



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Laboratoire Interdisciplinaire des  
Environnements Continentaux  
LIEC - UMR 7360 CNRS  
Metz



Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie  
Ressources Procédés Produits Environnement  
RP2E ED N°410  
Nancy

## THESE

Pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**  
*Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes*

Soutenue publiquement par :

**Emilie PERRAT**

Le 12 Décembre 2017

---

### **Impacts environnementaux des agents de contraste à base de Gadolinium : situation locale, approche cellulaire et *in vivo***

---

*Commission d'examen :*

Directeur de thèse	<b>Carole COSSU-LEGUILLE</b>	Professeur, Université de Lorraine - LIEC, Metz
Co-directeurs de thèse	<b>Marc PARANT</b> <b>Christophe ROSIN</b>	Maître de Conférences, Université de Lorraine - LIEC, Metz Adjoint chef d'unité chimie des eaux, ANSES - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy
Rapporteurs	<b>Christophe MINIER</b> <b>Amar BENNASROUNE</b>	Professeur, Université du Havre- SEBIO, Le Havre Maître de Conférences – HDR, Université de Reims Champagne- Ardenne - MEDyC, Reims
Examineur	<b>Florence GERET</b>	Professeur, Institut National Universitaire Champollion - EA BTSB, Albi



Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux – LIEC UMR 7360  
Campus Bridoux, 8 rue du général Delestraint, 57070 Metz



*A mes parents,  
**Jean-Pierre et Annie**  
Et à ma sœur, **Estelle***

*"Sometimes good things fall apart  
so better things can fall together"*

*Marilyn Monroe*



# Remerciements

---

*Au terme de ce doctorat, il est temps pour moi de faire une petite rétrospective sur ces 4 années... La réalisation d'une thèse de doctorat suit un chemin long et semé d'embûches et de petits tracés ; c'est aussi l'arrivée fortuite des premiers cheveux blancs. Malgré ces événements qui font parfois se poser la question saugrenue : « Mais, qui t'a rangé à plat dans ce tiroir, comme un espadon dans une baignoire ? » (Soldat Louis - Le Bagad De Lann Bihoué); cette période est une expérience passionnante dont on ressort grandi. Ces années d'étude reflètent les passions pour la découverte et la recherche, « car quiconque demande reçoit, celui qui cherche trouve » (Matthieu 7:8). Cependant, cette exploration n'est possible qu'au travers d'un apprentissage au laboratoire et sur le terrain, mais aussi et surtout, par des rencontres, des amitiés tant professionnelles que personnelles. C'est pourquoi je tiens à remercier ici toutes ces personnes qui m'ont accueillie, accompagnée et épaulée tout au long de ce travail.*

*Mes remerciements vont tout d'abord à mes directeurs de thèse, **Carole Cossu-Leguille** (Directrice), **Marc Parant** (co-directeur LIEC) et **Christophe Rosin** (co-directeur ANSES). J'ai énormément appris tant sur le plan scientifique que personnel à votre contact. Je vous suis reconnaissante pour avoir encadré ce travail et pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordée en me choisissant pour mener à bien ce doctorat.*

*Je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui ont pris le temps de lire et d'évaluer ce travail de thèse. Merci aux rapporteurs, **Christophe Minier** et **Amar Bennasroune**, d'avoir accepté de juger mon travail. Et merci à **Florence Geret** d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examinatrice.*

*Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage qui ont apporté un regard neuf sur mes travaux lors de chaque réunion annuelle d'état d'avancement de la thèse. Merci donc à **Françoise Chuburu**, **Isabelle Deschamps** et **Cyril Durou** de l'ICMR de Reims ; merci à **Bénédicte Sofm** du LIEC et à **Jean-Sébastien Py** de l'ANSES.*

*Merci aux soutiens financiers apportés par les programmes de l'ANR via le programme national Investissements d'avenir (Labex Ressources21) et du CNRS-INSU le programme EC2CO-ECODYN sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Mes remerciements vont également à l'UFR SCIFA qui m'a permis de faire de l'enseignement dans le cadre de vacances durant ma thèse, mais aussi en tant qu'ATER au cours de cette dernière année.*

*Un grand merci à la direction du laboratoire LIEC, **Fabien Thomas** et **Pascale Bauda**, et merci également à **Jean-François Munoz** pour son accueil au sein du Laboratoire d'hydrologie de l'ANSES à Nancy.*

Ces travaux n'auraient pas été possibles sans la participation de **Delphine Aran** (LIEC Metz), **Anne-Sylvie André Mayer** (LIEC Nancy), **Philippe Vanier** (ARS) et **Philippe Negrel** (BRGM) qui ont pris le temps de discuter géosciences avec moi. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à **Elise Billoir** et **Simon Devin** qui ont éclairé le monde de la statistique par leur approche humaine.

Toute ma reconnaissance et ma gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire. **Maryline** et **Catherine**, merci à vous pour votre aide dans les méandres administratifs. Merci également à **Valérie** et **Nathalie K.** (partie trop tôt) pour votre temps passé à jongler pour placer les heures d'enseignement. Un grand merci à **Nathalie N.**, tes petites attentions, ton sourire et nos discussions sont toujours un rayon de soleil pour commencer la matinée.

Un merci tout particulier à **Philippe Wagner**, pour ton aide lors des sorties terrain. Ces sorties resteront parmi les meilleurs moments de ma thèse. Grâce à toi j'ai pu découvrir la région Lorraine en long, en large et en travers. Merci également à **Philippe Rousselle**, pour les analyses et pour tous tes conseils sur les données chimiques, mais aussi pour les sorties astronomie qui ont permis de voir l'univers étoilé sous un autre angle. Merci à **Jean-François Poinsaint**, pour ses talents de bricoleur indispensables à la bonne réalisation de nos tests et qui est également là quand on perd les pédales ... de nos vélos. Un grand merci à tous ceux qui ont aidés à la réalisation des manips : **Chantal**, merci de ton aide pour les élevages « Algues et Daphnies » et merci pour ta bonne humeur ; **Marie-Andrée**, **Danièle** et **Clément B.**, merci pour vos conseils lors des essais en Algo et en Culture Cell. Enfin, merci à **Etienne** qui veille à la bonne préparation des salles et matériel de TP et qui gère le magasin, parce qu'on a toujours besoin de matériel au moment où on pensait avoir tout préparé.

Je souhaite remercier **Jean-Sébastien** pour m'avoir initiée à l'univers mystique de l'ICP-MS et toute l'équipe du Laboratoire d'hydrologie de l'ANSES à Nancy. Merci beaucoup à **Bénédictte** (alias Béné) et à **Justine** (alias T'it Tig) d'avoir éclairé ma lanterne sur le monde merveilleux de la cytométrie en flux.

Bien entendu, je n'oublie pas les autres collègues et amis qui m'ont supportée tout au long de ces quatre années. A ma coloc de Labo et voisine de palier pendant près d'un an, un grand merci **Andréina**, grâce à toi, ma chère copilote active tous les 200 km, j'ai notamment de merveilleux souvenirs de Berlin. Notre vie en colocation/voisinage au presbytère ont été de grands moments de rigolades intenses, bien que tu m'aies quittée pour de nouveaux horizons nommés : « la vie à deux avec **Bastien** ». Merci à tous les copains coach de ma santé mentale : **Anne** (alias Nanou), **Imad** (alias Mamad) et ta petite famille, **Clément C.** (alias Cre) - tu vois on arrive au bout, et **Marc R.** (alias Choupinet, ou Frozen, ou Petit oréo sucré au choix). Je remercie également tous les amis, docs, post-docs et ATER avec qui j'ai passé de très bons moments en sorties/balades et en soirées au Vivians, aux Berthom's, aux Arrangés du Bocal..... : **Julio** et **Evelyne**, merci pour votre bonne humeur et les délicieux barbeu's à la Papo ; **Alice** ma Bichette ; **Justine** et **Nico S.**, merci pour vos

super soirées sur Nancy avec la playlist Sympa et promis je ne vous remettrai plus « Despacito » ; **Mumu**, ma gymnaste préférée ; **Quentin** rouquin malin ; **Fanny** ma Belle ; **Floriane**, ma copine Thermapolis on ira se voir un match de Hockey quand tu rentreras ; **Eva** et **Mégane** les copines stagiaires du bureau ; **Morgane(s)** ; **David** ; **Albin** ; **Olivier** (dès que j'aurai un peu de temps, j'irai écouter le brame d'un Cerfff en dégustant des « potirons » verts), **Laëtitia** ; **Elise** et **Pillip** (avec Ulysse et Pikachu) ; **Marine** et **Dan** ; **Nico A.** ; **Pierre** et **Hillary** ; **Maël** et **Fau** (vivement la prochaine soirée déguisée) ; **Héla**, **Jennifer**, **Carole B.**, **Vanessa**, **Vincent B.**, **Kevinou**, **Joey**, **Elisa**, **Emmanuel**, **Kafina**, **Maxime**, **Stéphane**, **Anna**, **Céline**, **Jonathan**, **Romain P.** et **Alex**, **Romain C.** merci à tous d'être entrés dans ma vie. Mention spéciale pour les autres compagnons sportifs du LIEC, **Christophe**, **Sandrine** et **Simon**, **Kevin**, **Nicolas G.**, **Florian** et **Val**. Je tiens également à remercier **Paule Vasseur**, **Laure G.**, **Davide** et **Eric**, qui ont toujours un petit mot gentil quand je les croise dans le couloir ou dès qu'ils passent au bureau. **Mickaël** et **Florence**, un grand merci à vous deux, votre gentillesse tombe toujours à point nommé. Un merci tout particulier à **Vincent F.**, pour avoir su m'écouter et me remonter le moral quand il était en berne, tes conseils avisés et ton soutien ont été un point d'appui pendant ma thèse, j'espère pouvoir te rendre la pareille.

Au cours de ces années, j'ai eu l'occasion d'encadrer des stagiaires qui ont été de formidables collègues et amis. Merci **Laure B.**, pour ta bonne humeur et ton enthousiasme durant ton stage de M2. Je n'oublierai jamais nos sorties prélèvements de bivalves, où nous nous sommes retrouvées en culotte, en train de nous changer le long de la Moselle, avec un lot d'avironneurs arrêtés à notre hauteur pour profiter du spectacle.... Epique... Merci à **Gaëtan**, toi le jeune padawan d'Andréina qui est désormais parti vers de nouveaux horizons. Merci également à **mes élèves** qui ont su me faire rire parfois, voire souvent, à leur insu.

Je tenais également à remercier mes ami(e)s extérieurs au monde scientifique qui m'ont permis de garder un ancrage dans le monde « normal ». Alors, un grand merci à mes amis de Lyon, mes MeLMs favoris (alias **Mathilde** et **Manu**) et aux loulous de Lille (alias **Ségo** et **Seb**). Promis, je passerai bientôt vous voir, et on pourra refaire des soirées ensemble, même si elles seront plus calmes qu'avant avec vos petites familles. Je n'oublie pas non plus les copains d'Alive. Merci à **Fabien M.**, pour les soirées danses du mardi. Merci également à tous mes collègues plongeurs du Club Aquasports Plongée (**Alain**, **Bruno**, **Stéphane**, **Guy**, **Cyrille**, **Totof**, ...) et de l'éconettoyage du Canal de Jouy (**Joël**, **René**, **Jacques**, ...).

Une petite dédicace au Marathon de Metz qui nous a joué un vilain tour quand on est en fin de rédaction à deux semaines du rendu, et qu'il vous empêche de sortir du centre-ville pour venir au boulot le week-end. Mais bon, après moult péripéties nous avons réussi à sortir de la souricière, n'est-ce pas Cre ?

Mes derniers remerciements, mais non les moindres, vont bien évidemment à ma famille, en particulier à mes parents, **Jean-Pierre** et **Annie**, sans qui cette aventure n'aurait jamais été possible et à ma Pitoute, **Estelle**. Merci de m'avoir permis de garder le cap, de m'avoir épaulée dans les moments difficiles et merci de m'avoir



*poussée à croire en moi. Un grand merci à toi **Dédée**, et à mes **grands-parents** qui m'ont toujours soutenue. Une pensée particulière pour toi **Mamie Trappeloup**, toi ma marraine, et pour toi **Bernard** qui est parti trop tôt, vous me manquez.*

*Enfin, pour terminer sur une note plus légère, un grand « pouiiiiic » à ma **Kiki**, merci pour ton soutien sifflant avec un vocabulaire varié. Même si je sais pertinemment que tu ne pourras jamais lire ces mots, je tenais tout de même à t'accorder une petite ligne pour te remercier de ton soutien quotidien.*





# Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	5
<i>Liste des tableaux</i> .....	17
<i>Liste des figures</i> .....	21
<i>Abréviations</i> .....	27
<i>Introduction générale</i> .....	1
<i>Partie 1 : Synthèse bibliographique</i> .....	7
<i>Chapitre 1 : Le Gadolinium</i> .....	9
1. Le Gadolinium dans la famille des « terres rares ».....	9
2. Production du Gadolinium .....	11
3. Nature et structure chimique du Gadolinium .....	12
4. Propriétés physico-chimiques et utilisations.....	13
5. Toxicité du Gadolinium et de ses dérivés .....	14
<i>Chapitre 2 : Les Agents de contraste à base de Gadolinium (AC-Gd)</i> .....	19
1. Définition des AC-Gd employés en IRM.....	19
2. Nature chimique .....	22
3. Paramètres de stabilité des agents de contraste .....	25
A. Stabilité thermodynamique .....	26
B. Stabilité cinétique .....	27
C. Transmétallation .....	29
4. Toxicité .....	32
A. Toxicité aigüe des AC-Gd .....	32
B. Une pathologie sévère : la fibrose systémique néphrogénique .....	33
C. Autres effets des AC-Gd .....	35
<i>Chapitre 3 : Voies de contamination du milieu aquatique par les AC-Gd après leur utilisation en IRM</i> .....	41
1. Excrétion des AC-Gd .....	41
2. Résidus dans les ampoules et seringues employées lors de l'injection du produit	42

<b>3. Les AC-Gd au cours du processus de retraitement des eaux usées .....</b>	<b>42</b>
A. Boues résiduaire de STEP .....	45
B. Eaux usées retraitées en STEP .....	47
<b>4. Présence des AC-Gd dans le milieu aquatique .....</b>	<b>47</b>
A. Les AC-Gd dans les effluents de STEP .....	48
B. Eaux de surface .....	49
C. Nappes phréatiques .....	50
D. Eau de boisson .....	51
<b>5. Conséquences de la présence des AC-Gd dans le milieu aquatique .....</b>	<b>52</b>
<b>Partie 2 : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre 1 : Mesures du Gd.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Choix des sites d'étude.....</b>	<b>57</b>
<b>2. Techniques et analyses du Gd .....</b>	<b>60</b>
A. Mesure des éléments métalliques par analyse ICP-MS .....	60
B. Détermination de l'anomalie en Gd .....	63
<b>3. Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau.....</b>	<b>67</b>
A. Analyses physico-chimiques effectuées sur le terrain .....	67
B. Analyses physico-chimiques au laboratoire .....	67
<b>4. Mesures du Gd dans les tissus des organismes exposés <i>in situ</i> ou en conditions contrôlées de laboratoire.....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre 2 : Organismes d'étude .....</b>	<b>71</b>
<b>1. Les microalgues unicellulaires vertes .....</b>	<b>71</b>
A. Organismes d'étude .....	71
A.1. L'algue verte unicellulaire <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	72
A.2. L'algue verte unicellulaire <i>Chlorella vulgaris</i> .....	73
B. Culture des algues en conditions contrôlées .....	73
<b>2. Un microcrustacé d'eau douce : <i>Daphnia magna</i> .....</b>	<b>74</b>
A. Organisme d'étude .....	75
B. Elevage de daphnies en conditions contrôlées .....	78
<b>3. Un vertébré aquatique : <i>Danio rerio</i> .....</b>	<b>79</b>
A. Organisme d'étude .....	79
B. Maintien des organismes .....	80
<b>4. Les bivalves filtreurs .....</b>	<b>82</b>

A. Organismes d'étude .....	82
A.1. <i>Corbicula fluminea</i> .....	82
A.2. <i>Dreissena rostriformis bugensis</i> .....	83
B. Maintien des organismes en microcosme .....	84
<b>5. La lignée cellulaire ZF4 .....</b>	<b>85</b>
A. Fibroblastes de <i>D. rerio</i> (cellules ZF4) .....	85
B. Culture .....	86
<b>Chapitre 3 : Présentation des tests utilisés .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Tests de toxicité et bioaccumulation réalisés <i>in vivo</i> par exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) .....</b>	<b>90</b>
A. Toxicité chronique du Gd sous forme d'AC-Gd (Gd-DOTA ; Dotarem®) ou de sel de Gadolinium (GdCl <sub>3</sub> ) chez les microalgues vertes unicellulaires .....	90
B. Toxicité chronique et bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez <i>Daphnia magna</i> .....	93
C. Toxicité et bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez <i>Danio rerio</i> .....	95
D. Toxicité chronique et bioaccumulation du Gd chez les bivalves filtreurs d'eau douce par exposition in situ et en conditions contrôlées de laboratoire au Gd-DOTA (Dotarem®). .....	96
D.1. Mode d'exposition des bivalves .....	96
D.2. Mesures d'accumulation du Gd dans les tissus des bivalves .....	97
D.3. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) chez les bivalves .....	98
<b>2. Tests de toxicité et de bioaccumulation réalisés <i>in vitro</i> .....</b>	<b>101</b>
A. Test de cytotoxicité au MTT en présence de la forme d'AC-Gd la plus stable : le Gd-DOTA (Dotarem®) .....	101
B. Tests de croissance cellulaire .....	102
B.1. Essai de toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) .....	102
B.2. Essai de toxicité des différentes parties composant le Gd-DOTA (Dotarem®) .....	102
C. Etude du cycle cellulaire après exposition aux différentes parties composant le Dotarem® .....	103
<b>Chapitre 4 : Traitement statistique .....</b>	<b>105</b>
<b>1. Mesures de Gd dans le milieu aquatique Lorrain .....</b>	<b>105</b>
<b>2. Tests de toxicité, d'écotoxicité et bioaccumulation .....</b>	<b>105</b>
A. Analyses statistiques employées pour les essais <i>in vivo</i> .....	105
B. Analyses statistiques employées pour les essais <i>in vitro</i> .....	107
<b>Partie 3 : Résultats .....</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre 1 : Mesures du Gadolinium à proximité des rejets de STEP et des zones de captage en eau potable. ....</b>	<b>111</b>
<b>1. Concentrations en REE totales .....</b>	<b>111</b>

<b>2. Calcul de l'Anomalie en Gd.....</b>	<b>115</b>
<b>3. Comparaison des périodes de basses et de hautes eaux.....</b>	<b>116</b>
A. Paramètres physico-chimiques _____	116
A.1. Paramètres liés à la géochimie des sites .....	117
A.2. Paramètres liés à l'anthropisation .....	120
B. Mesures en Gd géogénique et lien avec les paramètres physico-chimiques du milieu _____	124
C. Concentrations en Gd d'origine anthropique à proximité de nos sites d'étude _____	126
D. Contamination indicative de l'eau du robinet par du Gd d'origine anthropique _____	134
<b>4. Points clés/Conclusions .....</b>	<b>135</b>

***Chapitre 2 : Bioaccumulation du Gadolinium libre et sous formulation pharmaceutique chez les bivalves filtreurs d'eau douce – Ecotoxicité des AC-Gd .....*** 139

<b>1. Accumulation du Gd lors de l'exposition <i>in situ</i>.....</b>	<b>139</b>
A. Concentrations d'exposition au Gd total et d'origine anthropique _____	139
B. Accumulation du Gd total chez les bivalves _____	140
<b>2. Accumulation du Gd sous forme de Gd-DOTA .....</b>	<b>144</b>
A. Concentrations en Gd-DOTA dans le milieu artificiel _____	144
B. Accumulation spécifique du Gd-DOTA chez les bivalves _____	144
<b>3. Ecotoxicité du Gd-DOTA chez les bivalves filtreurs.....</b>	<b>147</b>
A. Variabilité individuelle des réponses des biomarqueurs chez les individus témoins _____	148
B. Toxicité du Gd-DOTA sur les branchies des bivalves _____	149
C. Toxicité du Gd-DOTA sur la glande digestive des bivalves _____	151
<b>4. Points clés/conclusions .....</b>	<b>153</b>

***Chapitre 3 : Effets directs et indirects du Gd-DOTA (Dotarem®) sur d'autres organismes aquatiques (microalgues – microcrustacés – poissons) .....*** 157

<b>1. Concentrations en Gd-DOTA dans les milieux artificiels .....</b>	<b>157</b>
<b>2. Accumulation du Gd-DOTA chez les organismes aquatiques (microalgues – microcrustacés – poissons).....</b>	<b>159</b>
A. Accumulation du Gd-DOTA chez les microalgues unicellulaires _____	159
B. Accumulation du Gd-DOTA chez <i>D. magna</i> _____	160
C. Accumulation du Gd-DOTA chez <i>D. rerio</i> _____	161
<b>3. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les microalgues vertes unicellulaires....</b>	<b>162</b>
<b>4. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) pour les microcrustacés d'eau douce.....</b>	<b>165</b>
<b>5. Points clés/conclusions .....</b>	<b>168</b>

<i>Chapitre 4 : Impact du Gd-DOTA (Dotarem®) sur la croissance d'une lignée cellulaire de poissons zèbres (ZF4 - ATCC 2050)</i> .....	171
1. Détermination de la cytotoxicité du Dotarem® pour les cellules ZF4.....	171
2. Effets à court terme de la formulation pharmaceutique du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les cellules ZF4.....	172
3. Cycle cellulaire et effets sur la croissance des cellules .....	175
4. Réversibilité des effets observés sur la croissance cellulaire .....	177
5. Points clés/conclusions .....	180
<i>Partie 4 : Discussion générale</i> .....	183
1. De la mesure des REE à l'estimation des concentrations en Gd d'origine anthropique au l'échelle régionale .....	186
2. Internalisation et bioaccumulation du Gd-DOTA dans les organismes dulçaquicoles .....	191
3. Toxicité du Gd-DOTA .....	198
<i>Conclusions et Perspectives</i> .....	207
<i>Références bibliographiques</i> .....	215
<i>Annexes</i> .....	239
<i>Annexe 1</i> .....	240
<i>Annexe 2</i> .....	241
<i>Annexe 3</i> .....	242
<i>Annexe 4</i> .....	243
<i>Annexe 5</i> .....	244
<i>Annexe 6</i> .....	245
Biomarqueurs mesurés dans les branchies des bivalves .....	245
Biomarqueurs mesurés dans les Glandes digestives des bivalves.....	247
<i>Communications scientifiques issues du travail de thèse</i> .....	249
<i>Publications scientifiques</i> .....	253





# Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Domaines d'application du Gadolinium.....	14
<b>Tableau 2</b> : Présentation des 9 agents de contraste gadolinés autorisés sur le marché européen avant mars 2017, selon l'EMA et leur relaxivité à 20 MHz .....	20
<b>Tableau 3</b> : Concentrations sanguines des agents de contraste gadolinés lors d'examens IRM.....	22
<b>Tableau 4</b> : Mesures des constantes $K_{\text{therm}}$ et $K_{\text{cond}}$ nécessaires au calcul de la stabilité thermodynamique des AC-Gd.....	27
<b>Tableau 5</b> : Présentation des temps de demi-vies de stabilité cinétique estimés à pH = 1,0 et 25°C pour chaque agent de contraste gadoliné.....	28
<b>Tableau 6</b> : DL <sub>50</sub> mesurées chez les rongeurs pour les 9 AC-Gd injectés par voie intraveineuse. ..	32
<b>Tableau 7</b> : Valeurs des concentrations inhibitrices médianes (CI <sub>50</sub> ) en agents de contraste à base de Gd mesurées dans la littérature pour les cellules épithéliales porcines (LLC-PK1), les cellules de gliome de rat (cellules C6) et dans une culture tissulaire d'hépatome de rat (HTC). .....	33
<b>Tableau 8</b> : Valeurs des concentrations observées sans effet (NOEC) et des concentrations induisant 50% d'inhibition du paramètre observé (CE <sub>50</sub> ) mesurées pour différents organismes dulçaquicoles .....	38
<b>Tableau 9</b> : Coefficients de partage des agents de contraste et comportement au niveau des boues de STEP.....	46
<b>Tableau 10</b> : Pourcentage d'AC-Gd par rapport au Gd total mesuré au niveau de différents sites en Allemagne .....	48
<b>Tableau 11</b> : Liste des sites choisis pour notre étude (stations d'épuration (STEP), zones de captage en eau potable (ZC) et sites à pollution multiple (PW)) .....	58
<b>Tableau 12</b> : Isotopes majoritaires des terres rares mesurés par ICP-MS. ....	60
<b>Tableau 13</b> : Valeurs de normalisation de la table de référence Upper Continental Crust employées pour les eaux continentales (en ng/L) .....	63
<b>Tableau 14</b> : Présentation des biomarqueurs analysés à partir des glandes digestives des bivalves avec l'automate Konelab®.....	100

<b>Tableau 15</b> : Moyennes des concentrations ( $\pm$ écart-types) en REE en ng/L et anomalies positives au Gd mesurées à proximité des rejets de STEP (S (en amont (U) et en aval (D)), des zones de captage en eau potable (C) et des sites de référence (non contaminé (R) et pollué (PW)) au cours de la période de hautes eaux (HW) et de la période de basses eaux (LW).....	112
<b>Tableau 16</b> : Valeurs des mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D)) en période de basses et de hautes eaux.....	118
<b>Tableau 17</b> : Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-types) en Bore (B), valeurs des paramètres physico-chimiques (demande chimique et biochimique en oxygène (DCO et DBO), mesure de la conductivité électrique (Cond) et concentrations en carbone organique total (TOC), en oxygène dissous (O <sub>2</sub> d), en sulfates SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> et en chlorures Cl <sup>-</sup> ) pour chaque échantillon. ....	122
<b>Tableau 18</b> : Valeurs des corrélations positives (Spearman, $\alpha = 0,05$ ) entre concentrations en cations métalliques et les concentrations en Gd d'origine géogéniques pour chaque échantillon présentant des variations entre l'amont et l'aval de la STEP mesurées en périodes de haute et de basses eaux. ....	126
<b>Tableau 19</b> : Variations des concentrations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées en aval des rejets des STEP de Metz (S6) et de Nancy (S11) de la Lorraine pendant 24h consécutives .....	128
<b>Tableau 20</b> : Variations des concentrations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées en aval des rejets des STEP de Metz (S6) et de Nancy (S11) de la Lorraine pendant 14 jours consécutifs.....	128
<b>Tableau 21</b> : Valeurs des corrélations (Spearman, $\alpha = 0,05$ ) entre les différents paramètres physico-chimiques et les concentrations en Gd d'origine anthropique pour chaque échantillon prélevé au cours des périodes de basses et de hautes eaux .....	132
<b>Tableau 22</b> : Valeurs d'anomalies positives en Gd et concentrations moyennes ( $\pm$ écarts-types) en Gd d'origine anthropique calculés pour les échantillons prélevés en eau du robinet.....	135
<b>Tableau 23</b> : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des facteurs de bioconcentration (BCF) et de bioaccumulation (BAF) en Gd total calculés pour les tissus des bivalves après 7 et 21 jours d'exposition en amont (-65 m) et en aval (+50 m ; + 200 m ; + 600 m) du rejet de STEP de Metz <i>in situ</i> (c.à.d. après 7 et 21 jours) .....	142

<b>Tableau 24</b> : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd mesurées pendant 7 et 21 jours dans les milieux d'exposition des bivalves au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées. ....	144
<b>Tableau 25</b> : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd-DOTA (ng(Gd)/g) mesurées dans les tissus des bivalves au cours de l'exposition des bivalves en conditions contrôlées de laboratoire (c.à.d. après 7 et 21 jours). Les valeurs en gras montrent l'accumulation du Gd entre 7 et 21 jours. ....	145
<b>Tableau 26</b> : Moyennes ( $\pm$ écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurées dans les branchies de <i>D. r. bugensis</i> après 0 et 21 jours d'exposition à 0 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®). ....	150
<b>Tableau 27</b> : Valeurs des VIP calculées pour les biomarqueurs de la glande digestive des bivalves exposés à 0, 1 et 10 $\mu$ g(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 7 jours. Les valeurs en gras sont significatives pour l'exposition à 10 $\mu$ g(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®). ....	152
<b>Tableau 28</b> : Concentrations en Gd (ng/L) mesurées dans les milieux d'exposition des microalgues et des microcrustacés exposés au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire. ....	157
<b>Tableau 29</b> : Valeurs moyennes ( $\pm$ écart type) des concentrations en Gd et des facteurs de bioconcentration mesurés après 14 jours d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). ....	161
<b>Tableau 30</b> : Tableau des p-values des comparaisons de la taille moyenne des daphnies exposées à l'AC-Gd par rapport à la taille moyenne des individus témoins en fonction de chaque condition d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). ....	166
<b>Tableau 31</b> : Tableau récapitulatif des facteurs de bioconcentration (BCF) et de bioaccumulation (BAF) du Gd-DOTA calculés pour chaque organisme dulçaquicole internalisant l'AC-Gd en fonction des conditions d'exposition. ....	193
<b>Tableau 32</b> : Tableau de l'évaluation du risque du Gd-DOTA (Dotarem®) sur la base des concentrations prédies sans effet (PNEC) obtenues à partir des NOECs et des concentrations en Gd d'origine anthropique mesurées au cours des périodes de hautes et basses eaux en 2015. ....	203



# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Localisation des sites miniers sources de REE dans le monde. ....	10
<b>Figure 2</b> : Diagramme simplifié de la méthode d'extraction du Gd à partir d'un minage à ciel ouvert (ex: Mountain Pass, USA).....	11
<b>Figure 3</b> : Structures métallique (A) et atomique (B) du Gadolinium .....	12
<b>Figure 4</b> : Structure du [Gd(DTTA–Me)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].....	24
<b>Figure 5</b> : Structures des AC-Gd macromoléculaires Vistarem® (P792 - Gadomelitol) et Gadomer® (Gadomer-17) .....	24
<b>Figure 6</b> : Exemple de transmétallation de l'ion Gd dans un milieu contenant : l'AC-Gd, des ions métalliques endogènes (M) et d'autres éléments (A) pouvant se lier à l'ion Gd <sup>3+</sup> libre en solution. ....	30
<b>Figure 7</b> : Principaux sites de distribution et voies d'excrétion des complexes gadolinés administrés par voie intraveineuse.....	41
<b>Figure 8</b> : Représentation graphique du calcul d'anomalie en Gadolinium sur un échantillon d'eau déminéralisée enrichie en Dotarem®. ....	44
<b>Figure 9</b> : Diagramme schématique du fonctionnement interne d'une station dépurative.....	45
<b>Figure 10</b> : Carte des points de prélèvement en Lorraine .....	57
<b>Figure 11</b> : Schéma explicatif du fonctionnement de l'ICP-MS .....	62
<b>Figure 12</b> : Schéma montrant la comparaison des méthodes de calcul de l'anomalie en Gd.....	65
<b>Figure 13</b> : Exemple de la dérive de surestimation du Gd d'origine anthropique avec les deux méthodes de calcul pour une anomalie en Gd théorique croissante à la concentration mesurée de 298 ng(Gd)/L. ....	66
<b>Figure 14</b> : Schéma récapitulatif de la préparation des organismes et du milieu d'exposition pour le dosage du Gd par ICP-MS .....	69
<b>Figure 15</b> : <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	72
<b>Figure 16</b> : <i>Chlorella vulgaris</i> .....	73
<b>Figure 17</b> : Schéma de l'entretien de la culture des microalgues vertes d'eau douce en conditions contrôlées .....	74

<b>Figure 18</b> : <i>Daphnia magna</i> .....	75
<b>Figure 19</b> : Schéma du cycle de reproduction chez <i>D. magna</i> .....	77
<b>Figure 20</b> : Schéma de la procédure d'élevage de <i>D. magna</i> réalisée trois fois par semaine.....	78
<b>Figure 21</b> : Dimorphisme sexuel chez <i>Danio rerio</i> .....	79
<b>Figure 22</b> : Présentation de la partie de l'animalerie destinée au maintien des poissons zèbres.....	81
<b>Figure 23</b> : <i>Corbicula fluminea</i> .....	82
<b>Figure 24</b> : <i>Dreissena rostriformis bugensis</i> .....	83
<b>Figure 25</b> : Photo des dispositifs de maintien en milieu artificiel des bivalves en conditions contrôlées de laboratoire. A gauche <i>C. fluminea</i> maintenues en cristalliseur de 2L avec un fond en billes de verre ; A droite <i>D. r. bugensis</i> maintenues en cristalliseur de 2L fixées sur une plaque en céramique .....	84
<b>Figure 26</b> : Cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) de <i>Danio rerio</i> à confluence observée au microscope à contraste de phase .....	85
<b>Figure 27</b> : Schéma de la méthode de repiquage des cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) à confluence .....	86
<b>Figure 28</b> : Cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) en cours de décrochage suite à leur trypsination .....	87
<b>Figure 29</b> : Diagramme de synthèse des tests de toxicité et de bioaccumulation .....	89
<b>Figure 30</b> : Protocole d'essai standardisé de la croissance de <i>P. subcapitata</i> exposée au Gd-DOTA (Dotarem®) et au GdCl <sub>3</sub> .....	91
<b>Figure 31</b> : Protocole d'exposition des microalgues unicellulaires vertes aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®).....	91
<b>Figure 32</b> : Schéma de l'acidification et de la minéralisation des différentes fractions afin de mesurer les concentrations en AC-Gd par ICP-MS .....	92
<b>Figure 33</b> : Schéma de la mise en place du test de toxicité chronique des AC-Gd chez <i>D. magna</i> .	93
<b>Figure 34</b> : Diagramme expérimental du test de toxicité et de bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) par prélèvement hebdomadaire de daphnies exposées à cet AC-Gd.....	94
<b>Figure 35</b> : Diagramme expérimental des <i>D. rerio</i> prélevés pour mesurer la bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®).....	95

<b>Figure 36</b> : Exposition des bivalves <i>in situ</i> le long d'une section de la Moselle .....	96
<b>Figure 37</b> : Schéma du test de toxicité et de bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez les bivalves filtreurs d'eau douce. ....	97
<b>Figure 38</b> : Test de cytotoxicité des cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050 <sup>TM</sup> ) exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) .....	101
<b>Figure 39</b> : Exemple de profils de REE calculés pour le site de référence (R) et trois sites localisés en aval des rejets de STEP (Sx-D) .....	115
<b>Figure 40</b> : Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-types) des ions métalliques (Fe, Al, Cr, Pb et Cu) en $\mu\text{g/L}$ mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D))). .....	119
<b>Figure 41</b> : Valeurs de TAC (mEq) mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D))) en période de basses et de hautes eaux. ....	120
<b>Figure 42</b> : Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-types) en Gd d'origine naturelle en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D))). ....	125
<b>Figure 43</b> : Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-types) en Gd d'origine anthropique en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D))). ....	127
<b>Figure 44</b> : Exemple de variations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées à 100 m en aval du rejet de S6 au cours de la période de basses eaux. ....	129
<b>Figure 45</b> : Exemple de variations sur les concentrations élevées en Gd <sub>anth</sub> en milliers de ng/L mesurées à 100 m en aval du rejet de S11 au cours de la période de basses eaux. ....	129
<b>Figure 46</b> : Concentrations moyennes ( $\pm$ écart-types) en Gd d'origine anthropique en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des zones de captage en eau potable (C) et des sites considérés comme pollués (PW)) .....	130
<b>Figure 47</b> : Séparation des sites en fonction des paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque échantillon et des concentrations moyennes en Gd d'origine anthropique pour la période de basses eaux (a) et la période de hautes eaux (b). ....	131
<b>Figure 48</b> : Séparation géographique résultant des analyses en composantes principales réalisées en fonction des paramètres physico-chimiques et des concentrations en Gd d'origine anthropique	



mesurés pour chaque échantillon prélevé au cours des périodes de basses et de hautes eaux. .....	133
<b>Figure 49</b> : Concentrations en Gd total (a) et anthropique (b) mesurées en amont (- 65 m) et en aval (+ 400 m) du rejet de STEP de Metz au cours de l'exposition des bivalves <i>in situ</i> (c.à.d. pendant 7 et 21 jours).....	140
<b>Figure 50</b> : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd total mesurées dans les tissus des bivalves en amont et en aval de la STEP de Metz au cours de l'exposition de bivalves <i>in situ</i> (c.à.d. après 7 et 21 jours) .....	141
<b>Figure 51</b> : PCA globales montrant un exemple graphique des différences d'expression des biomarqueurs dans les branchies et la glande digestive des deux espèces de bivalves exposées à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 21 jours.....	148
<b>Figure 52</b> : Projection graphique (a) et cercle des corrélations et (b) de la PLS-DA des biomarqueurs étudiés chez <i>D. r. bugensis</i> exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) après 0 jours (Témoins) et 21 jours d'exposition à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L.....	151
<b>Figure 53</b> : Concentrations en Gd (mg/L) mesurées dans les milieux d'exposition des poissons exposés ou non au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire .....	159
<b>Figure 54</b> : Concentrations moyennes en Gd ( $\mu$ g/g de poids sec) et BCF respectifs mesurés dans les tissus des daphnies exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire pendant 7 et 14 jours via le milieu d'exposition à 26 ng(Gd)/L ou à la nourriture contaminée à la plus faible concentration de culture en Gd-DOTA (200 ng(Gd)/L). Les étoiles montrent une accumulation significative du Gd dans les tissus ( $\alpha = 0,05$ ).....	160
<b>Figure 55</b> : Courbes de la relation dose-réponse de la fluorescence algale de <i>P. subcapitata</i> en fonction de la concentration d'exposition au GdCl <sub>3</sub> et au Gd-DOTA (Dotarem®) en mg(Gd)/L calculées à l'aide de la macro Excel REGTOX. ....	162
<b>Figure 56</b> : Exemples de courbes de croissance des microalgues unicellulaires vertes exposées à différentes concentrations en Gd (Gd-DOTA - Dotarem®) d'ordre environnemental.....	163
<b>Figure 57</b> : Représentations graphique de la taille relative moyenne et de la granularité relative moyenne des cellules algales au cours des 6 jours d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) 164	
<b>Figure 59 a</b> : Pourcentage de mortalité de <i>D. magna</i> mesurée pendant 42 jours en fonction de leur mode d'exposition aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®). ....	167

<b>Figure 59 b</b> : Nombre de juvéniles pondus par femelle adulte <i>D. magna</i> pendant 42 jours en fonction de leur mode d'exposition aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®). .....	167
<b>Figure 60</b> : Croissance des cellules ZF4 cultivées en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) sans renouvellement de milieu pendant 6 jours. ....	172
<b>Figure 61</b> : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 3 et 6 jours en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) sans renouvellement de milieu ou avec renouvellement de milieu après 3 jours d'exposition avec du milieu enrichi en Gd-DOTA (Dotarem®). ....	173
<b>Figure 62</b> : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 6 jours en présence des différentes molécules à des concentrations équivalentes à celles du Dotarem® (à 0,125 nM et 63,59 nM). .....	174
<b>Figure 63</b> : Analyse du cycle cellulaire des cellules ZF4 (BD FACS Calibur™ – Biosciences) après exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 5 et 7 jours à 63,59 nM et pourcentage moyen ( $\pm$ écart type) des différentes phases du cycle entre les différentes phases du cycle cellulaire. .....	176
<b>Figure 64</b> : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 9 jours en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) (63.59 nM) sans renouvellement ou avec renouvellement de milieu après 5 jours d'exposition. ....	178
<b>Figure 65</b> : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 5 semaines en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) (63.59 nM) sans renouvellement de milieu. Au 21 <sup>e</sup> jour, une partie des cellules jusqu'alors exposées à l'AC-Gd ont été de nouveau cultivées dans du milieu non contaminé. .....	179
<b>Figure 66</b> : Représentation graphique des concentrations en REE totales mesurées dans les échantillons d'eau prélevés au cours des trois périodes d'échantillonnage en région Lorraine .....	188
<b>Figure 67</b> : Image de <i>D. magna</i> exposée pendant 19 heures à 100 mg(Gd)/L de Gd-DTPA (a) et profil d'intensité du Gd obtenu par LA-ICP-MS dans l'organisme (b). ....	196
<b>Figure 68</b> : Exemples d'interactions impliquant des allo-chimiques (composés allélopathiques et toxines) produits par des microalgues d'eau douces. ....	200
<b>Figure 69</b> : Procédure d'évaluation du risque par rapport au ration entre la concentration prédite sans effet et les concentrations environnementales mesurées ..... .....	202



# Abréviations

---

## **A**

**AC-Gd** : Agents de Contraste à base de Gadolinium

**ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

**ACP** : Phosphatases acides

**Al** : Aluminium

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

**ANOVA** : Analyses de variance

**ATCC** : « *American type culture collection* »

**ATPases** : Adénosine Triphosphatase

## **B**

**B** : Bore

**BAF** : Facteur de bioaccumulation

**BCF** : Facteur de bioconcentration

## **C**

**C** : Zone de captage en eau potable

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium divalent

**CAT** : CATalase

**CCR** : Chambre de Collision/Réaction

**CDNB** : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene

**Ce** : Cérium

**CE<sub>50</sub>** : Concentration Efficace médiane

**CI<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice à 50% de la croissance des cellules

**Cl** : Chlorures

**Cl** : Chlore

**Cond** : Conductivité

**Cr** : Chrome

**Cu** : Cuivre

## **D**

**DASRI** : Déchets d'Activités des Soins à Risques

**DBO** : Demande Biochimique en Oxygène

**DCO** : Demande Chimique en Oxygène

**DG** : Glande digestive

**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale médiane

**DMSO** : Dimethyl sulfoxide

**DOTA** : Acide tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique

**DREAL** : Direction régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

**DTPA** : Acide Diéthylène Triamine PentaAcétique

**Dy** : Dysprosium

## ***E***

**EDTA** : Éthylène Diamine Tétracétique

**EH** : Equivalent Habitants

**EMA** : « *European Medicines Agency* »

**Er** : Erbium

**ETS** : Système de Transport des Electrons de la mitochondrie

**Eu** : Europium

## ***F***

**FDA** : « *Food and Drug Administration* »

**Fe<sup>3+</sup>** : Fer trivalent

**FSC** : taille relative des cellules

**FSN** : Fibrose Systémique Néphrogénique

## ***G***

**G** : Branchies

**Ga** : Gallium

**Gd** : Gadolinium

**Gd\*** : Anomalie en Gadolinium

**Gd\*<sub>seuil</sub>** : Seuil d'anomalie en Gd

**Gd<sub>anth</sub>** : Gadolinium d'origine anthropique

**Gd<sub>geo</sub>** : Gadolinium d'origine géogénique

**GdL** : Complexes de Gadolinium

**Gd<sub>mes</sub>** : Gadolinium mesuré

**Gd<sub>natN</sub>** : Gadolinium naturel normalisé

**GdCl<sub>3</sub>** : Chlorure de Gadolinium

**GST** : Glutathion-S-Transférase

**GPx** : Glutathion Peroxydase

## ***H***

**H** : 1<sup>ère</sup> période de hautes eaux

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HCl** : Acide chlorhydrique

**Ho** : Holmium

**HW** : 2<sup>nde</sup> période de hautes eaux

## ***I***

**IBR** : « *Integrated Biomarker Response* »

**ICP-MS** : Spectrométrie de Masse avec Plasma à Couplage Inductif

**INSEE** : Institut National d'Etudes Statistiques et Economiques

**IRM** : Imagerie à Résonance Magnétique

**IV** : Intraveineuse

## ***K***

**K<sub>bw</sub>** : Coefficient de partage butanol/eau

**K<sub>cond</sub>** : Constante conditionnelle de stabilité

**KH** : Dureté totale

**K<sub>ow</sub>** : Coefficient de partage octanol/eau  
**K<sub>p</sub>** : Coefficient de distribution entre les boues résiduaires et l'eau  
**K<sub>therm</sub>** : Constante thermodynamique de stabilité  
**KW** : Test de Kruskal-Wallis

## **L**

**L** : Ligand libre  
**L<sub>T</sub>** : Ligand libre total  
**La** : Lanthane  
**LC** : Milieu Lefèvre-Czarda  
**LDH** : Lactate Déshydrogénase  
**LHN** : Laboratoire d'Hydrologie de Nancy  
**Ln<sup>3+</sup>** : Lanthanides  
**LOOH** : Hydroperoxydes Lipidiques  
**Lu** : Lutétium  
**LW** : Période de basses eaux

## **M**

**M** : Métal compétiteur  
**MANOVA** : « *Multivariate analyse of Variance* »  
**Mdr** : « *Multi drug resistance* »  
**MEC** : Concentrations mesurées dans l'environnement  
**MTT** : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium  
**MXR** : « *Multi Xenobiotic Resistance* »

## **N**

**NAD** ou **NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
**NASC** : « *Nord American Shale Composition* »  
**Nd** : Néodyme  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : Nitrates  
**NOEC** : Concentration sans effet observé

## **O**

**O<sub>2d</sub>** : Concentration en oxygène dissous

## **P**

**PAAS** : « *Post Archean Australian Shale* »  
**Pb** : Plomb  
**PB** : Concentration en protéines issues du Broyat  
**PBS** : Tampon phosphate salin  
**PCA** : Analyse en composante principale  
**PCB** : Polychlorobiphényle  
**PFC** : Concentration en protéines issues de la Fraction Cytosolique  
**PLS-DA** : « *Partial Last Square – Discriminant Analyse* »  
**Pm** : Prométhium  
**PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Phosphates  
**PNEC** : Concentration prédite sans effet

**Pr** : Praséodyme  
**PRAC** : Comité pour l'Évaluation des Risques en matière de Pharmacovigilance  
**Prot** : Protéines  
**PTFE** : Polytétrafluoroéthylène  
**PVDF** : PolyFluorure de VinyliDène  
**PW** : Sites à pollution multiple

## **Q**

**QR** : Quotient de risque

## **R**

**R** : Site de Référence  
**REE** : Terres rares  
**∑REE** : Concentration en REE totale  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

## **S**

**Sm** : Samarium  
**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Sulfates  
**STEP** : STation d'EPpuration des eaux usées  
**SVF** : Sérum de Veau Fœtal  
**Sr<sup>2+</sup>** : Strontium divalent  
**SSC** : Granularité relative des cellules  
**Sx-U** : Site en amont proche du rejet de la station d'épuration x  
**Sx-D** : Site en aval proche du rejet de la station d'épuration x

## **T**

**TAC** : Titrage Alcalimétrique Complet  
**Tb** : Terbium  
**TBH** : Tert-Butyl Hydroperoxyde  
**TC** : Carbone total  
**Teq** : Trolox équivalent  
**TG** : TriGlycérides  
**TIC** : Carbone Inorganique Total  
**Tm** : Thulium  
**ToAC** : Capacité Antioxydante Totale  
**TOC** : Carbone Organique Total

## **U**

**UCC** : « *Upper Continental Crust* »  
**UIOM** : Usine d'Incinération des Ordures Ménagères  
**UV** : UltraViolet

## **V**

**VIP** : « *Variable Importance in the Projection* »

## ***Y***

**Y** : Yttrium

**Yb** : Ytterbium

## ***Z***

**Zn<sup>2+</sup>** : Zinc divalent





# **Introduction générale**

---



Le développement des techniques d'IRM intègre depuis près de 25 ans l'utilisation d'agents de contraste contenant du Gadolinium (AC-Gd). Le Gadolinium est un élément métallique appartenant à la famille des terres rares. Il est employé en raison de ses propriétés paramagnétiques, mais est extrêmement toxique pour les organismes vivants, en particulier pour l'Homme, lorsqu'il se trouve à l'état libre (Amet et Deray, 2012 ; Courant, 2011 ; Evans, 2013 ; Feyrabend et al., 2010 ; Fretellier, 2013 ; Lansman, 1990 ; Wang, 1997). Son introduction dans une molécule, qui joue un rôle de chélateur (comme c'est le cas pour la partie organique des AC-Gd), permet de conserver les propriétés paramagnétiques du Gadolinium tout en masquant sa toxicité. Il peut donc être injecté à un patient par voie intraveineuse sous cette forme d' AC-Gd (Aime et Caravan, 2009). L'injection est réalisée juste avant l'examen médical, et ces composés sont ensuite éliminés par voie rénale puis par voie urinaire dans un délai court de quelques heures (Ersoy et Rybicki, 2007). Cette pratique médicale répandue à travers le monde, représente une utilisation entre 22 et 66 tonnes de Gadolinium par an (Kulaksız et Bau, 2011<sup>9</sup>). Par conséquent, dans de nombreux milieux aquatiques, on observe aujourd'hui des concentrations anormalement élevées en Gadolinium (phénomène appelé « anomalie en gadolinium ») d'origine anthropique. Ainsi, cet élément se trouve de façon accrue, présent sous forme soluble, dans les eaux de rivières, les nappes phréatiques et parfois même dans l'eau du robinet (Bau et al., 2006 ; Elbaz-Poulichet et al., 2002 ; Kulaksız et Bau, 2007 ; Lawrence et al., 2009 ; Rabiet, 2006 ; Rabiet et al., 2009 ; Verplanck et al., 2010).

