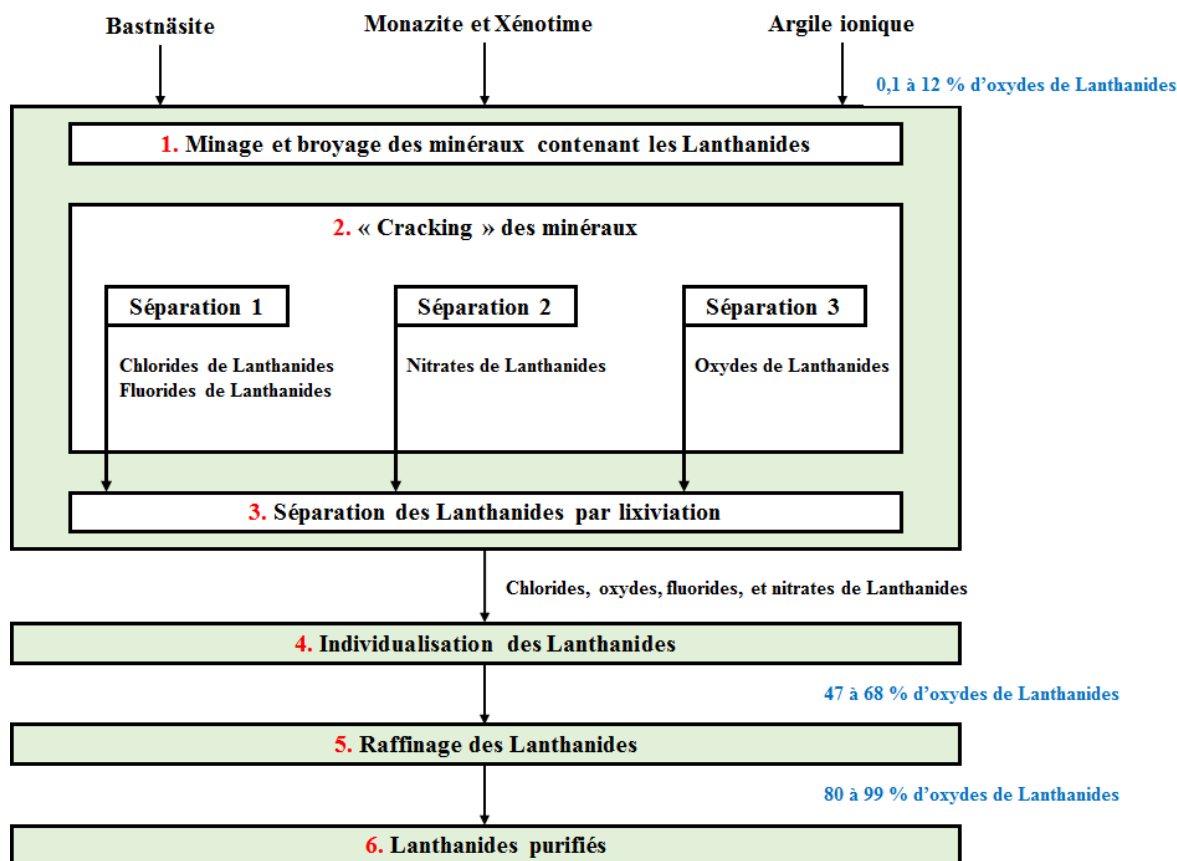


Figure 4. Organigramme simplifié des étapes nécessaires à la purification des Lanthanides (Peiró et Méndez, 2013).

4. Chimie des Lanthanides

Les Lanthanides possèdent une structure électronique de type $[Xe]5d^n6s^n4f^{n^*}$ avec n^* électrons, allant de 0 pour le lanthane à 14 pour le lutétium, remplissant la couche 4f. Le remplissage de cette couche s'accompagne d'une diminution faible mais progressive du rayonnement atomique, octroyant ainsi aux Lanthanides des propriétés chimiques proches (Cotton, 2006 ; Clamadieu et Butstraen, 2010). Dans des conditions naturelles, la chimie des Lanthanides est caractérisée par une dominance stable du degré d'oxydation +III (forme ionique trivalente libre). Pour des conditions physico-chimiques non-naturelles, ils peuvent présenter des états d'oxydo-réductions différents, en gagnant un proton (forme tétrade, +IV ; La, Ce, Pr, Tb, et Dy) ou en libérant un proton (forme divalente, +II ; Pr, Sm, Eu, Tm, et Yb) (Leybourne et al., 2000). Ces conditions sont influencées par la température (Morris et Haskin, 1974), la pression exercée par un liquide (Ryerson et Hess, 1980), et la pression partielle en dioxygène (PO_2) (Philpotts, 1970). Basé sur la configuration électronique et la masse atomique, les

Lanthanides sont classés communément en deux groupes opposant les Lanthanides Légers (La - Eu) et Lourds (Gd - Lu). Un troisième groupe peut être recensé, les Lanthanides Intermédiaires (Sm - Tb), réduisant les ensembles des Lanthanides Légers (La - Nd) et Lourds (Dy - Lu) (Chakhmouradian et Wall, 2012 ; Weng et al., 2013) (Figure 5).

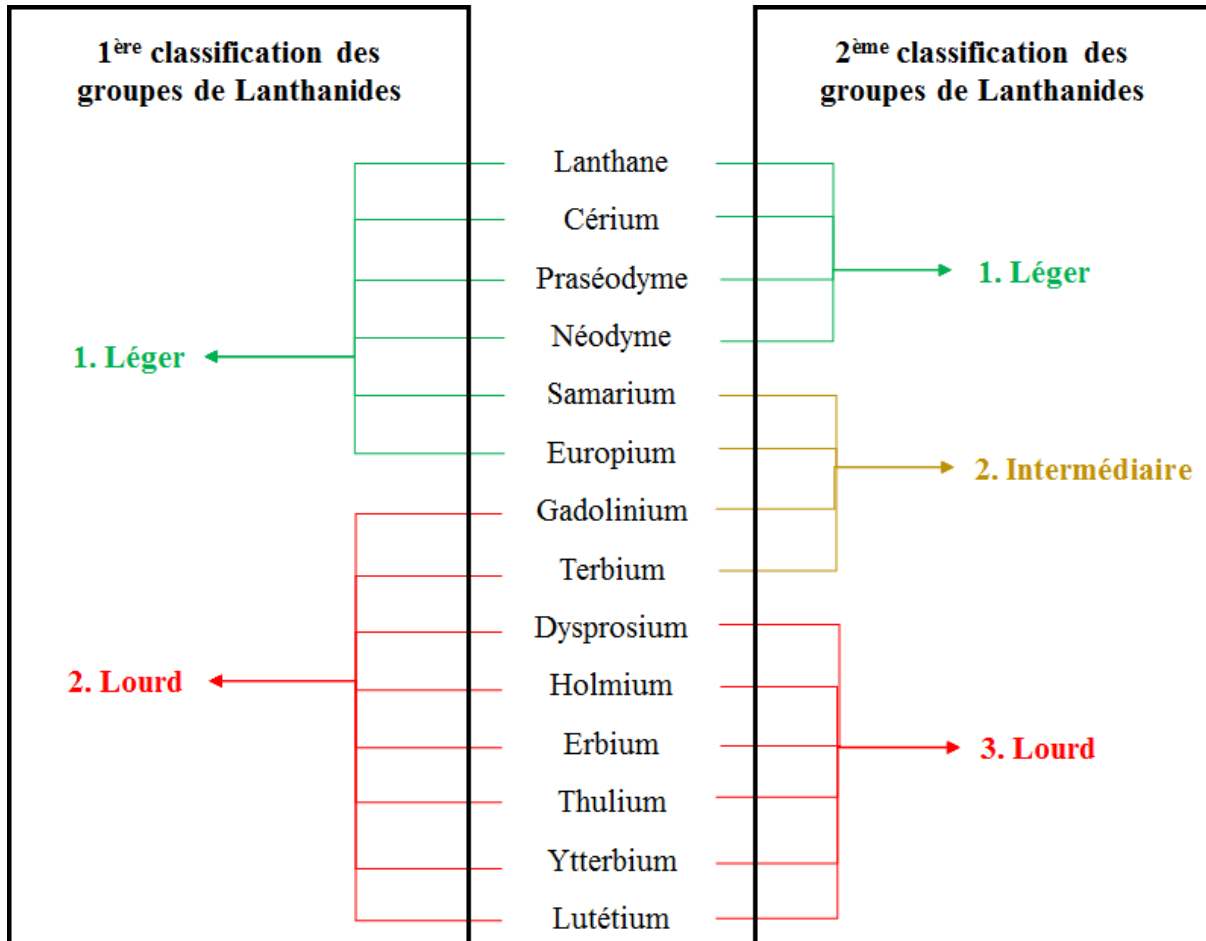


Figure 5. Classification des Lanthanides d'après la littérature (Chakhmouradian et Wall, 2012 ; Weng et al., 2013).

5. Utilisation des Lanthanides

Les Lanthanides sont des métaux présentant des propriétés magnétiques, électroniques, optiques, et catalytiques (Golev et al., 2014). En raison de ces propriétés, ils sont utilisés dans différents secteurs comme la défense et l'aéronautique, l'agriculture, les énergies renouvelables, l'industrie automobile, le domaine médical, l'électronique, et les hautes-technologies (Balaram, 2019). Près de 60 % de la production annuelle en Lanthanides est employée pour concevoir des aimants (18 %), des catalyseurs (10,8 %), des luminophores (1,8

%), des alliages métalliques (10,8 %), dans le polissage et le verre (12 %), dans la céramique (3 %), et la défense (3,6 %) (Figure 6). La part annuelle restante (40 %) est consacrée à la recherche et au développement des nouvelles applications (Kingsnorth, 2018 ; Mancheri et al., 2019).

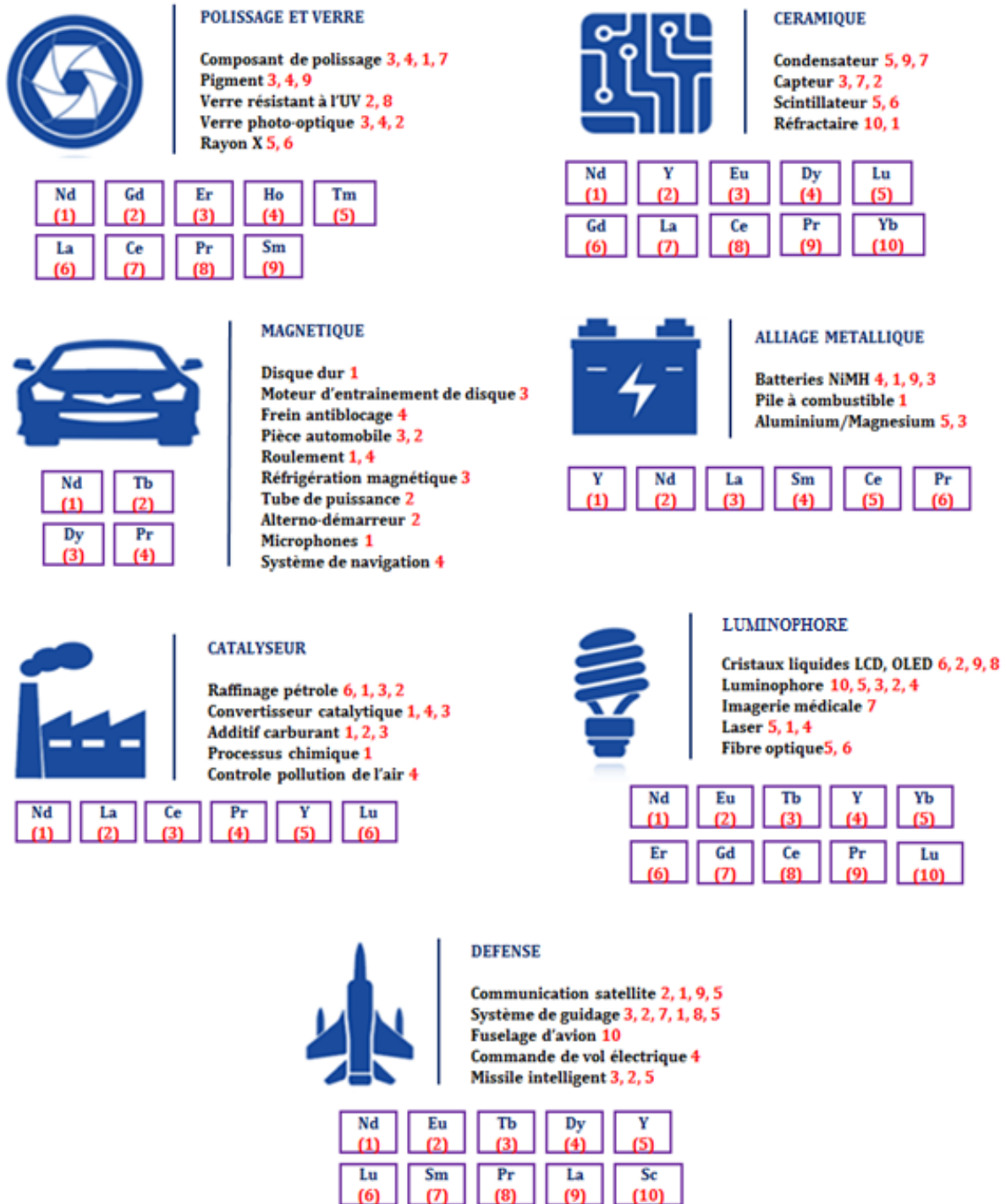


Figure 6. Utilisation et fonction des Lanthanides dans les différents secteurs industriels. Adapté de Haque et al. (2014) et du National Energy Technology Laboratory (2017).

6. Évolution de la demande mondiale en Lanthanides

Depuis les années 1960, la demande mondiale en Lanthanides a connu une croissance exponentielle. En 1960, la production était de 20 000 tonnes, puis elle a évolué pour atteindre 66 000 tonnes en 1997, 125 000 tonnes en 2008, et 170 000 tonnes en 2020 (Zhou et al., 2017 ; Goodenough et al., 2018 ; Dushyantha et al., 2020). Cette croissance est liée à la prise de pouvoir de la Chine sur le marché des Lanthanides. Actuellement, elle détient 47 % des réserves mondiales et assure 90 % de la production totale (Mancheri et al., 2019). Cette emprise chinoise est parfaitement illustrée par la « crise des Lanthanides » qui a eu lieu entre 2010 et 2013 (Figure 7). En 2010, la Chine a contribué à la flambée mondiale du prix des Lanthanides en réduisant ses exportations à 30 000 tonnes par an (Hurst, 2010). Cependant, les compagnies privatives chinoises voyant une opportunité économique intéressante ont continué à produire et à exporter illégalement des Lanthanides (Nd, Ce, Eu, Tb, et Dy). Cette production a été effectuée au détriment de la santé humaine, de l'impact environnemental, et des restrictions gouvernementales pour pallier la demande mondiale (Nguyen et Imholte, 2016). Plus tard en 2013, la Chine a favorisé la baisse du prix des Lanthanides sur le marché en supprimant ses quotas d'exportation. Cette action a provoqué une hausse de la demande mondiale en Lanthanides par les pays acheteurs, laquelle a été assurée par les réserves légales et illégales chinoises (Chen et al., 2018 ; Mancheri et al., 2019). Bien que les hautes instances gouvernementales de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) aient imposé de nouvelles restrictions vis-à-vis de la production et de l'exportation des Lanthanides, Wang et al. (2020) ont prédit d'ici 2118 une production chinoise record, atteignant au moins 400 000 tonnes.

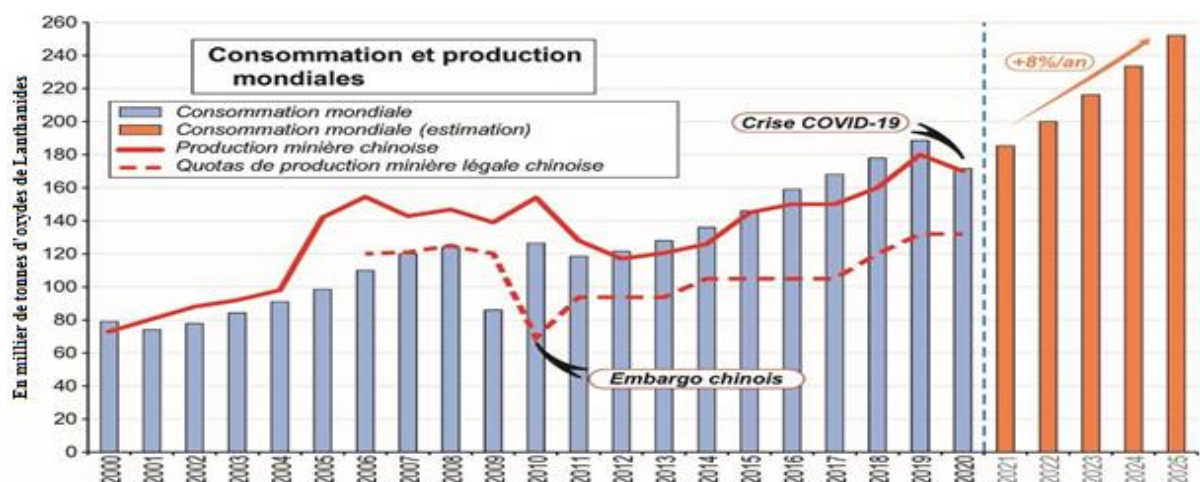


Figure 7. Évolution de la production mondiale des oxydes de Lanthanides (Charles et al., 2021).

7. Recyclage des Lanthanides

Pour éviter une explosion des coûts de production liée à la demande croissante en Lanthanides, le recyclage de ces éléments est depuis peu une activité en pleine expansion pour le maintien de la balance économique (Binnemans et Jones, 2015). Les Lanthanides peuvent être recyclés selon trois méthodes : (i) le recyclage direct des résidus de fabrication, (ii) l'extraction urbaine des produits en fin de vie, et (iii) le recyclage des déchets industriels et liquides (Li et al., 2017). Au moyen de ces procédés, les Lanthanides sont recyclés principalement à partir des aimants magnétiques, des batteries électriques et hybrides rechargeables, des lampes fluorescentes, et des catalyseurs. Cependant, le recyclage des Lanthanides dans ces produits en fin de vie reste faible et ne représente que moins de 1 %, en raison de leur complexité à être séparés individuellement (Brunner, 2011 ; Meyer et Bras, 2011 ; Schürler et al., 2011 ; Anderson et al., 2012 ; Tanaka et al., 2013 ; Li et Yang, 2016 ; Jowitt et al., 2018 ; Omodara et al., 2019 ; Bailey et al., 2020) (Tableau 2).

Tableau 2. Présentation des différentes méthodes de recyclage des Lanthanides.

Source	Lanthanide	Méthode de recyclage	Référence
Procédés industriels et résidus	La et Ce	Hydrométallurgie (lixiviation, extraction au solvant, précipitation sélective) ; lixiviation microbienne (biolixiviation)	Reed et al., 2016 Wang et al., 2017
Autres procédés industriels et résidus	Matériel source	Pyrométallurgie (grillage, calcination) ; hydrométallurgie (lixiviation, extraction au solvant, précipitation sélective) ; séparation physique et lixiviation microbienne (biolixiviation)	Wilfong et al., 2017 López et al., 2018
Produits en fin de vie	La, Ce, Tb et Y	Pyrométallurgie (grillage, calcination) ; hydrométallurgie (lixiviation, extraction au solvant, précipitation sélective) ; extraction en phase gazeuse	Binnemans et al., 2013 Wu et al., 2014 Van Loy et al., 2017
Magnétique	Nd, Dy	Hydrométallurgie (lixiviation, extraction au solvant, précipitation sélective)	Binnemans et al., 2013 Bogart et al., 2015, 2016
Batterie	La, Ce, Pr et Nd	Voies de récupération hydrométallurgique et pyrométallurgique	Binnemans et al., 2013 Rombach et al., 2014 Sommer et al., 2015

Actuellement, des programmes internationaux comme le COST (European Cooperation in Science and Technology, action ES1407) ou le Recup'TR (Institut Néel, CNRS, Institut Carnot Énergies du Futur) proposent des idées novatrices pour le recyclage des Lanthanides (Girtan et al., 2021). Les coûts engendrés par les procédés de recyclage restent conséquents, consomment une quantité importante d'énergie et de substances chimiques (acide hydrochlorique, nitrique, ou sulfurique), et produisent des sous-produits toxiques (gaz chloré, chlorure d'aluminium) (Binnemans et al., 2013 ; Cao et al., 2021). D'autres alternatives plus respectueuses de l'environnement, moins coûteuses en énergie, et permettant un meilleur taux de récupération des Lanthanides dans les produits en fin de vie sont en cours de développement (Zhuang et al., 2015). Bogart et al. (2015, 2016) ont développé un composé organique qui forme des agrégats dimériques en se liant aux Lanthanides Légers, et des composés non-agglutinants en présence des Lanthanides Lourds. L'utilisation d'un tel composé organique faciliterait, par conséquent, la séparation des Lanthanides par un processus de filtration. Pour le recyclage des Lanthanides, il est également possible d'utiliser des processus biologiques de lixiviation (Brierley et Brierley, 2013). En produisant des acides organiques (par exemple l'acide gluconique), des microorganismes tels que des espèces bactériennes ou fongiques aideraient ainsi à dégrader ces métaux. À titre informatif, Reed et al. (2016) ont reporté un taux de récupération de 49 % de la quantité totale de Lanthanides dans les catalyseurs de craquage catalytique liquide, et de 2 % dans les lampes fluorescentes au moyen de la bactérie *Gluconobacter oxydans*.

En conclusion de ce chapitre, les Lanthanides sont une famille de 15 éléments métalliques allant du lanthane au lutétium qui ont été découverts successivement entre la fin du XVIII^{ème} et la moitié du XX^{ème} siècle. Ils sont abondamment présents dans la croûte terrestre avec une réserve mondiale de gisements de Lanthanides estimée à 160 millions de tonnes en 2019. En raison de leurs propriétés magnétiques, électroniques, optiques, et catalytiques, les Lanthanides sont utilisés dans différents secteurs d'activités comme la défense et l'aéronautique, l'agriculture, les énergies renouvelables, l'industrie automobile, le domaine médical, l'électronique, et les hautes-technologies. Depuis 30 ans, la demande mondiale et l'utilisation de ces éléments se sont considérablement accrues avec une prise de pouvoir du marché économique par la Chine. Dans le cadre d'une stratégie de développement durable et pour limiter les coûts de production, le recyclage des Lanthanides est devenu actuellement une activité en plein développement.

Chap. II - Voies et processus de transfert des Lanthanides vers les écosystèmes aquatiques

En l'état actuel des connaissances, les Lanthanides ne sont pas considérés par les autorités sanitaires comme des éléments toxiques. Pour cette raison, aucun seuil réglementaire n'a été établi concernant le rejet de ces éléments dans les écosystèmes aquatiques, excepté aux Pays-Bas pour quelques-uns d'entre eux (yttrium, lanthane, cérium, praséodyme, néodyme, samarium, gadolinium, et dysprosium) (Sneller et al., 2000). Pour éviter des coûts supplémentaires liés aux traitements des déchets, ils sont ainsi à l'heure actuelle toujours déversés dans les eaux de surface (Weltje et al., 2002). Ces rejets contribuent à la présence de concentrations anormalement élevées de Lanthanides allant du ng au $\mu\text{g/L}$, lesquelles ont été détectées mondialement dans le compartiment aquatique (Bau et Dulski, 1996 ; Kulaksiz et Bau, 2013 ; Klaver et al., 2014 ; Liang et al., 2014 ; Hatje et al., 2016 ; Perrat et al., 2017 ; Schmidt et al., 2019 ; Itoh et al., 2021).

1. Sources de contamination des écosystèmes aquatiques par les Lanthanides

1.1. Activités minières

L'exploitation minière intensive au moyen de l'abattage, du forage, et du dynamitage a contribué à libérer dans l'atmosphère et dans les plans d'eau environnant de la poussière de Lanthanides (Barakos et al., 2015 ; Balaram, 2019). D'après Tang et al. (2016), l'extraction d'une tonne de Lanthanides en 2014 provenant des sites miniers de la ville de Ganzhou et de la province de Jiangxi (Sud de la Chine) a entraîné la destruction de 200 m² de végétation, 300 m² de décapage de sol, 2 000 m³ de résidus miniers, et 12 millions de m³ de sol érodé. Par conséquent, des concentrations de Lanthanides pouvant atteindre le mg/L ont été détectées dans les eaux de surface des rivières et des affluents à proximité des mines des villes de Bayan Obo (He et al., 2004), de Dingnan, de Ganzhou, et de la province de Jiangxi (Liu et al., 2018). Ces concentrations étaient 10 à 1 000 fois plus élevées par rapport aux concentrations géogéniques des Lanthanides variant de quelques ng/L à 1 $\mu\text{g/L}$ (Elderfield et al., 1990 ; Sultan et Shazili, 2009 ; Marsac et al., 2011 ; Schmidt et al., 2019), et aux concentrations de Lanthanides mesurées dans les eaux de surface (155 ng/L à 5 $\mu\text{g/L}$) au Nord de la Chine (Zhou et al., 2012 ; Liang et al., 2014), et dans les réservoirs de Liheng et de Bankeng (Liu et al., 2018), qui

n'étaient pas impactés par les activités minières. Pour les eaux souterraines, les concentrations totales de Lanthanides s'étendent de 30 ng/L depuis l'amont jusqu'à 13 µg/L en aval des sites miniers à proximité de la province de Jiangxi (Hao et al., 2016) et de la ville de Baotou en Chine (Tang et al., 2020).

1.2. Rejets hospitaliers

Les rejets hospitaliers sont une autre source importante de contamination des écosystèmes aquatiques par les Lanthanides, et quasi-exclusivement par le gadolinium. Leur implication a été mise en évidence pour la première fois par Bau et Dulski (1996), qui ont déterminé la part anthropique des éléments apportée dans le compartiment aquatique par les activités humaines. Pour cela, ils ont échantillonné différentes zones de quelques rivières et affluents en Allemagne, en Suède, au Japon, les eaux souterraines de Berlin-Steglitz, les eaux marines de Koljöfjord, et les eaux usagées des effluents de Ruhleben. L'analyse par spectrophotométrie de masse à plasma par couplage inductif (ICP-MS) a montré à plusieurs endroits (rivières de Wupper, Havel, Spree, Dhünn-LC, eaux souterraines de Berlin-Steglitz, effluents de Ruhleben) une présence anormalement élevée de gadolinium. L'origine de la contamination en gadolinium provenait des effluents urbains, et elle pouvait être directement reliée aux rejets urinaires des patients ayant subi un examen IRM avec injection d'agents de contraste gadolinés (Kümmerer et Helmers, 2002). Suivant les lieux échantillonnés, les concentrations de gadolinium mesurées s'étendent de 0,023 ng/L à 3,31 µg/L dans les lacs et les rivières (Tricca et al., 1999 ; Nozaki et al., 2000 ; Elbaz-Poulichet et al., 2002 ; Möller et al., 2002, 2003 ; Zhu et al., 2004, 2005 ; Knappe et al., 2005 ; Rabiet et al., 2005, 2009 ; Verplanck et al., 2005 ; Kulaksiz et Bau, 2011 ; Merschel et al., 2015 ; Perrat et al., 2017 ; Amorim et al., 2019), 0,19 ng/L à 228 ng/L dans les eaux côtières et les estuaires (Elbaz-Poulichet et al., 2002 ; Zhu et al., 2004, 2005 ; Lawrence, 2010), 37 ng/L à 130 µg/L dans les eaux souterraines (Möller et al., 2002, 2003 ; Knappe et al., 2005 ; Rabiet et al., 2009, Schmidt et al., 2019), et de 0,18 ng/L à 18 ng/L dans les eaux du robinet (Bau et Dulski, 1996 ; Kulasiz et Bau, 2007 ; Tepe et al., 2014). Cette présence accrue de gadolinium a été recensée majoritairement dans l'hémisphère Nord et depuis 7 ans dans l'hémisphère Sud, au Brésil dans le lac de Paranoá avec des concentrations anormales comprises entre 6,49 ng/L et 50,63 ng/L de l'amont vers l'aval des stations d'épuration des eaux usées (Merschel et Bau, 2015). Au regard de la littérature, la contamination du compartiment aquatique par les agents de contraste apparaît systématiquement à proximité des bassins de populations humaines denses (Klaver et al., 2014). Par ailleurs, on peut noter que le gadolinium

sous forme d'agent de contraste cyclique persiste longuement dans les écosystèmes aquatiques sous cette forme, puisque ce Lanthanide reste fixé sur son ligand d'origine (Bau et Dulski, 1996).

1.3. Rejets industriels

Démontrés pour la première fois par Kulaksiz et Bau (2011), les rejets industriels constituent la source majeure de contamination des écosystèmes aquatiques par les Lanthanides. De janvier à octobre 2009, ces auteurs ont échantillonné la rivière du Rhin à partir du Sud du lac de Constance (km 0) jusqu'à l'aval de Worms en Allemagne (km 449). L'analyse par ICP-MS a montré une concentration totale des Lanthanides dans la fraction dissoute allant de 27 ng/L en direction de Strasbourg (km 35) jusqu'à 396 ng/L vers le Mainz (km 449). Ces résultats ont souligné une présence anormale et élevée en lanthane qui contribuait jusqu'à 98 % de la concentration totale des Lanthanides mesurée sur le site de Worms (km 448). Après un nouvel échantillonnage dans un rayon de 4 km autour du site de Worms, l'origine de la contamination provenait des effluents d'une usine de craquage catalytique en lit fluidisé (FCC), avec une concentration maximale de lanthane de 49 mg/L dans l'effluent rejeté. Comparativement, en amont de cette usine de Worms, la concentration de lanthane mesurée dans le cours d'eau de Mannheim était de 1,91 ng/L. Deux ans plus tard, ces mêmes auteurs ont rapporté la première contamination des écosystèmes aquatiques par le samarium (Kulaksiz et Bau, 2013), avec une concentration anormalement élevée de cet élément (7,3 ng/L) en direction de Leverkusen, par rapport à sa concentration géogénique qui est de 1,1 ng/L. Les auteurs ont montré que la concentration en samarium augmentait jusqu'à atteindre un maximum de 13,1 µg/L à proximité des effluents d'une usine de Worms produisant des aimants. Hissler et al. (2015) ont mesuré des concentrations anormales de cérium dans les effluents urbains qui sont déversés dans le bassin Alzette. Ces enrichissements contribuaient à hauteur de 86 % de la concentration totale des Lanthanides mesurée dans les effluents industriels et de 43 % dans le bassin. Les auteurs ont identifié la source de contamination qui provenait d'une usine de fabrication d'aimants, utilisant les nanoparticules de cérium pour ses propriétés photocatalytiques (Xu et Qu, 2014). Entre la période 2011 à 2013, Hissler et al. (2016) ont effectué d'autres prélèvements à la source du bassin Alzette, au niveau de ses affluents, dans les effluents de STEP, et à la sortie du bassin inférieur en inondation hivernale (hauts et bas débits). Les auteurs ont montré un enrichissement léger en néodyme dans la fraction

particulaire. Cet enrichissement provenait des effluents du bassin qui recevaient les eaux usagées des activités sidérurgiques passées de la région.

2. Processus de transfert des Lanthanides : notion de biodisponibilité et de spéciation

Dans le cadre d'une évaluation du risque environnemental, la biodisponibilité et la spéciation sont des concepts importants pour comprendre le comportement et le devenir des composés (Fairbrother et al., 2007 ; Magalhães et al., 2015). La biodisponibilité est un phénomène dynamique qui inclue le transfert du polluant, et plus précisément son entrée et son absorption par un organisme. Celle-ci est déterminée par les propriétés physico-chimiques du polluant, la biologie / physiologie de l'organisme, et les facteurs environnementaux (Adriano, 2001). La spéciation, quant à elle, correspond à l'ensemble de toutes les formes physico-chimiques d'un élément, formant la concentration totale de l'élément dans un milieu donné. La formation de ces formes physico-chimiques est dépendante des caractéristiques des milieux (Florence et al., 1992). Depuis 30 ans, l'étude de la biodisponibilité et de la spéciation des Lanthanides a connu un intérêt grandissant. Compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques et de leur affinité pour des ligands, ils peuvent persister durablement ou être plus mobiles dans les écosystèmes aquatiques (Byrne et Li, 1995 ; Byrne et Sholkovitz, 1996 ; Luo et Byrne, 2004 ; Davranche et al., 2004, 2005, 2008, 2017 ; Aharchaou et al., 2020).

2.1. Processus de complexation et de précipitation des Lanthanides

Dans la fraction dissoute, les Lanthanides précipitent sous forme de carbonates et de phosphates (Khan et al., 2017 ; Gwenzi et al., 2018) (Figure 8). Néanmoins, ils peuvent aussi se complexer à des ligands inorganiques (fer, chlore, sulfate) ou organiques (monomère et polymère), ainsi qu'à des hydroxydes (Wood, 1990 ; Sneller et al., 2000 ; Ng et al., 2014). Dans la fraction particulaire, ils précipitent en présence des nitrates et des phosphates (Wells et Wells, 2001). Dans cette fraction, ils peuvent être assimilés par le biote selon deux voies possibles : sous la forme d'ion trivalent libre bien que la part biodisponible soit faible, et sous forme complexée à de la matière organique (plancton, débris des organismes) ou inorganique (argile) (Tan et al., 2017).

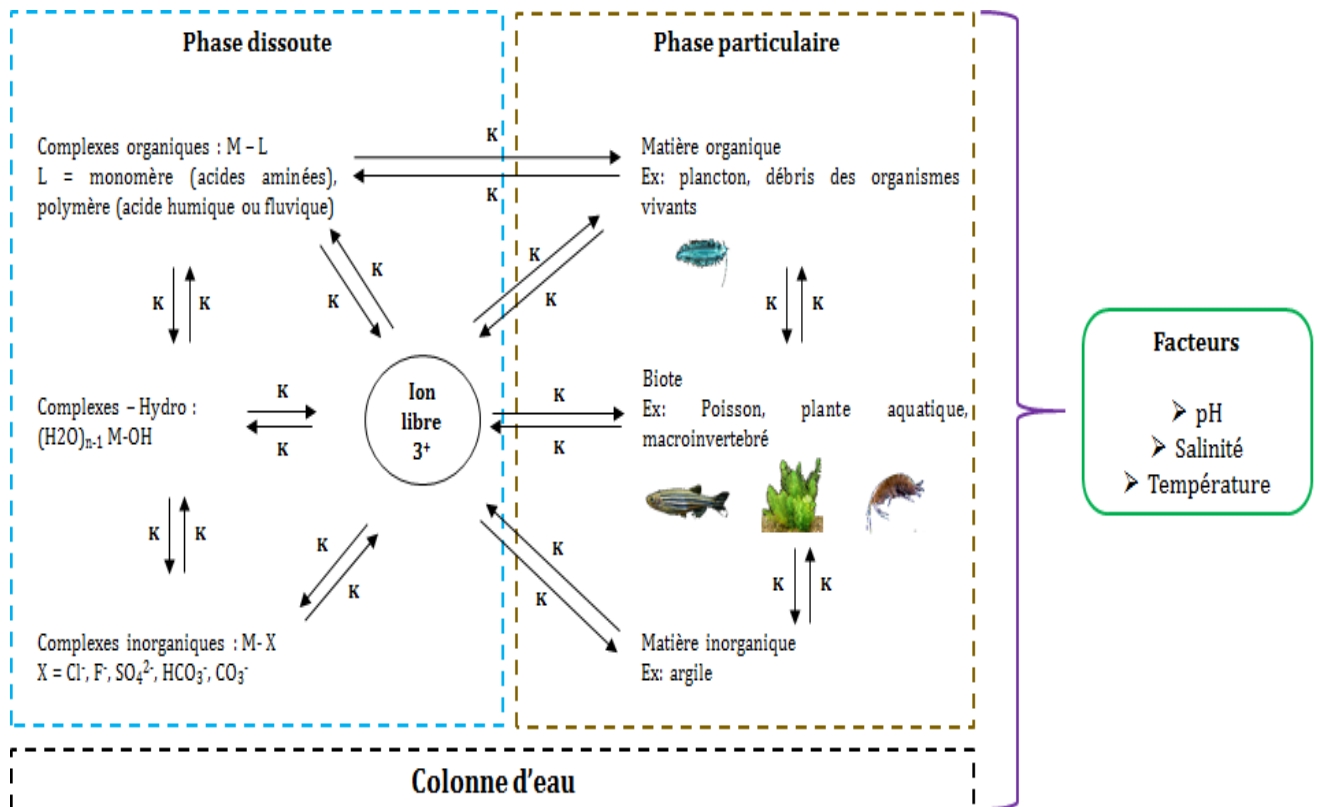


Figure 8. Conceptualisation des processus de précipitation et de complexation des Lanthanides à différents composés dans la fraction dissoute et particulaire (Adapté de Buffle et al., 1988 ; Urien, 2015).

2.2. Paramètres physico-chimiques environnementaux influençant le transfert des Lanthanides

Le transfert des Lanthanides peut dépendre des conditions physico-chimiques du milieu comme la salinité, le pH, la température, et les variations saisonnières impactant la montée ou la baisse du niveau des eaux (Liang et al., 2005 ; Ashraf et al., 2012). Khan et al. (2017) ont mentionné que la part biodisponible des Lanthanides pouvait varier de 10 à 30 % entre les eaux douces et marines. Des précipités de Lanthanides sous forme de carbonates sont produits en milieu salin, tandis que des complexes humiques sont créés en milieu saumâtre. Dans les eaux acides ($pH < 6$), les Lanthanides Légers sont préférentiellement enrichis en raison d'une forte affinité avec les substances humiques et les sulfates (Tang et Johannesson, 2003 ; Pourret et al., 2007). À l'inverse, les Lanthanides Lourds sont concentrés dans les eaux neutres ($6 \leq pH \leq 7$) et basiques ($pH > 7$), dont la biodisponibilité est contrôlée par les carbonates (Luo et Byrne, 2004). Peu de travaux ont relaté de l'importance de la température sur la biodisponibilité des Lanthanides. D'après la littérature, il est indiqué qu'en augmentant la température, la

mobilisation des éléments augmente avec le numéro atomique des Lanthanides (Choppin et Strazik, 1965 ; Walker et Choppin, 1967 ; Lee et Byrne, 1992). Hissler et al. (2015) ont mentionné un impact des périodes saisonnières sur la dynamique de transport des Lanthanides. Pour des hauts débits hivernaux, des enrichissements en lanthane, en gadolinium, et en cérium ont été trouvés dans la fraction dissoute (35 %) et particulaire (25 %) des eaux superficielles du bassin Alzette. Les enrichissements étaient importants au cours des douze premières heures durant les hauts débits hivernaux avant de diminuer les heures suivantes, en raison de la baisse du niveau des eaux. Un enrichissement de 5 % a été reporté pour les deux fractions lors des bas débits hivernaux.

En conclusion de ce chapitre, il s'avère que la contamination des écosystèmes aquatiques résulte des activités humaines et concerne essentiellement les Lanthanides Légers. Cela s'explique par une plus large utilisation de ces éléments dans les technologies modernes, et par un coût moindre d'exploitation et de production, contrairement aux Lanthanides Lourds. Comme nous l'avons rapporté, les Lanthanides Légers présentent des concentrations individuelles anormalement élevées de quelques ng/L à plusieurs centaines de µg/L, et peuvent atteindre le mg/L, en considérant la concentration totale de tous les éléments. La spéciation et la biodisponibilité des Lanthanides, ainsi que les paramètres physico-chimiques (température, pH, composition) du milieu environnant sont des éléments importants qui jouent un rôle prépondérant dans le transfert et la répartition des Lanthanides dans les écosystèmes aquatiques.

Chap. III - Transfert des Lanthanides vers les organismes aquatiques

1. Généralités sur le transfert des composés vers les organismes aquatiques

Les composés ioniques divalents et trivalents libres sont les formes les plus réactives et les plus facilement assimilables par les organismes vivants (Weltens et al., 2000 ; Bjerregaard, 2014). D'un point de vue biologique, l'assimilation de ces composés à travers les membranes des organismes est dépendante de plusieurs propriétés : le caractère hydrophobe, la présence de phospholipides, de protéines, et de divers transporteurs et / ou de canaux ioniques membranaires impliqués dans les échanges d'ions (Campbell et Couillard, 2004). Ces propriétés sont primordiales dans le processus de bioaccumulation des éléments métalliques qui s'effectuent en trois étapes (Figure 9).

(i) **Diffusion** des composés ioniques et des complexes depuis le milieu environnant vers la surface biologique. Cette étape est fonction de la concentration du composé dans l'environnement et de la chimie à l'état d'équilibre qui s'établit à l'interface entre l'organisme et le milieu extérieur.

(ii) **Adsorption** des composés aux sites membranaires de la surface biologique. L'adsorption repose sur une forte électropositivité des composés (noté M^{Z+}) qui vont se fixer sur différents constituants comme les groupements sulfhydryles, les ponts disulfures des protéines, ou sur des phospholipides. Ce processus rapide permet la formation de complexe de surface (noté M-X), selon l'équation de Campbell et al. (2002) :

$M^{Z+} + \text{X-cell} \leftrightarrow \text{M-X-cell}$ avec M^{Z+} : métal en solution ; et X-cell : ligand de la membrane cellulaire.

(iii) **Transport** des composés à travers la membrane biologique. L'internalisation peut être réalisée selon plusieurs mécanismes. Tout d'abord, elle peut se faire par simple diffusion à travers la membrane dans le cas des complexes métalliques neutre lipophiles (Puckett et al., 2010). Un autre mécanisme est la diffusion facilitée dans le sens du gradient de concentration par l'intermédiaire d'un transporteur, ou par un transport actif contre le gradient de

concentration sollicitant de l'énergie (ATP). Enfin, des mécanismes d'endocytose (i.e., invagination de la membrane créant une vacuole) peuvent être employés.

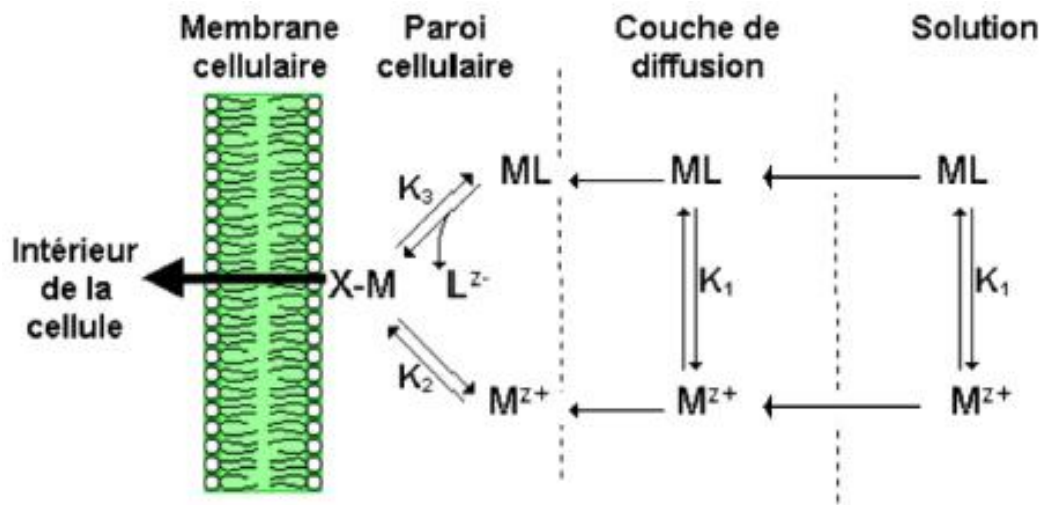


Figure 9. Conceptualisation des interactions entre les composés et les organismes montrant le processus de bioaccumulation (modifié de Campbell, 1995). M^{Z+} : ion métallique libre ; ML : complexe métallique en solution ; X-M : complexe métallique à la surface de la membrane cellulaire ; K_1 , K_2 , et K_3 : constante d'équilibre pour la formation d'espèces.

Généralement dans la fraction dissoute, la diffusion passive ou facilitée et le transport actif dominant les mécanismes d'internalisation, alors que pour la fraction particulaire, et plus précisément pour les composés présents / adsorbés sur les particules ou sous forme de particules, c'est l'endocytose qui prédomine (Campbell et al., 2004). Par définition, la bioaccumulation correspond au processus d'accumulation d'un contaminant par un organisme lorsque le contaminant est présent dans l'eau et dans l'alimentation. Il s'agit d'un phénomène dynamique qui tient compte à la fois de l'exposition, de la métabolisation, et de l'excrétion. Les voies d'exposition de ce mécanisme sont l'ingestion par la voie orale, la respiration, et par contact direct avec la peau. Pour illustrer ce processus, les résultats décrits dans ce chapitre présenteront les concentrations mesurées des Lanthanides dans les organismes aquatiques ainsi que les facteurs de bioaccumulation (noté BAF), qui désigne l'accumulation cumulée d'un polluant présent dans le milieu et dans l'alimentation.

2. Bioaccumulation des Lanthanides par les organismes aquatiques

Entre 1991 et 2021, peu de travaux ont traité de la bioaccumulation des Lanthanides, en tenant compte de leurs différentes formes physico-chimiques (ion trivalent libre et complexe, et nanoparticule). Blinova et al. (2020) ont reporté 51 publications traitant du sujet pour les principaux groupes taxonomiques : Microorganisme, Phytoplancton, Zooplancton, Macrophyte, Necton, et Benthique. D'après Web of Science, près de 90 % de ces études n'ont été publiées que depuis les 10 dernières années. Parmi les 51 études, 7 ont suivi les recommandations de REACH, en évaluant la bioaccumulation des Lanthanides à long terme par des organismes benthiques. Dans ces études, des bivalves (Bonnail et al., 2017 ; Hanana et al., 2018 ; Henriques et al., 2019 ; Pinto et al., 2019), des écrevisses (Van Oosterhout et al., 2014), des chironomidés (Waajen et al., 2017), et des plantes aquatiques enracinées (Waajen et al., 2017) ont été exposés aux ions libres ou à des complexes de Lanthanides. Pour la dernière étude, Zhao et al. (2017) ont relaté de la bioaccumulation des nanoparticules d'oxyde de cérium ($n\text{CeO}_2$) par des bivalves, des escargots, et des crevettes benthiques au sein d'un réseau trophique. Outre des études d'exposition, 11 autres études ont été réalisées dans le cadre de la surveillance des populations benthiques naturelles (Chassard-Bouchaud et al., 1992 ; Miskon et al., 2013 ; Merschel et Bau, 2015 ; Squadrone et al., 2016 ; Amyot et al., 2017 ; Bonnail et al., 2017 ; Bosco-Santos et al., 2017 ; MacMillan et al., 2017 ; Pratas et al., 2017 ; Zhao et Liu, 2018 ; Rodríguez-Hernández et al., 2019).

Il est à souligner que la majorité des recherches ont mis en évidence la bioaccumulation de Lanthanides Légers par les organismes aquatiques. En conditions contrôlées, Waajen et al. (2017) ont mesuré une concentration de lanthane 78 à 122 fois plus importante dans les tissus du macrophyte *Elodea nuttallii* après 1 an de culture en présence de sédiment Phoslock®. Xu et al. (2017) ont, quant à eux, observé que la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* bioaccumulaient le cérium dans ses tissus, après une exposition de 14 jours à une gamme de concentrations allant de 0 à 60 μM de sel de nitrate de cérium. Squadrone et al. (2016) ont mis en évidence que le lanthane et le cérium étaient aussi les Lanthanides les plus concentrés dans les tissus mous des moules (*Mytilus galloprovincialis* : 0,041 et 0,069 mg/kg de poids sec) et des huîtres (*Crassostrea gigas* : 0,012 et 0,021 mg/kg de poids sec), qui ont été prélevées *in situ* dans le Nord-Est de la mer Ligure.

La bioaccumulation d'un autre Lanthanide Léger, le gadolinium, a été également observée dans les tissus mous de *Corbicula fluminea* prélevée *in situ* dans la rivière du Rhin (Merschel et Bau, 2015), et de *Dreissena polymorpha* après une exposition de 28 jours à une

gamme de concentrations allant de 0 à 1 250 $\mu\text{g/L}$ de GdCl_3 (BAF = 43) (Hanana et al., 2017). D'après la littérature, Merschel et Bau (2015) se sont intéressés à la bioaccumulation du gadolinium sous forme d'agents de contraste gadolinés par les bivalves. Les résultats ont montré que les corbicules prélevées *in situ* dans les cours d'eau contaminés à proximité de la ville de Strasbourg ne bioaccumulaient pas de tels composés.

Parmi les 51 études de bioaccumulation des Lanthanides, quelques-unes d'entre elles ont mesuré et comparé les concentrations en Lanthanides Légers et Lourds dans les organismes aquatiques. Qiang et al. (1994) ont montré une bioaccumulation importante du lanthane, du gadolinium, et de l'yttrium dans les organes internes (23,6 à 38,9 $\mu\text{g/g}$ de poids frais) de la carpe commune (*Cyprinus carpio*), après 45 jours d'exposition à une concentration finale de 0,50 mg/L de sel de nitrate de Lanthanide. Compte tenu de ce résultat, les auteurs ont suggéré qu'il n'y avait pas de différence de bioaccumulation entre les Lanthanides. Cependant, cette hypothèse n'est pas soutenue par Mayfield et Fairbrother (2015). Dans cette étude, les concentrations des 14 Lanthanides, de l'yttrium, et du scandium ont été mesurées dans les tissus de plusieurs espèces de poissons benthiques et pélagiques de l'État de Washington (États-Unis). Les résultats ont montré une bioaccumulation allant de 0,014 à 3 $\mu\text{g/g}$ de poids sec dans les tissus des poissons, avec une contribution importante du scandium, du lanthane, du cérium, et du néodyme.

En conclusion de ce chapitre, une bioaccumulation des Lanthanides est observée pour les groupes taxonomiques représentatifs des différents maillons trophiques aquatiques. Les résultats ont montré que la bioaccumulation des Lanthanides dans les organismes aquatiques est dépendante de leurs formes physico-chimiques. Par exemple, le gadolinium sous forme d'agents de contraste gadolinés n'est pas bioaccumulé par les individus, comparativement à ce même Lanthanide sous forme d'ion trivalent libre. Bien que des études aient mesuré la bioaccumulation de plusieurs Lanthanides en utilisant différents organismes aquatiques, il est difficile de parvenir à un consensus quant à une variation de bioaccumulation d'un Lanthanide à l'autre. Cela s'explique par un manque d'informations concernant la bioaccumulation des 14 Lanthanides, et plus précisément sur les Lanthanides Lourds. Par conséquent, il est nécessaire d'étudier la bioaccumulation des Lanthanides Lourds, tout en considérant la concentration totale des Lanthanides dans les organismes.

Chap. IV - Toxicité *in vivo* des Lanthanides en milieu aquatique

D'après Web of Science, entre 1991 et 2021, plus de 240 études ont traité de la toxicité aiguë et chronique des Lanthanides incluant toutes leurs formes physico-chimiques (ion trivalent libre et complexe, nanoparticule, et oxyde). Dans les études relatant de la toxicité chronique des Lanthanides, les organismes benthiques (40 %) étaient les individus les plus utilisés. Ceci s'explique par l'abondance de protocoles d'essais normalisés et standardisés pour ces organismes. Parmi les organismes benthiques, le zooplancton, les poissons, et les macrophytes représentent près de 74 % des espèces étudiées. En effet, ces organismes possèdent un statut prioritaire au regard des protocoles à long terme de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) et de la législation « Registration Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) » (Blinova et al., 2020). Enfin, on peut noter que quelques études de toxicité chronique ont porté sur des microorganismes unicellulaires comme les microalgues (4 %).

1. Toxicité individuelle des nanoparticules de Lanthanides

Dans la littérature, les informations disponibles ont montré que les nanoparticules, et plus précisément les nanoparticules d'oxyde de cérium ($n\text{CeO}_2$) affectaient peu les organismes aquatiques (Keller et al., 2013 ; Gwenzi et al., 2018). Pour des concentrations et des temps d'exposition variables en présence de $n\text{CeO}_2$ (Tableau 3), il a été montré un taux de survie de 100 % des crustacées *Daphnia magna* et *Thamnocephalus platyurus*, du poisson *Danio rerio* (Van Hoecke et al., 2009), de l'amphipode *Corophium volutator* (Dogra et al., 2015), et de 3 espèces ciliées, i.e., *Loxocephalus sp.*, *Paramecium aurelia*, et *Tetrahymena pyriformis* (Peng et al., 2017). Plusieurs auteurs ont mis en évidence divers effets sublétaux des $n\text{CeO}_2$ sur le biote aquatique à différents niveaux trophiques (Tableau 4). À l'échelle individuelle, il est observé des altérations morphologiques (Correia et al., 2019) et une modification des traits de vie (Van Hoecke et al., 2009). Il est également rapporté que les $n\text{CeO}_2$ peuvent induire un état de stress oxydatif et des lésions à l'échelle cellulaire (Dogra et al., 2015, Garaud et al., 2015 ; Correia et al., 2019), ainsi que des effets génotoxiques à l'échelle moléculaire (Dogra et al., 2015). Par ailleurs, Tang et al. (2018) ont reporté des effets à l'échelle communautaire, i.e., une modification du biofilm périphytique liée à une augmentation de la population algale après 15 jours d'exposition à 5 mg/L de $n\text{CeO}_2$.

Tableau 3. Études relatant de l'absence de toxicité des nCeO₂ sur la survie de différents organismes aquatiques.

Organisme	Conditions d'exposition	Paramètre biologique mesuré	Essai	Effet observé	Référence
<i>Daphnia magna</i>	48 h : 0 - 100 et 1 000 mg/L	Immobilisation	OCDE 202 (2004)	100 % de survie	Van Hoecke et al., 2009
<i>Danio rerio</i>	72 h : 0 – 13 – 25 – 50 - 100 et 200 mg/L	Mortalité	OCDE 236 (2013)	100 % de survie	Van Hoecke et al., 2009
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 h : 0 – 100 – 500 - 1 000 - 3 000 et 5 000 mg/L	Mortalité	Thamnotokit F	100 % de survie	Van Hoecke et al., 2009
<i>Corophium volutator</i>	10 j : 10 mg/L	Mortalité		100 % de survie	Dogra et al., 2015
<i>Loxocephalus sp.</i> , <i>Paramecium aurelia</i> , et <i>Tetrahymena pyriformis</i>	64 j : 0 à 200 mg/L	Mortalité		100 % de survie	Peng et al., 2017

Tableau 4. Études relatant des effets sublétaux des nCeO₂ sur différents organismes aquatiques.

Organisme	Conditions d'exposition	Paramètre biologique mesuré	Essai	Effet observé	Référence
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	72 h : 0 – 3,2 – 5,6 – 10 - 18 et 32 mg/L	Croissance	OCDE 201 (2011)	Diminution du taux de croissance allant de 20 % (5,6 mg/L de nCeO ₂) à 80 % (32 mg/L de nCeO ₂)	Van Hoecke et al., 2009
<i>Daphnia magna</i>	21 j : 0 - 10 et 100 mg/L	Reproduction	OCDE 211 (2012)	Diminution du taux de reproduction (50 %) en présence de 47 mg/L de nCeO ₂	Van Hoecke et al., 2009
<i>Xenopus laevis</i>	12 j : 10 mg/L	Croissance	ISO 21427-1 (2006)	Diminution du taux de croissance (20 %)	Bour et al., 2015
<i>Corophium volutator</i>	10 j : 12,5 mg/L	Stress oxydatif Dommages cellulaires Dommages à l'ADN	Test du nitrobleu tétrazolium Méthode de réaction de l'acide thiobarbiturique Test des comètes	Augmentation de l'activité enzymatique de la SOD Augmentation du taux de LPO Augmentation du taux de dommages à l'ADN (15 % de cassures de brins d'ADN)	Dogra et al., 2015
<i>Dreissena polymorpha</i>	24 et 96 h : 0 – 10 et 100 µg/L	Stress oxydatif Dommages cellulaires Concentration héamolympatique	Dosage enzymatique d'une série de biomarqueurs	Glandes digestives à t = 96 h : augmentation de l'activité enzymatique de la CAT, augmentation du taux de LPO, diminution de la taille des lysosomes, diminution de la concentration des ions Ca ²⁺ et Na ⁺ dans l'hémolymphe	Graud et al., 2015
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28 j : 0 – 0,001 et 0,01 µg/L	Altération histologique Stress oxydatif	Coupe histologique de branchies et du foie Mesure de l'activité enzymatique de la CAT	Altération des branchies (hyperplasie et hypertrophie lamellaire, œdème intracellulaire, décollement des couches épithéliales) et du foie (vacuolisation des hépatocytes, élargissement des sinusoides, hyperémie) ; augmentation de l'activité enzymatique de la CAT dans le foie	Correia et al., 2019

Légende : SOD : superoxyde dismutase ; LPO : peroxydation lipidique ; CAT : catalase.