La prise de conscience de l'ampleur des rejets d'AC-Gd et l'absence de connaissance concernant leurs effets environnementaux après avoir été rejetés dans les masses d'eaux conduit actuellement au développement d'études concernant leurs impacts environnementaux sur les organismes aquatiques vivants dans ces milieux. Le travail mené au cours de cette thèse s'inscrit dans cette approche.

En région Lorraine, les installations IRM sont en constante augmentation afin de pouvoir répondre plus rapidement aux besoins croissants de la population. Nous nous sommes focalisés sur cette région afin de déterminer les concentrations les plus élevées en Gd d'origine anthropique susceptibles d'être rencontrées dans les milieux aquatiques. Pour ce faire nous avons majoritairement travaillé sur des sites localisés à proximité de rejets de stations d'épuration des eaux urbaines. Nous avons également étudié les effets des AC-Gd sur différents organismes vivants dans ces milieux (algues, microcrustacés, poissons et bivalves). Les approches ont principalement été menées en utilisant l'AC-Gd le plus utilisé et donc

rejeté sur le territoire français à savoir, le Gd-DOTA commercialisé sous le nom de Dotarem®. Ces effets ont été évalués par des mesures de bioaccumulation, de survie, de croissance et de reproduction au niveau individuel. Des réponses biochimiques ont été mesurées par une analyse multi-biomarqueurs au niveau organisationnel. Afin d'appréhender les éventuels impacts à l'échelle cellulaire, les effets du Gd-DOTA ont été évalués sur la croissance cellulaire de fibroblastes de poissons.

La première partie de ce document situe le sujet sur la base des connaissances actuelles dans la littérature. La toxicité connue du Gadolinium et celle liée aux AC-Gd est détaillée et une synthèse des connaissances concernant les voies de contamination des différents compartiments du milieu aquatique par les AC-Gd est présentée.

La seconde partie présente le matériel et les méthodes employés pour répondre à la nécessité d'approfondir nos connaissances sur la présence et les effets des AC-Gd dans le milieu aquatique. Cette partie décrit avec précision les essais d'écotoxicité qui ont été réalisés. D'une part, pour les approches *in vivo* qui ont été mises en place sur divers organismes modèles en conditions contrôlées de laboratoire (*Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*, *Corbicula fluminea* et *Dreissena rostriformis bugensis*) et d'autre part, concernant les expérimentations *in situ* effectuées sur des bivalves dulçaquicoles (*Corbicula fluminea* et *Dreissena rostriformis bugensis*). Enfin, les travaux menés *in vitro* sur la lignée cellulaire de fibroblastes de *D. rerio* (cellules ZF4 – ATCC 2050) sont présentés.

La troisième partie est consacrée aux principaux résultats de nos travaux. Nous montrerons la présence de Gd anthropique, supposée principalement sous la forme d'AC-Gd, à proximité de nos sites d'étude et les effets d'une exposition au Gd-DOTA sur les différents organismes seront décrits.

Enfin, une discussion générale des principaux résultats obtenus est présentée dans la quatrième partie de ce document, afin de tenter de conclure sur le risque que représentent les rejets d'AC-Gd dans le milieu aquatique. Cette discussion sera suivie d'une conclusion ouvrant sur des perspectives à ces travaux.





## **Partie 1 : Synthèse bibliographique**

---



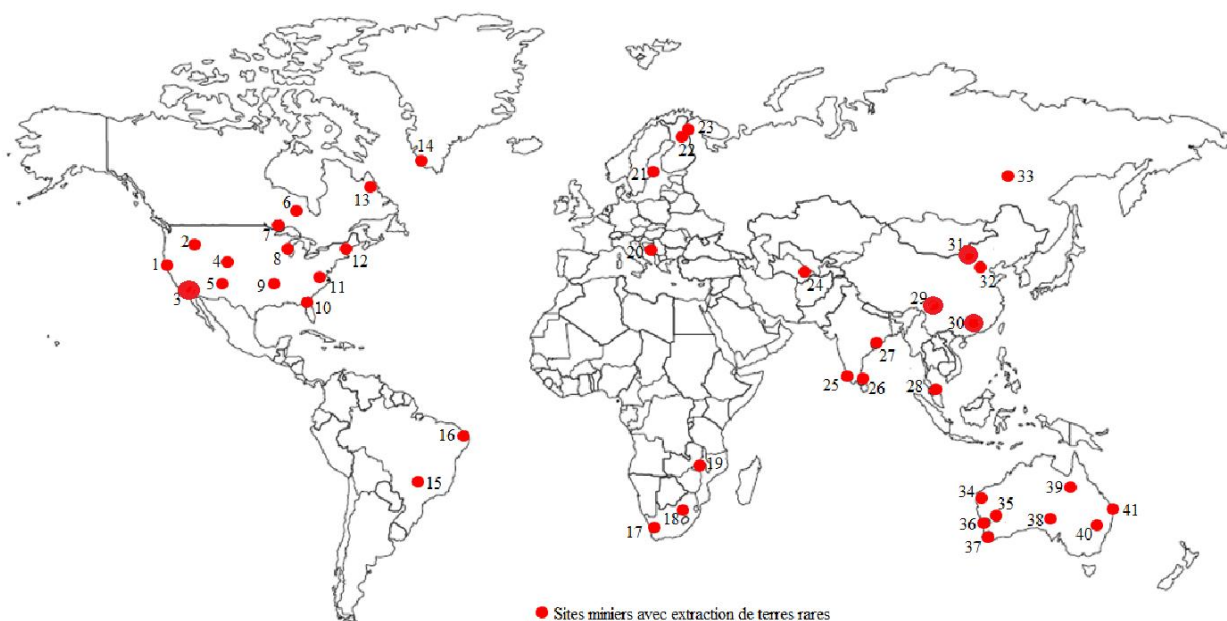


## Chapitre 1 : Le Gadolinium

### 1. Le Gadolinium dans la famille des « terres rares »

Le Gadolinium ( $Z=64$ ) appartient à la famille des « terres rares » (« *Rare Earth Elements* »; REE) qui regroupe un ensemble d'éléments métalliques comprenant le Scandium, l'Yttrium et les 15 éléments de la famille des lanthanides (du Lanthane (La) au Lutécium (Lu)). Ces REE ont été identifiées pour la première fois en Suède (1794) par un chimiste finlandais, Johan Gadolin, sous la forme d'un mélange d'oxydes appelé Ytterbia. Ce n'est que quelques années plus tard, en 1880, que le Gadolinium (Gd) fut isolé de ce mélange par le minéralogiste suisse Jean-Charles Gallissard de Marignac. Cependant, le nom de « Gadolinium » n'a été proposé qu'en 1886 par le chimiste français Paul-Emile Lecoq de Boisbaudran. La classification de cette famille d'éléments dans le tableau périodique de Mendeleïev est récente, ce n'est qu'à partir des années 1930 que les REE ont été nommées ainsi. Elles sont présentes au sein de nombreux types de roches en tant qu'éléments traces métalliques (Grawunder et Merten, 2012). Contrairement à leur nom, les terres rares sont retrouvées en abondance dans le manteau de la croûte terrestre (Taylor et McLennan, 1985). Les différentes roches composant la croûte terrestre contiennent des concentrations en REE spécifiques qui leur confèrent une signature particulière. Ainsi, les proportions en REE spécifiques de chaque roche permettent de déterminer par la suite l'origine des eaux provenant des nappes phréatiques en contact avec ces roches. Les REE se retrouvent naturellement dans le milieu aquatique par infiltration et les proportions en REE dans les roches sont conservées dans le milieu aquatique (Johannesson et al., 2000).

Le Gd et les autres REE sont des éléments métalliques de plus en plus utilisés afin d'améliorer les techniques en sciences et en industrie, c'est pourquoi les techniques d'extraction et d'analyses de ces métaux ont fortement évoluées qualitativement et quantitativement au cours du 19<sup>e</sup> siècle, et continuent d'être améliorées. Le Gd est toujours extrait à partir d'un mélange de REE et les processus d'extraction varient en fonction du minerai de départ : soit par extraction de la terre sèche, soit par des techniques de dragage de minerais acides. Ces mélanges de REE sont donc extraits de la croûte terrestre sous forme de minerais exploités partout à travers le monde (Figure 1).



N°	Localisation	Type de dépôt	N°	Localisation	Type de dépôt
1	Eagle Mountain, USA	Oxyde de Fer Cuivre-Or	22	Massif Khibina, Russie	Roches éruptives peralcaline
2	Lemhi Pass et Southeast Idaho, USA	Roches éruptives peralcalines et Résidus de phosphates stratiformes	23	Lovozero, Russie	Loparite dans un complexe peralcalin
3	Mountain Pass et Music Valley, USA	Carbonatites	24	Aktyus, Kirgystan	Dépôt polymétallique
4	Climax ; Mount Antero et South Platte, USA	Molybdène porphyrique et pegmatites	25	Chavara, Inde	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
5	Gallinas Mountains, USA	Carbonatites	26	Nord Sri-Lanka	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
6	Five Mile, Canada	Pegmatites	27	Orissa, Inde	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
7	Elliot Lake, Canada	Conglomérat uranifère	28	Perak, Malaisie	Sous-produits de Xénotime, Gisement alluvial d'étain
8	Complex Wasau, USA	Pegmatites	29	Maoniuping, Chine	Veine de Bastansite-barite
9	Magnet Cove, USA	Carbonatites	30	Xunwu et Longnan, Chine	Argile lateritique
10	Green Cove Springs, USA	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial	31	Bayan Obo, Chine	Dépôt de Fe-Terres rares et Nb
11	Spruce Pine, USA	Pegmatites	32	Weishan, Chine	Veine de Bastansite-barite
12	Topsham, USA	Pegmatites	33	Aldan, Russie	Pegmatites
13	Strange Lake, Canada	Complexes alcalin	34	Brockman, Australie	Roches éruptives peralcaline
14	Motzfeldt, Groenland	Roches éruptives peralcaline	35	Mont Weld, Australie	Carbonatite lateritizée
15	Poços de Caldas, Brésil	Complexe alcalin	36	Eneabba et Cooljarloo, Australie	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
16	Camaratuba, Brésil	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier	37	Capel et Yoganup, Australie	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
17	Steenkampskraal, Afrique du Sud	Veine d'apatite Monazite	38	Olympic Dam, Australie	Oxyde de Fer Cuivre-Or
18	Witwatersrand, Afrique du Sud	Paleo-gisement alluvial	39	Mary Kathleen, Australie	Métamorphique
19	Kangakunde Hill, Malawi	Carbonatites	40	Dubbo, Australie	Complexe alcalin altéré
20	Monténégro	Résidus de phosphates stratiformes	41	North Stradboke Island, Australie	Sous-produits de Monazite, Gisement alluvial côtier
21	Ytterby, Suède	Pegmatites			

Figure 1 : Localisation des sites miniers sources de REE dans le monde.  
 Inspiré de Castor et Hedrick (2006) ; Les principaux sites miniers sont représentés par les plus gros points.

Le Gd a tout d'abord été produit en petites quantités à partir de dépôts de Pegmatite sous forme d'un mélange de terres rares non dissociées les unes des autres. En termes de quantité, le Gd provient seulement d'une vingtaine de mélanges de minéraux allant de la Bastnasite à la Chéralite. Les dépôts de Bastnasite en Chine et aux Etats-Unis constituent la plus grosse part des ressources économiques de l'extraction du Gd et les dépôts de Monazite en constituent la deuxième part (Gambogi, 2015). Dès la seconde moitié du 19<sup>e</sup> siècle, le Gd a également été extrait à partir de dépôts alluvionnaires mais toujours sous la forme d'un mélange d'oxydes de terres rares. Ce n'est qu'à partir des années 1940 que ces éléments métalliques sont devenus disponibles individuellement.

## 2. Production du Gadolinium

Le Gadolinium est extrait puis séparé des autres REE selon différentes méthodes.

Aux Etats-Unis, en Russie et en Chine, le minerai à ciel ouvert est foré, dynamité puis broyé et soumis à la flottation afin de produire un concentré duquel on peut extraire l'oxyde de Gd par une extraction liquide-liquide avec ajout de solvant (Castor et Hedrick, 2006) (Figure 2).

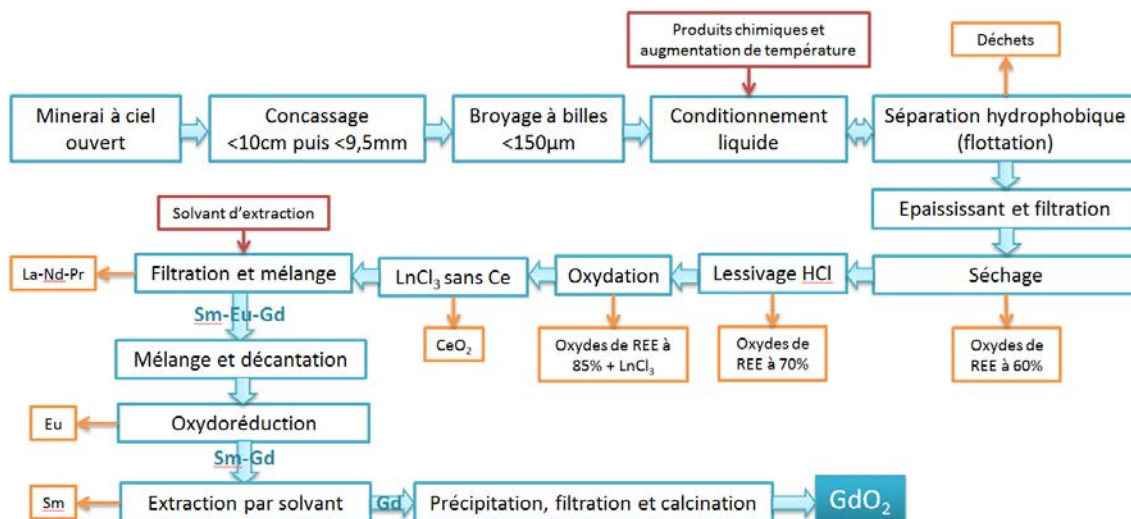


Figure 2 : Diagramme simplifié de la méthode d'extraction du Gd à partir d'un minerai à ciel ouvert (ex: Mountain Pass, USA)

Au Brésil, en Inde, en Australie et en Afrique du Sud, le minerai est récupéré à partir de dépôts de sables minéraux lourds (densité > 2,9), par exemple sous la forme de sous-produit du Zircon, du Titane ou de l'Etain. Ces sables sont récupérés par des méthodes de **placers**<sup>a</sup> non consolidés. Beaucoup de ces dépôts sont extraits par dragage séparant les sables minéraux lourds de la fraction plus légère par gravité à l'aide d'un broyeur humide. On obtient alors des dépôts de sable consolidés ou partiellement consolidés qui sont ensuite broyés à sec puis traités par les mêmes techniques de dépistage électrostatiques, électromagnétiques, magnétiques et gravimétriques employées sur un concentré de Bastnasite duquel on peut extraire l'oxyde de Gd par une extraction liquide-liquide avec ajout de solvant.

L'oxyde de Gd obtenu par ces méthodes d'extraction est ensuite transformé en Gd métallique par fusion sous vide à 1800°C. La température de fusion sous vide nécessite une étape de distillation afin d'éliminer les impuretés du creuset dans lequel l'oxyde a été fondu.

<sup>a</sup> **Placers** = langues de sables au-dessous du niveau de la mer

### 3. Nature et structure chimique du Gadolinium

Le Gd est retrouvé à une abondance de 6,5 mg/kg dans la croûte terrestre (Bonnet, 2006). Une fois extrait sous forme de métal blanc argenté (Figure 3), il est relativement stable à sec, mais dans un environnement humide un revêtement d'oxyde se forme à sa surface. Ce métal présente une structure cristalline hexagonale à température ambiante (Figure 3).

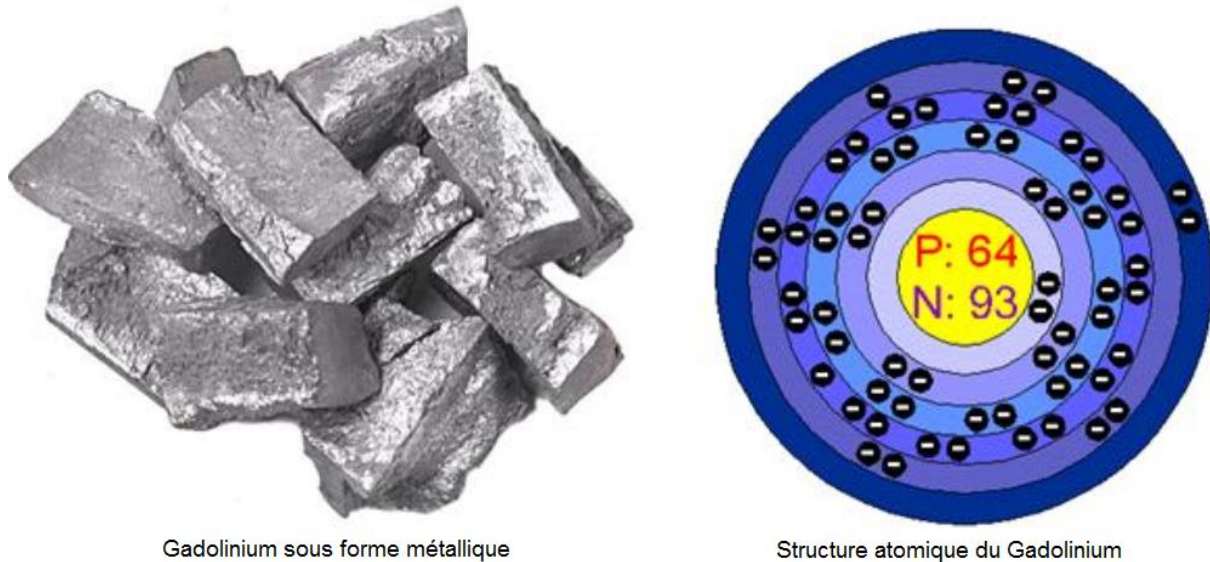


Figure 3 : Structures métallique (A) et atomique (B) du Gadolinium  
(Source : <http://www.chemicalelements.com/elements/gd.html>)

Sur les 17 isotopes connus du Gd allant du  $^{134}\text{Gd}$  au  $^{169}\text{Gd}$ , seuls sept sont stables et sont trouvés dans la nature :  $^{152}\text{Gd}$ ,  $^{154}\text{Gd}$ ,  $^{155}\text{Gd}$ ,  $^{156}\text{Gd}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{158}\text{Gd}$ ,  $^{160}\text{Gd}$  (Pieck, 2013). Le  $^{158}\text{Gd}$  représentant 24,84% du Gd total est la forme isotopique la plus abondante (Pieck, 2013), cette forme isotopique sera donc employé pour les mesures du Gd par analyses ICP-MS (Spectrométrie de Masse avec Plasma à Couplage Inductif) au cours de notre étude.

Le Gadolinium présente des configurations électroniques semblables aux autres REE ce qui lui confère des similarités chimiques avec les autres éléments de cette famille (Grawunder et Merten, 2012). Comme tous les ions lanthanides, il présente une configuration électronique stable du type  $[\text{Xe}]5d^0 6s^0 4f^n$  où  $n$  est le nombre d'électrons présents sur la couche externe ( $n = 7$  électrons dépareillés pour le Gd). L'ion Gadolinium trivalent ( $\text{Gd}^{3+}$ ) est un antagoniste d'autres ions métalliques comme le Calcium divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ) par exemple. En raison de leur rayons ioniques et de leur valence qui sont proches, le  $\text{Gd}^{3+}$  de rayon ionique 1,05 Å (+3) peut se substituer au  $\text{Ca}^{2+}$  de rayon ionique 1,00 Å (+2) dans différents milieux (Grawunder et Merten, 2012 ; Lansman, 1990) et dans les organismes en empruntant les voies destinées au

Ca<sup>2+</sup> (Courant, 2011; Fretellier, 2013). La présence d'un électron célibataire sur la couche externe comportant 7 électrons lui confère des propriétés physico-chimiques particulières dont un **temps de relaxation électronique**<sup>b</sup> long ( $t_1$  = temps de relaxation électronique  $1 > 10^{-9}$ s) par rapport aux autres lanthanides ( $t_1 \sim 10^{-13}$ s pour Eu<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> et Dy<sup>3+</sup>) (Caravan et al., 1999 ; Tallec, 2011).

#### 4. Propriétés physico-chimiques et utilisations

De par ses propriétés physico-chimiques de mieux en mieux exploitées, le Gd est de présent au sein des nombreuses applications industrielles (*Tableau 1*). Il a longtemps été employé pour la production de tubes cathodiques de téléviseurs et est toujours utilisé dans différents domaines tels que le nucléaire, la métallurgie, l'électronique, l'informatique ou la production de réfrigérateurs, qui est en plein essor à l'heure actuelle pour remplacer les réfrigérateurs au gaz.

Le gadolinium est également un élément important employé dans le domaine médical depuis les années 1990. Le Gd<sup>3+</sup> est utilisé sous forme d'agent de contraste à base de Gd (AC-Gd), qui est injecté par voie sanguine au patient lors d'examens par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM). Son emploi en IRM est lié à :

- **ses propriétés paramagnétiques** ; l'ion Gd<sup>3+</sup> est ferromagnétique à des températures inférieures à 20°C et présente un point de Curie à 293K ce qui signifie qu'à environ 20°C, le Gd perd son aimantation spontanée et devient fortement paramagnétique (Brown, 1976). Il n'est donc plus la source de l'aimantation mais reste magnétisable sous l'action d'un champ magnétique externe et peut garder cette faible aimantation.
- **son temps de relaxation électronique long** ; la modulation du signal récepteur par rapport à ce temps de relaxation électronique du Gd, permet de différencier les tissus observés sur l'image obtenue par IRM (Amet et Deray, 2012 ; Bonnet, 2006).

---

<sup>b</sup> **Temps de relaxation électronique** = temps de retour à l'équilibre énergétique de l'ion après excitation

- **son spin<sup>c</sup> élevé** ( $S = 7/2$ ) ; l'orientation du spin du Gd permet de révéler différents contrastes sur les images obtenues (Amet et Deray, 2012), ce qui améliore la clarté de l'image résultant de l'IRM.

Tableau 1 : Domaines d'application du Gadolinium

Domaine	Forme du Gd	Propriétés	Utilisations	Références
Nucléaire	Isotopes stables ( <sup>155</sup> Gd et <sup>157</sup> Gd)	Détection des fuites de rayonnement des centrales nucléaires	Mécanisme d'arrêt d'urgence	Stacey, 2007
	Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Neutrophagie des isotopes <sup>155</sup> Gd et <sup>157</sup> Gd	Limiter la réactivité en centrale et radiographie neutronique de métaux	Lide et Chemical Rubber Company, 2009 Von der Hardt et Röttger, 2013
Métallurgie	Combiné au Cr ou Fe	Meilleure usinabilité et résistance d'oxydation à haute température	Formation d'alliages de meilleure qualité	Castor et Hedrick, 2006
Télévisuel	Chélates de Gd	Phosphorescence	Tube des téléviseurs cathodiques	Gupta et Krishnamurthy, 2005 Strasser et Vogler, 2004
Electronique	Associé à Y	Amplification de la fréquence du signal micro-ondes	Transistors électroniques Amélioration des communications et signaux radar	Poplewell et Tebble, 1963
	Gd <sub>3</sub> Ga <sub>5</sub> O <sub>12</sub>		Fabrication de ferrites hyperfréquences	Nicolas, 1974
	Gd <sub>3</sub> Ga <sub>5</sub> O <sub>12</sub> + Yb, Dy ou Nd		Fabrication de lasers infrarouges et à rayon X	Gill et al., 1996 Shimokozono et al., 1996
Appareils ménagers	Gd <sub>5</sub> Si <sub>2</sub> Ge <sub>2</sub>	Réfrigération magnétique avec effets magnéto-caloriques	Réfrigérateurs	Okamura et al., 2006 Tušek et al., 2013
Informatique	Gd <sup>3+</sup>	Paramagnétisme	Production de CDs réenregistrables, disques durs ou clefs USB à durée de vie plus longue	Pohlmann, 1992
Médical	Agents de contraste à base de Gd	Paramagnétisme et Temps de relaxation électronique long	Examens IRM	Amet et Deray, 2012

## 5. Toxicité du Gadolinium et de ses dérivés

Suite à la découverte de l'utilité du Gd pour améliorer l'imagerie médicale, la question de la toxicité de cet élément métallique s'est posée.

<sup>c</sup> Spin = grandeur vectorielle utilisée pour décrire l'état général de rotation de l'ion

A l'heure actuelle, la toxicité du Gadolinium seul en solution est connue pour les organismes dans lesquels il a été injecté. Les interactions du  $Gd^{3+}$  avec le biote ont été depuis longtemps étudiées et le sont encore aujourd'hui. Ces interactions sont responsables de réponses à plusieurs niveaux d'organisation.

Le premier niveau de réponse des organismes à la présence de cet ion métallique est le niveau cellulaire. Les systèmes *in vitro* tels que les lignées cellulaires sont des outils importants permettant d'étudier les mécanismes physiologiques ou biologiques mis en place par les organismes en présence d'un contaminant. La toxicité du Gd a donc été montrée pour les mammifères à travers différentes lignées cellulaires. Cependant, une étude récente a montré qu'il existe une forte variabilité entre les réponses observées en fonction de l'utilisation de la lignées cellulaires, tels que les macrophages de souris (RAW 264.7), les ostéosarcomes humains (MG63) ou les cellules périvasculaires du cordon ombilical humain (HUCPV) (Feyerabend et al., 2010). Seules certaines lignées cellulaires montraient significativement une toxicité liée à la présence du  $Gd^{3+}$ . Ces auteurs ont mis en évidence une cytotoxicité du Gd supérieure à 157,250 mg/L pour les cellules RAW 264.7 et MG63 ; alors que pour les cellules HUCPV, aucune modification de la viabilité cellulaire n'a été mesurée. Ces observations ont soulevé la difficulté de dégager un profil de réponse toxique commun à toutes les lignées cellulaires modèles disponibles, et par voie de conséquence, à toutes les espèces susceptibles d'être exposées au Gd.

La source principale de la toxicité de cet ion réside dans le fait que le  $Gd^{3+}$  est un antagoniste de l'ion essentiel  $Ca^{2+}$ . Sa forme ionique libre en solution ( $Gd^{3+}$ ) bloque les canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants à des concentrations de l'ordre du micro-molaire (Courant, 2011 ; Fretellier, 2013). Plusieurs études ont montré que les mécanismes physiologiques impliquant l'utilisation des canaux calciques cellulaires sont inhibés par la présence du  $Gd^{3+}$ . Ainsi les processus de respiration mitochondriale, de contractilité myocardique, de coagulation sanguine, ou de transmission de l'influx nerveux sont inhibés dans les cellules de mammifères (Amet et Deray, 2012 ; Evans, 2013 ; Fretellier, 2013 ; Lansman, 1990). La toxicité de l'ion  $Gd^{3+}$  est amplifiée par sa capacité à s'accumuler dans divers tissus comme les os, le foie et les noyaux lymphatiques (Amet et Deray, 2012 ; Courant, 2011).

D'autres études ont également montré que le  $Gd^{3+}$  libre en solution, attaque directement le cytosquelette des érythrocytes (Wang, 1997 ; Wang et al., 1999). Après 30 minutes d'incubation à une concentration en Gd de l'ordre de  $1.10^{-5}$  M (soit 1,57 mg/L), le



cytosquelette des érythrocytes présentait des pores en forme de cratères tandis qu'à des concentrations plus faibles, la construction des petites structures autour de la membrane cellulaire a été observée. La formation de ces « pores » est à l'origine de la fuite de l'hémoglobine hors des érythrocytes pouvant conduire à une anémie (Wang, 1997). Pour parer à cette toxicité, les effets anormaux sur les membranes cellulaires ont été supprimés simplement par un traitement à l'aide de l'agent chélateur : l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Wang, 1997).

L'ion  $Gd^{3+}$  étant toxique sous forme ionique, il a d'abord été lié à un ligand tel que le Chlore formant ainsi le chlorure de Gadolinium ( $GdCl_3$ ) dans le but de limiter les interactions du  $Gd^{3+}$  libre avec les organismes. Cependant, plusieurs études ont montré que la toxicité du lanthanide n'est pas inhibée sous cette forme, notamment concernant la dépression du système réticulo-endothélial (Bellin et Van Der Molen, 2008 ; Fretellier, 2013 ; Kubota *et al.*, 2000). En effet, la présence de  $GdCl_3$  dans l'organisme augmente l'expression des cytokines hépatiques ainsi que certains facteurs de transcription des cytokines (gènes C-JUN ; C/EBP- $\beta$  ; C/EBP- $\delta$ ) (Idée *et al.*, 2006). L'altération de l'expression de ces cytokines impacte directement les cellules de Küpffer ce qui inhibe ainsi la phagocytose (Badger *et al.*, 1997 ; Hardonk *et al.*, 1992 ; Imuro *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 2015). La présence du  $GdCl_3$  pourrait alors diminuer les défenses des organismes en limitant l'élimination des éléments qui peuvent être à l'origine d'une toxicité pour les organismes, tels que les bactéries pathogènes ou les déchets métaboliques. Kubota *et al.*, (2000) ont montré que la cytotoxicité du Gd sous forme de  $GdCl_3$  dépend de son absorption intracellulaire. Cette toxicité est subséquente à la dissolution du Gd colloïdal formé dans le milieu de culture par phagocytose dans le phagolysosome.

D'autres ligands au Gd, tels que le phosphate de Gd ou le nitrate de Gd, ont également été élaborés afin de limiter la toxicité de l'ion. Comme pour le  $GdCl_3$ , ces composés ont mis en évidence une toxicité liée à la présence de ces composés dans les cellules. Par exemple, lorsque les ions Gd sont associés à du phosphate, ce composé est accumulé dans le foie au niveau des hépatocytes et des cellules de Küpffer, dans la moelle osseuse et dans les poumons ce qui peut être à l'origine de pathologies sévères telles que des fibroses (Fretellier, 2013).

Afin d'utiliser les propriétés paramagnétiques du Gd pour l'amélioration des contrastes d'images obtenues lors d'examens IRM, des complexes plus stables que le  $GdCl_3$ , le phosphate de Gd ou le nitrate de Gd ont été élaborés. Ces complexes ont été développés sous

forme de chélates de Gd, où l'ion trivalent est lié à une molécule fortement hydrophile, afin de parer à la toxicité de l'ion et à son accumulation dans les tissus ([Fretellier, 2013](#)). Cependant, nous allons voir que malgré leur formulation, l'innocuité de ces chélates appelés des agents de contraste à base de Gadolinium n'est pas absolue.



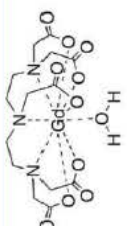
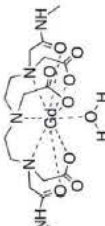
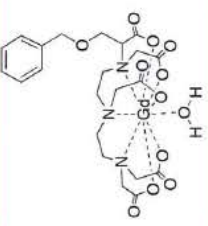
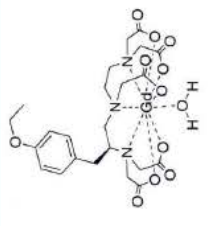
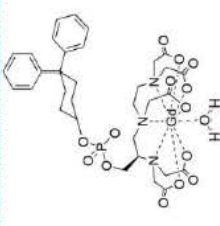
## Chapitre 2 : Les Agents de contraste à base de Gadolinium (AC-Gd)

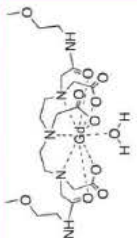
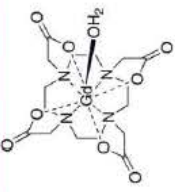
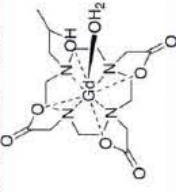
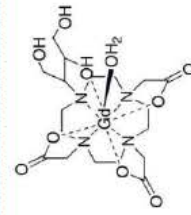
### 1. Définition des AC-Gd employés en IRM

Les agents de contraste à base de Gd (AC-Gd) sont des molécules linéaires ou macrocycliques complexées à un ion  $Gd^{3+}$ . Ces produits injectés par voie intraveineuse dans le corps du patient permettent d'améliorer la visualisation d'un tissu cible pendant un examen IRM non invasif (Bonnet, 2006). Cette technique d'imagerie a fait son apparition suite aux progrès de la résonance magnétique nucléaire (RMN) en 1973 (Courant, 2011), mais ce n'est qu'en 1986 que l'utilisation d'AC-Gd a permis d'obtenir une image détaillée des tissus en accentuant les contrastes de l'image. Cela permet d'avoir accès aux informations structurales des tissus observés par la construction de sections anatomiques imagées très précises, de l'ordre du millimètre, à l'intérieur d'un organisme vivant. Les observations précises réalisées engendrent un diagnostic plus fiable sur de nombreuses pathologies impliquant des modifications structurales de l'organisme telles que les tumeurs, les lésions au sein des différents tissus, ou encore les angiomes. Le suivi régulier d'une pathologie visible sur ce type d'image rend possible le calcul d'indicateurs utiles au suivi des traitements au cours de l'évolution de la maladie diagnostiquée.

Jusqu'au 10 mars 2017, 9 AC-Gd (Tableau 2) étaient autorisés sur le marché européen selon l'« *European Medicines Agency* » (EMA). Depuis lors, les Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) de 4 de ces produits de contraste ont été suspendues par le Comité pour l'Evaluation des Risques en matière de Pharmacovigilance (PRAC) (European Medicines agency, 2017). Le PRAC a mis en évidence que le Gd-BOPTA (Multihance®), le Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), le Gd-DTPA (Magnévist®) et le Gd-DTPA-BMEA (OptiMARK®) sont à l'origine d'une accumulation en Gd dans le cerveau des patients et ces AC-Gd ont été retirés du marché. En raison de cette avancée récente, les 9 agents de contraste ainsi que les connaissances établies concernant leur stabilité et leur toxicité pour les organismes seront présentées dans ce chapitre.

Tableau 2 : Présentation des 9 agents de contraste gadolinés autorisés sur le marché européen avant mars 2017, selon l'EMA et leur relaxivité à 20 MHz (Hermann et al., 2008 ; Idée et al., 2006 ; Rohrer et al., 2005)

Structure chimique	Nom commercial	Principe actif (nom générique)	Configuration (charge électrique)*	Formulation	Utilisation	AMM**	$r_1/r_2$ (L/mM/s, 20MHz, H <sub>2</sub> O, 37 °C)	Osmolalité (mOsm/Kg H <sub>2</sub> O, 37 °C)
	Magnevist®	Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	Linéaire ionique (-2)	Excès de DTPA 0,2% (1 mmol/L)	Composés extracellulaires	1986	3,4/4,0	1960
	Omniscan®	Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	Linéaire neutre (0)	Excès de Ca-DTPA-BMA et sel de Na <sup>+</sup> 5% (25 mmol/L)	Composés extracellulaires	1994	3,5/3,8	800
	MultiHance®	Gd-BOPTA (Gadobutrol)	Linéaire ionique (-2)	Pas de formulation	Contraste hépatobiliaire	1997	4,2/4,8	1970
	Primovist®	Gd-EOB-DTPA (Acide Gadoxétic disodium)	Linéaire ionique (-2)	Excès de Ca-EOB-DTPA et sel trisodique (concentration non communiquée)	Contraste hépatobiliaire et extravasculaire	2004	5,3/6,2	1660
	Vasovist®	MS-325 (Gadofosveset trisodique)	Linéaire ionique (-2)	Non communiqué	Contraste vasculaire	2005	5,8/6,7	700-950

	OptiMARK®	Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	Linéaire neutre (0)	Excès de Ca-DTPA- BMA et sel de Na <sup>+</sup> (50 mmol/L)	Composés extracellulaires	2007	4,2/5,2	110
	Dotarem®	Gd-DOTA (Acide gadotérique)	Macrocyclique ionique (-1)	Pas de formulation	Composés extracellulaires	1989	3,4/4,1	1350
	ProHance®	Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	Macrocyclique neutre (0)	Excès de [Ca-HP- DO3A] <sub>7</sub> et sel de Ca <sup>2+</sup> (0,5 mmol/L)	Composés extracellulaires	1994	3,1/3,7	630
	Gadovist®	Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	Macrocyclique neutre (0)	Excès de Ca-BT-DO3A et sel de Na <sup>+</sup> (1 mmol/L)	Composés extracellulaires des territoires crâniens et rachidiens. Foie et reins par angiographie	1998	3,7/5,1	560

\* Charge électrique = nombre d'électrons (signalés par le signe « - ») libres sur la couche externe de la molécule

\*\* AMM = autorisation de mise sur le marché

\*\*\*\* r<sub>1</sub> = temps de relaxation longitudinal ; r<sub>2</sub> = temps de relaxation transversal

Selon la Société Française de Radiologie, environ un tiers des examens IRM sont réalisés avec injection d'AC-Gd, ce qui correspond à 1,5 millions d'injections par an en France. Ces injections d'AC-Gd dans les organismes sont généralement effectuées par voie intraveineuse à des concentrations de l'ordre d'une millimole par litre de sang (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Concentrations sanguines des agents de contraste gadolinés lors d'examens IRM

Nom chimique (nom générique)	Posologie (mmol/Kg)	Concentration sanguine pour une femme* (mg(Gd)/L)	Concentration sanguine pour un homme* (mg(Gd)/L)
Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	0,1	268	240
Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	0,1	268	240
Gd-BOPTA (Gadobénate de diméglumine)	0,1	268	240
Gd-EOB-DTPA (Acide gadoxétic disodium)	0,025	67	60
MS-325 (Gadofosveset trisodique)	0,03	80	72
Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	0,1	268	240
Gd-DOTA (Acide Gadoterique)	0,1	268	240
Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	0,1	268	240
Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	0,1	268	240

\* Ces données ont été calculées sur la base des données INSEE ([de Saint Pol, 2007](#)) et du volume sanguin prédit en fonction du poids et de la taille des individus ([Nadler et al., 1962](#)) ; soit pour un homme de 77 Kg et de 1m75, un volume de sang est estimé à 5,05L et pour une femme de 63 Kg et de 1m63, un volume sanguin est estimé à 3,81L.

Ces produits contrastants ont diverses applications en fonction de leur configuration. Ce sont des agents de contraste extracellulaires, hépatobiliaires, vasculaires ou extravasculaires.

## 2. Nature chimique

La nature chimique des AC-Gd est basée sur le type de structure de leur squelette polyaminocarboxylate ; ils peuvent être linéaires avec des ligands acycliques dérivés de l'acide Diéthylène Triamine PentaAcétique (DTPA) ou macrocycliques avec des ligands cycliques dérivés de l'Acide tetraazacycloDodecane-1,4,7,10-Tetracétique (DOTA) (*Tableau 2*). La liaison de l'ion  $Gd^{3+}$  à ces deux types de ligands leur permet de diffuser très rapidement en dehors du système vasculaire suite à leur injection et de se répartir dans tous les espaces de l'organisme. Les AC-Gd ont une distribution extracellulaire rapide en raison de leur petite taille (entre 550 et 700 Da ([Aime et al., 2005](#))) qui leur permet de diffuser rapidement du sang

(où ils sont injectés) jusqu'au liquide interstitiel à l'exception du MS-325 (Vasovist®). Ce dernier est l'AC-Gd le plus gros (900 Da (Aime et al., 2005)) et ne diffuse pas jusqu'au liquide interstitiel. Sa taille plus importante que celle des autres AC-Gd lui permet de rester plus longtemps dans le sang et d'être employé spécifiquement pour les angiographies.

Les agents de contraste extracellulaires sont majoritairement employés pour détecter la présence de tumeurs cérébrales (Courant, 2011). En effet, la présence de lésions cérébrales liées à ces tumeurs permet aux produits de contraste de franchir la barrière hémato-encéphalique rendue plus perméable et de révéler ces anomalies. Cependant, les AC-Gd sont également employés pour localiser d'autres anomalies dans les différents tissus mous des patients et peuvent être diffusés dans tout l'organisme. Deux de ces AC-Gd présentent une conformation particulière du ligand acyclique DTPA (Gd-BOPTA - Multihance® et Gd-EOB-DTPA - Primovist®) (Tableau 2) qui leur permettent une capture spécifique de l'AC-Gd par un système transporteur et une entrée de l'agent de contraste dans les cellules du système hépatobiliaire.

L'efficacité des agents de contraste à base de Gd est dépendante de :

- (i) leur capacité à augmenter les vitesses de relaxation des protons des molécules d'eau voisines pour obtenir un retour à l'équilibre de l'aimantation dans le champ magnétique appliqué,
- (ii) leur perméabilité aux molécules d'eau afin que les protons d'hydrogène puissent interagir avec l'ion Gd.

Ce phénomène est appelé la relaxivité, elle peut être longitudinale ( $r_1$ ) comme pour les produits de contraste paramagnétiques à base de Gd qualifiés de type  $T_1$ , ou transversale ( $r_2$ ) comme pour les produits de contraste super-paramagnétiques à base de particules de ferrite dits de type  $T_2$ . Les 9 AG-Gd sont classifiés de type  $T_1$  car la modulation du contraste de l'image est déterminée par leur capacité à augmenter  $r_1$  ( $r_1$  autour de 4 mmol/L/s). Plus ces produits sont performants à diminuer leur temps de retour à l'équilibre longitudinal, plus cela permet de réaliser des acquisitions rapides sur les sections anatomiques et donc de mieux visualiser l'organe ciblé (Bonnet, 2006).

L'augmentation de ces relaxivités permet de mieux cibler les organes à visualiser. En effet, la relaxivité maximale atteignable pour les agents de contraste à base de Gd est de 100 mmol/L/s en théorie (Bach et al., 2010). Cette marge d'augmentation de la relaxivité des produits gadolinés est notamment développée à partir de complexes linéaires comme le



$[Gd(DTTA-Me)(H_2O)_2]^-$  ( $r_1 > 7$  mmol/L/s) qui n'est pas encore un AC-Gd commercialisé (Figure 4).

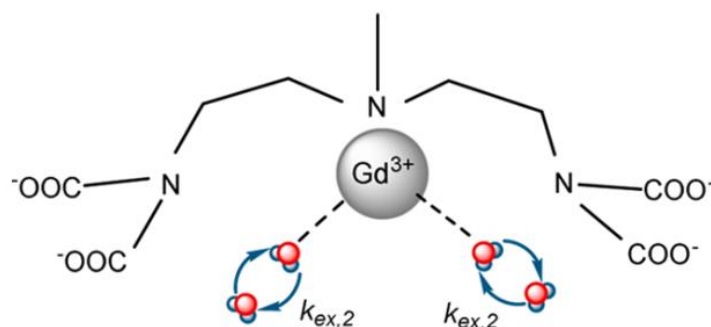
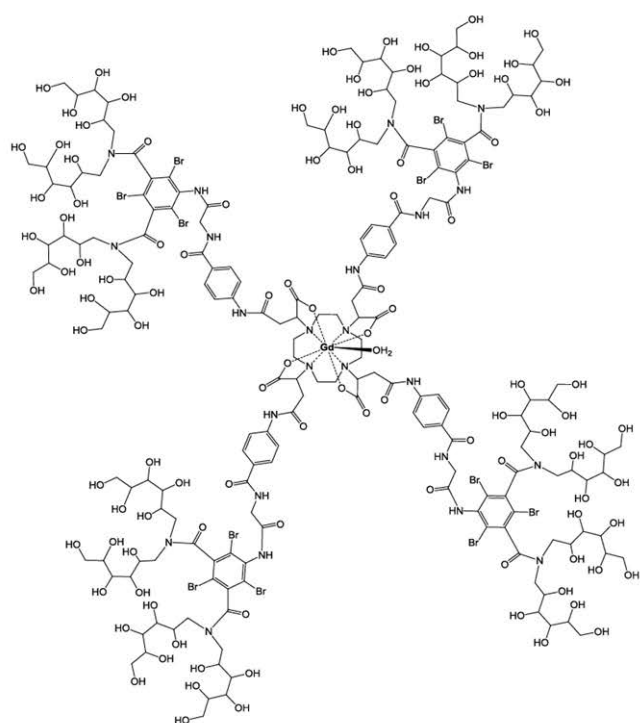


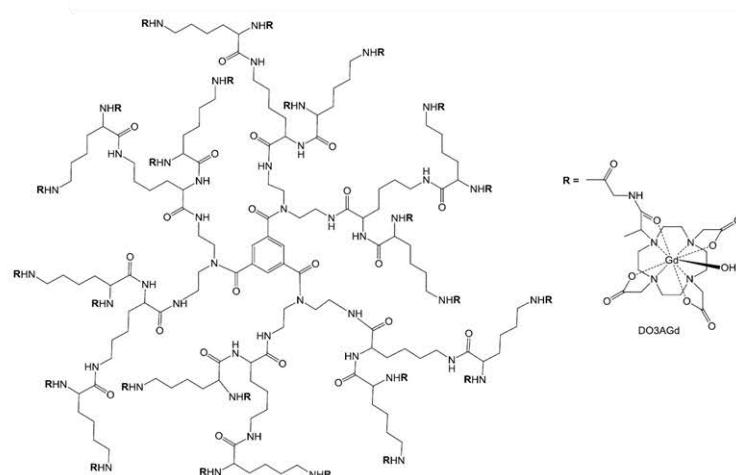
Figure 4 : Structure du  $[Gd(DTTA-Me)(H_2O)_2]^-$   
Tiré de (Karimi et al., 2016)

De nouveaux AC-Gd ont également vu le jour *via* la création de macromolécules gadolinées mais sont encore en essais cliniques. Ces macromolécules (Figure 5) ont des poids moléculaires élevés ce qui les rend utilisables seulement en angiographie (Boulay, 2013) :

- le Vistarem® (P792 - Gadomelitol) qui présente une relaxivité  $r_1 > 30$  mmol/L/s et un poids moléculaire de 6,47 kDa
- le Gadomer® (Gadomer-17) qui présente une relaxivité  $r_1 = 17,3$  mmol/L/s et un poids moléculaire de 30 à 35 kDa



Vistarem®



Gadomer®

Figure 5 : Structures des AC-Gd macromoléculaires Vistarem® (P792 - Gadomelitol) et Gadomer® (Gadomer-17)  
Tiré de Boulay, (2013)

Pour améliorer la visualisation d'organes spécifiques, un autre AC-Gd a récemment été autorisé (en 2014), il s'agit de l'Artirem® dont le principe actif est le Gd-DOTA comme pour le Dotarem®. Cependant ce produit n'est pas injecté par voie intraveineuse comme les autres agents de contraste mais par voie intra articulaire. Ce mode d'injection permet alors de diminuer les concentrations en Gd-DOTA injectées tout en ciblant mieux les organes à étudier, ce qui limite la quantité de Gd injectée au patient.

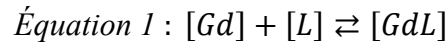
### 3. Paramètres de stabilité des agents de contraste

De par la forte toxicité de l'ion Gd libre, les AC-Gd injectés par voie sanguine doivent être stables et conserver leur formulation tout au long de l'examen afin d'empêcher la libération du Gd<sup>3+</sup>. Cependant la stabilité des produits de contraste gadolinés peut varier :

- (i) **Au niveau de la solution pharmaceutique qui est injectée** : leur stabilité est fonction de l'osmolalité de la solution (*Tableau 2*) qui est nettement supérieure à celle du sang (280 à 300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O, 37°C) ([Port et al., 2008](#)). Cette osmolalité est définie par la concentration d'une substance dans une solution, elle est proportionnelle à la somme des concentrations des différentes espèces moléculaires ou ioniques présentes dans la solution ([Courant, 2011](#)). La stabilité des complexes gadolinés diminue avec l'augmentation de leur osmolalité ([Port et al., 2008](#)). Des adjuvants sont ajoutés dans la formulation pharmaceutique des AC-Gd afin d'ajuster leur pouvoir osmotique. Par exemple dans le cas du Dotarem®, la Méglumine est ajoutée au Gd-DOTA. Cette osamine entre dans la composition de nombreux médicaments tels que les produits de contraste gadolinés ([Idée et al., 2015](#)) et iodés ([Brooks et Barry, 1974](#)) ou les traitements contre la leishmaniose ([Silva et al., 2016](#)), où elle agit comme un contre-ion. Cet excipient aide donc à améliorer la stabilité et la solubilité du principe actif des médicaments auxquels il est associé ([Zhang et al., 2010](#)).
- (ii) **Au niveau de l'AC-Gd en solution** : la stabilité de ces complexes est représentée par leur stabilité cinétique et leur stabilité thermodynamique présentées ci-dessous.