Cependant, Van Hoecke et al. (2009) ont émis l'hypothèse que les effets sublétaux observés sur les organismes aquatiques n'étaient pas liés à l'impact direct des $n\text{CeO}_2$. Au cours des expériences, ces auteurs ont observé la formation d'agrégats de $n\text{CeO}_2$ qui devenaient quantitativement importants aux plus fortes concentrations de cet élément dans les milieux de culture. Il a été suggéré que la formation de ces agrégats limitait la quantité disponible de phosphate dans les milieux, expliquant par conséquent, les effets observés chez les organismes aquatiques.

Concernant la toxicité d'autres nanoparticules de Lanthanides, à notre connaissance, seuls Balusamy et al. (2015) ont mis en évidence que les nanoparticules d'oxyde de lanthane ($n\text{La}_2\text{O}_3$) étaient toxiques sur *Daphnia magna*. Il a été montré un taux de mortalité de 70 % des individus après 72 h d'exposition à des concentrations allant de 250 à 1 000 mg/L de $n\text{La}_2\text{O}_3$.

2. Toxicité individuelle des oxydes de Lanthanides

À ce jour, peu de travaux ont relaté de la toxicité des oxydes de Lanthanides (Blinova et al., 2018a). Au regard des informations disponibles, ces éléments ne présentent pas d'effets toxiques sur la survie des organismes aquatiques. Il a été montré un taux de survie de 100 % des microorganismes *Vibrio fischeri* et *Tetrahymena thermophila* (Kurvet et al., 2017), ainsi que des crustacées *Thamnocephalus platyurus* et *Heterocypris incongruens* (Blinova et al., 2018a), pour différentes conditions expérimentales en termes de concentrations et de durées d'exposition (Tableau 5). À notre connaissance, Joonas et al. (2017) ont été les seuls auteurs à avoir étudié les effets sublétaux des oxydes de cérium, de gadolinium, de lanthane, et de praséodyme chez l'algue verte *Raphidocelis subcapitata*. Au moyen de l'essai d'inhibition de la croissance algale (OCDE 201, 2011), les résultats ont indiqué un ralentissement du taux la croissance algale, avec des valeurs mesurées de CE_{50} allant de 1 à 98 mg/L d'oxydes de Lanthanides. Cependant, les auteurs ont suggéré que ce ralentissement de la croissance était lié à une limitation des éléments nutritifs disponibles dans le milieu de culture en raison de leur précipitation avec les oxydes de Lanthanides.

Tableau 5. Études relatant de l'absence de toxicité des oxydes de Lanthanides sur la survie de différents organismes aquatiques.

Organisme	Conditions d'exposition	Paramètre biologique mesuré	Essai	Effet observé	Référence
<i>Vibrio fischeri</i>	30 min : 0 à 100 mg/L d'oxydes de La, Ce, Nd, Pr, et Gd	Mortalité	Essai de viabilité (Suppi et al., 2015)	100 % de survie	Kurvet et al., 2017
<i>Tetrahymena thermophila</i>	24 h : 0 à 500 mg/L d'oxydes de La, Ce, Nd, Pr, et Gd	Mortalité	Essai de viabilité (Jemec et al., 2016)	100 % de survie	Kurvet et al., 2017
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	24 h : 0 à 100 mg/L d'oxydes de La, Ce, et Gd	Mortalité	Ostracodtoxkit F	100 % de survie	Blinova et al., 2018a
<i>Heterocypris incongruens</i>	6 j : 0 à 100 mg/L d'oxydes de La, Ce, et Gd	Mortalité	Ostracodtoxkit F	100 % de survie	Blinova et al., 2018a

3. Toxicité individuelle des sels de Lanthanides

D'après la littérature, les sels de Lanthanides sont plus toxiques que les nanoparticules et les oxydes de Lanthanides (Joonas et al., 2017 ; Kurvet et al., 2017). Les données de toxicité proviennent généralement d'essais d'écotoxicité aiguë, et les études se sont focalisées majoritairement sur le lanthane et le cérium (Pagano et al., 2015 ; Herrmann et al., 2016). Bien que des valeurs de toxicité aient été calculées pour différentes espèces aquatiques, les résultats varient considérablement et les conclusions divergent concernant la toxicité des Lanthanides.

Blinova et al. (2018b) ont effectué une exposition aiguë et chronique des sels de nitrate de lanthane, de cérium, de praséodyme, de néodyme, et de gadolinium sur trois crustacées, i.e., *Thamnocephalus platyurus*, *Daphnia magna*, et *Heterocypris incongruens*. Pour le test de toxicité aiguë, les organismes ont été exposés pendant 24 h, 48 h, et 6 jours à des concentrations nominales de 0 - 6,25 - 12,5 - 25 et 50 mg/L de Lanthanide. Concernant le test de toxicité chronique, les crustacés ont été exposés durant 21 jours à des concentrations nominales de 0 - 0,01 - 0,25 - 0,5 et 1 mg/L de Lanthanide (OCDE 211, 1998). Les deux expériences ont montré pour les trois crustacées, une mortalité qui était dépendante de la concentration de Lanthanide, sans tenir compte de la spéciation. Des valeurs de CE₅₀ comprises entre 0,2 et 1,5 mg/L ont été calculées pour l'essai de toxicité aiguë et entre 0,30 et 0,46 mg/L pour l'essai de toxicité chronique. D'après ces valeurs, il a été suggéré que les Lanthanides possèdent des mécanismes d'action en commun, et que leur toxicité ne serait pas corrélée à la masse atomique.

Cependant, l'hypothèse d'une absence de variation de toxicité entre les Lanthanides n'est pas soutenue par Gonzalez et al. (2015). Dans cette étude, différents organismes aquatiques ont été exposés à une gamme nominale de concentrations allant de 0 à 6 400 µg/L de sels de chlorure de cérium, de gadolinium, et de lutétium. Pour *Daphnia magna*, *Heterocypris incongruens*, *Hydra attenuata*, et *Brachionus calyciflorus*, une absence de toxicité des Lanthanides a été observée. Néanmoins, la croissance diminuait de 20 à 90 % pour *Pseudokirchneriella subcapitata* et la luminescence diminuait de 40 à 70 % pour *Vibrio fischeri* aux plus fortes concentrations de Lanthanides. Basé sur les valeurs de CE₅₀, le lutétium était l'élément le plus toxique pour ces organismes modèles utilisés. Les auteurs ont supposé que les variations de toxicité entre les Lanthanides pourraient être expliquées par la spéciation et la disponibilité des éléments dans les milieux d'essai.

Cette affirmation a été confortée par Romero-Freire et al. (2019), suite à des concentrations mesurées de cérium, de gadolinium, et de lutétium sous forme d'ion trivalent libre qui étaient plus faibles et variables (10 à 80 %), par rapport aux concentrations nominales

testées dans les milieux d'essai des algues *Chlorella vulgaris* et *Raphidocelis subcapitata*, du rotifère *Brachionus calyciflorus*, de l'ostracode *Heterocypris incongruens*, de la bactérie *Allivibrio fischeri*, et de la daphnie *Daphnia magna*. En parallèle, la spéciation des Lanthanides à l'état d'équilibre a été modélisée en tenant compte de la température, du pH, de la force ionique, et de la concentration des différents éléments nutritifs des milieux d'essai. Cette modélisation a permis de montrer un pourcentage faible des Lanthanides sous forme d'ion trivalent libre, et un pourcentage élevé des Lanthanides sous forme de carbonates, hydroxydes, et sulfates. Compte tenu de ces études, la spéciation et la biodisponibilité des Lanthanides sont des paramètres importants à connaître pour comprendre et expliquer la toxicité de ces métaux.

Une variation de toxicité entre les Lanthanides a aussi été montrée, lors de l'évaluation de la toxicité individuelle de 11 Lanthanides sur *Hydra attenuata* (Blaise et al., 2018) et sur l'algue *Nitellopsis obtusa* (Manusadžianas et al., 2020). Suite à une exposition de 96 h des individus à une gamme de concentrations comprise entre 0 et 10 mg/L de sel de chlorure de Lanthanide, Blaise et al. (2018) ont obtenu des valeurs de CE_{50} variant de 0,21 à 0,77 mg/L selon les Lanthanides. Dans l'étude de Manusadžianas et al. (2020), après 24 jours d'exposition des organismes à une gamme de concentrations allant de 0 à 3 000 μ M (i.e., 0 à 450 mg/L) de sel de chlorure de Lanthanide, les valeurs de CE_{50} mesurées pour les éléments variaient entre 0,39 et 26 mg/L. Pour ces 2 études, les auteurs ont suggéré que la toxicité des Lanthanides est corrélée positivement à la masse atomique, avec une toxicité plus élevée des Lanthanides Lourds. Néanmoins, il est à souligner que la spéciation des Lanthanides n'a pas été considérée lors de l'analyse et de la comparaison de la toxicité entre les éléments.

Par ailleurs, de nombreux effets sublétaux des sels de Lanthanides ont été rapportés à l'échelle individuelle, affectant les traits de vie des organismes aquatiques. Il a été montré un ralentissement du taux de la croissance de *Daphnia magna* (25 %) après 14 jours d'exposition en présence de 330 et 1 000 μ g/L de sel de chlorure de lanthane (Lüring et Tolman, 2010), et de la lentille d'eau *Lemna minor* (33 %) après 15 jours d'exposition à 1 mM de sel de citrate de cérium (Zicari et al., 2018). Des troubles du comportement, i.e., une hyperactivité, un déséquilibre corporel, la sécrétion de mucus, une oscillation importante de la nageoire caudale, et des troubles de la respiration ont été observés sur le poisson *Gobiocypris rarus*, après 96 h d'exposition à des concentrations allant de 0 à 10 mg/L de sel de chlorure de lanthane. Une atrophie des branchies et des formes irrégulières des hépatocytes ont aussi été mises en évidence sur ce poisson, après 21 jours d'exposition à des concentrations comprises entre 0,04 et 0,80 mg/L de sel de chlorure de lanthane (Hua et al., 2017).

À l'échelle cellulaire, des altérations morphologiques, un état de stress oxydatif et des lésions cellulaires ont été révélés chez différentes plantes d'eau douce. Zicari et al. (2018) ont montré une augmentation de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) et du taux de peroxydation lipidique (LPO) de *Lemna minor* après 5 jours d'exposition à des concentrations de 0 à 1 mM (i.e., 0 à 150 mg/L) de sel de citrate de cérium avant de diminuer au 7^{ème} et au 12^{ème} jour. Une diminution de l'activité enzymatique de la SOD, CAT, APX de *Spirodela polyrhiza* a été mesurée après 14 jours d'exposition en présence de 1,4 à 2,8 mg/L de sel de chlorure de praséodyme (Xu et al., 2016). Pour ces deux organismes, une réduction du taux de chlorophylle a et b a été mise en évidence, et des altérations de la structure des chloroplastes ont été montrées sur *Spirodela polyrhiza* après 14 jours d'exposition à toutes les conditions testées (0 à 60 µM soit 0 à 9 mg/L) de sel de nitrate de cérium (Xu et al., 2017).

4. Toxicité des sels de Lanthanides en mélanges

Dans l'environnement, les organismes aquatiques sont soumis à l'influence des substances chimiques combinées. Prédire la réponse des organismes à ces mélanges constitue l'une des tâches les plus difficiles en écotoxicologie (Norwood et al., 2003). Pour évaluer le risque, il est essentiel de comprendre si la toxicité des mélanges est potentialisée (synergie), inhibée (antagoniste), ou additionnée à la toxicité directe des éléments individuels. Cependant, les études relatant de la toxicité des sels de Lanthanides en mélanges restent peu nombreuses, et même quasi-inexistantes concernant la toxicité des nanoparticules et des oxydes de Lanthanides. Par ailleurs, les quelques études relatant des effets des sels de Lanthanides en mélanges présentent des résultats divergents. Tai et al. (2010) ont formulé l'hypothèse que la toxicité des mélanges soit dépendante de la concentration totale en Lanthanides dans le milieu d'exposition. Pour ce faire, la diatomée *Skeletonema costatum* a été exposée pour 72 h à un mélange de Lanthanides Légers (La, Ce, Nd, Sm, et Eu), à un mélange de Lanthanides Lourds (Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, et Lu), à un mélange de ces 13 Lanthanides, et aux 13 sels de chlorure ou de nitrate de Lanthanides individuels, pour des concentrations finales d'exposition de 0 – 0,75 – 1,5 – 3 – 4,5 et 6 mg/L dans le milieu d'essai. Pour chaque condition d'exposition, il a été mesuré une valeur de CE₅₀ de 4,5 mg/L. Sur ces résultats, les auteurs ont suggéré que les mélanges de Lanthanides présentaient des effets additifs et des mécanismes d'action en commun, validant ainsi leur hypothèse.

Tan et al. (2017) ont montré par modélisation un effet antagoniste du samarium en mélange à des ligands biotiques comme l'acide malique, glycolique, et citrique selon une

gamme de concentrations allant de 3 ng/L à 150 µg/L, après une exposition de 1 h sur l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans une autre étude, Romero-Freire et al. (2019) ont évalué les effets toxiques du sel de chlorure de cérium, de gadolinium, et de lutétium sur *Aliivibrio fisheri*, *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Heterocypris incongruens*, *Danio rerio*, et *Brachionus calyciflorus*. Les auteurs ont testé des mélanges binaires et ternaires pour des ratios de concentrations variables, basé sur les concentrations effectives calculées par Gonzalez et al. (2015). En utilisant le modèle d'additivité défini par Loewe et Muischnek (1926), des effets de synergie ont été mis en évidence sur *Raphidocelis subcapitata*. Il a été suggéré, toutefois, que ces effets pourraient être liés à la combinaison potentielle de facteurs de stress (Borgert et al., 2004 ; Lies et al., 2016). Ces facteurs de stress comme une diminution du taux de phosphate disponible dans le milieu, et la compétition entre les Lanthanides et le calcium sur les sites de transport des algues, contribueraient à la toxicité observée (El-Akl et al., 2015). Cependant, les effets de synergie qui ont été montrés sur *Aliivibrio fisheri*, lesquels n'étaient pas en état de stress en raison d'une durée d'exposition plus courte (30 minutes), suggèrent que les effets combinés des Lanthanides ne doivent pas être écartés. En utilisant le modèle d'additivité, des effets antagonistes ont été montrés sur *Brachionus calyciflorus*. Romero-Freire et al. (2019) ont suggéré que ces effets pourraient être expliqués par une adsorption plus importante voir complète du lutétium dans les milieux de culture par rapport aux autres Lanthanides, soulignant qu'uniquement le cérium et le gadolinium contribuerait à la toxicité des différents mélanges.

Récemment, Hanana et al. (2021) ont évalué la toxicité individuelle et en mélange des Lanthanides selon des concentrations de 140 µg/L de lanthane, 280 µg/L de cérium, 28 µg/L de praséodyme, 120 µg/L de néodyme, et 23 µg/L de samarium sur des juvéniles d'*Oncorhynchus mykiss*. Après 96 h d'exposition, aucun effet des mélanges n'a été mis en évidence par les auteurs. Cependant, le mélange des Lanthanides présentait une valeur de CE₅₀ correspondant à 18,2 mg/L de cérium, 9 mg/L de lanthane, 7,5 mg/L de néodyme, 1,8 mg/L de praséodyme, et 1,5 mg/L de samarium. Les valeurs calculées de CE₅₀ pour les Lanthanides seuls ont révélé que la concentration de samarium dans le mélange correspondait à la valeur de CE₅₀ de cet élément individuel (1,6 mg/L). Ainsi, les auteurs ont suggéré que la toxicité du mélange était principalement attribuable au samarium. En effet, les concentrations déterminées pour les autres Lanthanides dans le mélange correspondant à un impact toxique de 50 % étaient 4 à 15 fois plus faibles, par rapport aux valeurs de CE₅₀ des éléments testés individuellement. Hanana et al. (2021) ont émis l'hypothèse qu'une différence de précipitation des Lanthanides en présence des phosphates dans le milieu pourrait expliquer la toxicité du mélange. Pour des

concentrations de Lanthanides inférieures à 40 mg/L, les concentrations mesurées étaient proches de celles testées dans le milieu d'exposition, suggérant une absence de précipitation des composés. Cependant, pour des concentrations élevées et supérieures à 40 mg/L, uniquement le samarium présentait encore une part biodisponible de 38 % dans le milieu.

En conclusion de ce chapitre, les valeurs de toxicité sont nécessaires pour comprendre le comportement toxique des Lanthanides. En considérant toutes les formes physico-chimiques des Lanthanides, le lanthane et le cérium sont les éléments les plus étudiés parmi les 14 Lanthanides. Des effets toxiques létaux (mortalité) et sublétaux (ralentissement de la croissance, troubles du comportement, diminution du taux de reproduction, état de stress oxydatif, lésions cellulaires, dommages à l'ADN) peuvent être observés sur les organismes représentatifs des différents niveaux trophiques aquatiques. Cependant, il a été montré que la toxicité des Lanthanides pourrait être due à la formation d'agrégats insolubles avec les composants des milieux de culture. Une limitation de la biodisponibilité des éléments nutritifs dans les milieux de culture pourrait, par conséquent, expliquer les effets toxiques observés. Ainsi, étudier l'impact des agrégats de Lanthanides est essentiel pour déterminer si les Lanthanides induisent une toxicité directe ou indirecte. Par ailleurs, les données traitant de la toxicité individuelle des 14 Lanthanides, et en particulier des sels de Lanthanides sont incomplètes. Il n'y a pas de consensus concernant une relation entre la toxicité et la masse atomique des Lanthanides. Des variations de toxicité sont observées entre les Lanthanides, et celles-ci diffèrent selon la sensibilité des organismes, les durées et les concentrations d'exposition. De nombreux auteurs ont suggéré que la spéciation et la biodisponibilité des Lanthanides expliqueraient les variations de toxicité entre ces composés. Par conséquent, mesurer les concentrations réelles d'exposition des Lanthanides dans les milieux d'essais est indispensable pour comprendre la toxicité de ces éléments.

Prédire les effets combinés des Lanthanides est important pour comprendre leur toxicité dans l'environnement. Cependant, les informations concernant la toxicité des mélanges de Lanthanides sont incomplètes, et aucun consensus n'est établi en ce qui concerne leur effet (i.e., antagoniste, additive, ou synergie). Un des axes de réflexion serait d'étudier la toxicité des sels de Lanthanides, en réalisant des mélanges binaires à partir d'un Lanthanide Léger, Intermédiaire, et Lourd. Il serait également intéressant d'analyser les effets toxiques de tels mélanges en utilisant des outils statistiques et modélisateurs, lesquels sont des méthodes plus puissantes par rapport aux méthodes « classiques » d'évaluation des risques sanitaires.

Chap. V - Toxicité *in vitro* des Lanthanides sur différents modèles cellulaires

La culture cellulaire est considérée comme une approche complémentaire aux essais *in vivo* normalisés. Elle présente les avantages d'obtenir des réponses biologiques reproductibles sur des temps d'exposition courts, d'être « moins » coûteuse, et de pouvoir travailler sur des quantités et des volumes de contaminants plus faibles (Segner et al., 2001). Plus de 90 % des études portant sur l'évaluation de la toxicité *in vitro* des Lanthanides Légers ont été menées sur des lignées cellulaires humaines et murines, pour des durées d'exposition n'excédant pas 96 h (Pagano et al., 2015). Outre le questionnement de l'impact toxique *in vitro* des Lanthanides, la caractérisation de leurs modes d'action est également essentielle pour comprendre la toxicité de ces éléments. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents, connaître les mécanismes de défense cellulaire présente un intérêt tout particulier puisqu'ils vont, en théorie, limiter les effets toxiques des xénobiotiques.

1. Mécanisme de détoxification cellulaire

Classiquement, les différents processus de détoxification cellulaire s'organisent en trois phases (Figure 10). Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, permettent d'introduire une fonction chimique nouvelle (-OH, NH₂, COOH) rendant la molécule plus polaire. Le plus souvent, ces réactions correspondent à des réactions d'oxydation, catalysées généralement par le système des cytochromes P450 (Park et al., 1995). Les réactions de phase II de la biotransformation sont dites, quant à elles, de conjugaison (Xu et al., 2005). Elles permettent l'ajout d'un radical hydrophile et sont réalisées soit directement sur le composé toxique inchangé depuis son entrée dans la cellule, soit sur les molécules fonctionnalisées qui sont générées lors de la phase I. Les composés électrophiles sont conjugués par exemple au glutathion (GSH) à l'aide d'une glutathion-S-transférase (GST), tandis que les molécules nucléophiles sont associées à un acide glucuronique par une UDP-glucuronosyltransférase (UGT). Ces réactions de conjugaison augmentent l'hydrophilie de la molécule conjuguée, facilitant ainsi son transport hors de la cellule (Manduzio et al., 2004). Enfin, des glycoprotéines membranaires sont capables d'assurer par un mécanisme actif l'élimination des xénobiotiques. Elles peuvent agir dès l'entrée des xénobiotiques dans la cellule (on parle alors de phase 0), mais aussi sur des xénobiotiques modifiés par les réactions des phases I et II (Higgins et al.,

1997 ; Bard et Stegeman, 2000 ; Ferreira et al., 2014). Les niveaux d'expression et d'activité de ces protéines sont révélateurs des niveaux d'exposition des cellules aux contaminants. Ainsi, elles sont utilisées comme biomarqueurs *via* la mesure de l'activité de transport en présence / absence d'inhibiteurs spécifiques (Pereira et al., 1995).

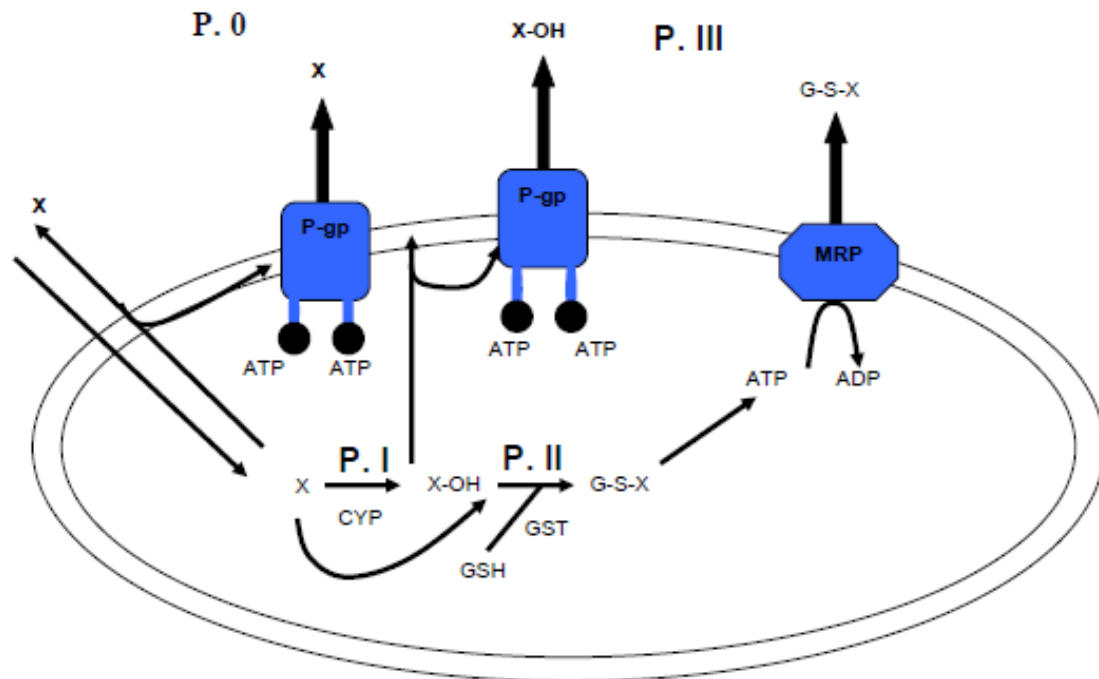


Figure 10. Conceptualisation des différentes phases de la détoxification cellulaire (Bard, 2000). X : diffusion au travers la membrane cellulaire ; P. 0 : phase 0 de la détoxification cellulaire ; P. I : phase I de la détoxification cellulaire ; P. II : phase II de la détoxification cellulaire ; P. III : phase III de la détoxification cellulaire ; CYP : cytochrome P450 ; GSH : glutathion réduit ; GST : glutathion-S-transférase ; P-gp : P-glycoprotéines ; MRP : protéines de multi-résistance.

Parmi ces glycoprotéines, les protéines membranaires « ATP-binding cassette (ABC) » constituent la plus large famille de protéines connue à ce jour (Henikoff et al., 1997). Ces protéines sont retrouvées dans toutes les espèces eucaryotes. Cette superfamille comprend 7 sous-familles, classées selon une nomenclature de A à G, avec à l'intérieur de chaque sous-famille un numéro correspondant à chaque transporteur. Parmi elles, les protéines membranaires de classe C, appelées aussi multidrug resistance protein (MRP-like) constituent une des sous-familles les plus étudiées (Sodani et al., 2012). Dans les cellules eucaryotes, au moins 9 types de protéines membranaires MRP-like (MRP1 à MRP9) ont été identifiés (Borst et Elferink, 2002). Dans les organismes aquatiques, des protéines présentant des activités

similaires aux MRP1 et MRP2, appelées communément MRP-like ont été largement étudiées, et plus précisément sur les bivalves et les poissons (Long et al., 2011a,b,c ; Ferreira et al., 2014). Par exemple, Long et al. (2011a,b,c) ont montré l'implication de ces protéines membranaires dans la détoxification de divers métaux (cadmium, arsenic, mercure) dans des cellules fibroblastiques ZF4 de *Danio rerio*. À notre connaissance, aucune étude n'a relaté le rôle de ces protéines membranaires dans la détoxification cellulaires des Lanthanides en écotoxicologie aquatique.

2. Toxicité des Lanthanides sur des modèles cellulaires humains et murins

2.1. Toxicité des nanoparticules de Lanthanides

D'après la littérature, les nanoparticules de Lanthanides n'induisent pas d'effets toxiques létaux pour différentes lignées cellulaires humaines et murines. En effet, un taux de viabilité cellulaire de 100 % a été observé pour les modèles cellulaires présentés dans le Tableau 6, pour des concentrations et des durées d'exposition variables, et pour différentes nanoparticules de Lanthanides (Heng et al., 2010 ; Gaiser et al., 2012 ; Kujur et al., 2021). Une exception est à souligner au regard des résultats de Park et al. (2008). Ces auteurs ont mentionné que les nCeO₂ affectaient la viabilité de plusieurs lignées cellulaires humaines et de rat. Suite à des expositions de 24, 48, 72, et 96 h à des concentrations de 0 – 10 – 20 et 40 µg/mL de nCeO₂, le taux de viabilité cellulaire diminuait graduellement jusqu'à atteindre 45 % en présence de 40 µg/mL de nCeO₂ après 96 h d'exposition. Cependant, aucune hypothèse n'a été avancée pour expliquer cette différence de toxicité par rapport aux autres études de la littérature. Park et al. (2008) ont également observé une augmentation du taux de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une diminution de l'activité de la glutathion dans les cellules exposées au nCeO₂. Heng et al. (2010) ont, quant à eux, souligné un ralentissement du taux de la croissance (0,5 à 2 fois) des cellules BEAS-2S et L929 exposées à des concentrations variant de 1 à 2 mg/L des nanoparticules d'oxyde de dysprosium (nDy₂O₃) et d'oxyde de gadolinium (nGd₂O₃), par rapport au témoin. Outre un ralentissement de la croissance cellulaire, des dommages à l'ADN ont été observés pour les deux lignées cellulaires à la plus forte concentration de nGd₂O₃ et de nDy₂O₃ (Tableau 6).

Tableau 6. Études relatant de la toxicité *in vitro* des nanoparticules de Lanthanides sur différentes lignées cellulaires.

Lignée cellulaire	Condition d'exposition	Paramètre biologique mesuré	Essai	Effet observé	Référence
BEAS-2B (cellules épithéliales de poumon humain) H ₉ C ₂ (cellules myocardiques de rat) T98G (cellules fibroblastiques de cerveau humain)	24, 48, 72, et 96 h : 0 - 10 – 20 et 40 mg/L de nCeO ₂	Mortalité cellulaire Stress oxydatif	Essai colorimétrique de viabilité (MTT) Essai fluorométrique (DCFH-DA)	Diminution graduelle de la viabilité cellulaire Augmentation du taux de production des ROS Diminution de l'activité de la glutathion	Park et al., 2008
BEAS-2B (cellules épithéliales de poumon humain) L929 (cellules fibroblastiques du tissu adipeux murin)	48 h : 0 à 2 mg/L de nDy ₂ O ₃ , nGd ₂ O ₃ , et nTb ₂ O ₃	Mortalité cellulaire Dommage à l'ADN	Essai colorimétrique de viabilité (WST-8) Essai fluorométrique (Pico-Green)	100 % de viabilité des 2 modèles cellulaires Ralentissement du taux de croissance (0,5 à 2 fois) et dommages à l'ADN (diminution de la concentration d'ADN) en présence de 1 mg/L	Heng et al., 2010
C3A (cellules hépatiques humaine)	24 h : 0 à 1 mg/L de nCeO ₂	Mortalité cellulaire	Essai de la LDH	100 % de viabilité cellulaire	Gaiser et al., 2012
MC3T3-E1 (cellules ostéoblastiques murine)	5 j : Magnésium pur + 0 – 0,5 – 1 ou 1,5 % de nSm ₂ O ₃	Mortalité cellulaire	Essai de la LDH	100 % de viabilité cellulaire	Kujur et al., 2021

Légende : DCFH-DA : 2,7-dichlorofluoroscein diacetate ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; WTS-8 : 2-2-methoxy-4-nitrophenyl-3-4-nitrophenyl-5-2,4-disulfo-phenyl-2H-tetrazolium, monosodium salt ; LDH : lactate déshydrogénase ; MTT : sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium).

2.2. Toxicité des oxydes de Lanthanides

À notre connaissance, Palmer et al. (1987) ont été les premiers auteurs à montrer que les oxydes de néodyme (Nd_2O_3) affectaient la survie des cultures primaires de macrophage pulmonaire obtenues à partir de rats de laboratoire Sprague Dawley[®]. Après une exposition de 20 h des cellules à une gamme de concentrations allant de 0 à 1 000 μM (i.e., 0 à 97 mg/L) de Nd_2O_3 , la viabilité cellulaire diminuait graduellement, et une valeur de CE_{50} de 101 μM (i.e., 9,8 mg/L) a été obtenue. Pour des conditions d'exposition similaires, les oxydes de lanthane (La_2O_3) et de cérium (CeO_2) n'impactaient pas la viabilité cellulaire, mais ont entraîné des modifications structurales. Il a été montré une atrophie des microvillosités ainsi qu'une perte des pseudopodes et des filopodes des cellules primaires. Gunay et al. (2021) ont également observé des altérations structurales (i.e., une perte de microvillosités à la surface des cellules, des cellules moins denses et plus sphériques, ainsi qu'une perte d'adhésion cellulaire) sur les cellules humaines HEK 293 (cellules embryonnaires rénales) et HepG2 (cellules cancéreuses hépatiques), après 48 h d'exposition à des concentrations de 10 à 100 $\mu\text{g/mL}$ d'oxydes d'euporium (Eu_2O_3) et de terbium (Tb_2O_3).

Récemment, les études traitant de la toxicité des oxydes de Lanthanides a connu un regain d'intérêt. Une diminution de 20 % du taux de viabilité a été observée sur les cellules mésenchymateuses de dent chez l'Homme après 48 h d'exposition à la plus forte concentration d'oxydes de gadolinium et d'ytterbium complexés au $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ (1,25 mg/mL) (Zambanini et al., 2019). Une diminution de 40 % du taux de viabilité des cellules humaines HepG2 (cellules cancéreuses hépatiques) et HEK 293 (cellules embryonnaires rénales) a également été mesurée après 48 h d'exposition en présence de 100 $\mu\text{g/mL}$ d'oxydes d'euporium (Eu_2O_3) et de terbium (Tb_2O_3) (Gunay et al., 2021).

2.3. Toxicité des sels de Lanthanides

Au moyen de lignées cellulaires humaines (Dai et al., 2001 ; Kostova et al., 2004 ; Paiva et al., 2009 ; Feyerabend et al., 2010 ; Palizban et al., 2010 ; Andiappan et al., 2018) et murines (Dai et al., 2015 ; Rucki et al., 2020 ; Siew et al., 2020), de nombreuses études ont mis en évidence un impact toxique des sels de Lanthanides, pour des concentrations et des durées d'exposition variables. Au regard des publications, il apparaît que la toxicité observée sur les cellules est dépendante de la concentration des Lanthanides dans le milieu de culture. Parmi les études, peu d'entre elles ont présenté des valeurs mesurées de CE_{50} , et encore moins ont

comparé la toxicité de plusieurs Lanthanides. Un premier élément de réponse est apporté par Feyerabend et al. (2010) qui ont exposé durant 48 h une culture primaire de cellules périvasculaires du cordon ombilical humain (HUCPV) et des lignées cellulaires provenant de l'Homme (MG63, cellules de l'ostéosarcome) et de la souris (RAW 264.7, cellules de macrophage) à des concentrations variant de 0 à 2 000 μM (i.e., 0 à 300 mg/L) de sels de lanthane, de cérium, de praséodyme, de néodyme, d'euporium, de gadolinium, et de dysprosium. D'après les valeurs de CE_{50} , les auteurs ont suggéré que la toxicité des Lanthanides semblerait être corrélée à la masse atomique, avec une toxicité plus élevée du lanthane ($\text{CE}_{50} = 400 \mu\text{M}$ soit 60 mg/L) par rapport à celle des autres éléments ($\text{CE}_{50} > 1\,000 \mu\text{M}$ soit 150 mg/L). Cette hypothèse n'est pas vérifiée dans les travaux de Rucki et al. (2020). Après une exposition de 48 h des cellules BALB/c 3T3 (cellules fibroblastiques murines) à une gamme de concentrations allant de 0 à 2 000 mg/L de Lanthanide, il a été montré pour les 14 Lanthanides (La, Er, Pr, Eu, Gd, Yb, Sm, Tm, Dy, Tb, Ho, Lu, Y, Nd, Ce) et l'yttrium, des valeurs de CE_{50} comprises entre 957 et 1 264 mg/L. Compte tenu que les différences de CE_{50} ne sont pas statistiquement significatives, les auteurs ont suggéré que les Lanthanides présentaient des impacts toxiques similaires.

Dai et al. (2001) ont montré un ralentissement de la croissance cellulaire, suite à des expositions pendant 48 h des cellules HL-60 (cellules leucémiques humaines) à des concentrations de 0,5 – 1 et 2 mM (i.e., 0,07 - 139 et 278 mg/L) de LaCl_3 , et pour 72 h des cellules NB4 (cellules leucémiques humaines) à des concentrations de 1 – 2 et 4 mM (i.e., 140 – 280 et 560 mg/L) de CeCl_3 . Dai et al. (2015) ont souligné une augmentation des espèces réactives oxygénées et de la lactate déshydrogénase (LDH), ainsi qu'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale par rapport au témoin, après une exposition de 24 h des cellules primaires de la moelle osseuse de souris à une concentration de 1 000 μM (i.e., 173 mg/L) d' YbCl_3 . Des dommages à l'ADN ont été observés sur les lignées cellulaires cancéreuses humaines Jurkat (cellules lymphocytaires T CD4) (Paiva et al., 2009), Hela (cellules épithéliales utérines), Vero (cellules épithéliales rénales), et MCF-7 (cellules mammaires) (Andiappan et al., 2018), mais aussi sur la lignée cellulaire V79-4 (cellules fibroblastiques de poumon du hamster chinois) (Siew et al., 2020).

2.4. Toxicité des agents de contraste gadolinés

Les agents de contraste majoritairement utilisés aujourd'hui dans le cadre des examens IRM sont composés de structures chimiques cycliques qui chélatent très fortement l'ion gadolinium. La stabilité de ces composés est telle que la libération de l'ion gadolinium de son chélateur après rejets des agents de contraste dans l'environnement semble négligeable. La toxicité du gadolinium présent sous forme d'agent de contraste est donc une situation très particulière qui ne peut pas être comparée à la seule présence de sel de gadolinium dans l'environnement étudié. Les recherches développées à ce sujet a montré que les agents de contraste gadolinés n'induisaient pas de toxicité (Cabella et al., 2006 ; Swaminathan et al., 2013), mais au contraire pouvait parfois améliorer la survie (Feng et al., 2015) et la croissance de nombreux modèles cellulaires humains (Decker et al., 1990 ; Bleavins et al., 2012) et murins (Midura et al., 2014).

3. Toxicité des Lanthanides sur des modèles cellulaires de poissons

3.1. Toxicité du sel de gadolinium

Comparativement aux données de toxicité *in vitro* obtenues sur des lignées cellulaires humaines et murines, il existe actuellement qu'une seule étude portant sur la toxicité des Lanthanides, et celle-ci n'a relaté que de la toxicité du sel de gadolinium en écotoxicologie aquatique (Laville et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont exposé les cellules primaires d'hépatocytes (PRTH) d'*Oncorhynchus mykiss* et les cellules fibroblastiques de *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1) à une gamme de concentrations de 9,83 à 157 mg/L de sel de chlorure de gadolinium. Après 24 h d'exposition, la viabilité cellulaire était plus faible en présence du gadolinium, avec des valeurs de CE₅₀ calculées de 151 mg/L pour les cellules PLHC-1 et de 41,18 mg/L pour les cellules PRTH. Au regard de ces seules données, l'étude de la toxicité des Lanthanides en utilisant des modèles cellulaire d'organismes aquatiques restent à être approfondie.

3.2. Toxicité des agents de contraste gadolinés

Récemment, Parant et al. (2019) ont étudié deux agents de contraste gadolinés (Dotarem® et Omniscan®) sur les cellules fibroblastiques de *Danio rerio* (ZF4) et branchiales d'*Oncorhynchus mykiss* (RTgill-W1). Les deux lignées cellulaires ont été exposées sans renouvellement du milieu pendant 6 jours à 20 ng/L et 10 µg/L de gadolinium sous la forme d'acide gadotérique (Dotarem®) ainsi qu'à 10 µg/L et 1 mg/L de gadolinium sous la forme gadodiamide (Omniscan®). Une croissance plus faible des cellules ZF4 et RTgill-W1 a été montrée pour les deux agents. Une autre exposition de 34 jours a été effectuée en exposant les cellules ZF4 à 10 µg/L de gadolinium à la formulation Dotarem®. Sur cette période, un ralentissement de la croissance a été mis en évidence au bout de 6 jours, avant que celle-ci ne redevienne normale après avoir enlevé l'agent de contraste dans le milieu d'exposition. Ces auteurs ont suggéré que le ralentissement de croissance observé était probablement dû à l'agent chélateur plutôt qu'à l'ion gadolinium.

En conclusion de ce chapitre, la toxicité des différentes formes physico-chimiques des Lanthanides (nanoparticule, ion trivalent libre, agent de contraste gadoliné, oxyde) à l'échelle cellulaire est effectivement représentative des observations faites au moyen des approches *in vivo*. Des effets létaux (mortalité) et sublétaux (ralentissement de la croissance cellulaire, altérations structurales, dommages oxydatifs, dommages à l'ADN) peuvent être observés selon les différentes formes physico-chimiques des Lanthanides. En dépit d'un nombre considérable d'études relatant leur toxicité, peu d'entre elles ont présenté des valeurs de toxicité (i.e., concentration effective). Les études concernant la toxicité *in vitro* des mélanges des Lanthanides sont inexistantes à notre connaissance, et un manque d'informations demeure concernant la toxicité des 14 Lanthanides, et plus précisément des Lanthanides lourds. Il est à noter que la biodisponibilité et la spéciation des éléments n'ont pas été considérées dans ces travaux, ce qui peut conduire à une mauvaise évaluation de la toxicité *in vitro* des Lanthanides. Outre un manque de connaissances en rapport à la toxicité cellulaire des Lanthanides, les mécanismes d'action de ces éléments restent actuellement non-élucidés. Un des moyens possibles pour identifier ces mécanismes moléculaires serait d'étudier la toxicité des Lanthanides en présence / absence d'inhibiteurs spécifiques des protéines transmembranaires intervenant en phase III du cycle de détoxification cellulaire. Bien que les approches *in vitro* aient été utilisées pour évaluer le risque sanitaire des Lanthanides, celles-ci restent peu considérées par la communauté scientifique en écotoxicologie aquatique.

Matériels et Méthodes

Chap. I – Matériels biologiques

1. Lignées cellulaires de poisson zèbre (*Danio rerio*)

1.1. Lignée cellulaire ZF4

La lignée cellulaire ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) a été établie par Driever et Rangini en 1993 à partir d'embryons de *Danio rerio* âgés d'un jour. Ces cellules proviennent du tissu conjonctif du derme. Ce sont des cellules adhérentes, caractérisées par une morphologie de type fibroblastique, et un caryotype hyperploïde de 110 à 120 chromosomes (Figure 11).

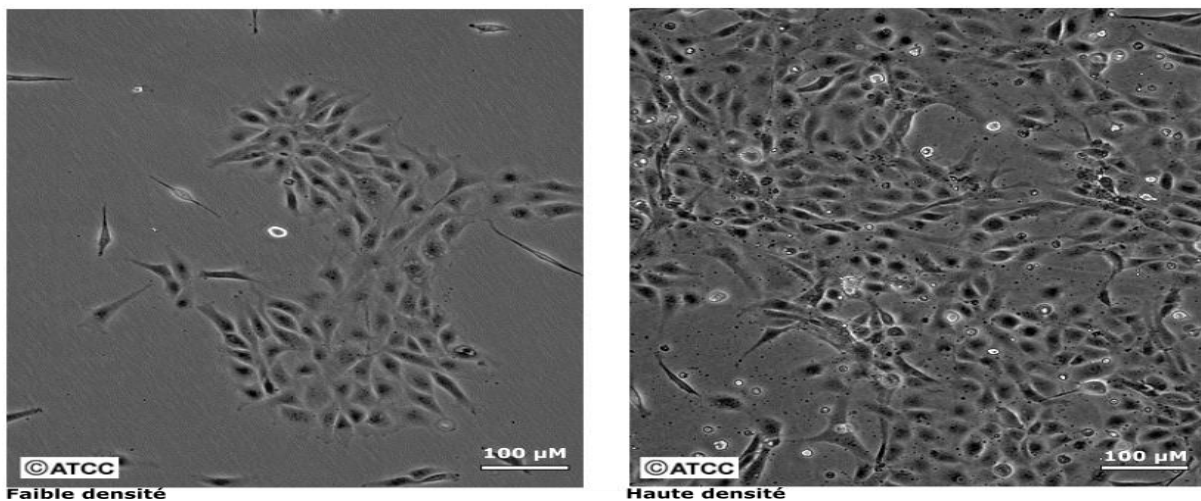


Figure 11. Lignée cellulaire ZF4 de poisson zèbre (*Danio rerio*) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).

(Site internet : <https://www.atcc.org/products/crl-2050>)

1.2. Lignée cellulaire ZFL

La lignée cellulaire ZFL (ATCC®, CRL-2643™) a été développée par Barnes en 1992 à partir de cultures primaires d'hépatocytes de *Danio rerio* adultes. Ces cellules sont impliquées dans les processus de métabolisation et de détoxification des substances toxiques, la glycogénogénèse ou la glycogénolyse, la dégradation de l'hémoglobine, ou encore la production de bile et de vitellogénine. Ce sont des cellules adhérentes qui présentent une morphologie de type épithéliale stratifiée, et un caryotype hypodiploïde de 47 chromosomes (Figure 12).

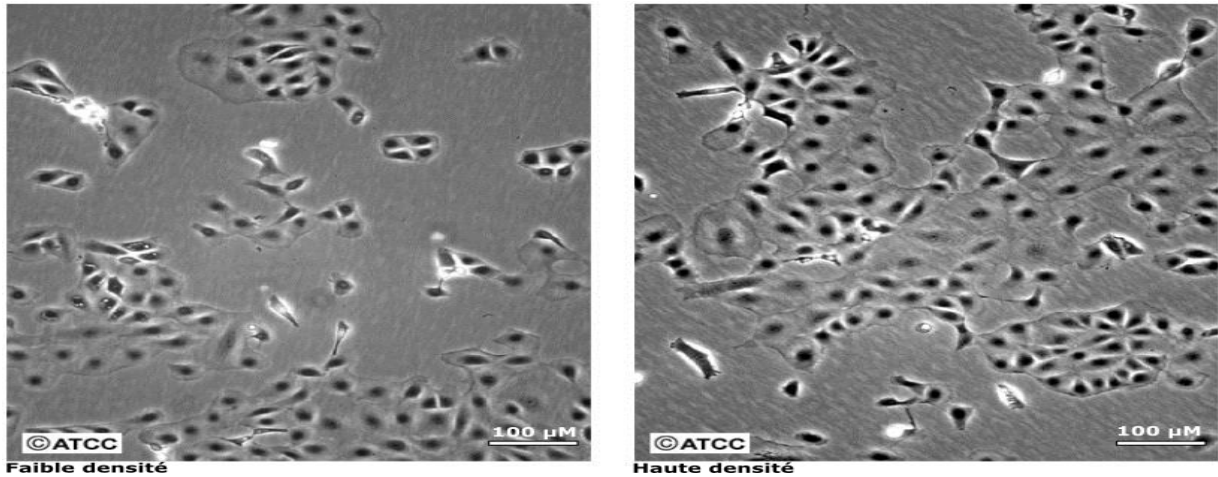


Figure 12. Lignée cellulaire ZFL de poisson zèbre (*Danio rerio*) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).

(Site internet : <https://www.atcc.org/products/crl-2643>)

2. Lignée cellulaire de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

La lignée cellulaire RTgill-W1 (ATCC®, CRL-2523™) a été caractérisée par Bols et al. (1994) à partir de cultures primaires de branchies d'*Oncorhynchus mykiss* âgées de quinze mois. Outre son rôle dans la respiration, ces cellules régulent la concentration ionique provenant du milieu extérieur. Ce sont des cellules adhérentes qui sont caractérisées par une morphologie de type épithéliale, et par un caryotype hétéropleïde de 44 à 139 chromosomes (Figure 13).

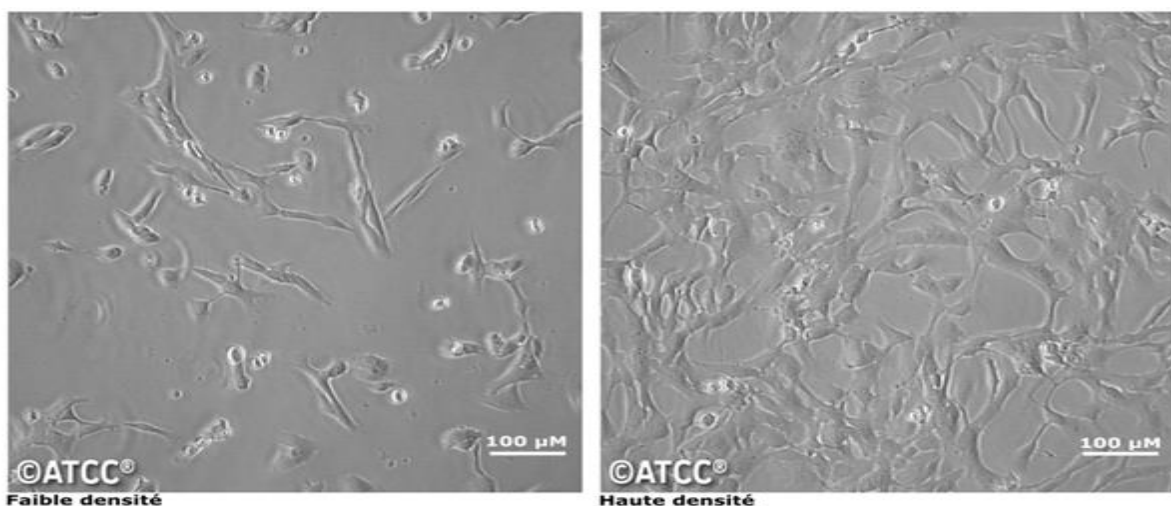


Figure 13. Lignée cellulaire RTgill-W1 de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) à faible (gauche) et forte (droite) densité de confluence au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 100).

(Site internet : <https://www.atcc.org/products/crl-2523>)

3. Cultures primaires de glandes digestives du bivalve *Corbicula fluminea*

3.1. *Corbicula fluminea*

Corbicula fluminea est un bivalve d'eau douce qui a été identifié en 1774 par O.F. Muller (Figure 14). Cette espèce invasive originaire d'Asie a colonisé les eaux douces de l'Afrique, de l'Australie, de la Nouvelle Guinée, d'Amérique du Nord, et de l'Europe (Kramer-Wilt, 2008 ; Cupsa, 2014).



Systématique

Embranchement : *Mollusca*

Classe : *Bivalvia*

Ordre : *Eulamellibranchiata*

Sous Ordre : *Heterodonta*

Super Famille : *Corbiculacea*

Famille : *Corbiculidae*

Genre : *Corbicula*

Espèce : *Corbicula fluminea*

Figure 14. *Corbicula fluminea* ou la palourde asiatique.

(Site internet : <https://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-2984-corbicula-fluminea.html>)

Ce bivalve est connu pour tolérer des milieux salins entre 0 et 3 ‰ (Morton et Tong, 1985). Il peut supporter des températures extrêmes (2 à 34 °C) (Mattice et Dye, 1976) avec une température optimale de croissance de 20 °C (Foe et Knight, 1986). D'une taille adulte de 3 à 5 cm, sa coquille de couleur marron à vert-olive est constituée de carbonate de calcium. Elle est composée de deux valves qui sont reliées dorsalement par un ligament externe. Les tissus et les organes principaux de *Corbicula fluminea* sont le manteau, les branchies, le cœur, le rein, et la masse viscérale. Cette masse comprend la glande digestive et les gonades qui sont entremêlées. Concernant la glande digestive, elle est constituée de diverticules qui communiquent avec l'estomac, et assurent l'absorption et la digestion intracellulaire des particules alimentaires (Figure 15).

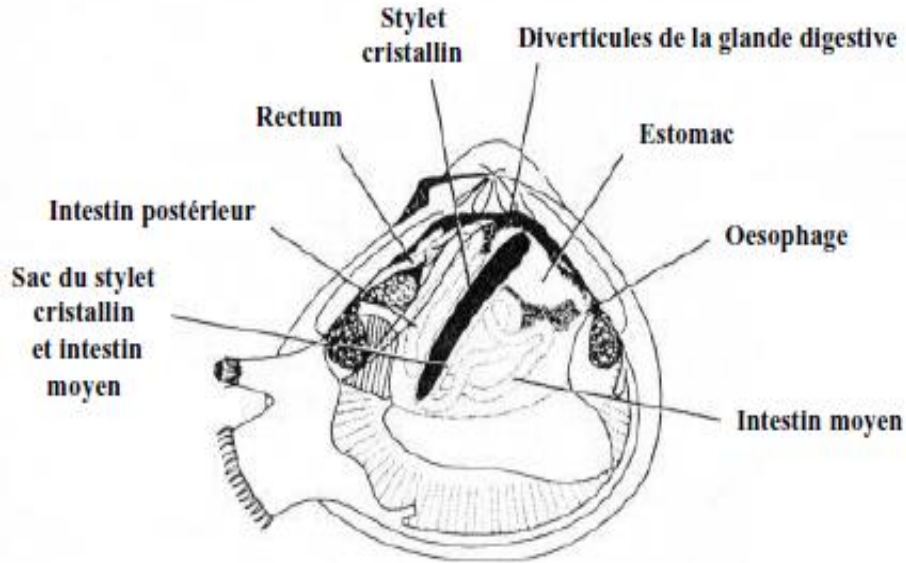


Figure 15. Coupe longitudinale de *Corbicula fluminea* mettant en évidence le tube digestif à l'intérieur de la masse viscérale (Britton et Morton, 1982).

Son régime alimentaire est composé d'algues, d'organismes zooplanctoniques, et de débris organiques. Cet organisme modèle est utilisé en écotoxicologie aquatique pour sa capacité à bioaccumuler divers contaminants (cuivre, plomb, zinc, cadmium...), à s'adapter à différentes niches écologiques, et pour sa durée de vie longue (2 à 3 ans).

3.2. Échantillonnage des bivalves

En 2017, une centaine d'individus ont été prélevés *in situ* dans la rivière Moselle à Argancy, dans l'Est de la France. Pendant l'échantillonnage, les bivalves ont été sélectionnés selon la couleur de la coquille (marron à vert-olive), la visibilité du pied, et la résistance de la coquille en exerçant une pression au niveau de l'axe radial. Les individus échantillonnés avaient une taille moyenne de $3 \pm 0,5$ cm. De l'eau a été prélevée sur le site pour limiter le stress des organismes durant leur acclimatation au laboratoire.

3.3. Acclimatation et maintien des bivalves en conditions contrôlées

3.3.1. Préparation du matériel et du milieu d'élevage synthétique

Une semaine avant la campagne d'échantillonnage, des cristallisoirs de 2 L et des billes de verre ont été acidifiés sous une hotte chimique à une concentration finale de 10 % (v/v) avec de l'acide nitrique (HNO₃) concentré à 65 %. L'acidification a été nécessaire pour éviter une contamination bactérienne ou fongique du matériel. Après 1 jour d'acidification, le matériel a été rincé dans un bain d'eau ultrapure pour éliminer l'excédent d'acide. Ce bain a été renouvelé quotidiennement durant les 3 jours qui ont suivi l'acidification, avant de laisser sécher le matériel à l'air ambiant. La composition du milieu synthétique utilisé pour le maintien des corbicules au laboratoire (annexe 1) a été adaptée de la norme OCDE n° 202 : *Daphnia sp.*, essai d'immobilisation immédiate (2004). La pureté des sels composant le milieu d'élevage était de 99,0 %. Chaque sel a été solubilisé dans de l'eau ultrapure, puis les solutions obtenues ont été autoclavées (cycle : 120 °C ; 20 minutes) et ajoutées à de l'eau de Volvic. Au cours de la préparation, les paramètres physico-chimiques du milieu synthétique ont été mesurés (conductimétrie = 435 µS/cm ; pH = 7,6 ; température = 9 °C ; saturation en oxygène = 93 %).

3.3.2. Procédure d'acclimatation et maintien au laboratoire

Les bivalves ont été répartis en groupe de 15 individus dans 6 cristallisoirs avec des billes de verre utilisées comme substrat artificiel. Les organismes ont été acclimatés dans une enceinte thermostatée à 15 °C, avec une photopériode de 12 h / 12 h (jour / nuit), un taux d'oxygénation constant de 90 %, et une intensité lumineuse de 1 000 lux (Figure 16). Lors de la première semaine d'acclimatation, un cycle de dépuration a été effectué. Tous les 2 jours, le milieu naturel a été remplacé par du milieu synthétique au 1/3, au 2/3, et à 100 %. Par la suite, le milieu synthétique a été intégralement renouvelé une fois par semaine durant la période de maintien des bivalves au laboratoire. Les bivalves ont été nourris *ad libidum* tous les 3 jours avec des microalgues vertes, *Chlorella vulgaris*.



Figure 16. Dispositif pour l’acclimatation des bivalves *Corbicula fluminea* en conditions contrôlées au laboratoire (photo prise par Emmanuel Fleurbaix, 2018).

Chap. II – Protocoles de culture des modèles cellulaires

1. Culture des lignées cellulaires de poissons

Les lignées cellulaires de poissons utilisées durant la thèse provenaient de l'American Type Culture Collection (ATCC). Leur culture a été développée au laboratoire par l'Ingénieur d'Étude Clément Bojic et l'Assistante Ingénieure Justine Flayac, en suivant les recommandations de l'ATCC. Après amplification, les cellules ont été cryogénisées dans de l'azote liquide en présence de 95 % de milieu complet et 5 % (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO), un agent cryoprotecteur. Nos différents essais expérimentaux ont été réalisés à partir des lots congelés de cellules ZF4 (lot : 61376027) et ZFL (lot : 61692919) de *Danio rerio*, et RTgill-W1 (lot : 61692919) d'*Oncorhynchus mykiss* (Tableau 7).

Tableau 7. Caractéristiques des lots de cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*, et composition des milieux complets nécessaires à leur culture.