### A. Stabilité thermodynamique

La stabilité thermodynamique des AC-Gd correspond à l'équilibre thermodynamique qui existe entre l'ion  $Gd^{3+}$  ( $Gd$ ), le ligand ( $L$ ) et le complexe formé par ces deux parties ( $GdL$ ) (Équation 1).



Cette stabilité est régie par deux concepts thermodynamiques proposés dans la littérature : la constante thermodynamique ( $K_{therm}$ ) (Équation 2) mesurée à pH = 11 et la constante conditionnelle ( $K_{cond}$ ) (Équation 3) mesurée à pH physiologique (pH = 7,4) (Port et al., 2008). Ces deux constantes exprimées en logarithme permettent de quantifier la concentration en ions Gd libres en solution (Tableau 4).

$$\text{Équation 2 : } K_{therm} = \frac{[GdL]}{[Gd] \times [L]}$$

$$\text{Équation 3 : } K_{cond} = \frac{[GdL]}{[Gd] \times [L_T]} = \frac{K_{therm} \times [L]}{[L_T]}$$

Où  $L_T$  est la concentration totale de ligand libre

La constante la plus représentative de la stabilité des AC-Gd ioniques est la constante conditionnelle exprimée en Log, car elle est mesurée à pH physiologique pour l'Homme. Pour les agents gadolinés ioniques, cette constante est plus élevée que chez les agents de contraste neutres ce qui indique une meilleure stabilité thermodynamique des complexes. Cependant, cette constante conditionnelle reste relativement peu élevée. La formulation pharmaceutique des AC-Gd inclue une quantité variable d'excipients tels que des ligands libres, des sels de Sodium ou de Calcium (Port et al., 2008). L'ajout de ces excipients (Tableau 2) permet de s'assurer de l'absence d'ion  $Gd^{3+}$  libre en solution en cas de transmétallation ou de décomplexation des AC-Gd (Idée et al., 2006).

Tableau 4 : Mesures des constantes  $K_{therm}$  et  $K_{cond}$  nécessaires au calcul de la stabilité thermodynamique des AC-Gd (Port et al., 2008).

Principe actif (nom générique)	Configuration	Log $K_{therm}$ (pH=11)	Log $K_{cond}$ (pH=7,4)
Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	Linéaire ionique	22,1	17,7
Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	Linéaire neutre	16,9	14,9
Gd-BOPTA (Gadobénate de diméglumine)	Linéaire ionique	22,6	18,4
Gd-EOB-DTPA (Acide Gadoxétic disodium)	Linéaire ionique	23,46	18,7
MS-325 (Gadofosveset trisodique)	Linéaire ionique	22,1	18,9
Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	Linéaire neutre	16,6	15,0
Gd-DOTA (Acide Gadoterique)	Macrocyclique ionique	25,8	19,3
Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	Macrocyclique neutre	23,8	17,1
Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	Macrocyclique neutre	21,8	14,7

### B. Stabilité cinétique

La stabilité cinétique définit la capacité de dégradation des agents de contraste gadolinés au fil du temps dans les différents fluides biologiques, c'est-à-dire la vitesse de dissociation du complexe tant que l'équilibre thermodynamique (Équation 1) n'est pas atteint. Expérimentalement, la demi-vie de l'AC-Gd est considérée en milieu acide (à pH = 1 à 25°C) car à pH physiologique (pH = 7,4 à 37°C) cette dissociation est beaucoup plus lente. Cette réaction peut être le résultat de deux mécanismes distincts :

- (i) la déchélation de l'ion  $Gd^{3+}$ , soit la dissociation assistée ou spontanée du proton de l'ion  $Gd^{3+}$  au sein du chélate qui peut être catalysée par la présence de métaux endogènes (Port et al., 2008). Ceci permet de calculer la vitesse de dissociation du complexe en présence de 0,1 M d'HCl à 25°C
- (ii) la transmétallation de l'ion  $Gd^{3+}$  (cf. 3.C. p 29)

Les temps de demi-vie associés aux agents de contraste ainsi calculés en milieu acide (Tableau 5) ont montré que les AC-Gd macrocycliques présentent les plus fortes stabilités cinétiques avec des demi-vies estimées à plusieurs heures contre quelques secondes pour les agents linéaires à chaîne ouverte (Port et al., 2008). Ces demi-vies de stabilité cinétique sont fortement augmentées en conditions physiologiques dans le corps humain. Que ce soit en conditions expérimentales ou physiologiques, aucune dissociation n'a été observée pour les

agents macrocycliques, et pour les agents linéaires, cette dissociation est apparue seulement au bout de plusieurs heures (Fretellier, 2013).

Tableau 5 : Présentation des temps de demi-vies de stabilité cinétique estimés à  $\text{pH} = 1,0$  et  $25^\circ\text{C}$  pour chaque agent de contraste gadoliné (Port et al., 2008).

Nom chimique (nom générique)	Configuration	Stabilité cinétique à $\text{pH} = 1,0$ et $25^\circ\text{C}$
Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	Linéaire ionique	< 5 secondes
Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	Linéaire neutre	< 5 secondes
Gd-BOPTA (Gadobénate de diméglumine)	Linéaire ionique	< 5 secondes
Gd-EOB-DTPA (Acide Gadoxétic disodium)	Linéaire ionique	< 5 secondes
MS-325 (Gadofosveset trisodique)	Linéaire ionique	< 5 secondes
Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	Linéaire neutre	< 5 secondes
Gd-DOTA (Acide Gadoterique)	Macrocyclique ionique	338 heures
Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	Macrocyclique neutre	3,9 heures
Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	Macrocyclique neutre	43 heures

La structure de l'agent de contraste employé joue un rôle important dans la stabilité du complexe en solution. La stabilité cinétique de l'agent de contraste est liée à sa structure. En effet, la structure macrocyclique conduit à la présence de liaisons électrostatiques fortes entre les groupes entourant l'ion métallique et le Gd lui-même, ce qui rigidifie le complexe (Idee et al., 2009). L'acide gadotérique (Dotarem®) présente la plus forte stabilité cinétique (Tableau 5) car l'ion  $\text{Gd}^{3+}$  est encadré par quatre groupes carboxylates ce qui réduit efficacement des mouvements de conformation de la molécule (Idee et al., 2009).

D'autre part, les liaisons électrostatiques entre l'ion Gd considéré « sphérique » et les agents chélatants qui lui sont associés modifient la stabilité thermodynamique de l'AC-Gd. Les produits de contraste stables thermodynamiquement sont les agents chargés négativement et formés à partir de ligands poly-carboxyliques. Trois facteurs principaux peuvent influencer cette stabilité selon Port et al., (2008) :

- (i) La basicité de la structure poly-carboxylique, pouvant être calculée par la somme des constantes de protonation de chaque atome donneur du ligand. En effet, le

pKA varie en fonction des interactions électrostatiques entre l'ion métallique et les atomes donneurs du ligand

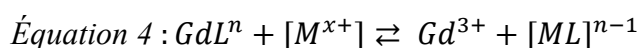
- (ii) Le nombre de cycles constitués, formés par le chélate entre l'ion métallique et les atomes donneurs du ligand : sept cycles pour les complexes linéaires contre huit pour les complexes macrocycliques
- (iii) La structure macrocyclique, qui induit une rigidité du chélate formant une cavité plus ou moins conséquente où se trouve l'ion métallique « sphérique ». Plus la cavité est adaptée à l'ion  $Gd^{3+}$ , plus le complexe est solide et stable

Les aspects structuraux des AC-Gd ont donc des conséquences majeures sur la stabilité thermodynamique et cinétique des agents de contraste à base de Gd. Ces études pour déterminer la stabilité des agents de contraste gadolinés ont été réalisées en conditions contrôlées de laboratoire, dans des milieux représentatifs de la solution sous laquelle ils sont formulés ou en conditions physiologiques. Cependant, à notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à leur stabilité en conditions environnementales. [Holzbecher et al., \(2005\)](#) ont estimé que le Gd-DTPA (Magnévist®) présentait une demi-vie environnementale supérieure à 100 jours. La stabilité de cet AC-Gd en conditions environnementales est donc nettement supérieure à celle mesurée en conditions contrôlées ( $< 5$  s ; [Tableau 5](#)). Il est donc assumé qu'en conditions environnementales, ces produits de contraste restent stables dans le milieu aquatique sauf cas exceptionnels dus à :

- un pH du milieu aquatique très acide (proche de 1) ; ce qui est peu probable car à notre connaissance, les milieux aquatiques les plus acides ont un pH proche de 3 (exemple de 23 lacs miniers extrêmement acides ( $2,3 < \text{pH} < 3,5$ ) à Lusace en Allemagne ([Nixdorf et al., 1998](#)))
- la présence d'éléments métalliques, pouvant induire une transmétallation des AC-Gd.

### C. Transmétallation

Le processus de transmétallation est une réaction chimique de dissociation d'un complexe à base métallique qui consiste en une substitution d'ion par des échanges de type métal-métal. Ce phénomène peut être traduit par l'équilibre suivant ([Équation 4](#)) :



Où M est le métal compétiteur

En condition physiologique, dans le sang et les autres fluides corporels, un très grand nombre de protéines, de ligands ou d'ions métalliques endogènes ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) peuvent entrer en compétition avec le Gd de l'agent de contraste (*Figure 6*).

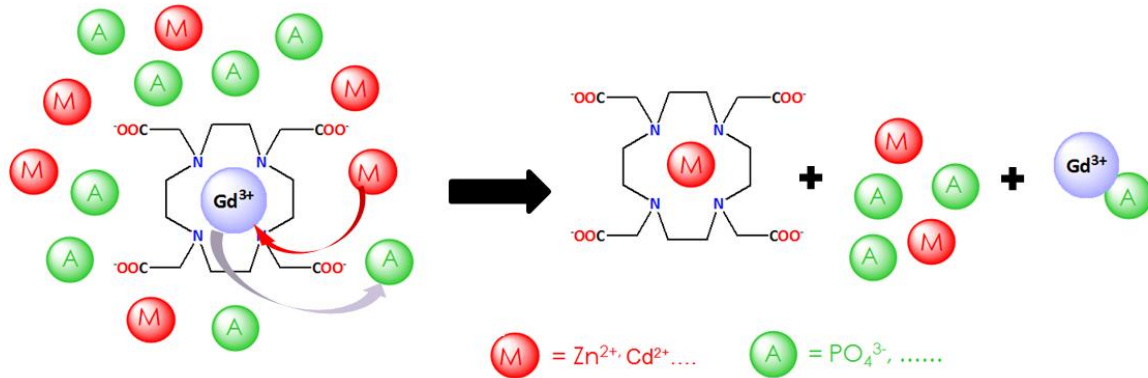


Figure 6 : Exemple de transmétallation de l'ion Gd dans un milieu contenant : l'AC-Gd, des ions métalliques endogènes (M) et d'autres éléments (A) pouvant se lier à l'ion  $\text{Gd}^{3+}$  libre en solution.  
Inspiré de Chuburu, 2014

Lorsque la transmétallation a lieu, le  $\text{Gd}^{3+}$  se retrouve libre en solution, où il est complexé par des protéines liant les métaux, des acides aminés (citrate, glutamate) ou des précipités anioniques endogènes ( $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Laurent *et al.*, 2010). Le ligand libre réagit quant à lui de son côté avec divers ions métalliques endogènes (Port *et al.*, 2008). Cet équilibre est défini par la comparaison entre les constantes de stabilité thermodynamiques des différents ions métalliques endogènes pouvant entrer en compétition avec le  $\text{Gd}^{3+}$ . Des constantes d'équilibre de transmétallation exprimées en Log sont alors définies pour chacun de ces ions métalliques. Au fil du temps l'amélioration des agents de contraste à base de Gd a permis de rapprocher ces constantes de 1, c'est-à-dire que l'ion Gd présent dans la molécule possède une affinité forte pour le ligand. Le Gd a donc peu de possibilités d'être remplacé par un autre ion métallique, notamment par des ions métalliques essentiels fréquemment rencontrés dans le sang tels que le Fer ou d'autres éléments métalliques découlant de la présence de prothèses (Titane, Chrome ou Cobalt (Liu *et al.*, 1998)).

Ce risque de transmétallation des AC-Gd a toutefois été soulevé concernant le devenir de ces produits suite à leur rejet dans le milieu aquatique. Peu d'études se sont intéressées à la transmétallation ou la dissociation des complexes gadolinés en conditions non physiologiques dans le milieu aquatique. En 2013, après avoir mesuré des concentrations en agents de contraste à base de Gd (Gd-DOTA, Gd-BT-DO3A et Gd-DTPA), représentant entre 74 et 89% du Gd total mesuré dans des échantillons d'eau de surface, Birka *et al.* ont supposé une possible transmétallation des AC-Gd en présence de  $\text{Fe}^{3+}$  dans les milieux aquatiques. Le

reste du Gd total serait donc présent sous forme ionique libre ou complexé à d'autres molécules comme des phosphates par exemple. Une autre étude réalisée par Rabiet *et al.*, (2014) a montré que le Gd-DTPA est significativement transmétallé par le  $\text{Fe}^{3+}$  au cours de l'étape de coagulation/floculation des eaux usées en station d'épuration. En effet, plus de 27% de l'agent de contraste linéaire est dissocié au cours de cette étape et le  $\text{Gd}^{3+}$  libre relâché dans le milieu aquatique environnant, n'est pas adsorbé ni co-précipité avec les floes. Donc, sous certaines conditions, quelques agents de contrastes peuvent être transmétallés et relarguer du Gd sous forme ionique libre dans le milieu environnant.

Cette thèse s'est inscrite dans un projet plus large, mené dans le but de proposer à terme des solutions de gestion des rejets en AC-Gd ([Rapport d'activité - Parant et al. - Programme EC2CO ECODYN 869543 - Impacts environnementaux des agents de contraste au gadolinium - 2016](#)). Dans le cadre de ce projet, la réactivité de ces produits de contraste a été mesurée en présence d'autres polluants de l'environnement. Pour cela, des analyses de **relaxométrie**<sup>d</sup> ont été réalisées à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims sur les eaux prélevées au cours de cette thèse. La relaxivité du Gd a été mesurée pour le Gd-DOTA (Dotarem®) et le Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) dans les eaux prélevées à proximité de rejets de STEP, de zones de captage en eau potable et de sites à pollution multiple localisés sur l'ensemble du territoire de la région Lorraine. Cette étude n'a montré aucune réaction de transmétallation du Gd-DOTA (Dotarem®) dans ces eaux. Le Gd présent majoritairement sous cette forme ne se décroche donc pas de la molécule macrocyclique. En revanche, il a été mis en évidence que le Gd de l'AC-Gd linéaire Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) est transmétallé par le Zinc dans ces eaux. Il est donc supposé que les autres AC-Gd linéaires qui présentent les mêmes niveaux de stabilité thermodynamiques et cinétiques sont également transmétallés par le Zinc dans ces milieux. A l'heure actuelle, 4 de ces produits de contraste linéaires ont été interdits sur les 9 autorisés jusqu'en mars 2017 ([European Medicines agency, 2017](#)). Il peut donc être considéré que le risque de transmétallation des produits de contraste gadolinés employés lors des examens IRM est désormais limité dans les eaux de la région Lorraine.

---

<sup>d</sup> **Relaxométrie** = Technique permettant la mesure de la relaxivité  $r_1$  du Gd dans l'eau



## 4. Toxicité

Malgré la formulation des AC-Gd qui combine : (i) l'efficacité lors des examens IRM, (ii) leur stabilité dans le corps humain, (iii) la prévention en  $GdCl_3$  de l'électron libre présent sur la couche externe de l'ion  $Gd^{3+}$ , (iv) le mode de distribution et d'excrétion rapide ; ces produits contrastants présentent tout de même quelques effets pour l'Homme et pour d'autres animaux. Dans ce paragraphe et pour la suite du document, les concentrations en AC-Gd seront exprimées en masse de Gd par unité de mesure du milieu (c'est-à-dire en kilogramme, gramme ou litre). Par convention, ces concentrations seront notées par exemple en mg(Gd)/kg ou en mg(Gd)/L.

### A. Toxicité aiguë des AC-Gd

La dose létale d'un composé responsable de 50% de la mortalité d'un groupe d'individus ( $DL_{50}$ ) est un facteur particulièrement important dans les expérimentations animales. Elle permet d'estimer la toxicité aiguë du composé pour les organismes testés. Les AC-Gd autorisés sur le marché présentent des  $DL_{50}$  estimées chez l'Homme à des concentrations au minimum 50 fois supérieures à leur formulation pharmaceutique (Bonnet, 2006). De nombreuses études effectuées chez les rongeurs (souris et rats) ont montré des  $DL_{50}$  calculées très élevées pour chaque agent de contraste autorisé sur le marché européen. Ces données sont synthétisées dans le *Tableau 6*.

*Tableau 6 :  $DL_{50}$  mesurées chez les rongeurs pour les 9 AC-Gd injectés par voie intraveineuse.*

Nom chimique (nom générique)	$DL_{50}$ mg(Gd)/kg
Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	944 <sup>a</sup> ; 1 258 <sup>b</sup>
Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	3 145 <sup>a</sup> ; 3 931 <sup>b</sup>
Gd-BOPTA (Gadobénate de diméglumine)	1 258 <sup>a</sup>
Gd-EOB-DTPA (Acide gadoxétic disodium)	1 179 <sup>c</sup>
MS-325 (Gadofosveset trisodique)	629 <sup>c</sup>
Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	3 931-4 403 <sup>d</sup>
Gd-DOTA (Acide Gadoterique)	1 258 <sup>a</sup> ; 2 831 <sup>b</sup>
Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	2 831 <sup>a</sup> ; <2 359 <sup>b</sup>
Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	3 931 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Thomsen, (2006)  $DL_{50}$  chez la souris ; <sup>b</sup> Krause, (2002)  $DL_{50}$  chez le rat ; <sup>c</sup> Weinmann et al., (1991)  $DL_{50}$  chez le rat ; <sup>d</sup> (Cheng, 2004<sup>3</sup>)  $DL_{50}$  chez la souris ; <sup>e</sup> Turetschek et al., (2001)  $DL_{50}$  chez le rat

La toxicité de ces AC-Gd à fortes concentrations se traduit par une augmentation de la force ionique *in vivo* et une perturbation de la pression osmotique, ce qui peut conduire à des dommages cellulaires et circulatoires (Courant, 2011).

Ces dommages cellulaires peuvent conduire à une diminution de la viabilité cellulaire qui a été étudiée *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires de mammifères. Les valeurs des concentrations inhibitrices médianes (CI<sub>50</sub>) relevées dans la littérature sont présentées dans le *Tableau 7* et ont permis d'évaluer la cytotoxicité des AC-Gd. L'ensemble des AC-Gd testés dans ces études ont montré des valeurs de cytotoxicité induisant une inhibition de 50% de la prolifération des cellules supérieure à 10 mg(Gd)/L (*Tableau 7* ; Cabella *et al.*, 2006 ; Heinrich *et al.*, 2007).

*Tableau 7 : Valeurs des concentrations inhibitrices médianes (CI<sub>50</sub>) en agents de contraste à base de Gd mesurées dans la littérature pour les cellules épithéliales porcines (LLC-PK1), les cellules de gliome de rat (cellules C6) et dans une culture tissulaire d'hépatome de rat (HTC).*

Type de cellules	CI <sub>50</sub> en mg(Gd)/L		
	LLC-PK1	HTC	C6
Espèce	Porc	Rat	
Temps d'exposition au complexe	24h	4h	
Référence	Heinrich <i>et al.</i> , 2007	Cabella <i>et al.</i> , 2006	
Gd-DTPA (Gadopentétate de diméglumine)	> 2 635	nd	nd
Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide)	> 5 224	[84 ; 167]	418
Gd-BOPTA (Gadobénate de diméglumine)	> 4 629	nd	nd
Gd-EOB-DTPA (Acide Gadoxétic disodium)	nd	nd	nd
MS-325 (Gadofosveset trisodique)	nd	nd	nd
Gd-DTPA-BMEA (Gadoversétamide)	nd	nd	nd
Gd-DOTA (Acide gadotérique)	> 5 533	nd	nd
Gd-HP-DO3A (Gadotériol)	nd	> 2 221	> 2 221
Gd-BT-DO3A (Gadobutrol)	nd	nd	nd

nd = non déterminé

Suite à leur injection à doses pharmaceutiques les AC-Gd peuvent également être à l'origine de pathologies graves pour une faible partie de la population présentant des caractéristiques les prédisposant à ces effets. Ces pathologies et leurs mécanismes sont décrits dans les paragraphes suivants.

### ***B. Une pathologie sévère : la fibrose systémique néphrogénique***

La pathologie la plus connue développée suite à l'injection d'AC-Gd est la fibrose systémique néphrogénique (FSN). Cette maladie a été diagnostiquée pour la première fois en

1997 chez 14 patients dialysés ayant subi un examen IRM avec injection d'AC-Gd. Elle a ensuite été caractérisée par [Cowper et al., \(2000\)](#) comme étant une forme particulière de scléromyxœdème. Cette maladie est caractérisée par une augmentation du taux de créatinine ( $> 44 \mu\text{mol/L}$ ) ([Amet et Deray, 2012](#)), 2 à 10 semaines suivant l'injection de produits de contraste gadolinés ([Fretellier, 2013](#)). Chez le patient, la FSN se traduit par un développement anormal de fibroblastes qui induit un aspect « peau d'orange », par un épaissement et une induration du derme sous forme de lésions cutanées très douloureuses allant des démangeaisons aux brûlures. La peau prend alors un aspect boursoufflé de couleur cire. La FSN se déclare généralement en commençant par les extrémités distales des membres inférieurs ([Fretellier, 2013](#) ; [Senet et al., 2009](#)). Des atteintes systémiques dues à cette maladie sont fréquentes chez de nombreux patients comme des douleurs abdominales, un érythème oculaire, des formes de pneumopathies ainsi qu'une rigidification articulaire et musculaire, y compris celle du myocarde ([Senet et al., 2009](#)).

Il n'existe pas de traitement curatif contre cette maladie bien que certains médicaments permettent d'en soulager les effets. Lorsque cette pathologie est déclarée, 20 à 30% des patients décèdent et 40% ne présentent pas d'amélioration au bout de 24 mois ([Marckmann et al., 2008](#)). Il est donc nécessaire au praticien de déterminer à l'avance si le patient peut ou non subir un examen IRM avec injection d'agents de contraste gadolinés. Les patients considérés « à risque » sont ceux souffrant d'une insuffisance rénale, d'hyperphosphatémie ou qui ont été dialysés peu de temps avant l'examen IRM ([Fretellier, 2013](#)).

Cette **pathologie iatrogène**<sup>e</sup> rare est essentiellement développée suite à l'injection d'AC-Gd linéaires neutres, principalement le Gadodiamide (Omniscan®) chez des patients qui présentent des prédispositions à cette maladie ([Morcos, 2007](#) ; [Senet et al., 2009](#)). Ce type de produits de contraste est moins stable que les composés macrocycliques, cependant [Edward et al., \(2010\)](#) ont montré que tous les agents de contraste gadolinés peuvent être à l'origine de cette affection cutanée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les mécanismes pathophysiologiques de la FSN :

- (i) La déchélation des AC-Gd ou leur transmétallation, ce qui permet au  $\text{Gd}^{3+}$  libre ou aux ligands seuls de se déposer dans le derme et/ou dans d'autres organes. Ce

---

<sup>e</sup> **Pathologie iatrogène** = effets secondaires et non désirés des médicaments administrés à des doses thérapeutiques habituelles

type de dépôt induit la libération de cytokines profibrotiques ainsi que des chimiokines (telles que les CXCL12) par les macrophages, ce qui attire des fibrocytes libres circulants et peut initier la fibrocytose (Morcos, 2007 ; Idee et al., 2008).

- (ii) La transmétallation des AC-Gd par l'ion  $Zn^{2+}$ , induisant un excès de chélates de Zinc dans l'organisme et diminuant la biodisponibilité du Zn endogène nécessaire à l'organisme (Morcos, 2007 ; Idee et al., 2008).
- (iii) L'acidose métabolique, pouvant être due au traitement de l'hyperphosphatémie par prise de médicament chélateur de phosphate, favorisant la déstabilisation des complexes gadolinés et conduisant à leur dissociation (Grobner, 2005 ; Idee et al., 2008).
- (iv) La présence d'AC-Gd dans le sang, qui induit une diminution de la concentration en érythropoïétine recombinante prise par certains patients atteints de déficience rénale afin de booster le taux d'hématocrites. Cette diminution en érythropoïétine limite donc les propriétés fibrogènes de cette hormone permettant d'améliorer la condition et le confort de ces patients (LeBoit, 2003).

Une revue récente a montré que 711 cas de FSN ont été répertoriés dans le monde par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) entre 2012 et 2016 (Thomsen, 2016<sup>a</sup>). Avant 2012, plus de 1600 cas en lien avec les AC-Gd avaient été publiés (Thomsen, 2016<sup>a</sup>). Cependant, le nombre réel de cas de FSN dans le monde n'est pas connu car lorsqu'un patient atteint d'insuffisance rénale est exposé aux agents de contraste gadolinés, le diagnostic médical concernant l'inspection de la peau n'est pas systématique. Thomsen (2016<sup>a</sup>) a donc supposé que plusieurs patients sont décédés de FSN sans avoir été diagnostiqués entre 1996 et 2006. Depuis quelques années, outre la recherche d'agents de contraste de plus en plus stables, des prérogatives lors d'un examen IRM ont été mises en place afin de limiter l'apparition de cette pathologie, la plus récente étant une contre-indication de l'administration des AC-Gd pour les patients considérés « à risque » (ESUR, 2014).

### **C. Autres effets des AC-Gd**

Bien que les effets cliniques liés à l'injection des complexes gadolinés restent rares, la majorité de ces réactions sont de nature irritative pour la peau. Galera et al., (2010) ont présenté les effets allergiques des produits de contraste gadolinés qui peuvent aller jusqu'à l'anaphylaxie. Cependant peu de cas sont recensés dans le monde : environ 0,07% des

patients sont allergiques aux AC-Gd (Dillman *et al.*, 2007). Ils ont tous présenté une urticaire généralisée très souvent accompagnée d'un collapsus cardio-vasculaire (Galera *et al.*, 2010)

D'autres effets physiologiques moins gênants pour les patients ont aussi pu être mis en évidence. Par exemple, la présence dans le sang d'AC-Gd linéaires qui peut induire une hyposidérémie, c'est à dire une diminution du taux de fer dans le sérum sanguin (Fretellier, 2013). Cette hyposidérémie est liée à une interférence entre les AC-Gd linéaires et l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  dans le sérum à cause d'un excès de ligands dans la formulation pharmaceutique qui permet la transmétallation du  $\text{Gd}^{3+}$  par du  $\text{Fe}^{3+}$  (Fretellier, 2013). Cette interférence avec le  $\text{Gd}^{3+}$  et l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  n'a pas lieu avec les AC-Gd macrocycliques. Corot *et al.*, (1998) ont également montré que le Gadopentétate de diméglumine (Magnévist®) et le Gadodiamide (Omniscan®) injectés à doses cliniques de 0,1 mmol/kg inhibent significativement l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette enzyme est un dipeptidyl-carboxylase qui sert de puissant vasoconstricteur notamment au niveau du myocarde. Cette inhibition aboutit à une diminution de la pression artérielle se traduisant par une chute de tension pouvant aller jusqu'au malaise.

De nombreux tests de toxicité ont été réalisés chez l'Homme afin de vérifier l'innocuité de l'injection de ces composés lors des examens IRM pour les patients ne présentant pas de prédisposition à la FSN et non allergiques à ces produits de contraste. De récentes études ont mis en évidence une accumulation du  $\text{Gd}^{3+}$  sous sa forme libre ou chélatée dans les tissus des mammifères après administration d'AC-Gd. Chez plusieurs groupes de patients oncologiques, la déposition du Gd a été observée dans les tissus cérébraux, tels que le thalamus, la substance blanche cérébelleuse ou le lobe frontal (Kanda *et al.*, 2015 ; Murata *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017) ; dans les tissus nerveux, comme l'endothélium capillaire ou le tissu interstitiel neural (McDonald *et al.*, 2015) ; et les tissus osseux (os cortical) (Murata *et al.*, 2016) chez l'Homme. L'accumulation de ce Gd administré sous forme de produit de contraste est fonction de la dose administrée, du nombre d'examens IRM avec injection d'AC-Gd passés, mais aussi du type d'AC-Gd injecté au patient. Rogosnitzky *et Branch*, (2016) ont montré que l'accumulation du Gd dans les tissus est plus importante lorsque les AC-Gd injectés sont de type linéaire. En conséquence le PRAC a suspendu les autorisations concernant Multihance®, l'Omniscan®, le Magnévist® et l'OptiMARK® (European Medicines agency, 2017).

Les effets des AC-Gd ont également été montrés sur d'autres organismes en lien avec cette accumulation en Gd dans les tissus. Chez le rat, l'accumulation du Gd a été observée dans le cervelet (Robert *et al.*, 2015) et dans la peau, le foie, et l'os du fémur (Wáng *et al.*,

2015). Wáng et al. (2015) ont comparé l'accumulation du Gd sous forme de Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide) et de Gd-DOTA (acide gadotérique). Ces comparaisons ont montré une accumulation du Gd de 25 et 30 fois plus élevée dans l'os du fémur et le foie, et jusqu'à 180 fois plus fortes dans la peau des individus exposés au Gd-DTPA-BMA (Gadodiamide) que pour les rats traités avec du Gd sous forme de Gd-DOTA (acide gadotérique) (Wáng et al., 2015). La dissociation des produits de contraste gadolinés dans le sang conduit à des lésions cutanées macroscopiques ou à une morbidité des individus allant jusqu'à leur mort (Fretellier, 2013). De même, Bartolini et al. (2003) ont réalisé une étude chez le chien et le rat montrant une accumulation du Gd dans les organes de ces individus. Le Gd s'accumule principalement dans les reins suite à l'injection de Gadotériol (ProHance®) et de Gadopentétate de diméglumine (Magnévist®) ce qui peut être à l'origine de pathologies sévères telles que la FSN.

Les essais de toxicité comprenant les AC-Gd présentés ci-dessus ont été réalisés en raison de leur utilisation médicale, y compris en médecine vétérinaire. A notre connaissance, la toxicité de ces produits de contraste chez d'autres organismes a été peu étudiée. On peut tout de même noter une étude sur les effets de ces AC-Gd sur une plante terrestre, le cresson (*Lepidium sativum*). Lindner et al. (2013) ont montré l'accumulation des AC-Gd dans les différentes parties de la plante après exposition à ces composés *via* l'eau d'arrosage à une concentration de 1 mg/L. Le cresson étant un producteur primaire à la base de la chaîne trophique, ces effets soulèvent donc la question d'une possible accumulation des AC-Gd le long de la chaîne trophique et des effets associés.

D'autre part, en Allemagne, un rapport d'étude basé sur des tests standardisés a montré que les AC-Gd présentaient une toxicité à des concentrations de l'ordre du mg(Gd)/L sur divers organismes du milieu dulçaquicole : les microalgues vertes *Desmodesmus subspicatus* et *Chlorella vulgaris*, le microcrustacé *Daphnia magna* et le poisson *Danio rerio* (Tableau 8).

Tableau 8 : Valeurs des concentrations observées sans effet (NOEC) et des concentrations induisant 50% d'inhibition du paramètre observé (CE<sub>50</sub>) mesurées pour différents organismes dulçaquicoles (Aga, 2008 ; Neubert, 2008)

Classe	Espèce	Spéciation de l'AC-Gd	NOEC	CE <sub>50</sub>	Paramètre
			mg(Gd)/L	mg(Gd)/L	
Microalgues vertes	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Gd-DTPA (Magnévist®)	100	> 100	Croissance à 72h
		Gd-BT-DO3A (Gadovist®)	937	> 1 000	
		MS-325 (Vasovist®)	80	> 1 000	
		Gd-EOB-DTPA (Primovist®)	125	> 1 000	
		Gd-HP-DO3A (Prohance®)	100	> 1 000	
		Gd-DTPA-BMA (Omniscan®)	20	40	
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Gd-BT-DO3A (Gadovist®)	-	[937 ; 2 062]	
Microcrustacé	<i>Daphnia magna</i>	Gd-DTPA (Magnévist®)	10	[937 ; 2 062]	Immobilisation à 48h
		Gd-BT-DO3A (Gadovist®)	10	[937 ; 2 062]	
		Gd-HP-DO3A (Prohance®)	10	[937 ; 2 062]	
		Gd-DTPA-BMA (Omniscan®)	10	[937 ; 2 062]	
Poisson	<i>Danio rerio</i>	Gd-DTPA (Magnévist®)	100	> 100	Biomasse à 96h
		Gd-BT-DO3A (Gadovist®)	100	> 1 000	
		Gd-HP-DO3A (Prohance®)	100	> 1 000	
		Gd-DTPA-BMA (Omniscan®)	100	> 1 000	
		Gd-BT-DO3A (Gadovist®)	-	Pas d'inhibition	







## Chapitre 3 : Voies de contamination du milieu aquatique par les AC-Gd après leur utilisation en IRM

### 1. Excrétion des AC-Gd

La formulation des AC-Gd leur permet d'être rapidement distribués puis excrétés par le patient. La majorité de ces complexes sont hydrophiles, ils sont donc excrétés par le système rénal (Brücher, 2002) (Figure 7) aux exceptions de :

- (i) MS-325 (Vasovist®), qui est employé pour l'imagerie des vaisseaux sanguins
- (ii) Gd-BOPTA (Multihance®) et Gd-EOB-DTPA (Primovist®), qui sont lipophiles et essentiellement employés pour les examens d'imagerie hépatique

En effet, Hao *et al.*, (2012) ont montré que Gd-BOPTA (Multihance®), Gd-EOB-DTPA (Primovist®) et MS-325 (Vasovist®), injectés par voie intraveineuse chez l'homme sont excrétés respectivement à 96%, 50% et 79-94% par le système rénal et à 4%, 50% et ~5% par voie hépatobiliaire (Figure 7).

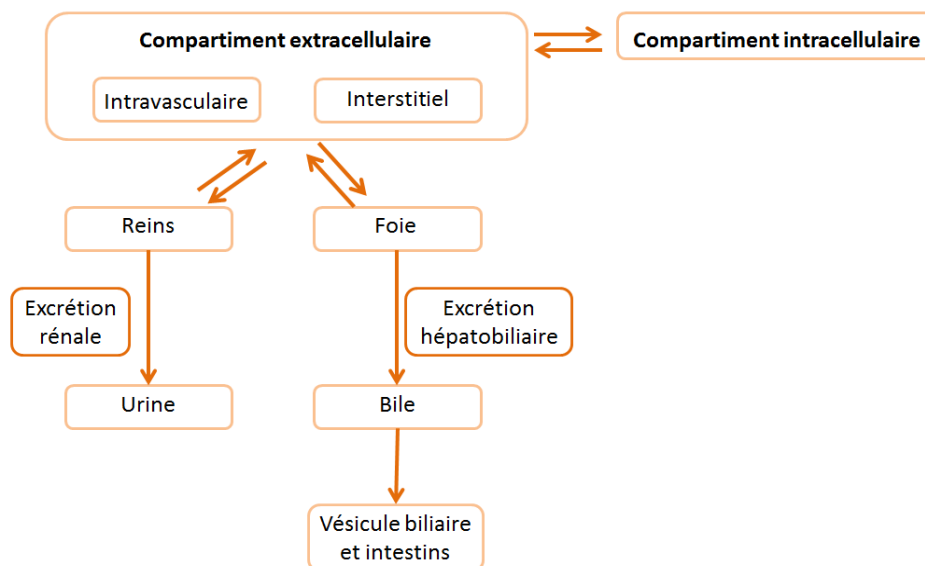


Figure 7: Principaux sites de distribution et voies d'excrétion des complexes gadolinés administrés par voie intraveineuse (Aime et Caravan, 2009)

Après leur excrétion, Kümmerer et Helmers (2000) ont montré que ces agents de contraste sont éliminés du corps du patient par voie urinaire à des concentrations allant de 350 mg(Gd)/L (soit 2,226 mmol/L), au premier jour après leur injection à 7 µg(Gd)/L (soit  $4,452 \cdot 10^{-5}$  mmol/L) par décroissance progressive jusqu'au 39<sup>e</sup> jour après leur injection. Plus de 95% du composé injecté est ainsi éliminé par voie urinaire en moins de 24h.

## **2. Résidus dans les ampoules et seringues employées lors de l'injection du produit**

Lors d'une injection d'agents de contraste au Gd pour un examen IRM, la dose de produit contrastant est adaptée au poids du patient. Une partie du produit pharmaceutique reste donc dans les ampoules ou les flacons dans lesquels les produits sont commercialisés. Ces résidus sont jetés dans les bacs jaunes de déchets médicaux : ce sont des Déchets d'Activités des Soins à Risques (DASRI). Leur retraitement se fait par incinération dans les UIOM (Usine d'Incinération des Ordures Ménagères).

Afin d'acquérir des connaissances sur le protocole employé pour le retraitement de ces DASRI, nous avons réalisé une enquête préliminaire à cette étude. Ces déchets médicaux sont amenés en conteneurs fermés où il n'y a pas de fuites possibles avant leur incinération. Après incinération, les résidus de fumées et de cendres sont transformés en mâchefers. A titre d'exemple, la région Lorraine possède deux UIOM capable de retraiter ce type de déchets : celle de Tronville-en-Barrois (55) et celle de Ludres (54), qui retraitent respectivement 26% et 74% des DASRI appartenant à la région.

Au sein des UIOM, si des tests de lixiviation des mâchefers sont réalisés, il n'existe pas d'étude précise sur la lixiviation du Gd. En théorie, le Gd provenant en partie des AC-Gd reste fixé au sein de ces mâchefers employés pour la construction de diverses routes et autoroutes. De fait, ces composés ne sont pas déversés dans le milieu aquatique environnant et ne sont donc pas rendus biodisponibles pour les organismes.

## **3. Les AC-Gd au cours du processus de retraitement des eaux usées**

La partie des produits contrastants à base de Gd injectée dans le sang puis éliminée par voie urinaire est alors transportée *via* le réseau urbain des eaux usées jusqu'aux stations de retraitement urbaines. En effet, ce type de composé n'est pas considéré par les autorités sanitaires comme un produit toxique nécessitant d'être retraité spécifiquement, comme c'est le cas pour les composés iodés ou radioactifs. Les patients éliminent donc ces AC-Gd dans les sanitaires localisés en dehors des centres médicaux, à l'exception des patients hospitalisés. Les eaux usées sont alors retraitées dans les stations d'épuration (STEP) des villes sans prise en compte spécifique de ce type de déchets pharmaceutiques.

La présence de ces composés gadolinés en STEP augmente de manière non négligeable les concentrations en Gd mesurées dans les eaux attenantes à celles-ci où sont déversées les eaux traitées. Cette part anormale de Gd est ensuite estimée par rapport à la distribution naturelle des REE dont le Gd dans les eaux, soit l'anomalie positive en Gd, qui correspond à la part de Gd apportée par les activités anthropiques. Pour ce calcul, [Taylor et McLennan \(1985\)](#) ont établi différentes tables permettant de normaliser les concentrations en REE en fonction du type de sol, c'est-à-dire de déterminer quelles sont les concentrations en REE considérées comme strictement d'origine géogénique pour les différents types de roches. Certaines de ces tables sont adaptables aux milieux aquatiques en fonction du type de sol puisque la signature de REE retrouvées dans les eaux est la même que celle présente dans les roches au contact de ces eaux ([Cullers, 1994](#) ; [Elbaz-Poulichet et al., 2002](#) ; [Johannesson et al., 2000](#) ; [Laveuf et Cornu, 2009](#)):

- (i) **La table chondritique**, qui a été élaborée pour la normalisation des concentrations en « terres rares » présentes au sein de météorites chondritiques et du manteau primitif des roches ignées. Cette table n'est pas extrapolable aux cours d'eau de surface qui nous intéressent dans cette étude puisque ce ne sont pas des roches en contact avec les eaux de surface et ont donc certainement une signature en REE différente.
- (ii) **La table « *Post Archean Australian Shales* » (PAAS)**, qui a été élaborée comme son nom l'indique pour les schistes argileux post-Archéens en Australie. Cette table peut être extrapolée aux eaux profondes reposant sur un socle argileux.
- (iii) **La table « *Nord American Shale Composition* » (NASC)**, qui a été élaborée à partir de 40 shales<sup>f</sup> en provenance d'Amérique du Nord. Cette table peut être extrapolée aux eaux de surface.
- (iv) **La table « *Upper Continental Crust* » (UCC)**, qui a été élaborée à partir des shales du manteau de la croûte continentale supérieure. Cette table peut être extrapolée aux eaux de surface car elle implique des données de type sédimentaires. Dans la **Partie « Matériel et Méthodes »**, nous verrons que cette table est la plus appropriée à nos conditions géologiques

---

<sup>f</sup> **Shale** = Roche sédimentaire non transformée

En fonction de la table de référence choisie, les concentrations en REE des eaux sont normalisées ce qui permet de lisser ces concentrations sur un spectre plat. Lorsqu'un de ces éléments s'écarte significativement de cette droite alors on considère qu'il y a une anomalie dans la répartition du lanthanide concerné (*Figure 8*).

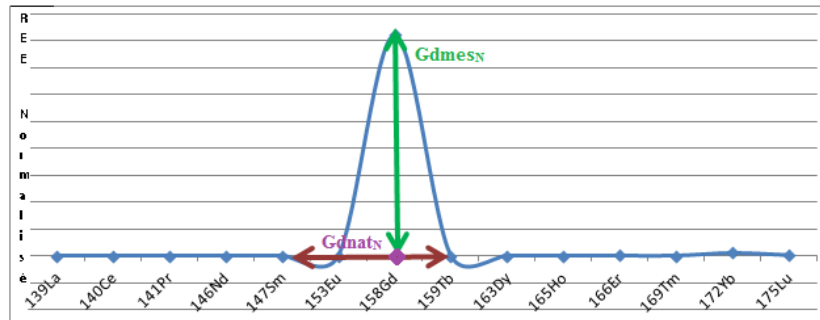


Figure 8 : Représentation graphique du calcul d'anomalie en Gadolinium sur un échantillon d'eau déminéralisée enrichie en Dotarem®.  $Gd_{natN}$  = Gadolinium naturel normalisé ;  $Gd_{mesN}$  = Gd mesuré donc cela correspond à la hauteur de l'anomalie en Gd

Cette anomalie peut être positive (au-dessus du spectre), dans ce cas elle correspond à un enrichissement du milieu par cet élément métallique, ou à l'inverse, l'anomalie peut être négative (au-dessous du spectre), dans ce cas elle correspond à un appauvrissement du milieu par cet élément métallique. L'anomalie en Gd (notée  $Gd^*$ ) permet ensuite de déterminer la part en Gd d'origine anthropique présente dans les eaux. Pour notre étude, le calcul de l'anomalie en Gd en fonction de la table de référence choisie sera détaillé dans la **Partie « Matériel et Méthodes »** de ce document de thèse. La part en Gd d'origine anthropique est estimée en fonction d'un seuil d'anomalie fixé par rapport à l'anomalie mesurée sur un site de référence exempt de Gd d'origine anthropique. Le seuil d'anomalie ( $Gd^*_{seuil}$ ) peut être supérieur ou égal à 1 pour mesurer l'enrichissement en Gd dû à la présence en AC-Gd dans le milieu aquatique. Voici quelques exemples de  $Gd^*_{seuil}$  estimés pour les eaux de surface le long desquelles sont construites des STEP : 1,2 ([Elbaz-Poulichet et al., 2002](#)) et 1,5 ([Rabiet, 2006](#)) pour les eaux du sud de la France ; 1,2 ([Bau et Dulski, 1996](#)) pour les eaux en Allemagne ; 1,3 ([Petelet-Giraud et al., 2009](#)) pour les eaux de la Meuse aux Pays-Bas.

En France, le retraitement des eaux usées en STEP aboutit au rejet d'effluents dans les cours d'eau attenants à ces STEP et à la formation de boues résiduaires (*Figure 9*) répondant aux critères de la Directive Européenne n°91-271 du conseil du 21 mai 1991. Ces boues sont ensuite employées par les communes pour l'épandage agricole, le compostage, l'incinération, la valorisation industrielle ou pour réactiver les boues d'autres STEP. Les eaux usées sont ainsi retraitées de manière à obtenir des effluents de STEP considérés « suffisamment

retraités » (Figure 9) qui seront par la suite déversés dans les cours d'eau attenants à ces stations.

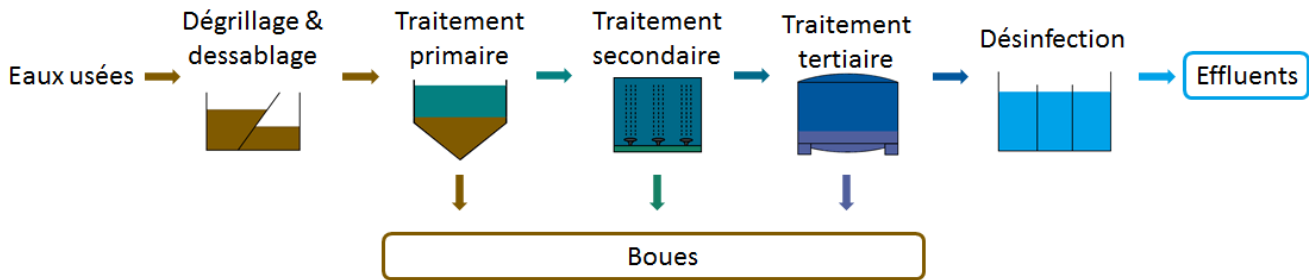


Figure 9 : Diagramme schématisant le fonctionnement interne d'une station de traitement des eaux usées. Inspiré de Verplanck et al., (2010)

### A. Boues résiduelles de STEP

Peu d'études se sont intéressées au comportement des agents de contraste gadolinés en STEP. Afin de déterminer les capacités d'adsorption de produits pharmaceutiques sur les boues résiduelles de STEP, plusieurs coefficients de répartition peuvent être calculés tel que :

- **Le coefficient de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ )**, permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une molécule sur un large gamme de solubilité (Chiou, 2002). Donc si  $\text{Log}(K_{ow}) < 0$ , les produits contrastants sont considérés très solubles dans l'eau donc fortement hydrophiles (Tableau 9).
- **Le coefficient de partage butanol/eau ( $K_{bw}$ )**, permet également d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile d'une molécule de la même manière que le  $K_{ow}$ . Cependant, ce coefficient est employé beaucoup plus fréquemment pour les AC-Gd car, comme l'a présenté Chiou (2002), le coefficient  $K_{bw}$  est préféré au  $K_{ow}$  en raison de la gamme de solubilité restreinte des AC-Gd dans l'eau, ce qui augmente la précision de ce coefficient (Tableau 9).
- **Le coefficient de partage carbone organique/eau ( $K_{oc}$ )**, indique la capacité de la molécule à être adsorbée ou désorbée sur la matière organique. A notre connaissance, ce coefficient n'a jamais été calculé pour les produits de contraste gadolinés.

- **Le coefficient de distribution du composé chimique entre les boues résiduaires et l'eau ( $K_p$ ).** Selon [Kümmerer, \(2008\)](#), on peut estimer  $K_p$  par l'équation de régression : [ $\text{Log}(K_p) = 0,58 \times \text{Log}(K_{ow}) - 0,37$ ] pour les composés zwitterioniques tels que les agents de contraste gadolinés. Les  $\text{Log}(K_p)$  ont ainsi été calculés et présentés dans le *Tableau 9*.

Tableau 9 : Coefficients de partage des agents de contraste et comportement au niveau des boues de STEP.

Principe actif	$\text{Log}(K_{ow})$	$\text{Log}(K_{bw})$	$\text{Log}(K_p)$
	octanol /eau	butanol /eau <sup>f</sup>	boues/eau
<b>Gd-DTPA</b>	-2,8 <sup>a</sup>	-3,16	-1,994
<b>Gd-DTPA-BMA</b>	-4,14 <sup>b</sup>	-2,13	-2,7712
<b>Gd-BOPTA</b>	-	-2,23	-
<b>Gd-EOB-DTPA</b>	-	-2,11	-
<b>MS-325</b>	-	-2,11	-
<b>Gd-DTPA-BMEA</b>	-	-	-
<b>Gd-DOTA</b>	-3,42 <sup>c</sup>	-2,87	-2,3536
<b>Gd-HP-DO3A</b>	-3,68 <sup>d</sup>	-1,98	-2,5044
<b>Gd-BT-DO3A</b>	-5,4 <sup>e</sup>	-2,00	-3,502

<sup>a</sup> [Wiegers et al., \(1992\)](#) ; <sup>b</sup> [Kumar et al., \(1994\)](#) ; <sup>c</sup> [Trivedi et al., \(2014\)](#) ; <sup>d</sup> [Troy \(2005\)](#) ; <sup>e</sup> [Cheng \(2004<sup>b</sup>\)](#) ; <sup>f</sup> [Merbach et al., \(2013\)](#).