Caractéristiques des lots de cellules congelées	Milieu complet de culture
ZF4 : densité cellulaire de 2×10^6 cellules/mL 2 ^{ème} sous-culture	DMEM : F12 (ATCC [®] , 30-2006 [™]) + 10 % (v/v) SVF (ATCC [®] , 30-2021 [™])
ZFL : densité cellulaire de $2,5 \times 10^6$ cellules/mL 3 ^{ème} sous-culture	50 % (v/v) Leibovitz's L-15 (ATCC [®] , 30-2008 [™]), 35 % (v/v) DMEM HG (Gibco [®] by Life Technologie [™] , réf : 12100), 15 % (v/v) Ham's F12 (Gibco [®] by Life Technologie [™] , réf : 21700), 0,15 g/L (v/v) bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich, réf : 58761), 15 mM (v/v) HEPES (Sigma-Aldrich, réf : H0887), 0,01 mg/mL (v/v) insuline bovine (Sigma-Aldrich, réf : E4127), et 5 % (v/v) de SVF inactivé (ATCC [®] , 30-2020 [™])
RTgill-W1 : densité cellulaire de $4,5 \times 10^6$ cellules/mL 7 ^{ème} sous-culture	Leibovitz's L-15 (Gibco [®] by Life Technologie [™] , réf : 11540556) + 10 % SVF (v/v) (Eurobio ^{Abcys} , réf : CVFSVF00-01)

1.1. Décongélation des cellules

Pour chaque lignée cellulaire, et à chaque fois qu'une nouvelle mise en culture était nécessaire, une ampoule a été sortie de l'azote liquide, décontaminée à l'éthanol 70 % (v/v), et placée sous un PSM de type II. Par trois séries d'aspirations et de refoulements, le culot cellulaire est décongelé par ajout de 5 mL de milieu complet. Après une centrifugation ($123 \times g$; 5 minutes), le surnageant est aspiré et le culot est mis en suspension par 5 mL de milieu

complet (4,75 mL de milieu complet sans SVF pour les cellules ZFL). La suspension cellulaire est ensuite transférée dans une flasque de culture de 25 cm² (flasque T₂₅), puis la flasque est agitée par un mouvement circulaire et placée dans une étuve thermostatée (Thermo Fisher Scientific, Heracell™ 150i), dans des conditions de culture définies pour chaque type cellulaire (Tableau 8). Après 30 minutes d'incubation qui a permis l'adhésion des cellules ZFL, 0,25 mL de SVF sont ajoutés dans la flasque avant de la placer de nouveau dans l'incubateur.

Tableau 8. Conditions d'incubation des lignées cellulaires ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*.

Lignée cellulaire	Conditions d'incubation
ZF4	Atmosphère humidifiée ; 28 °C ; 5 % CO ₂
ZFL	Atmosphère humidifiée ; 28 °C ; 0 % CO ₂
RTgill-W1	Atmosphère humidifiée ; 15 °C ; 0 % CO ₂

1.2. Amplification des lignées cellulaires

Lorsque la surface d'une flasque est recouverte à 90 % de cellules (stade de la sub-confluence), celles-ci sont réparties dans plusieurs nouvelles flasques de 75 cm² (flasque T₇₅). Pour cela, le milieu de la flasque est aspiré, et le tapis cellulaire est rincé pendant 10 secondes avec 1 mL de trypsine (étape 1 à 3, Figure 17). Ce rinçage est nécessaire pour éliminer les résidus de SVF qui pourraient inhiber l'action des peptidases (Tableau 9).

Tableau 9. Solution de trypsine utilisée pour chaque lignée cellulaire lors de la procédure d'amplification.

Lignée cellulaire	Solution de trypsine
ZF4	Trypsine à 0,25 % (Sigma-Aldrich, réf : 15090046)
ZFL	Trypsine à 0,25 % avec 53 mM EDTA (ATCC®, 30-2101™)
RTgill-W1	Trypsine à 0,25 % avec 1 mM EDTA (Merck Millipore, réf : SM-2003-C)

Après avoir aspiré la trypsine, 2 mL de trypsine sont déposés sur le tapis cellulaire, puis la flasque est agitée par un mouvement circulaire et placée pour 5 minutes dans l'incubateur (étape 4 à 6, Figure 17). Durant ce temps et sous l'action des peptidases, les cellules sont décrochées du support de culture. La trypsination est arrêtée en ajoutant 13 mL de milieu complet dans la flasque (étape 7, Figure 17). Par des séries d'aspirations et de refoulements, les cellules sont individualisées en « cassant » les agglomérats (étape 8, Figure 17), puis centrifugées (123 x g ; 5 minutes). Après l'aspiration du surnageant, le culot cellulaire est mis en suspension par 5 mL de milieu complet (sans SVF pour les cellules ZFL) (étape 9 à 13, Figure 17). Aux dernières étapes de l'amplification, la viabilité et la densité des cellules sont numérées à la cellule de Malassez au microscope optique (grossissement X 40) (étape 14 et 15, Figure 17). La numération est réalisée en utilisant la méthode d'exclusion au bleu de trypan à 0,4 % (v/v) (Gibco® by Life Technologie™, réf : 15250061) (étape 16, Figure 17). Cette méthode permet de distinguer les cellules vivantes et mortes. Une coloration bleue est observée pour les cellules mortes qui internalisent le bleu de trypan, contrairement aux cellules vivantes qui restent incolores.

1.3. Passage et maintien des lignées cellulaires

Après la numération, la densité cellulaire d'ensemencement est ajustée par ajout de milieu complet (sans SVF pour les cellules ZFL), et les cellules sont ensemencées dans plusieurs flasques T₇₅ (Tableau 10). Enfin les flasques sont agitées par mouvement circulaire et placées à l'incubateur aux conditions de température et de CO₂ définies pour la culture de chaque lignée cellulaire. Après 30 minutes d'incubation qui a permis l'adhésion des cellules ZFL, 0,75 mL de SVF sont ajoutés dans la flasque avant de la placer de nouveau dans l'incubateur.

Tableau 10. Densité d'ensemencement des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*.

Lignée cellulaire	Densité cellulaire d'ensemencement
ZF4	1 x 10 ⁶ cellules/mL
ZFL	1,25 x 10 ⁶ cellules/mL
RTgill-W1	2,5 x 10 ⁶ cellules/mL

Les densités cellulaires d'ensemencement permettent d'atteindre le stade de la sub-confluence après 6 jours de culture. Elles ont été déterminées par l'Ingénieur d'Étude Clément Bojic et l'Assistante Ingénieure Justine Flayac, lors de la validation des protocoles de culture. Pour établir ces densités cellulaires d'ensemencement, des courbes de croissance ont été réalisées pour des conditions d'ensemencement différentes (données non présentées dans ce manuscrit de thèse). Le milieu des flasques est renouvelé tous les 3 jours. Les cellules ne sont pas amplifiées au-delà de 20 passages pour éviter une dérive génétique.

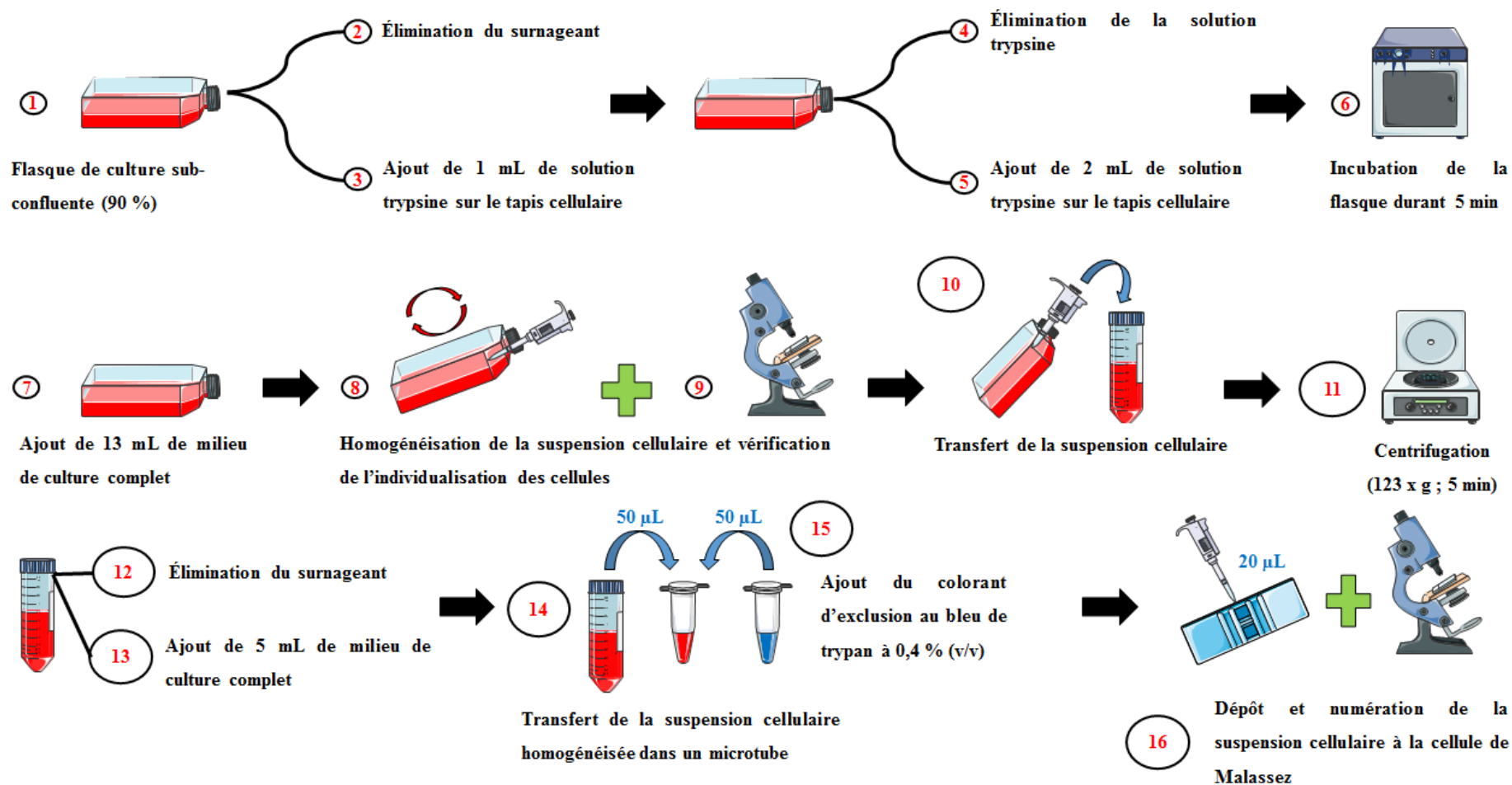


Figure 17. Procédure d'amplification des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*.

2. Cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

Le protocole est adapté des travaux menés sur *Dreissena polymorpha* par Quinn et al. (2009). Les conditions de culture (i.e., osmolarité du milieu, ratio et température de dissociation, condition d'ensemencement, et maintien des cultures) ont été optimisées lors d'essais préliminaires sur les tissus branchiaux et de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Ces essais ont été réalisés dans le cadre d'un stage de Master 2 (2016) et de DESU (2017) au laboratoire LIEC sous la direction du Pr. Carole Cossu-Leguille (données non montrées dans ce manuscrit de thèse). La composition du milieu de culture et les solutions pour la réalisation des cultures primaires sont détaillées dans les annexes 2 à 4.

2.1. Dissection, décontamination, et dissociation tissulaire des glandes digestives

Trois jours avant le début de la dissociation tissulaire, 3 corbicules sont isolées dans un cristallisoir contenant du milieu synthétique d'élevage. Pendant l'isolement, les individus ne sont pas nourris pour éviter une contamination des cultures primaires *in fine* par *Chlorella vulgaris*. Après cette période, sous un PSM de type II les bivalves sont disséqués, puis les glandes digestives sont récupérées et déposées dans une solution de tampon salin stérile SBS (étape 1 à 3, Figure 18). Pour éviter une contamination microbienne des cultures, les glandes digestives sont décontaminées (étape 4 à 6, Figure 18). Après avoir découpé les tissus en morceaux (1 à 2 mm²), 3 bains d'antibiotiques (10 mL ATB) et un rinçage au SBS sont effectués successivement, selon des durées et des concentrations en antibiotiques variables (ATB 4X pendant 30 minutes ; ATB 2X pendant 20 minutes ; ATB 1X pendant 10 minutes ; rinçage au SBS pendant 10 minutes). Ensuite, les glandes digestives sont dissociées par une digestion enzymatique à la pronase à 0,025 % (w/v) sous agitation pendant 8 h à 4 °C (étape 6 à 9, Figure 18).

2.2. Mise en culture des cellules primaires de glandes digestives

Sous un PSM de type II, la solution de dissociation est filtrée en utilisant un tamis cellulaire de 40 µm (Dutscher, réf : 149025). La solution est ensuite centrifugée (123 x g ; 10 minutes ; 15 °C), avant que le culot ne soit mis en suspension par 10 mL de SBS (étape 10 à 12, Figure 18). Cette étape est reproduite une deuxième fois pour éliminer les résidus de pronase, et limiter le nombre de débris cellulaires dans les cultures (étape 13 et 14, Figure 18).

Les cellules sont centrifugées une troisième fois (123 x g ; 10 minutes ; 15 °C) avant de reprendre le culot par 5 mL de milieu de culture complet (étape 15 et 16, Figure 18). La viabilité et la densité des cellules sont numérées à la cellule de Malassez au microscope optique (grossissement X 40). La numération est réalisée en utilisant la méthode de rétention au rouge neutre à 0,1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, réf : N4638-5G). Cet indicateur de l'intégrité lysosomale permet de distinguer les cellules viables en colorant les lysosomes en rouge (i.e., rétention du colorant liée à la perméabilisation de la membrane lysosomale), contrairement à ceux des cellules mortes (i.e., dégradation de la membrane lysosomale relarguant, par conséquent, le colorant) qui restent incolores. Après la numération, la suspension est ajustée à une densité cellulaire finale de 5×10^5 cellules/mL, puis celle-ci est répartie dans plusieurs flasques T₇₅. Enfin, les flasques sont placées dans une enceinte thermostatée (Eurochef, 15 °C ; 0 % CO₂ ; atmosphère humide) (étape 16 à 18, Figure 18).

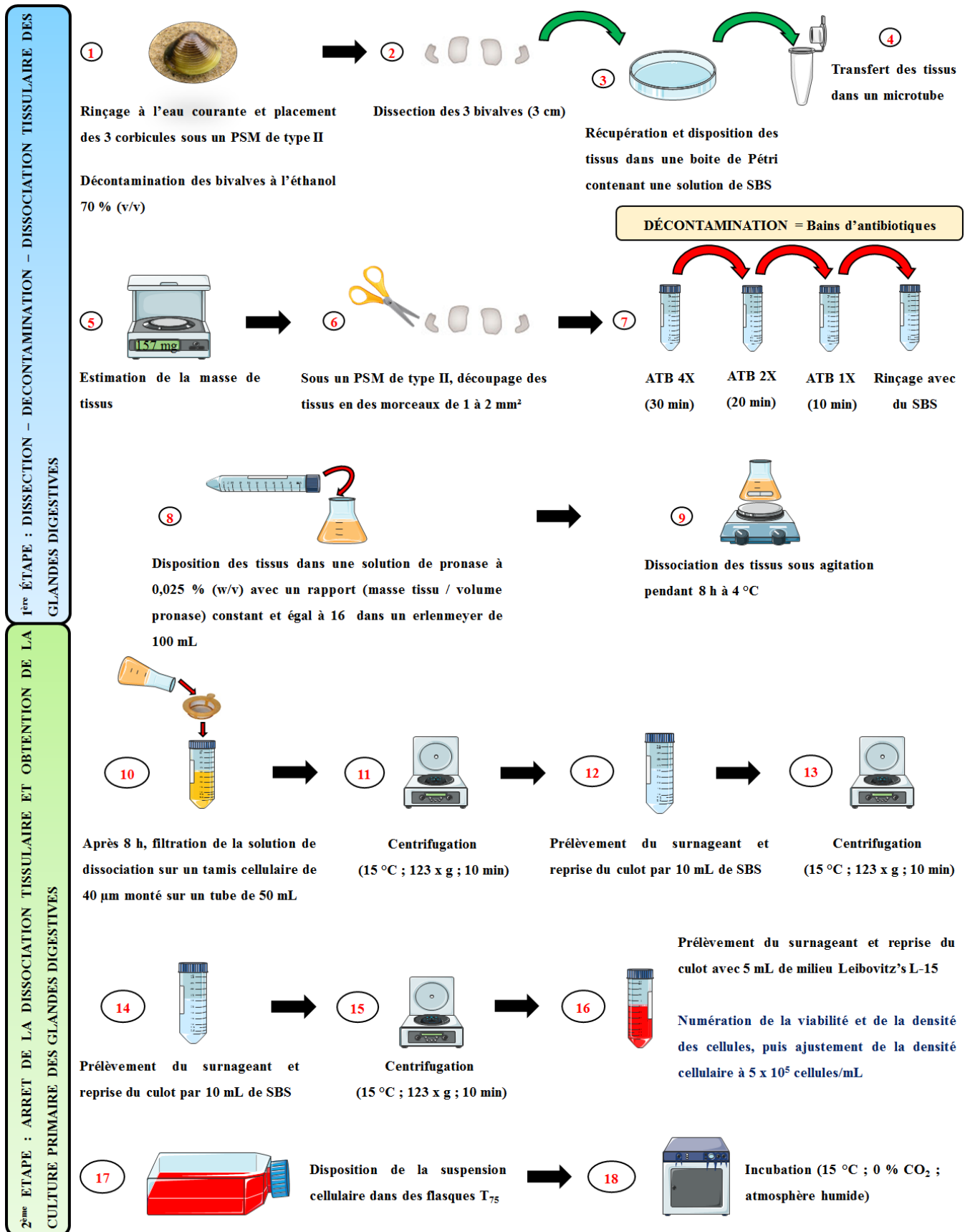


Figure 18. Protocole détaillé mis en œuvre pour le développement des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

Chap. III – Essais menés sur les lignées cellulaires de poissons

1. Évaluation de la toxicité des Lanthanides

1.1. Mesure de la viabilité cellulaire

Pour évaluer la toxicité des Lanthanides sur les lignées cellulaires de poissons, nous avons choisi de mesurer la viabilité cellulaire au moyen du test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium) établi par Mosmann (1983). Le principe du test repose sur la réduction du sel de tétrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase. Cette enzyme est fonctionnelle uniquement dans les mitochondries actives des cellules vivantes. La quantité de formazan ainsi produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

1.1.1. Préparation des solutions utilisées

Des solutions mères de Lanthanides (5 g/L en concentration de sel) ont été préparées par l'Assistante Ingénieure Danièle Pauly au laboratoire LIEC à partir des sels de Lanthanides : $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (réf : 262072), $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (réf : 228931), $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 205133), $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 289175), $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 518247), $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 212881), $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : G7532), $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 212903), $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 298158), $\text{HoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 289213), $\text{Er}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (réf : 298166), $\text{Tm}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (réf : 325996), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 337927), et $\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (réf : 298131). Tous les sels provenaient de Sigma-Aldrich à St. Louis, Missouri U.S.A, leur pureté était de 99,9 %.

Le sel de sodium MK571 (réf : M7571), et l'acide éthacrynique (réf : SML1083) ont été achetés chez Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri U.S.A. Le probénécide (réf : P36400) provenait de Molecular Probes® Invitrogen detection technologies, Québec, Canada. La pureté chimique de ces différents composés était supérieure à 95,0 %. À partir des poudres, des solutions mères ont été préparées à une concentration de 93 mM pour le MK571, 33 mM pour l'acide éthacrynique, et 250 mM pour le probénécide. En pratique, une ampoule de 25 mg de MK571 est reconstituée dans 500 μL (w/v) de DMSO. Une ampoule de 10 mg d'acide éthacrynique est solubilisée dans 1 mL (w/v) de DMSO. Une ampoule de 77 mg de probénécide

est recomposée dans 1 mL (w/v) de PBS 1X. Ces solutions mères sont aliquotées (100 µL) et stockées à -20 °C.

Une solution mère de dioxyde de silicium (1 g/L) a été préparée en dissolvant des pastilles de gels de silice (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri U.S.A, réf : 227196) dans de l'eau ultrapure. La pureté des pastilles de gels de silice était de 100 %.

Deux jours avant le début des expériences, les concentrations d'exposition ont été préparées en diluant les solutions mères dans les milieux respectifs sous un PSM de type II, puis stockées à 4 °C. Ces préparations ont été concentrées 4 fois (i.e., concentrations individuelles des Lanthanides, Dotarem[®], dioxyde de silicium, et d'inhibiteurs) ou 8 fois (i.e., concentrations des Lanthanides en mélanges binaires) par rapport aux concentrations nominales finales dans les milieux d'exposition. Par ailleurs, les solvants utilisés pour la préparation des inhibiteurs n'excédaient pas une concentration finale de 0,1 % de DMSO et de 1 % de PBS 1X dans le milieu d'exposition des cellules ZF4 de *Danio rerio* (Tableau 11).

Tableau 11. Volume d'inhibiteur ajouté dans le milieu d'exposition (Vf = 20 mL) des cellules ZF4 de *Danio rerio*.

Inhibiteur	Volume d'inhibiteur	Volume de milieu de culture
MK571 (0,1 % DMSO)	28,6 µL	19,9714 mL
Probénécide (1 % PBS)	212,5 µL	19,7875 mL
Acide éthacrynique (0,1 % DMSO)	20 µL	19,980 mL

1.1.2. Ensemencement des cellules en microplaque 96 puits

Six jours avant le début des expériences, les lignées cellulaires de poissons ont été cultivées dans des conditions standard de culture. Quand la confluence est atteinte (90 %), les cellules sont trypsinées et numérées à la cellule de Malassez au microscope optique selon la méthode d'exclusion au bleu de trypan à 0,4 % (v/v). Après la numération, la densité est ajustée à 2×10^5 cellules/mL pour les cellules ZF4, 1×10^5 cellules/mL pour les cellules ZFL, et $3,5 \times 10^5$ cellules/mL pour les cellules RTgill-W1 (étape 1, Figure 19). À l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µL de suspension cellulaire homogénéisée sont déposés dans chaque puits d'une microplaque 96 puits, excepté dans les lignes A et H et les colonnes 1 et 12 (étape 2 et 3, Figure 19) afin de limiter les effets de bord. Chaque puits est ensuite complété par 100 µL de

milieu de culture complet (90 μ L de milieu complet sans SVF pour les cellules ZFL). Pour les cellules ZFL, après avoir vérifié l'adhésion cellulaire au microscope optique à contraste de phase inversée (grossissement X 40) au bout de 30 minutes d'incubation, les puits sont complétés par 10 μ L de SVF (étape 4 à 6, Figure 19). Les lignes A et H et les colonnes 1 et 12 sont remplies par 200 μ L d'eau ultrapure (étape 7, Figure 19). La microplaque est placée pendant 24 h dans un incubateur ayant des conditions de température et de CO₂ identiques à celles utilisées lors de la culture des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss* (étape 8, Figure 19).

1.1.3. Exposition des lignées cellulaires

Lors des expositions, le nombre de cellules par puits est de 20 000 cellules ZF4, 10 000 cellules ZFL, et 35 000 cellules RTgill-W1. Ces quantités de cellules permettent d'obtenir une confluence de 90 % dans les puits après 4 jours de culture, produisant un signal de lecture optimale pour les témoins. Elles ont été sélectionnées après avoir testé pour 96 h différentes conditions d'ensemencement cellulaire lors d'essais préliminaires (données non montrées dans ce manuscrit de thèse). Après 24 h d'incubation, le milieu de culture des puits est aspiré, et les cellules sont rincées avec 100 μ L de milieu complet sans SVF pour enlever les débris cellulaires (étape 1 et 2, Figure 20). Dans les puits, le milieu est aspiré une nouvelle fois avant de déposer 150 μ L de milieu complet (étape 3 et 4, Figure 20) et 50 μ L de solution du composé toxique (cellules exposées) ou d'eau ultrapure (cellules témoins) (étape 5 et 6, Figure 20).

1.1.4. Arrêt des expositions et révélation du test MTT

À la fin de la durée d'exposition, une solution de tétrazolium est préparée à une concentration de 5 mg/mL, en dissolvant 30 mg de poudre de MTT (Sigma-Aldrich, réf : M2128) dans 6 mL d'une solution tampon phosphate saline PBS 1X (Eurobio, réf : CSP1PBS01-01). La solution est ensuite filtrée (0,22 μ m) sous un PSM de type II (étape 1 à 3, Figure 21). Dans chaque puits contenant les cellules témoins et exposées, 20 μ L de MTT sont ajoutés (étape 4, Figure 21). Après une incubation de 3 h 30 et avoir vérifié au microscope optique la formation de cristaux de formazan, le milieu d'exposition est aspiré (étape 5 à 7, Figure 21). Les cristaux sont dissous en ajoutant 100 μ L de DMSO dans chaque puits, puis la microplaque est agitée pendant 4 minutes (étape 8 à 10, Figure 21). Enfin, les absorbances sont

mesurées à 570 nm avec le lecteur de microplaque (Asys Expert Plus ; excitation : 544 nm ; émission : 580 nm) (étape 11, Figure 21).

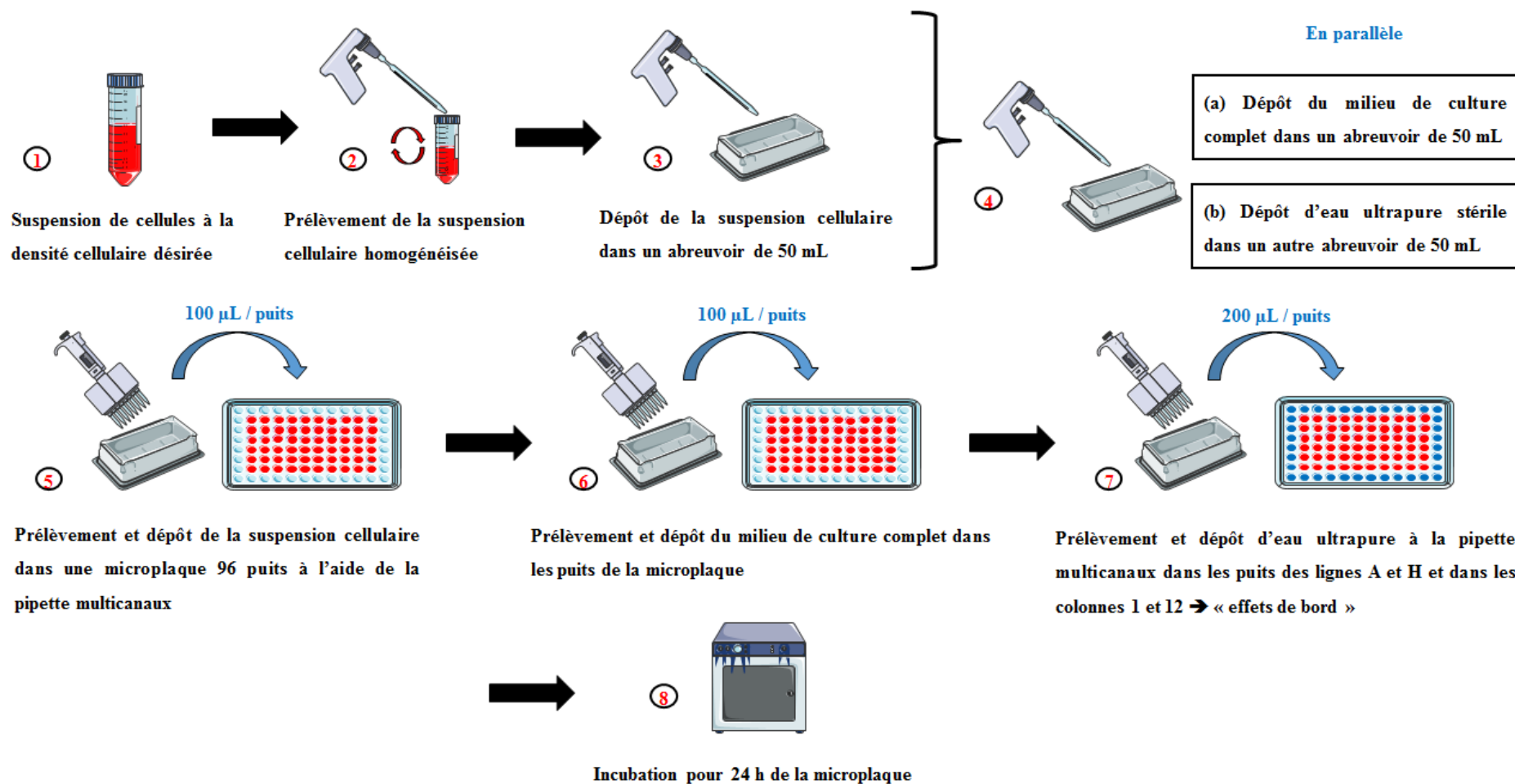


Figure 19. Essai de cytotoxicité : MTT – Première étape du protocole pour l'ensemencement des cellules.

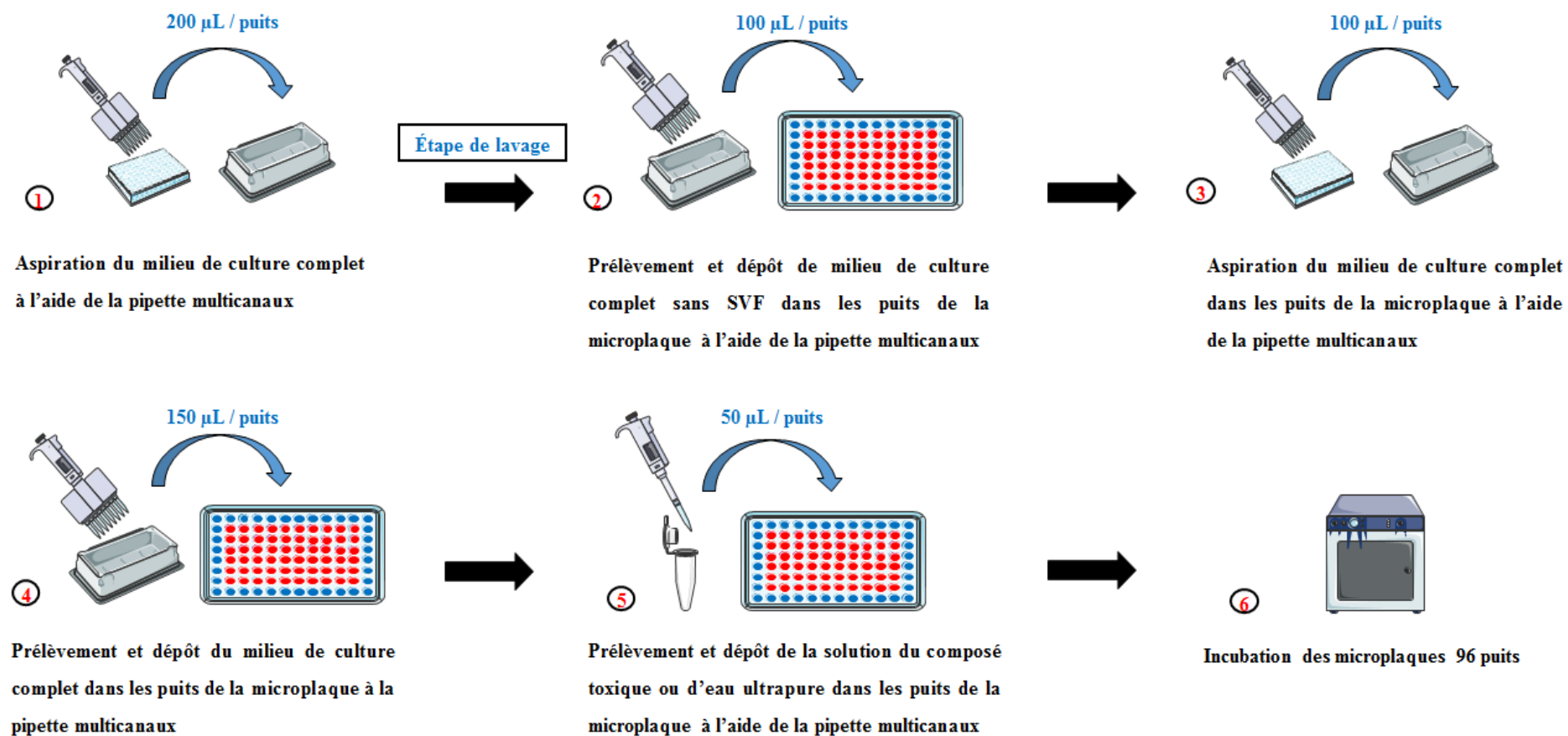


Figure 20. Essai de cytotoxicité : MTT – Deuxième étape du protocole mis en œuvre lors du lancement des expositions.

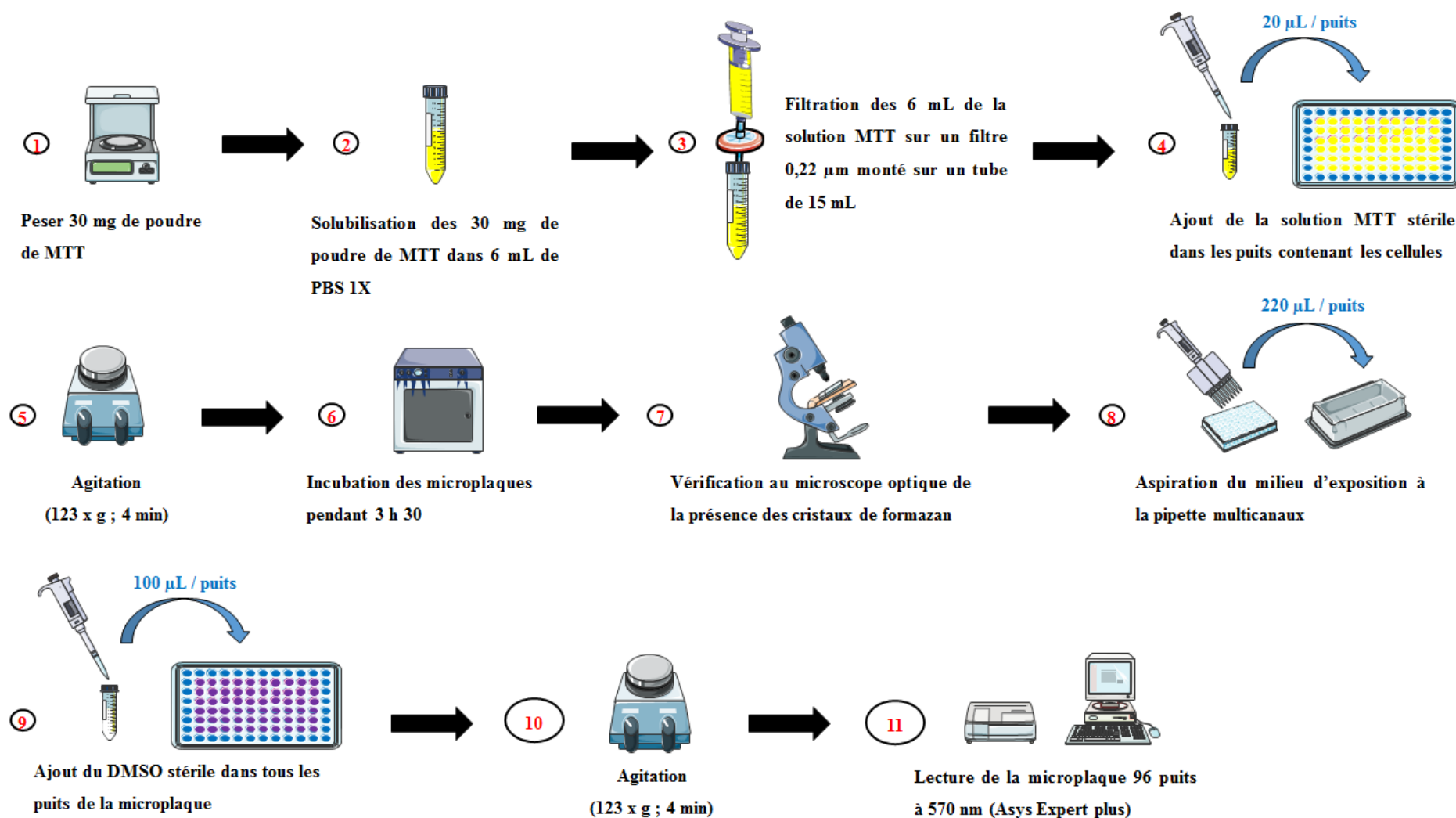


Figure 21. Essai de cytotoxicité : MTT – Troisième étape du protocole après arrêt des expositions et révélation au test MTT.

1.2. Toxicité individuelle des sels de Lanthanides

Tout d'abord, les cellules ZF4 ont été exposées pendant 24, 48, 72, et 96 h aux 14 sels de Lanthanides (La^{3+} au Lu^{3+}) à une gamme de concentrations nominales de 0 – 0,5 – 5 – 50 – 500 – 1 000 – 1 500 – 2 000 et 3 000 μM . En accord avec les différents acteurs du projet ANR ECOTREE, nous avons sélectionné ensuite un Lanthanide Léger (Nd^{3+}), Intermédiaire (Gd^{3+}), et Lourd (Yb^{3+}) afin d'étudier les possibles différences de toxicité entre les éléments sur d'autres modèles cellulaires. Ainsi, les effets toxiques individuels de ces 3 éléments retenus ont été étudiés sur les cellules ZFL et RTgill-W1 dans des conditions d'exposition identiques aux cellules ZF4. Les expositions ont été réalisées avec 4 réplicats par condition.

1.3. Impact des agrégats de Lanthanides

L'impact des agrégats de Lanthanides sur la toxicité observée sur nos modèles cellulaires a été étudié avec du dioxyde de silicium (SiO_2). Cette molécule inerte est capable de précipiter en présence de composés organiques et de former des agrégats. Ainsi, les cellules ZF4 ont été exposées durant 24, 48, 72, et 96 h à une gamme de concentrations nominales de 0 – 1,2 – 12 – 120 – 1 200 – 2 400 – 4 000 – 5 000 et 8 000 μM de SiO_2 . À titre informatif, cette gamme correspondait aux concentrations massiques qui ont été évaluées en moyenne pour les Lanthanides allant de 0,075 mg/L (i.e., 0,5 μM) à 500 mg/L (i.e., 3 000 μM). Les expositions ont été réalisées avec 6 réplicats par condition.

1.4. Toxicité d'un agent de contraste gadoliné

Outre la toxicité individuelle des sels de Lanthanides, la toxicité éventuelle de ces éléments sous leur forme chélate a été étudiée au moyen d'un agent de contraste gadoliné, i.e., le Dotarem[®]. Les cellules ZF4 ont été exposées pendant 24, 48, 72, et 96 h à une gamme de concentrations nominales de 0 – 0,5 – 5 – 50 – 500 – 1 000 – 1 500 – 2 000 et 3 000 μM de Dotarem[®]. Les expositions ont été réalisées avec 4 réplicats par condition.

1.5. Toxicité des sels de Lanthanides en mélanges

Pour une meilleure représentation environnementale, la toxicité des sels de Lanthanides en mélanges a été étudiée sur les différentes lignées cellulaires de poissons. Les concentrations nominales retenues pour les expositions correspondaient aux valeurs des concentrations effectives des Lanthanides (i.e., CE₅, CE₁₀, et CE₅₀ à t = 96 h) déterminées sur les cellules ZF4. Respectivement, ces concentrations sont : 164, 235, et 672 µM pour le Nd³⁺ ; 220, 290, et 849 µM pour le Gd³⁺ ; 149, 209, et 576 µM pour l'Yb³⁺. Les cellules ZF4 ont été exposées à de multiples mélanges binaires, alors que les cellules ZFL et RTgill-W1 n'ont été exposées qu'à quelques-unes de ces conditions (Tableau 12). Les expositions ont été réalisées pour une durée d'exposition de 96 h, répétées 3 fois avec 6 réplicats par condition.

Tableau 12. Concentrations nominales des Lanthanides testées individuellement et en mélanges binaires sur les cellules ZF4. Le texte en caractère gras correspond aux conditions testées sur les cellules ZFL et RTgill-W1.

Témoin		
Lanthanide		
164 µM Nd³⁺	220 µM Gd ³⁺	149 µM Yb³⁺
235 µM Nd ³⁺	290 µM Gd ³⁺	209 µM Yb ³⁺
672 µM Nd³⁺	849 µM Gd ³⁺	576 µM Yb³⁺
Mélange binaire de Lanthanide		
Nd ³⁺ + Gd ³⁺	Nd ³⁺ + Yb ³⁺	Gd ³⁺ + Yb ³⁺
164 µM Nd ³⁺ + 220 µM Gd ³⁺	164 µM Nd³⁺ + 149 µM Yb³⁺	220 µM Gd ³⁺ + 149 µM Yb ³⁺
164 µM Nd ³⁺ + 290 µM Gd ³⁺	164 µM Nd ³⁺ + 209 µM Yb ³⁺	220 µM Gd ³⁺ + 209 µM Yb ³⁺
164 µM Nd ³⁺ + 849 µM Gd ³⁺	164 µM Nd ³⁺ + 576 µM Yb ³⁺	220 µM Gd ³⁺ + 576 µM Yb ³⁺
235 µM Nd ³⁺ + 220 µM Gd ³⁺	235 µM Nd ³⁺ + 149 µM Yb ³⁺	290 µM Gd ³⁺ + 149 µM Yb ³⁺
235 µM Nd ³⁺ + 290 µM Gd ³⁺	235 µM Nd ³⁺ + 209 µM Yb ³⁺	290 µM Gd ³⁺ + 209 µM Yb ³⁺
672 µM Nd ³⁺ + 220 µM Gd ³⁺	672 µM Nd ³⁺ + 149 µM Yb ³⁺	849 µM Gd ³⁺ + 149 µM Yb ³⁺
672 µM Nd ³⁺ + 849 µM Gd ³⁺	672 µM Nd³⁺ + 576 µM Yb³⁺	849 µM Gd ³⁺ + 576 µM Yb ³⁺

1.6. Étude du rôle des protéines membranaires MRP-like dans la détoxification cellulaire des sels de Lanthanides

Le rôle des protéines membranaires MRP-like dans la détoxification cellulaire des Lanthanides a été étudié à l'aide de MK571 et de probénécide. Le sel de sodium MK571 est connu pour être un antagoniste des récepteurs leucotriène D₄ (LTD₄) et un inhibiteur des protéines MRP-like (Koley et Bard, 2012). L'acide benzoïque probénécide est connu pour inhiber les polypeptides transporteurs d'anions organiques (OAT) et les protéines membranaires MRP-like (Janneh et al., 2007). Le choix des composés et de leurs concentrations a été fait sur la base des résultats des travaux de Long et al. (2011a,b,c). Ces auteurs ont montré l'impact de ces inhibiteurs sur la toxicité du cadmium, du mercure, et de l'arsenic dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Notre essai a été réalisé en deux temps. Tout d'abord, les cellules ZF4 ont été exposées à des multiples concentrations de Lanthanides en présence et en absence des inhibiteurs. Ensuite et au regard des premiers résultats, nous avons voulu déterminer si sans induire d'impact direct sur la viabilité des cellules ZF4, les inhibiteurs de MRP-like pouvaient impacter la toxicité des Lanthanides au cours du temps (Tableau 13).

1.7. Évaluation du rôle des glutathion-S-transférases dans la détoxification cellulaire des sels de Lanthanides

Afin de déterminer le rôle des glutathion-S-transférases dans la détoxification cellulaire des Lanthanides, la toxicité du gadolinium a été mesurée en présence ou non d'acide éthacrynique, pour des durées et des concentrations d'exposition variables (Tableau 14). Cet inhibiteur est connu pour bloquer le co-transporteur sodium-potassium-chlorure (Na-K-Cl) (Ploemen et al., 1993 ; Allocati et al., 2018), et pour avoir montré un impact sur la toxicité du mercure, du cadmium, et de l'arsenic dans les cellules ZF4 de *Danio rerio* (Long et al., 2011a,b,c).

Tableau 13. Conditions d'exposition des cellules ZF4 de *Danio rerio* à différentes concentrations d'inhibiteurs et de Lanthanides testées seules et en mélanges.

Temps	Concentration de MK571 (a) et de probénécide (b)	Concentration de Lanthanide	Nombre de réplicats et de répétitions de l'essai
96 h	(a) 0 et 100 μM (b) 0 et 2 000 μM	Nd ³⁺ , Gd ³⁺ , et Yb ³⁺ : 0 - 0,5 - 5 - 50 - 500 - 1 000 - 1 500 - 2 000 et 3 000 μM	6 réplicats par condition, 1 répétition
96 h	(a) 0 - 5 - 10 - 25 - 50 et 100 μM (b) 0 - 100 - 250 - 500 - 1 000 et 2 000 μM	Nd ³⁺ : 0 - 235 et 672 μM Gd ³⁺ : 0 - 290 et 849 μM Yb ³⁺ : 0 - 209 et 576 μM	6 réplicats par condition, 3 répétitions
24, 48, 72, et 96 h	(a) 0 et 100 μM (b) 0 et 2 000 μM	Nd ³⁺ : 0 et 672 μM Gd ³⁺ : 0 et 849 μM Yb ³⁺ : 0 et 576 μM	6 réplicats par condition, 3 répétitions

Tableau 14. Conditions d'exposition des cellules ZF4 de *Danio rerio* à différentes concentrations d'acide éthacrynique et de gadolinium (Gd^{3+}) testées seules et en mélanges.

Temps	Concentration d'acide éthacrynique	Concentration de Lanthanide	Nombre de réplicats et de répétitions de l'essai
96 h	0 et 10 μ M	Gd^{3+} : 0 - 0,5 – 5 – 50 – 500 - 1 000 - 1 500 - 2 000 et 3 000 μ M	6 réplicats par condition, 1 répétition
96 h	0 - 0,1 – 1 – 5 et 10 μ M	Gd^{3+} : 0 – 290 et 849 μ M	6 réplicats par condition, 3 répétitions
24, 48, 72, et 96 h	0 et 10 μ M	Gd^{3+} : 0 et 849 μ M	6 réplicats par condition, 3 répétitions

1.8. Expression des résultats

La viabilité cellulaire (exprimé en pourcentage) est calculé selon 2 méthodes. La 1^{ère} méthode de calcul (Eq. 1) est utilisée pour mettre en évidence la toxicité individuelle et en mélange des composés testés sur les lignées cellulaires. La 2^{ème} méthode de calcul (Eq. 2) est employée pour déterminer uniquement la toxicité des Lanthanides testés en présence des différents inhibiteurs : MK571, probénécide, ou acide éthacrynique sur les cellules ZF4.

Viabilité cellulaire (%) = (absorbance des cellules exposées / absorbance des cellules témoins) x 100.

(Eq. 1)

Viabilité cellulaire (%) = (absorbance des cellules exposées à une concentration de Lanthanide et à une concentration d'inhibiteur / absorbance des cellules exposées uniquement à la même concentration d'inhibiteur) x 100.

(Eq. 2)

2. Mesure des concentrations de Lanthanides

Les concentrations de Nd^{3+} , de Gd^{3+} , et de Yb^{3+} ont été mesurées pour connaître les concentrations réelles d'exposition des cellules, et déterminer si ces éléments sont biodisponibles dans les milieux de culture. Les mesures ont été réalisées par ICP-MS au laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160) à Nantes en France, partenaire de l'ANR ECOTREE. Elles ont été mesurées à T_0 et après 96 h d'exposition dans les milieux d'exposition non filtrés et filtrés des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*, et sur les filtres. Chaque milieu de culture a été supplémenté par différentes solutions de Lanthanides seuls ou en mélanges (condition exposée ; valeurs de CE_5 , CE_{10} , et CE_{50} des Lanthanides déterminées sur les cellules ZF4 à $t = 96$ h), ou d'eau ultrapure (condition témoin). Toutes les mesures ont été faites en présence (condition biotique) et en absence (condition abiotique) des cellules.

En pratique, des flasques de culture T_{75} contenant 19,5 mL de milieu complet sont supplémentées par 6,5 mL de solution de Lanthanides ou d'eau ultrapure (Figure 22). Immédiatement après la préparation (T_0) et après 96 h d'exposition (T_{96}), la moitié de milieu est prélevée et acidifiée pour une concentration finale de 1 % (v/v) avec de l'acide nitrique

(HNO₃) concentré à 65 %. L'autre moitié est filtrée sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (Merck Millipore, réf : HAWPO4700). Préalablement, les membranes de nitrocellulose sont rincées en les filtrant par 100 mL d'HNO₃ préparé à 1 % (v/v) et par 1 L d'eau ultrapure dans le but d'éliminer toutes les particules résiduelles. Enfin, le filtrat est acidifié pour une concentration finale de 1 % (v/v) avec du HNO₃ concentré à 65 %. Toutes les solutions acidifiées et les filtres sont stockés à 4 °C avant les analyses par ICP-MS. Les résultats sont exprimés en pourcentage et ont été calculés sur la base des résultats analytiques, i.e., le rapport entre les concentrations réelles et les concentrations nominales d'exposition.

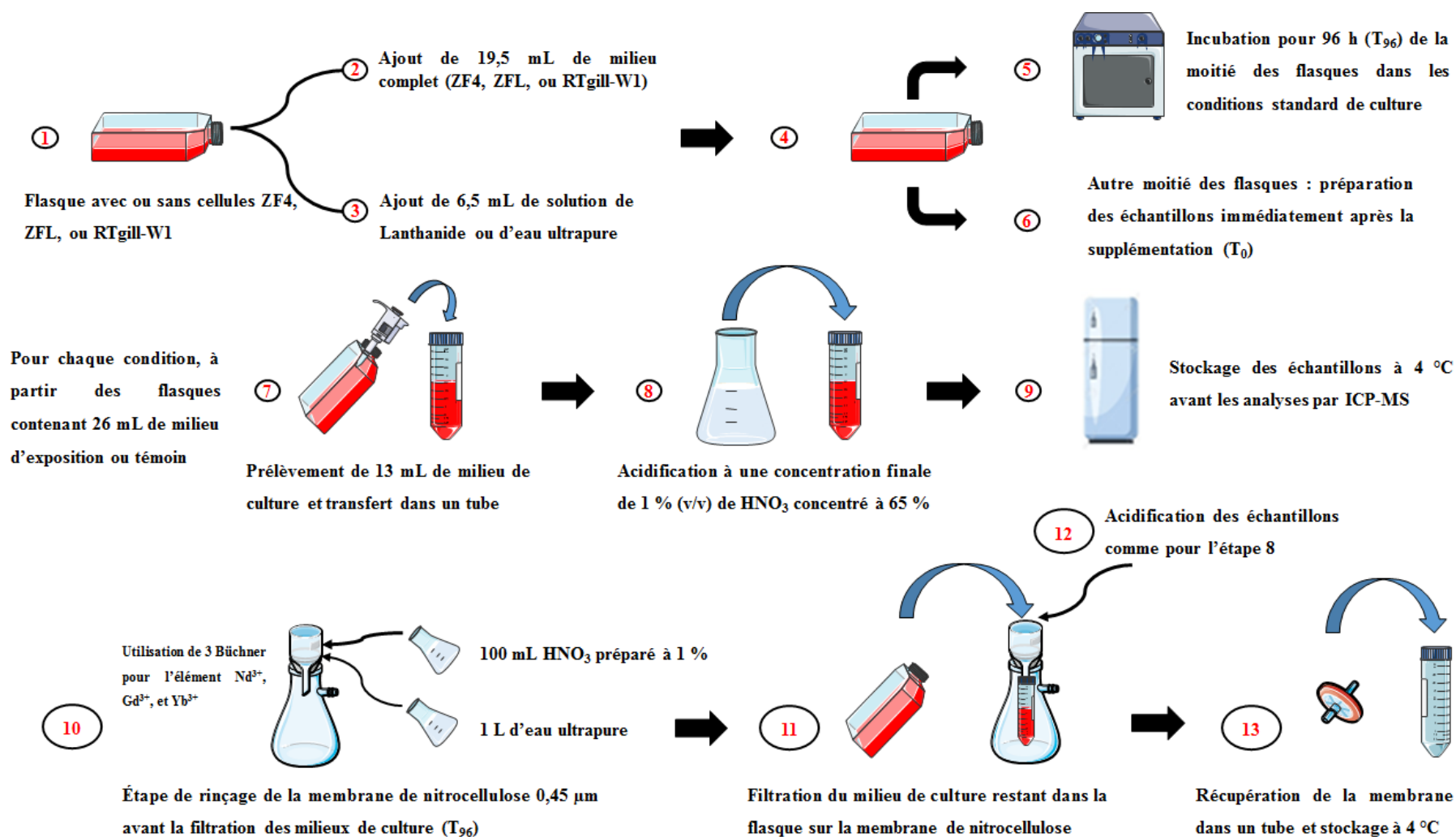


Figure 22. Protocole pour la mesure par ICP-MS des concentrations nominales en Nd^{3+} , en Gd^{3+} , et en Yb^{3+} dans le milieu de culture des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, et RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss* (conditions biotique et abiotique), immédiatement après la supplémentation (T_0) et après 96 h (T_{96}) d'incubation.

Chap. IV – Essais menés sur les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

1. Évaluation de la toxicité des Lanthanides

1.1. Validation de la sensibilité des cultures primaires

Avant de mesurer la toxicité des Lanthanides, la sensibilité des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* a été étudiée à l'aide du peroxyde d'hydrogène. Pour cette étude, les cellules primaires ont été exposées pendant 30 minutes à une gamme de concentrations de 0 – 0,015 – 0,0375 – 0,15 – 0,75 – 1,50 – 3,75 et 7,5 % en peroxyde d'hydrogène. Les expositions ont été effectuées au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture. Les expositions ont été réalisées avec des triplicats par condition.

1.1.1. Préparation du peroxyde d'hydrogène

La solution commerciale en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ concentré à 30 % ; Sigma-Aldrich, réf : H1009) a été titrée au laboratoire LIEC. La solution mère a été diluée au 1/500^e, au 1/1000^e, et au 1/2000^e dans de l'eau ultrapure, puis les absorbances ont été mesurées à 280 nm au spectrophotomètre (Specord[®] 205, AnalytikJena). À partir des valeurs d'absorbance, la pureté de la solution mère a été calculée d'après la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot L \cdot c$

- **A** : absorbance (sans unité)
- **ϵ** : coefficient d'absorption molaire (L/mol/cm²)
- **l** : trajet optique (1 cm)
- **c** : concentration molaire de la substance (mol/L)

L'analyse après titration a montré une dégradation de 4 % de la solution mère de H₂O₂. En considérant cette dégradation dans nos essais, les concentrations d'exposition ont été préparées en diluant la solution mère H₂O₂ concentrée à 26 % dans du milieu Leibovitz's L-15 à 10 % de SVF (v/v).

1.1.2. Exposition des cellules primaires au peroxyde d'hydrogène

Un jour avant le début des expositions, une culture primaire de glandes digestives de *Corbicula fluminea* a été obtenue. Cette culture présentait une viabilité cellulaire dont le taux était supérieur à 70 % et une densité cellulaire de 5×10^5 cellules/mL. Un jour après la mise en culture, les cellules primaires sont mises en suspension à l'aide d'un scraper de $0,45 \mu\text{m}$ (Thermo Fisher Scientific, Nunc™), puis cette suspension est prélevée et répartie dans des microtubes (1 mL) (étape 1, Figure 23). Après une centrifugation, le surnageant est aspiré et le culot cellulaire de chaque microtube est repris par 1 mL de milieu complet contenant le peroxyde d'hydrogène à la concentration désirée (étape 2 et 3, Figure 23). Après 30 minutes d'incubation, les microtubes sont centrifugés ($123 \times g$; 10 minutes ; 15°C), puis les surnageants sont aspirés, et les culots cellulaires sont repris par 1 mL de SBS (étape 4 à 6, Figure 23).

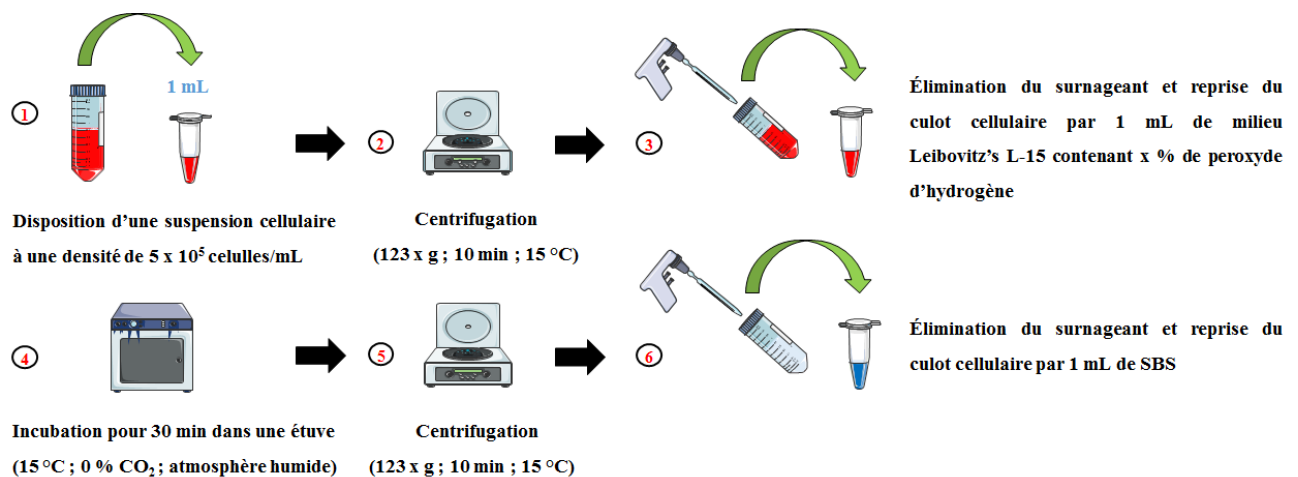


Figure 23. Protocole mis en œuvre pour les expositions des cellules primaires de *Corbicula fluminea* au peroxyde d'hydrogène.