Les AC-Gd ont donc un comportement fortement hydrophile ( $\text{Log}(K_{ow})$  et  $\text{Log}(K_{bw}) < 0$ ) et présentent une faible capacité de rétention au sein des boues issues de STEP produites à partir d'eaux usées contenant des produits contrastants gadolinés ( $\text{Log}(K_p) < 0$ ). De fait, peu d'études ont mesuré l'enrichissement de ces boues en Gd d'origine anthropique. [Verplanck et al., \(2010\)](#) ont comparé l'enrichissement en REE au sein des produits intermédiaires et finis obtenus lors du retraitement des eaux usées en station d'épuration (*i.e.* avant et après chaque traitement (primaire, secondaire et tertiaire) et au niveau de l'effluent de STEP). Ces auteurs ont pu montrer que les boues de STEP ne présentaient pas d'enrichissement en Gd pouvant correspondre à du Gd d'origine anthropique. Une seconde étude a montré que les concentrations en Gd d'origine anthropique pouvaient diminuer d'environ 10% entre l'entrée et la sortie de la station sans pour autant que ce Gd soit absorbé sur les boues activées au cours de leur digestion anaérobie ([Telgmann et al., 2012<sup>a</sup>](#)). L'absence d'absorption de ces composés gadolinés par les boues résiduaires de STEP a permis de focaliser la majorité des études mesurant les concentrations en Gd sur les données de la phase aqueuse tout au long du retraitement des eaux usées.

## **B. Eaux usées retraitées en STEP**

Le Gd d'origine anthropique mesuré dans les eaux usées au cours des différents traitements dans les stations d'épuration est de l'ordre de quelques centaines de ng/L (Migaszewski et Gałuszka, 2016 ; Telgmann et al., 2012<sup>b</sup> ; Verplanck et al., 2010) mais peut atteindre quelques centaines de µg/L (ONEMA-INERIS, 2009). Plusieurs études ont montré que la part en Gd d'origine anthropique retrouvée dans la phase dissoute en STEP représentait de 90% (Möller et al., 2002) à 97% (Migaszewski et Gałuszka, 2016) du Gd total mesuré dans ces fractions aqueuses.

De plus, la charge en Gd d'origine anthropique dans l'eau entre l'entrée et la sortie de la STEP est variable selon le jour de la semaine et fluctue tout au long de la journée (Telgmann et al., 2012<sup>b</sup> ; Knappe et al., 2005). Telgmann et al., (2012<sup>b</sup>) ont montré qu'à l'entrée de la STEP, avant le retraitement de ces eaux usées, les concentrations en Gd d'origine anthropique augmentent fortement les lundis et les mardis avec des concentrations de l'ordre 510 et de 750 ng/L de Gd respectivement en raison de la reprise des examens IRM au début de la semaine. Ensuite ces concentrations diminuent progressivement jusqu'au dimanche où elles sont de l'ordre de 40 ng/L puisque les examens IRM sont inexistantes les week-ends. Telgmann et al., (2012<sup>b</sup>) ont aussi mis en évidence qu'en sortie de STEP, suite au retraitement des eaux usées, les concentrations en Gd d'origine anthropique montrent moins de variations tout au long de la semaine. Ils ont montré que la charge en Gd d'origine anthropique était accrue les mardis et les mercredis à des concentrations de l'ordre de 390 et 450 ng/L puis suivait un même schéma décroissant au cours de la semaine. Ce schéma est identique à celui de la fréquence des examens IRM avec un décalage de 24 heures correspondant au temps de rétention dans les STEP. De même, ce décalage constant de 24h a également été montré avec des concentrations en Gd mesurées dans l'effluent de STEP plus élevées le matin en lien avec les concentrations en AC-Gd plus importantes au réveil dans les urines des patients (Telgmann et al., 2012<sup>b</sup>).

## **4. Présence des AC-Gd dans le milieu aquatique**

Après leur retraitement, les effluents sont rejetés dans les cours d'eau attenants à ces STEP. Plusieurs études ont mis en évidence que les AC-Gd poursuivent leur transfert vers le milieu aquatique naturel. En Allemagne, quatre de ces composés (Gd-DTPA - Magnévist®,



Gd-BOPTA – Multihance®, Gd-DOTA - Dotarem® et Gd-BT-DO3A - Gadobutrol®) ont été fréquemment détectés et ont permis d'établir un ratio de chaque AC-Gd présent par rapport au Gd total mesuré dans les échantillons d'eau (*Tableau 10*). Dans ces études, le pourcentage des concentrations en AC-Gd totales par rapport au Gd total mesuré dans ces échantillons d'eau ( $\Sigma$ AC-Gd) a été considéré comme étant équivalent au pourcentage en Gd d'origine anthropique par rapport au Gd total (*Tableau 10*).

Tableau 10 : Pourcentage d'AC-Gd par rapport au Gd total mesuré au niveau de différents sites en Allemagne

	Gd-DTPA	Gd-BOPTA	Gd-DOTA	Gd-BT-DO3A	Autres AC-Gd*	$\Sigma$ AC-Gd	Méthode d'analyse	Références
<i>Effluent de STEP</i>								
Münster	nd	< LOQ	< LOQ	100,00	nd	100,00	HILIC /ICP-MS	Künemeyer et al., 2009
Berlin - Teltow channel	nd	nd	50,35	48,25	nd	98,60		Lindner et al., 2013
Münster	23,85	nd	9,08	41,38	nd	74,31	HILIC /ICP-SFMS	Birka et al., 2013
<i>Eau de surface</i>								
Berlin - Teltow channel	nd	nd	39,45	38,53	nd	77,98	HILIC /ICP-MS	Lindner et al., 2013
Haltern am See	52,44	nd	17,92	< LOQ	nd	70,36		
Rurh proximité Soest	100,00	nd	< LOQ	< LOQ	nd	100,00		
Rurh proximité Iserlohn	69,92	nd	< LOQ	30,08	nd	100,00		
Rurh proximité Bochum	50,22	nd	24,24	12,99	nd	87,45		
Rurh proximité Essen amont	41,32	nd	25,21	20,25	nd	86,78		
Rurh proximité Essen aval	52,45	nd	32,08	14,34	nd	98,87		Birka et al., 2016 <sup>b</sup>
<i>Eau de distribution</i>								
Berlin -Salzufer	nd	23,41	38,18	35,00	nd	96,59	HPLC /ICP-MS	Lindner et al., 2015
Berlin -Westend	nd	20,53	33,68	30,88	nd	85,09		
Haltern am See	62,60	nd	< LOQ	nd	nd	62,60	HPLC /ICP-MS	Birka et al., 2016 <sup>b</sup>
Rurh proximité Soest	82,00	nd	nd	nd	nd	82,00		
Rurh proximité Iserlohn	76,42	nd	nd	< LOQ	nd	76,42		
Rurh proximité Bochum	58,51	nd	23,94	< LOQ	nd	82,45		
Rurh proximité Essen amont	40,94	nd	24,83	< LOQ	nd	65,77		
Rurh proximité Essen aval	47,69	nd	20,37	< LOQ	nd	68,06		

\*Autres AC-Gd = Gd-DTPA-BMA, Gd-EOB-DTPA, MS-325, Gd-DTPA-BMEA, Gd-HP-DO3A ; nd = non déterminé ou non détecté ; < LOQ = détecté mais inférieur à la limite de quantification.

### A. Les AC-Gd dans les effluents de STEP

Au niveau des sorties de STEP, de nombreux résidus médicamenteux sont rejetés dans le milieu aquatique. A l'heure actuelle, il n'y a aucune réglementation concernant le rejet des AC-Gd. Seul le rejet des produits anticancéreux radioactifs est réglementé, leur radioactivité devant être atténuée voire supprimée avant leur rejet dans le milieu aquatique.

En Australie, [Lawrence et al., \(2010\)](#) ont présenté un processus d'ultrafiltration des AC-Gd permettant d'éliminer le Gd d'origine anthropique dans les effluents de STEP jusqu'à des concentrations de l'ordre de 200 pM (soit environ 30 ng/L). Cependant, ce système n'existe pas pour les STEP européennes actuellement. Des études de spéciation ont permis de mettre en évidence que la part principale de Gd d'origine anthropique retrouvée dans ces effluents correspond aux trois agents de contraste les plus fréquemment employés : Gd-DTPA (Magnévist®), Gd-DOTA (Dotarem®) et Gd-BT-DO3A (Gadovist ®) ([Telgmann et al., 2012<sup>b</sup>](#) ; [Birka et al., 2016<sup>b</sup>](#) ; *Tableau 10*). Dans les cas où la spéciation des agents de contraste n'a pas été réalisée, les études ont mis en évidence que la part en Gd d'origine anthropique estimée augmentait proportionnellement par rapport aux concentrations en Bore mesurées dans les effluents de STEP ([Barber et al., 2015](#) ; [Knappe et al., 2005](#) ; [Rabiet, 2006](#)). Le Bore est un marqueur des effluents urbains puisqu'il est très présent dans les détergents et les lessives à usage domestique ([Rabiet, 2006](#)). En 2006, [Rabiet](#) a montré que la signature chimique des effluents de STEP est marquée par une prédominance de Bore qui représente plus de 50% de la concentration en éléments traces métalliques mesurée dans ces effluents. Plusieurs études ont approuvé l'efficacité du Gd d'origine anthropique en tant que traceur des effluents urbains : ([Bau et al., 2006](#) ; [Elbaz-Poulichet et al., 2002](#) ; [Merschel et Bau, 2015](#) ; [Rabiet et al., 2009](#) ; [Reinstorf et al., 2008](#) ; [Telgmann et al., 2013](#)). Ces rejets de Gd d'origine anthropique dans le milieu aquatique environnant ont un impact significatif sur la distribution des REE dans les eaux de surface, en fonction de la densité de population au sein des villes proches de ces points d'eau.

## **B. Eaux de surface**

[Telgmann et al., \(2012<sup>b</sup>\)](#) et [Birka et al., \(2013\)](#) ont montré que la majeure partie du Gd d'origine anthropique retrouvé en rivière est sous la forme d'agent de contraste employé en IRM, donc chélaté à des ligands spécifiques et connus. Ceci est particulièrement vrai pour les agents de contraste macrocycliques tels que l'acide gadotérique (Dotarem®) et le gadobutrol (Gadovist®) en raison de leurs fortes stabilités cinétique et thermodynamique ([Bonnet, 2006](#) ; [Port et al., 2008](#)). En France, ces concentrations en Gd d'origine anthropique varient de quelques ng/L à près de 200 ng/L dans les eaux de surface ([ONEMA-INERIS, 2009](#)). La répartition du Gd d'origine anthropique est modulée le long des rivières par la présence de STEP le long du cours d'eau. Plus la densité de population est importante, plus le nombre

d'examens IRM est conséquent et plus la quantité de Gd d'origine anthropique rejeté au niveau des sorties de STEP est importante (Kulaksız et Bau, 2013). Ceci entraîne donc l'augmentation des concentrations en Gd d'origine anthropique dans les cours d'eau en aval de ces stations (Reinstorf et al., 2008).

Ces effluents sont ensuite dilués dans le cours d'eau, ce qui diminue les concentrations en Gd d'origine anthropique au fur et à mesure de leur dispersion en aval des STEP. En effet, la forte stabilité et la solubilité des AC-Gd leur permet d'être dispersés loin en aval de la station. Birka et al., (2016<sup>b</sup>) ont mesuré des concentrations en Gd sous forme de Gd-DTPA (Magnévist®), Gd-DOTA (Dotarem®) et Gd-BT-DO3A (Gadovist ®) décroissantes (de 41,199 à 13,838 ng/L) sur un tronçon de environ 90 km le long de la Ruhr se jetant dans le Rhin (Tableau 10). De même en Pologne, Migaszewski et Gałuszka (2016) ont pu identifier la présence de ces AC-Gd à plus de 15 km en aval de la STEP rejetant ces composés pharmaceutiques.

En dehors du phénomène de dilution, d'autres paramètres vont probablement jouer sur la répartition de ce Gd d'origine anthropique tels que la libération de l'ion  $Gd^{3+}$  par transmétallation avec d'autres ions métalliques compétiteurs. Lorsque le Gd est libéré sous forme ionique il est adsorbé par la matière organique puis sédimente rapidement. Le Gd d'origine anthropique retrouvé dans la colonne d'eau est donc exclusivement sous la forme de complexes de Gd solubles, biodisponibles pour les organismes aquatiques vivant dans cet environnement aquatique.

### ***C. Nappes phréatiques***

L'infiltration des eaux jusque dans les nappes phréatiques transporte également une partie de ce Gd d'origine anthropique. C'est pour cette raison que des anomalies positives en Gd ont pu être relevées dans les nappes souterraines bien que les concentrations en Gd mesurées dans ce type de milieu soient beaucoup plus faibles que celles relevées dans les eaux de surface. Par exemple, d'après Möller et al., (2000), les concentrations en Gd mesurées dans la nappe phréatique sont de l'ordre de 0,08 ng/L alors que dans les eaux de surface elles sont de l'ordre de 3 ng/L.

D'autre part, au cours d'une campagne nationale d'échantillonnage pour déterminer la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux destinées à la consommation humaine,

Py *et al.*, (2011) ont montré que certaines nappes phréatiques présentait des concentrations supérieures à 5 ng/L en Gd d'origine anthropique.

#### **D. Eau de boisson**

De nombreuses nappes phréatiques ainsi que des eaux de surface sont employées en tant que zones de captage pour les eaux destinées à la consommation humaine.

En Allemagne, plusieurs études récentes ont montré la présence non négligeable d'AC-Gd dans l'eau de distribution (*Tableau 10*). En 2014, Tepe *et al.*, ont montré que 56 à 98% du Gd mesuré dans l'eau de distribution de la partie ouest de Berlin était présent sous forme de Gd d'origine anthropique lié à l'utilisation d'agents de contraste au Gd lors d'examens IRM. De même, Lindner *et al.*, (2015) ont pu mettre en évidence la présence de 3 AC-Gd dans l'eau potable berlinoise : l'acide gadotérique (Dotarem®), le gadobénate de diméglumine (Multihance®) et le gadobutrol (Gadovist®). A Berlin, ces trois produits contrastants ont été mesurés à des concentrations de l'ordre de 10 à 20 ng/L dans l'eau de distribution, et ces mêmes composés ont été retrouvés dans les eaux de surface, indiquant leur infiltration dans les eaux souterraines avant leur captage pour leur utilisation domestique (Lindner *et al.*, 2015). En 2016, Birka *et al.*,<sup>b</sup> ont montré un impact direct du Gd d'origine anthropique retrouvé en eaux de surface sur la quantité de ce Gd retrouvée dans l'eau de boisson. En effet, les concentrations en AC-Gd mesurées ont été augmentées pour l'eau de boisson produite à partir d'un réseau d'ouvrages hydrauliques localisé en aval de zones urbaines fortement peuplées, contrairement à celles mesurées dans l'eau de boisson produite à partir du même type d'installations localisées en amont de ces zones (Birka *et al.*, 2016<sup>b</sup>).

D'autre part, le traitement de l'eau servant à sa potabilisation ne semble pas dégrader ces complexes gadolinés que ce soit lors de leur irradiation aux UV ou lors de leur ozonation (Birka *et al.*, 2016<sup>a</sup>). Ils se retrouvent donc dans les eaux destinées à la consommation humaine sans aucun contrôle des autorités sanitaires.

## 5. Conséquences de la présence des AC-Gd dans le milieu aquatique

La présence et la stabilité de ces AC-Gd dans les différents compartiments du milieu aquatique les rendent biodisponibles pour un certain nombre d'organismes aquatiques tels que les algues, les crustacés, les mollusques, ou les poissons. Or, les études de toxicité et de bioaccumulation conduites jusqu'alors ont d'avantage été réalisées sur les organismes mammifères que sur les organismes aquatiques (*Desmodemus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*) (Aga, 2008 ; Neubert, 2008), à des concentrations similaires à celles injectées dans le sang du patient lors d'un examen IRM.

Peu d'études ont porté sur les effets de ces AC-Gd sur des organismes dulçaquicoles. Ces études se sont attachées à montrer la toxicité à des composés à des concentrations de l'ordre du mg(Gd)/L, mais ne se sont pas intéressées à l'accumulation des AC-Gd dans les organismes ni le long de la chaîne trophique. Pourtant, ce type d'accumulation a de nombreuses fois été montré dans la littérature pour d'autres composés tels que :

- les complexes métalliques et organométalliques (Mason, 2013)
- les produits organiques (Bergmann et al., 2015 ; Gobas et al., 2016)
- les produits pharmaceutiques (Zenker et al., 2014)

Les AC-Gd ont donc largement été étudiés d'un point de vue médical, mais le manque certain d'informations concernant les effets de ces produits, d'un point de vue environnemental nous a amené à étudier leur écotoxicité. De fait, il apparaît crucial de remédier à ce manque de connaissances pour compléter les études sur les AC-Gd d'un point de vue environnemental.





## ***Partie 2 : Matériel et Méthodes***

---





## Chapitre 1 : Mesures du Gd

### 1. Choix des sites d'étude

Une enquête préliminaire réalisée sous forme de questionnaire téléphonique, a permis d'obtenir des informations concernant l'utilisation des AC-Gd pour chaque centre de soin (hôpitaux, cliniques, centres de radiologie) de la région Lorraine. Le type d'AC-Gd employé, le nombre de patients auxquels sont injectés ces produits par an et le mode de traitement des déchets ont été répertoriés. Ces données sont présentées en *Annexe 1*. L'enquête préliminaire a permis de voir que les centres de soin ne traitent pas directement les rejets en AC-Gd, car la majorité des patients auxquels ont été injectés ces produits ne séjournent pas sur place. Les critères de choix de nos sites d'étude ont alors été basés sur la probabilité de retrouver ces produits dans les eaux en lien avec les stations de traitement des eaux usées urbaines. 23 sites spécifiques ont été choisis pour cette étude (*Figure 10* et *Tableau 11*)

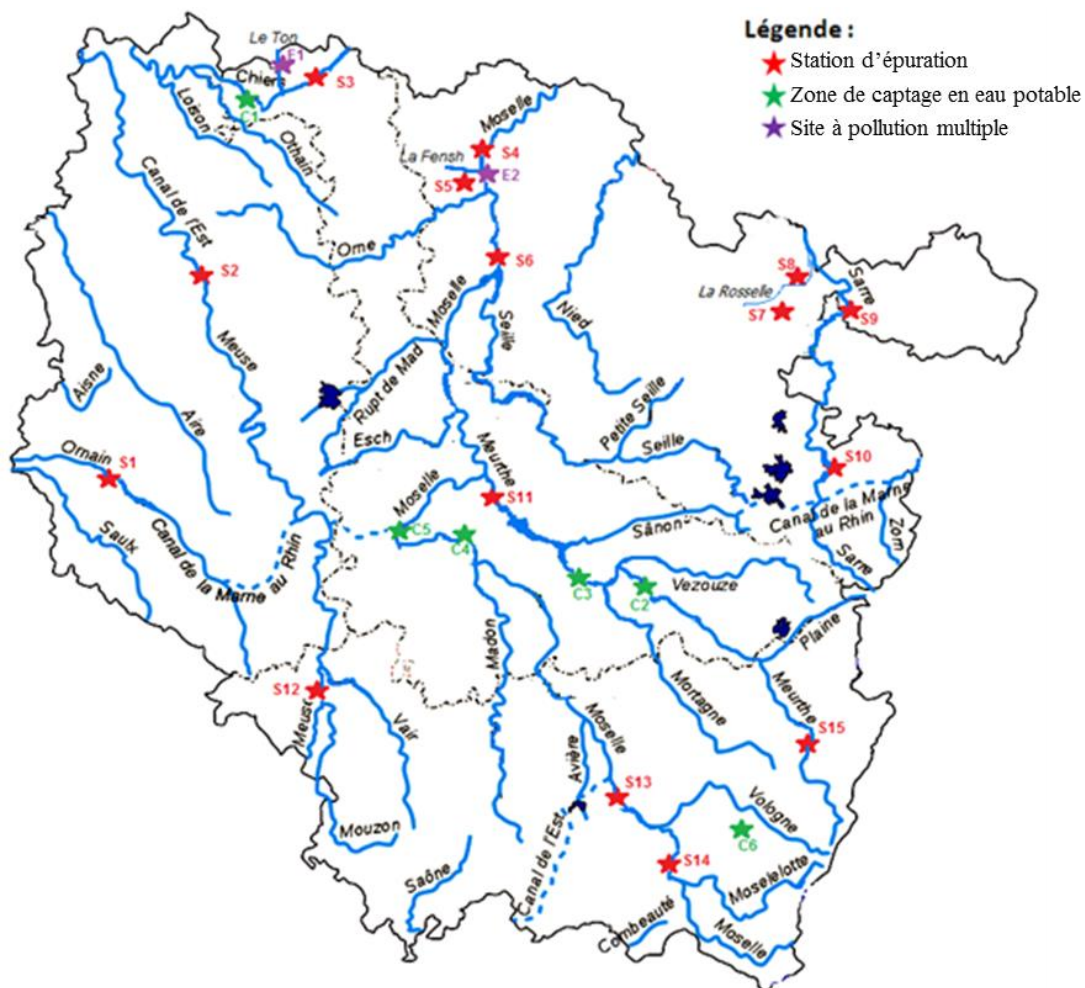


Figure 10 : Carte des points de prélèvement en Lorraine

Tableau 11 : Liste des sites choisis pour notre étude (stations d'épuration (STEP), zones de captage en eau potable (ZC) et sites à pollution multiple (PW)). Les STEP ont été déterminées à partir des données de [www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr](http://www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr)

Site	Ville	Cours d'eau	Coordonnées GPS		Infos complémentaires	
STEP	Nom (Dpt)	Nom	°N	°E	Capacité d'accueil de la STEP en EH	Types de traitements (données 2012) *
S1	Bar-le-Duc (55)	L'Ornain	48,790669	5,145065	35 000	DERU, BAA, Comp (100%)
S2	Verdun (55)	La Meuse	49,176718	5,363711	52 500	T2, Pr, Bf, Ep(100%)
S3	Longwy (54)	La Chiers	49,486763	5,720932	64 000	DERU, BAA, Ep(100%)
S4	Thionville (57)	La Moselle	49,363961	6,183195	28 800	DERU, BAA, Comp (100%)
S5	Briey (54)	Le Woigot	49,240550	5,945817	16 000	DERU, Bam, SA, Ep(100%)
S6	Metz (57)	La Moselle	49,143911	6,197777	440 000	DERU, Pr, Dec, Baf, St, Esg, Ep(100%)
S7	Saint-Avold (57)	La Rosselle	49,109035	6,733601	24 300	DERU, Pr, BAA, St, Esg, Comp(100%)
S8	Freyming-Merlebach (57)	La Rosselle	49,146028	6,820968	49 300	DERU, BAA, Esg, Comp(100%)
S9	Sarreguemines (57)	La Sarre	49,126242	7,044551	68 300	DERU, Esg, Bio, Ep(100%)
S10	Sarrebourg (57)	La Sarre	48,756420	7,066297	37 000	DERU, BAA, Bam, St, Esg, SeT, Ep(100%)
S11	Nancy (54)	La Meurthe	48,712911	6,174973	500 000	DERU, Pr, Dec, Bam, Baf, St, DC, Esg, SeT, SA, Comp(39,7%), Ep (60,3%)
S12	Neufchâteau (88)	La Meuse	48,371089	5,693349	18 000	DERU, Bam, Ep(100%)
S13	Epinal (88)	La Moselle	48,212785	6,443515	80 000	DERU, Pr, BAA, DC, Esg, Val(58,9%), Comp(41,1%)
S14	Remiremont (88)	La Moselle	48,022619	6,594981	26 200	DERU, BAA, Esg, Val(54,5%), Comp(45,5%)
S15	Saint-Dié-des-Vosges (88)	La Meurthe	48,316204	6,913969	40 000	DERU, BAA, St, Esg, Val(46,4%), Comp(53,6%)
ZC	STEP en Amont					
C1	Montmédy (55)	La Chiers	49,520540	5,380985	S3	
C2	Lunéville (54)	La Meurthe	48,580556	6,508525	S15	
C3	Blainville-sur-l'eau (54)	La Meurthe	48,559230	6,422078	S15	
C4	Méreville/Richardmémil (54)	La Moselle	48,600822	6,151403	S13, S14	
C5	Toul (54)	La Moselle	48,658544	5,891885	S13, S14	
R	Liézey (88)	Nappe phréatique	48,101081	6,805578	-	
PW	Rejets en Amont					
PW1	Écouvieux (54)	Le Ton	49,524836	5,460395	Papeteries	
PW2	Maison Neuve (57)	La Fensch	49,328137	6,153051	Sidérurgies et +150 m aval rejet de STEP de Florange (54)	

\* DERU : Traitement secondaire + Dénitrification + Déphosphatation, BAA : Eau- Boue activée aération prolongée (très faible charge), Baf : Eau - Boue activée faible charge, Bam : Eau - Boue activée moyenne charge, Pr : Eau – Prétraitements, Dec : Eau - Décantation physique, Bio : Eau – Biofiltre, St : Eau - Stockage avant traitement, DC : Eau - Désodorisation chimique, SA : Boue - Stabilisation aérobie, Esg : Boue - Epaissement statique gravitaire, SeT : Boue - Séchage thermique, Comp : Compostage des boues, Ep : Epandage des boues, Val : Valorisation industrielle des boues.

Ces sites correspondent à :

- **30 sites localisés à proximité en amont et en aval des 15 stations d'épuration** (STEP numérotées : S<sub>x</sub>) ayant les plus fortes capacités de traitement des eaux usées en équivalent habitant (EH) en Lorraine (Tableau 11).

- **5 sites localisés à proximité de ressources en eau potable (ZC)** destinées à la consommation humaine à partir d'eaux de surface. Ces sites ont été choisis en raison de leur localisation en aval éloigné des STEP précédemment définies (*Tableau 11*).
- **un site de référence (R)** localisé à Liézey dans les Vosges (88). Ce site a été choisi suite aux résultats obtenus par l'ANSES en 2011 (*Py et al.*). Ce site correspond à une zone de captage en eau potable à partir d'eau provenant de la nappe phréatique protégée qui s'étend majoritairement sous des exploitations sylvicoles sans apport anthropique externe. Le site de référence n'est donc pas susceptible de présenter de contamination au Gd d'origine anthropique. Bien que la nature du socle géogénique sur lequel se trouve la nappe phréatique soit probablement un peu différente de celle des autres sites d'étude localisés en eau de surface, ce site de référence reste le plus approprié pour notre étude locale à l'échelle de la région Lorraine (*Tableau 11*).
- **2 sites (en eaux de surface) localisés à proximité en aval de sites industriels** et considérés comme pollués (PW) (*Tableau 11*).

Les prélèvements d'eau ont été réalisés à 50 m en amont et en aval des rejets de STEP, des zones de captage en eau potable et ces prélèvements ont été effectués en eau courante pour les deux sites « à pollution multiple ». Pour chaque site, les échantillons d'eau ont été prélevés à 10 cm de la surface en eau courante à une distance d'environ 2 m de la berge à l'aide d'une canne de prélèvement. Concernant le site de Liézey (88), le prélèvement a été réalisé directement au niveau de la zone de captage. Chacun de ces prélèvements a été réalisé dans des flacons en polyéthylène haute densité (Falcon 100 mL HDPE) pour chaque site d'étude. Ces flacons proviennent d'un même lot pour lequel l'absence de traces de REE a préalablement été vérifiée par analyses ICP-MS dans ces contenants. Ces prélèvements ont été réalisés en triplicats à quelques secondes d'intervalle par site pour chaque campagne de prélèvement.

Plusieurs campagnes de prélèvements ont été effectuées au cours de deux périodes de hautes eaux (hiver 2014 et 2015) et d'une période de basses eaux (été 2014). Suite aux observations de *Telgmann et al. (2012<sup>b</sup>)* (*cf. p 47*), les plages horaires entre 8 h et 13 h du mardi au vendredi ont été choisies afin de resserrer la période de prélèvement au moment des plus forts rejets en Gd d'origine anthropique.

D'autres prélèvements ont été réalisés au cours de la seconde période de hautes eaux et de la période de basses eaux. Cet échantillonnage a permis de réaliser des suivis de

concentrations en Gd d'origine anthropique en aval des deux stations d'épuration ayant les plus fortes capacités de retraitement des eaux usées en Lorraine (Nancy (S11) et Metz (S6). Ces prélèvements ont été automatisés à l'aide de deux autopréleveurs pendant une journée (prélèvements toutes les heures) et pendant 14 jours consécutifs (prélèvements à 9h, 10h, 11h, 14h, 15h et 16h).

Lors de la seconde période de hautes eaux, des triplicats d'eau du robinet ont été prélevés à proximité des zones de captage en eau potable afin de déterminer, à titre indicatif, la présence éventuelle de Gd d'origine anthropique dans ces échantillons.

## 2. Techniques et analyses du Gd

Ne disposant pas des technologies nécessaires pour une mesure directe des AC-Gd, la présence des AC-Gd a été suivie de manière indirecte par dosage du  $Gd^{3+}$ . Les concentrations en Gd et en autres ions métalliques, ont été mesurées dans les échantillons par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) (XSeries II ICP-MS, Thermo Fisher Scientific) au Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) de l'ANSES. Deux types d'analyses ont été réalisés par ICP-MS :

- (i) **Le dosage complet des ions métalliques de l'échantillon** (REE, y compris le Gd (*Tableau 12*) et autres éléments métalliques (ISO 17294-2, 2016), a été effectuée dans les échantillons d'eau prélevés *in situ*. Les REE sont nécessaires au calcul de l'anomalie en Gd et les autres ions seront utilisés pour l'étude des paramètres physicochimiques des échantillons.
- (ii) **Le dosage du  $Gd^{3+}$  seul** a été réalisé dans les tissus des organismes aquatiques exposés au produit de contraste.

Tableau 12 : Isotopes majoritaires des terres rares mesurés par ICP-MS.

REE	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Isotopes	139	140	141	146	147	153	158	159	153	165	166	169	172	175

### A. Mesure des éléments métalliques par analyse ICP-MS

Chaque échantillon a été préalablement acidifié à 1% (v:v) avec de l'acide nitrique ( $HNO_3$ ) 70% (qualité Ultra pure) juste après le prélèvement. Les échantillons ont ensuite été

stockés à 4°C à l'abri de la lumière. L'analyse des échantillons par ICP-MS consiste en 3 grandes étapes comme présenté sur la *Figure 11* :

- (i) **L'introduction d'une solution** à analyser dans un plasma induit par nébulisation permettant de faire passer l'échantillon de l'état liquide à l'état de vapeur sous forme de gouttelettes de quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre. Au cours de cette nébulisation, les processus de transfert de l'énergie engendrés par le plasma provoquent la désolvatation, l'atomisation et l'ionisation des éléments. Ceux-ci sont ensuite amenés vers l'entrée de l'équipement via un fluide porteur (Argon). La torche à plasma est composée d'un miroir en argent pour recentrer le flux afin d'éviter la dispersion des éléments métalliques. L'échantillon passe alors par une chambre de collision/réaction (CCR) qui permet d'éviter les interférences entre les éléments métalliques. Cela consiste en l'ajout d'un fluide (Hélium) qui permet de dissocier les derniers groupements d'ions pour que chaque élément métallique soit individualisé. Ces groupements peuvent être dus à la présence d'isotopes naturellement stables de même masse, la formation d'oxydes ou d'hydroxydes dans le plasma, l'association d'ions doublement chargés.
- (ii) **L'extraction des ions du plasma** est réalisée par une interface sous vide à pompage différentiel avec un jeu de cônes  $X_t$  (« *sampler cone* ») et  $X_s$  (« *skimer cone* ») qui permettent de récupérer la partie centrale du flux. Ce flux passe ensuite par une optique ionique intégrée. La séparation des ions est effectuée sur la base de leur rapport masse-charge au moyen d'un spectromètre de masse. Ces lentilles vont alors concentrer, maintenir, sélectionner les couches externes du flux et le recentrer avant son arrivée au détecteur pour en limiter l'éblouissement.

- (iii) **La détection des éléments métalliques** se fait suite au passage des ions sur une série de lentilles électroniques. Ces ions sont ensuite détectés à l'aide d'un détecteur de masse utilisant un montage à multiplicateur d'électrons à dynode en continu. L'information ionique est alors traitée par un système de traitement des données.

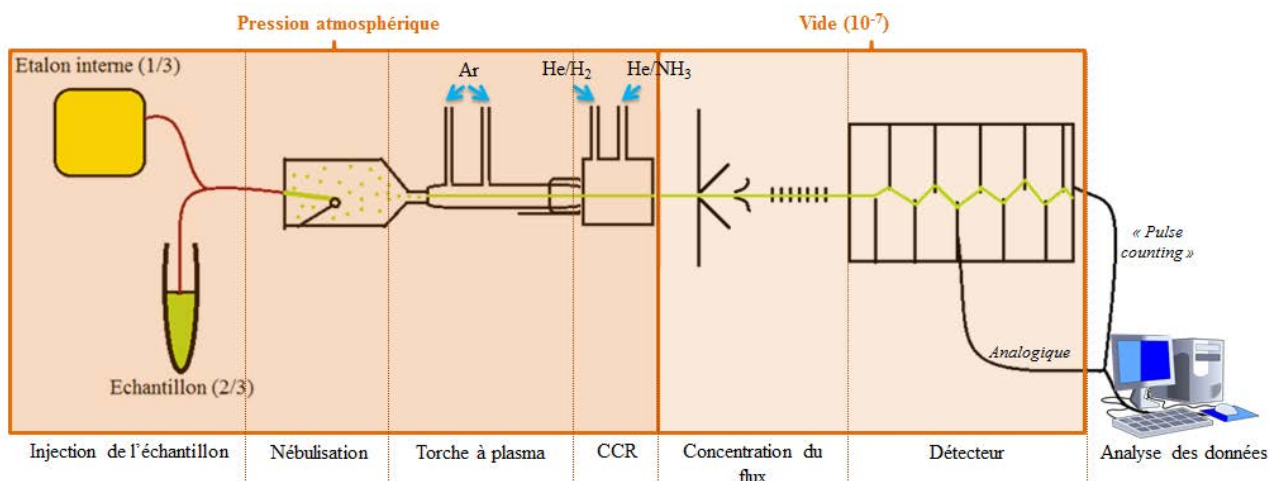


Figure 11 : Schéma explicatif du fonctionnement de l'ICP-MS

Sur cet équipement, un étalon interne (le Rhodium) est employé pour corriger les dérives instrumentales et celles liées à la matrice tout au long de l'analyse. Au début de chaque série d'analyses, une gamme étalon de 10, 20, 50, 100, 1 000, 10 000 et 100 000 ng/L en REE a été réalisée pour quantifier les éléments métalliques détectés suite à leur passage dans l'équipement ICP-MS. Cette gamme est réalisée à partir de la solution mère de REE Fluka®:78334 contenant 10 mg/L de chaque élément (Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb et Lu) dans 5% d'acide nitrique et à partir d'autres éléments métalliques à partir de la solution mère Fluka®:10711-SPEC contenant 10 mg/L de chaque élément (Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cs, Cr, Co, Cu, Ga, Hf, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, Nb, P, K, Re, Rb, Se, Si, Ag, Na, Sr, S, Ta, Te, Tl, Sn, Ti, W, U, V, Zn et Zr) dans 5% d'acide nitrique. Chaque échantillon est mesuré en triplicat par l'appareil afin d'améliorer la précision de la mesure.

Lors d'une analyse complète en REE d'un échantillon, la limite de quantification des éléments métalliques est de 10 ng/L, alors qu'au cours de l'analyse permettant de doser uniquement le Gd, cette limite est de 1 ng/L. La limite de détection pour tous les éléments est de 1 ng/L.

## B. Détermination de l'anomalie en Gd

Afin de calculer la part en Gd d'origine anthropique des échantillons étudiés, c'est-à-dire la partie anormale de la concentration en Gd total mesuré dans les échantillons, la valeur de cette anomalie a été déterminée selon plusieurs critères. Le premier critère consiste à normaliser les concentrations en Gd obtenues pour les différents échantillons testés à partir des autres REE voisines. Pour cela, des tables de référence préétablies sont employées (Taylor et McLennan, 1985).

Le choix de la table de référence a été basé sur deux tables de références pouvant correspondre aux critères pédologiques des sols sédimentaires de la région Lorraine : la table NASC (*Nord American Shale Composition*) et la table UCC (*Upper Continental Crust*). Une comparaison de ces deux tables a été effectuée sur les échantillons de la première période de hautes eaux (*Annexe 2*). Les valeurs des concentrations en Gd d'origine anthropique calculées à l'aide de ces deux tables ont mis en évidence une différence significative dans 56% des cas. Au vu de ces observations, nous avons choisi d'employer la table UCC qui permet de normaliser les concentrations en REE de (*Tableau 13*) et autres éléments métalliques (Cs, Ba, Rb, Sr, Pb, Th, U, Zr, Hf, Sn, Nb, Mo, W, Cr, V, Sc, Ni, Co, Cu, Ga, Bi et B) afin d'étudier les données obtenues sur site sédimentaire (Taylor et McLennan, 1985). Cette table est la plus appropriée puisque le prélèvement des échantillons est réalisé en eaux de rivières dont le socle géologique correspond à des sites sédimentaires.

Tableau 13 : Valeurs de normalisation de la table de référence Upper Continental Crust employées pour les eaux continentales (en ng/L)

REE	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Coef UCC	20.10 <sup>6</sup>	42.10 <sup>6</sup>	4,9.10 <sup>6</sup>	20.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	3,4.10 <sup>6</sup>	0,57.10 <sup>6</sup>	3,4.10 <sup>6</sup>	0,74.10 <sup>6</sup>	2,1.10 <sup>6</sup>	0,3.10 <sup>6</sup>	2.10 <sup>6</sup>	0,31.10 <sup>6</sup>

A partir de la table choisie, le degré de l'anomalie en Gadolinium a été calculé. L'anomalie en Gd (*Figure 8*) est déterminée par le rapport entre la concentration mesurée normalisée à l'aide d'une table de référence ( $Gd_{mesN}$ ) et la concentration théorique normalisée ou « naturelle » ( $Gd_{natN}$ ) calculée par interpolation par rapport aux lanthanides voisins du Gd (Sm et Tb). Une anomalie négative en Europium (Eu) est fréquente. Pour cette raison, l'anomalie en Gd est calculée à partir du Samarium (Sm) et non pas de son voisin direct l'Europium. Ainsi, le calcul ne se base plus sur une proportion de 50% d'Eu et 50% de Terbium (Tb) mais sur une proportion de 33% de Sm et de 67% de Tb.



Comme l’ont montré [Hatje et al. \(2016\)](#), il existe plusieurs méthodes de calcul dans la littérature pour prédire la part en Gd d’origine anthropique. Celles-ci comprennent des extrapolations et des interpolations linéaires et géométriques utilisant les REE lourdes ou les REE légères ([Bau et al., 2006](#) ; [Bau et Dulski, 1996](#) ; [Kulaksiz et Bau, 2011<sup>a</sup>, 2013](#)) en passant par une modélisation de la forme du profil des REE normalisées à l’aide d’un ajustement polynomial de troisième degré ([Lawrence et al., 2010, 2009](#) ; [Rabiet et al., 2009](#) ; [Verplanck et al., 2010](#)). [Hatje et al. \(2016\)](#) ont montré que ces différentes approches permettaient l’estimation similaire des concentrations en Gd d’origine anthropique pour un même échantillon. Par convention ou par habitude, les équations les plus fréquemment employées dans la littérature pour déterminer l’anomalie en Gd ( $Gd^*$ ) et pour déterminer les concentrations en Gd d’origine anthropique qui en découlent, sont celles utilisées par [Bau et Dulski \(1996\)](#) (respectivement *Équation 5* et *Équation 6*).

$$\text{Équation 5 : } Gd^* = \frac{Gd_{mesN}}{Gd_{natN}} = \frac{Gd_{mesN}}{Sm_{mesN} \times 0,33 + Tb_{mesN} \times 0,67}$$

$Sm_{mesN}$  : Concentration normalisée en Sm ;  $Tb_{mesN}$  : Concentration normalisée en Tb

$$\text{Équation 6: } Gd_{anth} = Gd_{mes} - \frac{Gd_{mes}}{Gd^*}$$

SSI :  $Gd^* > Gd^*_{seuil}$

Lorsque les calculs de  $Gd^*$  (*Équation 5*) sont réalisés sur les mesures provenant d’un(de) site(s) de référence(s), une valeur d’anomalie en Gd seuil ( $Gd^*_{seuil}$ ) est estimée. Dans notre étude, la valeur seuil d’anomalie en Gd a été fixée à 1,2 en lien avec les mesures obtenues pour le site de référence au cours de la première période de hautes eaux ( $Gd^* = 1,1$ ) (*Annexe 3*). Il est généralement considéré que les anomalies en Gd calculées (*Équation 5*) pour les autres sites d’étude, mettent en évidence une part en Gd d’origine anthropique uniquement si la valeur de l’anomalie est supérieure à la valeur seuil (*Équation 6*).

La valeur de l’anomalie mesurée pour notre site de référence n’étant pas de 1, cela montre que les échantillons d’eau prélevés sur ce site présentent une anomalie positive en Gd (de + 0,1). Dans la littérature, des anomalies positives en Gd ont été relevées pour des sites supposés exempts de contamination au Gd et ont été considérées comme des anomalies en Gd d’origine naturelle ([Lawrence, 2010](#) ; [Petelet-Giraud et al., 2009](#)). Le calcul de la concentration en Gd d’origine anthropique ( $Gd_{anth}$ ) à l’aide de l’*Équation 6* ne prend pas en

compte cette variabilité d'origine naturelle. Cette méthode de calcul considère que dès lors que  $Gd^* > Gd^*_{seuil}$ , la part en  $Gd_{anth}$  de l'échantillon correspond à la valeur totale de l'anomalie, donc à  $Gd^* > 1$  (Figure 12).

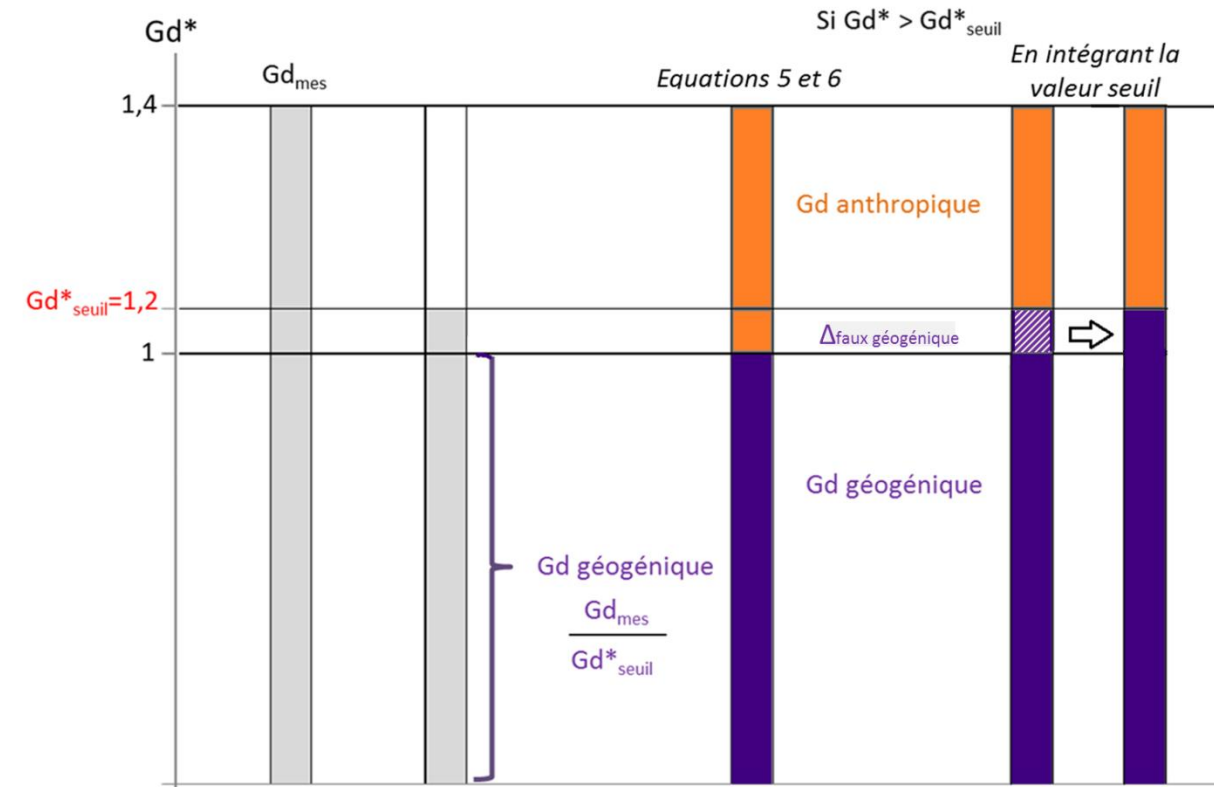


Figure 12 : Schéma montrant la comparaison des méthodes de calcul de l'anomalie en Gd

La Figure 12 illustre que seule la part en Gd correspondant à l'intervalle entre la valeur de  $Gd^* > Gd^*_{seuil}$  et la valeur  $Gd^*_{seuil}$  correspond sans ambiguïté à du Gd d'origine anthropique. En conséquence, il faut considérer la part entre la valeur seuil (ici  $Gd^*_{seuil}=1,2$ ) et l'anomalie de base ( $Gd^*=1$ ) comme étant du Gd « faux géogénique » et l'inclure dans l'équation dans la partie Gd géogénique ( $Gd_{geo}$ ). Ces observations sont corroborées par celles de Lawrence (2010) qui intègre aussi la valeur seuil d'anomalie en Gd dans son calcul de la concentration en Gd d'origine anthropique ( $Gd_{anth}$ ). L'Équation 6 a été réécrite en intégrant ce paramètre afin de réévaluer le calcul des concentrations en  $Gd_{anth}$  (Équation 7):

$$\text{Équation 7 : } Gd_{anth} = \frac{Gd_{mes}}{Gd^*_{seuil}} - \frac{Gd_{mes}}{Gd^*}$$

Ces deux méthodes de calcul ont été comparées sur les mesures effectuées au cours de la première période de hautes eaux et ont permis d'appuyer notre choix concernant l'utilisation préférentielle de l'Équation 7.

Cette comparaison a permis de montrer que les concentrations en Gd d'origine anthropique calculées, sont surestimées avec l'Équation 6 pour tous les sites où  $Gd^* > 1,2$  (Annexe 4). Cette surestimation a été mise en évidence par le pourcentage en Gd d'origine anthropique qui représentait en moyenne  $34 \pm 16\%$  du Gd total avec l'Équation 6 est qui est réduit à  $18 \pm 16\%$ . Dans ce document, les valeurs médianes des concentrations sont présentées sous la forme « valeur médiane [valeur minimale ; valeur maximale] unité ». Les concentrations en  $Gd_{anth}$  estimées pour les sites où  $Gd^* > 1,2$  ont été calculées à  $10 [1 ; 108]$  ng/L à partir de l'Équation 7 soit respectivement entre 10,2 et 1,5 fois plus faibles qu'avec l'Équation 6 (Annexe 4). Ces observations ont également soulevé le fait que la surestimation des concentrations en Gd d'origine anthropique calculé avec l'Équation 6 est d'autant plus forte que l'anomalie est faiblement supérieure à l'anomalie de référence. Un exemple de cette surestimation calculée à partir de la concentration en Gd total mesurée à proximité en aval du rejet de la STEP de Metz (S6) et de valeurs d'anomalie en Gd théoriques est présenté sur la Figure 13.