1.2. Toxicité individuelle des sels de Lanthanides

Cet essai visait à démontrer la pertinence des cultures primaires de *Corbicula fluminea* pour évaluer la toxicité des Lanthanides. Pour ce faire, les cellules primaires ont été exposées pendant 96 h aux 14 sels de Lanthanides (La^{3+} au Lu^{3+}) à une concentration nominale finale de 1 mM dans le milieu de culture Leibovitz's L-15 à 10 % de SVF. Le choix de cette concentration d'exposition a été fait d'après les résultats mis en évidence par Laville et al. (2004). Ces auteurs ont montré un impact cytotoxique du GdCl_3 sur les cellules primaires d'hépatocytes

d'*Oncorhynchus mykiss*, avec une valeur calculée de CE₅₀ de 956 µM (i.e., 150 mg/L) après une exposition de 24 h. Les expositions n'ont pu être réalisées qu'une fois avec des triplicats par condition, en raison d'une contamination par *Mycellium sp.*, dans les dernières cultures primaires.

1.2.1. Préparation des concentrations des sels de Lanthanides

Les concentrations individuelles des sels de Lanthanides ont été préparées comme décrit précédemment lors des essais réalisés sur les lignées cellulaires de poissons (cf. Matériels et Méthodes – III. 1.1.1. Préparation des solutions utilisées).

1.2.2. Exposition des cellules primaires aux Lanthanides

24 heures avant le début des expositions, une culture primaire de *Corbicula fluminea* a été obtenue. Cette culture présentait une viabilité cellulaire dont le taux était supérieur à 70 % et une densité cellulaire de 5×10^5 cellules/mL. Un jour après la mise en culture, les cellules primaires sont mises en suspension à l'aide d'un scraper de 0,45 µm (Thermo Fisher Scientific, Nunc™), puis les flasques sont poolées. La densité cellulaire est mesurée en cytométrie de flux et ajustée à $5,4 \times 10^5$ cellules/mL (étape 2 à 4, Figure 24). À partir du pool cellulaire homogénéisé (aspirations et refoulements), des flasques T₂₅ (4,5 mL) sont préparées (étape 5, Figure 24) et complétées par 0,5 mL de solution de Lanthanide (cellules exposées) ou d'eau ultrapure (cellules témoins) (étape 6, Figure 24). Pendant l'exposition, la densité cellulaire finale est de 5×10^5 cellules/mL. Par une série d'aspirations et de refoulements, le milieu est homogénéisé, avant de placer les flasques dans un incubateur à 15 °C (étape 7, Figure 24). À la fin de la durée d'exposition, les cellules primaires sont mises en suspension à l'aide d'un scraper de 0,45 µm (étape 8, Figure 24), puis transférées dans des tubes pour être centrifugées (123 x g ; 10 minutes) (étape 9 et 10, Figure 24). Le milieu d'exposition est aspiré, et le culot de chaque tube est repris par 5 mL de SBS (étape 11 et 12, Figure 24). En parallèle de ces expositions, des témoins positifs sont réalisés en exposant les cellules primaires pendant 30 minutes à 0,75 % de peroxyde d'hydrogène. Le protocole de cette exposition est identique à celui décrit précédemment pour l'essai du peroxyde d'hydrogène sur les cellules primaires.

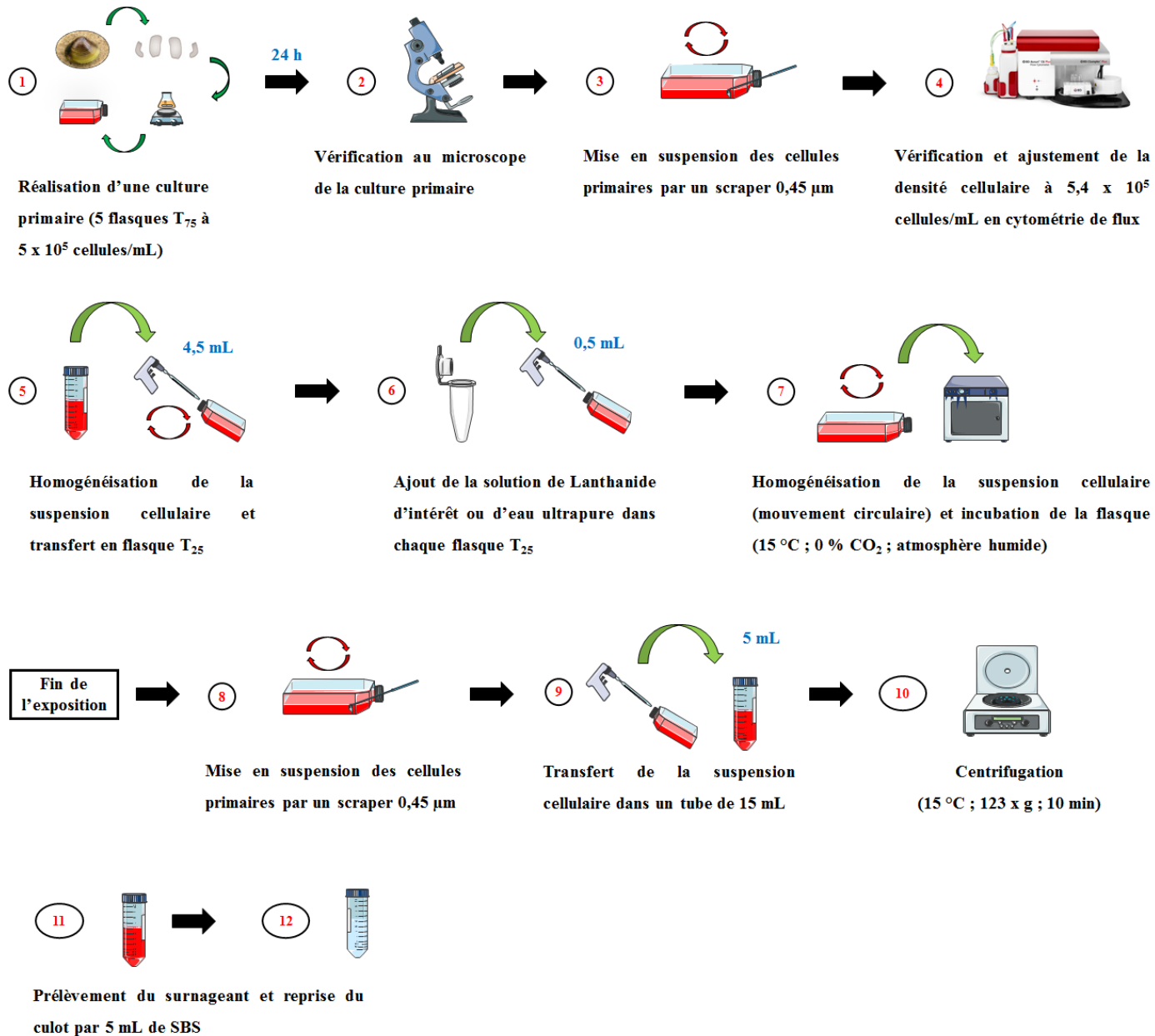


Figure 24. Protocole détaillé des expositions aux Lanthanides des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

1.3. Analyse de la densité et de la viabilité cellulaire en cytométrie de flux

Pour évaluer la toxicité du peroxyde d'hydrogène et des Lanthanides sur les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*, nous avons choisi de mesurer la viabilité et la densité des cellules en cytométrie de flux (BD accuri 6). Le protocole a été mis au point au laboratoire LIEC avec la collaboration du Dr. Bénédicte Sohm, et repose sur un principe de double marquage de la viabilité / mortalité cellulaire par la calcéine-AM (Ca-AM) et l'iode

de propidium (IP). La calcéine-AM (calcéine-acétoxyméthyle) va pénétrer toutes les cellules possédant des estérases actives. Celles-ci vont cliver par hydrolyse enzymatique la calcéine-AM et libérer la calcéine fluorescente. Le nombre de cellules viables est mesuré à partir d'un pic d'acquisition en FL1 (excitation : 495 nm ; émission : 515 nm). L'iodure de propidium (diiodure de 3,8-diamino-5,6-phénylphénantridinium), quant à lui, va entrer uniquement dans les cellules dont les membranes sont endommagées et devenir fluorescent en se liant à l'ADN. Le nombre de cellules mortes est mesuré sur un pic d'acquisition en FL3 (excitation : 305 nm ; émission : 538 / 617 nm).

1.3.1. Préparation de la solution de double marquage Ca-AM / IP

Une solution mère à 1 mM a été préparée pour le marqueur Ca-AM (InvitrogenTM Molecular ProbesTM Thermo Fisher Scientific, réf : C1430). Une ampoule de 1 mg de Ca-AM est reconstituée en ajoutant 50 µL (w/v) de DMSO. La solution est ensuite aliquotée (5 µL) et complétée par de l'eau ultrapure (45 µL) pour une concentration finale de 100 µM. Ces aliquots sont stockés à -80 °C. Quant à la solution de double marquage Ca-AM / IP, elle est préparée le jour de l'analyse. Celle-ci se compose de 10 µL de Ca-AM à 100 µM, 5 µL de iodure de propidium à 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, réf : P4864), et 1 mL de SBS.

1.3.2. Mesure des échantillons en cytométrie de flux

Après le traitement des échantillons au peroxyde d'hydrogène ou aux Lanthanides, des microtubes de suspension cellulaire (1 mL) sont préparés pour chaque condition d'exposition (étape 1, Figure 25). Après une centrifugation des microtubes (123 x g ; 10 minutes ; 15 °C), le surnageant est aspiré, et le culot est mis en suspension par 1 mL de SBS (étape 2 et 3, Figure 25). Par la suite, la suspension cellulaire de chaque microtube est répartie dans deux autres microtubes (200 µL) (étape 4, Figure 25). Ceux-ci sont centrifugés, et les surnageants sont aspirés. Enfin, les culots sont repris par 200 µL de la solution de double marquage Ca-AM / IP ou par 200 µL de SBS (étape 5 et 6, Figure 25). Les suspensions cellulaires homogénéisées (aspirations et refoulements) sont disposées en microplaque 96 puits (200 µL / puits). Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, la microplaque est lue au cytomètre en flux (20 000 évènements ; seuil de détection à 25 000) (étape 7 et 8, Figure 25).

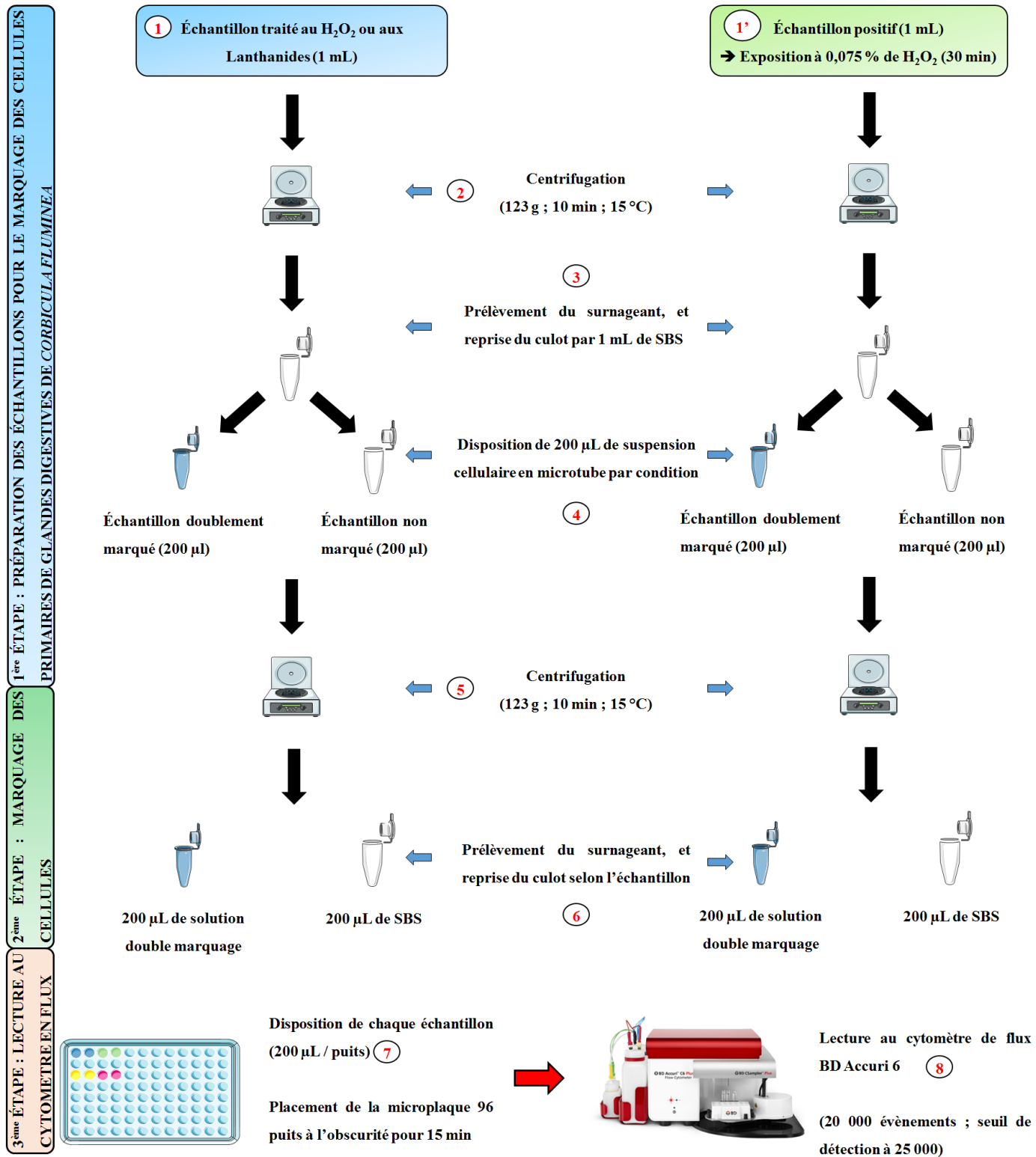


Figure 25. Protocole détaillé pour la mise en œuvre du double marquage des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* par la méthode Ca-AM / IP en cytométrie de flux.

1.4. Expression des résultats

À partir des données d'acquisition, le nombre de cellules viables (FL1) et mortes (FL3) dans un volume d'échantillon analysé, atteignant 20 000 événements, est déterminé en plaçant graphiquement des seuils (i.e., régions ou limites séparant les cellules comptées des débris cellulaires et des artefacts). Un seuil est également placé sur une troisième acquisition (FL1 vs FL3), afin d'éliminer les cellules doublement marquées qui apparaissent à la fois sur les données FL1 et FL3. À partir des seuils en FL1, en FL3, et en FL1 vs FL3, le nombre total de cellules (Eq. 3), la densité (Eq. 4) et la viabilité (Eq. 5) cellulaire sont calculés.

$$\begin{aligned} \text{Nombre total de cellules} = & \text{Nombre de cellules viables}_{(FL1)} + \text{Nombre de cellules mortes}_{(FL3)} - \\ & \text{Nombre de cellules doublement marquées}_{(FL1 \text{ vs } FL3)} \end{aligned} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\begin{aligned} \text{Densité cellulaire (cellules/mL)} = & (\text{Nombre total de cellules} / \text{Volume } \mu\text{L d'échantillon analysé}) \\ & \times 1\,000 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\begin{aligned} \text{Viabilité cellulaire (\%)} = & (\text{Nombre de cellules viables}_{(FL1)} / \text{Nombre total de cellules}) \times 100 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 5})$$

À partir de ces données, l'effet cytotoxique induit par le peroxyde d'hydrogène ou les Lanthanides est calculé. Cet effet est le rapport de densité entre les cellules exposées et témoins, en considérant uniquement la densité des populations viables dans les échantillons.

Chap. V – Traitements statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel R (version 4.0.0, package DRC, R Development Core Team, 2020).

1. Analyses de la toxicité des Lanthanides sur les lignées cellulaires de poissons

1.1. Analyse de la toxicité individuelle des Lanthanides

Pour les expositions impliquant une gamme de concentrations de Lanthanide, de dioxyde de silicium, ou d'agent de contraste gadoliné (Dotarem[®]), une courbe dose-réponse est modélisée à partir des données de viabilité cellulaire en utilisant la fonction de distribution cumulative (CDF) du modèle log-logistique. À partir de ces modèles, les concentrations effectives (CE) correspondant à 5 % (CE₅), 10 % (CE₁₀), et 50 % (CE₅₀) d'effet toxique sur la viabilité cellulaire avec les intervalles de confiance à 95 % sont calculés.

Pour déterminer s'il existe une différence éventuelle de sensibilité entre les lignées cellulaires de poissons, une analyse de la variance (ANOVA 3 facteur avec interactions ; seuil de significativité $\alpha = 0,01$) a été effectuée, en considérant l'effet du Lanthanide, le type cellulaire, et l'effet du temps sur les valeurs de toxicité (i.e., CE₅₀ après une transformation logarithmique). Pour ce faire, l'analyse a été réalisée selon un plan factoriel complet associées aux facteurs « Lanthanide » (2 niveaux : Nd³⁺, Yb³⁺), « Type cellulaire » (3 niveaux : ZF4, ZFL, et RTgill-W1), et « Temps » (4 niveaux : 24 h, 48 h, 72 h, et 96 h).

Dans les essais évaluant les rôles des protéines membranaires MRP-like et des glutathion-S-transférases dans la détoxification cellulaire des Lanthanides, une analyse de la variance est réalisée (ANOVA 1 facteur ; seuil de significativité $\alpha = 0,01$). Cette analyse permet de mettre en évidence l'impact de la concentration des inhibiteurs MRP-like et des GST sur la toxicité des Lanthanides.

Pour étudier l'impact des inhibiteurs MRP-like et des GST sur la toxicité des Lanthanides au cours du temps, les réponses observées pour un temps d'exposition donné sont comparées deux à deux, c'est à dire en comparant la toxicité du Lanthanide en présence et en absence d'une

concentration d'inhibiteur à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA 2 facteurs ; seuil de significativité $\alpha = 0,01$). Pour cela, l'analyse a été réalisée selon un plan factoriel complet associées aux facteurs « Concentration en inhibiteur » (2 niveaux : Présence d'une concentration en inhibiteur, Absence d'une concentration en inhibiteur), et « Temps » (4 niveaux : 24 h, 48 h, 72 h, et 96 h).

Pour l'ensemble de ces tests, l'homoscédasticité et la normalité de distribution des données à l'intérieur de chaque groupe sont vérifiées respectivement par le test de Levene et de Shapiro-Wilk au seuil de significativité fixé à $\alpha = 0,05$. Pour chaque analyse de la variance, lorsque des différences significatives sont montrées, un test de comparaison post-hoc deux à deux (test de Tukey HSD) est employé pour préciser les différences entre les groupes.

1.2. Analyse de la toxicité des mélanges de Lanthanides

Préalablement, l'hypothèse de l'homogénéité des variances dans les groupes de réplicats, associées aux différentes combinaisons de concentrations considérées est testée en utilisant le test de Levene (i.e., test de Brown-Forsythe pour l'homogénéité des variances). Par la suite, le modèle de régression linéaire log-logistique pondérée (WLR) est utilisé pour décrire la variation de viabilité cellulaire, comme une fonction de concentrations des deux Lanthanides dans chaque mélange étudié. Le modèle considère également leur interaction, dénoté par le signe * (Eq. 6).

$$\text{Log}_{10}(\text{viabilité cellulaire}) = \beta_1 \text{Lanthanide 1} + \beta_2 \text{Lanthanide 2} + \beta_{12} \text{Lanthanide 1} * \text{Lanthanide 2} \quad (\text{Eq. 6})$$

L'utilisation du modèle WLR est motivée, d'une part, par son aptitude à mieux répondre aux exigences des méthodes statistiques paramétriques (i.e., normalité et homogénéité de la variance), et d'autre part, pour examiner la nature multiplicative des effets toxiques sur la viabilité des cellules exposées aux mélanges de Lanthanides. La pondération assignée à chaque point dans les données est la moyenne de viabilité cellulaire de la condition considérée. Le test des coefficients de régression (i.e., β_1 , β_2 , et β_{12}), ainsi que l'obtention des modèles ajustés sont effectués en utilisant une procédure descendante par étape avec un seuil de signification fixé à $\alpha = 0,01$, pour tous les tests statistiques. La réponse prédite dans chaque mélange par le modèle WLR est traitée graphiquement en utilisant la méthode des surfaces de réponses (approche

RSM, package plot3D du logiciel R). Les viabilités cellulaires calculés à partir de chaque modèle ajusté sont ainsi représentés à la fois dans un graphique en 3D de surface et dans un graphique en 2D des contours de toxicité.

2. Analyse de la toxicité des Lanthanides sur les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

2.1. Analyse de la sensibilité des cultures primaires suite à des expositions au peroxyde d'hydrogène

Des courbes dose-réponses sont modélisées à partir des données de cytotoxicité obtenues à la suite des expositions des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* au peroxyde d'hydrogène. Par conséquent, les concentrations effectives (i.e., CE₅, CE₁₀, et CE₅₀) associées à leurs intervalles de confiance à 95 % sont calculés.

2.2. Analyse de la toxicité des sels de Lanthanides sur les cultures primaires

La toxicité des 14 sels de Lanthanides sur les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* est étudiée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA 1 facteur ; seuil de significativité $\alpha = 0,01$). Cette analyse compare les réponses d'effet cytotoxique de chaque condition d'exposition. Lorsque des effets significatifs sont observés par le test de l'ANOVA, un test de comparaison post-hoc deux par deux (test de Tukey HSD) est appliqué.

Afin de mettre en évidence l'existence éventuelle d'une relation entre la toxicité et la masse atomique des Lanthanides, un test de corrélation de Pearson ($p < 0,01$) est effectué sur les données de cytotoxicité des 14 Lanthanides sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

L'homoscédasticité et la normalité de distribution des données à l'intérieur de chaque groupe sont vérifiées respectivement par le test de Levene et de Shapiro-Wilk au seuil de significativité fixé à $\alpha = 0,05$.

Résultats

Chap. I – Étude de la toxicité individuelle et en mélange des Lanthanides sur différentes lignées cellulaires de poissons (ARTICLE)

Depuis 30 ans, les Lanthanides sont devenus des métaux d'une importance cruciale en raison de leur utilisation croissante dans les nouvelles technologies. La surexploitation des Lanthanides a contribué, par conséquent, à une libération importante de ces composés *via* les rejets miniers, hospitaliers, et industriels vers le compartiment aquatique. En l'absence de législation, les Lanthanides sont à l'heure actuelle toujours déversés dans les eaux superficielles. Cependant, dans une politique mondiale de développement durable qui vise à préserver la qualité des écosystèmes, l'impact toxique des Lanthanides sur les organismes qui vivent dans ces écosystèmes est un sujet d'actualité. Au regard de la littérature les données d'écotoxicité des Lanthanides disponibles, restent limitées et ne permettent pas de conclure sur la toxicité individuelle des Lanthanides. Par ailleurs, les études relatant de la toxicité de ces éléments en mélanges sont également peu nombreuses, et aucune conclusion n'a été établie concernant leurs effets (i.e., antagonisme, additivité, synergie).

Afin d'apporter des nouvelles connaissances concernant la toxicité cellulaire des Lanthanides, ces travaux ont été réalisés en utilisant les lignées cellulaires ZF4 (ATCC[®], CRL-2050[™]) et ZFL (ATCC[®], CRL-2643[™]) de *Danio rerio*, et la lignée cellulaire RTgill-W1 (ATCC[®], CRL-2523[™]) d'*Oncorhynchus mykiss*. Notre étude avait pour objectif d'évaluer la toxicité seule et en mélange de trois Lanthanides retenus dans le programme ANR ECOTREE, i.e., le néodyme, le gadolinium et l'ytterbium, et de vérifier si leur toxicité peut être considérée comme représentative de celle des autres Lanthanides Légers, Intermédiaires, et Lourds. Pour comprendre l'impact toxique des Lanthanides, nous avons déterminé quelle était la biodisponibilité de ces métaux dans les milieux d'essai. Pour cela, les concentrations d'exposition du Nd³⁺, du Gd³⁺, et de l'Yb³⁺ testés seuls et en mélange ont été mesurées par ICP-MS dans le milieu de culture de chaque lignée cellulaire. Pour étudier la toxicité des Lanthanides, les cellules ZF4 ont été exposées pendant 24, 48, 72, et 96 h aux 14 Lanthanides (La³⁺ au Lu³⁺) à des concentrations nominales comprises entre 0 et 3 000 µM. Les cellules ZFL et RTgill-W1 ont, quant à elles, été exposées au néodyme et à l'ytterbium, dans des conditions d'exposition identiques aux cellules ZF4. Pour une meilleure représentation de la situation environnementale, la toxicité des Lanthanides en mélanges a aussi été évaluée. Pour ce faire,

l'impact toxique de différents mélanges binaires constitués de Nd^{3+} , de Gd^{3+} , et de Yb^{3+} a été étudié sur la lignée ZF4, tandis que différents mélanges binaires constitués de Nd^{3+} et de Yb^{3+} ont été testés sur les cellules ZFL et RTgill-W1. Les trois lignées cellulaires de poissons exposées pendant 96 heures.

Les résultats des analyses par ICP-MS ont montré des concentrations réelles des Lanthanides très proches des concentrations nominales d'exposition dans le milieu de culture des cellules ZF4, ZFL, et RTgill-W1 (85 à 99 %). En rapport avec l'absence d'impact de dioxyde de silicium (testé à des concentrations similaires à celles des Lanthanides utilisés) sur la viabilité des cellules ZF4, nous avons considéré qu'une faible présence d'agrégats de Lanthanides n'impactait pas la toxicité cellulaire observée lors de nos manipulations. Nos résultats ont souligné un impact toxique du Nd^{3+} , du Gd^{3+} , et de Yb^{3+} sur les cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio*, ainsi que sur les cellules RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*. Cet impact toxique s'observait clairement par une diminution graduelle de la viabilité des lignées cellulaires de poissons aux plus fortes concentrations de Lanthanides, après 24, 48, 72, et 96 h d'exposition. L'évaluation de la toxicité des 14 Lanthanides sur les cellules ZF4 de *Danio rerio* a mis en évidence une toxicité plus marquée pour les quatre Lanthanides les plus lourds (Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , et Lu^{3+}) alors que Eu^{3+} , un Lanthanide Léger et le Tb^{3+} , un Lanthanide Intermédiaire, présentent la toxicité la plus faible. En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité des Lanthanides en mélanges, des effets de synergie sont observés pour toutes les conditions évaluées et sur toutes les lignées cellulaires. Globalement, l'utilisation des approches *in vitro* couplées à l'utilisation de modèles statistiques apparaissent comme des outils pertinents pour évaluer le risque écotoxicologique des Lanthanides.

Toxicity of Lanthanides on various fish cell lines

Emmanuel Fleurbaix^a, Marc Parant^a, Armand Maul^a, Carole Cossu-Leguille^{a,*}

^a LIEC - Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, CNRS, rue du Général Delestraint, F-57000 Metz, France

* Corresponding author.

Email addresses: emmanuel.fleurbaix@univ-lorraine.fr, marc.parant@univ-lorraine.fr,
armand.maul@univ-lorraine.fr, carole.leguille@univ-lorraine.fr

Abstract

The growing use of Lanthanides in new technologies has increased their anthropogenic releases into the aquatic environment over the last decades. However, knowledge on their ecotoxicological impacts is still incomplete, especially with regard to biological effects of Lanthanides mixtures and the possible regular variation in toxicity along the Lanthanides series. The present study evaluated individual toxicity of all Lanthanides and mixtures toxicity of three of them, namely Neodymium (Nd^{3+}), Gadolinium (Gd^{3+}), and Ytterbium (Yb^{3+}) on *Danio rerio* fibroblast-like cells (ZF4). Individual and mixtures toxicity of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) were also assessed on *Danio rerio* hepatic cells (ZFL) and *Oncorhynchus mykiss* epithelial cells (RTgill-W1). The measured Lanthanide concentrations were close to the nominal ones in the culture media of ZF4, ZFL, and RTgill-W1 cells (85 to 99 %). A toxic impact was observed on the three fish cell lines exposed to all Lanthanides tested individually. Four Lanthanides (Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , and Lu^{3+}) showed a higher toxicity than the others on ZF4 cells but no correlation could be established between the toxicity of Lanthanides and the order of the elements within the Lanthanides series. Exposures to binary mixtures highlighted the presence of synergistic effects on cell viability for all cell lines. Our study supports the need of further studies to understand the toxicity of Lanthanides in aquatic environments.

Keywords: Aquatic ecotoxicology, Lanthanide, Mixture effect, Fish cell line, Cytotoxicity

1. Introduction

Lanthanides are a group of fifteen elements from Lanthanum ($Z = 57$) to Lutetium ($Z = 71$) and may be divided into three groups: light (Lanthanum to Neodymium), medium (Samarium to Gadolinium), and heavy (Terbium to Lutetium). Due to their chemical and physical properties (Yoshida et al., 1997), Lanthanides are widely used in various fields such as industry (Celik et al., 2015), medical (Cabella et al., 2006), and agriculture (Li et al., 2010). In recent decades, the growing use of Lanthanides has contributed to an increasing release of these compounds into the aquatic environment (Alonso et al., 2012; Zhang et al., 2017). It is generally accepted that surface waters are an important pathway in the transport and distribution of Lanthanides (Verplanck et al., 2010). As a result of these anthropogenic contaminations, the presence of high level and abnormal Lanthanide concentrations has been worldwide detected from ng to μg per liter among different aquatic compartments (Bau and Dulski, 1996; Kulaksiz and Bau, 2013; Perrat et al., 2017). Up to now, except for the Netherlands, no other country has set regulatory environmental discharge thresholds of Lanthanides (Sneller et al., 2000).

The current literature on the ecotoxicity of Lanthanides is mostly confined to Lanthanum, Cerium, and Gadolinium, and studies of Lanthanide mixtures remain limited (Herrmann et al., 2016; Romero et al., 2019; Hanana et al., 2021). Until now, the question of a common toxicity profile for Lanthanides is not solved, some authors agree with this assumption (Blinova et al., 2018) while others mentioned a toxicity related to the atomic number (Manusadzianas et al., 2020). Due to the lack of information, no consensus about the Lanthanide ecotoxicity may be established. This lack of consensus emphasized the emerging need to investigate the toxicity of Lanthanides tested alone and in mixtures (Pagano et al., 2015).

Cells are one of the first levels of organization impacted by pollutants (Olabarrieta et al., 2001), and cell culturing is recognized as a sensitive tool for (eco)toxicity assessment.

Numerous studies have used *in vitro* approaches for human health risk assessment of Lanthanides, but few of them have dealt with aquatic ecotoxicological investigations (Pagano et al., 2015).

In this context, the aim of our study was to assess the cellular ecotoxicity of Lanthanides. This evaluation was performed by using three fish cell lines, i.e., ZF4 (ATCC® CRL-2050™) and ZFL (ATCC® CRL-2643™) cells from *Danio rerio* and RTgill-W1 (ATCC® CRL-2523™) cells from *Oncorhynchus mykiss*.

Firstly, the individual toxic effects of all Lanthanides were determined on ZF4 cells. Then, three of them, i.e., Neodymium (Nd³⁺), Gadolinium (Gd³⁺), and Ytterbium (Yb³⁺) were tested in mixtures on ZF4 cells and two of them i.e., Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) were tested alone and in mixtures on ZFL and RT-W1 cells. Differences of toxicity between Lanthanides alone, in mixtures, and on the different cell lines are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Stock solutions (5 g/L as salt concentration) were prepared from the following Lanthanide salts: LaCl₃-7H₂O, CeCl₃-7H₂O, Pr(NO₃)₃-6H₂O, Nd(NO₃)₃-6H₂O, Sm(NO₃)₃-6H₂O, EuCl₃-6H₂O, GdCl₃-6H₂O, TbCl₃-6H₂O, Dy(NO₃)₃-6H₂O, HoCl₃-6H₂O, Er(NO₃)₃-5H₂O, Tm(NO₃)₃-5H₂O, YbCl₃-6H₂O, and LuCl₃-6H₂O, purchased from Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri U.S.A. The purity of all salts was about 99.9 %. Two days prior to experiments, exposure concentrations were obtained by diluting the stock solutions in ultrapure water and stored at 4 °C.

2.2. Cell culture

Cell culture was performed as previously reported by Parant et al. (2019). Briefly: (a) *Danio rerio* fibroblast-like cells (ZF4; ATCC[®] CRL-2050[™]) were maintained in a humidified chamber (28 °C, 5 % CO₂) in DMEM: F12 medium (ATCC[®] 30-2006[™]) supplemented with 10 % (v/v) fetal calf serum (ATCC[®] 30-2021[™]). The medium was renewed every 3 days. Cells were passed once a week at 1 x 10⁶ cells/flask T₇₅; (b) *Danio rerio* hepatic cells (ZFL; ATCC[®] CRL-2643[™]) were cultured in mixed medium composed by 50 % (v/v) Leibovitz's L-15 medium (ATCC[®] 30-2008[™]), 35 % (v/v) DMEM HG (Gibco[®] by Life Technologie[™], ref: 12100), 15 % (v/v) Ham's F12 (Gibco[®] by Life Technologie[™], ref: 21700), 0.15 g/L (v/v) sodium bicarbonate solution (Sigma Aldrich, ref: 58761), 15 mM (v/v) HEPES solution (Sigma Aldrich, ref: H0887), 0.01 mg/mL (v/v) bovine insulin (Sigma Aldrich, ref: E4127), and 5 % (v/v) inactivated fetal calf serum (ATCC[®] 30-2020[™]). Cells were incubated at 28 °C without CO₂ and the medium was renewed every 3 days. Cells were passed twice a week at 1.25 x 10⁶ cells/flask T₇₅; (c) *Oncorhynchus mykiss* epithelial cells (RTgill-W1; ATCC[®] CRL-2523[™]) were maintained at 15 °C without CO₂ in Leibovitz's L-15 medium (Gibco[®] by Life Technologie[™], ref: 11415-064) supplemented with 10 % (v/v) fetal calf serum (Eurobio^{Abcys}, ref: CVFSVF00-01). The medium was renewed every 3 days. Cells were passed once a week at 2.5 x 10⁶ cells/flask T₇₅.

2.3. Toxicity assessment of Lanthanides

2.3.1. Toxicity assessment of individual Lanthanides

ZF4 cells were exposed to the fourteen Lanthanides (from Lanthanum to Lutetium) at nominal concentrations of 0, 0.5, 5, 50, 500, 1000, 1500, 2000, and 3000 μM during 24, 48, 72, and 96 h, with 4 replicates per condition. For ZFL and RTgill-W1 cells, similar exposure conditions were conducted in the presence of 2 Lanthanides (Nd^{3+} and Yb^{3+}).

2.3.2. Toxicity assessment of Lanthanides mixtures

Frequently described as representative of light, medium and heavy Lanthanides, 3 Lanthanides (Nd^{3+} , Gd^{3+} , and Yb^{3+}) were chosen for the toxicity assessment of Lanthanides mixtures on ZF4 cells. Mixtures of Nd^{3+} and Yb^{3+} were tested on ZFL and RTgill-W1 cells. Nominal Lanthanides concentrations were selected according to EC values (i.e., EC_5 , EC_{10} , EC_{50}) determined on ZF4 cells. Respectively, these concentrations were: 164, 235, and 672 μM for Nd^{3+} ; 220, 290, and 849 μM for Gd^{3+} ; 149, 209, and 576 μM for Yb^{3+} . ZF4 cells were exposed to multiple binary mixtures while ZFL and RTgill-W1 cells were exposed to some of these conditions (Table 1). Experiments were performed for 96 h, repeated three times with six replicates per condition.

Table 1. Nominal Lanthanide concentrations tested alone and in mixtures on ZF4 cells. Bold text represents the conditions tested on ZFL and RTgill-W1 cells.

Individual exposures			
	Nd ³⁺	Gd ³⁺	Yb ³⁺
EC ₅ :	164 μM	220 μM	149 μM
EC ₁₀ :	235 μM	290 μM	209 μM
EC ₅₀ :	672 μM	849 μM	576 μM
Mixture exposures			
	Nd ³⁺ + Gd ³⁺	Nd ³⁺ + Yb ³⁺	Gd ³⁺ + Yb ³⁺
	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺
	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Gd ³⁺	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺
	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Gd ³⁺	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺
	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	EC ₁₀ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺
	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Gd ³⁺	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	EC ₁₀ Gd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺
	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	EC ₅₀ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺
	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Gd ³⁺	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	EC ₅₀ Gd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺

2.4. Cytotoxicity assay

According to the Mosmann procedure (Mosmann, 1983), cell viability was evaluated using the MTT reduction assay. Fish cell lines were cultured under standard conditions for 6 days prior to experiments. Sub-confluent cells were trypsinized and counted according to the trypan blue exclusion method (0.4 %) (Gibco® by Life Technologie™, ref: 15250061). ZF4, ZFL, and RTgill-W1 cells were seeded on 96-well plate at initial densities of 2 x 10⁴, 1 x 10⁴, and 3.5 x 10⁴ cells/well in 200 μL of culture medium, respectively. After 96 h of exposure, 20 μL of 5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was added in each well for control and exposed cells. After 3.5 h of incubation, the exposure medium was

removed, and formazan salts were dissolved in 100 μ L DMSO under agitation for 4 min. Absorbance was measured at 570 nm using a microplate spectrophotometer (Asys Expert Plus; excitation: 544 nm; emission: 580 nm). Cell viability was calculated according to the formula: $cell\ viability\ (\%) = (absorbance\ of\ exposed\ cells / absorbance\ of\ control) \times 100$.

2.5. Measurement of Lanthanide concentrations

Lanthanide concentrations were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) at the Laboratory Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160) in Nantes, France. Measurements were performed in the culture media of ZF4, ZFL, and RTgill-W1 cells. Each media was supplemented with the individual and mixture concentrations of Lanthanide reported in Table 1. All solutions were prepared both with (biotic) and without (abiotic) cells. Immediately after preparation (T_0) and after 96 h (T_{96}), half of the medium (representing the total concentration) was acidified to 1 % (v/v) with concentrated HNO_3 65 %. The remaining medium was filtered on a 0.45 μ m nitrocellulose membrane (Millipore, ref: HAWPO4700). The filtrate obtained, representing the dissolved Lanthanides, was acidified to 1 % (v/v) with HNO_3 65 % and the filter, representing the undissolved Lanthanides, was stored in a tube. All acidified solutions and the filters were stored at 4 °C prior to ICP-MS analyses.

2.6. Statistical methods

2.6.1. Analysis of the individual toxicity of Lanthanides

For each Lanthanide, a dose-response curve was fitted to the viability data using the cumulative distribution function (CDF) of the log-logistic probability distribution. Effective concentrations (EC) inducing 5 % (EC₅), 10 % (EC₁₀), and 50 % (EC₅₀) effect on the cell viability with associated 95 % confidence intervals were calculated from these models.

A three-way ANOVA was performed to investigate the effects of Lanthanide, cell type, and time on toxicity, expressed as EC₅₀, after log transformation. To this end, the analysis was carried out on the complete factorial design, associated with the factors "Lanthanide" (2 levels: Nd³⁺, Yb³⁺) "Cell" (3 levels: ZF4, ZFL, RTgill-W1), and "Time" (4 levels: 24h, 48h, 72h and 96h), respectively.

Analyses were performed using R software (version 4.0.0, DRC package, R Development Core Team, 2020).

2.6.2. Analysis of the toxicity of Lanthanides mixtures

The toxicity of Lanthanide mixtures was analyzed using parametric statistical methods. The hypothesis of homogeneity of variances within replicate groups, associated with the different combinations of concentrations considered, was preliminarily tested using the modified Levene test (i.e., the Brown-Forsythe test for the homogeneity of variances).

A weighted log-linear regression model (WLR) was used to describe the variation of cell viability, as a function of two Lanthanide concentrations in each mixture. The model also considered an interaction term, denoted by the sign * in Equation 1:

$$\text{Log}_{10} (\text{cell viability}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Lanthanide 1} + \beta_2 \text{Lanthanide 2} + \beta_{12} \text{Lanthanide 1} * \text{Lanthanide 2}$$

Eq.1

The use of the WLR model is motivated, on the one hand, by its ability to better meet the requirements of parametric statistical methods (i.e., normality and variance homogeneity) and, on the other hand, to consider the multiplicative nature of the toxic effects on cell viability of the Lanthanides in the mixtures. The weight assigned to each data point was the mean cell viability of the assay (i.e., the condition considered) to which it belonged.

The testing of the regression coefficients (i.e., β_0 , β_1 , β_2 , and β_{12}), and the subsequent construction of the fitted regression models, was carried out following a backward stepwise procedure with a significance threshold set at $\alpha = 0.01$ for all statistical tests.

The predicted response in each mixture with the WLR model was graphically processed using the response surface methodology (RSM approach). The viability rates calculated from each fitted model were thus represented in both a 3D surface plot and a 2D contour plot. Statistical analyses were performed using R software (version 4.0.0, plot3D package, R Development Core Team, 2020).

3. Results

3.1. Lanthanide concentrations in culture media

As described in Materials and Methods (Table 1) a large panel of concentrations was measured for three Lanthanides (Yb^{3+} , Nd^{3+} and Gd^{3+}) after supplementation of the medium (T_0) and after 96h (T_{96}) of exposure. Fig. 1A shows results obtained for one concentration of Yb^{3+} on ZF4 cell medium. These results are representative of those obtained with other Lanthanides for all tested concentrations on ZF4 cells (data not shown). Similar trends were observed for the three Lanthanides in ZFL and RTgills-W1 culture media (Fig. S1).

For all tested conditions regardless of Lanthanides, Lanthanides concentration alone or in mixtures and cell lines, total concentrations measured at T_0 and after T_{96} were between 85 and 99 % of the nominal ones (Fig. 1B). In the remainder of the paper, Lanthanide concentrations will therefore be expressed as the corresponding nominal values for all results. Regarding quantification in abiotic conditions, the concentration of Lanthanides measured in the unfiltered medium (i.e. “measured total concentration”) was of the same order of magnitude than the one measured in the filtrate, just after supplementation (T_0) and after 96 h ($T_{96\text{h}}$) of exposure for all cell culture media. These results suggested that most of the Lanthanides were dissolved in the culture media and that undissolved fraction was negligible (less than 5% of the total measured concentration).

The same trend was observed in the presence of cells (biotic condition) after 96 h of exposure. (Fig. 1B).

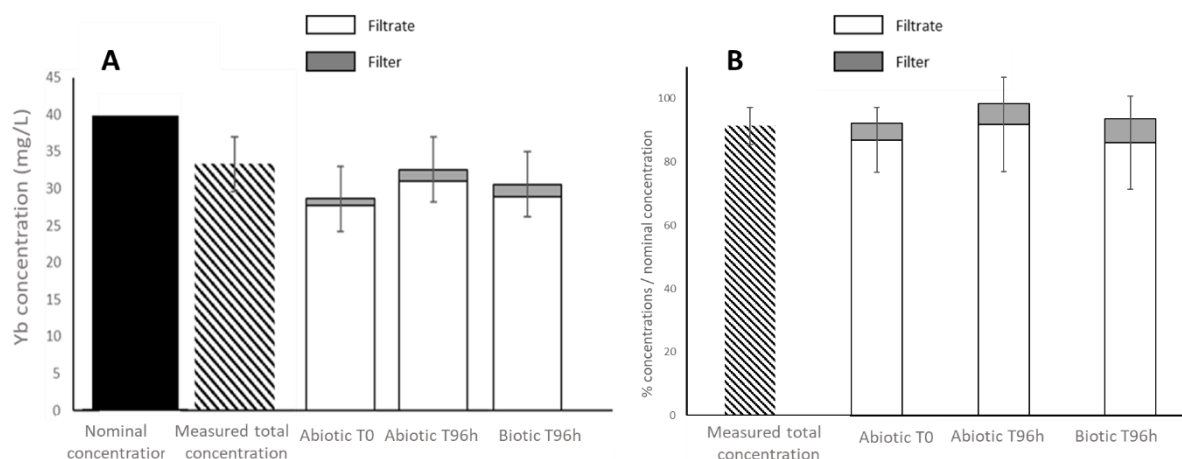


Fig. 1. (A) Concentration (mg/L) of Ytterbium (Yb³⁺) under abiotic and biotic conditions after the supplementation (T₀) and after 96 h (T_{96h}) of exposure in the media of ZF4 cells. (B) percentage of nominal concentration considering all tested conditions under abiotic and biotic conditions after the supplementation (T₀) and after 96 h (T_{96h}) of exposure in the media regardless of Lanthanides, Lanthanides concentration (alone or in mixtures) and cell lines. Data are expressed as the mean ± one standard deviation (n = 3) per condition.

3.2. Impact of Lanthanides on ZF4 cells

3.2.1. Individual toxicity of 14 Lanthanides on ZF4 cells

The toxicity of the fourteen Lanthanides (from Lanthanum to Lutetium) was assessed on ZF4 cells. Dose-response curves obtained for Neodymium, Gadolinium and Ytterbium for 24 to 96 h of exposure are given in Fig. 2 (dose-response curves for the other Lanthanides are presented in Fig. S2).

ZF4 cell viability was not impacted by the lowest concentrations (from 0.5 to 50 μM), but decreased for concentrations ranging from 500 to 3000 μM, and 100 % mortality was observed at 3000 μM, from 48h of exposure.

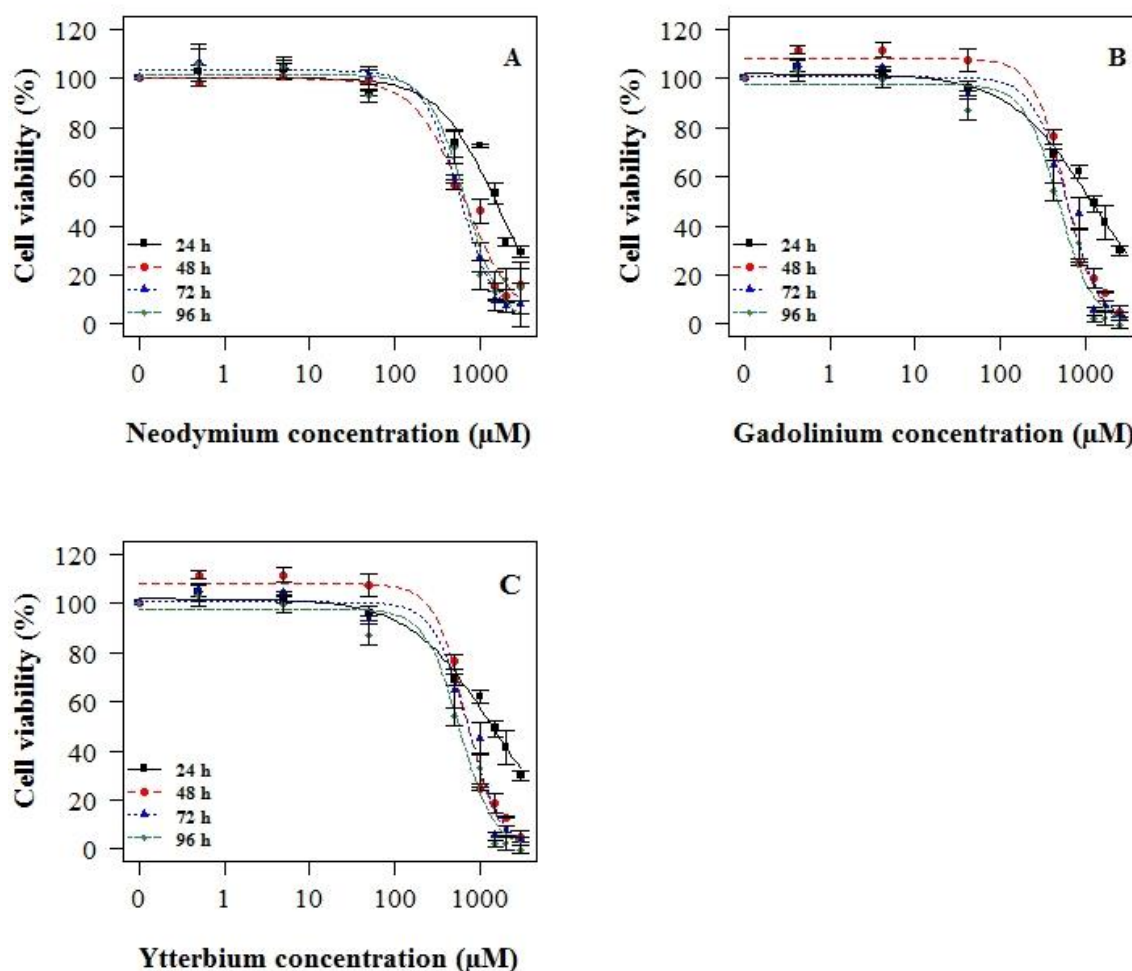


Fig. 2. Dose-response curves for the viability of ZF4 cells exposed for 24 to 96 h to Neodymium (A), Gadolinium (B) and Ytterbium (C) at nominal concentrations ranging from 0.5 to 3000 μM . Data are expressed as the mean \pm one standard deviation ($n = 3$) per condition.

According to EC_{50} values, Lanthanides were significantly more toxic (1.3 – 2 times) after 48, 72, and 96 h of exposure (Table 2 and Table S1) when compared to 24 h of exposure. After 96 h of exposure, Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , and Lu^{3+} were the most toxic elements toward ZF4 cells with EC_{50} values $< 600 \mu\text{M}$, whereas Eu^{3+} and Tb^{3+} presented the lowest toxicity with EC_{50} values $> 1000 \mu\text{M}$.

Table 2. Effective concentrations (with associated 95 % confidence intervals between square brackets) inducing 50 % (EC₅₀) of the effect on ZF4 cell viability. Values were calculated from dose-response curves obtained after 96 h of exposure to fourteen Lanthanides.

Lanthanide	Time (h)	EC ₅₀ [95 % CI]	
			Molarity concentration (μM)
Lanthanum	24	1633 [1430 - 1836]	1188 [1014 - 1363]
	48	1027 [916 - 1139]	994 [845 - 1143]
	72	966 [862 - 1071]	928 [799 - 1056]
	96	864 [760 - 969]	1069 [865 - 1273]
Cerium	24	1546 [1304 - 1788]	1079 [809 - 1349]
	48	907 [792 - 1023]	753 [661 - 845]
	72	835 [700 - 971]	674 [610 - 739]
	96	760 [663 - 857]	668 [593 - 744]
Praseodymium	24	1951 [1318 - 2585]	1131 [978 - 1283]
	48	800 [675 - 924]	936 [778 - 1093]
	72	883 [770 - 996]	805 [683 - 926]
	96	793 [706 - 879]	673 [547 - 799]
Neodymium	24	1504 [1287 - 1722]	731 [638 - 825]
	48	665 [557 - 773]	583 [517 - 649]
	72	583 [525 - 641]	570 [530 - 609]
	96	672 [567 - 776]	480 [449 - 512]
Samarium	24	1479 [1193 - 1766]	1360 [1181 - 1539]
	48	858 [646 - 1071]	777 [659 - 895]
	72	841 [700 - 982]	747 [635 - 860]
	96	823 [696 - 950]	501 [298 - 705]
Europium	24	1500 [1235 - 1765]	1342 [1201 - 1482]
	48	1003 [834 - 1173]	698 [638 - 758]
	72	1053 [911 - 1196]	715 [611 - 818]
	96	1047 [917 - 1178]	576 [488 - 665]
Gadolinium	24	1601 [1319 - 1882]	1145 [1001 - 1289]
	48	919 [758 - 1079]	587 [493 - 680]
	72	890 [747 - 1032]	312 [0 - 650]
	96	849 [717 - 981]	242 [79 - 404]

3.2.2. Toxicity of Nd³⁺, Gd³⁺, and Yb³⁺ mixtures on ZF4 cells

ZF4 cells were exposed for 96 h to different concentrations of 3 Lanthanides (Nd³⁺, Gd³⁺, and Yb³⁺), tested individually and in binary mixtures. Mixture experiments were conducted using the EC₅, EC₁₀, and EC₅₀ values calculated on ZF4 cells after 96 h of exposure.

As shown in Table 3, the cell viability was reduced in the presence of Lanthanides for all tested conditions.

Table 3. ZF4 cell viability calculated after 96 h of exposure to Neodymium (Nd³⁺), Gadolinium (Gd³⁺), and Ytterbium (Yb³⁺) tested alone and in mixtures. Experiments were repeated three times with six replicates per condition. The percentage of cell viability corresponding to each condition was expressed as the mean ± one standard deviation in parentheses.

Lanthanide		Mixture Nd ³⁺ + Yb ³⁺	
Condition	Cell viability (%)	Condition	Cell viability (%)
Control	100 (± 1)	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	69 (± 6)
EC ₅ Nd ³⁺ ; 164 μM	93 (± 4)	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	58 (± 11)
EC ₅ Gd ³⁺ ; 220 μM	89 (± 4)	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	30 (± 9)
EC ₅ Yb ³⁺ ; 149 μM	81 (± 2)	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	58 (± 13)
EC ₁₀ Nd ³⁺ ; 235μM	85 (± 2)	EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	54 (± 7)
EC ₁₀ Gd ³⁺ ; 290 μM	80 (± 4)	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	44 (± 14)
EC ₁₀ Yb ³⁺ ; 209 μM	70 (± 5)	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	4 (± 3)
EC ₅₀ Nd ³⁺ ; 672 μM	48 (± 11)		
EC ₅₀ Gd ³⁺ ; 849 μM	51 (± 7)		
EC ₅₀ Yb ³⁺ ; 576 μM	51 (± 5)		
Mixture Nd ³⁺ + Gd ³⁺		Mixture Gd ³⁺ + Yb ³⁺	
Condition	Cell viability (%)	Condition	Cell viability (%)
EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	80 (± 4)	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	61 (± 5)
EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Gd ³⁺	75 (± 6)	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	53 (± 8)
EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Gd ³⁺	31 (± 2)	EC ₅ Gd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	43 (± 6)
EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	76 (± 4)	EC ₁₀ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	54 (± 7)
EC ₁₀ Nd ³⁺ + EC ₁₀ Gd ³⁺	69 (± 2)	EC ₁₀ Gd ³⁺ + EC ₁₀ Yb ³⁺	49 (± 4)
EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅ Gd ³⁺	22 (± 9)	EC ₅₀ Gd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	40 (± 10)
EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Gd ³⁺	4 (± 4)	EC ₅₀ Gd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	12 (± 11)

To understand this toxicity, the combined effects of Lanthanides in mixtures were studied. The assumption of homogeneity of the variance of the data within the various conditions was not rejected for any mixture examined (Levene test, $p > 0.05$). Thus, a WLR analysis was performed using all available viability data. The fitted models presented in Table S2 express the variation of cell viability for each mixture studied according to the regression model in Eq.1.

The values resulting from the fitting procedure (i.e., F-test, $p < 10^{-4}$; $r^2 > 0.88$; residual coefficient of variation $< 15\%$) suggested both high explanatory power and good predictive capacity of the fitted models. Moreover, all regression coefficients in these models were statistically significant ($p < 0.01$) and negative. This indicates a toxic effect of each of the two Lanthanides, as well as the existence of a synergistic effect for each of the binary mixtures considered.

The predicted combined effect of each mixture was explored using the RSM approach. Thus, the effects for the Nd^{3+} and Yb^{3+} mixture were represented on the 3D plot of the regression surface (Fig. 3A), as well as by the 2D survival level contours, i.e., the isobologram in Fig. 3B.

The synergistic effect, which means that the combination of two lanthanides shows a higher toxicity than expected from the individual components, can be seen from the isobologram in Fig. 3B. Indeed, in the presence of an interaction effect, the isoboles are curved, while they would be straight lines in the absence of interaction. Furthermore, the curvature of the lines (i.e., concavity or convexity) helps to decide between antagonism and synergy, respectively. Here, the convexity of the isoboles in Fig. 3B reflects a synergistic effect. The same phenomenon was observed for the other mixtures examined in the present study (Fig. S3 and Fig.4). Finally, the fitted model, presented in Table S2, show that this synergistic effect is more pronounced at higher concentrations.