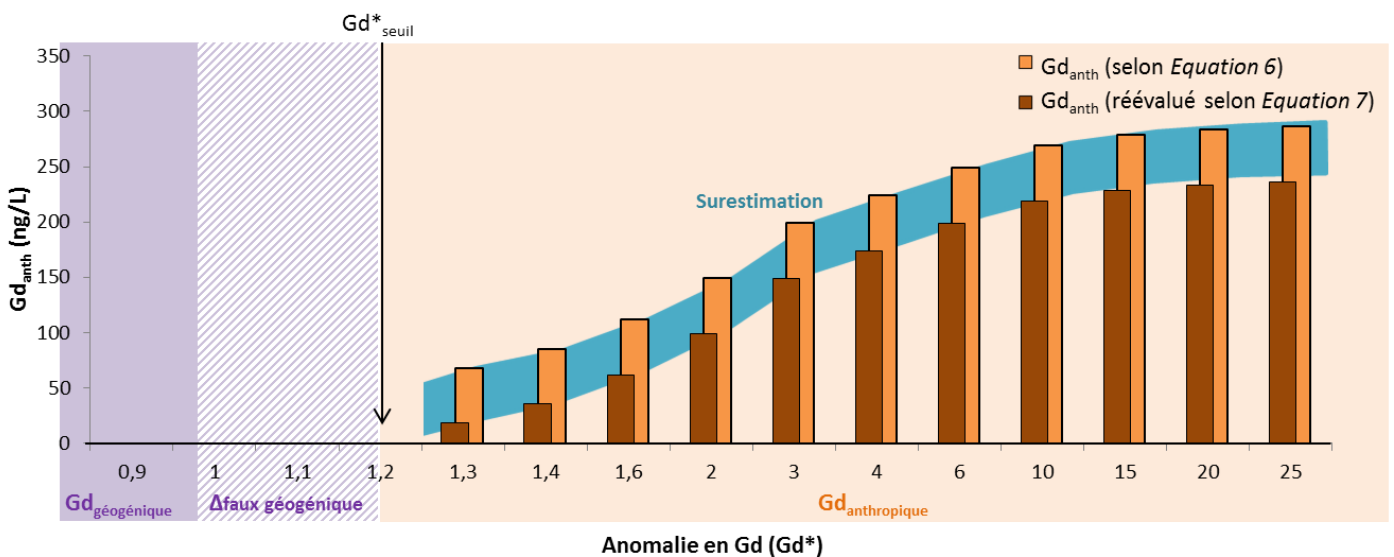


Figure 13 : Exemple de la dérive de surestimation du Gd d'origine anthropique avec les deux méthodes de calcul pour une anomalie en Gd théorique croissante à la concentration mesurée de 298 ng(Gd)/L.

Les mesures des concentrations en  $Gd_{anth}$  au cours de la première période de hautes eaux ont également permis de montrer la faible concentration en Gd d'origine anthropique mesurée pour le site S2, contrairement aux autres sites localisés en aval proche des rejets de STEP (Annexe 4). Cette observation suggère deux possibilités : soit qu'il n'y a pas eu de rejet de Gd d'origine anthropique au moment du prélèvement, soit que la dilution de l'effluent était très élevée au moment du prélèvement en lien avec les conditions environnementales. Cette seconde hypothèse paraît la plus probable, car le cours d'eau sur lequel est localisé S2 (La

*Meuse*) était en crue au moment du prélèvement avec un débit de 95 m<sup>3</sup>/s (DREAL - Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement ; *communication personnelle*). D'après les informations fournies par la DREAL, *La Meuse* est régulièrement en crue au niveau de S2 au cours des périodes de hautes eaux. En raison de cette variabilité, le site S2 n'a pas été pris en compte pour les mesures effectuées lors des autres campagnes d'échantillonnage.

### 3. Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau

Au cours de la période de basses eaux et de la seconde période de hautes eaux, plusieurs paramètres physico-chimiques permettant de déterminer les caractéristiques géochimiques et la contamination des cours d'eau par les activités d'origine anthropique ont été étudiés.

#### A. Analyses physico-chimiques effectuées sur le terrain

Pour chaque site, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés directement sur site dans l'eau courante à l'aide d'un pH-mètre (WTW 3110). Ces paramètres sont : la température de l'eau, son degré d'acidité ou d'alcalinité (pH), sa teneur en sel dissous mesurée par la conductivité, la qualité d'oxygénation du milieu mesurée par oxymétrie, ou le potentiel RedOx mesuré à l'aide d'une électrode au calomel saturée en KCl. Ils apportent des indications globales sur l'état du cours d'eau.

#### B. Analyses physico-chimiques au laboratoire

Différentes analyses chimiques ont été effectuées à partir des échantillons d'eau prélevés sur chaque site afin de déterminer la qualité du cours d'eau. La charge organique des eaux a été étudiée puisque beaucoup d'échantillons ont été prélevés en aval de rejets de STEP. Pour cela, des indicateurs employés pour le suivi de la qualité des eaux selon la norme [AFNOR NF EN 1484 \(1997\)](#) ont été mesurés : le **carbone organique total (TOC)**, le **carbone total (TC)** et le **carbone inorganique (TIC)**. La dégradation de la matière organique dans les cours d'eau a été évaluée pour chaque échantillon *via* la **demande biochimique en oxygène (DBO)** et la **demande chimique en oxygène (DCO)**. La DBO<sub>5</sub> permet de déterminer la diminution de la concentration en oxygène au cours du temps due à la

charge organique (NF EN 1899-1, 1998). Ce paramètre permet de mesurer la dégradation des matières organiques naturelles (organismes végétaux ou animaux morts) ou artificielles (provenant des eaux usées). Elle se mesure par la différence entre les mesures d'oxymétrie au moment du prélèvement et celles au bout de cinq jours en milieu fermé à 20°C et à l'obscurité. La DCO estime quant à elle la demande théorique en oxygène consommée par l'oxydation chimique totale des constituants organiques présents dans l'eau (NF T 90-101, 2001). Elle se mesure par titrage au sel de Mohr avec la ferroïne (virage du bleu au rouge).

Sur les échantillons d'eau prélevés, la minéralisation des eaux a été étudiée par **titrage alcalimétrique complet (TAC)** et par la mesure des concentrations de certains ions liés à l'apport de pollutions d'origine anthropiques tels que les **chlorures (Cl)** (dus aux mines de sel en région Lorraine) ; les **nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**, les **phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)** et les **sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)** (dus au lessivage des engrais et des rejets urbains et industriels). Le TAC détermine la présence de bicarbonates, carbonates et hydroxydes par neutralisation des échantillons d'eau aux niveaux de pH 8,3 et 4,5 avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (NF EN ISO 9963-1, 1996). Les concentrations ioniques ont été évaluées par chromatographie ionique selon la norme AFNOR EN ISO 10304-1 (2009).

#### 4. Mesures du Gd dans les tissus des organismes exposés *in situ* ou en conditions contrôlées de laboratoire.

Les concentrations en Gd ont été mesurées dans les tissus des organismes aquatiques exposés selon deux modes :

- (i) Les organismes ont été exposés *in situ* le long d'une portion de *La Moselle* localisée à proximité du rejet de la STEP de Metz. Ces organismes ont donc été exposés à un cocktail de polluants incluant le Gd sans savoir sous quelles formes cet élément métallique est présent dans le milieu.
- (ii) Les individus ont été exposés au Gd en conditions contrôlées de laboratoire sous forme d'AC-Gd.

Le choix de l'AC-Gd pour cette étude, s'est porté sur l'utilisation spécifique de l'AC-Gd le plus stable et le plus commercialisé en Europe : l'acide gadotérique (Gd-DOTA ; Dotarem®) (Birka *et al.*, 2016<sup>a</sup> ; Port *et al.*, 2008 ; Telgmann *et al.*, 2012<sup>a</sup>). Les résultats de l'enquête préliminaire (*Annexe 1*) ont appuyé ce choix puisque le Gd-DOTA (Dotarem®) est

l'un des AC-Gd les plus fréquemment employé au cours des examens IRM réalisés en région Lorraine. En parallèle de cette thèse, une étude a permis de vérifier l'absence de démétallation du Dotarem®, quel que soient les conditions de démétallation appliquées testées pour chaque échantillon d'eau prélevé en milieu naturel ([Rapport d'activité - Parant et al. - Programme EC2CO ECODYN 869543 - Impacts environnementaux des agents de contraste au gadolinium - 2016](#)). L'utilisation de ce produit de contraste limite le risque de transmétallation dans les milieux aquatiques testés. L'utilisation spécifique de ce produit de contraste permettra de déterminer les effets liés uniquement aux AC-Gd et non pas ceux liés aux ions  $Gd^{3+}$  qui auraient pu être relargués par le complexe organique.

*In situ*, les concentrations en Gd mesurées dans les tissus correspondent au Gd total, alors qu'en condition contrôlée de laboratoire, elles sont équivalentes à celle en Gd-DOTA et permettent un suivi indirect du Gd-DOTA (une mole de Gd équivalente à une mole d'AC-Gd). Ces données ont été mesurées dans les organismes et dans le milieu d'exposition afin d'estimer les concentrations en Gd-DOTA accumulées par ces organismes par comparaison aux concentrations réelles d'exposition.

Des prélèvements de milieux ont été effectués tout au long de l'exposition des organismes. Après leur exposition, les organismes ont été séchés à l'étuve et pesés (*Figure 14*). Les organismes et les échantillons de milieu ont été minéralisés à l'aide d'une solution d' $HNO_3$  70% (Ultra pure) et d'eau déminéralisée (50:50, v:v) chauffée à 65°C pendant 48h (*Figure 14*). Le pourcentage d'acide a ensuite été ramené à 1% (v:v) par dilution avec de l'eau déminéralisée. Les échantillons ont été stockés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse par ICP-MS pour doser les concentrations en Gd dans les tissus.

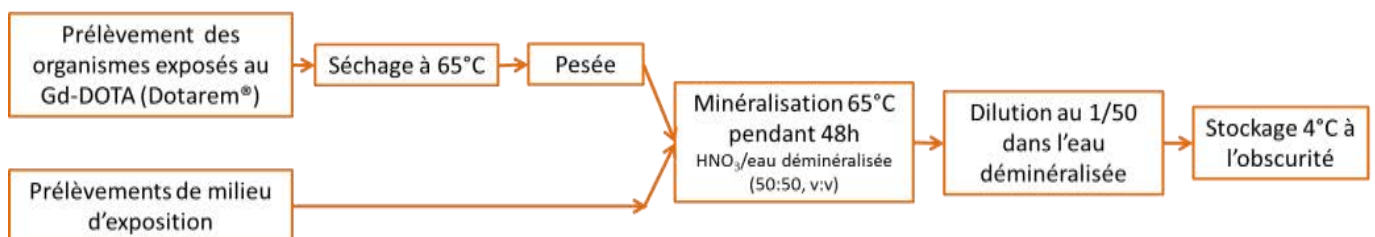


Figure 14 : Schéma récapitulatif de la préparation des organismes et du milieu d'exposition pour le dosage du Gd par ICP-MS



## **Chapitre 2 : Organismes d'étude**

Au cours de cette thèse, les effets toxiques et la bioaccumulation des agents de contraste au Gd ont été mesurés chez divers organismes dulçaquicoles (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna* et *Danio rerio*) fréquemment employés en écotoxicologie pour les tests standardisés (ISO 8692, 2012 ; NF EN ISO 6341, 2012 ; NF EN ISO 7346-1, -2, et -3, 1998 ; NF EN ISO 8692, 2012 ; OCDE 211, 2012 ; OCDE 305, 2012 ; OCDE 229, 2009 ; OCDE 230, 2009 ; OCDE 212, 1998 ; OCDE 210, 1992 ; OCDE 204, 1984). L'ensemble de ces organismes, leur entretien et leur utilisation sont décrits dans ce chapitre.

### **1. Les microalgues unicellulaires vertes**

#### ***A. Organismes d'étude***

Deux espèces d'algues vertes unicellulaires ont été choisies : *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella vulgaris*. Ces producteurs primaires jouent un rôle clé dans la régulation des nutriments dans le milieu aquatique, ils interviennent dans les cycles du carbone et de l'azote *via* la photosynthèse et sont à la base de la chaîne alimentaire des écosystèmes aquatiques (Nielsen *et al.*, 2004). Ils permettent ainsi l'entrée du carbone inorganique dans le compartiment biotique de l'écosystème dulçaquicole. Les algues vertes unicellulaires choisies pour cette étude sont des espèces planctoniques d'eau douce de la famille des *Chlorophyceae* (ordre des *Chlorococcales*). Ce type d'algues est facilement cultivable en laboratoire.



### A.1. L'algue verte unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*



Figure 15 : *Pseudokirchneriella subcapitata*  
(source : CCLA, 2013)

*P. subcapitata* (Figure 15) est une algue unicellulaire verte autotrophe obligatoire qui se développe principalement en milieu lentique comme les eaux stagnantes, certaines rivières ou des lacs (Aruoja, 2011). Elle est notamment répertoriée dans les lacs d'Amérique du nord ou de Norvège (Angerville, 2009). Cette algue peut se développer dans la colonne d'eau, le sédiment ou sur d'autres supports à condition que la lumière soit en quantité suffisante. Cet organisme de petite taille en forme de faucille mesure en moyenne 5 à 10 µm de long. Elle n'a pas de flagelle et se disperse en cellules isolées sans former de colonies dans le milieu aquatique (Angerville, 2009). Cette algue se reproduit par division cellulaire d'une cellule mère en 2, 4, ou 6 autospores (Aruoja, 2011). Le cytoplasme de cet organisme unicellulaire contient essentiellement de la chlorophylle *a*, de la chlorophylle *b* et des pigments caroténoïdes.

L'espèce *P. subcapitata* a tout d'abord été utilisée pour étudier l'impact des nutriments sur la productivité primaire en relation avec l'eutrophisation des milieux aquatiques. Elle est aussi connue pour être sensible à la pollution des écosystèmes, c'est pourquoi elle est employée comme modèle pour l'étude de l'impact des polluants sur la croissance cellulaire dans la norme ISO 8692 (2012). Elle permet ainsi de caractériser rapidement une toxicité chronique à un niveau trophique primordial. En effet, la cinétique de croissance de cette algue suit un modèle exponentiel en fonction de plusieurs facteurs abiotiques comme la richesse et la disponibilité des nutriments (azote et phosphore) présents dans le milieu, la lumière et le carbone (Garric *et al.*, 1993).

## A.2. L'algue verte unicellulaire *Chlorella vulgaris*

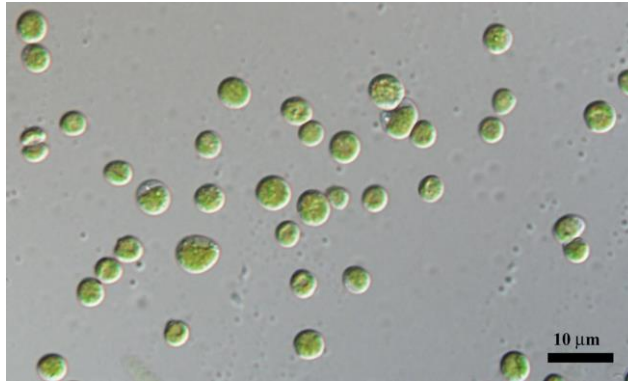


Figure 16 : *Chlorella vulgaris*  
(source : CCLA, 2013)

*C. vulgaris* (Figure 16) est une algue verte unicellulaire d'eau douce, de forme ronde ou ellipsoïde mesurant en moyenne 5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Clement-Larosière, 2012). Elle possède un chloroplaste pariétal qui représente environ 50% du volume intracellulaire contenant de la chlorophylle *a* et *b* ainsi que des pigments caroténoïdes (Clement-Larosière, 2012). Cet organisme ne comporte pas de flagelle. Grâce à la diversité écologique de ses clones, elle présente une forte tolérance à la salinité et à la déshydratation, si bien qu'on peut trouver cette microalgue en milieu dulçaquicole ou en milieu marin, dans le sédiment ou sur d'autres supports y compris en milieu aérien (Naessens-Perez, 1998). Cependant, cette algue n'est pas systématiquement présente dans le milieu aquatique, on la trouve essentiellement aux périodes propices comme lors des blooms estivaux et dans les eaux riches en matières organiques (Naessens-Perez, 1998). Son mode de reproduction asexué se caractérise par la non-séparation des cellules filles jusqu'en fin de 2<sup>ème</sup> division où la paroi de la chlorelle se déchire libérant les 4 autospores (Naessens-Perez, 1998). Cet organisme est bien connu des physiologistes qui l'ont souvent utilisé afin d'étudier le mécanisme de la photosynthèse. D'autre part, *C. vulgaris* est utilisée comme organisme d'essai pour les tests écotoxicologiques en raison de sa forte sensibilité aux produits toxiques (Ma et al., 2004).

### B. Culture des algues en conditions contrôlées

Les algues unicellulaires vertes d'eau douce peuvent être cultivées au moyen :

- (i) d'un milieu solide (milieu de culture LC liquide concentré 1,5X et solidifié à la gélose avec de l'Agar à 1,5% w/v). Ce milieu facilite la croissance des algues en conditions stériles à une température de 20°C et lumière comprise entre 7 000 et

8000 lux. Cela permet ensuite un stockage de longue durée des algues à température de 4 °C et à l'obscurité.

- (ii) d'un milieu de culture liquide (milieu LC ([Annexe 5](#)) stérile décrit dans la norme [AFNOR NF EN ISO 8692 \(2012\)](#)). L'entretien de la culture se fait par repiquage, en conditions stériles, de quelques colonies d'algues mono-spécifiques dans ce milieu de culture liquide. Les cultures d'algues en milieu de culture liquide sontensemencées à une concentration de  $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  cellules/mL pour *Pseudokirchneriella subcapitata* ([NF EN ISO 8692, 2012](#)) et  $1 \times 10^4$  cellules/mL pour *Chlorella vulgaris* ([Naessens-Perez, 1998](#)).

L'entretien de la culture ([Figure 17](#)) se fait par repiquage d'un inoculum de la suspension mère à 10% du volume final deux fois par semaine et en conditions stériles. Les suspensions algales ont été cultivées dans une enceinte climatisée à  $25 \pm 1$  °C, avec photopériode 16h/8h (éclairage de type « lumière du jour » entre 8 000 et 10 000 lux) et par agitation du milieu (entre 100 et 150 t/min). Les cultures sont contrôlées au microscope au moment des repiquages hebdomadaires afin de vérifier leur pureté.

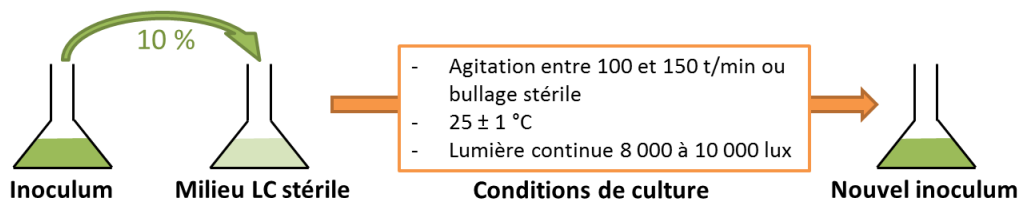


Figure 17 : Schéma de l'entretien de la culture des microalgues vertes d'eau douce en conditions contrôlées

Les solutions d'algues utilisées pour la préparation de l'inoculum proviennent toujours d'une culture en phase exponentielle de croissance.

## 2. Un microcrustacé d'eau douce : *Daphnia magna*

Une espèce de microcrustacé d'eau douce fréquemment utilisée dans les tests d'écotoxicité du milieu aquatique a été choisie : la daphnie ([NF EN ISO 6341, 2012](#) ; [OCDE 211, 2012](#) ; [OCDE 202, 2004](#)). *Daphnia magna* est employée ici en tant que consommateur primaire car elle se nourrit majoritairement des deux espèces d'algues citées précédemment qui sont de faible taille et riches en carbone. Ces daphnies sont des espèces sentinelles qui assurent le transfert de matière et d'énergie au sein des écosystèmes ([Angerville, 2009](#)). De fait, ces organismes produisent de la matière organique uniquement à partir des producteurs

primaires dont ils régulent la population. Ce zooplancton est susceptible de coloniser une variété importante de types d'eaux douces lenticques comme les eaux stagnantes, les cours d'eau à très faibles débits ou les bassins riches en matière organique et peu oxygénés ce qui en fait un bon représentant du milieu aquatique (Boillot, 2008 ; Chèvre, 2000). D'autre part, ces organismes intermédiaires jouent un rôle clé car ils sont eux-mêmes des proies pour les consommateurs secondaires qui constituent la macrofaune benthique et pélagique (Cauzzi, 2007).

### A. Organisme d'étude

Le genre *Daphnia* inclut plus de 100 espèces connues dans le monde (Ebert, 2005). Pour notre étude, nous avons choisi de prendre le clone A de l'espèce *Daphnia magna* Strauss (Toumi et al., 2014) (Figure 18), dont la lignée est maintenue depuis plus de 35 ans au sein du laboratoire LIEC (Metz, France). *Daphnia magna* également appelée « puce d'eau » est un microcrustacé dulçaquicole herbivore et détritivore. Ce zooplancton peut mesurer jusqu'à 6 mm, cette espèce est la plus grande espèce de daphnie présente en zone tempérée de l'hémisphère nord (Boillot, 2008).

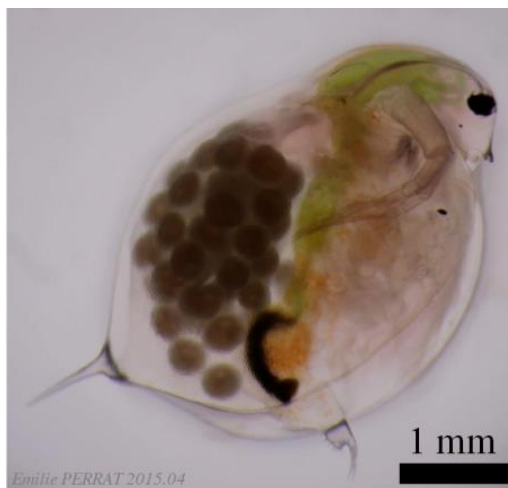


Figure 18 : *Daphnia magna*  
(Source : E. Perrat)

*Daphnia magna* est une espèce modèle utilisée pour de nombreux tests écotoxicologiques standardisés car elle présente beaucoup d'avantages (ISO 6341, 2012 ; OCDE 202, 2004). Elle est recommandée aussi bien pour les tests de toxicité aigus que chroniques (Manar, 2008). Les daphnies présentent des conditions d'élevage relativement aisées à mettre en place. De plus, la production de jeunes de façon régulière en quantité élevée par parthénogénèse assure une population stable génétiquement justifiant l'utilisation de cet

organisme dans les tests d'écotoxicité. Ces invertébrés dulçaquicoles ont une importance particulière de par leur mode de vie qui les expose à la fois aux contaminants d'origine sédimentaire (nourrissage par broutage) et à ceux présents dans la colonne d'eau (respiration par filtration). La mesure de la toxicité chez ces organismes est facile à mettre en œuvre puisque l'inhibition de la mobilité des daphnies (inhibition de la ventilation) précède généralement leur mort ([Angerville, 2009](#)).

La daphnie comporte un œil unique qui a pour rôle la perception de la photopériode et du phototropisme. Elle comporte aussi deux paires d'antennes ([Angerville, 2009](#)) : la plus grande paire sert d'organe locomoteur alors que la seconde de taille beaucoup plus réduite est associée à la prise de nourriture. L'abdomen est traversé par le tube digestif où la nourriture est déplacée et digérée par mouvements péristaltiques. Il est caractérisé par 10 paires d'appendices aplatis situés en face ventrale de l'abdomen que l'organisme fait aller et venir constamment afin de créer un courant d'eau pour la filtration des particules, sauf en cas de stress où l'organisme s'immobilise ([Angerville, 2009](#) ; [Boillot, 2008](#) ; [Chèvre, 2000](#)). En face dorsale, il y a une cavité qui constitue une chambre de maturation où sont déposés les œufs provenant des ovaires situés de part et d'autre de l'intestin. Cette chambre abrite également le cœur dans sa partie antérieure. Chez la daphnie cet organe bat en moyenne à 200 pulsations par minute afin de redistribuer l'hémolymphe à tout l'organisme. L'abdomen se termine par une paire de griffes ([Ebert, 2005](#)).

Leur corps est encapsulé dans une coquille non calcifiée constituée majoritairement de chitine et formant une double paroi au sein de laquelle circule l'hémolymphe ([Ebert, 2005](#)). Cet exosquelette transparent est renouvelé par mue à l'occasion des étapes de croissance et de la ponte et est terminé par une épine caudale plus ou moins longue dont la taille varie en fonction des contraintes environnementales ([Angerville, 2009](#)). En effet, la morphologie des daphnies peut être affectée par la température, la turbidité du milieu et l'apport de lumière pour les contraintes du milieu ([Toumi, 2013](#)). D'autres études ont montré que certains prédateurs des daphnies libèrent des kairomones solubles qui induisent une augmentation de la taille de l'épine caudale des néonates afin de se défendre contre les prédateurs ([Tollrian, 1994](#)).

La maturité sexuelle des daphnies survient au bout de 7 à 8 jours après l'éclosion en conditions de température stable à 20°C. Le type de reproduction chez ces organismes varie en fonction de la qualité des conditions environnementales ([Figure 19](#)) :

- (i) **en conditions environnementales favorables**, la reproduction se fait par parthénogenèse (*Figure 19*), c'est-à-dire en reproduction asexuée faisant intervenir des cellules somatiques (les femelles matures produisent des œufs qui donneront naissance à des individus strictement identiques à la mère d'un point de vue génétique) (Angerville, 2009 ; Boillot, 2008).
- (ii) **en conditions environnementales défavorables** les femelles vont produire des mâles, puis par reproduction sexuée (*Figure 19*), un œuf contenant un embryon dormant appelé éphippie. Ce dernier peut rester en dormance pendant plusieurs mois en attendant le retour de conditions plus favorables afin de reprendre le cycle parthénogénétique (Angerville, 2009 ; Boillot, 2008).

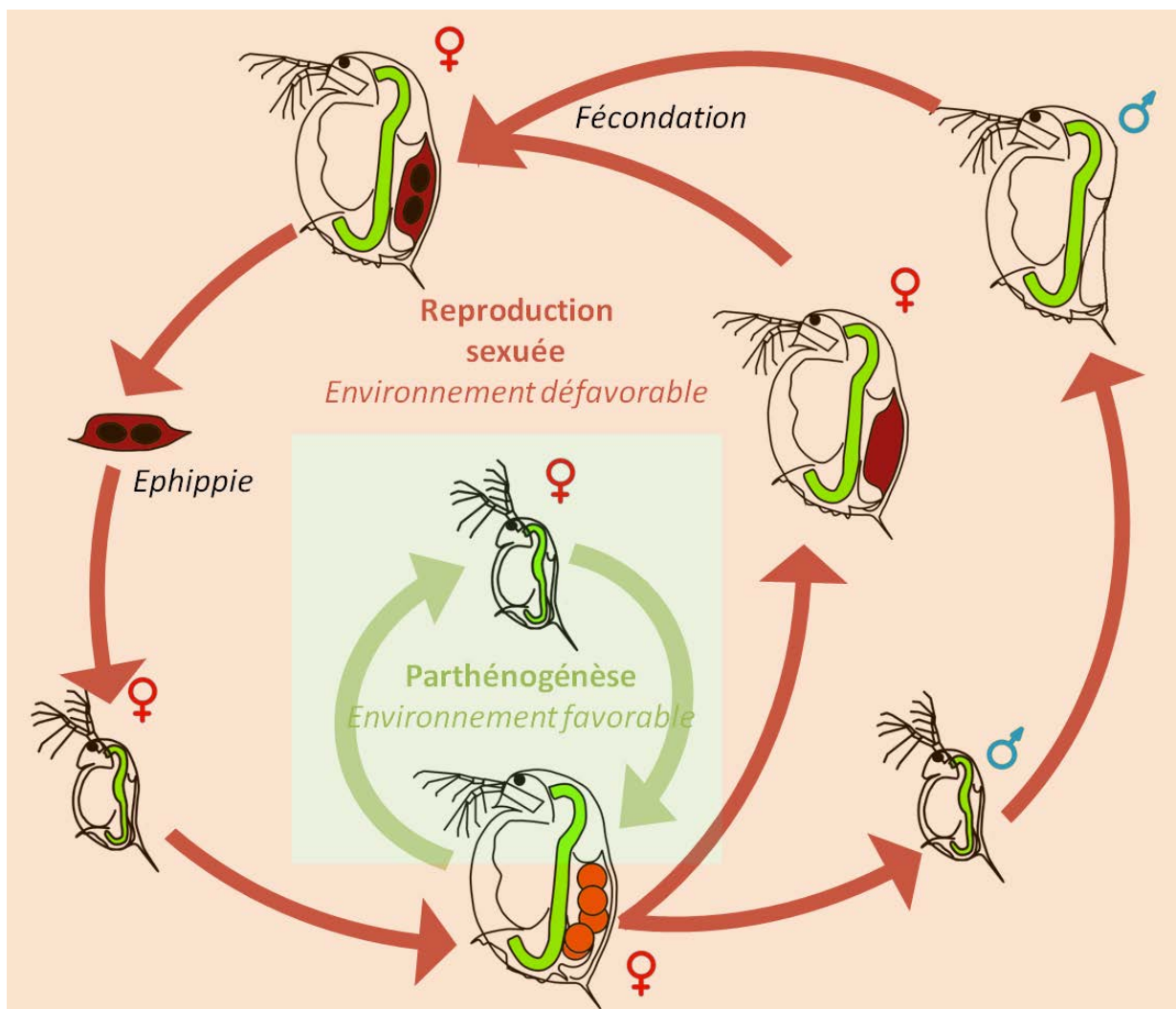


Figure 19 : Schéma du cycle de reproduction chez *D. magna* (Inspiré de Ebert, 2005)

## B. Elevage de daphnies en conditions contrôlées

Dans le cadre de cette thèse, les daphnies ont été élevées en cristallisoirs de 2 L et se reproduisent par parthénogénèse acyclique. Les conditions générales d'élevage des femelles sont en accord avec les principales recommandations en la matière (Santiago *et al.*, 1993), c'est à dire :

- (i) une enceinte réservée aux élevages et maintenue à  $20 \pm 2$  °C
- (ii) un éclairage avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit en lumière artificielle imitant le spectre de la lumière naturelle, dont l'intensité est comprise entre 800 et 1 000 lux
- (iii) une alimentation au moyen d'un mélange de microalgues vertes administrées aux concentrations suivantes : *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $5 \cdot 10^6$  cellules/mL), *Chlorella vulgaris* ( $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL) ainsi que *Desmodesmus subspicatus* ( $2,5 \cdot 10^6$  cellules/mL) par jour et par daphnie.

Le milieu de vie des daphnies se compose de milieu LC à pH  $7,0 \pm 0,2$  (non stérile) mélangé à de l'eau minérale du commerce (Volvic®) en proportion LC/Volvic® à 1:4 (v:v). Ce mélange est supplémenté en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  pour atteindre une dureté totale de 250 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ . Ce milieu est supplémenté en vitamines par : 0,1mL/L d'un mélange de Thiamine HCl (750 mg/L), Vitamine B12 (10 mg/L) et Biotine (7,5 mg/L). Les changements de milieu et les apports de nourriture sont réalisés trois fois par semaine (Figure 20).

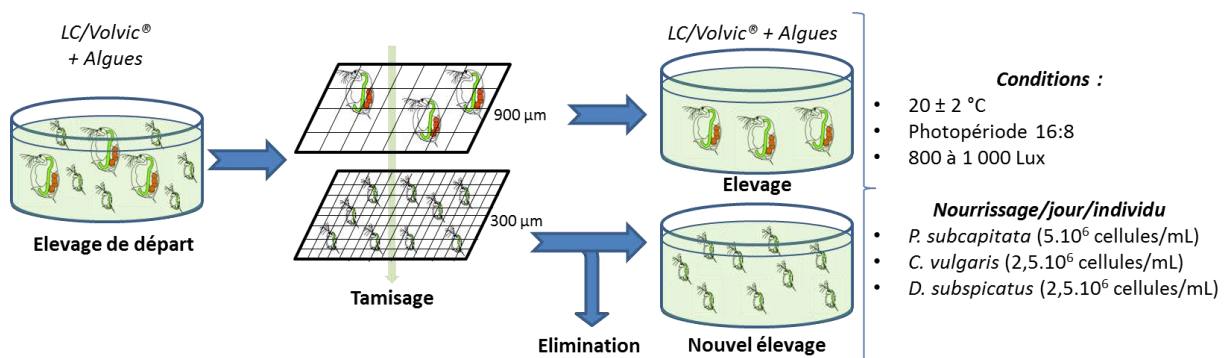


Figure 20 : Schéma de la procédure d'élevage de *D. magna* réalisée trois fois par semaine

Lors de ces changements, le contenu des cristallisoirs est tamisé doucement à l'aide de 2 tamis (Figure 20) : l'un avec des grosses mailles (900 µm) pour laisser passer les petits et retenir les adultes et le second tamis avec des mailles plus fines (300 µm) afin de retenir les petits issus des pontes qui sont soit conservés pour le maintien de l'élevage, soit éliminés.

### 3. Un vertébré aquatique : *Danio rerio*

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un consommateur secondaire représentatif des vertébrés aquatiques et est souvent utilisé comme organisme modèle dans les essais d'écotoxicité (OCDE, 2009<sup>a, b</sup>, 1998, 1992<sup>a, b</sup>, 1984).

#### A. Organisme d'étude

*Danio rerio* (Figure 21) est un poisson téléostéen de la famille des *cyprinidae* appartenant à l'ordre des *cypriniformes*. Ce petit poisson tropical d'eau douce est originaire d'Asie du sud et notamment des eaux du delta du Gange, de Malaisie et de Sumatra. Il peuple les cours d'eau peu profonds abritant souvent une végétation dense tels que les rizières et les eaux stagnantes. *Danio rerio* est poïkilotherme, c'est-à-dire qu'il adapte sa température corporelle à celle du milieu environnant ce qui limite les pertes d'énergie. De fait, il supporte de fortes variations de température mais préfère des eaux entre 25 et 28°C.

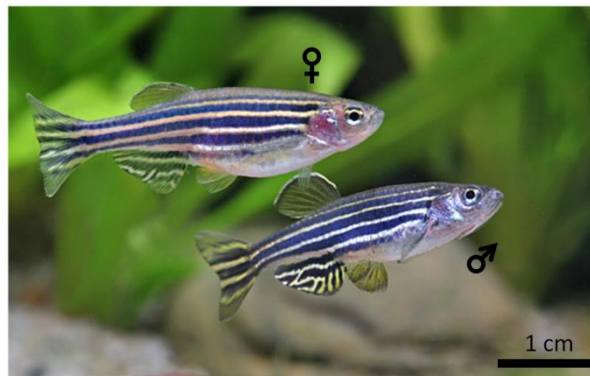


Figure 21 : Dimorphisme sexuel chez *Danio rerio*  
(Source : [http://acquariofiliaconsapevole.it/pesci\\_danio\\_riproduzione\\_thomas](http://acquariofiliaconsapevole.it/pesci_danio_riproduzione_thomas))

Le poisson zèbre possède un dimorphisme sexuel au stade adulte. Les mâles présentent une nageoire anale et une nageoire caudale très vivement colorée comparée aux femelles. D'autre part, les mâles ont une cavité ventrale moins bombée et ne possèdent pas de papille ano-uro-génitale juste devant la nageoire anale (Figure 21). Cette espèce est ovipare avec un fort taux de reproduction (environ 100 à 200 œufs sont produits par femelle par semaine). Leur développement embryonnaire est rapide : en moins de 24 h après la fertilisation externe des œufs par les mâles, la majorité des organes sont développés et, au bout de 3 jours, le poisson zèbre est capable de chercher sa nourriture dans le milieu environnant. Ils atteignent leur maturité sexuelle au bout de 3 à 4 mois (Bopp *et al.*, 2006). Leur croissance est continue après la maturité sexuelle et ces poissons peuvent atteindre 3 à 5 cm de long.



Le poisson zèbre est un bon modèle biologique, recommandé dans les tests écotoxicologiques standardisés. En effet, il est employé à tous les stades de vie pour mesurer la toxicité aiguë et chronique de certains composés ou mélanges de composés chimiques (NF EN ISO 7346-1, -2 et -3, 1998 ; OCDE 212, 1998 ; OCDE 203, 1992 ; OCDE 210, 1992) mais aussi pour mesurer ses capacités de bioaccumulation (OCDE 305, 2012). Dans le cadre de cette étude les poissons proviennent d'un élevage agréé (Elevage de la Grande Rivière, N° agrément : B692001301) pour la production et la vente de *Danio rerio* à destination des animaleries dans le but de réaliser des tests d'écotoxicité. La souche employée ici est une souche sauvage de *Danio rerio* d'origine japonaise.

### **B. Maintien des organismes**

Les organismes ont été maintenus dans une salle dédiée à l'aquariophilie (*Figure 22*) et localisée dans une animalerie agréée (N° d'agrément C57-463-3 selon l'arrêté préfectoral 2016-DDPP-081). Cette salle est thermostatée à 21°C pour limiter les écarts de température des aquariums tempérés à 26°C. Les conditions générales d'élevage des poissons sont en accord avec les principales recommandations en la matière. Une photopériode de 14h de jour et 10h de nuit a donc été respectée avec une luminosité de type « lumière du jour » à environ 1200 Lux. Le milieu aquatique a été réalisé à partir d'une eau artificielle reconstituée selon la norme (OCDE 203, 1992) saturée en oxygène par bullage et filtration et le pH du milieu a été ajusté entre 6 et 8,5.

Le milieu artificiel est préparé 2 jours à l'avance afin de permettre la saturation en oxygène. Cette eau artificielle est constituée d'eau déionisée possédant une conductivité de 1,8  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et supplémentée en :  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (294 mg/L) ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (123,25 mg/L) ;  $\text{NaCO}_3$  (64,75 mg/L) ; KCl (5,75 mg/L).

Lors de leur arrivée, les poissons ont été acclimatés séparément selon le sexe pendant 2 semaines dans ce milieu artificiel avant d'effectuer les tests d'écotoxicité en animalerie spécifique au maintien de poissons (*Figure 22*). Ils ont été nourris quotidiennement avec de la Tétramine® en poudre provenant d'un magasin d'aquariophilie. Le milieu de vie a été renouvelé toutes les semaines par transfert des organismes de leur aquarium à un autre aquarium dont le milieu a été préalablement préparé.

Des mesures de la qualité de l'eau employées en aquariophilie sont effectuées 1 fois par semaine : mesure du pH du milieu, de la dureté totale (KH) de l'eau, des taux en nitrites et en nitrates dans le milieu à l'aide d'un kit d'aquariophilie (Kombiset®).



Figure 22 : Présentation de la partie de l'animalerie destinée au maintien des poissons zèbres  
a) Photo de la pièce d'élevage de poissons; b) Aquarium équipé contenant des *Danio rerio* femelles

#### 4. Les bivalves filtreurs

En parallèle de ces organismes modèles fréquemment employés en laboratoire (microalgues, daphnies et poissons), des organismes filtreurs du milieu aquatique fréquemment rencontrés en Lorraine ont été utilisés pour comparer les effets des AC-Gd *in situ* et en conditions contrôlées.

##### A. Organismes d'étude

###### A.1. *Corbicula fluminea*



Figure 23 : *Corbicula fluminea*  
(Source : <https://www.aquaportail.com/fiche-invertebre-2984-corbicula-fluminea.html>)

La corbicule (Figure 23), également appelée palourde asiatique, est originaire d'Asie. *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) est une espèce invasive en Europe et a été détectée pour la première fois en France dans le bassin de la Dordogne en 1980 (Bigot, 2009). Son introduction dans les cours d'eau s'est faite par transport sur les coques des bateaux avec l'essor du commerce fluvial international dès le début du 20<sup>e</sup> siècle. Cette espèce a été signalée pour la première fois dans *La Moselle* Française en 1994 (Bachmann *et al.*, 1995) et a colonisé la totalité des bassins hydrographiques français en près de vingt ans. De fait, *C. fluminea* est présente dans la majorité des cours d'eau, des lacs et des canaux de navigation (Bigot, 2009).

Cette espèce sentinelle se nourrit essentiellement du phytoplancton et de la matière organique en suspension présente dans l'eau, qu'elle filtre au niveau de l'interface eau sédiment. Ce bivalve filtreur d'eau douce peut supporter de grandes amplitudes de salinités allant de 1,5 à 24 psu (Bertrand *et al.*, 2017 ; Crespo *et al.*, 2017 ; Evans *et al.*, 1977) ,ce qui explique son aire de répartition très large, allant des rivières jusqu'aux estuaires.

De par sa grande capacité de filtration de l'eau (1 à 2 L/jour par individu) (Cataldo et al., 2001) la corbicule peut bioaccumuler un certain nombre de polluants et les concentrer efficacement dans ses branchies, gonades et glande digestive comme c'est le cas par exemple pour les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides chlorés, les dioxines, les furanes et les métaux lourds (Bilos et al., 1998 ; Colombo et al., 1995 ; Vidal, 2001). La corbicule est donc un bon indicateur de la contamination du milieu.

### A.2. *Dreissena rostriformis bugensis*



Figure 24 : *Dreissena rostriformis bugensis*  
(Source : <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/ais-eae/pot-fresh-douce/zeb-quagga-fra.html>)

*Dreissena rostriformis bugensis* (Figure 24) également appelée moule Quagga est aussi une espèce invasive originaire de l'est de l'Europe. Son arrivée en Europe de l'ouest est récente. En effet, elle a commencé à se disperser au début du 21<sup>e</sup> siècle et a été signalée pour la première fois dans *La Moselle* Française en 2011 (Marescaux et al., 2012). Elle a également une forte capacité de filtration (1 L/jour par individu) car ce bivalve se nourrit essentiellement du phytoplancton et de la matière organique en suspension dans la colonne d'eau.

Son homologue, la moule Zébrée (*Dreissena polymorpha*) est un modèle bien connu et fréquemment employé dans les études de suivi de la qualité des eaux (Johns et Timmerman, 1998). Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser leur homologie et d'effectuer nos tests d'écotoxicité et de bioaccumulation sur *D. r. bugensis*. En effet, cette espèce est connue pour être capable d'accumuler les polluants organiques dans ses tissus à des taux 300 000 fois plus élevés que les concentrations mesurées dans son environnement immédiat. Les organes qui bioaccumulent le plus les polluants sont les branchies, les gonades et les glandes digestives (Rutzke et al., 2000).

### B. Maintien des organismes en microcosme

Les organismes des deux espèces destinés aux tests écotoxicologiques ont été prélevés dans *La Moselle* au niveau de « l'île du Saulcy » à Metz (57, France ; 49,118782 °N-6,160703 °E). Lors de ce prélèvement, de l'eau a également été prélevée sur le même site que les bivalves afin de limiter le stress des organismes au cours de la phase d'acclimatation. Les individus ont été placés en bacs de 10 L dans une enceinte thermostatée à 15°C avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit sous lumière artificielle de type « lumière du jour » d'intensité comprise entre 800 et 1 000 Lux.

Au cours de la phase d'acclimatation, en 2 semaines, le milieu naturel a progressivement été remplacé par un milieu artificiel lors du renouvellement tous les 3 jours (soit 0% à J0, 20% à J3, 40% à J6, 60% à J9, 80% à J12 et 100% du volume total à J15). Les organismes ont ensuite été laissés dans les bacs avec 100% de milieu artificiel afin de terminer leur dépuraction des toxiques organiques et inorganiques en provenance de leur milieu d'origine. Le milieu artificiel a été réalisé à partir d'eau déminéralisée mélangée à 1/8<sup>e</sup> d'eau minéralisée du commerce (Volvic®) et supplémentée en CaSO<sub>4</sub> (105 mg/L), MgCl<sub>2</sub> (4 mg/L), NaHCO<sub>3</sub> (15 mg/L), KCl (1,5 mg/L). Les bivalves nécessitent un milieu fortement oxygéné (Doherty et al., 1987), de fait dès l'implantation des organismes dans les bacs, leur milieu a été oxygéné en permanence par bullage.

Afin de recréer des conditions physiques similaires à l'environnement naturel des moules, des billes de verre de 2 cm de diamètre ont été ajoutées pour les *Corbicules* (simulation de gravier sur le fond du bac) et des plaques de céramiques de 25 x 25 cm ont été disposées pour permettre au moules *Quagga* de se fixer (Figure 25).



Figure 25 : Photo des dispositifs de maintien en milieu artificiel des bivalves en conditions contrôlées de laboratoire. A gauche *C. fluminea* maintenues en cristalliseur de 2L avec un fond en billes de verre ; A droite *D. r. bugensis* maintenues en cristalliseur de 2L fixées sur une plaque en céramique

Les bivalves ont été nourris quotidiennement par ajout de microalgues vertes unicellulaires cultivées en laboratoire. Nous avons choisi de les nourrir exclusivement avec l'espèce *Chlorella vulgaris* ( $3,10^5$  cellules algales / jour et par chaque individu).

## 5. La lignée cellulaire ZF4

### A. Fibroblastes de *D. rerio* (cellules ZF4)

La toxicité de cet AC-Gd a également été étudiée *in vitro*. Pour cela, il a été choisi d'employer une lignée cellulaire issue d'un vertébré dulçaquicole : le poisson zèbre.

Depuis plusieurs années, différentes lignées cellulaires issues de *Danio rerio* ont été immortalisées afin d'améliorer l'étude de la toxicité de composés ou de mélanges de composés retrouvés dans l'environnement (Segner, 1998). L'utilisation de ces lignées cellulaires permet également l'identification des mécanismes développés par les organismes en présence de contaminants. Ces lignées cellulaires sont aussi employées pour compléter, voire remplacer les essais *in vivo* sur les poissons afin de réduire considérablement le nombre d'animaux sacrifiés pour la recherche (Segner, 1998).

Pour cette étude, la lignée cellulaire ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) (Figure 26) a été employée. En 1993, Driever et Rangini ont caractérisé cette lignée cellulaire issue de fibroblastes de poisson zèbre développée à partir d'embryons âgés de 1 jour. Ces fibroblastes sont des cellules adhérentes présentant un caryotype spécifique, ces cellules sont hétéropléïdes avec en général 120 chromosomes.

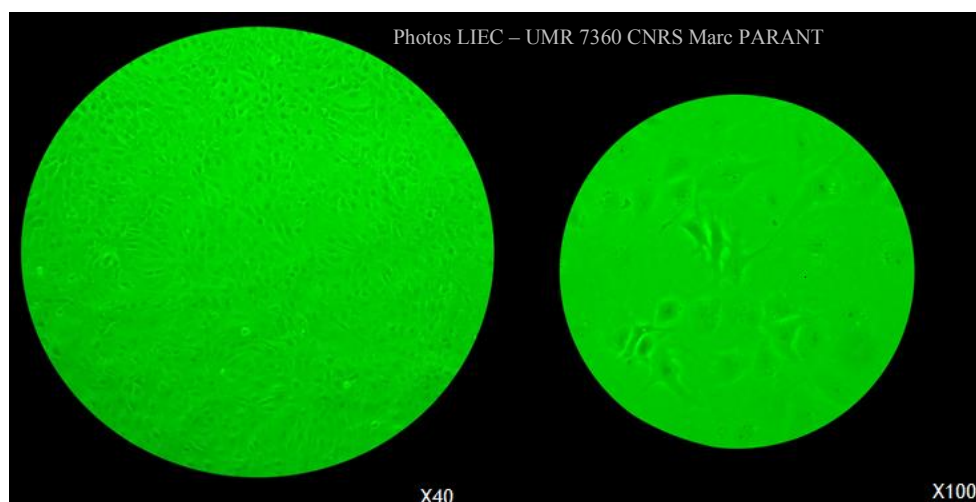


Figure 26 : Cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) de *Danio rerio* à confluence observée au microscope à contraste de phase (Olympus T041 phase contrast microscope (Olympus Optical Co. Ltd. Tokyo, Japan)) à 2 grossissements optiques (x40 à gauche et x100 à droite)

## B. Culture

A leur réception, les cellules ont été cultivées dans les conditions préconisées par l'ATCC :

- (i) Tapis cellulaire en boîtes de culture stériles.
- (ii) Boîtes de culture incubées en enceinte thermostatée à 28°C et 5% de CO<sub>2</sub> sans lumière.
- (iii) Milieu de culture DMEM:F12 stérile complété à 20% avec du sérum de veau fœtal (SVF) et stocké à 4°C à l'abri de la lumière sans antibiotiques. L'ATCC préconisait seulement 10% de sérum, mais suite à quelques difficultés de croissance avec ces préconisations, il a été choisi de compléter le milieu à 20% afin de parer à ce problème. Avant chaque utilisation, le milieu complet a été réchauffé à température ambiante pour ne pas provoquer de choc thermique aux cellules.

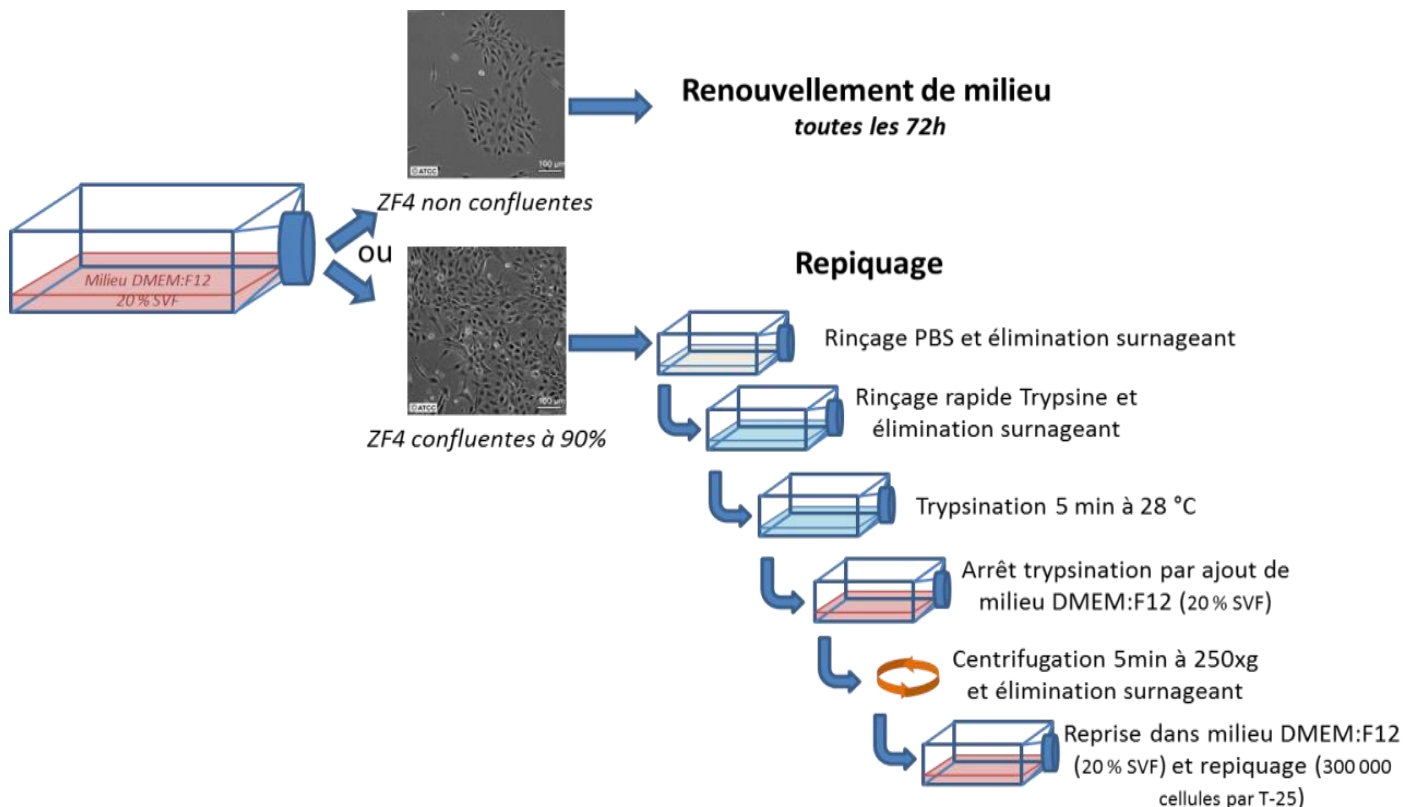
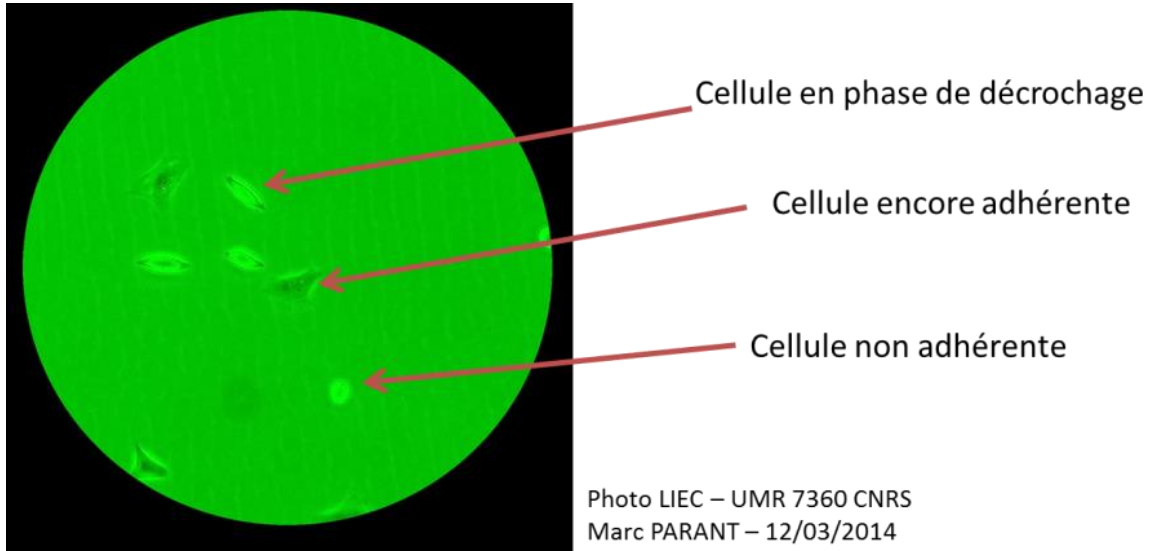


Figure 27 : Schéma de la méthode de repiquage des cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) à confluence

Le milieu a été renouvelé toutes les 72h et lorsque les cellules sont à confluence (> 95% de confluence) (Figure 27), elles ont été repiquées. Pour cela, elles ont été décrochées du fond de la boîte de culture par rinçage au tampon phosphate (PBS de chez Dulbecco®) puis par

double rinçage à la trypsine (1X sans EDTA – Gibco®) le premier de quelques secondes et le second servant à décoller les cellules (*Figure 28*) pendant 5 min à 28°C. Les cellules ont ensuite été rincées avec du milieu de culture complet propre et centrifugées 5 min à 250 x g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été repris dans du milieu DMEM:F12 (20% SVF) et agité doucement par flux/reflux afin d'éviter les agrégats cellulaires. Les cellules ont été repiquées dans une nouvelle boîte de culture stérile (*Figure 27*), à environ 300 000 cellules pour une boîte T-25 et 5 mL de DMEM:F12 (20% SVF).



*Figure 28 : Cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050<sup>TM</sup>) en cours de décrochage suite à leur trypsination (Olympus T041 phase contrast microscope (Olympus Optical Co. Ltd. Tokyo, Japan), grossissement x100)*

Lorsque les cellules sont suffisamment amplifiées, elles peuvent être cryogénisées afin de s'assurer de la pérennité de la lignée cellulaire. La cryogénisation s'effectue à partir de cultures cellulaires sub-confluentes. Ces cellules ont été décollées des boîtes par double rinçage à la trypsine (1X sans EDTA– Gibco®) et rincées avec du milieu de culture complet comme lors d'un repiquage (*Figure 27*). Elles ont été comptées à la cellule de Malassez afin de répartir les cellules dans les ampoules de cryogénisation à une concentration de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL. Ces cellules ont été transférées dans un milieu de congélation spécifique contenant 70% de milieu de culture sans sérum, 20% de sérum de veau fœtal et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les ampoules de cryogénisation contenant les cellules ont été placées dans un conteneur en polystyrène pendant 24h à -80°C avant d'être placées dans de l'azote liquide pour leur conservation longue (la décongélation, l'amplification et la cryogénisation sont nécessaires environ tous les 18 mois afin d'assurer la viabilité des cellules conservées).





## Chapitre 3 : Présentation des tests utilisés

Les tests de toxicité, d'écotoxicité et de bioaccumulation réalisés *in situ* et en conditions contrôlées en laboratoire apporteront des éléments de réponse concernant l'écotoxicité et l'accumulation des agents de contraste à base de Gd employés en IRM sur les organismes dulçaquicoles. La *Figure 29* présente les tests réalisés dans ce but.

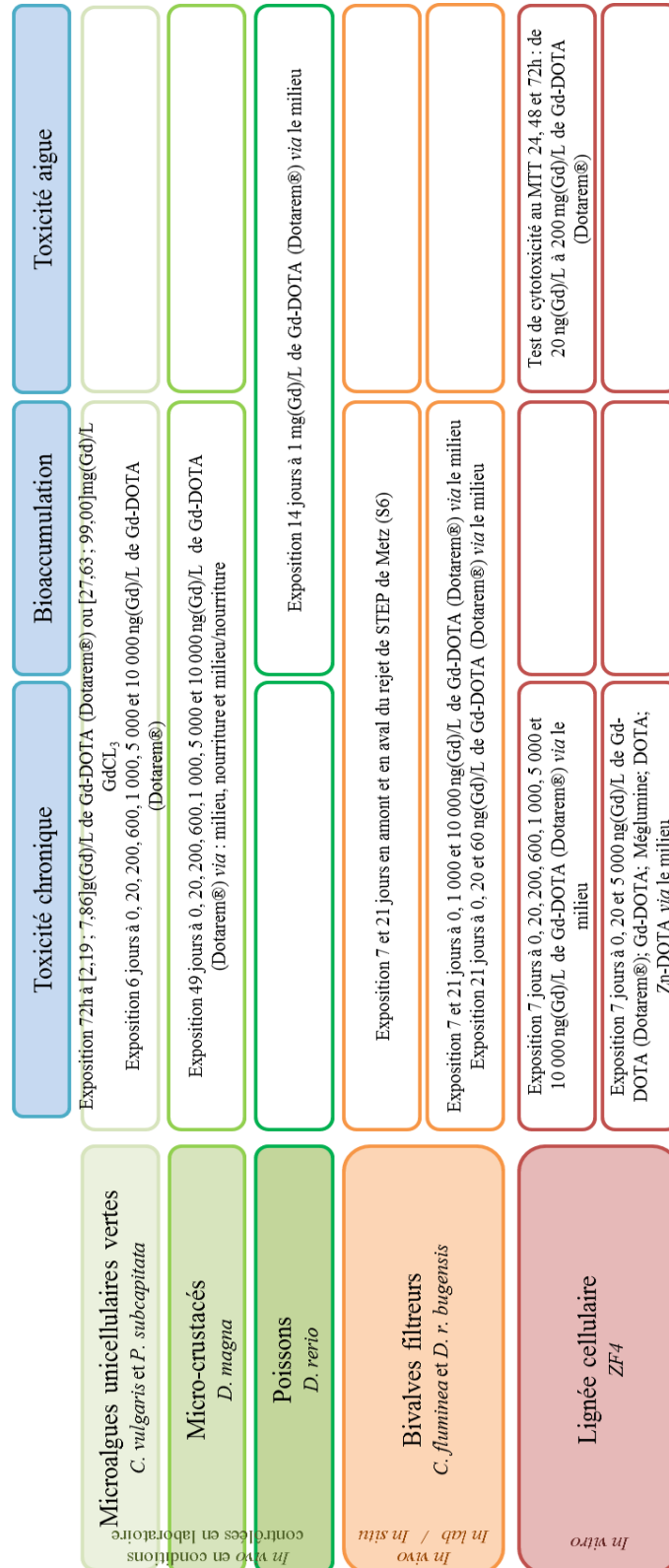


Figure 29 : Diagramme de synthèse des tests de toxicité et de bioaccumulation

En fonction des résultats de dosage du Gd mesurés dans l'environnement aquatique lorrain, les concentrations d'exposition à : 20, 200, 600, 1 000, 5 000 et 10 000 ng(Gd)/L ont été choisies. Ces concentrations sont représentatives de la réalité environnementale au niveau des rejets de STEP (20 ng/L = valeur médiane mesurée au cours des campagnes de prélèvement sur l'ensemble de la région Lorraine ; 10 µg/L = valeur ponctuelle mesurée au niveau du rejet de STEP de Metz lors d'un suivi cinétique pendant 14 jours consécutifs). Les milieux artificiels employés pour la croissance et/ou le maintien des organismes ont été enrichis en acide gadotérique (Gd-DOTA ; Dotarem®) pour obtenir ces concentrations d'exposition pour les tests de toxicité chronique.

## **1. Tests de toxicité et bioaccumulation réalisés *in vivo* par exposition au Gd-DOTA (Dotarem®)**

Les organismes ont été exposés aux contaminants *via* leur milieu de vie et/ou *via* leur nourriture dans les mêmes conditions que celles de culture/élevage.

### ***A. Toxicité chronique du Gd sous forme d'AC-Gd (Gd-DOTA ; Dotarem®) ou de sel de Gadolinium (GdCl<sub>3</sub>) chez les microalgues vertes unicellulaires***

Une étude préliminaire a permis de montrer qu'aux concentrations préalablement établies (entre 20 et 10 000 ng(Gd)/L), aucune inhibition de la croissance algale indiquant une toxicité chronique du composé sur 72h d'exposition n'a été notée. Pour cette raison, la toxicité chronique du Gd-DOTA (Dotarem®) a été déterminée par des mesures d'inhibition de la croissance algale, sur une large gamme de concentrations atteignant des concentrations entre 2,19 mg(Gd)/L et 7,86 mg(Gd)/L en solution.

La toxicité chronique du Gd-DOTA (Dotarem®) a été comparée à celle du chlorure de Gd (GdCl<sub>3</sub>). Ce dernier est un sel de Gd souvent employé pour déterminer la toxicité de du Gd<sup>3+</sup>. Les observations de [González et al., \(2015\)](#) et une étude préliminaire ont permis de déterminer une gamme de concentrations d'exposition entre 27,63 et 99 g(Gd)/L au GdCl<sub>3</sub>. Ces tests ont été réalisés selon la norme [NF EN ISO 8692 \(2012\)](#) uniquement pour *P. subcapitata* ([Figure 30](#)).

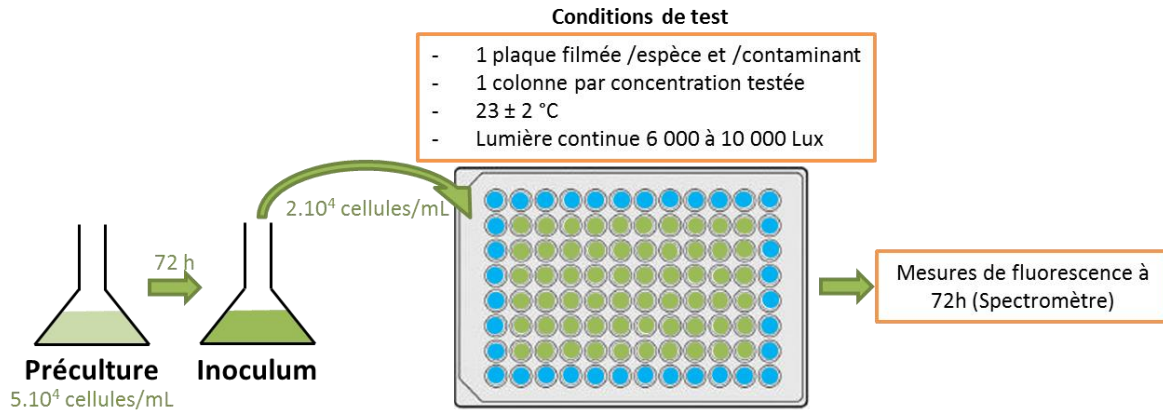


Figure 30 : Protocole d'essai standardisé de la croissance de *P. subcapitata* exposée au Gd-DOTA (Dotarem®) et au  $GdCl_3$ .

Ces mesures ont permis d'obtenir des valeurs de  $CE_{50}$ , c'est-à-dire la concentration qui inhibe 50% de la croissance algale à l'aide de la macro Excel REGTOX (version 7.0.7.).

*P. subcapitata* et *C. vulgaris* ont été employées pour étudier la toxicité et l'accumulation du Gd chez les producteurs primaires directement exposés aux agents de contraste *via* leur milieu environnant. Ces deux espèces algales ont été exposées aux concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®) préalablement définies (0, 20, 200, 600, 1 000, 5 000 et 10 000 ng(Gd)/L) pendant 6 jours en ballons contenant 5L du milieu LC (Figure 31).

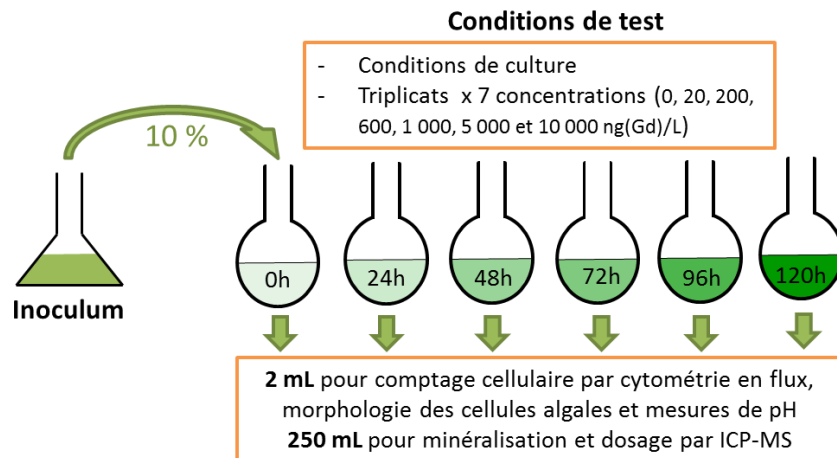


Figure 31 : Protocole d'exposition des microalgues unicellulaires vertes aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®)

Des triplicats ont été réalisés pour chaque condition d'exposition. Les conditions du test sont similaires à celles utilisées lors de la culture des algues : dans une enceinte climatisée à  $25 \pm 1$  °C, avec photopériode 16:8 (éclairage de type « lumière du jour » entre 8 000 et 10 000 lux) et aération par bullage stérile).

Pour chaque réplicat, 252 mL de culture algale ont été prélevés quotidiennement. Deux mL ont été employés afin d'évaluer la toxicité à long terme des produits de contraste gadolinés sur ces organismes par :

- Mesure de la croissance algale par comptage cellulaire par cytométrie en flux (BD Accuri CSampler - FL3, émission à 488 nm)
- La morphologie des cellules algales a été étudiée par des mesures de taille relative (*Forward Scager* - FSC) et de granularité relative (*Side Scager* - SSC) des cellules par cytométrie en flux (BD Accuri CSampler - FL3, émission à 488 nm).
- Mesure du pH du milieu.

Les 250 mL de milieu avec algues restants (*Figure 32*) ont été séparés en 2 fractions : une de 50 mL et l'autre de 200 mL. La première fraction a été acidifiée à 1% avec du HNO<sub>3</sub> (ultrapure®) puis stockée à 4°C à l'obscurité. La seconde a été filtrée sur membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de porosité 0,65 µm. Le filtrat a été récupéré puis acidifié à 1% (v:v) avec du HNO<sub>3</sub> (ultrapure®) et stocké à 4°C à l'abri de la lumière. Les algues et le filtre ont été séchés à 110°C pendant 72h puis pesés (Sartorius analytic) avant d'être minéralisés et repris dans un volume de 50 mL d'eau déminéralisée acidifiée à 1% (v:v) avec du HNO<sub>3</sub> (ultrapure®).

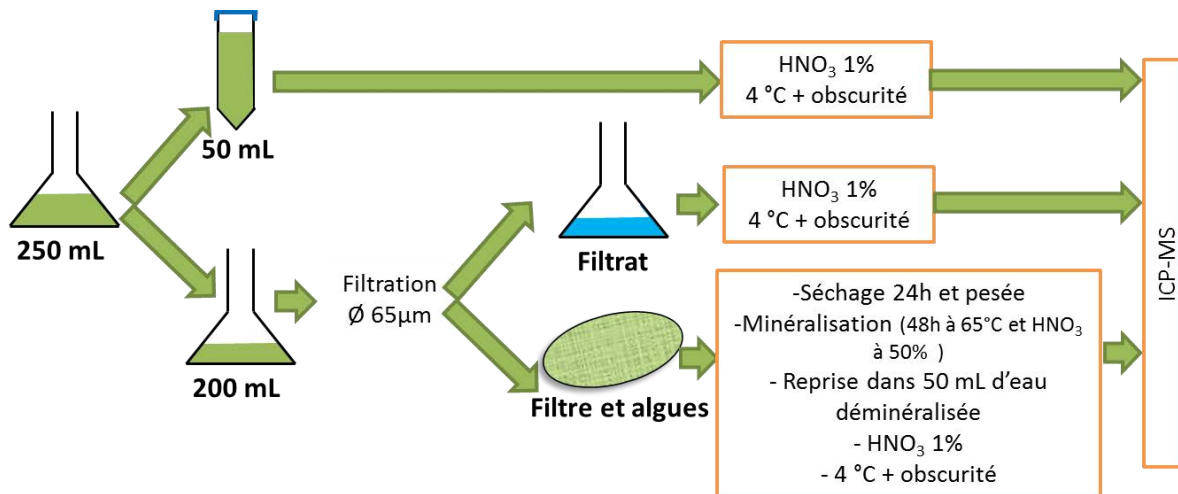


Figure 32 : Schéma de l'acidification et de la minéralisation des différentes fractions afin de mesurer les concentrations en AC-Gd par ICP-MS

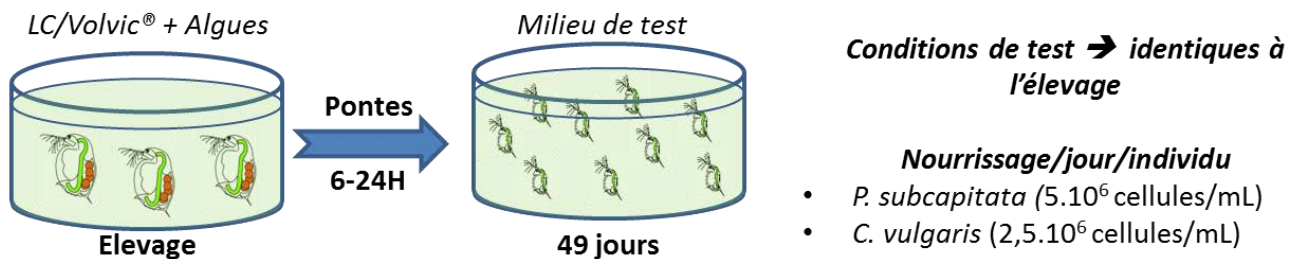
Chaque échantillon a été stocké à 4°C à l'abri de la lumière en attendant d'être analysé par ICP-MS pour mesurer les concentrations en Gd (*Figure 32*). L'accumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) dans les algues a été évaluée à l'aide du calcul des facteurs de bioconcentration (BCF) (*Équation 8*) :

$$\text{Équation 8 : } BCF_{\text{algues}} = \frac{([Gd]_{\text{algues exposées au Gd-DOTA}} - [Gd]_{\text{algues témoin}})}{[Gd]_{\text{milieu}}}$$

### **B. Toxicité chronique et bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez *Daphnia magna***

Afin de mesurer la toxicité chronique et la bioaccumulation de l'AC-Gd chez la daphnie, les organismes ont été exposés pendant 49 jours à différentes concentrations de Gd-DOTA (Dotarem®). Ce temps d'exposition permet de couvrir une grande partie de la durée de vie des daphnies.

Les tests ont été réalisés chez *D. magna* à partir de juvéniles âgés de moins de 24h (*Figure 33*) en cristallisoirs de 2L contenant 50 individus au premier jour d'essai en conditions identiques à celles de l'élevage.



*Figure 33 : Schéma de la mise en place du test de toxicité chronique des AC-Gd chez *D. magna**

Différents modes d'expositions des daphnies ont été mise en œuvre :

- (i) *via* leur milieu de vie par supplémentation en Gd-DOTA (Dotarem®)
- (ii) *via* leur nourriture qui a été elle-même exposée aux mêmes concentrations en AC-Gd (culture algale en présence de Gd-DOTA - Dotarem®)
- (iii) *via* la combinaison des deux conditions précédentes (milieu et nourriture contaminés)

Ces trois modes d'exposition ont été réalisés en parallèle et différents paramètres ont été mesurés (*Figure 34*). Avant le renouvellement de milieu de chaque cristallisoir, nous avons mesuré le pH et la température du milieu, nous avons également regardé la morphologie et le comportement de nage des individus. Le nombre d'individus morts et de petits a été recensé puis ils ont été éliminés avant chaque renouvellement de milieu.

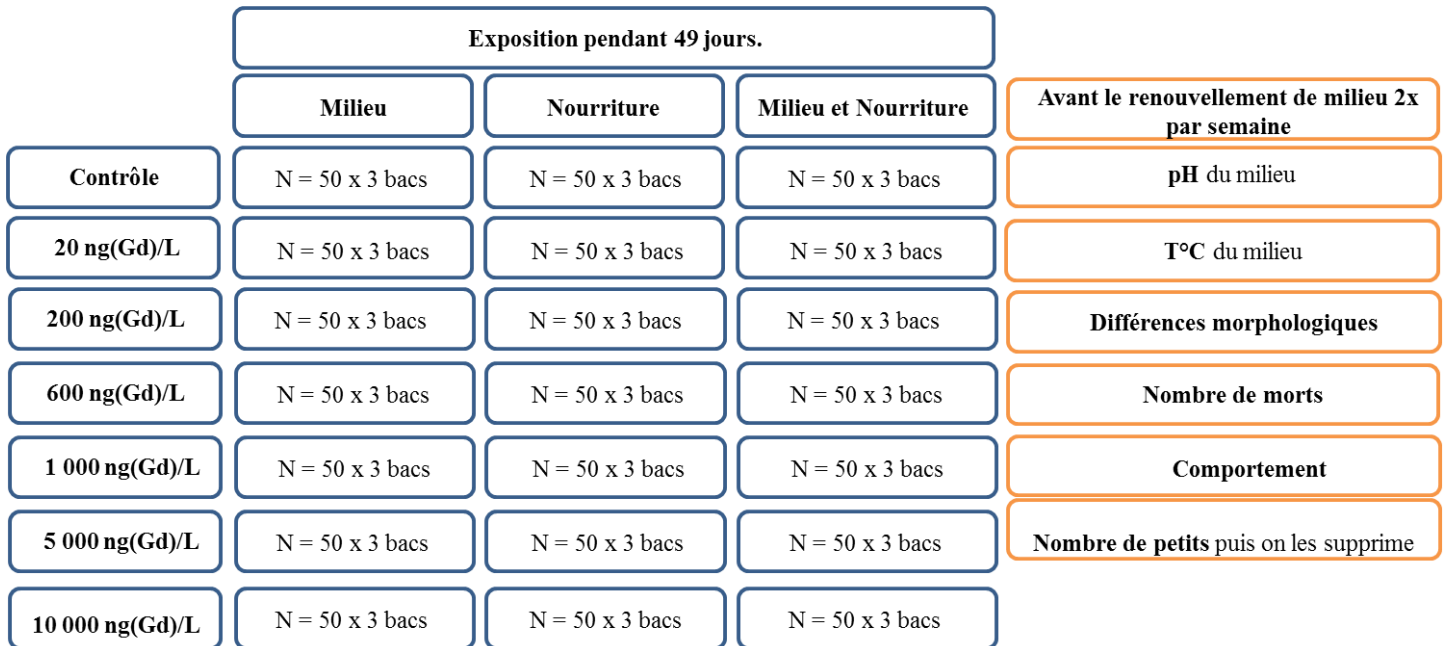


Figure 34 : Diagramme expérimental du test de toxicité et de bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) par prélèvement hebdomadaire de daphnies exposées à cet AC-Gd  
*N = nombre d'individus par bac*

Une fois par semaine 4 individus ont été prélevés aléatoirement dans chaque bac pour une étude morphologique à la loupe binoculaire et des photos des individus ont été prises pour pouvoir réaliser des mesures. Ces organismes ont été individualisés en boîtes de 96 puits où ils ont été séchés à l'étuve à 60°C pendant 48h et pesés (Balance Perkin Elmer AD6) avant d'être regroupés en fonction de leur bac d'origine puis minéralisées pour la mesure de la concentration en Gd dans les tissus. Les minéralisas ont été récupérés dans un volume de 4 mL d'eau déminéralisée afin d'obtenir une concentration en acide à 1% (v:v) et stockés à 4°C à l'abri de la lumière avant leur analyse par ICP-MS.

Ces mesures ont permis de mesurer l'accumulation de l'AC-Gd dans les daphnies ( $BCF_{daphnie/mode\ d'exposition}$ ). Cette accumulation a été calculée par masse sèche de daphnie selon l'Équation 9 :

$$\text{Équation 9 : } BCF_{daphnie/mode\ d'exposition} = \frac{[Gd]_{daphnie}}{[Gd]_{milieu\ et/ou\ [Gd]_{nourriture}}$$

### C. Toxicité et bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez *Danio rerio*

La toxicité du Gd-DOTA et sa bioaccumulation a été évaluée chez *D. rerio* par exposition des poissons à une concentration de 1 mg(Gd)/L en Gd-DOTA (Dotarem®) *via* leur milieu d'exposition. Cette concentration élevée a été choisie suite à l'estimation de la bioaccumulation potentielle des composés hydrophiles tels que l'Uranium appauvri (de 0,5 à 1% dans les *D. rerio* entre 10 et 60 jours d'exposition (Bourrachot, 2009)).

Les mâles et les femelles ont été exposés au Gd-DOTA (Dotarem®) dans des aquariums séparés en conditions identiques à celles de leur acclimatation. La mortalité des individus a été contrôlée pendant les 14 jours d'exposition au produit de contraste. A la fin de l'exposition, les poissons ont été divisés en trois groupes de chaque sexe (Figure 35). Les organismes ont été rendus inconscient par leur passage sur la glace durant 5 minutes et ont ensuite été mis à mort selon les lignes directrices du CCPA (2005) sur les soins et l'utilisation des poissons en recherche.

Les organismes prélevés (Figure 35) ont été individualisés en tubes avant d'être séchés à 60°C pendant 24 heures et pesés (Sartorius analytics®). Ils ont été minéralisés pour leur passage sur ICP-MS afin de mesurer les concentrations en AC-Gd dans les organismes (Figure 35).

	Condition	Mâles	Femelles
Contrôle	/	N = 7	N = 3
1 mg(Gd)/L	/	N = 12	N = 3
	Lavés	N = 3	N = 3
	Dépurés 48h	N = 6	N = 3

- Poissons inconscients suite au dépôt dans la glace
- Mise à mort par décapitation
- Séchage (24 h à 60°C) et pesée
- Minéralisation (48h à 65°C et HNO<sub>3</sub> à 50%)
- Reprise dans 50 mL d'eau déminéralisée
  - HNO<sub>3</sub> à 1%
  - 4°C à l'obscurité

**→ Analyse ICP-MS**

Figure 35 : Diagramme expérimental des *D. rerio* prélevés pour mesurer la bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®)  
N = nombre d'individus par bac

Les mesures des concentrations en Gd pour chaque individu ont permis de déterminer l'accumulation de l'AC-Gd par le calcul des BCF dans les organismes entiers (Équation 10).

$$\text{Équation 10 : } BCF_{\text{poisson}} = \frac{[Gd]_{\text{poisson}}}{[Gd]_{\text{milieu}}}$$



## D. Toxicité chronique et bioaccumulation du Gd chez les bivalves filtreurs d'eau douce par exposition *in situ* et en conditions contrôlées de laboratoire au Gd-DOTA (Dotarem®).

### D.1. Mode d'exposition des bivalves

*D. r. bugensis* et de *C. fluminea* ont été exposées au Gd sous différentes formes. D'une part *in situ* sans différenciation de la forme sous laquelle est retrouvée ce Gd au travers d'un cocktail de polluants et d'autre part sous la formulation de Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire. Ces mesures seront employées afin de comparer l'accumulation du Gd total à celle spécifique en AC-Gd dans les tissus des bivalves.

Après leur période d'acclimatation, 6 bivalves de chaque espèce ont été prélevés. Les concentrations en Gd ont été mesurées à T0 dans les tissus de ces bivalves. Les organismes acclimatés ont été divisés au hasard en 2 groupes expérimentaux.

Le premier groupe expérimental (320 organismes de chaque espèce) a été employé pour l'exposition *in situ*. Les bivalves ont été déposés en batch par groupes de 20 organismes de chaque espèce le long de *La Moselle* à proximité du rejet de la STEP retraitant les eaux usées de la ville de Metz et de sa banlieue. Chaque batch a été dupliqué pour chaque temps d'exposition à 4 localisations par rapport au rejet de la STEP (Figure 36) : amont (-65 m), aval proche (50 m), et aval éloigné (200 m et 600 m). Au bout de 7 et 21 jours d'exposition, une cage de chaque espèce a été prélevée.

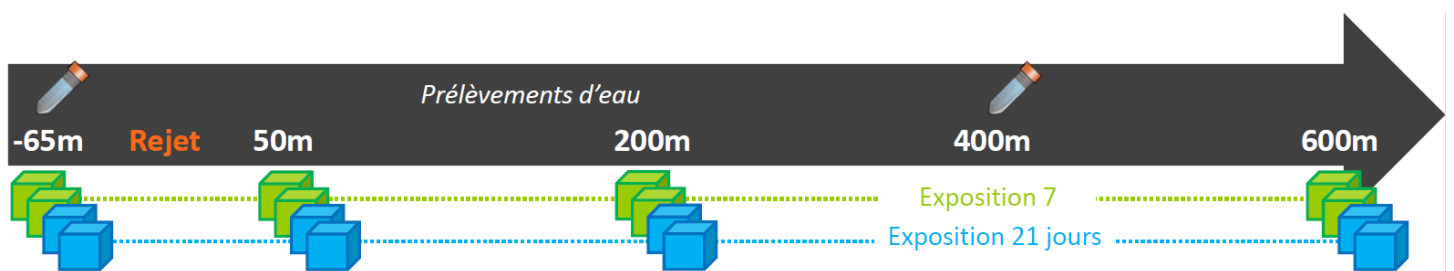


Figure 36 : Exposition des bivalves *in situ* le long d'une section de la Moselle

Le second groupe expérimental a été employé pour l'exposition en conditions contrôlées de laboratoire. Deux essais ont été réalisés en triplicat pour chaque concentration d'exposition dans les mêmes conditions que lors de leur acclimatation (Figure 37) :

- (i) *D. r. bugensis* et *C. fluminea* (N = 2 par espèce et par bac) ont été exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 21 jours à des concentrations en Gd fréquemment retrouvées dans le milieu aquatique (0, 20 et 60 ng(Gd)/L).
- (ii) *D. r. bugensis* et *C. fluminea* (N = 2 par espèce et par bac) ont été exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) à 0, 1 000 et 10 000 ng(Gd)/L pendant 7 et 21 jours. Le prélèvement au 7<sup>e</sup> jour permet de mesurer l'évolution de la présence du Gd-DOTA dans les tissus des bivalves.

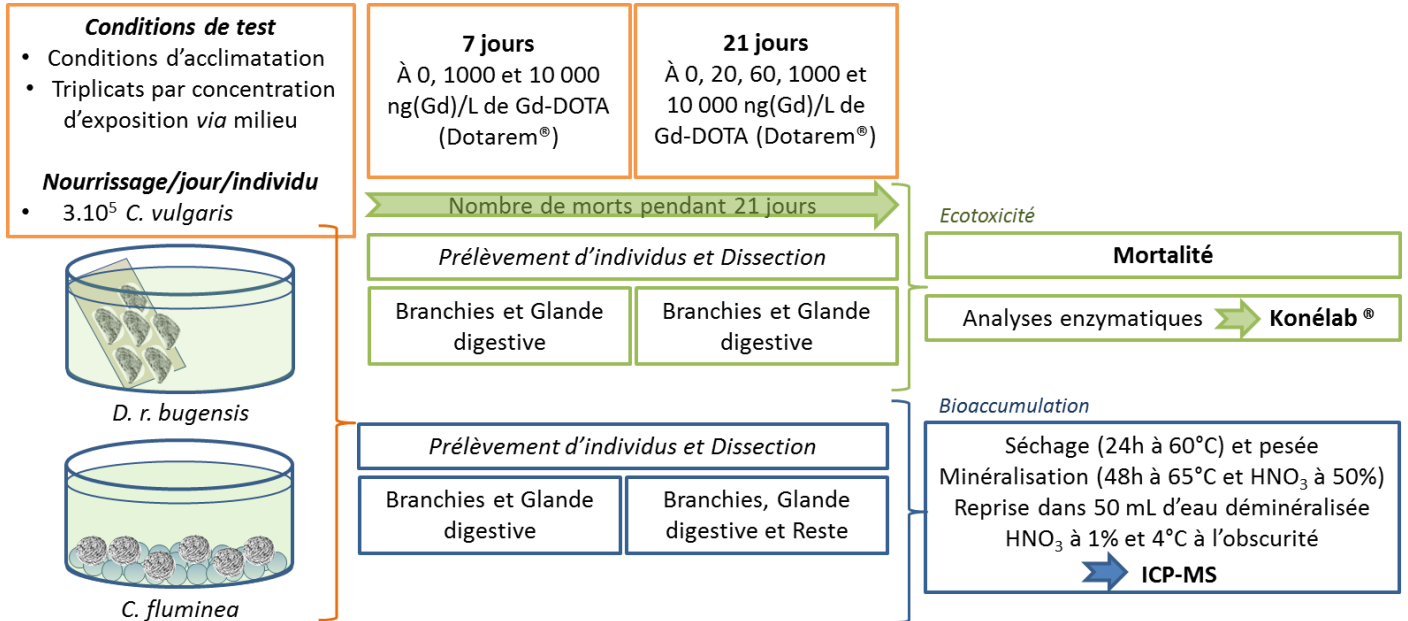


Figure 37 : Schéma du test de toxicité et de bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) chez les bivalves filtreurs d'eau douce.

## D.2. Mesures d'accumulation du Gd dans les tissus des bivalves

Les organismes prélevés ont été disséqués pour mesurer les concentrations en Gd dans les tissus de ces bivalves. *In situ*, pour chaque site et chaque temps d'exposition, 6 individus de chaque espèce ont été employés pour mesurer les concentrations en Gd dans les organismes entiers et 6 autres pour mesurer celles contenues dans les branchies et dans la glande digestive. En conditions contrôlées de laboratoire, 6 individus de chaque espèce par condition d'exposition ont été employés pour mesurer les concentrations en Gd dans les branchies, dans la glande digestive et dans le reste des tissus mous des organismes (Figure 37). Chaque tissu prélevé a été séché, pesé (Sartorius analytics®) puis minéralisé avant d'être analysés par ICP-MS.

En parallèle des expositions des bivalves, des prélèvements de milieu ont été effectués. *In situ*, de l'eau a été prélevée quotidiennement en amont (-65 m) et en aval (400 m) du rejet

de la STEP comme présenté sur la *Figure 36*. Chacun de ces prélèvements correspond à 24 fractions échantillonnées sur la journée complète. En conditions contrôlées de laboratoire, des prélèvements de milieu ont été réalisés avant et après chaque renouvellement de milieu afin de vérifier les concentrations d'exposition. Ces mesures de concentrations en Gd dans le milieu ont pu être comparées avec les concentrations en Gd accumulées dans les tissus des bivalves.

Les facteurs de bioconcentration (BCF) du Gd ont été calculés *in situ* pour les organismes entiers (*Équation 11*). Pour chaque tissu considéré, les facteurs de bioaccumulation (BAF) du Gd et plus spécifiquement du Gd-DOTA (Dotarem®) ont été calculés (*Équation 12*) :

$$\text{Équation 11 : } BCF_{in\ situ} = \frac{[Gd]_{organisme\ entier\ après\ 7\ ou\ 21\ jour} - [Gd]_{organisme\ entier\ à\ t_0}}{[Gd]_{milieu\ après\ 7\ ou\ 21\ jour}}$$

$$\text{Équation 12 : } BAF_{organe} = \frac{[Gd]_{organe\ après\ 7\ ou\ 21\ jour} - [Gd]_{organe\ à\ t_0}}{[Gd]_{milieu\ après\ 7\ ou\ 21\ jour}}$$

### D.3. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) chez les bivalves

L'exposition des organismes au Gd-DOTA en conditions contrôlées de laboratoire a également permis de suivre plusieurs paramètres évaluant la toxicité de l'AC-Gd chez les bivalves. La mortalité des individus a été comptabilisée tout au long de l'exposition et des individus de chaque espèce ont été prélevés afin de mesurer les réponses cellulaires à la présence de ce produit de contraste dans le milieu. Les réponses des organismes ont été évaluées à l'aide d'une batterie de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets des bivalves exposés au Gd-DOTA (Dotarem®).

Pour chaque concentration d'exposition (20 ; 60 ; 1 000 et 10 000 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem ®) et chez les témoins, 6 pools de deux *D. r. bugensis* et 6 *C. fluminea* ont été prélevées pour chaque réplicat à T0, T7 et T21.

Les branchies et les glandes digestives ont été prélevées sur chaque individu, elles ont ensuite été pesées fraîches (Sartorius analytics®). Une analyse spectrophotométrique de l'activité enzymatique d'une batterie de biomarqueurs a alors été réalisée sur l'automate Konelab 20 Xti (Thermofisher Scientific). Les différents biomarqueurs étudiés dans les

branchies et dans la glande digestive des bivalves et leur méthode d'analyse respective sont présentés dans le *Tableau 14*. Cette étude multi-biomarqueurs a été réalisée afin de mesurer les réponses des organismes à la présence de l'AC-Gd dans leur milieu d'exposition par l'étude de différents paramètres tels que : les réserves énergétiques, la respiration cellulaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la digestion intracellulaire, l'activation des défenses antioxydantes et les dommages tissulaires. Les procédures d'analyses ont été développées et validées par [Garaud \(2015\)](#).

L'activité de la **Catalase (CAT)**, biomarqueur faisant partie de la batterie de biomarqueurs utilisés, a également été mesurée dans les branchies et les glandes digestives de ces individus. Cette activité enzymatique antioxydante a été dosée par méthode manuelle sur la fraction cytosolique. Cette fraction diluée au  $\frac{1}{4}$  dans du tampon phosphate a permis de mesurer la réduction des molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'action catalytique de la catalase qui a été suivie par lecture de l'absorbance sur le spectrophotomètre ANALYTIK JENA SPECORD 205 (Serlio Technologies) à 240 nm (absorbance dans l'UV) pendant 30s.

Tableau 14 : Présentation des biomarqueurs analysés à partir des glandes digestives des bivalves avec l'automate Konelab®

Type de biomarqueur	Biomarqueur étudié	Mesure de	Par l'étude de :	A partir de protéines issues de	Temps d'incubation (s)	Absorbance (nm)	Unité	Mesure d'absorbance
Réserves énergétiques	PB / PFC	Concentration en protéines	Dosage colorimétrique du complexe de rouge de Pyrogallol-Molybdate lié aux groupements aminés des protéines	Broyat de l'organe / Fraction cytosolique	300 + 420	600	mg/gFW	Abs finale
	TG	Concentration en triglycérides	Hydrolyse des triglycérides	Broyat de l'organe	600	510	mg/gFW	Abs finale
	ETS	Activité du système de transport des électrons	Production de formazan par réduction du p-iodonitrotetrazolium	Broyat de l'organe	120 + 180	480	mmolO <sub>2</sub> /gprot/h	Cinétique
Dommages cellulaire	LOOH	Concentration en hydroperoxydes lipidiques	Oxydation du Fe <sup>2+</sup> en Fe <sup>3+</sup> . Calibration par rapport à une gamme de tert-butylhydroperoxyde (TBH)	Broyat de l'organe	180 + 120 + 1200	620	μmolTBH/gprot	Cinétique
	ACP	Activité des phosphatases acides	Hydrolyse du 4- nitrophenyl en p-nitrophénol	Broyat de l'organe	180 + 180 + 720 + 180	405	μmol/gprot/h	Abs finale
Défenses antioxydantes et antitoxiques	GST	Activité de la Glutathion -S-Transférase	Consommation du 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) par conjugaison à la glutathion hépatique	Fraction cytosolique	15 + 15	340	μmolCDNB/gprot/min	Cinétique
	GPx	Activité de la Glutathion peroxydase totale	Consommation du NADPH pour le recyclage du Glutathion hépatique	Fraction cytosolique	15 + 15	340	μmolNADPH/gprot/min	Cinétique
	ToAC	Capacité antioxydante totale	Réduction du 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). Calibration par rapport à une gamme de Trolox (Teq)	Fraction cytosolique	240 + 60 + 345	660	μmolTeq/gprot/min	Abs finale
Dommages tissulaire	LDH	Activité de la lactate deshydrogénase	Oxydation du lactate en pyruvate et réduction de la NAD en NADH	Fraction cytosolique	300 + 120	340	nmolNADH/mgprot/h	Cinétique

## 2. Tests de toxicité et de bioaccumulation réalisés *in vitro*

### A. Test de cytotoxicité au MTT en présence de la forme d'AC-Gd la plus stable : le Gd-DOTA (Dotarem®)

Afin de déterminer une éventuelle cytotoxicité de l'AC-Gd sur un système cellulaire non mammifère, nous avons effectué un test de viabilité cellulaire au MTT (*Figure 38*) sur des fibroblastes de poisson zèbre ; les cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™). Pour cela, les puits ont étéensemencés à des concentrations en cellules permettant d'obtenir un dénombrement correct à la fin du temps d'exposition :

- 1 plaque de 96 puits avec 20 000 cellules/puits pour une exposition à l'AC-Gd pendant 24h
- 1 plaque de 96 puits avec 10 000 cellules/puits pour une exposition à l'AC-Gd pendant 48h
- 1 plaque de 96 puits avec 10 000 cellules/puits pour une exposition à l'AC-Gd pendant 72h

Pour chaque plaque, les puits ont été remplis avec 200  $\mu$ L de milieu à différentes concentrations en AC-Gd soit 20, 200 et 600 ng(Gd)/L ; 1, 5, 10, 25, 50 et 100  $\mu$ g(Gd)/L ; 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 mg(Gd)/L ; le milieu de culture seul a servi de témoin négatif et le milieu contaminé à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,015% (v:v) a été employé comme témoin positif.

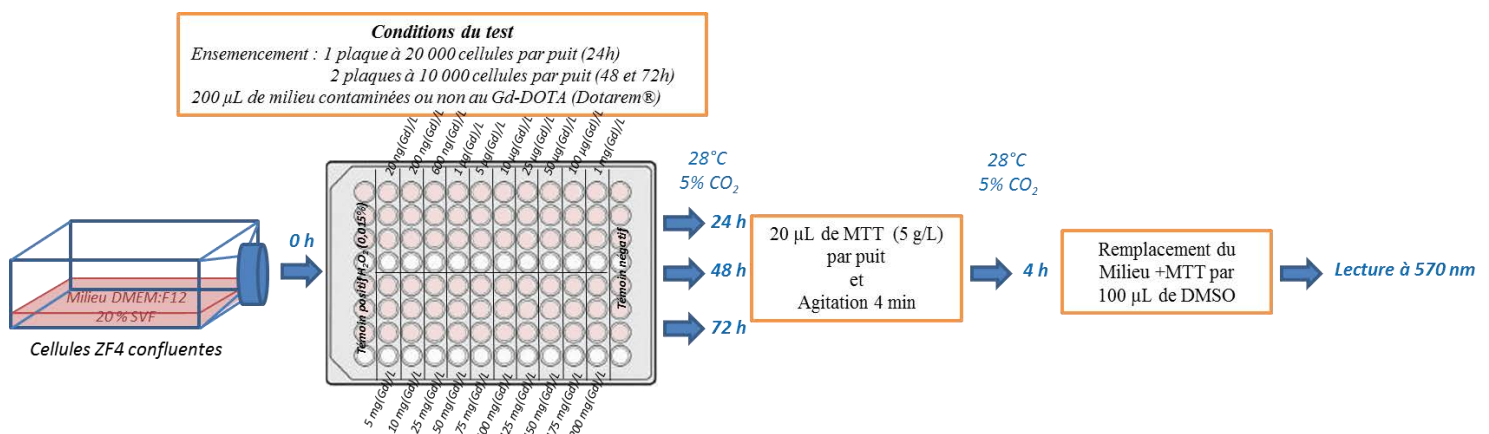


Figure 38 : Test de cytotoxicité des cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) exposées au Gd-DOTA (Dotarem®)

L'incubation des cellules a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de culture de la lignée cellulaire. Après 24h, 48h et 72h d'incubation 20  $\mu$ L de la solution de MTT filtrée

(5 mg/mL) ont été ajoutés dans chaque puits contenant des cellules et le milieu de chaque puits a été homogénéisé par agitation sur table d'agitation durant 4 minutes. Les plaques ont ensuite été replacées dans l'incubateur pendant 4h à 28°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Puis, un volume de 100 µL de DMSO a été ajouté par puit et 100 µL de DMSO ont été ajoutés dans un puits vide afin de mesurer l'absorbance du DMSO seul. L'absorbance de chaque puits a ensuite été mesurée à 570 nm par spectrofluorimétrie (SAFAS FLX-Xenius®).