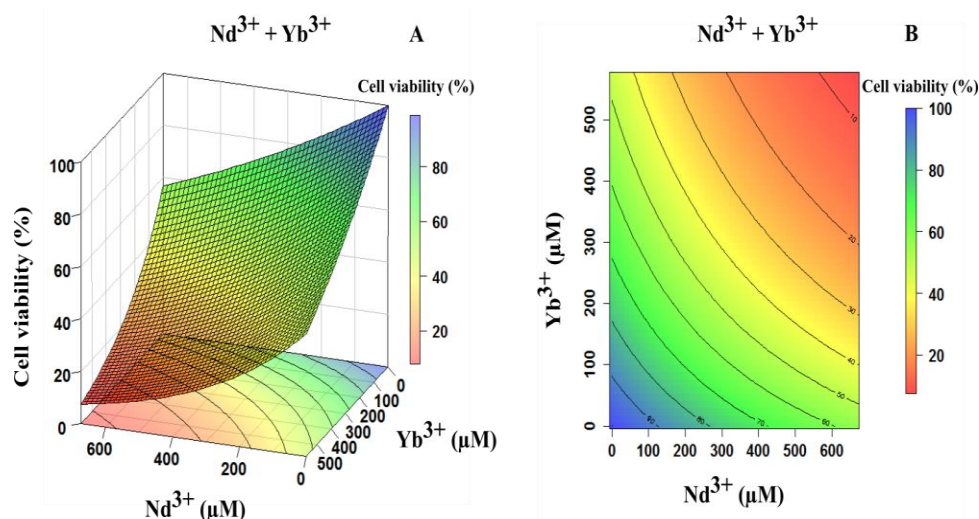


Fig. 3. (A) Three-dimensional response surface plot (3D) showing the combined effect of the Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) mixtures on the viability of ZF4 cells after 96 h of exposure; (B) Two-dimensional level contour plots (2D), i.e. isobologram showing the relationship between combinations of Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) concentrations to attain predetermined values of ZF4 cell viability after 96 h of exposure (print in color).

3.3. Impact of Lanthanides on ZFL and RTgill-W1 cells

3.3.1. Individual Toxicity of Nd³⁺ and Yb³⁺ on ZFL and RTgill-W1 cells

Cells were exposed to Nd³⁺ and Yb³⁺ under the same conditions as ZF4 cells. The responses of ZFL (Fig. S4) and RTgill-W1 (Fig. S5) cells were like those observed for ZF4 cells. Indeed, results showed no effect of the lowest Lanthanide concentrations (from 0.5 to 50 μM) and a gradual decrease in cell viability for Lanthanide concentrations ranging from 500 to 3000 μM.

Table 4. Effective concentrations (with associated 95 % confidence intervals in brackets) inducing 50 % (EC₅₀) loss in cell viability in ZF4, ZFL, and RTgill-W1 cell lines exposed to Neodymium and Ytterbium. Values were calculated from dose-response curves after 24, 48, 72, and 96 h of exposure to Neodymium and Ytterbium.

Lanthanide	Time (h)	EC ₅₀ [95 % CI]		
		ZF4	ZFL	RTgill-W1
Neodymium	24	1504 [1287 - 1722]	1666 [1405 - 1926]	1509 [1392 - 1625]
	48	665 [557 - 773]	616 [506 - 727]	1420 [1207 - 1633]
	72	583 [525 - 641]	566 [511 - 620]	1018 [865 - 1170]
	96	672 [567 - 776]	461 [417 - 505]	799 [697 - 901]
Ytterbium	24	1342 [1201 - 1482]	1359 [1160 - 1558]	1494 [1348 - 1640]
	48	698 [638 - 758]	952 [827 - 1078]	1558 [1343 - 1773]
	72	715 [611 - 818]	630 [529 - 732]	964 [849 - 1081]
	96	576 [488 - 665]	565 [498 - 632]	840 [774 - 906]

The three-way ANOVA, performed on the data in Table 4, leads to the following conclusions:

- (i) there is no statistically significant difference between the mean EC₅₀ of the two Lanthanides considered ($p > 0.30$);
- (ii) there are differences between the three cell lines: specifically, the mean EC₅₀ value observed for RTgill-W1 cells is significantly higher than the corresponding values of ZF4 and ZFL cells ($p < 10^{-3}$), which are not statistically different from each other; and
- (iii) the mean EC_{50s} observed for all factors decrease with time ($p < 10^{-3}$).

Thus, based on EC₅₀ values, the toxicity of Lanthanides increased from 24 to 96 h for all three cell lines (Table 4). RTgill-W1 cells seemed to be less sensitive than ZF4 and ZFL cells, from 48h and especially after 96h of exposure. Based on EC₅₀ values, Nd³⁺ was clearly more toxic for ZFL cells compared to ZF4 and RTgill-W1 cells after 96h of exposure.

3.3.2. Toxicity of Nd³⁺ and Yb³⁺ mixtures on ZFL and RTgill-W1 cells

To determine whether the toxicity induced by the Lanthanide mixtures on ZF4 cells varied among cell lines, ZFL and RTgill-W1 cells were exposed for 96 h to different Nd³⁺ and Yb³⁺ concentrations, tested alone and in mixtures. The tested concentrations are EC₅, EC₁₀ and EC₅₀ values obtained on ZF4 cells.

As shown in Table 5, the viability of ZFL and RTgill-W1 cells was reduced in the presence of Lanthanides. For these experiments, it may be also noted that the RTgill-W1 cells were less sensitive, with higher viability of cells exposed to Lanthanides tested individually or in binary mixtures, compared to ZFL cells (two-sided Wilcoxon signed-rank test; $p \leq 0.05$).

Table 5. ZFL and RTgill-W1 cell viability calculated after 96 h of exposure to Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺), tested alone and in mixtures. Experiments were repeated three times with six replicates per condition. The percentage of cell viability corresponding to each condition was expressed as the mean \pm one standard deviation in parentheses.

		Cell line	
Condition		ZFL	RTgill-W1
Lanthanide	Control	100 (\pm 4)	100 (\pm 5)
	EC ₅ Nd ³⁺ : 164 μ M	74 (\pm 6)	99 (\pm 10)
	EC ₅₀ Nd ³⁺ : 672 μ M	48 (\pm 6)	63 (\pm 5)
	EC ₅ Yb ³⁺ : 149 μ M	79 (\pm 13)	100 (\pm 6)
	EC ₅₀ Yb ³⁺ : 576 μ M	50 (\pm 11)	72 (\pm 9)
Mixture Nd ³⁺ + Yb ³⁺	EC ₅ Nd ³⁺ + EC ₅ Yb ³⁺	70 (\pm 15)	82 (\pm 5)
	EC ₅₀ Nd ³⁺ + EC ₅₀ Yb ³⁺	1 (\pm 1)	39 (\pm 9)

Furthermore, the combined effect of Nd³⁺ and Yb³⁺ in the mixture was assessed both on ZFL and RTgill-W1 cells by performing a WLR analysis, as previously described for ZF4 cells.

The values obtained from the fitting procedure (i.e., F-test, $p < 10^{-4}$; $r^2 > 0.88$, residual coefficient of variation $< 15\%$) indicated a good fit of the models to the experimental data, as well as high explanatory power and good predictive ability. As shown in Table S3, all regression coefficients of the fitted models were statistically significant ($p < 0.01$) and negative. This result led to the same conclusion as for ZF4 cells, namely that a synergistic effect existed in addition to the direct effects of Nd^{3+} and Yb^{3+} on both-ZFL and RTgill-W1 cells.

As observed on ZFL (Fig. 4A) and RTgill-W1 cells (Fig. 4C), the 3D surface plots showed that for a given Nd^{3+} concentration, the toxicity increased with the Yb^{3+} concentration, and *vice versa*. However, the toxicity of Lanthanide mixtures was lower for RTgill-W1 cells, with cell viability ranging from 45 to 100 % (Fig. 4C) than for ZFL cells (Fig. 4A).

In addition to the fitted models in Table S3, which highlighted the presence of a synergistic effect, the 2D contour plots, i.e., the isobolograms in Fig. 4B and Fig.4D, allow visualization of this effect for both cell lines. However, the synergistic effect appears to be more pronounced for ZFL cells than for RTgill-W1 cells, as the convexity of the isoboles is more marked in Fig. 4B than in Fig. 4D, respectively

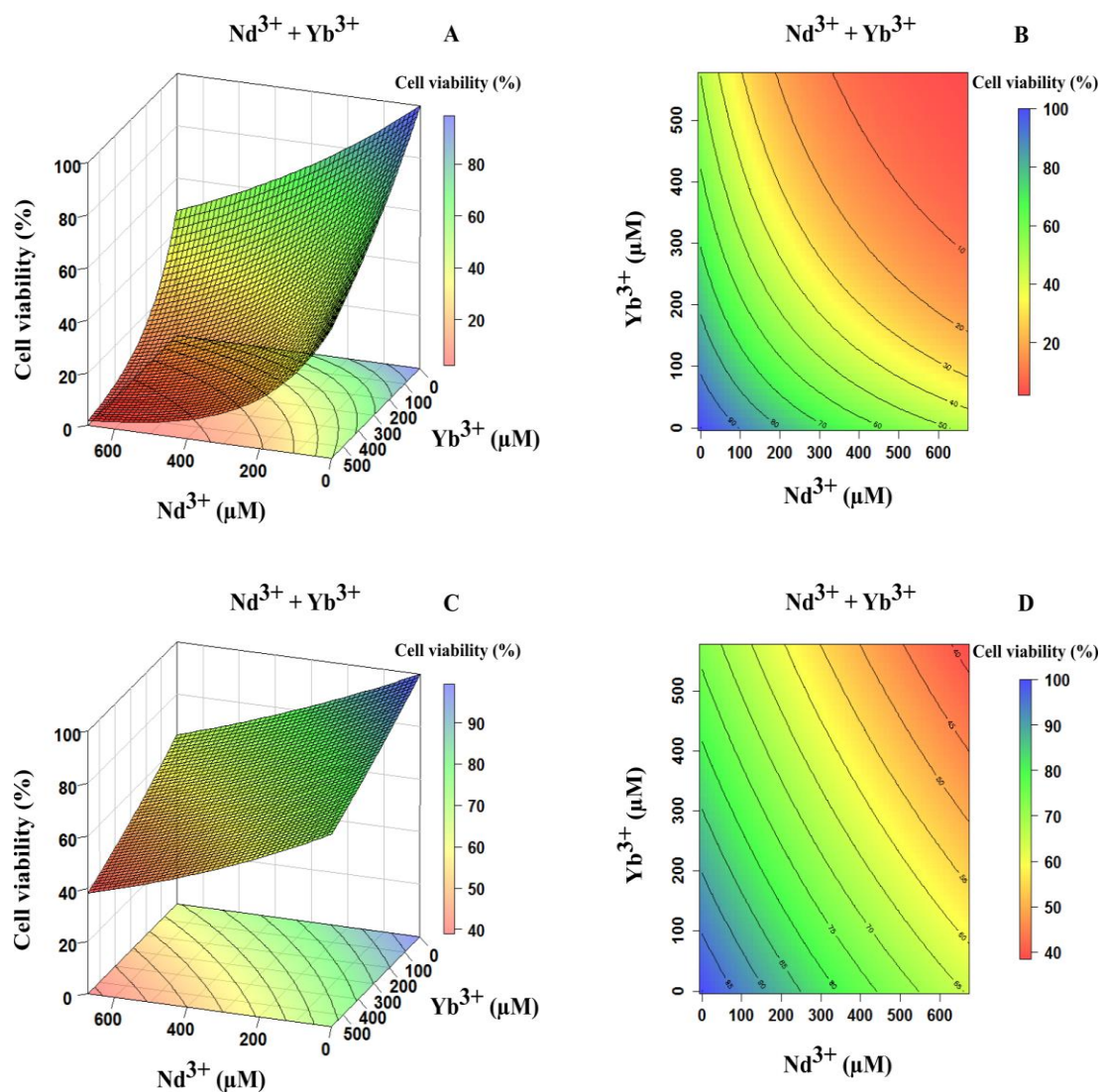


Fig. 4. Three-dimensional response surface plots (3D) showing the combined effect of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) mixtures on the viability of ZFL (A) and RTgill-W1 (C) cells after 96 h of exposure. Two-dimensional contour plots (2D) i.e. isobolograms showing the relationship between combinations of Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) concentrations to attain predetermined values of ZFL (B) and RTgill-W1 (D) cell viability after 96 h of exposure (print in color).

4. Discussion

In aquatic ecotoxicology, the bioavailability of Lanthanides remains an important issue to understand their toxicity and assess their environmental risk. Because Lanthanides can form precipitates in the presence of carbonates, phosphates, and sulfates in culture medium (Petersen et al., 1974; Ng et al., 2014), Ng et al. (2014) suggested that their toxicity could be linked to indirect effects caused by such precipitates, as previously demonstrated by Petersen et al. (1974). The analytical results conducted on total medium spiked with lanthanides and on the filtrates showed that more than 95% of the Lanthanides were in solution, suggesting that, in our medium, the precipitation of Lanthanides was negligible. Nevertheless, the mechanical impact of aggregates, even in few amounts, could not be excluded. Then, it would be of great interest to assess precisely the size of Lanthanides aggregates and then to evaluate the impact of inert aggregates with such size on the cell viability. As previously described by Bergna et al. (1994), silicon dioxide can be organized as aggregates with a size slightly higher than 0.45 μm (corresponding of the filtering size of our filters) and could be used for such experiments. A preliminary experiment was conducted in this way (data not shown) and did not show any toxicity on ZF4 cells at concentrations close to the Lanthanides one. Therefore, it might be assumed that the observed toxicity on fish cell lines during our experiments was mainly induced by the direct effects of Lanthanides, even in the presence of tiny amounts of aggregates.

Concentration-dependent effects of Lanthanides were reported *in vitro* on the cell viability of human (Rucki et al., 2020), rat (Yang et al., 2012), and fish cell lines (Laville et al., 2004), but also *in vivo* using bioassays with aquatic organisms (Gonzalez et al., 2015; Romero et al., 2019; Blinova et al., 2020). Laville et al. (2004) used the MTT assay to investigate Gadolinium toxicity on primary hepatocyte cells from *Oncorhynchus mykiss* and hepatocyte cell line (PLHC-1) from *Poeciliopsis lucida*. These authors observed a decrease in the cell viability,

after 24 h of exposure to Gadolinium concentrations ranging from 7 μM to 1 mM. Our results are in agreement with these observations. For all exposure durations, concentrations-response curves showed Lanthanide toxicity on ZF4 cells, leading to 100 % mortality at the highest tested concentrations.

Although several adverse effects of Lanthanides have been previously reported, no consensus exists as to regular changes in their toxicity along the Lanthanides series. Some authors (Blinova et al., 2018) suggested that Lanthanides should be considered as a uniform group with all elements exhibiting similar toxicity, while others mentioned that their toxicity appears to change as a function of atomic number (Manusadzianas et al., 2020). Our results are not in agreement with Blinova et al. (2018) nor with Manusadzianas et al. (2020). Indeed, the impact observed on ZF4 cells shows a high toxicity concerning the four heaviest Lanthanides (Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , and Lu^{3+}) but no correlation appears by the comparison of EC_{50} of light and intermediate Lanthanides depending on their atomic number. Two of them (Eu^{3+} and Tb^{3+}) are clearly less toxic when the others display a toxicity of the same order. These observations underlined the need to assess not only La^{3+} , Ce^{3+} , and Gd^{3+} as frequently mentioned in the current literature, but also the other Lanthanides, especially the heavy ones, which are the most toxic but the less studied (Pagano et al., 2015; Herrmann et al., 2016).

Our results clearly show that, in our experimental conditions, all Lanthanides do not induce the same toxicity without displaying any clear relation between the toxicity and the order of the elements within the Lanthanides series. From a molecular point of view, the observed differences of toxicity between Lanthanides could be explained by their abilities to compete differently within cells with essential metallic ions such as Calcium (Ansoborlo et al., 2006; Bresson et al., 2011).

Mixture studies are qualified as a more realistic point of view to determine the effects of pollutants in aquatic systems (Altenburger et al., 2018). In environmental toxicology, predict and understand the biological responses induced by the effects of mixtures (i.e., synergism, additive, or antagonism) is one of the greatest challenges, and at the same time an essential aspect of ecotoxicological risk assessment (Norwood et al., 2003). To date, few studies were carried out to assess the impacts of Lanthanide mixtures using various organisms such bacteria, algae, rotifers, daphnids, ostracods, and fish (Hao et al., 1997; Tai et al., 2010; Tan et al., 2017; Blinova et al., 2018; Romero et al., 2019; Hanana et al., 2021). In these studies, different mixture toxicities were observed, according to Lanthanide compositions. Tai et al. (2010) showed an additive effect for the mixture of fourteen Lanthanides on *Skeletetonema costatum*, while a synergistic effect was found on *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of Sm^{3+} , La^{3+} , Ce^{3+} , and Eu^{3+} mixture (Tan et al., 2017). In another study on the Ce^{3+} , Gd^{3+} , and Lu^{3+} mixtures, Romero et al. (2019) showed synergistic effects on bacteria and algae, and antagonistic ones on rotifers, by means on standardized bioassays. Based on these observations, it is a challenge to analyze the effects of Lanthanide mixtures at the organism level due to the diversity of studied endpoints, biological variations, stress factors, and sensitivity of the selected organisms (Liess et al., 2016). Moreover, possible invalid data interpretations may result due to a lack of statistical analysis of the interaction effects (Kerr and Meador, 1996). The combination of studies at the cellular level with statistical and modelling methods could be an interesting approach to overcome these limitations. The results of the WLR analysis and the RSM approach used in the present study showed no antagonist effects for all mixtures tested whatever the cell line used. Dose-response curves showed concentration-dependent effects of Lanthanides on cell viability, as well as synergistic effects for each of the five mixtures examined mixture, which were more pronounced at higher concentrations after 96 h of exposure.

Our results are in accordance with Jonker et al. (2005), namely synergistic effect becoming more marked at high pollutant concentrations. Although synergistic effect was observed and confirmed by statistical tests for each of the five mixtures examined in this study, we must acknowledge that, at this time, we have no mechanistic or biological explanation to offer for interpreting synergism. Further studies are therefore needed to confirm these observations and eventually clarify this phenomenon. We suggest that statistical and modelling methods could be alternative and more powerful tools to predict the toxicity of Lanthanide mixtures compared with the classical models of concentration addition (Lowe and Muischeck, 1926) and independent action (Bliss, 1939).

Three fish cell lines were used to evaluate Nd^{3+} , Gd^{3+} , and Yb^{3+} toxicity. RTgill-W1 appeared as the less sensitive cells, compared to the two others, exposed on Lanthanides alone as well as in mixture. Gills are the first tissues in contact with the external medium and possess potentially more efficient defense mechanisms against external aggressions (Perrat et al., 2017), which can make them less sensitive than other cellular models. No clear difference of sensitivity in both individual or mixture toxicity of Lanthanides could be observed between ZF4 and ZFL cells. Our results suggested that the *in vitro* approaches to assess the biological responses of living organisms exposed to abnormal Lanthanide concentrations in aquatic systems can be useful to compare the sensitivity of cells with various tissue origins.

5. Conclusion

Lanthanides are frequently employed in new technologies and are considered as emerging pollutants due to their growing release into the aquatic environment. Increased risks of interaction with living organisms can therefore be expected. In an innovative way, the present study is conducted from an aquatic environmental point of view by evaluating the cellular

impact of Lanthanides individually and in mixtures. However, it is still uncertain whether all Lanthanides have the same toxicity, regarding few studies in the literature carried out on the toxicity of some elements. Our results highlighted that Nd^{3+} , Gd^{3+} , and Yb^{3+} have a toxic impact on fish cell lines but could not be considered as representatives of the toxicity of the other light, medium, and heavy Lanthanides, respectively. The evaluation of the toxicity of the fourteen Lanthanides on ZF4 cells showed, on the one hand, that the heavy Lanthanides (i.e., Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , and Lu^{3+}) were the most toxic and, on the other hand, that Eu^{3+} and Tb^{3+} , one medium and one light Lanthanide, were the least toxic elements. More generally, these observations did not show the existence of a relationship between increasing toxicity and atomic mass of lanthanides. Thus, our results support the need to pursue more investigations on the toxicity of all the fourteen Lanthanides to better understand their intracellular behavior (specific abilities to bind with biomolecules and to compete with essential ions) in order to elucidate the reasons of differences in toxicity among individual elements.

The analysis of Lanthanide mixtures highlighted synergistic effects in all tests conducted with the three cell lines from two fish models. Synergistic effects became stronger at high Lanthanide concentrations confirming the need of further research on the toxic potential of their mixtures in aquatic environments. The use of *in vitro* approaches coupled with statistical and modelling methods appears to be an effective way to assess the ecotoxicological risk of Lanthanides and their mixtures.

Funding

This work was supported by the Lorraine region and French National Research Agency through the “Ecotoxicology of Rare Earth Elements in Aquatic Systems” project with the reference ANR-16-CE34-0012/ECOTREE.

Ethics approval

The cellular models ZF4 (ATCC® CRL-2050™) and ZFL (ATCC® CRL-2643™) cells from *Danio rerio* and RTgill-W1 (ATCC® CRL-2523™) cells from *Oncorhynchus mykiss* do not benefit from any particular protection status. No legal professional qualification is currently required for their experimental use in the laboratory.

CRedit authorship contribution statement

Emmanuel Fleurbaix: Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **Marc Parant:** Conceptualization, Writing – original draft, Supervision. **Armand Maul:** Formal statistic and modelling analysis, Writing – original draft. **Carole Cossu-Leguille:** Conceptualization, Supervision, Writing – original draft, Funding acquisition.

Acknowledgments

We thank Clément Bojic and Justine Flayac for technical support in cell culture, and Danièle Pauly for the preparation of the stock solutions of Lanthanides. We warmly thank Davide Vignati for his proofreading and advice in English improvement.

References

Alonso, E., Sherman, A.M., Wallington, T.J., Everson, M.P., Field, F.R., Roth, R., Kirchain, R.E., 2012. Evaluating Rare Earth Element Availability: A Case with Revolutionary

Demand from Clean Technologies. *Environmental Science & Technology* 46, 3406–3414. <https://doi.org/10.1021/es203515d>

Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B.I., Jakobs, G., Krauss, M., Krüger, J., Neale, P.A., Ait-Aissa, S., Almeida, A.C., Seiler, T.-B., Brion, F., Hilscherová, K., Hollert, H., Novák, J., Schlichting, R., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A., Tollefsen, K.E., Umbuzeiro, G., Williams, T.D., Kortenkamp, A., 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International* 114, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.013>

Ansoborlo, E., Prat, O., Moisy, P., Den Auwer, C., Guilbaud, P., Carriere, M., Gouget, B., Duffield, J., Doizi, D., Vercouter, T., Moulin, C., Moulin, V., 2006. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1605–1618. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.011>

Bau, M., Dulski, P., 1996. Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth and Planetary Science Letters* 143, 245–255. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(96\)00127-6](https://doi.org/10.1016/0012-821X(96)00127-6)

Blinova, I., Lukjanova, A., Muna, M., Vija, H., Kahru, A., 2018. Evaluation of the potential hazard of lanthanides to freshwater microcrustaceans. *Science of The Total Environment* 642, 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.155>

Blinova, I., Muna, M., Heinlaan, M., Lukjanova, A., Kahru, A., 2020. Potential Hazard of Lanthanides and Lanthanide-Based Nanoparticles to Aquatic Ecosystems: Data Gaps,

- Challenges and Future Research Needs Derived from Bibliometric Analysis. *Nanomaterials* 10, 328. <https://doi.org/10.3390/nano10020328>
- Bliss, C.I., 1939. The Toxicity of Poisons Applied Jointly¹. *Annals of Applied Biology* 26, 585–615. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>
- Bresson, C., Ansoborlo, E., Vidaud, C., 2011. Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26, 593–601. <https://doi.org/10.1039/C0JA00223B>
- Cabella, C., Crich, S.G., Corpillo, D., Barge, A., Ghirelli, C., Bruno, E., Lorusso, V., Uggeri, F., Aime, S., 2006. Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as ‘sponges’ of Gd³⁺ ions. *Contrast Media & Molecular Imaging* 1, 23–29. <https://doi.org/10.1002/cmml.88>
- Çelik, İ., Kara, D., Karadaş, C., Fisher, A., Hill, S.J., 2015. A novel ligandless-dispersive liquid-liquid microextraction method for matrix elimination and the preconcentration of rare earth elements from natural waters. *Talanta* 134, 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.063>
- González, V., Vignati, D.A.L., Pons, M.-N., Montarges-Pelletier, E., Bojic, C., Giamberini, L., 2015. Lanthanide ecotoxicity: first attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. *Environmental Pollution* 199, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.020>

Hanana, H., Kleinert, C., Gagné, F., 2021. Toxicity of representative mixture of five rare earth elements in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12218-5>

Hao, S., Xiao-rong, W., Lian-sheng, W., Lemei, D., Zhong, L., Yi-jun, C., 1997. Bioconcentration of Rare Earth Elements lanthanum, gadolinium and yttrium in algae (*Chlorella Vulgarize Beijerinck*): Influence of chemical species. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00031-3)

Herrmann, H., Nolde, J., Berger, S., Heise, S., 2016. Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124, 213–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.033>

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2701–2713. <https://doi.org/10.1897/04-431r.1>

Kerr, D.R., Meador, J.P., 1996. Modeling dose response using generalized linear models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 395–401. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150325>

- Kulaksız, S., Bau, M., 2013. Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters* 362, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.11.033>
- Kulaksız, S., Bau, M., 2011. Rare earth elements in the Rhine River, Germany: first case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. *Environmental International* 37, 973–979. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.02.018>
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.002>
- Li, J., Hong, M., Yin, X., Liu, J., 2010. Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community. *Journal of Rare Earths* 28, 957–964. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(09\)60233-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(09)60233-7)
- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R.B., Liess, H.-D., 2016. Predicting the synergy of multiple stress effects. *Scientific Reports* 6, 32965. <https://doi.org/10.1038/srep32965>
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 114, 313–326. <https://doi.org/10.1007/BF01952257>

- Manusadžianas, L., Vitkus, R., Gylytė, B., Cimperman, R., Džiugelis, M., Karitonas, R., Sadauskas, K., 2020. Ecotoxicity Responses of the Macrophyte Algae *Nitellopsis obtusa* and Freshwater Crustacean *Thamnocephalus platyurus* to 12 Rare Earth Elements. *Sustainability* 12, 7130. <https://doi.org/10.3390/su12177130>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Ng, T., Smith, D.S., Straus, A., McGeer, J.C., 2014. Review of aquatic effects of lanthanides and other uncommon elements 42. Attachment 7. EC Contribution Agreement. Wilfrid Laurier University, p.42.
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A., 2003. Effects of Metal Mixtures on Aquatic Biota: A Review of Observations and Methods. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9, 795–811. <https://doi.org/10.1080/713610010>
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro* 15, 511–517. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00056-X)
- Pagano, G., Guida, M., Tommasi, F., Oral, R., 2015. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements—Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.030>

- Parant, M., Sohm, B., Flayac, J., Perrat, E., Chuburu, F., Cadiou, C., Rosin, C., Cossu-Leguille, C., 2019. Impact of gadolinium-based contrast agents on the growth of fish cells lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182, 109385. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109385>
- Perrat, E., Parant, M., Py, J.-S., Rosin, C., Cossu-Leguille, C., 2017. Bioaccumulation of gadolinium in freshwater bivalves. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 12405–12415. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8869-9>
- Petersen, K., Heiaas, H.H., Tollefsen, K.E., 2014. Combined effects of pharmaceuticals, personal care products, biocides and organic contaminants on the growth of *Skeletonema pseudocostatum*. *Aquatic Toxicology* 150, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.013>
- Romero-Freire, A., Joonas, E., Muna, M., Cossu-Leguille, C., Vignati, D.A.L., Giamberini, L., 2019. Assessment of the toxic effects of mixtures of three lanthanides (Ce, Gd, Lu) to aquatic biota. *Science of The Total Environment* 661, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.155>
- Rucki, M., Kejlova, K., Vlkova, A., Jirova, D., Dvorakova, M., Svobodova, L., Kandarova, H., Letasiova, S., Kolarova, H., Mannerstrom, M., Heinonen, T., 2021. Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *Journal of Rare Earths* 39, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2020.02.011>

Sneller, F.E.C., Kalf, D.F., Weltje, L., Van Wezel, A.P., 2000. Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for Rare Earth Elements (REEs) (No. RIVM--601501011). National Institute of Public Health and Environmental Protection RIVM.

Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., Stagnitti, F., 2010. Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere* 80, 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>

Tan, Q.-G., Yang, G., Wilkinson, K.J., 2017. Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 168, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.051>

Verplanck, P.L., Furlong, E.T., Gray, J.L., Phillips, P.J., Wolf, R.E., Esposito, K., 2010. Evaluating the Behavior of Gadolinium and Other Rare Earth Elements through Large Metropolitan Sewage Treatment Plants. *Environmental Science & Technology* 44, 3876–3882. <https://doi.org/10.1021/es903888t>

Yang, G., Sun, Z., Lv, X., Deng, Y., Zhou, Q., Huang, X., 2012. Living Target of Ce(III) Action on Horseradish Cells: Proteins on/in Cell Membrane. *Biological Trace Element Research* 150, 396–402. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9514-6>

Yoshida, S., Muramatsu, Y., Tagami, K., Uchida, S., 1998. Concentrations of lanthanide elements, Th, and U in 77 Japanese surface soils. *Environment International* 24, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00006-3)

Zhang, K., Kleit, A.N., Nieto, A., 2017. An economics strategy for criticality – Application to rare earth element Yttrium in new lighting technology and its sustainable availability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 77, 899–915.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.127>

Supplemental Data: Toxicity of Lanthanides on various fish cell lines

Emmanuel Fleurbaix^a, Marc Parant^a, Armand Maul^a, Carole Cossu-Leguille^{a*}

^a LIEC - Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, Université de Lorraine, CNRS, LIEC, rue du Général Delestraint, F-57000 Metz, France

* Corresponding author.

Email addresses: emmanuel.fleurbaix@univ-lorraine.fr, marc.parant@univ-lorraine.fr,
armand.maul@univ-lorraine.fr, carole.leguille@univ-lorraine.fr

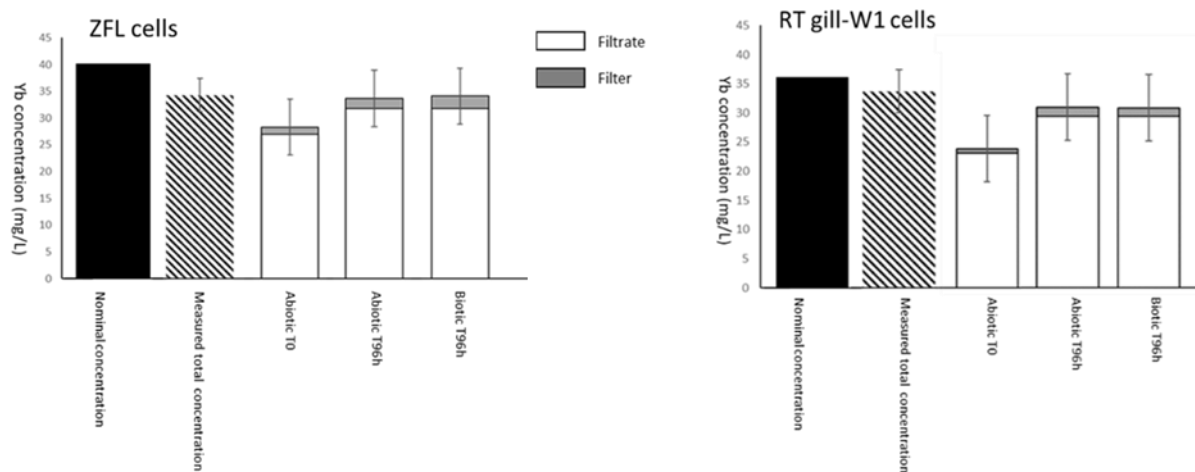


Fig. S1. Concentration (mg/L) of Ytterbium (Yb^{3+}) under abiotic and biotic conditions after the supplementation (T_0) and after 96 h (T_{96h}) of exposure in the media of ZFL and RTgill-W1 cells. Data are expressed as the mean \pm one standard deviation ($n = 3$) per condition.

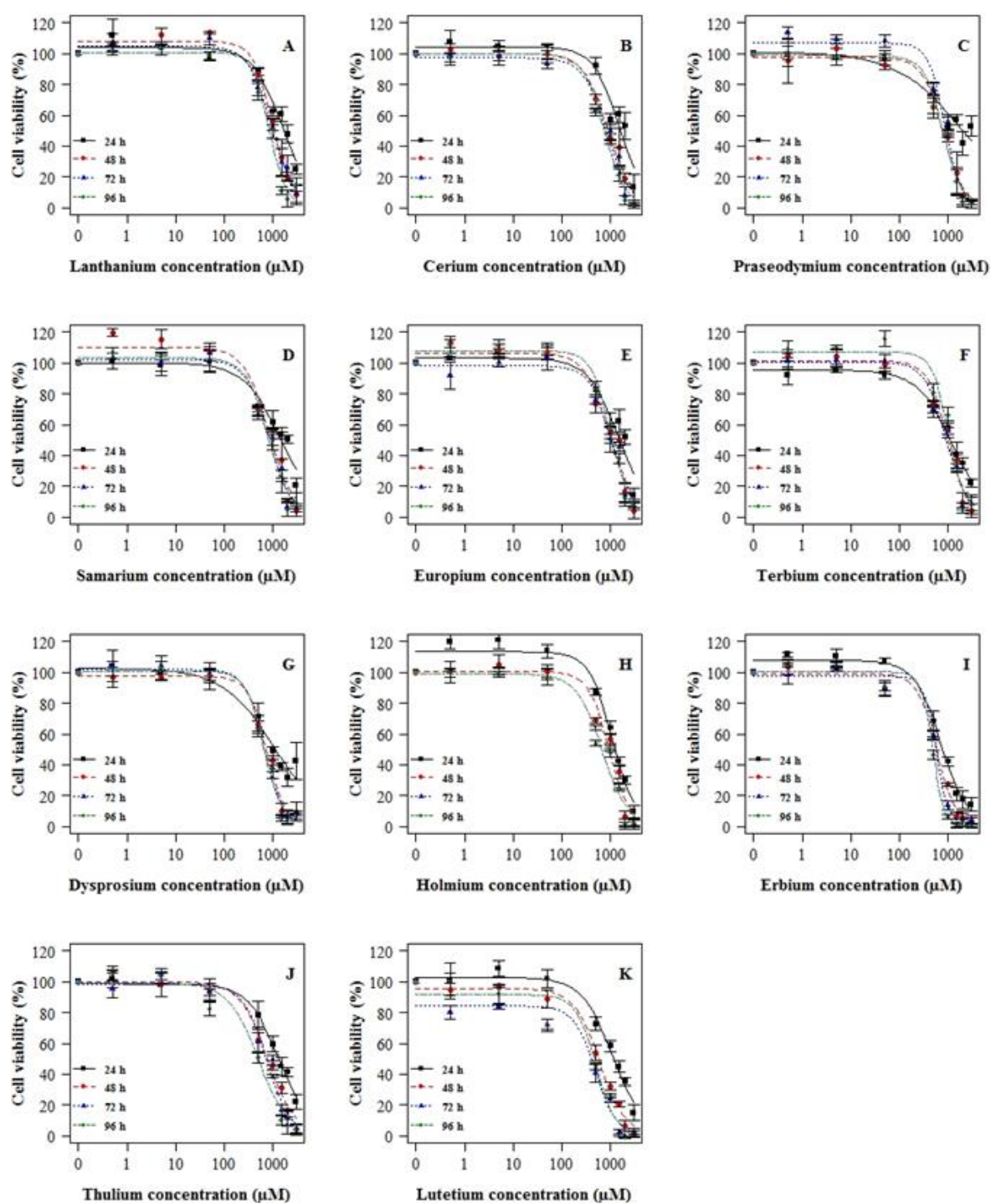


Fig. S2. Dose-response curves for the viability of ZF4 cells exposed for 24 to 96 h to Lanthanum (A), Cerium (B), Praseodymium (C), Samarium (D), Europium (E), Terbium (F), Dysprosium (G), Holmium (H), Erbium (I), Thulium (J) and Lutetium (K) at nominal concentrations ranging from 0.5 to 3000 μM . Data are expressed as the mean \pm one standard deviation (n = 3) per condition.

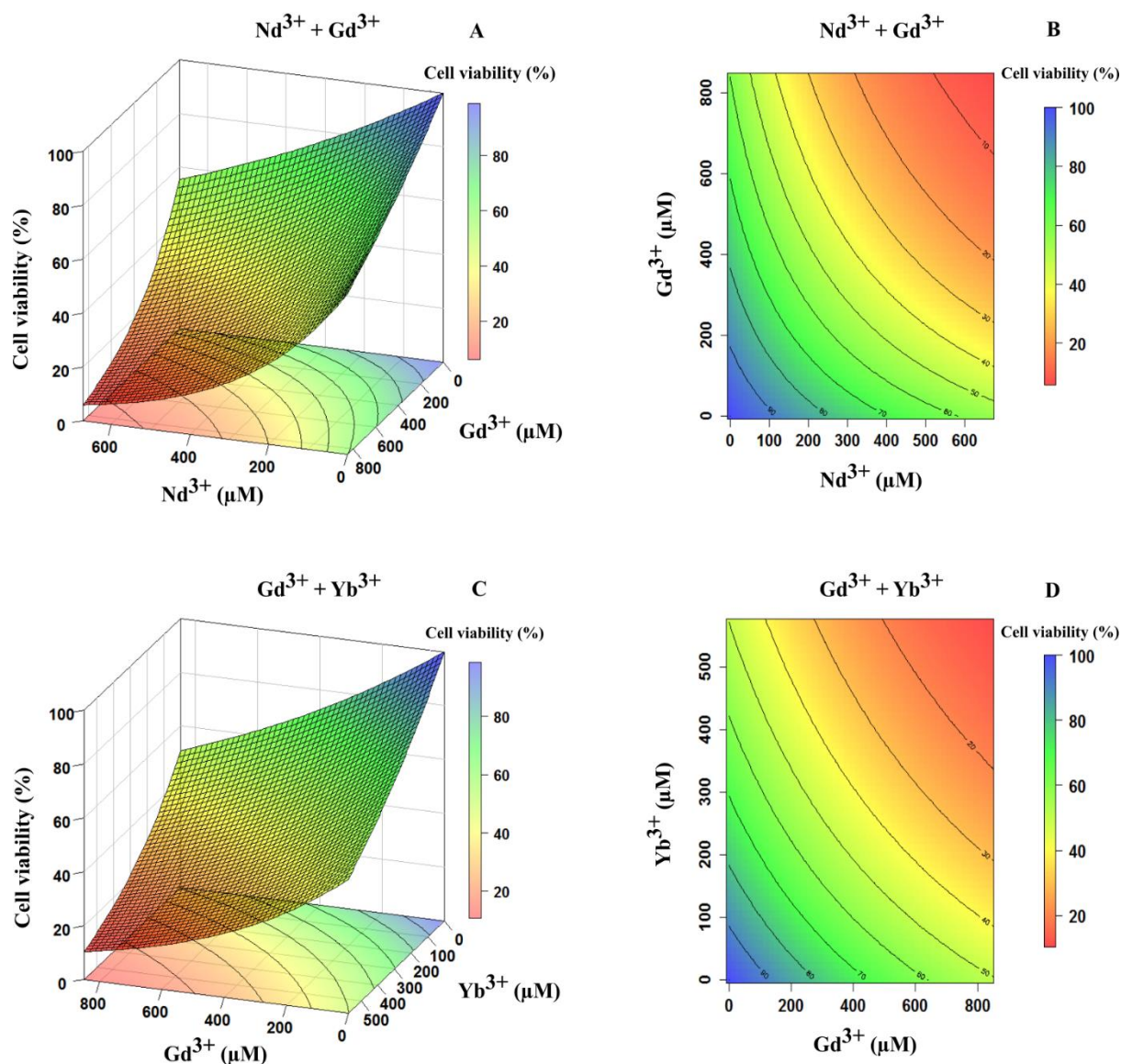


Fig. S3. Three-dimensional response surface plot (3D) showing the effect of Neodymium (Nd³⁺) and Gadolinium (Gd³⁺) (A), Gadolinium (Gd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) (C), mixture on the viability of ZF4 cells after 96 h of exposure; Two-dimensional level contour plot (2D) showing the relationship between various combinations of Neodymium (Nd³⁺) and Gadolinium (Gd³⁺) (B), Gadolinium (Gd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) (D) concentrations to attain predetermined values of ZF4 cell viability after 96 h of exposure (print in color).

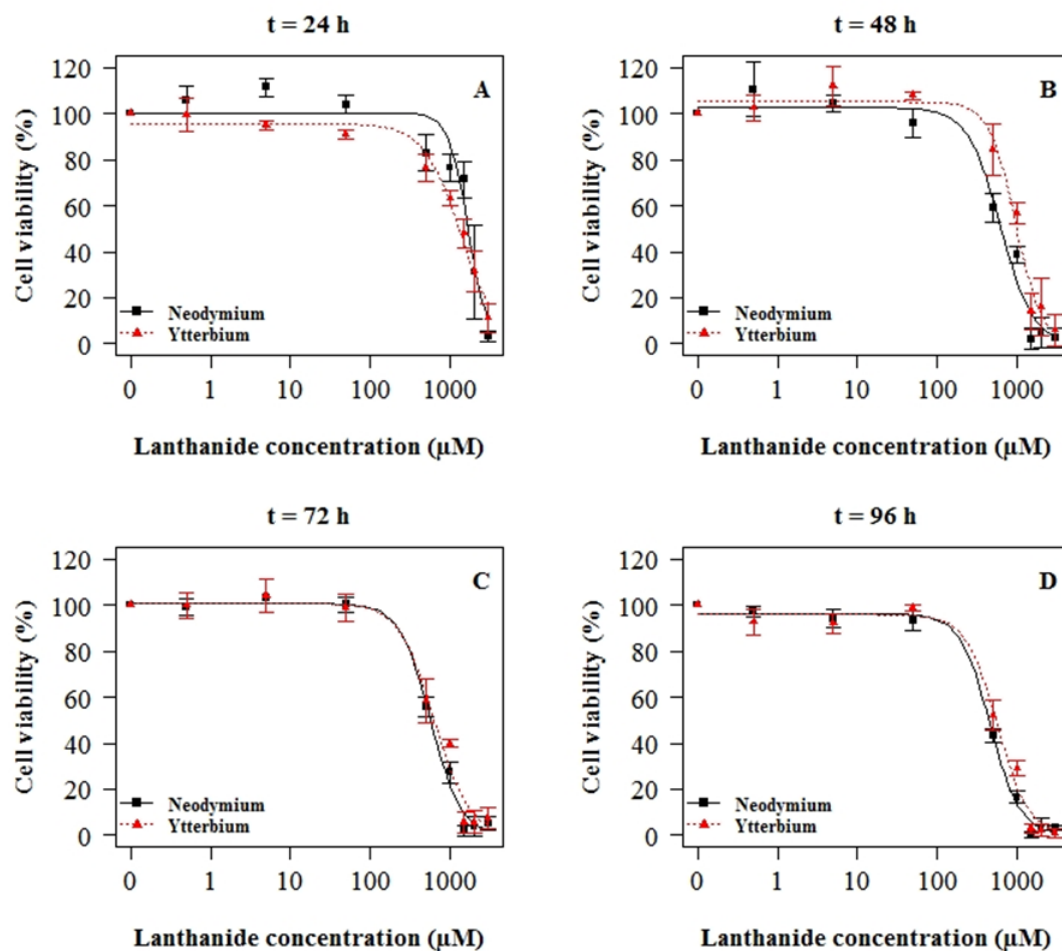


Fig. S4. Dose-response curves fitted on the viability data of ZFL cells exposed to Neodymium (Nd³⁺) and Ytterbium (Yb³⁺) at nominal concentrations ranging from 0.5 to 3000 μM for 24 (A), 48 (B), 72 (C), and 96 h (D). Data are expressed as the mean ± the standard deviation (n = 4) per condition.

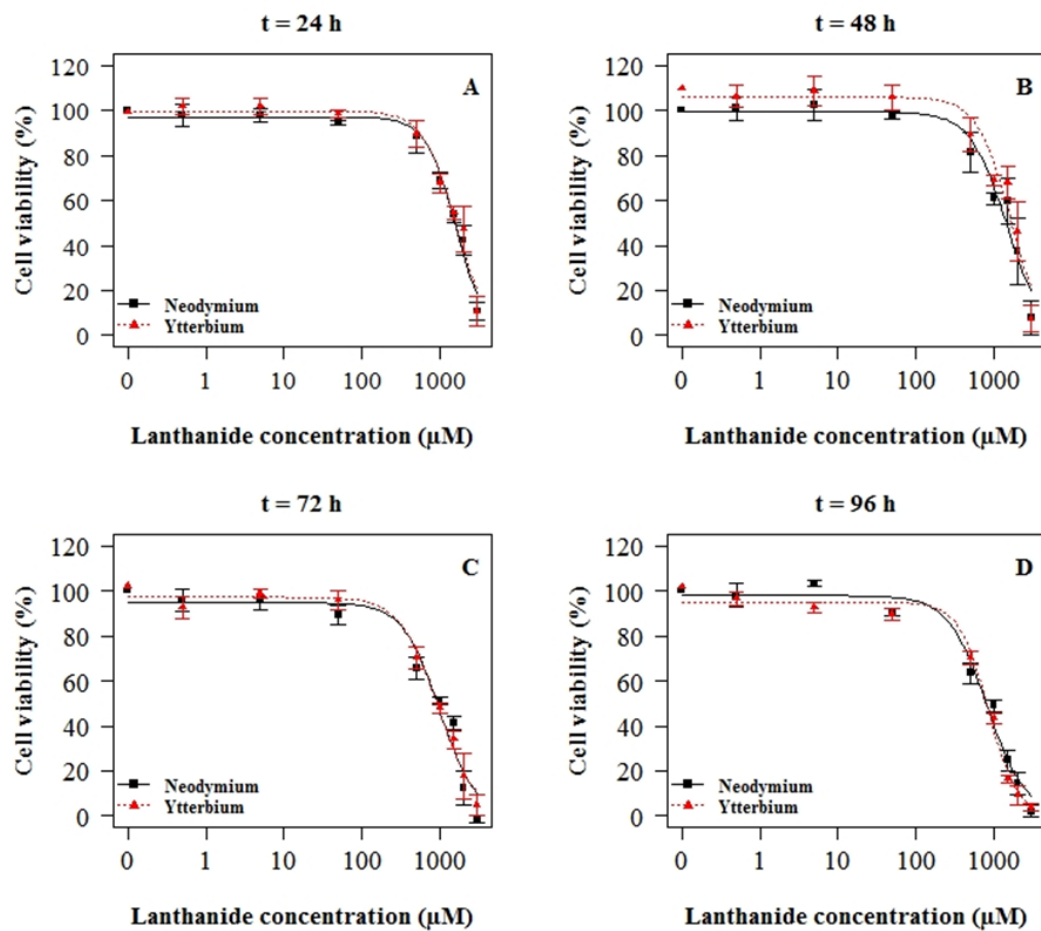


Fig. S5. Dose-response curves fitted on the viability data of RTgill-W1 cells exposed to Neodymium (Nd^{3+}) and Ytterbium (Yb^{3+}) at nominal concentrations ranging from 0.5 to 3000 μM for 24 (A), 48 (B), 72 (C), and 96 h (D). Data are expressed as the mean \pm the standard deviation ($n = 4$) per condition.

Table S1. Effective concentrations inducing 5 % (EC₅) and 10 % (EC₁₀) effect on ZF4 cell viability with associated 95 % confidence intervals between square brackets. Values are calculated from dose-response curves fitted obtained for 24, 48, 72, and 96 h of exposure to fourteen Lanthanides.

Lanthanide	Time (h)	EC ₅ [95 % CI]	EC ₁₀ [95 % CI]
		Molarity concentration (μM)	
Lanthanum	24	213 [103 - 323]	357 [215 - 499]
	48	263 [172 - 354]	371 [269 - 474]
	72	190 [123 - 258]	288 [206 - 369]
	96	261 [162 - 359]	353 [245 - 461]
Cerium	24	263 [111 - 415]	413 [277 - 598]
	48	162 [95 - 229]	251 [167 - 334]
	72	154 [74 - 235]	237 [137 - 337]
	96	167 [104 - 230]	245 [170 - 320]
Praseodymium	24	22 [0 - 56]	69 [0 - 148]
	48	182 [95 - 269]	265 [163 - 367]
	72	279 [175 - 384]	374 [260 - 488]
	96	206 [141 - 271]	290 [215 - 364]
Neodymium	24	151 [44 - 259]	271 [123 - 419]
	48	89 [39 - 138]	148 [82 - 214]
	72	137 [93 - 181]	197 [146 - 249]
	96	164 [65 - 264]	235 [123 - 347]
Samarium	24	111 [13 - 209]	214 [69 - 359]
	48	154 [31 - 277]	238 [85 - 392]
	72	167 [80 - 255]	252 [146 - 358]
	96	175 [90 - 259]	259 [158 - 360]
Europium	24	182 [52 - 312]	310 [138 - 483]
	48	183 [80 - 286]	282 [155 - 408]
	72	226 [126 - 326]	334 [216 - 452]
	96	278 [165 - 391]	389 [262 - 516]
Gadolinium	24	114 [27 - 201]	223 [95 - 351]
	48	106 [33 - 178]	183 [83 - 282]
	72	202 [95 - 310]	295 [169 - 420]
	96	220 [94 - 309]	290 [166 - 415]

	24	98 [33 - 162]	184 [89 - 279]
Terbium	48	247 [128 - 365]	351 [215 - 487]
	72	204 [113 - 295]	300 [191 - 408]
	96	340 [118 - 563]	455 [216 - 694]
	24	32 [0 - 70]	79 [34 - 149]
Dysprosium	48	196 [125 - 268]	276 [195 - 358]
	72	175 [125 - 226]	247 [190 - 304]
	96	183 [123 - 243]	254 [187 - 321]
	24	236 [127 - 345]	352 [223 - 480]
Holmium	48	219 [104 - 334]	317 [183 - 451]
	72	186 [104 - 269]	270 [173 - 368]
	96	110 [46 - 173]	174 [92 - 256]
	24	116 [66 - 167]	186 [121 - 250]
Erbium	48	149 [95 - 203]	210 [149 - 272]
	72	231 [180 - 281]	290 [240 - 340]
	96	212 [146 - 278]	261 [198 - 324]
	24	148 [63 - 233]	260 [145 - 376]
Thulium	48	109 [51 - 166]	179 [103 - 255]
	72	140 [72 - 208]	214 [131 - 298]
	96	60 [0 - 143]	102 [0 - 219]
	24	55 [26 - 84]	124 [73 - 174]
Ytterbium	48	203 [148 - 257]	278 [218 - 337]
	72	187 [108 - 265]	262 [172 - 352]
	96	148 [80 - 216]	209 [131 - 287]
	24	132 [67 - 198]	229 [140 - 318]
Lutetium	48	94 [45 - 144]	150 [86 - 213]
	72	27 [0 - 112]	51 [0 - 181]
	96	14 [0 - 38]	29 [0 - 70]

Table S2. WLR analysis on each binary mixture data (n = 42) from ZF4 cells. A backward stepwise procedure was performed with $\alpha = 0.01$.

Mixture	Fitted model	F-test p-value	r ²
Nd ³⁺ + Gd ³⁺	$\text{Log}_{10}(\text{cell viability}) = -3.902 \times 10^{-4} \text{Nd}^{3+} - 2.252 \times 10^{-4} \text{Gd}^{3+} - 1.106 \times 10^{-6} \text{Nd}^{3+} * \text{Gd}^{3+}$	$< 10^{-4}$	0.885
Nd ³⁺ + Yb ³⁺	$\text{Log}_{10}(\text{cell viability}) = -3.648 \times 10^{-4} \text{Nd}^{3+} - 5.664 \times 10^{-4} \text{Yb}^{3+} - 1.432 \times 10^{-6} \text{Nd}^{3+} * \text{Yb}^{3+}$	$< 10^{-4}$	0.927
Gd ³⁺ + Yb ³⁺	$\text{Log}_{10}(\text{cell viability}) = -2.922 \times 10^{-4} \text{Gd}^{3+} - 4.350 \times 10^{-4} \text{Yb}^{3+} - 6.754 \times 10^{-6} \text{Gd}^{3+} * \text{Yb}^{3+}$	$< 10^{-4}$	0.931

Table S3. WLR analysis on each binary mixture data (n = 42) from ZFL and RTgill-W1 cells. A backward stepwise procedure with $\alpha = 0.01$.

Cell line	Mixture	Fitted model	F-test p-value	r ²
ZFL	Nd ³⁺ + Yb ³⁺	$\text{Log}_{10}(\text{cell viability}) = -4.783 \times 10^{-4} \text{Nd}^{3+} - 5.272 \times 10^{-4} \text{Yb}^{3+} - 2.793 \times 10^{-6} \text{Nd}^{3+} * \text{Yb}^{3+}$	<10 ⁻⁴	0.887
RTgill-W1	Nd ³⁺ + Yb ³⁺	$\text{Log}_{10}(\text{cell viability}) = -2.838 \times 10^{-4} \text{Nd}^{3+} - 2.335 \times 10^{-4} \text{Yb}^{3+} - 2.326 \times 10^{-7} \text{Nd}^{3+} * \text{Yb}^{3+}$	<10 ⁻⁴	0.970

Chap. II – Étude de la détoxification de trois Lanthanides (Nd^{3+} , Gd^{3+} , et Yb^{3+}) dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*

Cette recherche visait à étudier les rôles des glutathion-S-transférases (GST) et des protéines membranaires de type multidrug resistance protein (MRP-like) dans la détoxification cellulaire des Lanthanides. Pour mettre en évidence leurs rôles, notre étude a été menée en utilisant des inhibiteurs spécifiques, i.e., l'acide éthacrynique pour les GST et le MK571 et le probénécide pour les protéines MRP-like. La toxicité individuelle du Nd^{3+} , du Gd^{3+} , et de l' Yb^{3+} a été mesurée sur la lignée cellulaire ZF4 de *Danio rerio* en présence ou non de ces inhibiteurs spécifiques.

1. Impact des solvants sur la viabilité cellulaire ZF4

En raison de leur difficulté de solubilisation, le MK571 et l'acide éthacrynique ont été dissous dans du DMSO, tandis que le probénécide a été préparé dans du PBS 1X. Au regard de la littérature, ces solvants permettent effectivement d'augmenter la solubilité des composés mais sont aussi capables d'entraîner des dommages cellulaires sévères (Penninckx et al., 1983). Des études ont montré qu'une concentration élevée de DMSO supérieure à 1 % dans le milieu de culture induisait une diminution de la viabilité cellulaire (Da Violante et al., 2002). D'autres études ont souligné que divers systèmes cellulaires chez l'Homme (Orbach et al., 2017) ou le rat (Lafarga et al., 1998 ; Moench et al., 2013) pouvaient subir un stress osmotique en présence d'une concentration inadaptée de solution tampon saline. Compte tenu de ces observations, nous avons vérifié que le DMSO à 0,1 % (solvant du MK571 et de l'acide éthacrynique) et le PBS à 1 % (utilisé pour mettre en solution le probénécide) n'impactaient pas la viabilité des cellules ZF4 après 96 h d'exposition (données non montrées dans ce manuscrit de thèse).

2. Impact des inhibiteurs de MRP-like sur la toxicité du Nd³⁺, du Gd³⁺, et de l'Yb³⁺ dans le cas des cellules ZF4

Afin de déterminer si les systèmes d'efflux de type MRP-like sont impliqués dans la détoxification cellulaire des Lanthanides, nous avons mesuré la toxicité de différents Lanthanides sur les cellules ZF4 en présence et en absence d'inhibiteurs de ces systèmes d'efflux. Pour ce faire, les cellules ZF4 ont été exposées pendant 96 h au Nd³⁺, au Gd³⁺, et à l'Yb³⁺ en présence et en absence de 100 µM de MK571 ou de 2 000 µM de probénécide.

En présence et en absence des inhibiteurs, la viabilité des cellules ZF4 n'est pas impactée aux plus faibles concentrations de Lanthanides (0,5 à 50 µM), avant de diminuer graduellement aux plus fortes concentrations de Lanthanides (500 à 3 000 µM) (Figure 26 et 27).

D'après les valeurs calculées de CE₅₀, les Lanthanides sont significativement plus toxiques sur les cellules ZF4 en présence de MK571 (Figure 26). Cette augmentation de la toxicité s'observe clairement par une diminution plus importante de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides à partir d'une concentration de 500 µM et en présence de l'inhibiteur. La comparaison des graphiques A, B, et C présentés dans la figure 26 permet également de constater que cet effet est plus prononcé pour le gadolinium que pour les 2 autres éléments testés.