## **B. Tests de croissance cellulaire**

Les effets de toxicité chronique de l'AC-Gd ont été étudiés *in vitro* via des mesures de la croissance cellulaire en présence de Gd-DOTA (Dotarem®).

### **B.1. Essai de toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®)**

Les cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™) ont été exposées aux différentes concentrations en AC-Gd de 0, 20 et 10 000 ng(Gd)/L pendant 1 à 6 jours *via* leur milieu de vie boîtes T-75. Des triplicats ont été réalisés pour chaque condition et chaque temps d'exposition. Les boîtes ont étéensemencées à 250 000 cellules par boîte et leur milieu de culture n'a pas été renouvelé pendant 6 jours. Pour chaque condition d'exposition, le nombre de cellules par boîte a été mesuré quotidiennement par comptage à la cellule de Malassez. Le même essai a été réalisé en renouvelant le milieu au bout de 3 jours d'exposition aux différentes concentrations en AC-Gd.

### **B.2. Essai de toxicité des différentes parties composant le Gd-DOTA (Dotarem®)**

Afin de définir quelle partie de la formulation pharmaceutique du Gd-DOTA (Dotarem®) est responsable des effets de toxicité observés au cours de l'essai ci-dessus, nous avons refait ce test sans renouvellement de milieu sur les cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050™), non plus en suivant la gamme de concentrations en AC-Gd, mais en exposant ces organismes à plusieurs composés, c'est-à-dire :

- Le Gd-DOTA (Dotarem® - Guerbet), qui permet déterminer les effets liés à l'exposition du produit de contraste sous sa formulation pharmaceutique complète
- Le Gd-DOTA (Poudre : Na-Gd-DOTA, 6H<sub>2</sub>O ; Provenance : ICMR - UMR 7312 CNRS), permettant de déterminer les effets liés au principe actif du Dotarem®
- La Méglumine (Sigma-Aldrich®), afin de déterminer si la présence de l'adjuvant du Dotarem® engendre des effets sur les cellules ZF4
- Le DOTA (Poudre : DOTA, H<sub>4</sub> ; Provenance : ICMR - UMR 7312 CNRS), permettant de déterminer si c'est le cycle ou l'ion chélaté qui est responsable des effets
- Le Zn-DOTA (Poudre : Zn-DOTA, H<sub>2</sub> ; Provenance : ICMR - UMR 7312 CNRS), permettant de déterminer si c'est l'ion Gd qui induit les effets

Les cellules ont été exposées à ces composés selon deux molarités à 0,127 nM et à 63,59 nM soit l'équivalent de la contamination à 20 ng(Gd)/L et 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®). Chaque condition a été comparée à un témoin négatif (sans contamination). Pour chaque condition d'exposition, le nombre de cellules par boîte a été mesuré quotidiennement par comptage à la cellule de Malassez.

### ***C. Etude du cycle cellulaire après exposition aux différentes parties composant le Dotarem®***

Le cycle cellulaire a été analysé après 5 et 7 jours d'exposition des cellules ZF4 (ATCC®, CRL-2050<sup>TM</sup>). Les cellules exposées ont été fixées dans de l'éthanol à 70% pendant 48h puis marquées à l'iodure de propidium selon la méthode proposée par [Darzynkiewicz et al., \(2001\)](#).

La fluorescence de l'iodure de propidium a été mesurée par cytométrie en flux (BD FACS Calibur<sup>TM</sup> – Biosciences ; FL2-A, excitation à 533 nm, émission à 617 nm). Ces mesures ont permis de déterminer le nombre de cellules en phase G0/G1 (phase d'initiation permettant la croissance de la cellule), en phase S (réplication de l'ADN) et en phase G2/M (phase de croissance de la cellule puis mitose permettant la division cellulaire).





## **Chapitre 4 : Traitement statistique**

La majorité des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 3.1.0 ; R Development Core Team, 2014). Pour chaque tableau de données, l'homoscédasticité et la normalité ont été vérifiées respectivement par des tests de Levene et de Shapiro–Wilk ( $\alpha = 0,05$ ).

### **1. Mesures de Gd dans le milieu aquatique Lorrain**

Au cours de cette étude, des tests statistiques non paramétriques ont été employés en raison de l'absence de normalité et d'homoscédasticité dans la distribution des mesures effectuées pour les différents paramètres.

Les concentrations en AC-Gd d'origine anthropique ont été comparées deux à deux entre l'amont et l'aval chaque STEP à l'aide de tests de Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ ).

A partir des concentrations en Gd d'origine anthropique et des paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque site, des analyses en composante principale (PCA) ont pu être réalisées pour chaque période de prélèvement. Ces analyses descriptives ont permis de mettre en évidence une séparation des sites d'étude en plusieurs groupes. Les sites ont alors été répartis le long de deux axes les décrivant. Les groupes ainsi formés semblaient corrélés à certains paramètres et ont été vérifiés par des corrélations de Spearman ( $\alpha = 0,05$ ) afin d'appuyer les résultats décrits par la PCA.

### **2. Tests de toxicité, d'écotoxicité et bioaccumulation**

#### ***A. Analyses statistiques employées pour les essais in vivo***

Lorsque les conditions de normalité et d'homoscédasticité dans la distribution des mesures ont été vérifiées, les réponses observées pour les différentes conditions d'exposition au sein de chaque test ont été comparées deux à deux à l'aide de tests de Student ( $\alpha = 0,05$ ).

Dès lors que différents paramètres qualitatifs ont été employés pour expliquer les réponses des organismes entiers, une analyse de variance à 1 ou 2 facteurs (ANOVA où  $\alpha = 0,05$ ) a été employée. Enfin lorsque ces analyses montraient un effet significatif, nous avons réalisé un test *Post-Hoc* de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) pour préciser les différences entre groupes.

Concernant les deux espèces de bivalves, une première approche descriptive (PCA) a été employée pour mettre en évidence les différences entre les réponses des biomarqueurs dans les branchies et dans la glande digestive de chaque espèce. Cet outil a alors permis de montrer graphiquement une différence dans les réponses des biomarqueurs. De fait, l'analyse des résultats obtenus a été abordée séparément pour chaque espèce et pour chaque organe. La différence significative de la réponse des biomarqueurs a alors été évaluée à l'aide d'un test MANOVA (*Multivariate Analyse of Variance* ; Pillai -  $\alpha = 0,05$ ) pour comparer les concentrations d'exposition dans chaque condition de test. Lorsque des différences significatives ont été montrées par le test de MANOVA, chaque jeu de donnée a été analysé en utilisant la régression des moindres carrés partiels (*Partial Least Squares regression*, PLS) couplée à l'analyse discriminante (*Discriminant Analysis*, DA) : la PLS-DA. Cette analyse permet de hiérarchiser le poids de chaque variable dans le pouvoir discriminant du modèle afin de conserver uniquement les biomarqueurs les plus pertinents grâce à la sélection des VIP (*Variable Importance in the Projection*). Les différences entre les groupes considérés 2 à 2 ont alors pu être étudiées à l'aide du test  $T^2$  de Hotelling utilisant le risque de correction de Benjamini et Hochberg (extension du test t pour une réponse multivariée) (Benjamini et Hochberg, 1995). Les biomarqueurs ainsi sélectionnés correspondaient aux VIP dont les valeurs étaient supérieures à 1 (Eriksson et al., 2013).

Des courbes de mortalité ont été obtenues à partir du suivi quotidien du nombre de daphnies mortes lors de chaque renouvellement de milieu d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). Ces courbes ont été comparées par rapport à celle des individus témoins à l'aide d'un test statistique adapté test du *log-rank* généralement employé pour comparer les courbes de survie des organismes (Harrington et Fleming, 1982).

### **B. Analyses statistiques employées pour les essais *in vitro***

Les essais de cytotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les cellules ZF4 ont permis de déterminer les valeurs des concentrations inhibitrices correspondant à 50% de la survie des cellules (CI<sub>50</sub>) à l'aide d'analyses probit.

Les différences de la croissance des cellules ZF4 suite à leur exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) ont été représentées graphiquement et les jeux de données ont été comparés deux à deux à l'aide d'un test de Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ ) à chaque temps d'échantillonnage. Les effets de l'AC-Gd sur la croissance des cellules ZF4 ont également été évalués à travers l'utilisation de plusieurs composés (*cf. p 102*) permettant de déterminer la partie de la molécule induisant ces effets. Ces résultats ont été discriminés statistiquement à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur (où  $\alpha = 0,05$ ) et lorsque ces analyses montraient un effet significatif, un test *Post-Hoc* de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) a été employé pour préciser les différences entre groupes.



## ***Partie 3 : Résultats***

---



## Chapitre 1 : Mesures du Gadolinium à proximité des rejets de STEP et des zones de captage en eau potable.

### 1. Concentrations en REE totales

Les mesures des concentrations en REE (La : Lanthane ; Ce : Cérium ; Pr : Praséodyme ; Nd : Néodyme ; Sm : Samarium ; Eu : Europium ; Gd : Gadolinium ; Tb : Terbium ; Dy : Dysprosium ; Ho : Holmium ; Er : Erbium ; Tm : Thulium ; Yb : Ytterbium ; Lu : Lutécium) ont été réalisées par analyse ICP-MS pour chaque échantillon d'eau prélevé (*Tableau 15*). Ces mesures sont employées pour déterminer les concentrations en Gd d'origine géogénique et d'origine anthropique dans les échantillons. Les concentrations en REE moyennes ont été mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé au cours d'une période de basses eaux (LW = été 2014) et d'une période de hautes eaux (HW = hiver 2015). Les concentrations mesurées dans les échantillons aqueux reflètent les proportions de chacune de ces REE par rapport à la somme des REE totales ( $\Sigma$ REE), dans le socle rocheux sur lesquelles s'écoulent les eaux (*Johannesson et al., 2000*). Les REE ont été dosées dans les échantillons prélevés à proximité des zones de captage en eau potable (C), des sites à pollution multiple (PW), des sites localisés en amont (Sx-U) et en aval (Sx-D) des rejets de STEP et au niveau de notre site de référence (R) (*Tableau 15*).

Les concentrations en  $\Sigma$ REE ont été dosées entre 190 ng/L et 3 727 ng/L au cours de la période de basses eaux et entre 780 ng/L et 10 357 ng/L au cours de la période de hautes eaux (*Tableau 15*). Malgré l'apparence plus élevée de ces mesures en période de hautes eaux, les concentrations en terres rares totales sont du même ordre de grandeur en moyenne au cours des deux périodes de prélèvement ( $1\,225 \pm 866$  ng/L en LW et  $3\,028 \pm 2\,690$  ng/L en HW).



Tableau 15 : Moyennes des concentrations ( $\pm$  écart-types) en REE en ng/L et anomalies positives au Gd mesurées à proximité des rejets de STEP (S en amont (U) et en aval (D)), des zones de captage en eau potable (C) et des sites de référence (non contaminé (R) et pollué (PW)) au cours de la période de hautes eaux (HW) et de la période de basses eaux (LW).

Echantillon	Période	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm, Yb & Lu	$\Sigma$ REE	Gd*
Bar-le-Duc	S1-U	LW	49 ± 1	94 ± 17	9 ± 0	36 ± 5	7 ± 0	56 ± 14	1 ± 0	6 ± 1	1 ± 0	3 ± 0	< 0,1	265	8,7
	HW	281 ± 8	619 ± 22	74 ± 2	306 ± 5	66 ± 1	16 ± 0	73 ± 2	9 ± 0	49 ± 1	9 ± 1	26 ± 1	< 0,1	1 528	1,3
		LW	33 ± 6	56 ± 6	7 ± 1	27 ± 1	6 ± 0	2 ± 0	114 ± 2	1 ± 0	4 ± 0	1 ± 0	3 ± 0	< 0,1	253
	S1-D	HW	248 ± 20	530 ± 41	64 ± 4	263 ± 12	56 ± 4	14 ± 1	145 ± 10	8 ± 0	44 ± 2	8 ± 1	23 ± 1	< 0,1	1 403
Longwy	LW	58 ± 12	115 ± 14	14 ± 1	65 ± 5	14 ± 1	7 ± 1	90 ± 11	2 ± 0	13 ± 1	3 ± 0	7 ± 1	< 0,1	389	7
	HW	148 ± 26	327 ± 68	43 ± 8	188 ± 31	41 ± 7	13 ± 2	75 ± 8	6 ± 1	34 ± 5	7 ± 1	18 ± 3	< 0,1	901	2,1
		LW	66 ± 18	143 ± 29	18 ± 4	79 ± 12	17 ± 4	8 ± 1	96 ± 4	3 ± 0	15 ± 2	3 ± 1	10 ± 2	< 0,1	459
	S3-D	HW	161 ± 14	366 ± 39	49 ± 4	221 ± 15	45 ± 4	15 ± 1	81 ± 4	7 ± 1	38 ± 4	7 ± 1	20 ± 1	< 0,1	1 009
Thionville	LW	98 ± 12	242 ± 7	29 ± 4	122 ± 15	28 ± 4	16 ± 0	66 ± 3	4 ± 1	23 ± 3	5 ± 0	13 ± 2	< 0,1	646	2,7
	HW	652 ± 2	1468 ± 11	208 ± 1	885 ± 4	198 ± 2	52 ± 1	211 ± 1	27 ± 0	141 ± 1	26 ± 0	69 ± 0	< 0,1	3 935	1,3
		LW	462 ± 23	1139 ± 32	144 ± 6	593 ± 10	136 ± 4	37 ± 1	241 ± 3	19 ± 0	100 ± 3	19 ± 1	52 ± 2	< 0,1	2 943
	S4-D	HW	532 ± 9	1200 ± 28	173 ± 3	740 ± 6	167 ± 4	44 ± 1	193 ± 2	23 ± 0	119 ± 1	21 ± 0	59 ± 1	< 0,1	3 272
Bney	LW	412 ± 52	984 ± 125	115 ± 13	482 ± 58	110 ± 11	25 ± 3	126 ± 14	18 ± 2	98 ± 9	19 ± 2	54 ± 5	< 0,1	2 443	1,3
	HW	135 ± 3	293 ± 1	41 ± 1	173 ± 3	36 ± 1	11 ± 0	40 ± 2	5 ± 0	27 ± 1	5 ± 0	14 ± 1	< 0,1	780	1,3
		LW	331 ± 1	763 ± 38	91 ± 5	378 ± 2	84 ± 3	19 ± 2	120 ± 2	13 ± 0	73 ± 0	14 ± 0	40 ± 0	< 0,1	1 927
	S5-D	HW	138 ± 6	295 ± 17	41 ± 2	172 ± 11	37 ± 2	10 ± 1	90 ± 7	5 ± 0	28 ± 1	5 ± 0	15 ± 1	< 0,1	837
Metz	LW	125 ± 5	281 ± 22	37 ± 0	154 ± 8	35 ± 1	19 ± 0	62 ± 3	5 ± 0	26 ± 2	5 ± 0	15 ± 1	< 0,1	763	2,1
	HW	690 ± 41	1569 ± 82	226 ± 11	963 ± 39	222 ± 10	56 ± 1	232 ± 8	30 ± 1	154 ± 5	28 ± 1	77 ± 2	< 0,1	4 248	1,3
		LW	112 ± 17	245 ± 48	32 ± 5	128 ± 16	29 ± 4	14 ± 1	109 ± 5	5 ± 1	22 ± 4	4 ± 1	13 ± 2	< 0,1	713
	S6-D	HW	426 ± 25	972 ± 54	141 ± 7	607 ± 32	141 ± 6	37 ± 2	307 ± 5	19 ± 1	101 ± 6	18 ± 1	51 ± 2	< 0,1	2 819
Saint-Avoid	LW	250 ± 59	558 ± 128	66 ± 15	276 ± 62	68 ± 15	29 ± 5	152 ± 6	14 ± 3	85 ± 17	18 ± 4	55 ± 12	< 0,1	1 571	2,1
	HW	884 ± 8	2139 ± 36	255 ± 7	1114 ± 2	262 ± 5	65 ± 1	310 ± 7	43 ± 0	237 ± 6	44 ± 1	123 ± 2	< 0,1	5 476	1,3
		LW	114 ± 26	245 ± 46	28 ± 6	123 ± 27	29 ± 6	15 ± 2	363 ± 15	6 ± 1	33 ± 6	7 ± 1	20 ± 4	< 0,1	984
	S7-D	HW	449 ± 66	1081 ± 143	136 ± 27	576 ± 90	131 ± 19	38 ± 5	285 ± 10	21 ± 3	117 ± 13	22 ± 3	64 ± 8	< 0,1	2 921
Freyring-Merlebach	LW	133 ± 5	270 ± 14	33 ± 3	132 ± 6	32 ± 2	21 ± 0	81 ± 2	7 ± 0	40 ± 2	10 ± 0	37 ± 2	< 0,1	796	2,2
	HW	1395 ± 176	3379 ± 453	413 ± 48	1757 ± 233	410 ± 55	104 ± 11	504 ± 62	64 ± 9	348 ± 46	66 ± 8	182 ± 27	< 0,1	8 620	1,4
		LW	115 ± 11	230 ± 22	29 ± 4	114 ± 12	28 ± 2	19 ± 0	75 ± 3	7 ± 0	34 ± 2	9 ± 0	33 ± 2	< 0,1	692
	S8-D	HW	1650 ± 314	3628 ± 124	439 ± 16	1862 ± 66	436 ± 12	109 ± 4	535 ± 15	68 ± 2	373 ± 11	70 ± 2	195 ± 5	< 0,1	9 365
Sarreguemines	LW	101 ± 5	227 ± 16	27 ± 2	111 ± 3	28 ± 1	17 ± 1	61 ± 1	5 ± 0	22 ± 1	4 ± 0	12 ± 1	< 0,1	615	2,3
	HW	650 ± 38	1389 ± 62	194 ± 6	833 ± 11	199 ± 2	54 ± 1	232 ± 3	30 ± 0	160 ± 5	29 ± 0	83 ± 8	< 0,1	3 854	1,3
		LW	98 ± 8	227 ± 33	28 ± 5	112 ± 13	28 ± 2	16 ± 2	70 ± 7	5 ± 0	24 ± 2	4 ± 0	12 ± 1	< 0,1	623
	S9-D	HW	613 ± 27	1338 ± 47	187 ± 5	804 ± 21	195 ± 6	53 ± 1	233 ± 15	29 ± 1	160 ± 7	29 ± 1	79 ± 3	< 0,1	3 721
Sarrebourog	LW	247 ± 15	572 ± 45	71 ± 6	302 ± 23	69 ± 4	24 ± 1	81 ± 4	11 ± 1	56 ± 3	10 ± 1	28 ± 1	< 0,1	1 473	1,3
	HW	475 ± 10	1129 ± 39	155 ± 5	648 ± 14	158 ± 4	45 ± 0	183 ± 5	24 ± 1	135 ± 3	25 ± 1	69 ± 2	< 0,1	3 046	1,3
		LW	234 ± 17	547 ± 52	67 ± 6	281 ± 25	67 ± 6	25 ± 2	96 ± 6	10 ± 1	54 ± 6	10 ± 1	28 ± 3	< 0,1	1 419
	S10-D	HW	460 ± 2	1049 ± 9	145 ± 4	623 ± 11	150 ± 2	43 ± 0	181 ± 1	23 ± 0	128 ± 2	24 ± 0	66 ± 1	< 0,1	2 894

S11-U	LW	254 ± 20	552 ± 58	71 ± 6	296 ± 33	69 ± 8	30 ± 1	98 ± 8	10 ± 1	50 ± 3	10 ± 1	26 ± 2	< 0,1	1 465	1,7
	HW	387 ± 10	876 ± 26	123 ± 2	544 ± 8	133 ± 3	43 ± 1	146 ± 3	19 ± 1	103 ± 1	19 ± 1	53 ± 1	< 0,1	2 445	1,3
Nancy	LW	157 ± 17	332 ± 19	44 ± 1	178 ± 16	42 ± 2	24 ± 1	95 ± 6	7 ± 1	31 ± 1	6 ± 1	17 ± 2	< 0,1	934	2,5
	HW	392 ± 7	896 ± 18	127 ± 3	555 ± 8	136 ± 3	43 ± 0	155 ± 4	20 ± 0	120 ± 27	20 ± 1	56 ± 2	< 0,1	2 519	1,3
S12-U	LW	33 ± 1	59 ± 4	10 ± 0	39 ± 1	9 ± 0	8 ± 0	17 ± 0	2 ± 0	8 ± 0	2 ± 0	5 ± 0	< 0,1	190	1,8
	HW	1472 ± 30	3421 ± 92	570 ± 7	2589 ± 48	581 ± 5	134 ± 1	610 ± 6	78 ± 1	403 ± 5	72 ± 1	184 ± 3	< 0,1	10 115	1,3
Neufchâteau	LW	36 ± 5	55 ± 9	9 ± 2	44 ± 4	9 ± 3	8 ± 0	31 ± 3	2 ± 0	8 ± 3	2 ± 1	5 ± 1	< 0,1	210	3,4
	HW	1500 ± 73	3476 ± 198	580 ± 24	2673 ± 108	597 ± 24	138 ± 7	630 ± 29	81 ± 3	416 ± 15	74 ± 4	193 ± 10	< 0,1	10 357	1,3
S13-U	LW	170 ± 6	345 ± 25	52 ± 2	224 ± 8	58 ± 2	22 ± 0	71 ± 8	8 ± 0	44 ± 1	9 ± 0	27 ± 1	< 0,1	1 030	1,5
	HW	146 ± 7	271 ± 4	48 ± 2	225 ± 4	59 ± 1	18 ± 0	60 ± 1	8 ± 0	43 ± 1	8 ± 0	26 ± 0	< 0,1	912	1,3
Epinal	LW	167 ± 1	317 ± 2	50 ± 2	223 ± 1	57 ± 0	23 ± 0	83 ± 1	8 ± 0	42 ± 2	9 ± 0	28 ± 1	< 0,1	1 007	1,8
	HW	135 ± 8	307 ± 85	48 ± 5	222 ± 26	58 ± 8	18 ± 1	76 ± 8	8 ± 1	42 ± 5	8 ± 1	26 ± 4	< 0,1	949	1,6
S14-U	LW	181 ± 9	276 ± 7	56 ± 0	251 ± 8	65 ± 2	18 ± 1	70 ± 3	8 ± 0	41 ± 2	8 ± 0	23 ± 1	< 0,1	998	1,4
	HW	170 ± 7	310 ± 5	57 ± 2	260 ± 8	68 ± 0	18 ± 1	62 ± 1	8 ± 1	39 ± 1	9 ± 1	23 ± 0	< 0,1	1 024	1,2
Remiremont	LW	180 ± 14	264 ± 6	53 ± 2	238 ± 15	63 ± 1	19 ± 1	72 ± 3	7 ± 0	41 ± 1	8 ± 0	24 ± 0	< 0,1	969	1,5
	HW	141 ± 7	251 ± 19	48 ± 2	217 ± 10	57 ± 3	15 ± 1	74 ± 3	6 ± 0	35 ± 1	6 ± 1	20 ± 1	< 0,1	871	1,8
S15-U	LW	424 ± 13	967 ± 16	133 ± 4	581 ± 27	151 ± 4	43 ± 2	161 ± 5	20 ± 1	109 ± 5	20 ± 1	58 ± 6	< 0,1	2 666	1,3
	HW	139 ± 0	307 ± 4	50 ± 1	237 ± 2	68 ± 1	22 ± 1	71 ± 2	10 ± 0	51 ± 1	10 ± 0	28 ± 1	< 0,1	993	1,2
Saint-Dié-des-Vosges	LW	343 ± 5	733 ± 18	101 ± 2	465 ± 1	121 ± 5	36 ± 1	143 ± 3	17 ± 0	88 ± 4	16 ± 0	47 ± 3	< 0,1	2 110	1,4
	HW	139 ± 10	301 ± 18	49 ± 2	229 ± 10	66 ± 3	23 ± 1	78 ± 2	9 ± 0	51 ± 1	10 ± 1	28 ± 0	< 0,1	983	1,4
Liézey	LW	202 ± 3	143 ± 1	61 ± 1	264 ± 4	67 ± 1	14 ± 0	87 ± 16	12 ± 0	69 ± 1	13 ± 0	37 ± 1	< 0,1	958	1,1
	HW	900 ± 20	634 ± 11	194 ± 2	775 ± 6	166 ± 1	32 ± 1	241 ± 50	33 ± 0	197 ± 1	38 ± 1	102 ± 2	< 0,1	3 313	1,2
Montmédy	LW	281 ± 2	622 ± 4	78 ± 0	321 ± 2	70 ± 1	19 ± 0	81 ± 2	10 ± 0	54 ± 1	10 ± 0	28 ± 1	< 0,1	1 577	1,4
	HW	397 ± 26	932 ± 61	116 ± 8	489 ± 33	106 ± 8	28 ± 1	119 ± 8	15 ± 1	79 ± 4	15 ± 1	40 ± 2	< 0,1	2 426	1,3
Lunéville	LW	206 ± 17	475 ± 20	62 ± 4	255 ± 7	64 ± 2	24 ± 1	73 ± 7	9 ± 0	46 ± 2	9 ± 0	24 ± 1	< 0,1	1 251	1,4
	HW	332 ± 25	743 ± 54	102 ± 4	448 ± 31	113 ± 5	35 ± 1	137 ± 21	16 ± 1	87 ± 3	16 ± 1	46 ± 2	< 0,1	2 075	1,3
Blainville sur l'eau	LW	165 ± 6	369 ± 18	48 ± 1	202 ± 4	49 ± 2	21 ± 0	61 ± 2	7 ± 0	36 ± 2	7 ± 0	19 ± 1	< 0,1	981	1,5
	HW	608 ± 21	1242 ± 49	182 ± 3	780 ± 13	189 ± 2	54 ± 0	209 ± 5	27 ± 1	149 ± 9	27 ± 1	74 ± 2	< 0,1	3 541	1,3
Méréville	LW	164 ± 22	340 ± 38	51 ± 5	202 ± 25	50 ± 5	19 ± 2	55 ± 3	7 ± 1	36 ± 3	7 ± 1	21 ± 2	< 0,1	955	1,5
	HW	180 ± 11	379 ± 12	58 ± 3	263 ± 8	64 ± 2	20 ± 2	66 ± 1	8 ± 0	45 ± 1	9 ± 0	26 ± 1	< 0,1	1 117	1,3
Toul	LW	137 ± 14	305 ± 38	42 ± 5	181 ± 19	41 ± 5	20 ± 1	61 ± 8	5 ± 1	29 ± 3	6 ± 0	18 ± 2	< 0,1	836	1,4
	HW	231 ± 19	495 ± 14	75 ± 3	324 ± 11	77 ± 2	23 ± 1	81 ± 2	10 ± 0	54 ± 1	10 ± 0	28 ± 2	< 0,1	1 406	1,3
Ecouvieux	LW	571 ± 15	1188 ± 37	147 ± 5	605 ± 24	133 ± 3	33 ± 1	169 ± 27	18 ± 1	100 ± 3	19 ± 0	52 ± 1	< 0,1	3 009	1,3
	HW	520 ± 182	1216 ± 452	144 ± 53	609 ± 221	128 ± 46	32 ± 11	145 ± 53	18 ± 7	97 ± 37	18 ± 7	50 ± 18	< 0,1	2 380	1,3
Maison Neuve	LW	630 ± 21	1465 ± 56	176 ± 2	735 ± 20	169 ± 5	41 ± 0	182 ± 39	27 ± 1	151 ± 5	29 ± 1	81 ± 4	< 0,1	3 727	1,6
	HW	211 ± 31	463 ± 64	63 ± 7	268 ± 35	58 ± 7	18 ± 1	74 ± 10	9 ± 1	48 ± 6	9 ± 1	26 ± 3	< 0,1	1 246	1,4

Hormis le Gd total, les comparaisons deux à deux des concentrations en REE mesurées entre l'amont et l'aval des rejets de chaque STEP, ont montré que ces concentrations en REE n'étaient pas significativement différentes (Tests Wilcoxon : p-values > 0,05) pour la majorité des sites au cours de chaque période de prélèvement (*Tableau 15*). Quelques sites font exception à cette observation (Tests Wilcoxon : p-values < 0,05). Les dosages ont mis en évidence une diminution de l'ensemble des REE mesurées (La-Er) entre l'amont et l'aval des rejets des stations S5, S7, S11 et S15 au cours de la période des basses eaux (diminution de  $33 \pm 19$  % en moyenne) et des stations S4, S6 et S7 échantillonnées en période de hautes eaux (diminution de  $35 \pm 2$  % en moyenne). Une diminution moyenne de  $24 \pm 11$  % des concentrations en REE légères (La-Eu) a également été mesurée pour la station S1 en période de basses eaux. Les REE sont probablement précipités suite à leur complexation avec des éléments organiques ou inorganiques du milieu (Johannesson *et al.*, 1996 ; Sholkovitz, 1978 ; Tang et Johannesson, 2003 ; Turner *et al.*, 1981) lors du retraitement des eaux usées. En conséquence, la précipitation de ces éléments est probablement responsable d'un enrichissement des boues de STEP en REE comme l'ont montré Laveuf et Cornu (2009) ; et les eaux retraitées et rejetées en sortie de STEP sont appauvries en REE. La dilution de l'effluent dans le cours d'eau à proximité du rejet reflète cet appauvrissement. A l'inverse, une augmentation de l'ensemble des REE (La-Er) (en moyenne de  $304 \pm 90$  %) a été observée entre l'amont et l'aval du rejet de la station S4 en période de basses eaux. Cette augmentation suggère également un impact du rejet de la STEP, où les résultats laissent supposer que le prélèvement a été réalisé au moment d'un relargage de ces éléments métalliques dans les eaux provenant de la station d'épuration.

Les concentrations en Gd total ont été mesurées à des concentrations similaires au cours des deux périodes de prélèvement. Le Gd total a été dosé à des concentrations moyennes de  $103 \pm 65$  ng/L (soit entre 52 et 363 ng/L) en période de basses eaux et à des concentrations moyennes de  $191 \pm 158$  ng/L (soit entre 62 et 630 ng/L) au cours de la période de hautes eaux. Une augmentation de  $79 \pm 85$  % de ces concentrations a été mesurée entre l'amont et l'aval de 9 rejets de STEP (S1, S3, S4, S6, S7, S10, S12, S13 et S14) au cours de la période de basses eaux. De même, une augmentation  $31 \pm 42$  % de ces concentrations a été mesurée entre l'amont et l'aval de 11 rejets de STEP (S1, S3, S5, S6, S8, S9, S11, S12, S13, S14 et S15) au cours de la période de hautes eaux (*Tableau 15*). Ces variations en Gd total laissent supposer un apport en Gd d'origine anthropique provenant de ces rejets.

## 2. Calcul de l'Anomalie en Gd

Les concentrations en REE normalisées à la table de référence « *Upper Continental Crust* » (Taylor & McLennan, 1985) ont permis de mettre en évidence des anomalies en REE. La Figure 39 montre quelques exemples de profils de REE par comparaison au site de référence (R) pour trois sites localisés en aval proche des rejets de STEP (S6, S7 et S11) au cours des périodes de hautes et de basses eaux. Des anomalies négatives en Ce et Eu ont été mesurées sur le site de référence au cours des deux périodes de prélèvement et peuvent être liées à la valence de ces éléments métalliques. Contrairement aux autres REE qui sont toutes trivalentes, Ce peut également être présent sous forme tétravalente et Eu sous forme divalente en fonction des conditions du milieu. Les différentes formes de ces deux REE peuvent augmenter leur précipitation et diminuer leur disponibilité dans les échantillons. Sur cet exemple, des anomalies en Eu ont été également observées pour les échantillons prélevés à proximité des rejets de STEP. Ceci justifie l'emploi des concentrations en Sm pour le calcul de l'anomalie en Gd, par interpolation du Gd théorique naturel avec les REE voisines (Équation 5).

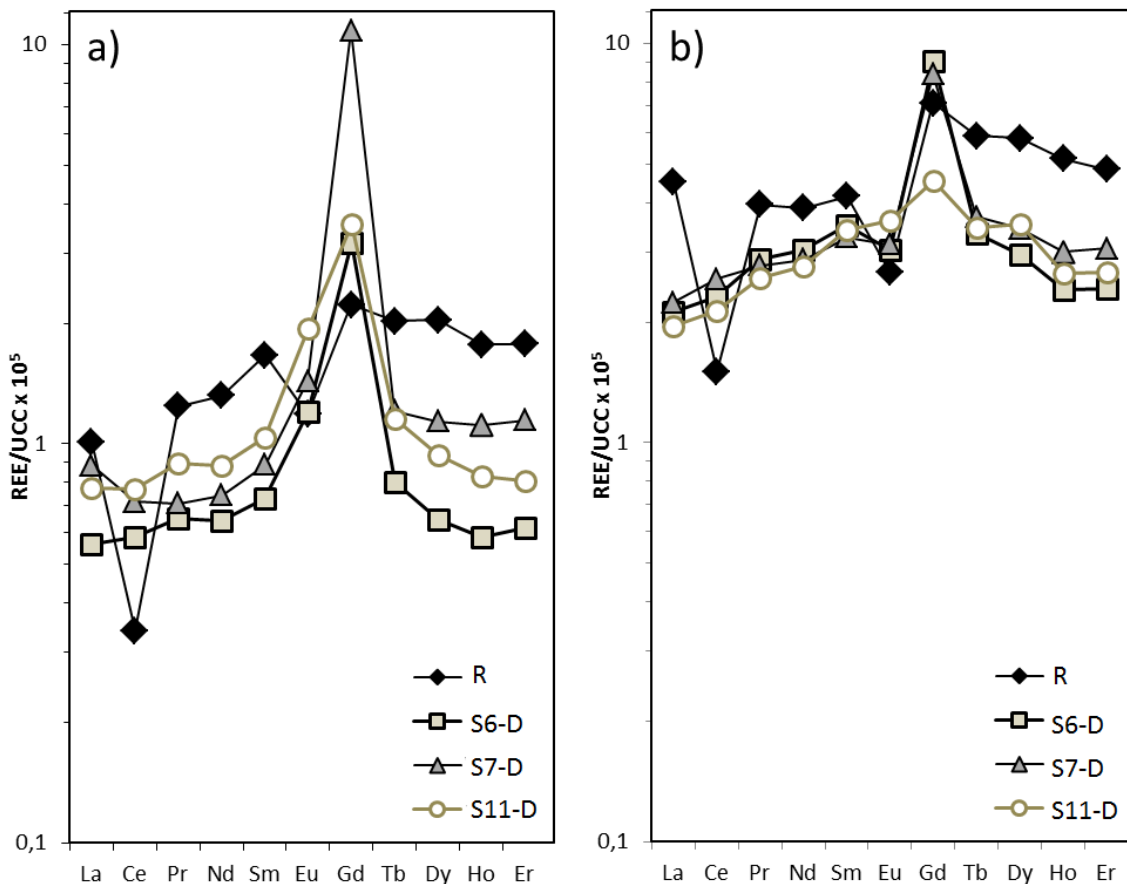


Figure 39 : Exemple de profils de REE calculés pour le site de référence (R) et trois sites localisés en aval des rejets de STEP (Sx-D). Ces profils mettent en évidence les anomalies en REE mesurées au cours des périodes de hautes eaux (a) et de basses eaux (b).

Les valeurs de l'anomalie en Gd (Gd\*) sont présentées dans le *Tableau 15*. Une anomalie positive en Gd a été mesurée sur l'ensemble des sites d'étude et les valeurs de ce Gd\* varient fortement selon les sites. Gd\* a été mesurée à une valeur médiane de 1,75 [1,13 ; 21,80] en période de basses eaux ; alors qu'au cours de la période des hautes eaux, les valeurs de Gd\* étaient globalement plus faibles et ont été calculées entre à 1,3 [1,18 ; 3,04].

Les anomalies positives en Gd les plus fortes, ont été mesurées dans les échantillons prélevés à proximité des rejets de STEP (*Tableau 15*). Les valeurs moyennes de ces anomalies ont été mesurées à  $3,6 \pm 4,3$  pour la période des basses eaux et à  $1,6 \pm 0,5$  pour la période des hautes eaux. Malgré des niveaux d'anomalie fortement variables pour ces sites, ces valeurs sont plus élevées que les pour les autres sites d'étude (R, C et PW), où Gd\* a été mesuré en moyenne à  $1,39 \pm 0,13$  pour période des basses eaux et à  $1,33 \pm 0,08$  période des hautes eaux. Ces mesures suggèrent que du Gd d'origine anthropique est déversé dans les effluents de STEP.

### 3. Comparaison des périodes de basses et de hautes eaux

#### A. Paramètres physico-chimiques

Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés pour l'ensemble des échantillons prélevés au cours des périodes de basses et hautes eaux. Dans ce paragraphe, seuls les résultats des paramètres physico-chimiques sont présentés. Ces résultats seront ensuite utilisés selon deux axes permettant d'une part, de faire lien avec les caractéristiques géochimiques des sites ; et d'autre part, de faire le lien avec les concentrations en Gd d'origine anthropique mesurées à proximité de nos sites d'étude. Les valeurs médianes de ces paramètres sont employées pour décrire les échantillons d'eau et mettre en évidence les mesures les plus fréquentes dans ces échantillons. Les variations des paramètres physico-chimiques entre l'amont et l'aval de chaque rejet de STEP, seront exprimées en pourcentage moyen des valeurs mesurées en aval du rejet par rapport aux valeurs mesurées en amont.

### A.1. Paramètres liés à la géochimie des sites

Les paramètres ayant permis de caractériser les sites d'étude d'un point de vue géochimique sont le pH et le potentiel Redox du milieu (*Tableau 16*), la mesure des concentrations en cations métalliques dans les échantillons (*Figure 40*) et l'alcalimétrie totale (TAC) de l'eau prélevée (*Figure 41*).

Le pH et le potentiel Redox de ces eaux ont été mesurés dans les mêmes gammes de valeur au cours des deux périodes d'échantillonnage, soit respectivement à des valeurs médianes de 7,8 [5 ; 8,4] et de 229 [96 ; 354] (*Tableau 16*). Le pH le plus acide et le potentiel Redox le plus élevé ont été mesurés pour le site de référence au cours des deux périodes de prélèvement.

Pour la majorité des sites, les concentrations en cations métalliques (Al, Fe, Cu, Pb et Cr) (*Figure 40*) ainsi que les valeurs de TAC (2,66 [0,06 ; 6,51] mEq) (*Figure 41*) sont similaires entre l'amont et l'aval de chaque rejet de STEP ; soit en moyenne  $3 \pm 31$  % de différence en période de basses eaux et  $7 \pm 20$  % de différence en période de hautes eaux. La forte variabilité de ces mesures est liée à des variations inter-sites qui ont été notées uniquement pour les échantillons prélevés à proximité de quelques rejets de STEP. D'une part, une augmentation des cations métalliques a été observée entre l'amont et l'aval de la station S4 en basses eaux (*Figure 40*). Cette augmentation mesurée en aval représentait en moyenne  $189 \pm 126$  % des concentrations de ces cations métalliques par rapport à l'amont du rejet. Les mesures de ce prélèvement sur la station S4, suggèrent un rejet inopportun d'éléments métalliques dans l'effluent de la station. D'autre part, une diminution des concentrations en cations métalliques (Al, Fe, Cu, Pb et Cr) a été mesurée entre l'amont et l'aval des rejets de STEP pour les sites S5, S7, S11 et S15 en période de basses eaux (diminution moyenne de  $21 \pm 14$  %), et pour les sites S6 et S7 en période de hautes eaux (diminution moyenne de  $37 \pm 11$  %) (*Figure 40*). En parallèle de la diminution de ces cations métalliques, une augmentation des valeurs de TAC (*Figure 41*) a été notée pour les mêmes sites. L'augmentation de la TAC mesurée en aval des STEP en période de basses eaux, correspondait en moyenne à  $23 \pm 17$  % de la TAC mesurée en amont de ces sites ; et en période de hautes eaux, cette augmentation correspondait en moyenne à  $55 \pm 5$  % de l'alcalimétrie totale mesurée en amont des rejets. Les variations de ces paramètres physicochimiques pour les STEP S5, S7, S11 et S15 en période de basses eaux et pour les

sites S6 et S7 en période de hautes eaux, appuient l'idée d'une complexation des éléments métalliques en sortie de STEP.

Tableau 16 : Valeurs du pH et du potentiel Redox mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D)) en période de basses et de hautes eaux

Echantillon	Basses eaux		Hautes eaux	
	pH	Redox (mV)	pH	Redox (mV)
S1-U	8	228	8,1	262
S1-D	7,92	222	7,9	270
S3-U	7,8	175	7,9	262
S3-D	7,8	173	7,9	258
S4-U	7,8	204	8	235
S4-D	7,5	202	7,82	236
S5-U	7,9	184	8	274
S5-D	8,2	196	8	277
S6-U	7,8	187	8,3	210
S6-D	7,5	210	7,7	250
S7-U	7,1	96	7,8	236
S7-D	7,3	196	7,4	232
S8-U	7,5	183	7,8	230
S8-D	7,5	175	7,8	220
S9-U	7,7	210	7,9	254
S9-D	7,8	200	7,9	259
S10-U	7,9	189	8	244
S10-D	7,8	180	7,9	249
S11-U	7,5	204	8,3	207
S11-D	7,4	199	8,3	220
S12-U	7,8	226	7,8	288
S12-D	7,8	233	7,8	268
S13-U	7,2	256	6,9	271
S13-D	7,4	249	6,8	270
S14-U	7,2	223	7,3	282
S14-D	7,4	224	6,9	268
S15-U	7,5	218	7,8	257
S15-D	7,3	243	7,4	260
R	5,4	275	5	354
C1	8,1	167	8,1	259
C2	7,1	256	7,9	252
C3	7,4	226	7,9	235
C4	7,7	244	7,7	196
C5	7,6	217	7,6	205
PW1	8	187	8,4	270
PW2	7,7	158	7,9	157

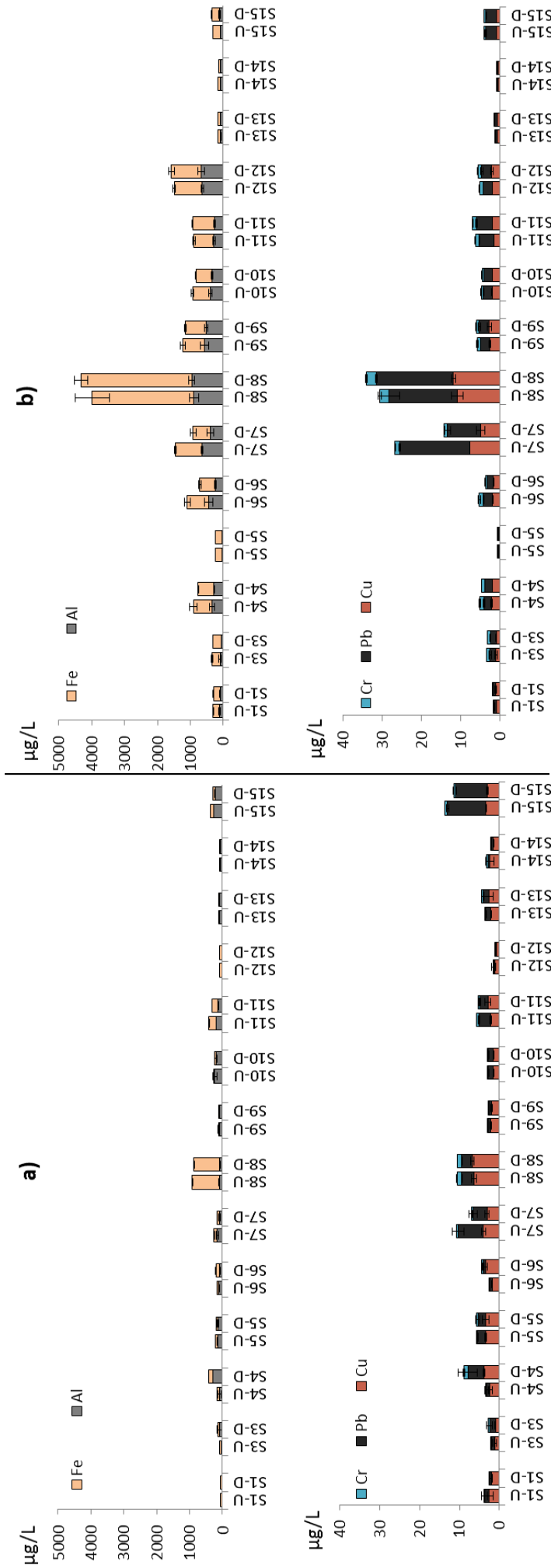


Figure 40 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-types) des ions métalliques (Fe, Al, Cr, Pb et Cu) en  $\mu\text{g/L}$  mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Aval) (U) et en aval (D)). Ces concentrations ont été mesurées pour la période de basses eaux (a) et la période de hautes eaux (b)



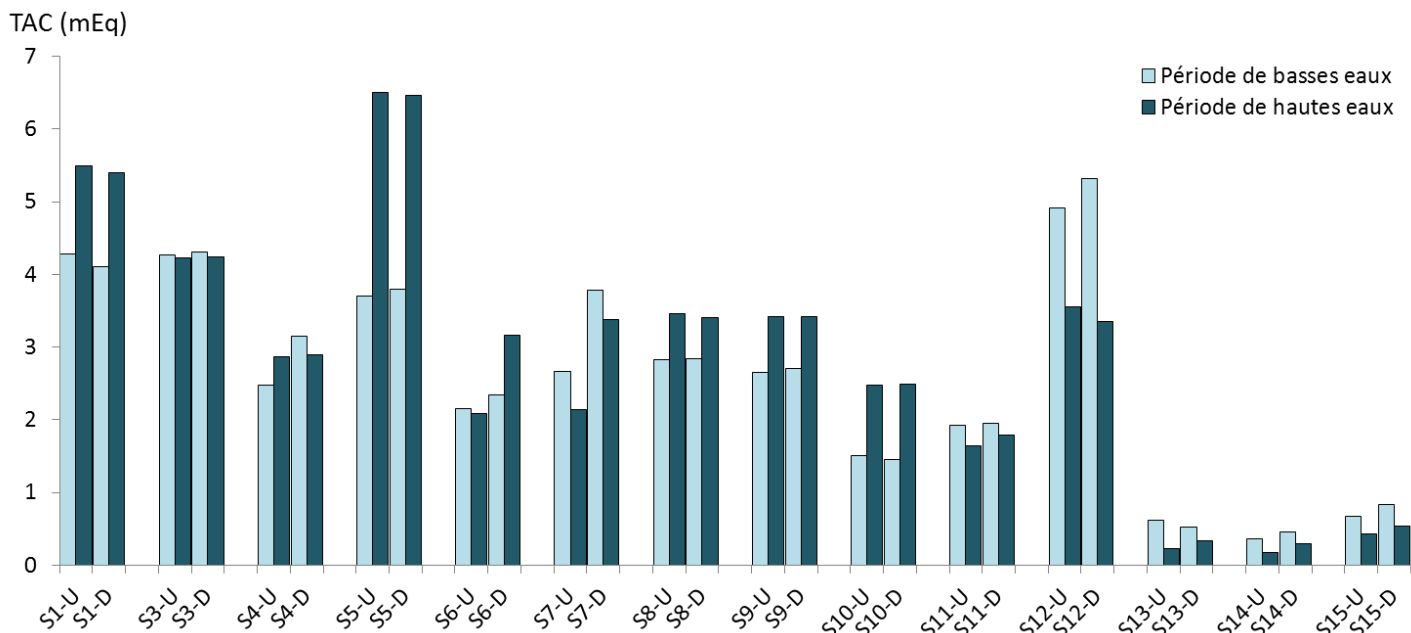


Figure 41 : Valeurs de TAC (mEq) mesurées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S) (Amont (U) et en aval (D)) en période de basses et de hautes eaux.

## A.2. Paramètres liés à l'anthropisation

Les autres paramètres physico-chimiques mesurés, ont permis une approche des résultats employés pour l'étude de la contamination du milieu aquatique par des activités d'origine anthropique. Les concentrations en Bore, la demande chimique en oxygène (DCO), la demande biochimique en oxygène (DBO) et le carbone organique total (TOC) sont quatre paramètres reconnus comme de bons marqueurs d'effluents urbains (*Tableau 17*).