Pour les résultats associés au probénécide, les valeurs obtenues de CE₅₀ ont mis en évidence, de manière surprenante, que la toxicité des Lanthanides est significativement plus faible en présence de cet inhibiteur (Figure 27A, 27B, et 27 C). Cette diminution de la toxicité est mise en évidence par un taux de viabilité cellulaire plus élevé de 10 % à partir de 500 µM de Lanthanide et en présence de probénécide.

Concernant les valeurs de CE₅ et de CE₁₀, aucune différence de toxicité des Lanthanides n'est observée sur les cellules ZF4 en présence de MK571 ou de probénécide (Tableau 15).

Tableau 15. Concentrations effectives induisant 5 % (CE₅) et 10 % (CE₁₀) d'effet sur la viabilité cellulaire ZF4 avec leurs intervalles de confiance à 95 % entre crochets. Les concentrations effectives sont exprimées en molarité (μM), et elles ont été calculées à partir des courbes dose-réponse obtenues après 96 h d'exposition au néodyme (Nd³⁺), au gadolinium (Gd³⁺), et à l'ytterbium (Yb³⁺) en présence et en absence de 100 μM de MK571 ou de 2 000 μM de probénécide.

Condition	Lanthanide	Concentration molaire (μM)	
		CE ₅ [IC 95 %]	CE ₁₀ [IC 95 %]
Témoin	Nd ³⁺	178 [151 - 205]	246 [216 - 277]
	Gd ³⁺	256 [216 - 297]	340 [297 - 384]
	Yb ³⁺	239 [198 - 281]	301 [260 - 342]
100 μM MK571	Nd ³⁺	277 [198 - 356]	325 [256 - 394]
	Gd ³⁺	272 [215 - 330]	309 [262 - 356]
	Yb ³⁺	231 [108 - 353]	275 [161 - 388]
2000 μM probénécide	Nd ³⁺	235 [185 - 284]	317 [264 - 371]
	Gd ³⁺	329 [245 - 413]	432 [344 - 521]
	Yb ³⁺	276 [249 - 304]	346 [318 - 374]

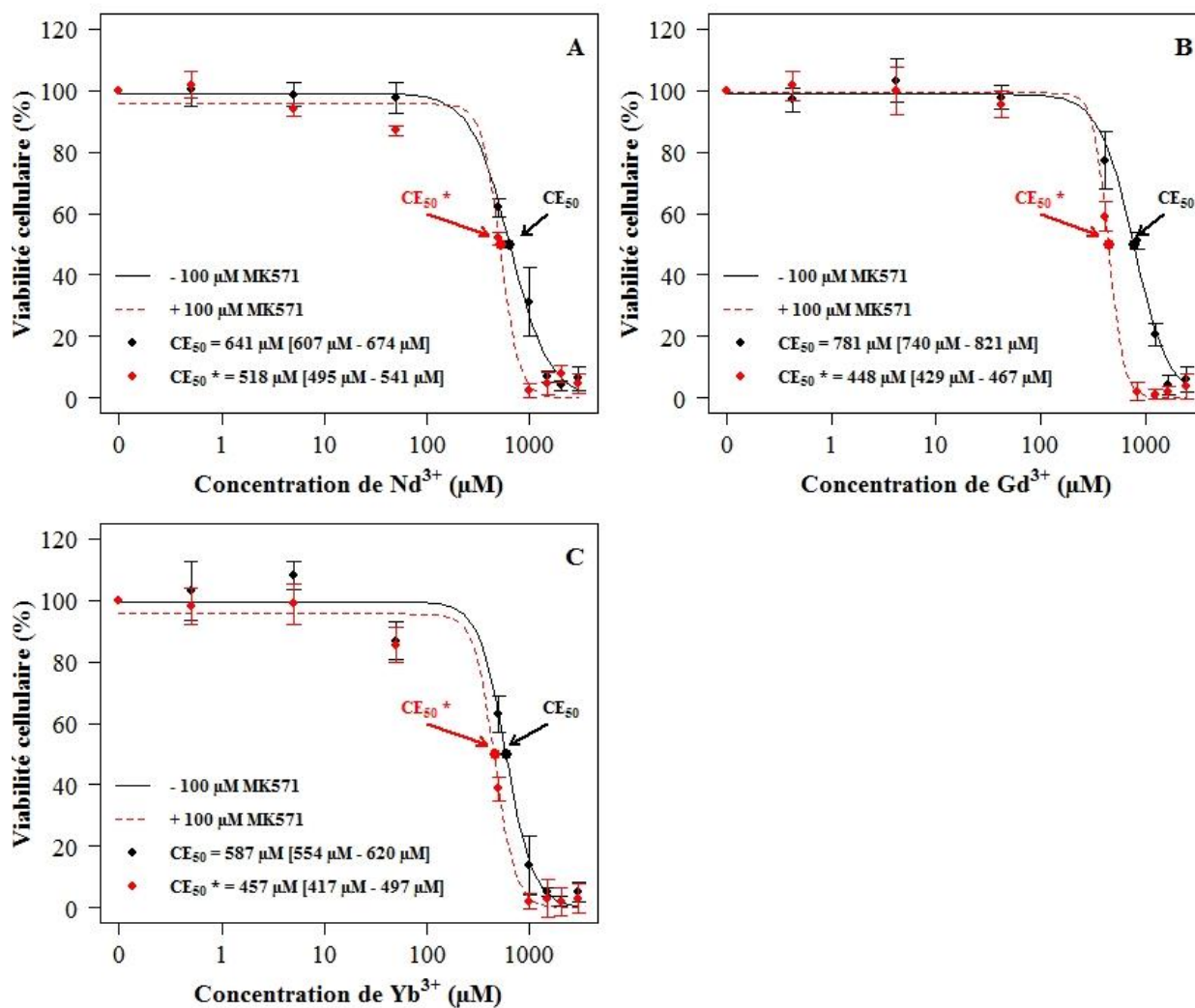


Figure 26. Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h au (A) néodyme (Nd^{3+}), (B) au gadolinium (Gd^{3+}), et (C) à l'ytterbium (Yb^{3+}) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence (rouge) et en absence (noir) de 100 μM de MK571. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart-type ($n = 6$) par condition. Le symbole * indique une différence significative de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides en présence de l'inhibiteur (en se basant sur la valeur de CE_{50} et l'intervalle de confiance à 95 %) par rapport à la viabilité des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides.

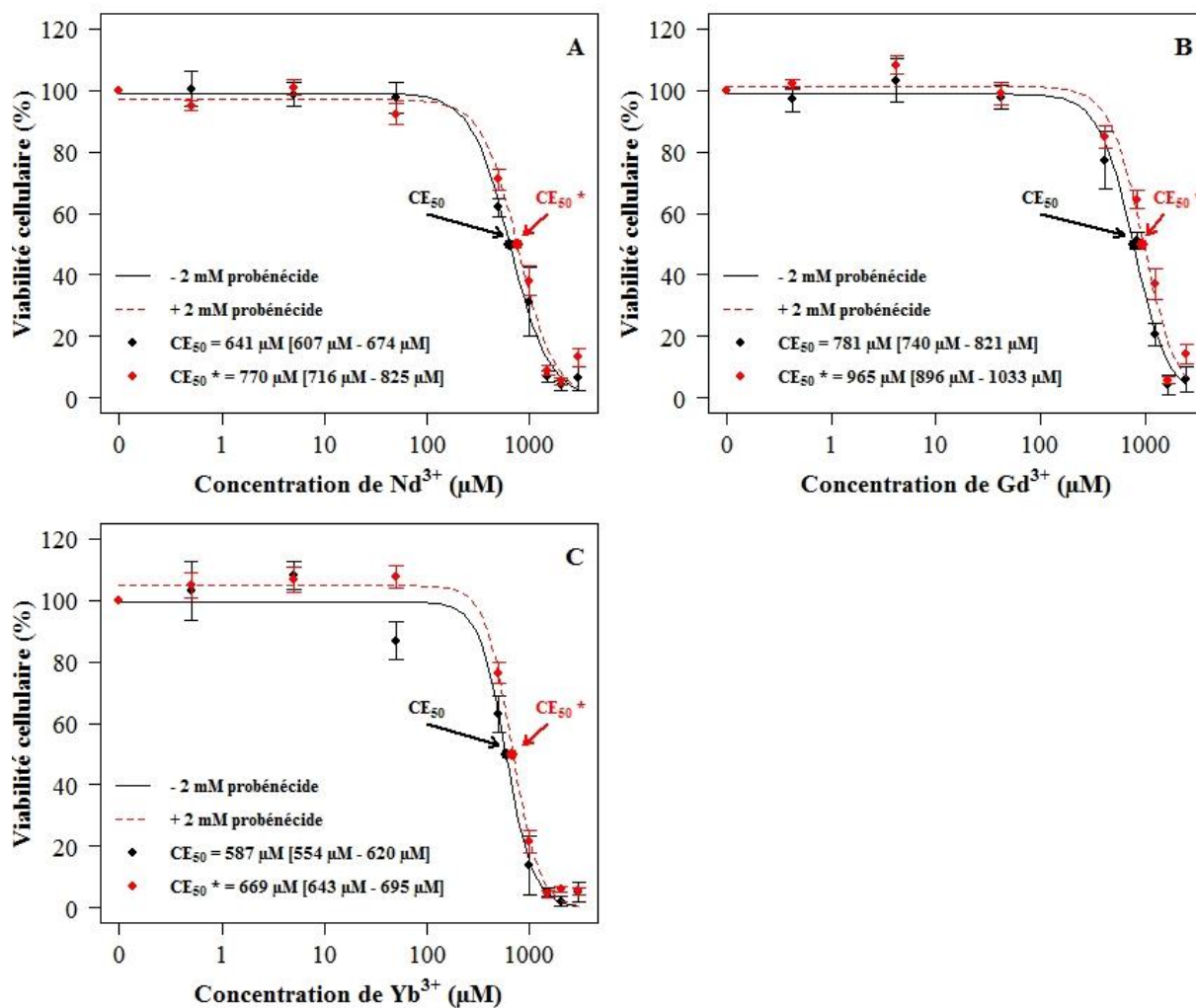


Figure 27. Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h au (A) néodyme (Nd³⁺), (B) au gadolinium (Gd³⁺), et (C) à l'ytterbium (Yb³⁺) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence (rouge) et en absence (noir) de 2 mM de probénécide. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne ± un écart-type (n = 6) par condition. Le symbole * indique une différence significative de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides en présence de l'inhibiteur (en se basant sur la valeur de CE₅₀ et l'intervalle de confiance à 95 %) par rapport à la viabilité des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides.

L'impact de la concentration des inhibiteurs des systèmes d'efflux de type MRP-like a été évalué sur la toxicité des Lanthanides. Pour cela, les cellules ZF4 ont été exposées durant 96 h aux Lanthanides (i.e., valeurs de CE_{50} déterminées sur les cellules ZF4 à $t = 96$ h) et en présence de différentes concentrations de MK571 ou de probénécide (Figure 28). Les résultats ont montré un impact significatif ($p < 0,01$) de la concentration en MK571 sur la toxicité des Lanthanides, i.e., une diminution plus importante de la viabilité cellulaire ZF4, comparé à celle des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides (Figure 28A). Cet impact est plus prononcé pour le Gd^{3+} , puisque le taux de viabilité cellulaire ZF4 diminue significativement de 83 % à partir de 50 μM de MK571, et de 97 % en présence de 100 μM de MK571 ($p < 0,01$). Pour les 2 autres Lanthanides, uniquement le MK571 à une concentration de 100 μM impacte significativement leur toxicité ($p < 0,01$). Ceci s'observe clairement par une diminution de 87 % du taux de viabilité des cellules ZF4 exposées au Nd^{3+} et de 85 % en présence d' Yb^{3+} . Quant aux résultats liés au probénécide, ceux-ci ont indiqué que la concentration en inhibiteur n'impacte pas significativement la toxicité des Lanthanides ($p > 0,01$). En effet, les cellules ZF4 exposées à chaque Lanthanide (i.e., valeurs de CE_{50}) présentaient un taux de viabilité compris entre 45 et 63 % pour toutes les conditions testées ($p > 0,01$; Figure 28B).

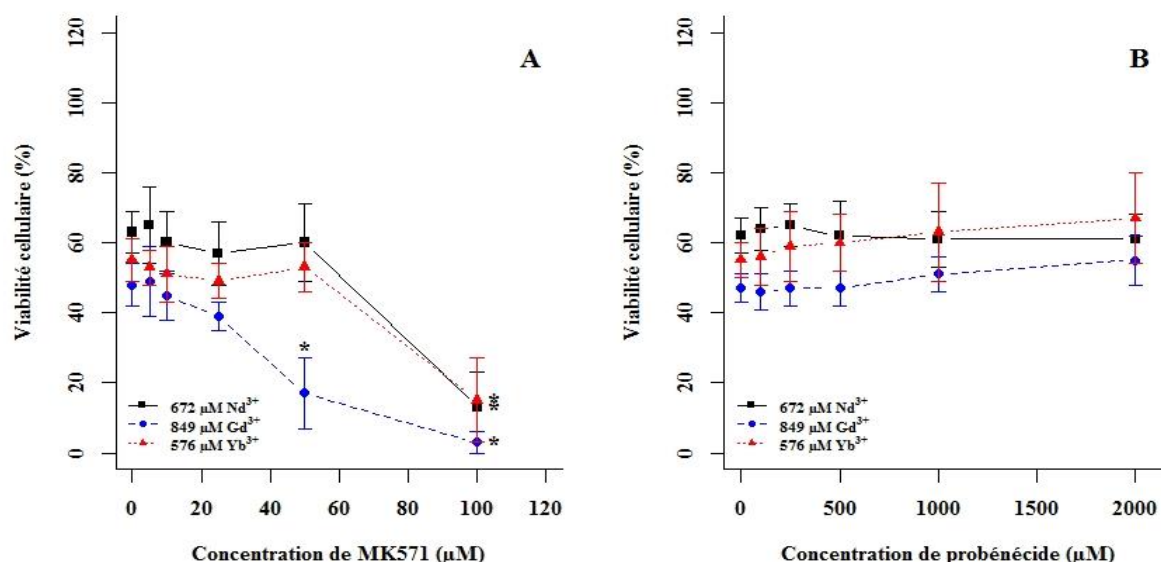


Figure 28. Viabilité des cellules ZF4 exposées durant 96 h à 672 μM de néodyme (Nd^{3+} ; en noir), 849 μM de gadolinium (Gd^{3+} ; en bleu), et 576 μM d'ytterbium (Yb^{3+} ; en rouge) en présence de différentes concentrations de (A) MK571 (0 à 100 μM) ou de (B) probénécide (0 à 2 000 μM). Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart de type ($n = 18$) par condition. Le symbole * indique une différence significative (ANOVA, $p^* < 0,01$) de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides en présence d'une concentration d'inhibiteur par rapport à la viabilité des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides.

Pour de plus faibles concentrations en Lanthanides (i.e., valeurs de CE_{10} déterminées sur les cellules ZF4 à $t = 96$ h) testées sur les cellules ZF4, la concentration de l'inhibiteur MK571 n'impacte pas significativement ($p > 0,01$) la toxicité du Nd^{3+} , du Gd^{3+} , et de l' Yb^{3+} (Figure 29A). Ce pattern de résultat a aussi été observé lorsque les cellules ZF4 étaient exposées aux Lanthanides et à différentes concentrations de probénécide, excepté pour le Nd^{3+} et l' Yb^{3+} à la plus forte concentration de probénécide testée (Figure 29B). En effet, pour ces deux conditions, de manière surprenante, le taux de viabilité cellulaire est significativement plus élevé ($p < 0,01$) de 12 % pour le Nd^{3+} et de 20 % pour l' Yb^{3+} .

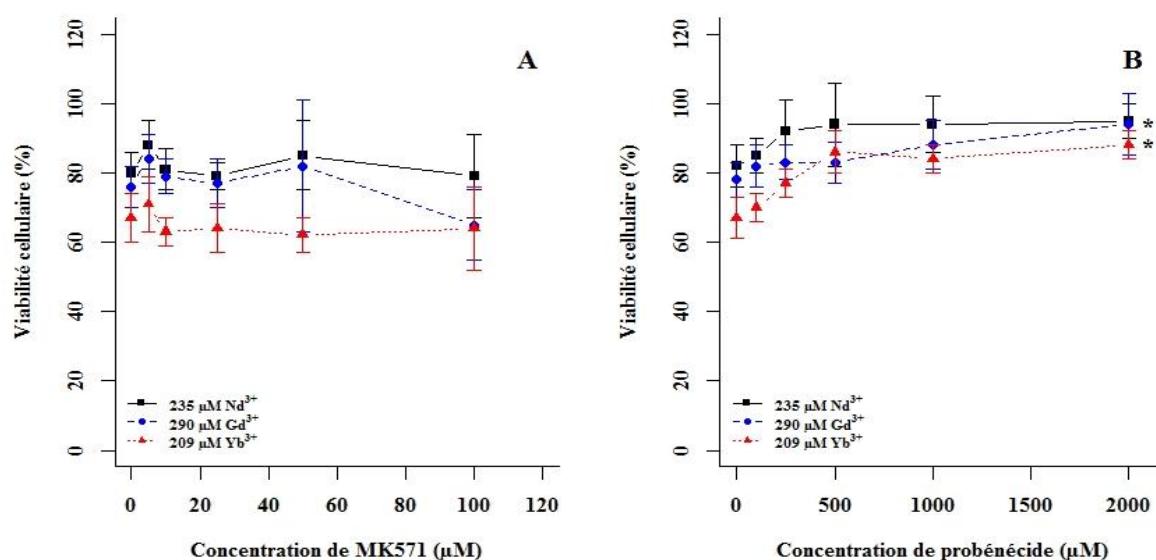


Figure 29. Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 96 h à 235 µM de néodyme (Nd^{3+} ; en noir), 290 µM de gadolinium (Gd^{3+} ; en bleu), et 209 µM d'ytterbium (Yb^{3+} ; en rouge) en présence de différentes concentrations de (A) MK571 (0 à 100 µM) ou de (B) probénécide (0 à 2 000 µM). Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart de type ($n = 18$) par condition. Le symbole * indique une différence significative (ANOVA, $p^* < 0,01$) de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides en présence d'une concentration d'inhibiteur par rapport à la viabilité des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides.

L'impact des inhibiteurs de MRP-like a été étudié sur la toxicité des Lanthanides au cours du temps. Pour ce faire, les cellules ZF4 ont été exposées pendant 24, 48, 72, et 96 h aux valeurs de CE_{50} de chaque élément, respectivement 672 µM de Nd^{3+} , 849 µM de Gd^{3+} , et 576 µM d' Yb^{3+} , en présence et en absence de 100 µM de MK571 ou de 2 000 µM de probénécide (Tableau 16). Nos mesures ont mis en évidence une toxicité significativement plus élevée des Lanthanides en présence de 100 µM de MK571 au cours du temps ($p < 0,01$). Cette augmentation de la toxicité est observée pour le Gd^{3+} à partir de 48 h jusqu'à 96 h d'exposition.

Pour le Nd^{3+} et Yb^{3+} , celle-ci apparaît clairement à partir de 72 h et à 96 h d'exposition. On remarque que le MK571 testé seul à une concentration de 100 μM n'est significativement pas toxique sur les cellules ZF4 après 24 h et 48 h ($p > 0,01$), comparativement à 72 h et 96 h d'exposition ($p < 0,01$). Ces résultats montrent que sans induire de toxicité directe sur les cellules ZF4, le MK571 peut impacter la toxicité des Lanthanides, en particulier celle du Gd^{3+} après une exposition de 48 h. En présence d'une concentration de 2 000 μM de probénécide, la toxicité du Gd^{3+} n'est significativement pas différente sur les cellules ZF4 ($p > 0,01$) après 24, 48, 72, et 96 h d'exposition. Pour le Nd^{3+} et Yb^{3+} , leur toxicité est, de manière surprenante, significativement plus faible ($p < 0,01$) avec cet inhibiteur après 72 h et 96 h d'exposition.

Tableau 16. Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 24, 48, 72, et 96 h à 672 μM de néodyme (Nd^{3+}), 849 μM de gadolinium (Gd^{3+}), et 576 μM d'ytterbium (Yb^{3+}) en absence et en présence de 100 μM de MK571 ou de 2 000 μM de probénécide. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart de type ($n = 18$) par condition. Le symbole * indique une différence significative (ANOVA 2 facteurs, $p^* < 0,01$) de la viabilité des cellules ZF4 exposées aux Lanthanides en présence de l'inhibiteur par rapport à la viabilité des cellules ZF4 exposées uniquement aux Lanthanides, pour chaque temps d'exposition considéré.

Condition	Temps	Sans inhibiteur	100 μM MK571	2 000 μM probénécide
Témoin	24 h	100 (± 5)	98 (± 5)	94 (± 9)
	48 h	100 (± 5)	96 (± 6)	95 (± 8)
	72 h	100 (± 4)	77 (± 7) *	90 (± 11)
	96 h	100 (± 5)	50 (± 6) *	76 (± 16) *
672 μM Nd^{3+}	24 h	75 (± 7)	78 (± 21)	90 (± 15)
	48 h	70 (± 8)	63 (± 7)	82 (± 6)
	72 h	59 (± 8)	38 (± 9) *	75 (± 6) *
	96 h	56 (± 9)	13 (± 10) *	74 (± 6) *
849 μM Gd^{3+}	24 h	67 (± 5)	69 (± 10)	75 (± 13)
	48 h	61 (± 8)	17 (± 5) *	70 (± 7)
	72 h	51 (± 3)	9 (± 6) *	59 (± 5)
	96 h	51 (± 8)	10 (± 10) *	59 (± 9)
576 μM Yb^{3+}	24 h	72 (± 14)	70 (± 16)	78 (± 5)
	48 h	64 (± 12)	56 (± 9)	80 (± 8)
	72 h	49 (± 6)	27 (± 7) *	75 (± 4) *
	96 h	44 (± 6)	7 (± 6) *	74 (± 6) *

3. Impact de l'acide éthacrynique, inhibiteur des GST, sur la toxicité du Gd^{3+} dans le cas des cellules ZF4

Afin d'étudier le rôle des glutathion-S-transférases dans la détoxification cellulaire des Lanthanides, les cellules ZF4 ont été exposées pendant 96 h au Gd^{3+} en présence et en absence de 10 μM d'acide éthacrynique (Figure 30).

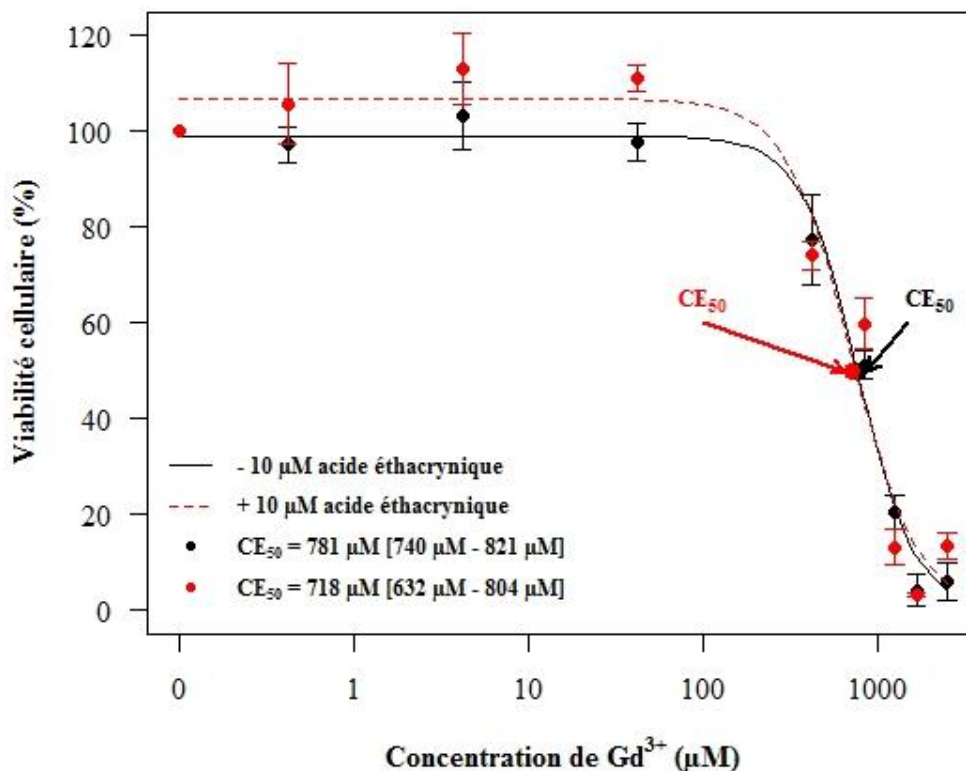


Figure 30. Courbes dose-réponse modélisées à partir des données de viabilité des cellules ZF4 exposées pendant 96 h au gadolinium (Gd^{3+}) pour des concentrations nominales variant de 0 à 3 000 μM en présence et en absence de 10 μM d'acide éthacrynique. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart-type ($n = 6$) par condition.

En présence et en absence d'acide éthacrynique, la viabilité des cellules ZF4 n'est pas impactée par les trois plus faibles concentrations de gadolinium (0,5 à 50 μM). Cependant, aux plus fortes concentrations de gadolinium (500 à 3 000 μM), la viabilité cellulaire diminue avec ou sans cet inhibiteur. Au regard des valeurs calculées de CE₅₀, l'acide éthacrynique ne présente aucun impact significatif sur la toxicité du Gd^{3+} . En ce qui concerne les valeurs de CE₅ et de CE₁₀, aucune différence significative de toxicité du gadolinium n'est également observée en présence de cet inhibiteur sur les cellules ZF4 (Tableau 17).

Tableau 17. Concentrations effectives induisant 5 % (CE₅) et 10 % (CE₁₀) d'effet sur la viabilité cellulaire ZF4 avec leurs intervalles de confiance à 95 % entre crochets. Les concentrations effectives sont exprimées en molarité (μM), et elles ont été calculées à partir des courbes dose-réponse obtenues après 96 h d'exposition des cellules ZF4 au gadolinium (Gd³⁺) en présence et en absence de 10 μM d'acide éthacrynique.

Condition	Lanthanide	Concentration molaire (μM)	
		CE ₅ [IC 95 %]	CE ₁₀ [IC 95 %]
Témoin	Gd ³⁺	256 [216 - 297]	340 [297 - 384]
10 μM acide éthacrynique	Gd ³⁺	199 [126 - 271]	276 [194 - 357]

Pendant 96 h, les cellules ZF4 ont été exposées à 849 μM de Gd³⁺ (i.e., la valeur de CE₅₀ du Gd³⁺) en présence de différentes concentrations d'acide éthacrynique (Figure 31). Pour chaque condition d'exposition, il est observé un taux de viabilité cellulaire de 50 % en rapport avec la toxicité du Gd³⁺ (i.e., CE₅₀). Ces résultats montrent que la concentration d'acide éthacrynique n'impacte pas significativement ($p > 0,01$) la toxicité du Gd³⁺ sur les cellules ZF4.

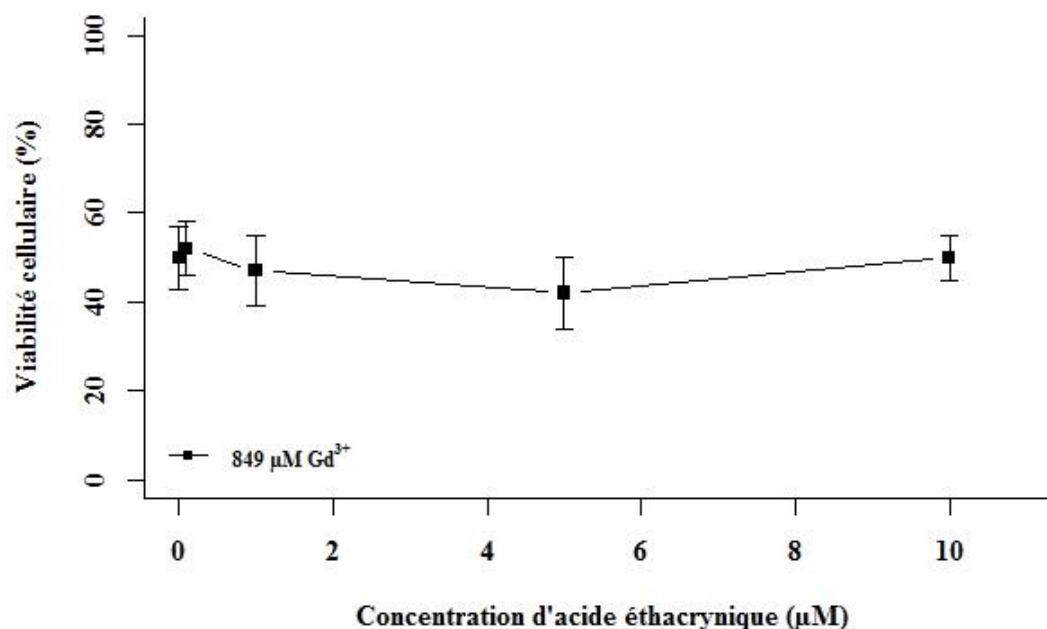


Figure 31. Viabilité des cellules ZF4 exposées pour 96 h à 849 μM de gadolinium (Gd³⁺) en présence de multiples concentrations d'acide éthacrynique. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne ± un écart de type (n = 18) par condition. Toutes les conditions n'étaient significativement pas différentes (ANOVA, $p > 0,01$).

L'impact de l'acide éthacrynique a été étudié sur la toxicité du gadolinium au cours du temps, en exposant les cellules ZF4 pendant 24, 48, 72, et 96 h à 849 μM de Gd^{3+} , et en présence et en absence de 10 μM d'acide éthacrynique (Tableau 18).

Tableau 18. Viabilité des cellules ZF4 exposées durant 24, 48, 72, et 96 h à 849 μM de gadolinium (Gd^{3+}) en absence et en présence de 10 μM d'acide éthacrynique. Les données de viabilité cellulaire sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart de type ($n = 18$) par condition. Toutes les conditions n'étaient significativement pas différentes (ANOVA 2 facteurs, $p > 0,01$), excepté pour l'acide éthacrynique testé seul sur les cellules ZF4 après 72 h et 96 h d'exposition (ANOVA 2 facteurs, $p^* < 0,01$).

Condition	Temps	Sans inhibiteur	10 μM acide éthacrynique
Témoin	24 h	100 (± 5)	125 (± 24)
	48 h	100 (± 5)	102 (± 13)
	72 h	100 (± 4)	77 (± 7) *
	96 h	100 (± 5)	49 (± 6) *
849 μM Gd^{3+}	24 h	67 (± 5)	68 (± 10)
	48 h	61 (± 8)	59 (± 14)
	72 h	51 (± 3)	51 (± 8)
	96 h	51 (± 8)	43 (± 9)

L'analyse statistique montre, au cours du temps, aucune différence significative ($p > 0,01$) de toxicité du gadolinium en présence et en absence d'acide éthacrynique sur la viabilité des cellules ZF4.

Chap. III – Développement et application des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

Cette étude exploratoire consistait à développer et à utiliser un nouveau modèle cellulaire pour évaluer la toxicité des Lanthanides. Pour ce faire, nous avons choisi de réaliser des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. La particularité de ce modèle cellulaire est de pouvoir tester la toxicité des Lanthanides sur des cellules qui, en théorie, ont une morphologie et une activité métabolique plus proches de ce qui se passe *in vivo*, comparativement aux lignées cellulaires dont l'activité métabolique a pu être modifiée au cours du processus d'immortalisation. La toxicité individuelle des 14 Lanthanides a été étudiée sur ce modèle cellulaire, après avoir vérifié la viabilité et la sensibilité des cellules primaires de glandes digestives pendant plusieurs jours de culture.

1. Développement et identification des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

Au total, 7 cultures primaires de *Corbicula fluminea* ont été réalisées durant la thèse. Chaque culture a été obtenue à partir de 3 individus ayant en moyenne une taille de $3 \pm 0,5$ cm et une masse de glande digestive de 481 ± 118 mg. L'observation de ces cultures au microscope inversé à contraste de phase et fluorescence (grossissement X 40) couplée à une analyse de la taille et de la granulométrie en cytométrie de flux ont indiqué la présence de plusieurs types cellulaires. Le premier type cellulaire est caractérisé par une taille inférieure à $5 \mu\text{m}$, dépourvu de granulation, et ayant un contour régulier (Figure 32 et 34A, noté 1). On remarque la présence d'une population hétérogène de cellules composée de plusieurs types cellulaires non différenciables aussi bien en cytométrie, qu'au microscope inversé à contraste de phase et fluorescence (Figure 32 et 34A, noté 2). Leur taille moyenne est comprise entre 7 et $14 \mu\text{m}$, leur contour est régulier, mais de granulométrie variable. Le dernier type est constitué de cellules ayant une granulométrie importante, à contour régulier, et une taille moyenne entre 17 et $25 \mu\text{m}$ (Figure 32 et 34A, noté 3). Parmi les différents types cellulaires recensés, ce sont les cellules de petite taille (noté 1 sur les figures 32 et 34A) qui sont quantitativement les plus importantes pour l'ensemble des mises en cultures qui ont été réalisées.

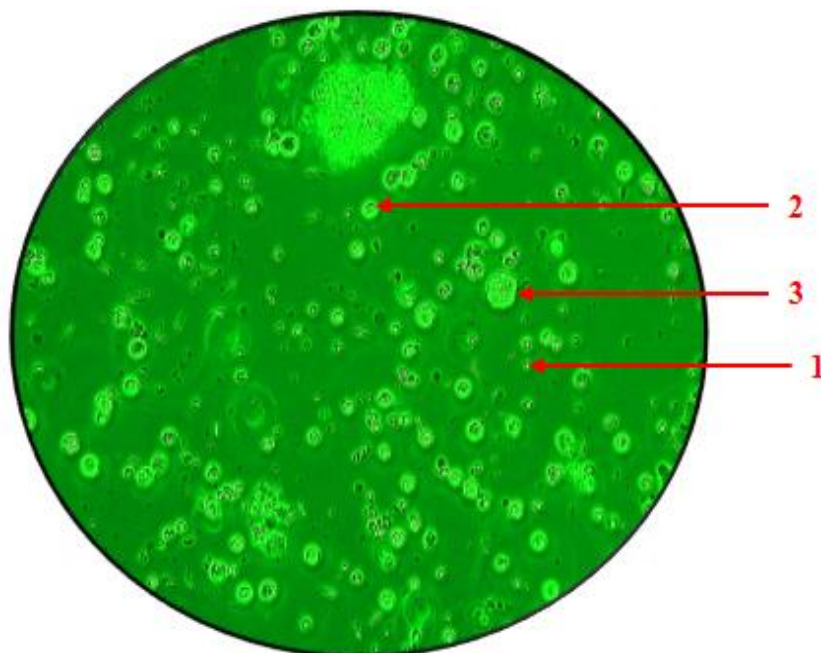


Figure 32. Observation et « identification » des principaux types cellulaires d'une culture primaire de glandes digestives de *Corbicula fluminea* (J₀) au microscope inversé à contraste de phase et fluorescence (grossissement x 40) (photo prise par Emmanuel Fleurbaix, 2018). 1 : 1^{er} type cellulaire ; 2 : 2^{ème} type cellulaire ; 3 : 3^{ème} type cellulaire.

Ces cultures primaires présentaient une viabilité cellulaire dont le taux était supérieur en moyenne à $77 \pm 4 \%$, d'après un comptage à la cellule de Malassez par la méthode de rétention au rouge neutre (Figure 33A). Le nombre total de cellules obtenues après la dissociation tissulaire était en moyenne de $3,9 \times 10^7 \pm 0,21 \times 10^7$ cellules, ce qui était suffisant pour obtenir lors de chaque nouvelle culture un minimum de 5 flasques T₇₅ensemencées à une densité finale de 5×10^5 cellules/mL (Figure 33B).

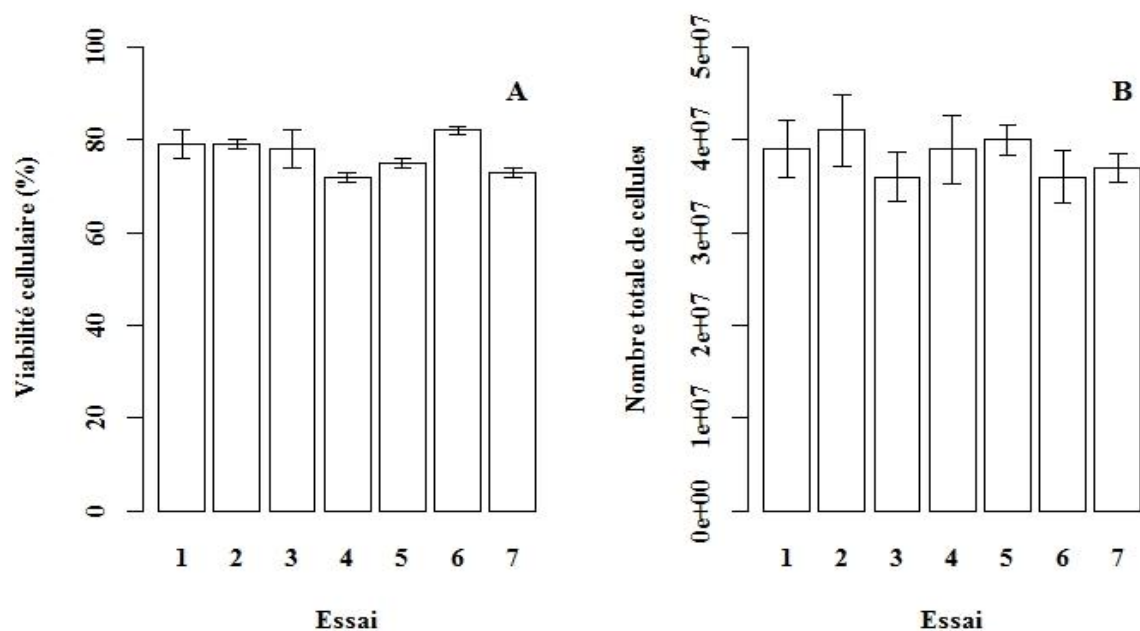


Figure 33. Numération de la viabilité cellulaire (A) et du nombre total de cellules (B) pour les 7 essais de cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Les données sont exprimées sous la forme d'une moyenne \pm un écart-type de 3 numérations à la cellule de Malassez (grossissement X 40). Le nombre total de cellules et le taux de viabilité cellulaire n'étaient significativement pas différents entre les 7 essais réalisés de culture primaire (ANOVA, $p > 0,01$).

Cependant, en raison de la difficulté à estimer convenablement la densité et la viabilité des cellules primaires due à leur taille comparable à des débris et des agrégats cellulaires à la cellule de Malassez, ces 2 paramètres ont aussi été mesurés en cytométrie de flux. Comme montré avec la Figure 34, avec un exemple représentatif d'une culture primaire, l'analyse par double marquage (Ca-AM / IP) a montré un pourcentage élevé de cellules viables (Figure 34B ; $> 74 \%$), et faible de cellules mortes (Figure 34C ; $< 22 \%$) et doublement marquées (Figure 34D ; $< 4 \%$). D'après les seuils positionnés sur les pics d'acquisition FL1, FL3, et FL1 vs FL3, la viabilité et la densité des cellules calculées sont identiques à celles estimées par le comptage à la cellule de Malassez. Au regard des résultats, les protocoles pour l'acclimatation des organismes, le développement des cultures primaires, et l'analyse de la viabilité et de la densité cellulaire en cytométrie de flux conviennent à la culture et au suivi des cellules primaires des glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

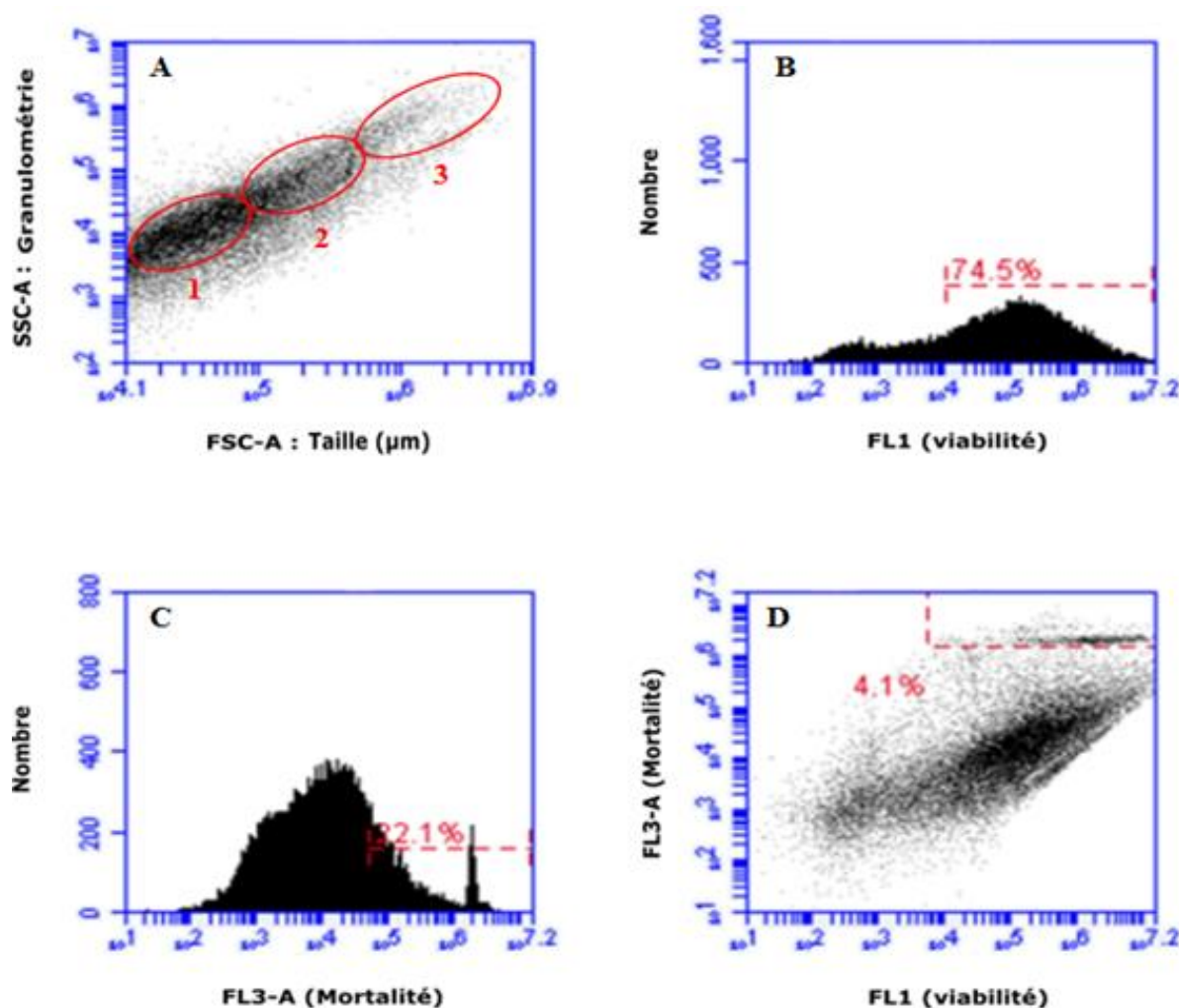


Figure 34. Analyse en cytométrie de flux d'une culture primaire de glandes digestives de *Corbicula fluminea* selon la taille et la granulométrie des cellules (A), et en estimant le nombre de cellules viables (B), mortes (C), et doublement marquées (D) par Ca-AM / IP.

2. Validation de la sensibilité des cultures primaires de *Corbicula fluminea*

D'après la littérature, le maintien des cultures primaires n'est possible que sur quelques jours en raison d'une absence de prolifération cellulaire (Freshney, 2005). De ce fait, il est possible que la sensibilité des cellules primaires soit altérée après une longue période de culture, dépassant une semaine. Avant d'évaluer la toxicité des Lanthanides, la sensibilité des cultures primaires a été, par conséquent, évaluée à l'aide du peroxyde d'hydrogène. Les cellules ont été exposées pendant 30 min au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture à une gamme de concentrations allant de 0 à 7,5 % de peroxyde d'hydrogène.

D'après la Figure 35, pour chaque jour de culture, l'effet cytotoxique observé sur les cellules primaires augmente graduellement avec la concentration de peroxyde d'hydrogène, comparé au témoin. On remarque aussi que le taux de mortalité cellulaire est de 100 % aux plus fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène (1,5 et 7,5 %).

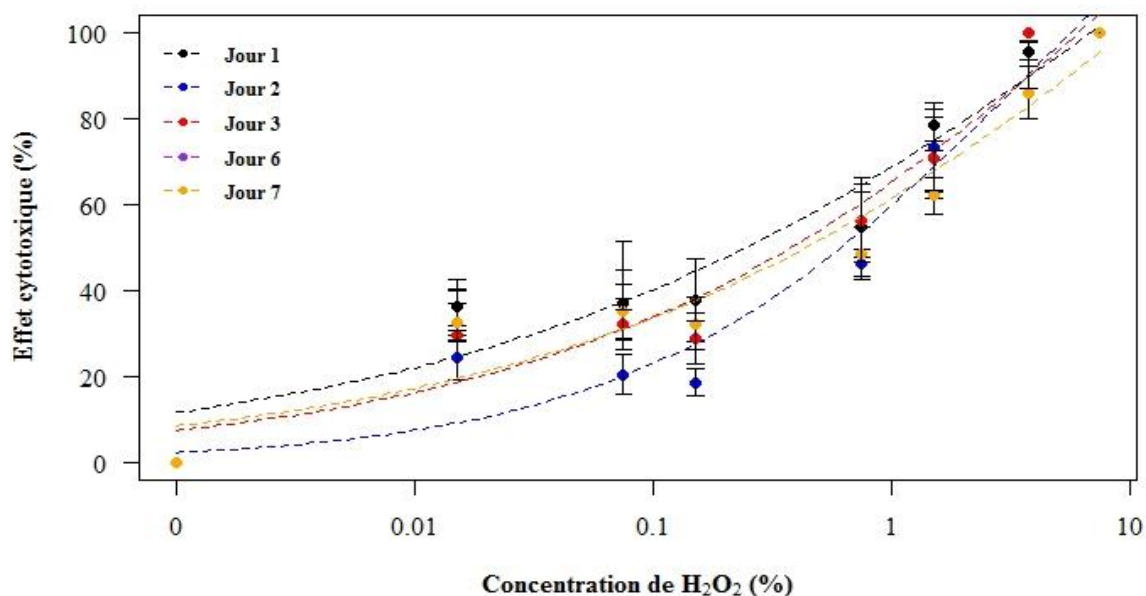


Figure 35. Courbes dose-réponse ajustées sur les données de rapport de densité des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* exposées pendant 30 minutes au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture. Les données de cytotoxicité sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart-type ($n = 3$) par condition.

Au regard des valeurs calculées de CE₅₀, la toxicité du peroxyde d'hydrogène n'est significativement pas différente sur les cellules primaires au cours du temps (Tableau 19). Ces résultats suggèrent que la sensibilité des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* est similaire après une semaine de culture précédant leur obtention. Pour la suite des expériences avec les Lanthanides, nous avons choisi d'utiliser, par conséquent, le peroxyde d'hydrogène à une concentration de 0,75 % (d'après la gamme d'essai et la valeur de CE₅₀ moyenne de $0,56 \pm 0,31$ %) comme contrôle positif de la sensibilité des cultures primaires.

Tableau 19. Concentrations effectives induisant 50 % (CE₅₀) d'effet cytotoxique du peroxyde d'hydrogène sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* avec les intervalles de confiance 95 % entre crochets. Les concentrations effectives sont exprimées en pourcentage, et elles ont été calculées à partir des courbes dose-réponse obtenues après une exposition de 30 minutes des cellules primaires au peroxyde d'hydrogène au 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture.

Concentration en H ₂ O ₂ (%)	
Jour de culture	CE ₅₀ [IC 95 %]
1	0,292 [0,000 - 0,619]
2	0,987 [0,574 - 1,199]
3	0,676 [0,040 - 1,312]
6	0,638 [0,000 - 1,559]
7	0,220 [0,000 - 0,584]

3. Évaluation de la toxicité des Lanthanides

Afin de démontrer que ce nouveau modèle cellulaire peut être utilisé pour évaluer la toxicité des Lanthanides, les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* ont été exposées pendant 96 h aux 14 Lanthanides (La³⁺ au Lu³⁺) à une concentration de 1 mM. D'après le Tableau 20, un effet cytotoxique des Lanthanides compris entre 16 ± 21 et 53 ± 3 % a été observé sur les cultures primaires de corbicules, comparativement au témoin. Par ailleurs, l'analyse statistique montre des différences significatives d'effet cytotoxique entre les 14 Lanthanides ($p < 0,01$), i.e., une toxicité plus élevée est observée pour le lanthane, l'euprium, le thulium, et l'ytterbium sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Ces résultats suggèrent une de variation de toxicité entre les Lanthanides sur les cellules primaires de glandes digestives de *C. fluminea*. Cependant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la toxicité et la masse atomique des Lanthanides (corrélation de Pearson ; $r_s = 0,22$; $p > 0,05$). Ces premiers résultats sont à nuancer et doivent être confirmés en répétant plusieurs fois l'expérience, tout en étudiant aussi une gamme de concentrations de Lanthanides et une cinétique de réponses.

Tableau 20. Effet cytotoxique induit par chaque Lanthanide (La³⁺ au Lu³⁺) à une concentration finale de 1 mM après 96 h d'exposition de ces éléments sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Les données d'effet cytotoxique sont exprimées en pourcentage sous la forme d'une moyenne \pm un écart type (n = 3) par condition. Le symbole * indique une différence significative (ANOVA, p* < 0,01) de toxicité entre les Lanthanides.

Contrôle	Effet cytotoxique (%)	Lanthanide	Effet cytotoxique (%)
Témoin	0 (\pm 1)	Lanthane	32 (\pm 12)*
Témoin positif (H ₂ O ₂ à 0,75 %)	44 (\pm 5)	Cérium	53 (\pm 3)
		Praséodyme	47 (\pm 11)
		Néodyme	51 (\pm 12)
		Samarium	46 (\pm 9)
		Europium	39 (\pm 5)*
		Gadolinium	44 (\pm 4)
		Terbium	50 (\pm 14)
		Dysprosium	41 (\pm 7)
		Holmium	48 (\pm 7)
		Erbium	51 (\pm 7)
		Thulium	32 (\pm 9)*
		Ytterbium	16 (\pm 21)*
		Lutétiem	46 (\pm 14)

Discussion

Les Lanthanides représentent aujourd'hui un enjeu économique et stratégique majeur, étant donné leur importance dans les nouvelles technologies (Zhou et al., 2017 ; Goodenough et al., 2018 ; Dushyantha et al., 2020). L'utilisation de ces métaux dans les activités humaines ayant été de plus en plus fréquente au cours de ces 30 dernières années, leurs rejets vers les écosystèmes aquatiques ont, par conséquent, considérablement augmenté (Verplack et al., 2010 ; Kulaksiz et Bau, 2011). La présence de ces métaux dans les écosystèmes aquatiques a été largement décrite (Bau et Dulski, 1996 ; Kulaksiz et Bau, 2013 ; Klaver et al., 2014 ; Hatjet et al., 2016 ; Perrat et al., 2017 ; Schmidt et al., 2019 ; Itoh et al., 2021), et des recherches ont été menées pour étudier les effets toxiques des Lanthanides sur les organismes aquatiques. Actuellement, ces recherches ne permettent pas de conclure quant à leur toxicité individuelle et en mélange, et leurs mécanismes d'action moléculaire restent non élucidés. Ces études restent peu nombreuses et sont essentiellement focalisées sur les Lanthanides Légers (Gonzalez et al., 2014 ; Herrmann et al., 2016 ; Romero-Freire et al., 2019 ; Hanana et al., 2021).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la toxicité cellulaire des Lanthanides et à identifier les mécanismes impliqués dans la détoxification cellulaire de ces métaux.

Dans une première partie, nous discuterons des résultats concernant la toxicité individuelle de la série complète des Lanthanides sur les lignées cellulaires de poissons, ainsi que sur les mélanges pour des éléments retenus dans le cadre du programme ANR ECOTREE, i.e., le néodyme, le gadolinium, et l'ytterbium. Dans une deuxième partie, les résultats relatant du rôle des GST et des protéines MRP-like pour la détoxification des trois Lanthanides sélectionnés dans des cellules ZF4 de *Danio rerio* seront discutés. Dans une troisième partie, nous discuterons des résultats sur le développement et l'utilisation d'un nouveau modèle cellulaire, les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*, pour évaluer la toxicité des Lanthanides.

1. Toxicité *in vitro* des sels de Lanthanides sur des lignées cellulaires de poissons

Dans les écosystèmes aquatiques, les Lanthanides sont présents sous forme d'ion trivalent libre ou complexée. Des études ont montré que la formation de ces espèces est dépendante des caractéristiques physico-chimiques des milieux, i.e., pH, température, et composition en carbonate, sulfate, et phosphate (Florence et al., 1992 ; El-Akl et al., 2015 ; Khan et al., 2017). En tenant compte de cette affirmation, de nombreuses études d'écotoxicité suggèrent que la toxicité des Lanthanides observée sur les organismes aquatiques est liée à la biodisponibilité de ces métaux dans les milieux des bioessais (Gonzalez et al., 2015 ; Herrmann et al., 2016 ; Blaise et al., 2018 ; Romero-Freire et al., 2019). Ainsi, pour comprendre la toxicité cellulaire des Lanthanides, il apparaissait fondamental de déterminer si les Lanthanides étaient biodisponibles dans les milieux de culture des cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio* et des cellules RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*. En mesurant par ICP-MS les concentrations réelles d'exposition de nos cellules aux Lanthanides (seuls et en mélanges), les résultats analytiques ont mis en évidence des concentrations biodisponibles en Lanthanides comprises entre 85 et 99 % dans les milieux de culture. Ces résultats sont en accord avec ceux de Gonzalez et al. (2015) et de Romero et al. (2019), lesquels ont montré des concentrations biodisponibles en Ce^{3+} , en Gd^{3+} , en Yb^{3+} , et en Lu^{3+} supérieures à 80 % dans les milieux des bioessais de *H. attenuata*, *B. calyciflorus*, et de *A. fisheri*. Même si la proportion de Lanthanides sous forme de précipités était faible (5 % sur les filtres) dans nos milieux de culture, nous ne pouvions exclure un effet de ces agrégats et/ou de Lanthanides présents sous forme de colloïdes sur les cellules. En effet, dans des études précédentes, plusieurs auteurs ont formulé l'hypothèse que la toxicité des Lanthanides est associée à la présence de d'agrégats de ces métaux dans les milieux de culture (Ng et al., 2014 ; Joonas et al., 2017 ; Romero-Freire et al., 2019). Cette hypothèse a été vérifiée à l'aide du dioxyde de silicium, une molécule inerte dont la structure peut être assimilée à des agrégats présentant une taille comprise entre 1 et 1 000 nm (Bergna, 1994). Les cellules ZF4 de *Danio rerio* ont été exposées à ce composé pendant 96 h, à des concentrations proches et supérieures à celles des Lanthanides. En présence de cette molécule inerte, un taux de viabilité de 100 % des cellules ZF4 a été mesuré pour toutes les conditions testées. En résumé, l'ensemble des résultats montrent que la toxicité observée sur nos modèles cellulaires est induite par les effets directs des Lanthanides, lesquels sont biodisponibles dans les milieux de culture.

Au travers des essais de toxicité *in vitro* présentés dans ce manuscrit, la toxicité individuelle des Lanthanides a été évaluée. Les cellules ZF4 et ZFL de *Danio rerio* ainsi que sur les cellules RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss* ont été exposées pendant 24, 48, 72, et 96 h à une gamme de concentrations allant de 0 à 3 000 μM de Lanthanides. Les résultats ont montré, pour toutes les durées d'exposition, un impact toxique des Lanthanides sur toutes les lignées cellulaires de poissons, i.e., la viabilité des cellules exposées aux Lanthanides diminuait aux plus fortes concentrations testées. Nos résultats confirment les observations faites par Laville et al. (2004). Après 24 h d'exposition à une gamme de concentrations allant de 0 à 1 000 μM (i.e., 0 à 157 mg/L) de GdCl_3 , ces auteurs ont observé une diminution concentration-dépendante de la viabilité des cellules fibroblastiques de *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1) exposées au gadolinium. En outre, l'évaluation de la toxicité des 14 Lanthanides sur les cellules ZF4 de *Danio rerio* a soulevé la question de savoir si la toxicité est corrélée à la masse atomique des Lanthanides ? En analysant nos données, les résultats ont montré une absence de corrélation entre la masse atomique et les valeurs de CE_{50} des Lanthanides. Notre résultat n'est pas en accord avec ceux des précédentes études qui ont mis en évidence une toxicité plus élevée des Lanthanides Lourds, par rapport à celles des Lanthanides Légers (Gonzalez et al., 2015 ; Blaise et al., 2018 ; Romero-Freire et al., 2019 ; Manusadžianas et al., 2020), mais également avec les études mentionnant une toxicité du même ordre entre les Lanthanides (Blinova et al., 2018). Dans notre étude, la toxicité semble augmentée le long de la série de de cette famille de métaux (La^{3+} au Lu^{3+}), cependant cette augmentation n'est pas régulière puisque des variations individuelles de toxicité ont été observées entre les Lanthanides. En comparant les valeurs de CE_{50} des Lanthanides, il a été montré que les 4 derniers Lanthanides Lourds (erbium, thulium, ytterbium, et lutétium) sont effectivement les éléments les plus toxiques sur les cellules ZF4 de *Danio rerio*. L'euporium (Lanthanide Léger) et le terbium (Lanthanide Intermédiaire) sont, quant à eux, les éléments les moins toxiques sur ces cellules. D'un point de vue biochimique, les différences observées de toxicité entre les Lanthanides pourraient être expliquées par leur habilité à concurrencer des ions essentiels tels que le calcium intracellulaire chez les organismes aquatiques (Ansoborlo et al., 2006 ; Bresson et al., 2011 ; Tan et al., 2017). Pour la suite des recherches sur ce sujet, il serait intéressant de poursuivre l'étude non seulement de la toxicité des Lanthanides Légers et Intermédiaires (lanthane, cérium, et gadolinium) comme fréquemment mentionnée dans la littérature actuelle (Pagano et al., 2015 ; Herrmann et al., 2016), mais également celles des

Lanthanides Lourds, en raison des variations individuelles de toxicité liées à leur spécificité de liaison à des biomolécules et aux composants des milieux de culture.

Comparativement aux études menées sur la toxicité individuelle des contaminants, les études de mélanges sont qualifiées comme un point de vue environnementale plus réaliste pour évaluer les dangers et les risques associés des contaminants dans les écosystèmes aquatiques (Altenburger et al., 2018). Ainsi, nous avons également étudié la toxicité du néodyme, du gadolinium, et de l'ytterbium en mélanges sur nos 3 lignées cellulaires de poissons. À travers cette étude, la question était de déterminer si les effets toxiques des mélanges testés (i.e., antagoniste, additive, ou synergie) sont identiques, quelque soit les Lanthanides utilisés dans les mélanges ? Pour y répondre, nous avons réalisé un plan d'expérience complet de mélanges binaires et quelques conditions de mélanges ternaires à partir d'un Lanthanide Léger (néodyme), Intermédiaire (gadolinium), et Lourd (ytterbium) sur les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Pour les cellules ZFL de *Danio rerio* et les cellules RTgill-W1 d'*Oncorhynchus mykiss*, seuls quelques conditions de mélanges ont été testées sur ces 2 modèles cellulaires. Les concentrations testées dans nos mélanges correspondaient aux valeurs de CE₅, CE₁₀, et CE₅₀ de chaque Lanthanide qui ont été obtenues sur les cellules ZF4 à t = 96 h. Les résultats ont montré l'existence d'effets synergiques pour tous les mélanges binaires de Lanthanides testés sur les 3 lignées cellulaires de poissons. Ces effets de synergie étaient observés à toutes les combinaisons de concentrations de Lanthanides et devenaient importants aux plus fortes concentrations testées en mélanges. Concernant l'analyse statistique des effets toxiques des Lanthanides en mélanges ternaires, il n'a pas été possible de mettre clairement en évidence l'existence d'effets toxiques (i.e., antagoniste, additive, ou synergie), en raison de la difficulté d'interprétation des interactions d'ordre III avec le modèle WLR. Au cours de la thèse, des mesures de viabilité ont aussi été faites sur les cellules ZF4 de *Danio rerio* exposées pendant 96 h à des concentrations de néodyme, de gadolinium, et d'ytterbium qui étaient équivalentes aux concentrations totales de quelques mélanges binaires et ternaires des Lanthanides. Ces résultats complémentaires ont souligné que l'impact toxique individuel des Lanthanides est équivalent à celle de ces éléments en mélanges à concentration totale équivalente sur la viabilité des cellules ZF4. Ceux-ci laissent à penser que la toxicité des Lanthanides en mélanges est également concentration totale-dépendant, quelque soit les Lanthanides et leur nombre utilisés dans les mélanges. La comparaison de nos résultats avec les travaux de la littérature est difficile car les paramètres expérimentaux (durées, concentrations, éléments dans les mélanges, organismes étudiés) diffèrent selon les recherches. De plus, les conclusions qui en sont tirées ne dégagent aucun consensus concernant l'impact

toxique des Lanthanides en mélanges. Tai et al. (2010) ont montré un effet additif pour le mélange des 14 Lanthanides sur *Skeletonema costatum*. Des effets de synergie ont été rapportés sur *Chlamydomonas reinhardtii* exposée à un mélange de samarium, de lanthane, de cérium, et d'euporium (Tan et al., 2017), ainsi que sur des bactéries marines et des microalgues d'eau douce exposées à différents mélanges de cérium, de gadolinium, et de lutétium (Romero-Freire et al., 2019). Ces auteurs ont aussi observé des effets antagonistes sur des rotifères exposés à ces mêmes mélanges. Le manque de consensus concernant la toxicité des Lanthanides en mélanges peut également s'expliquer par les limites des modèles « classiques » utilisés dans les études, i.e., additivité des concentrations (Loewe et Muischeck, 1926) et indépendance des actions (Bliss, 1939). Ces modèles « classiques » ont été établis il y a plus de 80 ans, avant l'émergence de la Statistique, et sont dépourvues d'analyses statistiques approfondies (Kerr et Meador, 1986). En raison de cette limitation, ces modèles simples d'utilisation ne peuvent pas intégrer toutes les données expérimentales, et chaque condition de mélange doit être analysée au cas par cas, ce qui peut conduire à une sous-estimation (i.e., cas de faibles concentrations) ou à une surestimation (i.e., cas des fortes concentrations) des effets de mélanges. Une autre limite qui peut expliquer ces différences résulte d'une application inadaptée des modèles « classiques » pour des mélanges montrant des effets antagonistes ou synergiques, puisque ces modèles par définition ne tiennent pas compte de l'interaction entre les contaminants en mélange (Borgert et al., 2004 ; Rider et LeBlanc, 2005 ; Rodea-Palomares et al., 2015). Comparativement à ces modèles « classiques », les approches statistique (i.e., modèle WLR) et modélisatrice (i.e., RSM) utilisées dans notre étude présente les avantages : 1) de considérer ou non l'existence d'une interaction entre les composées en mélange ; et 2) de tenir compte de toutes les données expérimentales pour l'analyse, ce qui permet une estimation qualitative et quantitative plus précise de l'effet toxique du mélange.

En se basant sur les résultats de toxicité individuelle et en mélange des Lanthanides, il apparaît que les cellules branchiales (RTgill-W1) d'*Oncorhynchus mykiss* sont significativement moins sensibles que les cellules fibroblastiques (ZF4) et hépatiques (ZFL) de *Danio rerio*. La toxicité des Lanthanides seuls et en mélanges était plus faible sur les cellules RTgill-W1, par rapport aux cellules ZF4 et ZFL. Pour expliquer cette observation, notre hypothèse est que les cellules de branchies possèderaient potentiellement des systèmes de défense plus efficaces, d'où une plus faible sensibilité apparente. En effet, il est admis que les branchies sont un des premiers tissus à être en contact avec le milieu extérieur et constitue, par conséquent, l'une des premières barrières de défenses chez les organismes aquatiques contre

les agressions extérieures liées à des modifications physico-chimiques ou à des contaminants (Perry et al., 2009 ; Zachar et Jonz, 2012 ; Perrat et al., 2017). En outre, aucune différence claire de sensibilité n'a pu être mise en évidence entre les cellules fibroblastiques (ZF4) et hépatiques (ZFL) de *Danio rerio*. La toxicité des Lanthanides (seuls et en mélanges) observée sur les cellules ZF4 n'était significativement pas différente de celle observée sur les cellules ZFL. Ces résultats ne sont pas forcément surprenants, étant donné que le paramètre qui évalue les effets toxiques des Lanthanides est général, puisque nous avons mesuré la viabilité cellulaire. Compte tenu de ce paramètre, celui-ci peut expliquer pourquoi aucune différence de sensibilité n'a été observée, sachant que les activités métaboliques des cellules sont différentes et liées à l'origine de ces cellules.

2. Détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*

Les cellules possèdent des mécanismes de détoxification pour combattre les effets des substances toxiques (Tamas et al., 2005 ; Wysocki et Tamas, 2010). Le rôle des enzymes de phase 1 (réactions de fonctionnalisation), de phase 2 (réactions de conjugaison), et de protéines membranaires pour l'expulsion des composés hors des cellules ont été décrits dans la littérature (Bard et al., 2000 ; Hall, 2002 ; Xu et al., 2005 ; Ferreira et al., 2014). Chaque acteur de la détoxification peut intervenir seul ou en synergie de manière à limiter les effets toxiques des composés. Actuellement, il n'existe aucune donnée concernant les mécanismes de détoxification cellulaire des Lanthanides. Cependant, il a été montré que les GST et les protéines de type MRP-like, intervenant respectivement en phase II et III du cycle de détoxification cellulaire, contribueraient activement au transport du plomb, du mercure, du cadmium, et de l'arsenic à travers la membrane cellulaire des cellules ZF4 (Long et al., 2011a,b,c). Ainsi, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'une telle prise en charge cellulaire pour d'autres métaux tels que les Lanthanides ?

Des études précédentes ont montré que lors de la détoxification cellulaire, les métaux étaient conjugués au glutathion (GSH) et ceux-ci étaient transportés hors des cellules *via* les systèmes d'efflux MRP (Singhal et al., 1987 ; Kala et al., 2000 ; Long et al., 2011a). Au regard de cette observation, il était donc intéressant de déterminer si la réaction de conjugaison au glutathion était impliquée en synergie avec les protéines MRP-like pour la détoxification cellulaire des Lanthanides ? Pour cela, les cellules ZF4 de *Danio rerio* ont été exposées aux Lanthanides en présence et en absence d'inhibiteur des glutathion-S-transférases (GST), une

enzyme catalysant la réaction de conjugaison au glutathion sur les xénobiotiques (Deleey et al., 2006). Les résultats ont montré que la toxicité des Lanthanides n'a pas été impactée en présence d'acide éthacrynique, un inhibiteur des glutathion-S-transférases (GST). Nos résultats suggèrent, par conséquent, que l'action des GST n'est pas requise dans les mécanismes de détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*.

Concernant le rôle des protéines de type MRP-like dans la détoxification cellulaire des Lanthanides, les résultats ont montré que les Lanthanides étaient plus toxiques en présence de MK571 sur les cellules ZF4 de *Danio rerio*, par rapport aux Lanthanides testés en absence de MK571 sur ces cellules. Ceci est clairement mis en évidence dans le cas du gadolinium pour une durée d'exposition de 48 h. En effet, pour cette durée d'exposition, aucun impact toxique significatif du MK571 n'a été observé sur la viabilité des cellules ZF4. Ces résultats suggèrent l'implication des protéines MRP-like pour la détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Cette observation est en accord avec la littérature, soulignant le rôle des protéines MRP-like pour la détoxification des métaux (Zhou et al., 2008 ; Long et al., 2011a,b,c ; Luckenbach et al., 2014). Dans une perspective de recherche à court terme, il serait intéressant de mesurer quantitativement l'expression des gènes MRP-like (1 à 5) dans les cellules ZF4 de *Danio rerio* exposées pendant 48 h aux Lanthanides en présence et en absence de MK571. Pour cela, nous pourrions envisager d'adapter le protocole de RT-PCR (réaction en chaîne par polymérase par transcriptase inverse) proposé par Long et al. (2011b,c). Ce protocole vise dans une première étape à extraire et à purifier l'ARNm des tissus exposés ou non aux contaminants. Dans une deuxième étape, les brins d'ARNm purifiés sont retranscrits en brins d'ADN complémentaire et amplifiés, à l'aide d'un « Mix PCR » composé d'une transcriptase inverse (RT), d'amorces ciblant les séquences des gènes ABCC 1 à 5, d'oligonucléotides, et d'une enzyme polymérase. Cette perspective permettra de déterminer plus précisément si toutes ou certaines protéines MRP actuellement recensées chez le *Danio rerio* sont impliquées dans le transport des Lanthanides hors des cellules ZF4. Les résultats mis en évidence avec le probénécide ont, quant à eux, montré que la toxicité des Lanthanides n'était pas différente et pouvait même être plus faible (10 à 20 %) dans certaines de nos expériences, comparativement à la toxicité de ces métaux en absence de l'inhibiteur sur les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus avec le MK571 et avec Long et al. (2011a), pour lesquels la toxicité d'autres métaux (plomb, mercure, cadmium, et arsenic) était plus élevée suite à une inhibition des systèmes d'efflux MRP-like par du probénécide dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Pour expliquer les différences de résultats en présence de

probénécide et de MK571, notre hypothèse est que les cellules ZF4 présenteraient des systèmes d'efflux, autres que les MRP-like, capables d'éliminer les Lanthanides suite à leur stimulation par le probénécide. En effet, dans la littérature, le probénécide est connu pour potentialiser l'activité des canaux cationiques TRPV2 (Bang et al., 2007). Ces canaux protéiques non sélectifs sont localisés au niveau des membranes cellulaires chez les organismes pluricellulaires, et jouent un rôle de médiateur vis-à-vis du calcium intracellulaire (Hofmann et al., 2000 ; Montel, 2001). Dans des recherches complémentaires, il serait intéressant d'étudier le rôle par exemple des systèmes d'efflux de type ABCB-like (Sabri et al., 2012 ; Lerebours et al., 2016 ; Gordon et al., 2019) ou de type SLC-like (Cooper et al., 2006 ; Hernández et Allende, 2008), lesquels sont impliqués dans l'élimination de divers métaux (cuivre, zinc, fer) chez *Danio rerio*, dans le cas de la détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 en présence et en absence de probénécide.

3. Cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*

Au cours de cette thèse, nous avons décidé de développer des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Au regard de la littérature, il n'existe pas d'étude ayant relaté le développement de ce modèle cellulaire. Notre choix s'est porté sur ce bivalve filtreur, puisqu'il est particulièrement exposé à l'action de nombreux stress physique (variations de température et de salinité) et à divers contaminants (cuivre, plomb, cadmium...). De plus, cet organisme est actuellement présent dans la plupart des eaux douces du monde entier (Kramer-Wilt, 2008 ; Cupsa, 2014) et est utilisé comme organisme modèle en laboratoire (Bertrand et al., 2017 ; Perrat et al., 2017 ; Koehlé-Divo et al., 2018, 2019a,b).

Les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* sont obtenues par dissociation enzymatique, dont le taux de viabilité lors de la mise en culture était supérieur en moyenne à 77 ± 4 %. Nous avons choisi cette méthode puisqu'il a été rapporté que l'utilisation d'enzymes protéolytiques pour dissocier les tissus avait permis d'obtenir des suspensions cellulaires d'acinus de glandes digestives de la coquille Saint-Jacques d'Atlantique (Le Pennec et Le Pennec, 2001) et de glandes digestives de *Dreissena polymorpha* (Quinn et al., 2009), dont les taux de viabilité étaient supérieurs à 80 % après 96 h de culture. Par ailleurs, cette méthode est moins destructrice que celle par dissociation mécanique (Nogueira et al., 2013) et plus rapide que la culture d'explants de tissus (Potts et al., 2020). Dans nos cultures primaires, il a été observé la présence de plusieurs types

cellulaires non adhérents et qui possèdent des tailles et des granulométries variables. Des observations similaires ont été décrites dans la littérature entre 2001 et 2020, pour d'autres cultures primaires de glandes digestives de bivalves aquatiques. Le Pennec et Le Pennec (2001) ont identifié dans les cultures primaires de glandes digestives de la coquille Saint-Jacques de l'Atlantique (*Pecten maximus*) la présence de cellules sécrétrice d'acinus très granuleuses et ayant une taille comprise entre 40 et 60 μm . Balbi et al. (2017) ont, quant à eux, identifié au microscope confocal à balayage laser les cellules de glandes digestives du bivalve marin *Mytilus galloprovincialis*. Ces auteurs ont mentionné la présence de plusieurs types cellulaires de tailles différentes, i.e., un 1^{er} type cellulaire de petite taille contenant peu de vacuoles correspondant à des cellules sécrétrices digestives, un 2^{ème} type cellulaire de petite taille dépourvue de vacuole identifié comme des cellules épithéliales, et un 3^{ème} type de grande taille contenant une multitude de granulation comparable à des cellules sécrétrices digestives. Au cours de nos essais, un type cellulaire adhérent a également été observé dans quelques-unes de nos cultures primaires. Il présentait une morphologie de type fibroblastique et pouvait jusqu'à former une pré-matrice de 4 à 5 cellules après 3 jours de culture. Cependant, ces cellules n'ont pas évolué en raison, peut-être, de la grande surface de culture des flasques T₇₅. Il est donc possible que les cellules n'aient pas pu communiquer entre elles de manière optimale, limitant leur adhésion et leur élongation. Quinn et al. (2009) ont aussi relaté à partir du 4^{ème} jour de culture la présence d'un type cellulaire adhérent provenant des glandes digestives de *Dreissena polymorpha*. Ces auteurs précisent que ces cellules pourvues d'une granulation faible sont comparables à des cellules fibroblastiques. Elles sont capables d'effectuer une élongation à partir du 4^{ème} jusqu'à former une pré-matrice cellulaire au bout du 7^{ème} jour de culture. Parmi nos types cellulaires, il est probable que certains d'entre eux proviennent des tissus de gonades de *Corbicula fluminea*. Lors de la dissection des individus et pour chaque nouvelle culture, il a été difficile de ne récupérer que les glandes digestives puisqu'elles sont intimement liées aux gonades. Bien que nous ayons tenté de séparer délicatement les organes après leur prélèvement, la procédure n'était pas concluante. Ainsi, il serait intéressant dans d'autres études de tenter d'obtenir des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*, dépourvues de cellules gonadiques. Dans une première étape, nous pourrions envisager de caractériser les types cellulaires présents dans les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* par des observations au microscope à balayage électronique couplées à des coupes d'histochimie des tissus de glandes digestives et de gonades des individus. Dans une deuxième étape, il faudrait séparer les types cellulaires issus des gonades et des glandes digestives lors de l'étape de la

mise en culture. Pour cela, nous pourrions tenter d'isoler un type cellulaire de glandes digestives préalablement identifié en cytométrie de flux par un tri cellulaire mécanique. Cette méthode consiste à isoler physiquement un type cellulaire du reste de la population hétérogène de cellules après avoir sélectionné ses caractéristiques de taille et de granulométrie. Le tri cellulaire mécanique présente l'avantage d'obtenir une population de cellules avec un taux de pureté supérieurs à 99 %. Cependant, l'opération pour obtenir une population de 10^6 cellules peut être longue (1 h à 9 h), en raison de contraintes physiques (fragilité de la membrane cellulaire, taille) liées au type cellulaire isolé.

Le maintien des cultures primaires avec une viabilité supérieure à 75 % n'est possible que pendant une semaine, en raison d'une absence de prolifération cellulaire (Freshney, 2005). À terme, une altération de la sensibilité des cultures primaires peut être attendue liée à une baisse de l'activité métabolique des cellules, entraînant ainsi une surestimation ou une sous-estimation de la toxicité réelle des contaminants. Ainsi, il a été nécessaire de démontrer que la toxicité observée pour les essais d'exposition aux Lanthanides ne s'expliquait pas par une altération de la sensibilité des cellules primaires après 96 h. Pour cela, les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* ont été exposées au peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes après le 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 6^{ème}, et 7^{ème} jour de culture. Au regard des valeurs de CE₅₀ calculées à partir des courbes dose-réponse, aucune différence significative de toxicité du peroxyde d'hydrogène n'a été observée sur les cellules cultivées pendant une semaine. Ce résultat montre que les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* sont stables en termes de réponse à une exposition à un contaminant toxique de référence, et que ces cultures peuvent être utilisées pour évaluer la toxicité des Lanthanides sur une période n'excédant pas une semaine.

En mesurant la toxicité des 14 Lanthanides, les résultats montrent une différence significative de toxicité entre ces métaux sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. L'effet cytotoxique était compris entre 16 ± 21 et 53 ± 3 % sur nos cellules exposées pendant 96 h à une concentration finale de 1 mM de Lanthanide. Bien qu'aucune corrélation n'ait été mise en évidence entre la toxicité et la masse atomique des Lanthanides, des variations individuelles de toxicité sont observées entre les éléments, i.e., une toxicité plus élevée du lanthane, europium, thulium, et ytterbium est observée sur les cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. À ce jour, il s'agit des premiers résultats obtenus à partir de travaux initiés sur ce nouveau modèle cellulaire. Dans la littérature, Laville et al.

(2004) ont évalué la toxicité cellulaire des Lanthanides au moyen d'une culture primaire d'hépatocytes d'*Oncorhynchus mykiss*. Ces auteurs ont mesuré une valeur de CE₅₀ de 41,18 mg/L (i.e., 265 µM) sur ces cellules primaires d'hépatocytes après 24 h d'exposition à une gamme de concentrations de 9,83 à 157 mg/L (i.e., 63 à 1010 µM) de sel de chlorure de gadolinium. Au regard de l'ensemble des résultats, il est indispensable de poursuivre l'étude de la toxicité des Lanthanides à l'aide de cet outil cellulaire, en répétant plusieurs fois l'expérience et en réalisant une cinétique de réponse identique à celle faite sur nos lignées cellulaires de poissons, c'est-à-dire en termes de durées et de concentrations d'expositions. Cela permettrait également de comparer les effets toxiques des Lanthanides entre les lignées de poissons et les cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre du programme « Ecotoxicology of Rare Earth Elements in Aquatic Systems (ECOTREE) », soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en France et par le Fonds National de la Recherche au Luxembourg. Ce travail avait comme objectifs d'étudier la toxicité cellulaire des Lanthanides et d'identifier les mécanismes de détoxification cellulaire de ces métaux. La toxicité individuelle et en mélange des Lanthanides a été étudiée à travers des mesures de viabilité sur des cellules fibroblastiques (ZF4) et des cellules hépatiques (ZFL) de *Danio rerio*, des cellules branchiales (RTgill-W1) d'*Oncorhynchus mykiss*, et des cellules primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*. Nous nous sommes ensuite intéressés aux rôles que peuvent avoir les glutathion-S-transférases et les protéines MRP-like, deux acteurs intervenant respectivement en phase II et III de la détoxification cellulaire, dans le cas de la détoxification cellulaire des Lanthanides. Pour cela, les effets toxiques individuels de trois Lanthanides (néodyme, gadolinium, et ytterbium) ont été étudiés, en mesurant la viabilité de cellules ZF4 de *Danio rerio* exposées à ces métaux en absence et en présence d'inhibiteurs des GST (acide éthacrynique) et des MRP-like (MK571, probénécide).

La première partie de ce travail était d'étudier les effets toxiques individuels et en mélanges des Lanthanides sur des lignées cellulaires de poissons. Les résultats ont montré un impact toxique du néodyme, du gadolinium et de l'ytterbium sur les 3 lignées cellulaires de poissons. Il a été montré une toxicité plus élevée des Lanthanides Lourds par rapport à celle des Lanthanides Légers sur les cellules ZF4 de *Danio rerio*. L'augmentation de la toxicité le long des groupes de Lanthanides n'est toutefois pas régulière, puisque des variations individuelles de toxicité sont observées entre ces métaux. Nos observations soulignent également l'importance d'étudier les effets toxiques des Lanthanides en mélanges à l'aide des approches statistiques et modélisatrices. Pour nos 3 lignées cellulaires de poissons, des effets de synergie sont mis en évidence pour tous les mélanges réalisés.

La deuxième partie de ce travail visait à identifier les mécanismes impliqués pour la détoxification du néodyme, du gadolinium et de l'ytterbium dans des cellules ZF4 de *Danio rerio*. L'étude de la toxicité des Lanthanides en présence d'inhibiteur des glutathion-S-transférases souligne que la réaction de conjugaison au glutathion ne contribue pas à la détoxification de ces métaux dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. En effet, aucune différence de toxicité des Lanthanides n'est observée en présence d'acide éthacrynique.

Compte tenu des résultats associés au MK571, un inhibiteur des protéines MRP-like, il a été montré que ces protéines membranaires sont impliquées dans la détoxification des Lanthanides, i.e., une toxicité plus élevée des Lanthanides est observée en présence de MK571 sur les cellules ZF4. Dans le cas du probénécide, la toxicité des Lanthanides n'est pas différente et peut même diminuer en présence de cet autre inhibiteur des protéines MRP-like. Ce résultat suggère que d'autres systèmes d'efflux contribueraient à la détoxification cellulaire des Lanthanides en présence de probénécide.

La troisième partie de ce travail consistait à développer des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* et à utiliser ce modèle cellulaire pour évaluer la toxicité des Lanthanides. Le développement de ce modèle a permis de montrer un taux de viabilité cellulaire supérieur à 75 % lors de la mise en culture, et son maintien pendant une semaine sans que leur sensibilité n'ait été altérée. Un impact toxique des Lanthanides est observé sur les cellules primaires de glandes digestives, montrant ainsi que ce modèle peut être utilisé comme un outil supplémentaire pour évaluer la toxicité cellulaire des Lanthanides.

Les travaux de cette thèse sont les premiers de ce genre en écotoxicologie aquatique à l'aide de modèles cellulaires d'organismes aquatiques. Ceux-ci laissent, par conséquent, entrevoir des nouvelles questions et des perspectives de recherche complémentaires afin d'évaluer le danger que représentent les Lanthanides pour les organismes aquatiques.

Au regard de l'ensemble de nos résultats, les lignées cellulaires de poissons et les approches statistiques sont des outils puissants, pertinents, prédictifs et complémentaires aux essais *in vivo* pour évaluer la toxicité des Lanthanides. D'une part, il est nécessaire de poursuivre l'évaluation de la toxicité individuelle des 14 Lanthanides sur les cellules hépatiques (ZFL) de *Danio rerio* et sur les cellules branchiales (RTgill-W1) d'*Oncorhynchus mykiss*. Cela permettrait de comparer et de confirmer nos observations faites sur les cellules fibroblastiques (ZF4) de *Danio rerio*. D'autre part, pour confirmer les effets de synergie que nous avons observés pour les Lanthanides, il serait intéressant d'étudier prochainement la toxicité d'autres sels de Lanthanides en mélanges sur nos cellules fibroblastiques (ZF4) et hépatiques (ZFL) de *Danio rerio*, ainsi que sur les cellules branchiales (RTgill-W1) d'*Oncorhynchus mykiss* à l'aide du modèle statistique WLR et de l'approche modélisatrice RSM.

D'autres études sont requises pour étudier la détoxification cellulaire des Lanthanides dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*, suite aux résultats préliminaires misent en évidence au cours de la thèse. Dans des prochaines études complémentaires, il serait pertinent de mesurer la toxicité d'autres sels de Lanthanides en présence et en absence d'inhibiteurs des GST (acide éthacrynique) et des protéines MRP-like (MK571, probénécide) dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Les réponses apportées permettront de déterminer si les protéines MRP-like sont impliquées dans la détoxification cellulaire de tous les Lanthanides dans les cellules ZF4.

L'utilisation de cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea* apparaît comme un outil cellulaire intéressant pour évaluer la toxicité cellulaire des Lanthanides. Il faut, par conséquent, continuer le développement de ce nouveau modèle cellulaire dans une perspective de recherche à long terme. Nous pourrions tenter d'obtenir une lignée cellulaire immortalisée de glandes digestives de *Corbicula fluminea*, en effectuant des sous-cultures successives du type cellulaire adhérent présent dans les cultures primaires. Cette perspective est d'autant plus originale puisqu'il n'existe actuellement aucune lignée cellulaire de bivalve aquatique commercialisé, d'après les banques de données de Cellosaurus et de l'ATCC.

Références bibliographiques

-A-

- Adriano, D.C., 2013. Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer Science & Business Media.
- Aharchaou, I., Beaubien, C., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2020. Lanthanum and Cerium Toxicity to the Freshwater Green Alga *Chlorella fusca*: Applicability of the Biotic Ligand Model. *Environ Toxicol Chem* 39, 996–1005. <https://doi.org/10.1002/etc.4707>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 7, 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Alonso, E., Sherman, A.M., Wallington, T.J., Everson, M.P., Field, F.R., Roth, R., Kirchain, R.E., 2012. Evaluating Rare Earth Element Availability: A Case with Revolutionary Demand from Clean Technologies. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3406–3414. <https://doi.org/10.1021/es203518d>
- Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B.I., Jakobs, G., Krauss, M., Krüger, J., Neale, P.A., Ait-Aissa, S., Almeida, A.C., Seiler, T.-B., Brion, F., Hilscherová, K., Hollert, H., Novák, J., Schlichting, R., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A., Tollefsen, K.E., Umbuzeiro, G., Williams, T.D., Kortenkamp, A., 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International* 114, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.013>
- Amorim, A.M., Sodr e, F.F., Rousseau, T.C.C., Maia, P.D., 2019. Assessing rare-earth elements and anthropogenic gadolinium in water samples from an urban artificial lake and its tributaries in the Brazilian Federal District. *Microchemical Journal* 148, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.055>
- Amyot, M., Clayden, M.G., MacMillan, G.A., Perron, T., Arscott-Gauvin, A., 2017. Fate and Trophic Transfer of Rare Earth Elements in Temperate Lake Food Webs. *Environ Sci Technol* 51, 6009–6017. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00739>

Anderson, C.D., Anderson, C.G., Taylor, P.R., 2013. Survey of recycled rare earths metallurgical processing. *Canadian Metallurgical Quarterly* 52, 249–256. <https://doi.org/10.1179/1879139513Y.0000000091>

Andiappan, K., Sanmugam, A., Deivanayagam, E., Karuppasamy, K., Kim, H.-S., Vikraman, D., 2018. In vitro cytotoxicity activity of novel Schiff base ligand–lanthanide complexes. *Sci Rep* 8, 3054. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21366-1>

Ansoborlo, E., Prat, O., Moisy, P., Den Auwer, C., Guilbaud, P., Carriere, M., Gouget, B., Duffield, J., Doizi, D., Vercoüter, T., Moulin, C., Moulin, V., 2006. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1605–1618. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.011>

Ashraf, M.A., Maah, M.J., Yusoff, I., 2012. Speciation of heavy metals in the sediments of former tin mining catchment 18. <https://doi.org/10.22099/IJSTS.2012.2067>

-B-

Bailey, G., Joyce, P.J., Schrijvers, D., Schulze, R., Sylvestre, A.M., Sprecher, B., Vahidi, E., Dewulf, W., Van Acker, K., 2020. Review and new life cycle assessment for rare earth production from bastnäsite, ion adsorption clays and lateritic monazite. *Resources, Conservation and Recycling* 155, 104675. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104675>

Balaram, V., 2019. Rare earth elements: A review of applications, occurrence, exploration, analysis, recycling, and environmental impact. *Geoscience Frontiers* 10, 1285–1303. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2018.12.005>

Balbi, T., Ciacci, C., Grasselli, E., Smerilli, A., Voci, A., Canesi, L., 2017. Utilization of *Mytilus* digestive gland cells for the in vitro screening of potential metabolic disruptors in aquatic invertebrates. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 191, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.08.009>

- Balusamy, B., Taştan, B.E., Ergen, S.F., Uyar, T., Tekinay, T., 2015. Toxicity of lanthanum oxide (La₂O₃) nanoparticles in aquatic environments. *Environ Sci Process Impacts* 17, 1265–1270. <https://doi.org/10.1039/c5em00035a>
- Bang, S., Kim, K.Y., Yoo, S., Lee, S.-H., Hwang, S.W., 2007. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neuroscience Letters* 425, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.08.035>
- Bao, Z., Zhao, Z., 2008. Geochemistry of mineralization with exchangeable REY in the weathering crusts of granitic rocks in South China. *Ore Geology Reviews - ORE GEOL REV* 33, 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2007.03.005>
- Barakos, G., Mischo, H., Gutzmer, J., 2016. Chapter 8 - Rare Earth Underground Mining Approaches with Respect to Radioactivity Control and Monitoring Strategies, in: Borges De Lima, I., Leal Filho, W. (Eds.), *Rare Earths Industry*. Elsevier, Boston, pp. 121–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802328-0.00008-5>
- Bard, S., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357–389. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00088-6)
- Bard, S.M., Stegeman, J.J., 2000. Expression of multixenobiotic resistance transport P-glycoproteins in fish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Marine Environmental Research* 50, 331. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00197-5)
- Barnes, D.W., 1992. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues. *Cell Biology and Toxicology*.
- Bau, M., Dulski, P., 1996. Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth and Planetary Science Letters* 143, 245–255. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(96\)00127-6](https://doi.org/10.1016/0012-821X(96)00127-6)

- Bergna, H.E., 1994. Colloid Chemistry of Silica, in: *The Colloid Chemistry of Silica, Advances in Chemistry*. American Chemical Society, pp. 1–47. <https://doi.org/10.1021/ba-1994-0234.ch001>
- Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators* 74, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029>
- Bhushan, S., Somani, O.P., 2019. Rare Earth Elements and Yttrium Potentials of Neoproterozoic Peralkaline Siwana Granite of Malani Igneous Suite, Barmer District, Rajasthan. *Journal of the Geological Society of India* 94, 35–41. <https://doi.org/10.1007/s12594-019-1263-0>
- Binnemans, K., Jones, P.T., 2015. Rare Earths and the Balance Problem. *J. Sustain. Metall.* 1, 29–38. <https://doi.org/10.1007/s40831-014-0005-1>
- Binnemans, K., Jones, P.T., Blanpain, B., Van Gerven, T., Yang, Y., Walton, A., Buchert, M., 2013. Recycling of rare earths: a critical review. *Journal of Cleaner Production* 51, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.12.037>
- Bjerregaard, P., Andersen, C.B.I., Andersen, O., 2015. Chapter 21 - Ecotoxicology of Metals—Sources, Transport, and Effects on the Ecosystem, in: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 425–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00021-4>
- Blaise, C., Gagné, F., Harwood, M., Quinn, B., Hanana, H., 2018. Ecotoxicity responses of the freshwater cnidarian *Hydra attenuata* to 11 rare earth elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163, 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.033>
- Bleavins, K., Perone, P., Naik, M., Rehman, M., Aslam, M.N., Dame, M.K., Meshinchi, S., Bhagavathula, N., Varani, J., 2012. Stimulation of fibroblast proliferation by insoluble gadolinium salts. *Biol Trace Elem Res* 145, 257–267. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9176-9>

- Blinova, I., Lukjanova, A., Muna, M., Vija, H., Kahru, A., 2018. Evaluation of the potential hazard of lanthanides to freshwater microcrustaceans. *Science of The Total Environment* 642, 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.155>
- Blinova, I., Muna, M., Heinlaan, M., Lukjanova, A., Kahru, A., 2020. Potential Hazard of Lanthanides and Lanthanide-Based Nanoparticles to Aquatic Ecosystems: Data Gaps, Challenges and Future Research Needs Derived from Bibliometric Analysis. *Nanomaterials* 10, 328. <https://doi.org/10.3390/nano10020328>
- Blinova, Irina, Vija, H., Lukjanova, A., Muna, M., Syvertsen-Wiig, G., Kahru, A., 2018. Assessment of the hazard of nine (doped) lanthanides-based ceramic oxides to four aquatic species. *Science of The Total Environment* 612, 1171–1176. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.274>
- Bliss, C.I., 1939. The Toxicity of Poisons Applied Jointly¹. *Annals of Applied Biology* 26, 585–615. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x>
- Bogart, J.A., Cole, B.E., Boreen, M.A., Lippincott, C.A., Manor, B.C., Carroll, P.J., Schelter, E.J., 2016. Accomplishing simple, solubility-based separations of rare earth elements with complexes bearing size-sensitive molecular apertures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 14887–14892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612628113>
- Bogart, J.A., Lippincott, C.A., Carroll, P.J., Booth, C.H., Schelter, E.J., 2015. Controlled Redox Chemistry at Cerium within a Tripodal Nitroxide Ligand Framework. *Chemistry – A European Journal* 21, 17850–17859. <https://doi.org/10.1002/chem.201502952>
- Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P., Lee, L.E.J., 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* 17, 601–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x>

- Bonnail, E., Pérez-López, R., Sarmiento, A.M., Nieto, J.M., DelValls, T.Á., 2017. A novel approach for acid mine drainage pollution biomonitoring using rare earth elements bioaccumulated in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Hazardous Materials* 338, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.052>
- Bonnet, C., 2006. Complexation des cations lanthanides trivalents par des ligands d'origine biologique pour l'IRM : Structure, thermodynamique et méthodes (phdthesis). Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004a. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.005>
- Borgert, C.J., Quill, T.F., McCarty, L.S., Mason, A.M., 2004b. Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.005>
- Borst, P., Elferink, R.O., 2002. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537–592. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>
- Bortolini, C., 2019. Les terres rares, une « trump card » pour la Chine dans la guerre commerciale ?
- Bosco-Santos, A., Luiz-Silva, W., Silva-Filho, E.V. da, Souza, M.D.C. de, Dantas, E.L., Navarro, M.S., 2017. Fractionation of rare earth and other trace elements in crabs, *Ucides cordatus*, from a subtropical mangrove affected by fertilizer industry. *Journal of Environmental Sciences* 54, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.05.024>
- Bour, A., Mouchet, F., Verneuil, L., Evariste, L., Silvestre, J., Pinelli, E., Gauthier, L., 2015. Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians. *Chemosphere* 120, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.012>

- Bresson, C., Ansoborlo, E., Vidaud, C., 2011. Radionuclide speciation: A key point in the field of nuclear toxicology studies. *J. Anal. At. Spectrom.* 26, 593–601. <https://doi.org/10.1039/C0JA00223B>
- Brierley, C.L., Brierley, J.A., 2013. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 7543–7552. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5095-3>
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacological Review*, Niwot, Colo., U.S.A.
- Brunner, P.H., 2011. Urban Mining A Contribution to Reindustrializing the City. *Journal of Industrial Ecology* 15, 339–341. <https://doi.org/10.1111/j.1530-9290.2011.00345.x>
- Buffle, J., Chalmers, R.A., Masson, M.R., Midgley, D., 1988. Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach, Ellis Horwood series in analytical chemistry. Ellis Horwood ; Halsted Press, Chichester ; New York.
- Byrne, R.H., Li, B., 1995. Comparative complexation behavior of the rare earths. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 4575–4589. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00303-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00303-7)
- Byrne, R.H., Sholkovitz, E.R., 1996. Chapter 158 Marine chemistry and geochemistry of the lanthanides, in: *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*. Elsevier, pp. 497–593. [https://doi.org/10.1016/S0168-1273\(96\)23009-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1273(96)23009-0)

-C-

- Cabella, C., Crich, S.G., Corpillo, D., Barge, A., Ghirelli, C., Bruno, E., Lorusso, V., Uggeri, F., Aime, S., 2006. Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as ‘sponges’ of Gd³⁺ ions. *Contrast Media & Molecular Imaging* 1, 23–29. <https://doi.org/10.1002/cmml.88>

- Campbel, P., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms : A critique of the Free-ion Activity Model.
- Campbell, P., Couillard, Y., 2004. Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. *Écotoxicologie Moléculaire* 10–61.
- Campbell, P.G.C., 2004. *Écotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*, 1st ed. Presses de l'Université du Québec. <https://doi.org/10.2307/j.ctv18ph2xj>
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 189–206. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7)
- Cao, Y., Shao, P., Chen, Y., Zhou, X., Yang, L., Shi, H., Yu, K., Luo, Xianxin, Luo, Xubiao, 2021. A critical review of the recovery of rare earth elements from wastewater by algae for resources recycling technologies. *Resources, Conservation and Recycling* 169, 105519. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105519>
- Castor, S.B., 2008. Rare Earth Deposits of North America. *Resource Geology* 58, 337–347. <https://doi.org/10.1111/j.1751-3928.2008.00068.x>
- Castor, S.B., Hedrick, J.B., 2006. Rare Earth Elements. *Industrial Minerals and Rocks: Commodities, markets and Uses* 7th edition, 1568.
- Çelik, İ., Kara, D., Karadaş, C., Fisher, A., Hill, S.J., 2015. A novel ligandless-dispersive liquid–liquid microextraction method for matrix elimination and the preconcentration of rare earth elements from natural waters. *Talanta* 134, 476–481. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.063>
- Chakmouradian, A., Wall, F., 2012. Rare Earth Elements: Minerals, Mines, Magnets (and More). *Elements* 8, 333–340. <https://doi.org/10.2113/gselements.8.5.333>

- Charles, N., Tuduri, J., Lefebvre, G., Pourret, O., Gaillard, F., Goodenough, K., 2021. Ressources en terres rares de l'Europe et du Groenland : un potentiel minier remarquable mais tabou ?
- Chassard-Bouchaud, C., Escaig, F., Boumati, P., Gallé, P., 1992. Microanalysis and image processing of stable and radioactive elements in ecotoxicology. Current developments using SIMS microscope and electron microprobe. *Biology of the Cell* 74, 59–74. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(92\)90009-P](https://doi.org/10.1016/0248-4900(92)90009-P)
- Chesson, T., Schelter, E.J., 2019. Rare earth elements: Mendeleev's bane, modern marvels. *Science* 363, 489–493. <https://doi.org/10.1126/science.aau7628>
- Chen, J., Zhu, X., Liu, G., Chen, W., Yang, D., 2018. China's rare earth dominance: The myths and the truths from an industrial ecology perspective. *Resources, Conservation and Recycling* 132, 139–140. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.01.011>
- Chi, R., Xu, S., Zhu, G., Xu, J., Qiu, X., 2001. Benefication of rare earth ore in China. *Light Metals: Proceedings of Sessions, TMS Annual Meeting (Warrendale, Pennsylvania)* 1159–1165.
- Choppin, G.R., Strazik, W.F., 1965. Complexes of Trivalent Lanthanide and Actinide Ions. I. Outer-Sphere Ion Pairs. *Inorg. Chem.* 4, 1250–1254. <https://doi.org/10.1021/ic50031a003>
- Clamadieu, J.-P., Butstraen, E., 2010. Les terres rares, des matières premières minérales stratégiques. *Annales des Mines - Responsabilité et environnement* N° 58, 92. <https://doi.org/10.3917/re.058.0092>
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650–1654. <https://doi.org/10.1126/science.1360704>

- Cooper, C.A., Handy, R.D., Bury, N.R., 2006. The effects of dietary iron concentration on gastrointestinal and branchial assimilation of both iron and cadmium in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 79, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.008>
- Correia, A.T., Rebelo, D., Marques, J., Nunes, B., 2019. Effects of the chronic exposure to cerium dioxide nanoparticles in *Oncorhynchus mykiss*: Assessment of oxidative stress, neurotoxicity and histological alterations. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 68, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.02.012>
- Cotton, S., 2006. *Lanthanide and Actinide Chemistry*, 2Rev Ed. ed. Wiley-Blackwell, Chichester, England ; Hoboken, NJ.
- Cupsa, D., 2014. *Corbicula fluminea* upstream expansion in Crisuri Rivers, Tisa hydrographical basin (Hungarian-Romanian cross-border). *North-Western Journal of Zoology* 10, 438–440. [https://doi.org/10.2438/10\(2\):438-440](https://doi.org/10.2438/10(2):438-440)

-D-

- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J.C., Arnaud, P., 2002. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 1600–1603. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1600>
- Dai, C., Chen, S., Wang, C., Zhang, L., Ge, K., Zhang, J., 2015. Ytterbium ion promotes apoptosis of primary mouse bone marrow stromal cells? *Journal of Rare Earths* 33, 445–452. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(14\)60439-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(14)60439-7)
- Dai, Y., Li, Jian, Li, Jie, Yu, L., Dai, G., Hu, A., Yuan, L., Wen, Z., 2002. Effects of rare earth compounds on growth and apoptosis of leukemic cell lines. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 38, 373–375. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0373:EORECO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0373:EORECO>2.0.CO;2)

- Davranche, M., Gruau, G., Dia, A., Le Coz-Bouhnik, M., Marsac, R., Pédrot, M., Pourret, O., 2017. Rare Earth Elements in wetlands, in: Trace Elements in Waterlogged Soils and Sediments. Taylor & Francis Group/CRC Press, pp. 135–162.
- Davranche, M., Pourret, O., Gruau, G., Dia, A.N., 2004. Impact of humate complexation on the adsorption of REE onto Fe oxyhydroxide. *Journal of Colloid and Interface Science* 277, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.04.007>
- Davranche, M., Pourret, O., Gruau, G., Dia, A.N., Jin, D., Gaertner, D., 2008. COMPETITIVE BINDING OF REE TO HUMIC ACID AND MANGANESE OXIDE: IMPACT OF REACTION KINETICS ON DEVELOPMENT OF CERIUM ANOMALY AND REE ADSORPTION. *Chemical Geology* 247, 154–170. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.10.010>
- Davranche, M., Pourret, O., Gruau, G., Dia, A.N., Le Coz-Bouhnik, M., 2005. Adsorption of REE(III)-humate complexes onto MnO₂: Experimental evidence for cerium anomaly and lanthanide tetrad effect inhibition. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 4825–4835. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.06.005>
- De Paiva Magalhães, D., da Costa Marques, M.R., Baptista, D.F., Buss, D.F., 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environ Chem Lett* 13, 69–87. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0491-9>
- Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2006. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters, ABC Transporters* 580, 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.036>
- Dogra, Y., Arkill, K.P., Elgy, C., Stolpe, B., Lead, J., Valsami-Jones, E., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2016. Cerium oxide nanoparticles induce oxidative stress in the sediment-dwelling amphipod *Corophium volutator*. *Nanotoxicology* 10, 480–487. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1088587>

Driever, W., Rangini, Z., 1993. Characterization of a cell line derived from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 29A, 749–754. <https://doi.org/10.1007/BF02631432>

Dushyantha, N., Batapola, N., Ilankoon, I.M.S.K., Rohitha, S., Premasiri, R., Abeysinghe, B., Ratnayake, N., Dissanayake, K., 2020. The story of rare earth elements (REEs): Occurrences, global distribution, genesis, geology, mineralogy and global production. *Ore Geology Reviews* 122, 103521. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2020.103521>

-E-

El-Akl, P., Smith, S., Wilkinson, K.J., 2015. Linking the chemical speciation of cerium to its bioavailability in water for a freshwater alga. *Environ Toxicol Chem* 34, 1711–1719. <https://doi.org/10.1002/etc.2991>

Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.-L., Othoniel, C., 2002. Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of Southern France. *Water Research* 36, 1102–1105. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00370-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00370-0)

Elderfield, H., Upstill-Goddard, R., Sholkovitz, E.R., 1990. The rare earth elements in rivers, estuaries, and coastal seas and their significance to the composition of ocean waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 971–991. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(90\)90432-K](https://doi.org/10.1016/0016-7037(90)90432-K)

Escher, B.I., Hunziker, R., Schwarzenbach, R.P., Westall, J.C., 1999. Kinetic Model To Describe the Intrinsic Uncoupling Activity of Substituted Phenols in Energy Transducing Membranes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 560–570. <https://doi.org/10.1021/es980545h>

-F-

Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145–227. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.015>

- Featherston, E.R., Issertell, E.J., Cotruvo, J.A., 2021. Probing Lanmodulin's Lanthanide Recognition via Sensitized Luminescence Yields a Platform for Quantification of Terbium in Acid Mine Drainage. *J. Am. Chem. Soc.* 143, 14287–14299. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c06360>
- Feng, M., Fan, Y.-Z., Ma, X.-J., Li, J.-X., Yang, X.-G., 2015. The gadolinium-based contrast agent Omniscan® promotes in vitro fibroblast survival through in situ precipitation. *Metallomics* 7, 1103–1110. <https://doi.org/10.1039/C5MT00055F>
- Fernandez, V., 2017. Rare-earth elements market: A historical and financial perspective. *Resources Policy* 53, 26–45. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2017.05.010>
- Ferreira, M., Costa, J., Reis-Henriques, M.A., 2014. ABC transporters in fish species: a review. *Front. Physiol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00266>
- Feyerabend, F., Fischer, J., Holtz, J., Witte, F., Willumeit, R., Drücker, H., Vogt, C., Hort, N., 2010. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomaterialia* 6, 1834–1842. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.024>
- Figueiredo, C., Grilo, T.F., Lopes, C., Brito, P., Diniz, M., Caetano, M., Rosa, R., Raimundo, J., 2018. Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Chemosphere* 206, 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.029>
- Florence, T.M., Morrison, G.M., Stauber, J.L., 1992. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. *Science of The Total Environment* 125, 1–13. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90377-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90377-5)
- Foe, C., Knight, A., 1986. Growth of *Corbicula fluminea* (bivalvia) fed artificial and algal diets. *Hydrobiologia* 133, 155–164. <https://doi.org/10.1007/BF00031864>
- Freshney, R.I., 2005. Culture of Specific Cell Types, in: *Culture of Animal Cells*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/0471747599.cac023>

-G-

- Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M.A., Lead, J.R., Tyler, C.R., Baalousha, M., Biswas, A., Britton, G.J., Cole, P.A., Johnston, B.D., Ju-Nam, Y., Rosenkranz, P., Scown, T.M., Stone, V., 2012. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 31, 144–154. <https://doi.org/10.1002/etc.703>
- Gałuszka, A., Migaszewski, Z., 2011. Geochemical background - an environmental perspective. *Mineralogia* 42, 7–17. <https://doi.org/10.2478/v10002-011-0002-y>
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giamberini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.004>
- Girtan, M., Wittenberg, A., Grilli, M.L., Oliveira, D. de, Giosuè, C., Ruello, M.L., 2021. The Critical Raw Materials Issue between Scarcity, Supply Risk, and Unique Properties. *Materials* 14, 1826. <https://doi.org/10.3390/ma14081826>
- Golev, A., Scott, M., Erskine, P.D., Ali, S.H., Ballantyne, G.R., 2014. Rare earths supply chains: Current status, constraints and opportunities. *Resources Policy* 41, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2014.03.004>
- Gonzalez, V., Vignati, D.A.L., Leyval, C., Giamberini, L., 2014. Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry? *Environment International* 71, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.06.019>
- González, V., Vignati, D.A.L., Pons, M.-N., Montarges-Pelletier, E., Bojic, C., Giamberini, L., 2015. Lanthanide ecotoxicity: First attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. *Environmental Pollution* 199, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.020>

- Goodenough, K.M., Wall, F., Merriman, D., 2018. The Rare Earth Elements: demand, global resources, and challenges for resourcing future generations. *Natural Resources Research* 27, 201–216. <https://doi.org/10.1007/s11053-017-9336-5>
- Gordon, W.E., Espinoza, J.A., Leerberg, D.M., Yelon, D., Hamdoun, A., 2019. Uptake and Efflux of Xenobiotic Transporter Substrates in Zebrafish Embryo Ionocytes. *Aquat Toxicol* 212, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.013>
- Grillo, C.A., Alvarez, F., de Mele, M.A.F.L., 2014. Cellular response to rare earth mixtures (La and Gd) as components of degradable Mg alloys for medical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 117, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.030>
- Gunay, B., Sariyar, E., Unal, U., Firtina Karagonlar, Z., Sağlam, Ö., 2021. Upconversion properties of Tm³⁺-Er³⁺ co-doped layered perovskites and in-vitro cytotoxicity of their exfoliated nanomaterials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 612, 126003. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.126003>
- Gupta, C.K., Krishnamurthy, N., 2005. Extractive metallurgy of rare earths. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Gwenzi, W., Mangori, L., Danha, C., Chaukura, N., Dunjana, N., Sanganyado, E., 2018. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants. *Science of The Total Environment* 636, 299–313. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.235>

-H-

- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1–11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- Hanana, H., Kleinert, C., Gagné, F., 2021. Toxicity of representative mixture of five rare earth elements in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Environ Sci Pollut Res* 28, 28263–28274. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12218-5>

- Hanana, H., Turcotte, P., André, C., Gagnon, C., Gagné, F., 2017. Comparative study of the effects of gadolinium chloride and gadolinium – based magnetic resonance imaging contrast agent on freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 181, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.073>
- Hanana, H., Turcotte, P., Dubé, M., Gagnon, C., Gagné, F., 2018. Response of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha* to sub-lethal concentrations of samarium and yttrium after chronic exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 165, 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.047>
- Hao, S., Xiaorong, W., Liansheng, W., Lemei, D., Zhong, L., Yijun, C., 1997. Bioconcentration of Rare Earth Elements lanthanum, gadolinium and yttrium in algae (*Chlorella Vulgarize* Beijerinck): Influence of chemical species. *Chemosphere* 34, 1753–1760. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00031-3)
- Hao, X., Wang, D., Wang, P., Wang, Y., Zhou, D., 2015. Evaluation of water quality in surface water and shallow groundwater: a case study of a rare earth mining area in southern Jiangxi Province, China. *Environ Monit Assess* 188, 24. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-5025-1>
- Haque, N., Hughes, A., Lim, S., Vernon, C., 2014. Rare Earth Elements: Overview of Mining, Mineralogy, Uses, Sustainability and Environmental Impact. *Resources* 3, 614–635. <https://doi.org/10.3390/resources3040614>
- Hatje, V., Bruland, K.W., Flegal, A.R., 2016. Increases in Anthropogenic Gadolinium Anomalies and Rare Earth Element Concentrations in San Francisco Bay over a 20 Year Record. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4159–4168. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04322>
- He, J., Mi, N., Kuang, Y., Fan, Q., Wang, Xia, Guan, W., Li, G., Li, C., Wang, Xi-wei, 2004. Speciation and distribution characters of rare earth elements in the Baotou Section of the Yellow River. *Huan Jing Ke Xue* 25, 61–66. <https://doi.org/15202236>

- He, X., Zhang, Z., Zhang, H., Zhao, Y., Chai, Z., 2008. Neurotoxicological Evaluation of Long-Term Lanthanum Chloride Exposure in Rats. *Toxicol Sci* 103, 354–361. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn046>
- Heng, B.C., Das, G.K., Zhao, X., Ma, L.-L., Tan, T.T.-Y., Ng, K.W., Loo, J.S.-C., 2010. Comparative cytotoxicity evaluation of lanthanide nanomaterials on mouse and human cell lines with metabolic and DNA-quantification assays. *Biointerphases* 5, FA88–FA97. <https://doi.org/10.1116/1.3494617>
- Henikoff, S., Greene, E., Pietrokovski, S., Bork, P., Attwood, T., Hood, L., 1997. Gene Families: The Taxonomy of Protein Paralogs and Chimeras. *Science* 278, 609–614. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.609>
- Henriques, B., Coppola, F., Monteiro, R., Pinto, J., Viana, T., Pretti, C., Soares, A., Freitas, R., Pereira, E., 2019. Toxicological assessment of anthropogenic Gadolinium in seawater: Biochemical effects in mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment* 664, 626–634. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.341>
- Hernández, P.P., Allende, M.L., 2008. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88, 835S-839S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.3.835S>
- Herrmann, H., Nolde, J., Berger, S., Heise, S., 2016. Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124, 213–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.033>
- Higgins, C.F., Callaghan, R., Linton, K.J., Rosenberg, M.F., Ford, R.C., 1997. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Seminars in Cancer Biology* 8, 135–142. <https://doi.org/10.1006/scbi.1997.0067>

- Hissler, C., Hostache, R., Iffly, J.F., Pfister, L., Stille, P., 2015. Anthropogenic rare earth element fluxes into floodplains: Coupling between geochemical monitoring and hydrodynamic sediment transport modelling. *Comptes Rendus Geoscience, Geochemical and isotopic record of anthropogenic activities (Part 1)* 347, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2015.01.003>
- Hissler, C., Stille, P., Iffly, J.F., Guignard, C., Chabaux, F., Pfister, L., 2016. Origin and Dynamics of Rare Earth Elements during Flood Events in Contaminated River Basins: Sr–Nd–Pb Isotopic Evidence. *Environ. Sci. Technol.* 50, 4624–4631. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03660>
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T., 2000. Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med (Berl)* 78, 14–25. <https://doi.org/10.1007/s001099900070>
- Holden, N., Coplen, T., 2004. The periodic table of the elements, Chemistry International.
- Hua, D., Wang, J., Yu, D., Liu, J., 2017. Lanthanum exerts acute toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Ecotoxicology* 26, 1207–1215. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1846-8>
- Hurst, C., 2010. China's Rare Earth Elements Industry: What Can the West Learn? 43.

-I-

- Iijima, K., Yasukawa, K., Fujinaga, K., Nakamura, K., Machida, S., Takaya, Y., Ohta, J., Haraguchi, S., Nishio, Y., Usui, Y., Nozaki, T., Yamazaki, T., Ichiyama, Y., Ijiri, A., Inagaki, F., Machiyama, H., Suzuki, K., Kato, Y., KR13-02 Cruise Members, 2016. Discovery of extremely REY-rich mud in the western North Pacific Ocean. *Geochem. J.* 50, 557–573. <https://doi.org/10.2343/geochemj.2.0431>

Itoh, A., Yaida, A., Zhu, Y., 2021. Potential Anthropogenic Pollution of High-technology Metals with a Focus on Rare Earth Elements in Environmental Water. *Analytical Sciences* 37, 131–143. <https://doi.org/10.2116/analsci.20SAR16>

-J-

Jackson, W.D., Christiansen, G., 1993. International Strategic Minerals Inventory Summary Report - Rare Earth Oxides (U.S. Geological Survey Circular No. 930- N).

Jaireth, S., Hoatson, D.M., Mieзитis, Y., 2014. Geological setting and resources of the major rare-earth-element deposits in Australia. *Ore Geology Reviews* 62, 72–128. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2014.02.008>

Jamrack, W.D., 1963. Rare Metal Extraction by Chemical Engineering Techniques. *Science* 142, 1050–1050. <https://doi.org/10.1126/science.142.3595.1050>

Janneh, O., Jones, E., Chandler, B., Owen, A., Khoo, S.H., 2007. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *J Antimicrob Chemother* 60, 987–993. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm353>

Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Center, M., Keppler, D., 1994. ATP-dependent Transport of Glutathione S-Conjugates by the Multidrug Resistance-associated Protein. *Cancer Res* 54, 4833–4836.

Jia, Y., Liu, Y., 2020. REE Enrichment during Magmatic–Hydrothermal Processes in Carbonatite-Related REE Deposits: A Case Study of the Weishan REE Deposit, China. *Minerals* 10, 25. <https://doi.org/10.3390/min10010025>

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ Toxicol Chem* 24, 2701–2713. <https://doi.org/10.1897/04-431r.1>

Joonas, E., Aruoja, V., Olli, K., Syvertsen-Wiig, G., Vija, H., Kahru, A., 2017. Potency of (doped) rare earth oxide particles and their constituent metals to inhibit algal growth and induce direct toxic effects. *Science of The Total Environment* 593–594, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.184>

Jordens, A., Cheng, Y.P., Waters, K.E., 2013. A review of the beneficiation of rare earth element bearing minerals. *Minerals Engineering* 41, 97–114. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.10.017>

Jowitt, S.M., Werner, T.T., Weng, Z., Mudd, G.M., 2018. Recycling of the rare earth elements. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 13, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.02.008>

-K-

Kala, S.V., Neely, M.W., Kala, G., Prater, C.I., Atwood, D.W., Rice, J.S., Lieberman, M.W., 2000. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* 275, 33404–33408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007030200>

Kanazawa, Y., Kamitani, M., 2006. Rare earth minerals and resources in the world. *Journal of Alloys and Compounds* 408–412, 1339–1343. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.04.033>

Keith, L., Gosen, B.S., Foley, N., Cordier, D., 2010. The principal rare earth elements deposits of the United States. *USGS Scientific Investigations Report* 2010–5220.

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res* 15, 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>

Keppler, D., 2011. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 299–323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_8

- Kerr, D.R., Meador, J.P., 1996. Modeling dose response using generalized linear models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 395–401. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150325>
- Khan, A.M., Bakar, N.K.A., Bakar, A.F.A., Ashraf, M.A., 2017. Chemical speciation and bioavailability of rare earth elements (REEs) in the ecosystem: a review. *Environ Sci Pollut Res* 24, 22764–22789. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7427-1>
- Kim, H., Wesstrom, B., Alam, S., Ouchi, T., Azimi, G., Neelameggham, N.R., Wang, S., Guan, X. (Eds.), 2018. *Rare Metal Technology 2018*, The Minerals, Metals & Materials Series. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72350-1>
- Klaver, G., Verheul, M., Bakker, I., Petelet-Giraud, E., Négrel, P., 2014. Anthropogenic Rare Earth Element in rivers: Gadolinium and lanthanum. Partitioning between the dissolved and particulate phases in the Rhine River and spatial propagation through the Rhine-Meuse Delta (the Netherlands). *Applied Geochemistry* 47, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.05.020>
- Knappe, A., Möller, P., Dulski, P., Pekdeger, A., 2005. Positive gadolinium anomaly in surface water and ground water of the urban area Berlin, Germany. *Geochemistry* 65, 167–189. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2004.08.004>
- Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S., Giambérini, L., 2018. Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology* 198, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.020>
- Koehlé-Divo, V., Pain-Devin, S., Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., Sohm, B., 2019. *Corbicula fluminea* gene expression modulated by CeO₂ nanomaterials and salinity. *Environ Sci Pollut Res Int* 26, 15174–15186. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04927-3>

- Koehle-Divo, V., Sohm, B., Giamberini, L., Pauly, D., Flayac, J., Devin, S., Auffan, M., Mouneyrac, C., Pain-Devin, S., 2019. A sub-individual multilevel approach for an integrative assessment of CuO nanoparticle effects on *Corbicula fluminea*. *Environmental Pollution* 254, 112976. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112976>
- Koley, D., Bard, A.J., 2012. Inhibition of the MRP1-mediated transport of the menadione-glutathione conjugate (thiodione) in HeLa cells as studied by SECM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 11522–11527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201555109>
- Kostova, I., Manolov, I., Momekov, G., 2004. Cytotoxic activity of new neodymium (III) complexes of bis-coumarins. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39, 765–775. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.06.002>
- Kramer-Wilt, E., 2008. *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774) - Asian Clam. undefined.
- Kujur, M.S., Manakari, V., Parande, G., Prasad, S., Wong, R., Mallick, A., Gupta, M., 2021. Effect of samarium oxide nanoparticles on degradation and in vitro biocompatibility of magnesium. *Materials Today Communications* 26, 102171. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102171>
- Kulaksız, S., Bau, M., 2013. Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters* 362, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.11.033>
- Kulaksız, S., Bau, M., 2011. Rare earth elements in the Rhine River, Germany: First case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. *Environment International* 37, 973–979. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.02.018>
- Kulaksız, S., Bau, M., 2007. Contrasting behaviour of anthropogenic gadolinium and natural rare earth elements in estuaries and the gadolinium input into the North Sea. *Earth and Planetary Science Letters* 260, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2007.06.016>

Kümmerer, K., Helmers, E., 2000. Hospital Effluents as a Source of Gadolinium in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* 34, 573–577. <https://doi.org/10.1021/es990633h>

Kurvet, I., Juganson, K., Vija, H., Sihtmäe, M., Blinova, I., Syvertsen-Wiig, G., Kahru, A., 2017. Toxicity of Nine (Doped) Rare Earth Metal Oxides and Respective Individual Metals to Aquatic Microorganisms *Vibrio fischeri* and *Tetrahymena thermophila*. *Materials (Basel)* 10, E754. <https://doi.org/10.3390/ma10070754>

-L-

Lafarga, M., Berciano, M.T., Garcia-Segura, L.M., Andres, M.A., Carmo-Fonseca, M., 1998. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. *J Neurocytol* 27, 205–217. <https://doi.org/10.1023/A:1006937032068>

Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.002>

Lawrence, M.G., 2010. Detection of anthropogenic gadolinium in the Brisbane River plume in Moreton Bay, Queensland, Australia. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1113–1116. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.027>

Le Penec, G., Le Penec, M., 2001. Acinar primary cell culture from the digestive gland of *Pecten maximus* (L.): an original model for ecotoxicological purposes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259, 171–187. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00232-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00232-5)

Lee, J.H., Byrne, R.H., 1992. Examination of comparative rare earth element complexation behavior using linear free-energy relationships. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 1127–1137. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90050-S](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90050-S)

- Leybourne, M.I., Goodfellow, W.D., Boyle, D.R., Hall, G.M., 2000. Rapid development of negative Ce anomalies in surface waters and contrasting REE patterns in groundwaters associated with Zn–Pb massive sulphide deposits. *Applied Geochemistry* 15, 695–723. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(99\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(99)00096-7)
- Li, J., Hong, M., Yin, X., Liu, J., 2010. Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community. *Journal of Rare Earths* 28, 957–964. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(09\)60233-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(09)60233-7)
- Li, J., Liu, Q., Ge, Z., Duan, Y., Yang, Z., Di, J., 2017. Optimized liquid-separated thermodynamic states for working fluids of organic Rankine cycles with liquid-separated condensation. *Energy* 141, 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.09.115>
- Li, L.Z., Yang, X., 2016. Chapter 9 - China's Rare Earth Resources, Mineralogy, and Beneficiation, in: Borges De Lima, I., Leal Filho, W. (Eds.), *Rare Earths Industry*. Elsevier, Boston, pp. 139–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802328-0.00009-7>
- Liang, T., Li, K., Wang, L., 2014. State of rare earth elements in different environmental components in mining areas of China. *Environ Monit Assess* 186, 1499–1513. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3469-8>
- Liang, T., Zhang, S., Wang, L., Kung, H.-T., Wang, Y., Hu, A., Ding, S., 2005. Environmental biogeochemical behaviors of rare earth elements in soil–plant systems. *Environ Geochem Health* 27, 301–311. <https://doi.org/10.1007/s10653-004-5734-9>
- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R.B., Liess, H.-D., 2016. Predicting the synergy of multiple stress effects. *Scientific Reports* 6, 32965. <https://doi.org/10.1038/srep32965>
- Lin, C.-H., Hwang, P.-P., 2016. The Control of Calcium Metabolism in Zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Mol Sci* 17, 1783. <https://doi.org/10.3390/ijms17111783>

- Liu, W.-S., Guo, M.-N., Liu, C., Yuan, M., Chen, X.-T., Huot, H., Zhao, C.-M., Tang, Y.-T., Morel, J.L., Qiu, R.-L., 2019. Water, sediment and agricultural soil contamination from an ion-adsorption rare earth mining area. *Chemosphere* 216, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.109>
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 114, 313–326. <https://doi.org/10.1007/BF01952257>
- Long, Y., Li, Q., Li, J., Cui, Z., 2011a. Molecular analysis, developmental function and heavy metal-induced expression of ABCC5 in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 158, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.09.005>
- Long, Y., Li, Q., Wang, Y., Cui, Z., 2011b. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.12.001>
- Long, Y., Li, Q., Zhong, S., Wang, Y., Cui, Z., 2011c. Molecular characterization and functions of zebrafish ABCC2 in cellular efflux of heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.01.002>
- López, J., Reig, M., Gibert, O., Torres, E., Ayora, C., Cortina, J.L., 2018. Application of nanofiltration for acidic waters containing rare earth elements: Influence of transition elements, acidity and membrane stability. *Desalination* 430, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.12.033>
- Luckenbach, T., Fischer, S., Sturm, A., 2014. Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 165, 28–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.05.002>
- Lungu-Mitea, S., Oskarsson, A., Lundqvist, J., 2018. Development of an oxidative stress in vitro assay in zebrafish (*Danio rerio*) cell lines. *Sci Rep* 8, 12380. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30880-1>

Luo, Y.-R., Byrne, R.H., 2004. Carbonate complexation of yttrium and the rare earth elements in natural waters. Associate Editor: D. Rimstidt. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 691–699. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00495-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00495-2)

Lürling, M., Tolman, Y., 2010. Effects of lanthanum and lanthanum-modified clay on growth, survival and reproduction of *Daphnia magna*. *Water Research* 44, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.034>

-M-

Macova, S., Dolezelova, P., Pistekova, V., Svobodova, Z., Bedanova, I., Voslarova, E., 2008. Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. *Neuro Endocrinol Lett* 29, 680–684.

Mancheri, N.A., Sprecher, B., Bailey, G., Ge, J., Tukker, A., 2019. Effect of Chinese policies on rare earth supply chain resilience. *Resources, Conservation and Recycling* 142, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2018.11.017>

Manusadžianas, L., Vitkus, R., Gylytė, B., Cimperman, R., Džiugelis, M., Karitonas, R., Sadauskas, K., 2020. Ecotoxicity Responses of the Macrophyte Algae *Nitellopsis obtusa* and Freshwater Crustacean *Thamnocephalus platyurus* to 12 Rare Earth Elements. *Sustainability* 12, 7130. <https://doi.org/10.3390/su12177130>

Marsac, R., 2011. Contrôle de la spéciation des terres rares par les acides humiques : rôle de l'hétérogénéité des sites de complexation et de la compétition entre cations (phdthesis). Université Rennes 1.

Mattice, J.S., Dye, L.L., 1976. Thermal tolerance of adult Asiatic clam. *Proceedings of Thermal Ecology Symposium* 130–134.

Mayfield, D.B., Fairbrother, A., 2015. Examination of rare earth element concentration patterns in freshwater fish tissues. *Chemosphere* 120, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.010>

- McLellan, B.C., Corder, G.D., Golev, A., Ali, S.H., 2014. Sustainability of the Rare Earths Industry. *Procedia Environmental Sciences, The 4th International Conference on Sustainable Future for Human Security SUSTAIN 2013* 20, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.035>
- Merschel, G., Bau, M., 2015. Rare earth elements in the aragonitic shell of freshwater mussel *Corbicula fluminea* and the bioavailability of anthropogenic lanthanum, samarium and gadolinium in river water. *Science of The Total Environment* 533, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.042>
- Merschel, G., Bau, M., Baldewein, L., Dantas, E.L., Walde, D., Bühn, B., 2015. Tracing and tracking wastewater-derived substances in freshwater lakes and reservoirs: Anthropogenic gadolinium and geogenic REEs in Lake Paranoá, Brasilia. *Comptes Rendus Geoscience, Geochemical and isotopic record of anthropogenic activities (Part 1)* 347, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2015.01.004>
- Meyer, L., Bras, B., 2011. Rare earth metal recycling. Presented at the Proceedings of the 2011 IEEE International Symposium on Sustainable Systems and Technology, ISSST 2011, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1109/ISSST.2011.5936890>
- Midura, S., Schneider, E., Sakamoto, F.A., Rosen, G.M., Winalski, C.S., Midura, R.J., 2014. In vitro toxicity in long-term cell culture of MR contrast agents targeted to cartilage evaluation. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 1337–1345. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.07.010>
- Miskon, F., M Shazili, N.A., Faridah, M., 2013. Trace metals and rare earth elements in Rock Oyster *Saccostrea cucullata* along the east coast of Peninsular Malaysia. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 16, 78–87. <https://doi.org/10.1080/14634988.2013.762327>
- Moench, I., Meekhof, K.E., Cheng, L.F., Lopatin, A.N., 2013. Resolution of hyposmotic stress in isolated mouse ventricular myocytes causes sealing of t-tubules. *Experimental Physiology* 98, 1164–1177. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.072470>

- Möller, P., Morteani, G., Dulski, P., 2003. Anomalous Gadolinium, Cerium, and Yttrium Contents in the Adige and Isarco River Waters and in the Water of Their Tributaries (Provinces Trento and Bolzano/Bozen, NE Italy). *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 31, 225–239. <https://doi.org/10.1002/aheh.200300492>
- Möller, P., Paces, T., Dulski, P., Morteani, G., 2002. Anthropogenic Gd in surface water, drainage system, and the water supply of the city of Prague, Czech Republic. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2387–2394. <https://doi.org/10.1021/es010235q>
- Montell, C., 2001. An End in Sight to a Long TRP. *Neuron* 30, 3–5. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00254-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00254-9)
- Moraes, J.S., da Silva Nornberg, B.F., Castro, M.R. de, Vaz, B.D.S., Mizuschima, C.W., Marins, L.F.F., Martins, C. de M.G., 2020. Zebrafish (*Danio rerio*) ability to activate ABCC transporters after exposure to glyphosate and its formulation Roundup Transorb®. *Chemosphere* 248, 125959. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125959>
- Morris, R.V., Haskin, L.A., 1974. EPR measurement of the effect of glass composition on the oxidation states of europium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38, 1435–1445. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(74\)90097-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(74)90097-0)
- Morton, B., Tong, K.Y., 1985. The salinity tolerance of *corbicula fluminea* bivalvia *corbiculoidea* from hong kong. *Malacological Review* 18, 91–96.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- N-
- Ng, T., Smith, D.S., Straus, A., McGeer, J.C., n.d. Review of aquatic effects of lanthanides and other uncommon elements. Attachment 7. EC Contribution Agreement 42.

- Nguyen, R.T., Imholte, D.D., 2016. China's Rare Earth Supply Chain: Illegal Production, and Response to new Cerium Demand. JOM 68, 1948–1956. <https://doi.org/10.1007/s11837-016-1894-1>
- Nogueira, L.S., Wood, C.M., Gillis, P.L., Bianchini, A., 2013. Isolation and fractionation of gill cells from freshwater (*Lasmigona costata*) and seawater (*Mesodesma mactroides*) bivalves for use in toxicological studies with copper. Cytotechnology 65, 773–783. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9647-2>
- Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A., 2003. Effects of Metal Mixtures on Aquatic Biota: A Review of Observations and Methods. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal 9, 795–811. <https://doi.org/10.1080/713610010>
- Nozaki, Y., Lerche, D., Alibo, D.S., Tsutsumi, M., 2000. Dissolved indium and rare earth elements in three Japanese rivers and Tokyo Bay: Evidence for anthropogenic Gd and In. Geochimica et Cosmochimica Acta 64, 3975–3982. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00472-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00472-5)

-O-

OCDE, 2018. Kingsnorth: The Rare Earth Market in 2018. URL.

OCDE, 2013. Essai n° 236 : Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire.

OCDE, 2012. Essai n° 211 : *Daphnia magna*, essai de reproduction.

OCDE, 2011. Essai n° 201: Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance.

OCDE, 2004. Essai n° 202: *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate.

Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M.P., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro* 15, 511–517. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00056-X)

Omodara, L., Pitkäaho, S., Turpeinen, E.-M., Saavalainen, P., Oravisjärvi, K., Keiski, R.L., 2019. Recycling and substitution of light rare earth elements, cerium, lanthanum, neodymium, and praseodymium from end-of-life applications - A review. *Journal of Cleaner Production* 236, 117573. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.07.048>

Orbach, A., Zelig, O., Yedgar, S., Barshtein, G., 2017. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother* 44, 183–187. <https://doi.org/10.1159/000452106>

Orris, G., Grauch, R., 2002. Rare Earth Element Mines, Deposits, and Occurrences.

-P-

Pagano, G., Guida, M., Tommasi, F., Oral, R., 2015. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements—Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 115, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.030>

Paiva, A., Oliveira, M., Yunes, S., Oliveira, L., Cabral-Neto, J., Almeida, C., 2008. Effects of Lanthanum on Human Lymphocytes Viability and DNA Strand Break. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 82, 423–7. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9596-1>

Palizban, A.A., Sadeghi-aliabadi, H., Abdollahpour, F., 2010. Effect of cerium lanthanide on Hela and MCF-7 cancer cell growth in the presence of transferring. *Res Pharm Sci* 5, 119–125.

- Palmer, R.J., Butenhoff, J.L., Stevens, J.B., 1987. Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium in vitro: Comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. *Environmental Research* 43, 142–156. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(87\)80066-X](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(87)80066-X)
- Pang, X., Li, D., Peng, A., 2002. Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ Sci & Pollut Res* 9, 143. <https://doi.org/10.1007/BF02987462>
- Parant, M., Sohm, B., Flayac, J., Perrat, E., Chuburu, F., Cadiou, C., Rosin, C., Cossu-Leguille, C., 2019. Impact of gadolinium-based contrast agents on the growth of fish cells lines. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 182, 109385. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109385>
- Park, B.K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., 1995. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacology & Therapeutics* 68, 385–424. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02013-6)
- Park, E.-J., Choi, J., Park, Y.-K., Park, K., 2008. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* 245, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.12.022>
- Peiravi, M., Ackah, L., Guru, R., Mohanty, M., Liu, J., Xu, B., Zhu, X., Chen, L., 2017. Chemical extraction of rare earth elements from coal ash. *Mining, Metallurgy & Exploration* 34, 170–177. <https://doi.org/10.19150/mmp.7856>
- Peng, C., Chen, Ying, Pu, Z., Zhao, Q., Tong, X., Chen, Yongsheng, Jiang, L., 2017. CeO₂ nanoparticles alter the outcome of species interactions. *Nanotoxicology* 11, 625–636. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1340527>
- Penninckx, F., Cheng, N., Kerremans, R., Van Damme, B., de Loecker, W., 1983. The effects of different concentrations of glycerol and dimethylsulfoxide on the metabolic activities of kidney slices. *Cryobiology* 20, 51–60. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90059-7)

- Pereira, E., Teodori, E., Dei, S., Gualtieri, F., Garnier-Suillerot, A., 1995. Reversal of multidrug resistance by verapamil analogues. *Biochemical Pharmacology* 50, 451–457. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00174-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00174-X)
- Perrat, E., Parant, M., Py, J.-S., Rosin, C., Cossu-Leguille, C., 2017. Bioaccumulation of gadolinium in freshwater bivalves. *Environ Sci Pollut Res* 24, 12405–12415. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8869-9>
- Perry, S.F., Esbaugh, A., Braun, M., Gilmour, K.M., 2009. Gas Transport and Gill Function in Water-Breathing Fish, in: Glass, M.L., Wood, S.C. (Eds.), *Cardio-Respiratory Control in Vertebrates: Comparative and Evolutionary Aspects*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 5–42. https://doi.org/10.1007/978-3-540-93985-6_2
- Petersen, S.A., Sanville, W., Stay, F., Powers, C., 1974. *Nutrient Inactivation as a Lake Restoration Procedure: Laboratory Investigations*, Corvallis. ed. U.S. Government Printing Office, Oregon.
- Petran, A., Radu, T., Borodi, G., Nan, A., Suciu, M., Turcu, R., 2018. Effects of rare earth doping on multi-core iron oxide nanoparticles properties. *Applied Surface Science* 428, 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.09.160>
- Philpotts, J.A., 1970. Redox estimation from a calculation of Eu²⁺ and Eu³⁺ concentrations in natural phases. *Earth and Planetary Science Letters* 9, 257–268. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(70\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0012-821X(70)90036-1)
- Pinto, J., Costa, M., Leite, C., Borges, C., Coppola, F., Henriques, B., Monteiro, R., Russo, T., Di Cosmo, A., Soares, A.M.V.M., Polese, G., Pereira, E., Freitas, R., 2019. Ecotoxicological effects of lanthanum in *Mytilus galloprovincialis*: Biochemical and histopathological impacts. *Aquatic Toxicology* 211, 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.017>
- Ploemen, J.H., van Ommen, B., Bogaards, J.J., van Bladeren, P.J., 1993. Ethacrynic acid and its glutathione conjugate as inhibitors of glutathione S-transferases. *Xenobiotica* 23, 913–923. <https://doi.org/10.3109/00498259309059418>

- Potts, R.W.A., Gutierrez, A.P., Cortés-Araya, Y., Houston, R.D., Bean, T.P., 2020. Developments in marine invertebrate primary culture reveal novel cell morphologies in the model bivalve *Crassostrea gigas*. *PeerJ* 8, e9180. <https://doi.org/10.7717/peerj.9180>
- Pourret, O., Davranche, M., Gruau, G., Dia, A., 2007. Rare earth elements complexation with humic acid. *Chemical Geology* 243, 128. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.05.018>
- Pratas, J., Favas, P.J.C., Varun, M., D'Souza, R., Paul, M.S., 2017. Distribution of rare earth elements, thorium and uranium in streams and aquatic mosses of Central Portugal. *Environ Earth Sci* 76, 156. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6459-2>
- Puckett, C.A., Ernst, R.J., Barton, J.K., 2010. Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans.* 39, 1159–1170. <https://doi.org/10.1039/B922209J>

-Q-

- Qiang, T., Xiao-rong, W., Li-qing, T., Le-mei, D., 1994. Bioaccumulation of the rare earth elements lanthanum, gadolinium and yttrium in carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Pollution* 85, 345–350. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90057-4)
- Quinn, B., Costello, M.J., Dorange, G., Wilson, J.G., Mothersill, C., 2009. Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytotechnology* 59, 121–134. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9202-3>

-R-

- Rabiet, M., Brissaud, F., Seidel, J.L., Pistre, S., Elbaz-Poulichet, F., 2009. Positive gadolinium anomalies in wastewater treatment plant effluents and aquatic environment in the Hérault watershed (South France). *Chemosphere* 75, 1057–1064. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.036>

- Rabiet, M., Brissaud, F., Seidel, J.-L., Pistre, S., Elbaz-Poulichet, F., 2005. Deciphering the presence of wastewater in a medium-sized Mediterranean catchment using a multitracer approach. *Applied Geochemistry* 20, 1587–1596. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2005.04.005>
- Reed, D.W., Fujita, Y., Daubaras, D.L., Jiao, Y., Thompson, V.S., 2016. Bioleaching of rare earth elements from waste phosphors and cracking catalysts. *Hydrometallurgy* 166, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.08.006>
- Richardson, D.G., Birkett, T.C., 1995. Peralkaline Rock-Associated Rare Metals. <https://doi.org/10.1130/DNAG-GNA-P1.523>
- Rider, C.V., LeBlanc, G.A., 2005. An Integrated Addition and Interaction Model for Assessing Toxicity of Chemical Mixtures. *Toxicological Sciences* 87, 520–528. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi247>
- Rodea-Palomares, I., González-Pleiter, M., Martín-Betancor, K., Rosal, R., Fernández-Piñas, F., 2015. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. *Toxics* 3, 342–369. <https://doi.org/10.3390/toxics3040342>
- Rodríguez-Hernández, Á., Zumbado, M., Henríquez-Hernández, L.A., Boada, L.D., Luzardo, O.P., 2019. Dietary Intake of Essential, Toxic, and Potentially Toxic Elements from Mussels (*Mytilus* spp.) in the Spanish Population: A Nutritional Assessment. *Nutrients* 11, E864. <https://doi.org/10.3390/nu11040864>
- Rombach, E., Friedrich, B., 2014. Chapter 10 - Recycling of Rare Metals, in: Worrell, E., Reuter, M.A. (Eds.), *Handbook of Recycling*. Elsevier, Boston, pp. 125–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396459-5.00010-6>
- Romero-Freire, A., Joonas, E., Muna, M., Cossu-Leguille, C., Vignati, D.A.L., Giamberini, L., 2019. Assessment of the toxic effects of mixtures of three lanthanides (Ce, Gd, Lu) to aquatic biota. *Science of The Total Environment* 661, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.155>

Romero-Freire, A., Minguez, L., Pelletier, M., Cayer, A., Caillet, C., Devin, S., Gross, E.M., Guérol, F., Pain-Devin, S., Vignati, D.A.L., Giamberini, L., 2018. Assessment of baseline ecotoxicity of sediments from a prospective mining area enriched in light rare earth elements. *Science of The Total Environment* 612, 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.128>

Roskill, 2015. Rare earths: Market outlook to 2020.

Rucki, M., Kejlova, K., Vlkova, A., Jirova, D., Dvorakova, M., Svobodova, L., Kandarova, H., Letasiova, S., Kolarova, H., Mannerstrom, M., Heinonen, T., 2021. Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *Journal of Rare Earths* 39, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2020.02.011>

Ryerson, F.J., Hess, P.C., 1980. The role of P₂O₅ in silicate melts. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 611–624. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(80\)90253-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(80)90253-7)

-S-

Sabri, D.M., Rabie, T., Ahmed, A.I., Zakaria, S., Bourdineaud, J.-P., 2012. Heavy Metals-Induced Expression of ABCB10 Gene in Zebrafish *Danio rerio*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology* 4, 97–106. <https://doi.org/10.21608/eajbsc.2012.16128>

Schmidt, K., Bau, M., Merschel, G., Tepe, N., 2019. Anthropogenic gadolinium in tap water and in tap water-based beverages from fast-food franchises in six major cities in Germany. *Science of The Total Environment* 687, 1401–1408. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.075>

Schürler, D., Buchert, M., Liu, R., Dittrich, S., Merz, C., 2011. Study on Rare Earths and Their Recycling. Final Report for The Greens/EFA Group in the European Parliament 162.

- Segner, H., Chesné, C., Cravedi, J.-P., Fauconneau, B., Houlihan, D., LeGac, F., Loir, M., Mothersill, C., Pärt, P., Valotaire, Y., Prunet, P., 2001. Cellular approaches for diagnostic effects assessment in ecotoxicology: introductory remarks to an EU-funded project. *Aquatic Toxicology* 53, 153–158. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00162-X)
- Sengupta, D., Gosen, B.S.V., 2016. Placer-Type Rare Earth Element Deposits, in: *Rare Earth and Critical Elements in Ore Deposits*. Society of Economic Geologists. <https://doi.org/10.5382/Rev.18.04>
- Siew, E.L., Farris, A.F., Rashid, N., Chan, K.M., Rajab, N.F., 2020. In vitro toxicological assessment of gadolinium (III) chloride in V79–4 fibroblasts. *Genes and Environment* 42, 22. <https://doi.org/10.1186/s41021-020-00161-3>
- Singer, H., Drobot, B., Zeymer, C., Steudner, R., Daumann, L., 2021. Americium preferred: Lanmodulin, a natural lanthanide-binding protein favors an actinide over lanthanides. <https://doi.org/10.33774/chemrxiv-2021-w0nx3>
- Singhal, R.K., Anderson, M.E., Meister, A., 1987. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity. *FASEB J* 1, 220–223. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.3.2887478>
- Sneller, F., DF, K., Weltje, L., Wezel, A., 2000. Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for Rare Earth Elements (REEs), RIVM report 601501011.
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R.J., Chen, Z.-S., 2012. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* 31, 58–72. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10329>
- Sommer, P., Rotter, V.S., Ueberschaar, M., 2015. Battery related cobalt and REE flows in WEEE treatment. *Waste Management, Urban Mining* 45, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.05.009>

Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Prearo, M., Pastorino, P., Serracca, L., Ercolini, C., Abete, M.C., 2016. Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution* 215, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.096>

Streckeisen, A., 1980. Classification and nomenclature of volcanic rocks, lamprophyres, carbonatites and melilitic rocks IUGS Subcommittee on the Systematics of Igneous Rocks. *Geol Rundsch* 69, 194–207. <https://doi.org/10.1007/BF01869032>

Su, X., Zheng, X., Ni, J., 2009. Lanthanum citrate induces anoikis of Hela cells. *Cancer Lett* 285, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.018>

Sultan, K., Shazili, N.A., 2009. Rare earth elements in tropical surface water, soil and sediments of the Terengganu River Basin, Malaysia. *Journal of Rare Earths* 27, 1072–1078. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(08\)60391-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(08)60391-9)

-T-

Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., Stagnitti, F., 2010. Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere* 80, 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>

Takaya, Y., Yasukawa, K., Kawasaki, T., Fujinaga, K., Ohta, J., Usui, Y., Nakamura, K., Kimura, J.-I., Chang, Q., Hamada, M., Dodbiba, G., Nozaki, T., Iijima, K., Morisawa, T., Kuwahara, T., Ishida, Y., Ichimura, T., Kitazume, M., Fujita, T., Kato, Y., 2018. The tremendous potential of deep-sea mud as a source of rare-earth elements. *Sci Rep* 8, 5763. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23948-5>

Talens Peiró, L., Villalba Méndez, G., 2013. Material and Energy Requirement for Rare Earth Production. *JOM* 65, 1327–1340. <https://doi.org/10.1007/s11837-013-0719-8>

- Tamás, M.J., Labarre, J., Toledano, M.B., Wysocki, R., 2006. Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast, in: Tamás, M.J., Martinoia, E. (Eds.), *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man*, Topics in Current Genetics. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 395–454. https://doi.org/10.1007/4735_105
- Tan, Q.-G., Yang, G., Wilkinson, K.J., 2017. Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 168, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.051>
- Tanaka, E., Nakamura, K., Yasukawa, K., Mimura, K., Fujinaga, K., Iijima, K., Nozaki, T., Kato, Y., 2020. Chemostratigraphy of deep-sea sediments in the western North Pacific Ocean: Implications for genesis of mud highly enriched in rare-earth elements and yttrium. *Ore Geology Reviews* 119, 103392. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2020.103392>
- Tanaka, M., Oki, T., Koyama, K., Narita, H., Oishi, T., 2013. Chapter 255 - Recycling of Rare Earths from Scrap, in: Bünzli, J.-C.G., Pecharsky, V.K. (Eds.), *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Including Actinides*. Elsevier, pp. 159–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59536-2.00002-7>
- Tang, H., Wang, X., Shuai, W., Liu, Y., 2016. Immobilization of Rare Earth Elements of the Mine Tailings Using Phosphates and Lime. *Procedia Environmental Sciences* 31, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.02.034>
- Tang, J., Johannesson, K.H., 2003. Speciation of rare earth elements in natural terrestrial waters: assessing the role of dissolved organic matter from the modeling approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2321–2339. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01413-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01413-8)
- Tang, J., Zhu, N., Zhu, Y., Zamir, S.M., Wu, Y., 2018. Sustainable pollutant removal by periphytic biofilm via microbial composition shifts induced by uneven distribution of CeO₂ nanoparticles. *Bioresource Technology* 248, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.064>

Tang, S., Zheng, C., Chen, M., Du, W., Xu, X., 2020. Geobiochemistry characteristics of rare earth elements in soil and ground water: a case study in Baotou, China. *Sci Rep* 10, 11740. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68661-4>

Tepe, N., Romero, M., Bau, M., 2014. High-technology metals as emerging contaminants: Strong increase of anthropogenic gadolinium levels in tap water of Berlin, Germany, from 2009 to 2012. *Applied Geochemistry* 45, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.04.006>

Tricca, A., Stille, P., Steinmann, M., Kiefel, B., Samuel, J., Eikenberg, J., 1999. Rare earth elements and Sr and Nd isotopic compositions of dissolved and suspended loads from small river systems in the Vosges mountains (France), the river Rhine and groundwater. *Chemical Geology* 160, 139–158. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(99\)00065-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(99)00065-0)

Tuduri, J., Lefebvre, G., Charles, N., Naby, Z., Gaillard, F., Pourret, O., 2020. Lumière sur la géologie des terres rares, pourquoi tant d'attraits ? *Géologues : revue de l'Union française des géologues*.

-U-

Urien, N., 2015. Waterborne metal bioaccumulation modelling in *Gammarus* species : influence of water chemistry and life history of organisms.

-V-

Van Gosen, B.S., Verplanck, P.L., Long, K.R., Gambogi, J., Seal II, R.R., 2014. The rare-earth elements: Vital to modern technologies and lifestyles (USGS Numbered Series No. 2014–3078), The rare-earth elements: Vital to modern technologies and lifestyles, Fact Sheet. U.S. Geological Survey, Reston, VA. <https://doi.org/10.3133/fs20143078>

- Van Hoecke, K., Quik, J.T.K., Mankiewicz-Boczek, J., De Schamphelaere, K.A.C., Elsaesser, A., Van der Meeren, P., Barnes, C., McKerr, G., Howard, C.V., Van de Meent, D., Rydzyński, K., Dawson, K.A., Salvati, A., Lesniak, A., Lynch, I., Silversmit, G., De Samber, B., Vincze, L., Janssen, C.R., 2009. Fate and effects of CeO₂ nanoparticles in aquatic ecotoxicity tests. *Environ Sci Technol* 43, 4537–4546. <https://doi.org/10.1021/es9002444>
- Van Loy, S., Binnemans, K., Van Gerven, T., 2017. Recycling of rare earths from lamp phosphor waste: Enhanced dissolution of LaPO₄:Ce³⁺,Tb³⁺ by mechanical activation. *Journal of Cleaner Production* 156, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.160>
- Van Oosterhout, F., Goitom, E., Roessink, I., Lürling, M., 2014. Lanthanum from a Modified Clay Used in Eutrophication Control Is Bioavailable to the Marbled Crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *PLoS One* 9, e102410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102410>
- Verplanck, P.L., Furlong, E.T., Gray, J.L., Phillips, P.J., Wolf, R.E., Esposito, K., 2010. Evaluating the Behavior of Gadolinium and Other Rare Earth Elements through Large Metropolitan Sewage Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3876–3882. <https://doi.org/10.1021/es903888t>
- Verplanck, P.L., Taylor, H.E., Nordstrom, D.K., Barber, L.B., 2005. Aqueous stability of gadolinium in surface waters receiving sewage treatment plant effluent, Boulder Creek, Colorado. *Environ Sci Technol* 39, 6923–6929. <https://doi.org/10.1021/es048456u>
- Voßenkaul, D., Kruse, S., Friedrich, B., 2013. Recovery of rare earth elements from small scale consumer scrap magnets. Presented at the European Metallurgical Conference, EMC 2013, pp. 1263–1270. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35014.27202>

-W-

- Waajen, G., Pauwels, M., Lürling, M., 2017. Effects of combined flocculant – Lanthanum modified bentonite treatment on aquatic macroinvertebrate fauna. *Water Research* 122, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.075>
- Walker, J.B., Choppin, G.R., 1967. Thermodynamic Parameters of Fluoride Complexes of the Lanthanides, in: *Lanthanide/Actinide Chemistry, Advances in Chemistry*. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 127–140. <https://doi.org/10.1021/ba-1967-0071.ch010>
- Wambeke, L.V., 1995. LES CARBONATITES : ORIGINE, MINERALOGIE ET IMPORTANCE ECONOMIQUE ACTUELLE LA CONTRIBUTION BELGE ET DE L'UNION EUROPEENNE 9.
- Wang, J., Guo, M., Liu, M., Wei, X., 2020. Long-term outlook for global rare earth production. *Resources Policy* 65, 101569. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2019.101569>
- Wang, X., Yao, M., Li, J., Zhang, K., Zhu, H., Zheng, M., 2017. China's Rare Earths Production Forecasting and Sustainable Development Policy Implications. *Sustainability* 9, 1003. <https://doi.org/10.3390/su9061003>
- Wells, B., Wells, V., 2001. *The Lanthanides, Rare Earth Metals*.
- Weltens, R., 2000. Ecotoxicity of Contaminated Suspended Solids for Filter Feeders (*Daphnia magna*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 315–323. <https://doi.org/10.1007/s002440010110>
- Weltje, L., Heidenreich, H., Zhu, W., Wolterbeek, H.Th., Korhammer, S., de Goeij, J.J.M., Markert, B., 2002. Lanthanide concentrations in freshwater plants and molluscs, related to those in surface water, pore water and sediment. A case study in The Netherlands. *Science of The Total Environment* 286, 191–214. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00978-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00978-0)

- Weng, Z., Jowitt, S., Mudd, G., Haque, N., 2013. Assessing rare earth element mineral deposit types and links to environmental impacts. *Applied Earth Science IMM Transactions section B* 122, 83–96. <https://doi.org/10.1179/1743275813Y.0000000036>
- Whitlock, B., Leslie, E., 2020. Efflux transporters in anti-cancer drug resistance: Molecular and functional identification and characterization of multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). pp. 31–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816434-1.00002-4>
- Wilfong, W.C., Kail, B.W., Bank, T.L., Howard, B.H., Gray, M.L., 2017. Recovering Rare Earth Elements from Aqueous Solution with Porous Amine–Epoxy Networks. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 18283–18294. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03859>
- Williams, P.J., Barton, M.D., Johnson, D.A., Fontboté, L., Haller, A. de, Mark, G., Oliver, N.H.S., Marschik, R., 2005. Iron Oxide Copper-Gold Deposits Geology, Space-Time Distribution, and Possible Modes of Origin. One Hundredth Anniversary Volume. <https://doi.org/10.5382/AV100.13>
- Wood, S.A., 1990. The aqueous geochemistry of the rare-earth elements and yttrium: 2. Theoretical predictions of speciation in hydrothermal solutions to 350°C at saturation water vapor pressure. *Chemical Geology* 88, 99–125. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(90\)90106-H](https://doi.org/10.1016/0009-2541(90)90106-H)
- Wu, Y., Yin, X., Zhang, Q., Wang, W., Mu, X., 2014. The recycling of rare earths from waste tricolor phosphors in fluorescent lamps: A review of processes and technologies. *Resources, Conservation and Recycling* 88, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.04.007>
- Wysocki, R., Tamás, M.J., 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev* 34, 925–951. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x>

-X-

- Xiaowei, Z., MIAO, R., LI, C., WU, D., YAN, H., WANG, Z., CHEN, D., YAN, S., LI, Z., 2016. Impurity distribution in metallic dysprosium during distillation purification. *Journal of Rare Earths* 34, 924–930. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(16\)60116-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(16)60116-3)
- Xie, F., Zhang, T.A., Dreisinger, D., Doyle, F., 2014. A critical review on solvent extraction of rare earths from aqueous solutions. *Minerals Engineering* 56, 10–28. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.10.021>
- Xu, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28, 249–268. <https://doi.org/10.1007/BF02977789>
- Xu, C., Qu, X., 2014. Cerium oxide nanoparticle: A remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Materials* 6. <https://doi.org/10.1038/am.2013.88>
- Xu, Q., Jiang, Y., Chu, W., Su, C., Hu, D., Lu, Q., Zhang, T., 2017. Response of *Spirodela polyrhiza* to cerium: subcellular distribution, growth and biochemical changes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.012>
- Xu, T., Su, C., Hu, D., Li, F., Lu, Q., Zhang, T., Xu, Q., 2016. Molecular distribution and toxicity assessment of praseodymium by *Spirodela polyrrhiza*. *Journal of Hazardous Materials* 312, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.040>

-Y-

- Yang, G., Sun, Z., Lv, X., Deng, Y., Zhou, Q., Huang, X., 2012. Living Target of Ce(III) Action on Horseradish Cells: Proteins on/in Cell Membrane. *Biol Trace Elem Res* 150, 396–402. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9514-6>

Yoshida, S., Muramatsu, Y., Tagami, K., Uchida, S., 1998. Concentrations of lanthanide elements, Th, and U in 77 Japanese surface soils. *Environment International* 24, 275–286. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00006-3](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00006-3)

Yu, S., Yuan, L., Yang, X., Wang, K., Ke, Y., Qian, Z.M., 2005. La³⁺-promoted proliferation is interconnected with apoptosis in NIH 3T3 cells. *J Cell Biochem* 94, 508–519. <https://doi.org/10.1002/jcb.20303>

-Z-

Zachar, P.C., Jonz, M.G., 2012. Neuroepithelial cells of the gill and their role in oxygen sensing. *Respiratory Physiology & Neurobiology, New Insights into Structure/Function Relationships in Fish Gills* 184, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.06.024>

Zambanini, T., Borges, R., Faria, P.C., Delpino, G.P., Pereira, I.S., Marques, M.M., Marchi, J., 2019. Dissolution, bioactivity behavior, and cytotoxicity of rare earth-containing bioactive glasses (RE = Gd, Yb). *International Journal of Applied Ceramic Technology* 16, 2028–2039. <https://doi.org/10.1111/ijac.13317>

Zhang, K., Kleit, A.N., Nieto, A., 2017. An economics strategy for criticality – Application to rare earth element Yttrium in new lighting technology and its sustainable availability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 77, 899–915. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.127>

Zhao, L., Liu, L., 2018. Assessing the impact of lanthanum on the bivalve *Corbicula fluminea* in the Rhine River. *Science of The Total Environment* 640–641, 830–839. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.351>


- Zharikov, V., Arkai, P., Brodie, K., Callegari, E., Coutinho, J., Davis, E., Desmons, J., Fettes, D., Grieve, R., Harte, B., Krautner, H., Pertsev, N., Rosen, O., Rusinov, V., Sassi, F., Schmid, R., Sen, S., Siivola, J., Smulikowski, W., Stöffler, D., Wimmenauer, W., 2008. Metamorphic rocks: a classification and glossary of terms: recommendations of the International Union of Geological Sciences Subcommittee on the Systematics of Metamorphic Rocks. *Choice Reviews Online* 45, 45-4741-45-4741. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.45-4741>
- Zhou, B., Li, Z., Chen, C., 2017. Global Potential of Rare Earth Resources and Rare Earth Demand from Clean Technologies. *Minerals* 7, 203. <https://doi.org/10.3390/min7110203>
- Zhou, H., Greig, A., Tang, J., You, C.-F., Yuan, D., Tong, X., Huang, Y., 2012. Rare earth element patterns in a Chinese stalagmite controlled by sources and scavenging from karst groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 83, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.12.027>
- Zhou, S.-F., Wang, L.-L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W., Li, C.G., Li, Y., 2008. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr Med Chem* 15, 1981–2039. <https://doi.org/10.2174/092986708785132870>
- Zhu, Y., Hattori, R., Rahmi, D., Okuda, S., Itoh, A., Fujimori, E., Umemura, T., Haraguchi, H., 2005. Fractional Distributions of Trace Metals in Surface Water of Lake Biwa as Studied by Ultrafiltration and ICP-MS. *Bulletin of The Chemical Society of Japan - BULL CHEM SOC JPN* 78, 1970–1976. <https://doi.org/10.1246/bcsj.78.1970>
- Zhu, Y., Hoshino, M., Yamada, H., Itoh, A., Haraguchi, H., 2004. Gadolinium Anomaly in the Distributions of Rare Earth Elements Observed for Coastal Seawater and River Waters around Nagoya City. *Bulletin of The Chemical Society of Japan - BULL CHEM SOC JPN* 77, 1835–1842. <https://doi.org/10.1246/bcsj.77.1835>
- Zhuang, W.-Q., Fitts, J.P., Ajo-Franklin, C.M., Maes, S., Alvarez-Cohen, L., Hennebel, T., 2015. Recovery of critical metals using biometallurgy. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.019>

Zicari, M.A., d'Aquino, L., Paradiso, A., Mastrolitti, S., Tommasi, F., 2018. Effect of cerium on growth and antioxidant metabolism of *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163, 536–543. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.113>

Annexes

Annexe 1

Tableau relatant de la composition du milieu d'élevage pour l'acclimatation de *Corbicula fluminea*.

Composition du milieu d'élevage	Proportion en volume	
CaCl ₂ , 2H ₂ O (4,2 g/L)	25 ‰	 Stérilisation pendant 20 min à 120 °C (autoclavage)
MgSO ₄ , 7H ₂ O (160 mg/L)	25 ‰	
NaHCO ₃ (600 mg/L)	25 ‰	
KCl (60 mg/L)	25 ‰	
Eau de Volvic	1/8 ^{ème}	
QSP eau déminéralisé		

Annexe 2

Tableau relatant des solutions nécessaires à la procédure de décontamination des tissus de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

Solution	Quantité
SBS à 2,32 g/L (Quinn et al., 2009) Osmolarité = 100 mOSM	1 L d'eau ultrapure stérile + 2,32 g de NaCl Filtration sur 0,22 µm par Stéricup (1 L)
Solution antibiotique 4X (ATB)	0,02 ‰ (20 mL) de Pénicilline - Streptomycine (5, 000 IU/mL - 5000 µg/mL, Gibco) 80 µg/mL de Gentamycine (50 mg/mL, Gibco soit un vol = 1,6 mL) 40 µg/mL de Kanamycine (Sigma - Alderich, soit un vol = 52 mL) QSP 1 L d'eau ultrapure stérile Filtration sur 0,22 µm par Stéricup (1 L)
Solution antibiotique 2X (ATB)	1/2 sol ATB 4X (5 mL) + 1/2 sol SBS (5 mL)
Solution antibiotique 1X (ATB)	1/4 sol ATB 4X (2,5 mL) + 3/4 sol SBS (7,5 mL)

Annexe 3

Tableau relatant de la composition de la solution de pronase à 0,025 % nécessaire au lancement de la dissociation des tissus de glandes digestives de *Corbicula fluminea* (8 heures).

Composant	Proportion en volume
Solution de pronase à 0,025 % (w/v)	3/4 Solution de SBS (75 mL) + 1/4 sol ATB 4X (25 mL) + 25 mg de Pronase (4 units/mL, Sigma - Alderich) Filtration sur 0,22 µm par seringue

Annexe 4

Tableau relatant de la composition du milieu Leibovitz's L-15 modifié à 10 % d'après Quinn et al. (2009) pour la réalisation des cultures primaires de glandes digestives de *Corbicula fluminea*.

Composition et constitution du milieu Leibovitz's L-15 modifié à 10 %	Quantité
Milieu de culture Leibovitz's L-15	15 % (150 mL)
Péniciline - Streptomycine (5,000 IU/mL - 5000 µg/mL, Gibco)	5 mL (2,5 mg/mL)
Gentamycine (50 mg/mL, Gibco)	2 mL (100 mg/mL)
Kanamycine (Sigma - Alderich)	0,01 g
Rouge de Phénol	0,01 g
HEPES	2,38 g
QSP 1 L eau ultrapure stérile	
Vérification et ajustement du pH à 7,5	
Vérification osmolarité à 100 mOSM	
Filtration sur 0,22 µm par Stéricup	
Conservation à - 20 °C puis lors de l'utilisation ajouter	
L - glutamine	10 mL
Sérum de veau foetal (SVF)	100 mL
Vérification du pH à 7,5 - conservation à - 20 °C - décongélation à température ambiante	

Communications et activités scientifiques

Articles acceptés, soumis, ou en préparation :

TOXICITY OF LANTHANIDES ON VARIOUS FISH CELL LINES

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc, MAUL Armand et COSSU-LEGUILLE Carole
(Soumis après révision dans *Aquatic Toxicology*, août 2021)

Communications orales :

ECOTOXICOLOGY ASSESSMENT OF RARE EARTH ELEMENTS: CELLULAR
APPROACH ON ZF4 CELL LINE (*DANIO RERIO*)

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole
Séminaire interne au laboratoire LIEC, Metz (France), juin 2018

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF RARE EARTH ELEMENTS: CELLULAR
APPROACHES TO VARIOUS AQUATIC SPECIES

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole
*Workshop ECOTREE, Luxembourg Institute of Science and Technology, Esch-sur-Alzette
(Luxembourg), octobre 2018*

ECOTOXICOLOGY ASSESSMENT OF RARE EARTH ELEMENTS ALONE AND IN
MIXTURES ON ZF4 CELL (*DANIO RERIO*)

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole
*Colloque national LabEx RESSOURCES21, École thématique CNRS « Ressources
Minérales : Cycle Géochimique des Métaux », Nancy (France), octobre 2018*

CYTOTOXICITY OF RARE EARTH ELEMENTS ALONE AND IN MIXTURES ON A FISH
CELL LINE (ZF4, *DANIO RERIO*)

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc, FLAYAC Justine, BOJIC Clément et COSSU-
LEGUILLE CAROLE
International Symposium on Toxicity Assessment, 19th, Thessalonique (Grèce), août 2019

IN VITRO CYTOTOXICITY OF RARE EARTH ELEMENTS ALONE AND IN MIXTURES
TO FISH CELL LINES

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc, FLAYAC Justine, BOJIC Clément et COSSU-LEGUILLE CAROLE

Workshop LabEx RESSOURCES21, Strategic metals in the 21st century, Nancy (France), octobre 2019

Communications affichées :

CELLULAR RESPONSE TO RARE EARTH ELEMENTS ALONE AND IN MIXTURES ON ZF4 CELL LINE (*DANIO RERIO*)

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole

Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy (France), février 2019

LE COTÉ OBSCUR DES ÉLÉMENTS TERRES-RARES : IMPACT À L'ÉCHÈLLE DES CELLULES DU POISSON ZÈBRE

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole

Séminaire des doctoriales de l'Université de Lorraine, Vosges (France), mai 2019

CELLULAR RESPONSE TO RARE EARTH ELEMENTS ALONE AND IN MIXTURES ON ZF4 CELL LINE (*DANIO RERIO*)

FLEURBAIX Emmanuel, PARANT Marc et COSSU-LEGUILLE Carole

Séminaire interne DocDay au laboratoire LIEC, Metz (France), juin 2019

Encadrements d'étudiants

ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES ÉLÉMENTS TERRES-RARES SUR DES CELLULES FIBROBLASTIQUES DE *DANIO RERIO* (ZF4)

Co-encadrement technique de LUDOVIC Mayer (étudiant master 1^{ère} année 3E) avec la Pr. Carole Cossu-Leguille et le Dr. Marc Parant, laboratoire LIEC, Metz (France), avril à juin 2018

ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DU NÉODYME, GADOLINIUM ET DE L'YTTERBIUM SUR DES CELLULES BRANCHIALES D'ONCORHYNCHUS *MYKISS* (RT-GILL W1)

Co-encadrement technique de Jean-Baptiste Robert (étudiant master 1^{ère} année Gestion de l'environnement) avec la Pr. Carole Cossu-Leguille et le Dr. Marc Parant, laboratoire LIEC, Metz (France), avril à juillet 2019

Participation aux activités du laboratoire :

Membre élu du collège des non-permanents au conseil de laboratoire LIEC (mandat 3 ans et demi ; mars 2018 à juin 2021)

Résumé

Depuis 30 ans, l'utilisation croissante des Lanthanides dans les nouvelles technologies a entraîné des rejets importants de ces métaux vers les écosystèmes aquatiques. Dans une politique mondiale de développement durable visant à préserver la qualité des écosystèmes, la question de l'impact des Lanthanides sur les organismes aquatiques s'est naturellement posée. Néanmoins, les études restent peu nombreuses et aucun consensus ne subsiste concernant la toxicité des Lanthanides. Dans ce contexte, nous avons étudié la toxicité cellulaire des Lanthanides individuellement et en mélanges. Les effets toxiques ont été mis en évidence en mesurant la viabilité de cellules fibroblastiques (ZF4 ; ATCC®, CRL-2050™) et hépatiques (ZFL ; ATCC®, CRL-2643™) de poisson zèbre (*Danio rerio*), de cellules branchiales (RTgill-W1 ; ATCC®, CRL-2523™) de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), et des cellules primaires de glandes digestives de corbicule (*Corbicula fluminea*) exposées à ces métaux. Les résultats ont montré que les Lanthanides sont responsables d'effets toxiques directs sur nos modèles cellulaires. Concernant la toxicité des Lanthanides en mélanges, des effets synergiques ont été observés sur les 3 lignées cellulaires de poissons. Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes de détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4 de *Danio rerio*. Pour cela, la viabilité des cellules ZF4 a été mesurée après des expositions aux Lanthanides en présence d'inhibiteurs spécifiques des glutathion-S-transférases (acide éthacrynique) et des protéines MRP (MK571 et probénécide). Nous avons décidé d'étudier ces acteurs en raison de leurs rôles respectifs dans les phases II et III de la détoxification cellulaire de métaux chez les bivalves et les poissons. Les résultats ont montré que les protéines MRP jouent un rôle dans la détoxification des Lanthanides dans les cellules ZF4. Globalement, les résultats obtenus pour cette recherche ont confirmé que les effets toxiques des Lanthanides à l'échelle cellulaire sont pertinents pour prédire les effets *in vivo*, dans le cadre d'une évaluation de la toxicité de ces métaux.

Mots-clés : *Lanthanides, Cytotoxicité, Effet mélange, Détoxification cellulaire, modèles cellulaires.*

Abstract

Since 30 years ago, the growing use of Lanthanides in new technologies has contributed to important releases of these metals into aquatic ecosystems. In a global sustainable development policy aimed at preserving the quality of ecosystems, the impact of Lanthanides on aquatic organisms has naturally been questioned. However, studies on the aquatic ecotoxicology of Lanthanides are incomplete, and no consensus is established yet. In this context, we studied the cellular toxicity of Lanthanides individually and in mixtures. To determine these toxic effects, cell viability was measured on *Danio rerio* fibroblast-like cells (ZF4; ATCC®, CRL-2050™), *Danio rerio* hepatic cells (ZFL; ATCC®, CRL-2643™), *Oncorhynchus mykiss* epithelial cells (RTgill-W1; ATCC®, CRL-2523™), and primary culture of *Corbicula fluminea* digestive glands exposed to Lanthanides. Direct toxicity of Lanthanides has been observed on all cellular models. Concerning the toxicity of Lanthanides in mixtures, synergistic effects have been underlined on the three fish cell lines. In this research, we focused on the mechanisms of the detoxification of Lanthanides in the case of ZF4 cells from *Danio rerio*. The effects of Lanthanides were assessed in the presence of specific inhibitors of glutathione-S-transferases (ethacrynic acid) and MRP-like (MK571 and probenecid), by cell viability measurements. We decided to study these actors of the cellular detoxification due to their respective roles in phases II and III of the cellular detoxification of metals in fishes and bivalves. Regarding the results, MRP-like proteins are effectively involved in the detoxification of Lanthanides in ZF4 cells. Overall, our results highlighted the relevance of the toxic effects of Lanthanides at the cellular level for the risk assessment of these metals.

Keywords: *Lanthanides, Cytotoxicity, Mixture effect, Cellular detoxification, Cellular models.*