Les concentrations en Bore ont été mesurées à proximité des rejets de STEP en raison de l'utilisation de cet élément dans les détergents ménagers, d'où son rejet dans les eaux usées urbaines retraitées en STEP. Ceci qui lui a valu d'être qualifié de bon traceur d'effluents urbains par le BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières) (*Elbaz-Poulichet et al., 2002 ; Py et al., 2011*). Les concentrations en Bore (*Tableau 17*) sont généralement plus fortes en période de basses eaux (101 [15 ; 521] µg/L) qu'en période de hautes eaux (24 [5 ; 434] µg/L) à l'exception du site PW2 (366,8 ± 9 µg/L en période de basses eaux et 455,7 ± 4,5 µg/L en période de hautes eaux). Ces résultats semblent indiquer une dilution du Bore plus importante au cours de la période de hautes eaux probablement liée à l'augmentation des précipitations et des niveaux d'eau. Le site PW2 étant localisé à proximité (+ 150 m) d'un rejet de SETP secondaire (la station d'épuration de Florange (57)) ; l'augmentation de la concentration en Bore en hautes eaux, laisse supposer que ce prélèvement a été réalisé au

moment d'un rejet important d'eau retraitée. Les mesures ont également mis en évidence des concentrations en Bore significativement plus élevées (Test Wilcoxon : p-value < 0,05) en aval des rejets de STEP. Cette augmentation a été calculée en moyenne à  $31 \pm 47$  % en période de basses eaux et en moyenne à  $13 \pm 22$  % en période de hautes eaux.

Les niveaux de DCO ont été mesurés car leur augmentation dans le milieu signifie que l'eau contient un niveau élevé de matière organique oxydable. Par exemple, les bactéries présentes dans les matières fécales consomment de l'oxygène afin de dégrader la matière organique, ce qui augmente la demande chimique en oxygène. Ces niveaux (*Tableau 17*), sont globalement similaires ( $23,5 [5,1 ; 69,1]$  mg(O<sub>2</sub>)/L) entre les deux périodes d'échantillonnage pour l'ensemble des sites. Une augmentation de la DCO a cependant été notée entre l'amont et l'aval des STEP (Test Wilcoxon : p-value = 0,073 ; augmentation moyenne de  $17 \pm 39$  % au cours des deux périodes).

La consommation de l'oxygène par les microorganismes a été évaluée par les niveaux de la DBO (*Tableau 17*). Ces niveaux ont été calculés à des valeurs similaires entre les deux périodes d'échantillonnage pour chaque site d'étude. La DBO a été mesurée à une valeur médiane de  $2,9 [0,7 ; 16,1]$  mg(O<sub>2</sub>)/L au cours des deux périodes de prélèvement. En période de basses eaux, une diminution significative des valeurs de la DBO a généralement été mesurée entre l'amont et l'aval de plusieurs stations (S1, S3, S7, S9, S10, S11, S12, S13, S14 et S15 ; diminution moyenne de  $26 \pm 21$  %). Cependant, au cours de cette période, une augmentation significative de la DBO a été mesurée entre l'amont et l'aval de certaines STEP (S4, S5, S6 et S8 ; Test Wilcoxon : p-values < 0,05 ; augmentation moyenne de  $91 \pm 87$  %). Au cours de la période de hautes eaux les valeurs de DBO n'étaient pas significativement différentes à proximité du rejet des STEP.

Les concentrations en TOC, liées au taux de matière organique dans le milieu aquatique, ont été dosées (*Tableau 17*). Les valeurs de ce paramètre étaient similaires entre les deux périodes d'échantillonnage pour chaque station ( $3,7 [0,4 ; 11,8]$  mg(C)/L pour l'ensemble des prélèvements). Concernant, la période de basses eaux, les mesures n'étaient pas significativement différentes entre l'amont et l'aval du rejet (Test Wilcoxon : p-value > 0,05). En revanche, pour la période des hautes eaux, les résultats ont mis en évidence que la matière organique rejetée dans le milieu augmente entre l'amont et l'aval des rejets (Test Wilcoxon : p-value = 0,014 ; augmentation moyenne de  $7 \pm 8$  %). Cette augmentation des concentrations en TOC est probablement liée à celle des débits des cours d'eaux en hiver, ce qui laisse

supposer que la matière organique rejetée dans l’effluent n’a pas eu le temps de sédimenter contrairement à la période des basses eaux, où aucune différence n’a été notée.

Les mesures réalisées sur l’ensemble de ces quatre paramètres (concentrations en Bore, DCO, DBO et TOC), montrent une perturbation locale du cours d’eau liée aux rejets des eaux retraitées en STEP. Les fortes variations de ces mesures sont probablement liées aux rejets d’effluent urbains irréguliers au cours du temps et différents selon chaque station d’épuration.

Afin de déterminer l’oxygénation du milieu, les concentrations en oxygène dissous ont été mesurées au cours des deux périodes d’échantillonnage. Ce paramètre a été mesuré à une valeur médiane de 7,8 [1,6 ; 10,1] mg(O<sub>2</sub>)/L en période de basses eaux et à 11,4 [7,2 ; 12,8] mg(O<sub>2</sub>)/L en période de hautes eaux (*Tableau 17*). Les résultats mettent en évidence que les concentrations en oxygène dissous sont globalement similaires entre les deux périodes d’échantillonnage bien qu’une concentration atypique ait été mesurée en amont de la STEP S7 (1,6 mg(O<sub>2</sub>)/L) au cours de la période de basses eaux. Cette mesure est certainement liée au faible niveau, et donc au faible débit du cours d’eau au moment du prélèvement (0,81 m<sup>3</sup>/s selon les données de la DREAL, *communication personnelle*).

*Tableau 17 : Concentrations moyennes (± écart-types) en Bore (B), valeurs des paramètres physico-chimiques (demande chimique et biochimique en oxygène (DCO et DBO), mesure de la conductivité électrique (Cond) et concentrations en carbone organique total (TOC), en oxygène dissous (O<sub>2</sub>d), en sulfates SO<sub>4</sub><sup>-</sup> et en chlorures Cl) pour chaque échantillon. Ces mesures ont été réalisés à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D)) des zones de captage en eau potable (C) et des sites de référence (non contaminé (R) et à pollution multiple (PW) en périodes de hautes (HW) et de basses eaux (LW).*

Echantillon	Période	B (µg/L)	DCO (mg(O <sub>2</sub> )/L)	DBO (mg(O <sub>2</sub> )/L)	TOC (mg/L)	O <sub>2</sub> d (mg/L)	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Cond (µS/cm)	Cl (mg/L)
S1-U	LW	57,7 ± 1,4	19	1,5	1,7	10	25	476	30
	HW	11,6 ± 1,1	10	1,8	1,7	11	11	550	6
S1-D	LW	66,8 ± 1	25	1,3	1,0	9	14	532	15
	HW	16 ± 0,8	12	1,6	1,9	10	17	590	16
S3-U	LW	214,9 ± 3	26	2,7	2,7	6	99	787	49
	HW	111,6 ± 1,8	17	4,3	2,3	10	78	660	33
S3-D	LW	213,3 ± 2,2	28	1,3	1,6	6	97	800	53
	HW	112 ± 2,5	17	4,2	2,4	10	78	663	34
S4-U	LW	204,1 ± 4,9	45	7,0	5,0	6	156	1430	362
	HW	47,4 ± 0,9	26	2,8	3,3	12	59	1473	339
S4-D	LW	212,3 ± 3,2	44	12,4	4,8	6	139	1702	267
	HW	59,2 ± 1,7	23	3,3	3,8	12	67	1418	310
S5-U	LW	518,5 ± 5	30	9,0	4,5	8	241	865	14
	HW	434,8 ± 10,3	11	2,3	1,7	11	385	1370	18
S5-D	LW	509,5 ± 4,2	69	14,0	5,3	8	245	855	23
	HW	409,7 ± 5	28	2,0	2,1	11	370	1350	23
S6-U	LW	115,3 ± 2,5	30	2,9	3,4	8	141	1822	422
	HW	22 ± 1,1	27	2,5	3,7	13	37	1721	430
S6-D	LW	120,8 ± 1,7	38	9,2	6,3	7	103	1435	303
	HW	52,2 ± 0,6	24	2,2	3,8	12	51	1444	332
S7-U	LW	88,4 ± 6,9	29	8,5	3,9	2	84	570	72
	HW	16,6 ± 0,3	26	8,0	3,9	9	20	340	23
S7-D	LW	165 ± 4,8	36	3,3	3,8	7	122	1030	161
	HW	39,5 ± 2,7	35	7,1	4,3	10	43	631	73
S8-U	LW	521,3 ± 19,7	43	3,8	8,0	6	684	2170	153
	HW	137,6 ± 3,1	29	7,7	5,5	9	148	840	59

S8-D	LW	515,8 ± 5,3	39	4,4	5,5	6	693	2190	158
	HW	135,1 ± 2,4	30	8,3	5,2	10	155	830	64
S9-U	LW	102,8 ± 3,2	24	2,0	5,4	7	72	542	38
	HW	34,4 ± 0,2	25	4,0	4,8	12	49	505	23
S9-D	LW	103,5 ± 1,2	24	1,6	5,6	7	73	546	41
	HW	34,7 ± 0,7	27	3,5	4,9	12	47	500	23
S10-U	LW	32,4 ± 0,4	20	1,5	4,6	8	25	216	7
	HW	11 ± 0,5	22	4,2	4,3	9	22	318	12
S10-D	LW	36,5 ± 0,6	22	1,4	4,5	9	26	243	10
	HW	12,1 ± 0,4	21	3,9	4,2	11	22	327	11
S11-U	LW	94,2 ± 1,9	23	2,5	3,6	6	116	3640	1079
	HW	25,8 ± 0	55	3,4	3,7	13	50	4180	1280
S11-D	LW	99,1 ± 0,4	24	1,6	3,4	6	117	3610	1063
	HW	28,3 ± 0,6	50	3,3	3,7	13	10	4050	1224
S12-U	LW	92,1 ± 1	26	1,7	2,3	9	225	959	33
	HW	12,3 ± 0	22	2,9	4,1	11	19	387	7
S12-D	LW	105,7 ± 2	40	1,5	3,2	9	233	1052	55
	HW	13,4 ± 0,4	22	2,4	4,4	11	19	394	8
S13-U	LW	54,9 ± 3,8	18	1,7	4,0	9	10	131	13
	HW	5,4 ± 0,2	15	3,0	2,7	12	5	74	9
S13-D	LW	58,4 ± 4,6	20	1,5	3,8	9	11	146	15
	HW	7 ± 0,5	15	3,1	2,8	12	7	117	21
S14-U	LW	15 ± 0,6	18	1,2	4,0	10	6	97,2	12
	HW	6,6 ± 0,6	11	2,9	2,3	12	4	56,4	7
S14-D	LW	17,1 ± 0,4	17	1,0	3,7	10	7	103,2	13
	HW	7,4 ± 0,7	12	3,7	2,7	11	5	90	12
S15-U	LW	23,9 ± 1,3	22	2,7	4,6	10	8	127	9
	HW	8,3 ± 0,5	20	3,7	2,4	13	7	89,8	7
S15-D	LW	28,3 ± 1,4	25	1,4	4,3	10	9	162	14
	HW	11 ± 0,4	17	2,9	2,5	12	8	126	11
R	LW	7,3 ± 0,2	5	0,7	0,4	10	1	31,6	1
	HW	0,6 ± 0,2	8	1,9	1,0	10	4	26	2
C1	LW	76,7 ± 0,8	33	2,3	5,5	8	124	790	37
	HW	39,5 ± 0,3	24	4,5	3,2	11	66	649	23
C2	LW	21,4 ± 0,2	14	1,8	3,4	9	14	163	11
	HW	4,8 ± 0,1	12	3,4	3,1	12	7	128	8
C3	LW	39,4 ± 0,2	16	1,2	3,3	8	46	278	14
	HW	12,7 ± 0,6	13	2,5	4,4	12	17	230	7
C4	LW	63,7 ± 0,3	16	1,3	3,9	8	53	296	16
	HW	9,1 ± 0,3	15	3,3	2,7	12	20	166	10
C5	LW	97 ± 0,9	19	1,1	3,6	7	129	545	25
	HW	12,5 ± 0,6	16	3,3	3,0	12	25	300	10
PW1	LW	53,9 ± 0,2	49	2,4	11,8	6	219	1004	50
	HW	30 ± 0,7	39	6,8	7,7	7	123	717	28
PW2	LW	366,8 ± 9	55	16,1	4,8	7	200	933	76
	HW	455,7 ± 4,5	23	4,0	3,0	9	453	1485	65

Les activités anthropiques agricoles ont été étudiées par les mesures des concentrations en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), en phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et en sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Les valeurs de ces trois paramètres (*Tableau 17*) étaient globalement similaires entre les deux périodes d'échantillonnage et du même ordre de grandeur entre l'amont et l'aval des rejets de STEP ( $\text{NO}_3^-$  : 5 [1 ; 18] mg/L ;  $\text{PO}_4^{3-}$  : 0,1 [0,0 ; 0,6] mg/L ;  $\text{SO}_4^{2-}$  : 50 [1 ; 693] mg/L). Ces résultats suggèrent que les activités agricoles n'ont pas perturbé les concentrations dans les cours d'eau à proximité des rejets de STEP au moment des prélèvements.

Enfin, les concentrations en chlorures (24 [2 ; 57] mg/L) et la conductivité électrique du milieu (560 [26 ; 4180]  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ont été mesurées. Ces concentrations en chlorures étaient

similaires dans les échantillons au cours des deux périodes de prélèvements (en moyenne  $23 \pm 14$  mg/L). Cependant, des valeurs atypiques de conductivité ont été relevées au cours de ces deux périodes. Pour les stations S4 (1452 [1418 ; 1702]  $\mu\text{S/cm}$ ), S6 (1583 [1435 ; 1822]  $\mu\text{S/cm}$ ) et S11 (3845 [3610 ; 4180]  $\mu\text{S/cm}$ ), ces valeurs étaient plus élevées que pour les autres sites d'étude (en moyenne  $552 \pm 473$   $\mu\text{S/cm}$ ) (*Tableau 17*). Les valeurs atypiques de conductivité pour ces trois sites, sont liées aux activités industrielles des rejets des mines de sel. En effet, ces mines sont localisées en amont des rejets de ces STEP, mais en aval des zones de captage en eau potable (C2 et C3) le long de *La Meurthe* qui se déverse ensuite dans *La Moselle*.

### ***B. Mesures en Gd géogénique et lien avec les paramètres physico-chimiques du milieu***

Dans ce paragraphe, un rapide focus a été réalisé sur les variations des concentrations en Gd géogénique ( $\text{Gd}_{\text{geo}}$ ) calculées à partir de l'Équation 7 (*Figure 42*). Ces mesures ont été mises en lien avec les concentrations des autres REE et avec les paramètres physico-chimiques de chaque échantillon. Comme pour les mesures de concentrations en REE pour l'ensemble des sites (*Tableau 15*), des concentrations en Gd géogénique apparemment plus faibles, mais pas significativement différentes, ont été calculées au cours de la période de basses eaux (60 [12 ; 192] ng/L (*Figure 42*) par rapport à la période de hautes eaux (135 [37 ; 596] ng/L (*Figure 42*)). Les fortes variations en Gd géogénique observées pour chaque site en fonction des différentes périodes d'échantillonnage sont probablement liées à celles des niveaux d'eau au moment des prélèvements. Ces résultats ont également mis en évidence de grandes variations en Gd géogénique inter-sites pour une même période de prélèvement. Ceci laisse présumer que ces variations sont liées au type de socle sédimentaire sur lequel coule le lit des différentes rivières et qui ne contient pas les mêmes proportions en REE sur l'ensemble de la région Lorraine.

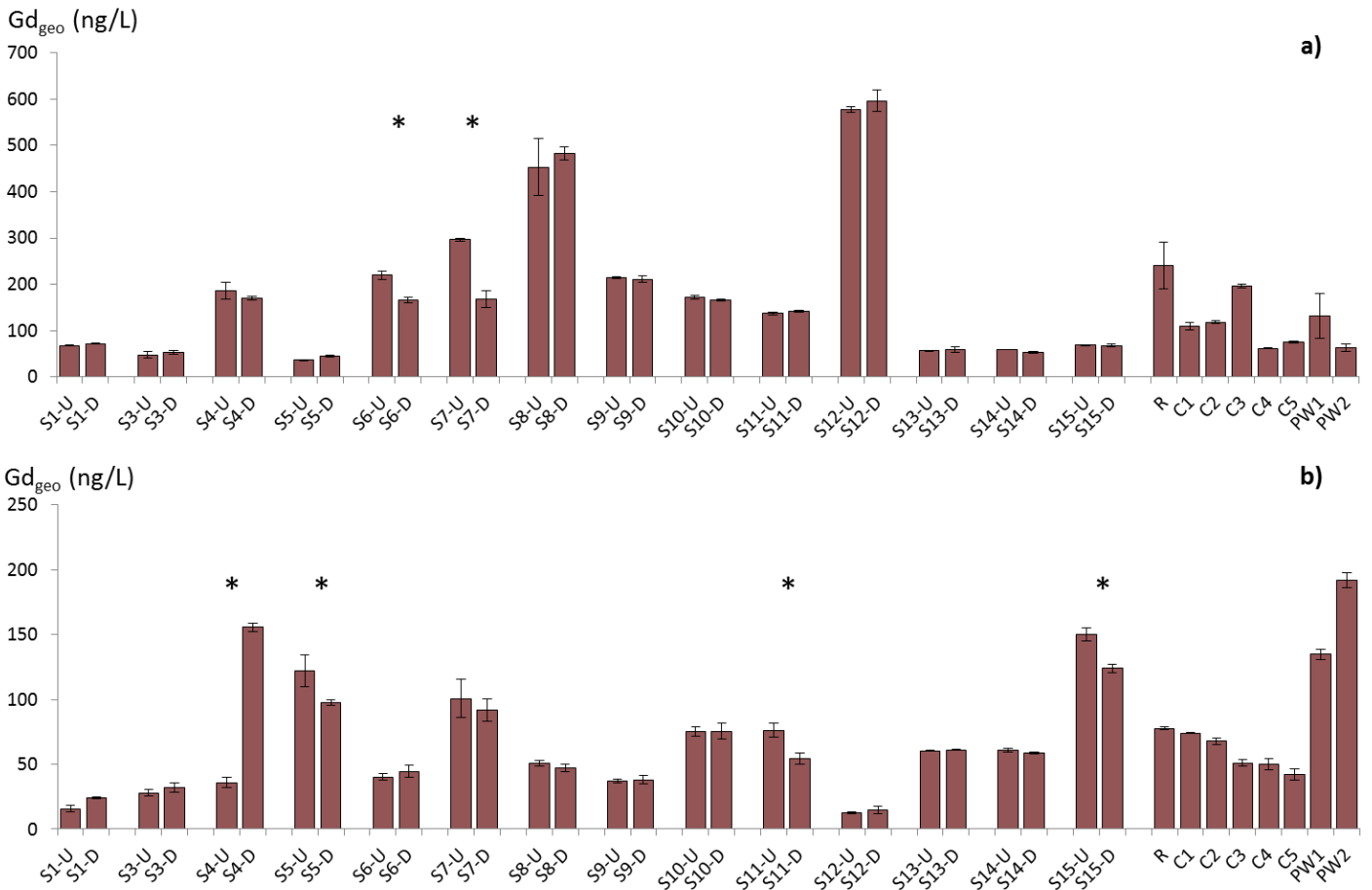


Figure 42 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-types) en Gd d'origine naturelle en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D))). Ces concentrations ont été calculées pour la période de basses eaux (a) de et la période hautes eaux (b).

Pour certains sites localisés à proximité des rejets de STEP, la comparaison des concentrations en Gd géogénique dans les échantillons d'eau, a montré des variations de ces concentrations entre l'amont et l'aval des rejets. La *Figure 42* met en évidence que la station S4 est un cas particulier avec une augmentation des concentrations en Gd géogénique entre l'amont ( $36 \pm 4$  ng/L) et l'aval ( $156 \pm 3$  ng/L) du rejet au moment du prélèvement en basses eaux. Cette augmentation (également mesurée pour les autres REE (*Tableau 15*)) est corrélée positivement à l'augmentation des concentrations en cations métalliques (Al, Cu, Pb et Cr) de ce site (*Tableau 18*). Ceci suggère une remise en suspension de tous les ions métalliques sédimentés dans les boues de STEP, probablement en lien avec le nettoyage des bacs servant à récupérer ces boues peu de temps avant le prélèvement. Il est connu que les REE dissoutes et les autres éléments cationiques sont naturellement complexés avec des ligands inorganiques (Johannesson *et al.*, 1996 ; Turner *et al.*, 1981) ou avec des ligands organiques (Sholkovitz, 1978 ; Tang & Johannesson, 2003). Au moment du retraitement des eaux usées, ces complexes sédimentent dans les boues. Une partie de ces complexes est alors remise en suspension lors de la récupération de ces boues (par curage des bacs) pour l'épandage ou

d'autres activités de recyclage de celles-ci. Puis, avec l'apport de nouvelles eaux usées, les éléments cationiques n'ont pas le temps de re-sédimer et sont rejetés dans l'effluent. Il est probable que notre prélèvement ait été effectué à ce moment-là.

Tableau 18 : Valeurs des corrélations positives (Spearman,  $\alpha = 0,05$ ) entre concentrations en cations métalliques et les concentrations en Gd d'origine géogéniques pour chaque échantillon présentant des variations entre l'amont et l'aval de la STEP mesurées en périodes de haute et de basses eaux. La p-value indique la significativité de la corrélation.

p-value	Période	Al	Cr	Fe	Cu	Pb
S4	Basses eaux	<b>0,003**</b>	<b>0,007**</b>	0,088	<b>0,024**</b>	<b>0,000**</b>
S5		0,419	0,803	0,658	1,000	0,564
S11		<b>0,017**</b>	<b>0,003**</b>	<b>0,033**</b>	0,919	<b>0,003**</b>
S15		<b>0,003**</b>	<b>0,017**</b>	<b>0,017**</b>	0,175	<b>0,017**</b>
S6	Hautes eaux	<b>0,017**</b>	<b>0,003**</b>	<b>0,003**</b>	<b>0,017**</b>	<b>0,017**</b>
S7		<b>0,003**</b>	<b>0,017**</b>	<b>0,003**</b>	0,103	<b>0,003**</b>

\*\* Corrélation significative

A l'inverse, les résultats ont permis de mettre en évidence une diminution de la concentration en Gd géogénique entre l'amont et l'aval de plusieurs stations (S5 (de  $20 \pm 8$  %), S11 (de  $29 \pm 6$  %) et S15 (de  $17 \pm 4$  %) en période de basses eaux ; ainsi que S6 (de  $24 \pm 2$  %) et S7 (de  $43 \pm 6$  %) en période de hautes eaux). Ces diminutions étaient accompagnées de celles d'autres cations métalliques tels que les autres REE géogéniques, l'Al, le Fe, le Cu, le Pb et le Cr (Tableau 18). La diminution en cations métalliques mesurée dans les échantillons a toujours été observée en parallèle de l'augmentation de l'alcalimétrie totale du milieu (Figure 41). Ces observations portent à croire que la complexation des éléments cationiques avec d'autres éléments organiques ou inorganiques du milieu provoque leur précipitation et leur diminution dans la colonne d'eau. Cette diminution affecte uniquement le Gd géogénique présent sous forme cationique libre dans le milieu aquatique et ne concerne pas la présence de Gd anthropique supposé être sous la forme d'agents de contraste.

### C. Concentrations en Gd d'origine anthropique à proximité de nos sites d'étude

Les mesures des concentrations en Gd d'origine anthropique ( $Gd_{anth}$ ) calculées à partir de l'Équation 7, ont mis en évidence la présence de  $Gd_{anth}$  sur chacun des sites d'étude ; c'est-à-dire à proximité des rejets de STEP, des zones de captage en eau potable et des sites à pollution multiple. Les concentrations en  $Gd_{anth}$  mesurées, ne présentaient pas de différence significative (p-value = 0,121) entre les deux périodes d'échantillonnage. Elles ont été calculées entre 2 ng/L et 271 ng/L au cours de la période de basses eaux (soit en moyenne

56,0 ± 62,5 ng/L) et entre 2 ng/L et 140 ng/L dans les échantillons au cours des périodes de hautes eaux (soit en moyenne 43,6 ± 53,2 ng/L).

Au cours des deux campagnes d'échantillonnage, les concentrations en Gd<sub>anth</sub> mesurées en aval à proximité des rejets de STEP représentaient de 5% à 79% du Gd total mesuré dans ces échantillons d'eau. Ceci suppose que le Gd<sub>anth</sub> provient des eaux usées retraitées au niveau de ces stations (Figure 43). Les résultats ont mis en évidence l'augmentation des concentrations en Gd<sub>anth</sub> entre l'amont (17 [4 ; 52] ng/L) et l'aval proche (27 [13 ; 271] ng/L) de 9 rejets de STEP (S1, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S12 et S15) en période de basses eaux (Figure 43). De même, pour la période de hautes eaux, l'augmentation des concentrations en Gd<sub>anth</sub> entre l'amont (8 [0 ; 14 ng/L) et l'aval proche (21 [10 ; 140] ng/L) des rejets de STEP a été observée pour 11 stations (S1, S4, S5, S6, S7, S8, S10, S11, S13, S14 et S15) (Figure 43). Ces augmentations significatives (p-values < 0,01) ont été relevées au cours des deux périodes d'échantillonnage pour 8 sites sur les 14 étudiés.

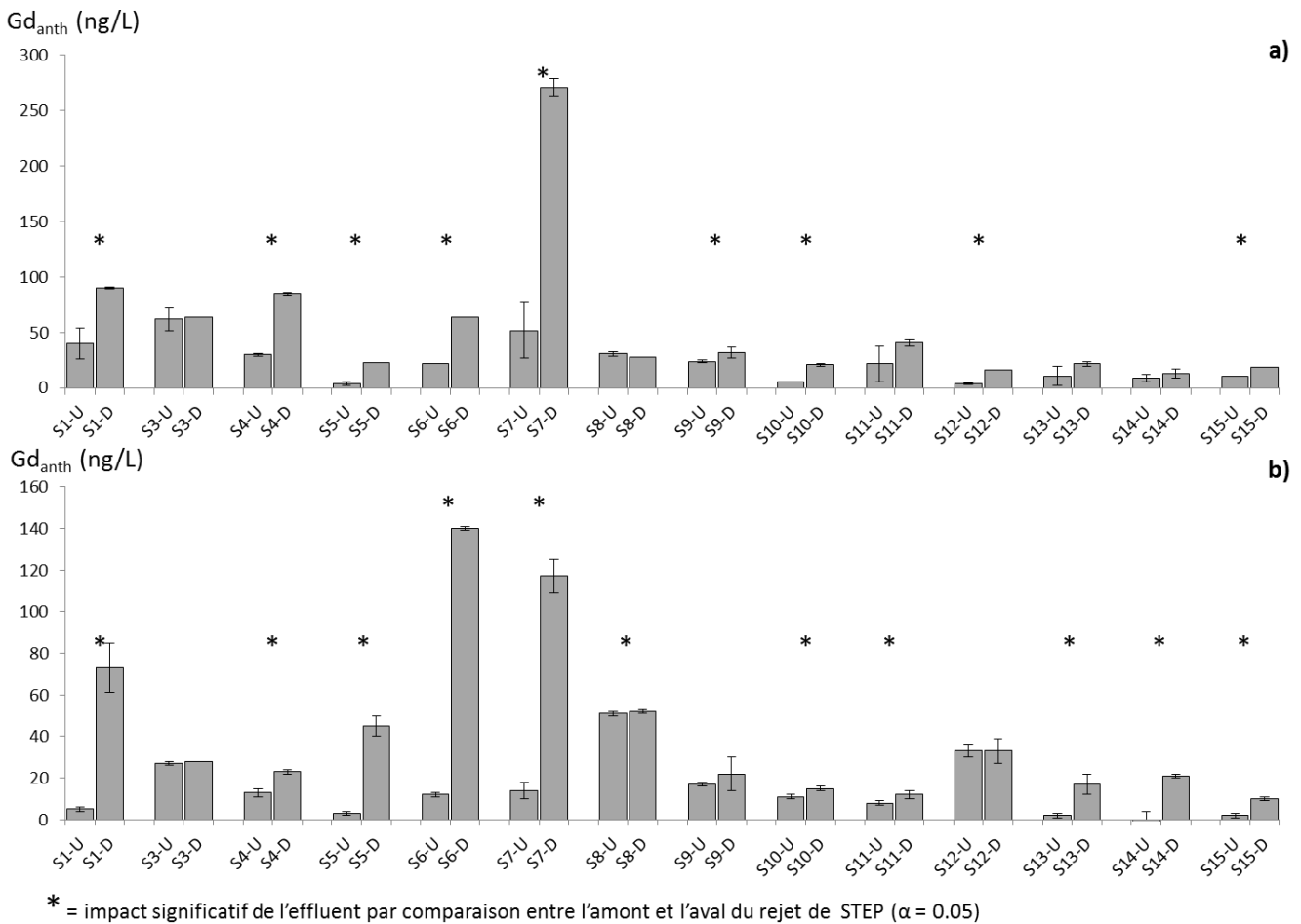


Figure 43 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-types) en Gd d'origine anthropique en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des rejets de STEP (S (Amont (U) et en aval (D)). Ces concentrations ont été calculées pour la période de basses eaux (a) et la période de hautes eaux (b).



L'ensemble des mesures en  $Gd_{anth}$  sont représentatives des concentrations en Gd à un moment précis au cours de la période d'échantillonnage. Afin de mieux comprendre le comportement de ces rejets en  $Gd_{anth}$  dans le milieu aquatique, les concentrations en aval des rejets des différentes STEP ont été étudiées par suivi cinétique pendant 24 heures et 14 jours. Nous avons choisi d'étudier les variations de concentrations en  $Gd_{anth}$  à proximité des deux stations d'épuration ayant les plus fortes capacités de retraitement des eaux usées en Lorraine, à savoir les sites de Metz (S6) et Nancy (S11). Les concentrations médiane, minimale et maximale pour chacun des sites aux cours des deux périodes d'échantillonnage sont présentées dans les *Tableau 19* et *Tableau 20*. Ces mesures réalisées en cinétique ont mis en évidence la présence de fortes variations en aval des rejets de STEP S6 et S11 sur de courtes périodes, c'est-à-dire au cours de la journée et de la semaine. En effet, les concentrations en  $Gd_{anth}$  à proximité des rejets de STEP ont été mesurées entre 5 ng/L et 85 991 ng/L (*Tableau 20*). Les mesures ont souligné que les concentrations en  $Gd_{anth}$  sont supérieures à 1000 ng/L pour 31% des prélèvements de S6 effectués et pour 7% des prélèvements de S11 réalisés en période de basses eaux uniquement et dans 81% des cas, les concentrations en  $Gd_{anth}$  sont inférieures à 200 ng/L. Les variations en  $Gd_{anth}$  pour le site S6 semblent être plus importantes seulement sur une journée au cours de la période de basses eaux. En période de hautes eaux, les concentrations en  $Gd_{anth}$  mesurées pour les deux sites d'étude ont présenté des valeurs similaires, entre 6 et 223 ng/L.

Tableau 19 : Variations des concentrations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées en aval des rejets des STEP de Metz (S6) et de Nancy (S11) de la Lorraine pendant 24h consécutives

$Gd_{anth}$ (ng/L)	Médiane	Minimum	Maximum
<i>Période de basses eaux</i>			
<b>S6-D</b>	38	28	147
<b>S11-D</b>	23	10	158
<i>Période de hautes eaux</i>			
<b>S6-D</b>	34	17	73
<b>S11-D</b>	nd	nd	nd

nd = non déterminé

Tableau 20 : Variations des concentrations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées en aval des rejets des STEP de Metz (S6) et de Nancy (S11) de la Lorraine pendant 14 jours consécutifs.

$Gd_{anth}$ (ng/L)	Médiane	Minimum	Maximum	Jour (heure) du maximum
<i>Période de basses eaux</i>				
<b>S6-D</b>	44	6	5 527	Vendredi (15:00)
<b>S11-D</b>	359	5	85 991	Mercredi (16:00)
<i>Période de hautes eaux</i>				
<b>S6-D</b>	37	6	79	Vendredi (15:00)
<b>S11-D</b>	43	24	223	Jeudi (09:00)

Les résultats ont montré que les variations des concentrations en  $Gd_{anth}$  ne suivent pas un schéma régulier au fil des jours, comme cela est montré en exemple sur la *Figure 44*. Ce propos illustre les variations mesurées sur les deux sites d'étude (S6 et S11) aussi bien en période de basses que de hautes eaux.

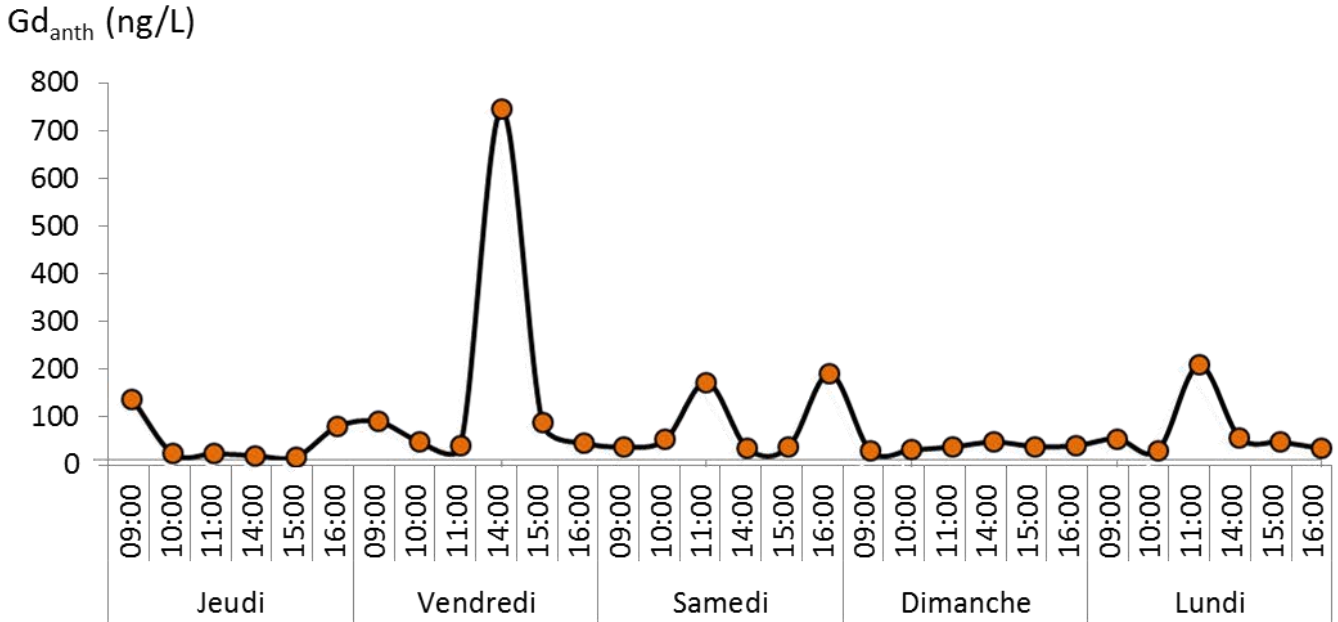


Figure 44: Exemple de variations en Gd d'origine anthropique en ng/L mesurées à 100 m en aval du rejet de S6 au cours de la période de basses eaux.

Au cours de la période de basses eaux, où les concentrations les plus fortes ont été fréquemment mesurées, l'augmentation puis la diminution de ces concentrations a également été relevée sur des périodes beaucoup plus courtes de quelques heures consécutives (Exemple : Figure 45).

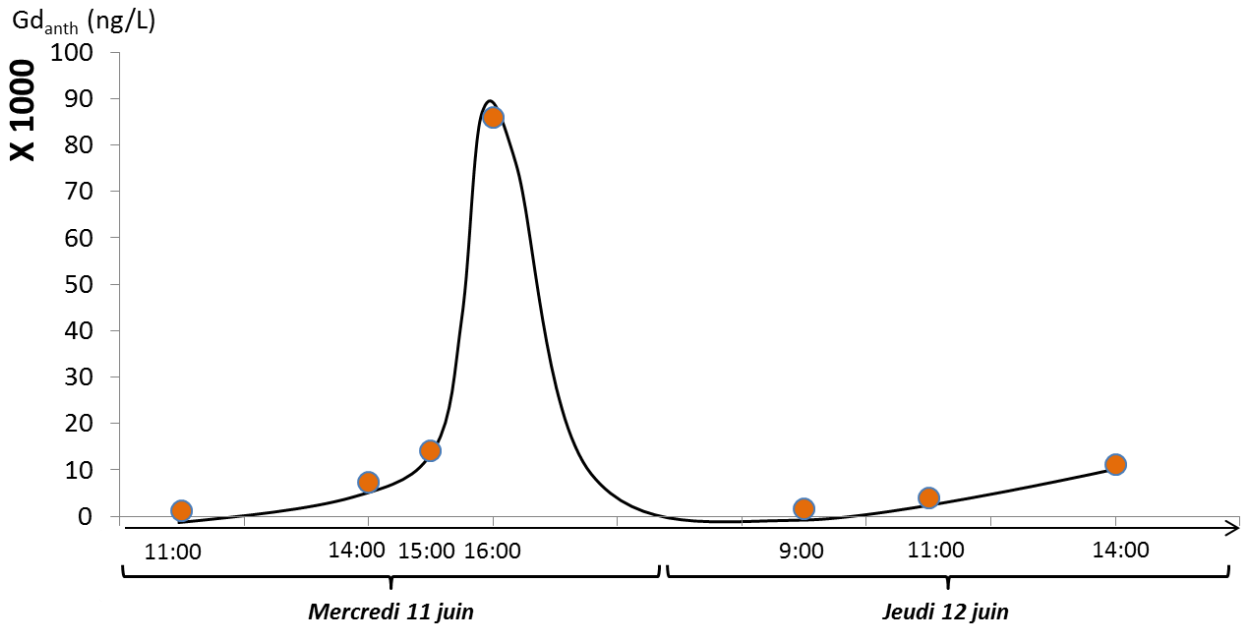


Figure 45 : Exemple de variations sur les concentrations élevées en Gd<sub>anth</sub> en milliers de ng/L mesurées à 100 m en aval du rejet de S11 au cours de la période de basses eaux.

Nos observations laissent à penser que les STEP de la région Lorraine n'ont pas de modèle récurrent quant aux rejets quotidiens et hebdomadaires des concentrations en Gd d'origine anthropique. Il est donc supposé que ces variations sont liées au mode de

fonctionnement de la STEP où les eaux usées subissent plusieurs traitements dont la durée peut être variable en fonction de la qualité de l'eau à la sortie de chaque traitement.

Les concentrations en  $Gd_{anth}$  ont également été mesurées loin en aval de ces rejets à proximité de plusieurs zones de captage en eau potable (C) et des sites à pollution multiple (PW). Le  $Gd_{anth}$  a été mesuré à des concentrations similaires au cours de la période des basses et de hautes eaux. Ces concentrations étaient de 9 [4 ; 13] ng/L pour l'ensemble de ces sites à l'exception de PW2 en période de basses eaux où la concentration en  $Gd_{anth}$  a été estimée à 33 ng/L (Figure 46). Cette concentration élevée en  $Gd_{anth}$  pour PW2 au cours de la période de basses eaux est probablement liée à celle en Bore mesurée au cours de la même période qui suggérait un rejet de la station d'épuration de Florange (57) au moment du prélèvement (Figure 46).

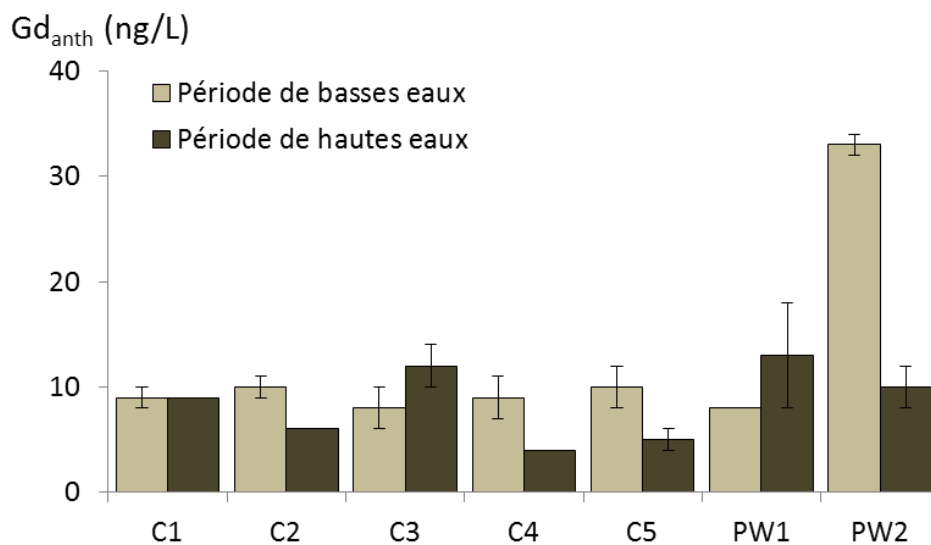


Figure 46 : Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-types) en Gd d'origine anthropique en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé à proximité des zones de captage en eau potable (C) et des sites considérés comme pollués (PW)

L'ensemble des sites d'étude étant répartis sur la région Lorraine, la mesure des différents paramètres physico-chimiques, a permis de décrire ces sites par une analyse en composantes principales (PCA) en lien avec les concentrations en Gd d'origine anthropique. Ces résultats sont présentés sur la Figure 47.

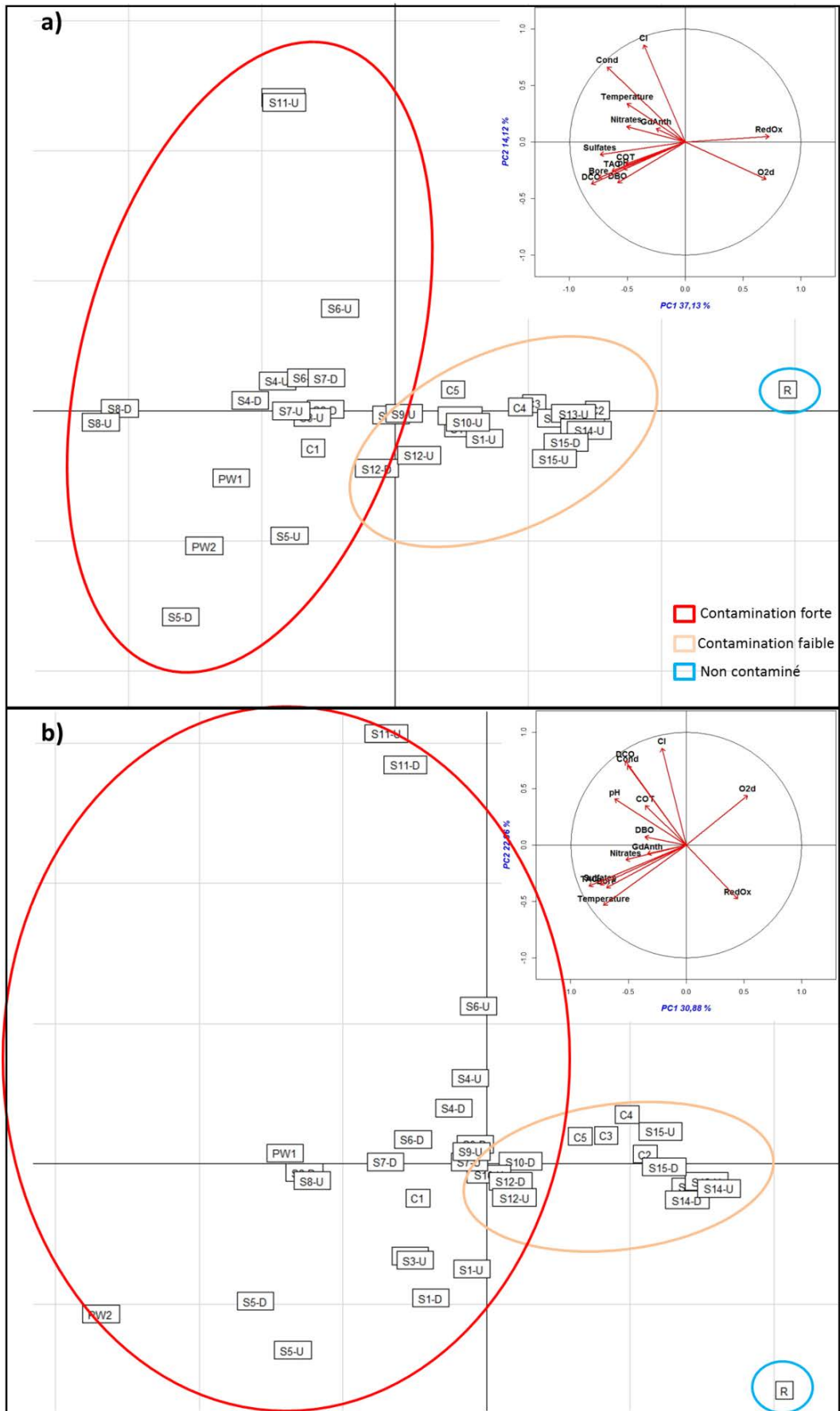


Figure 47 : Séparation des sites en fonction des paramètres physico-chimiques mesurés pour chaque échantillon et des concentrations moyennes en Gd d'origine anthropique pour la période de basses eaux (a) et la période de hautes eaux (b).

La répartition des sites selon les paramètres physico-chimiques et les concentrations en Gd d'origine anthropique mesurés pour chaque échantillon, a permis de mettre en évidence une répartition des sites similaire pour les deux campagnes d'échantillonnage. Les deux premiers axes de ces analyses représentent respectivement 53,25% et 52,25% de la variance totale en périodes de hautes et de basses eaux. Dans les deux cas, l'axe 1 permet de distribuer les sites selon un gradient de contamination du milieu avec les sites les moins contaminés sur la partie positive de cet axe et les plus contaminés sur la partie négative de l'axe. L'axe 2, quant à lui, permet une répartition des sites selon les paramètres plus descriptifs de la physicochimie du milieu tels que la conductivité et les concentrations en chlorures tous deux liés à la salinité du milieu.

Les cercles des corrélations (*Figure 47*) ont permis de proposer des relations entre les concentrations en Gd d'origine anthropique et certains paramètres physico-chimiques. La validité de ces relations a été calculée à l'aide d'un test de corrélation de Spearman ( $\alpha = 0,01$ ) est les valeurs sont présentées dans le *Tableau 21*. Au cours des deux périodes de prélèvement, nos résultats ont montré des corrélations positives des concentrations en  $Gd_{anth}$  avec quatre paramètres employés comme marqueurs d'effluents urbains ont été étudiés : les concentrations en Bore, la demande chimique en oxygène (DCO), la demande biochimique en oxygène (DBO) et le carbone organique total (TOC) (*Tableau 21*). Une corrélation négative avec les concentrations en oxygène dissous dans le milieu a été notée (*Tableau 21*). Ces résultats appuient l'idée que le  $Gd_{anth}$  provient du rejet des effluents de STEP pour les mesures réalisées à proximité de nos sites d'étude

*Tableau 21 : Valeurs des corrélations (Spearman,  $\alpha = 0,05$ ) entre les différents paramètres physico-chimiques et les concentrations en Gd d'origine anthropique pour chaque échantillon prélevé au cours des périodes de basses et de hautes eaux. La p-value indique la significativité de la corrélation et le rho détermine s'il s'agit d'une corrélation négative ou positive.*

Période	Basses eaux		Hautes eaux	
	p-value	rho	p-value	rho
<b>Bore</b>	<b>0,0007</b>	0,54	<b>0,0009</b>	0,53
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0,1814	0,23	0,0531	0,33
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	0,3039	0,18	<b>0,0135</b>	0,41
<b>TOC</b>	0,8638	0,03	<b>0,0078</b>	0,44
<b>DBO</b>	<b>0,0169</b>	0,40	0,2525	0,20
<b>DCO</b>	<b>0,0057</b>	0,45	<b>0,0052</b>	0,46
<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>0,0000</b>	0,62	<b>0,0061</b>	0,45
<b>Cond</b>	<b>0,0078</b>	0,43	<b>0,0167</b>	0,40
<b>O<sub>2</sub>d</b>	<b>0,0014</b>	-0,51	<b>0,0061</b>	-0,45

Les concentrations en chlorures et la conductivité du milieu ont montré une corrélation positive avec l'augmentation du  $Gd_{anth}$  au cours des deux périodes de prélèvement (*Tableau 21*). Ces résultats sont uniquement liés aux niveaux élevés mesurés pour S11, S6 et S4, en lien

avec les rejets des mines de sel localisées en amont des rejets de STEP le long de *La Meurthe*. Ces résultats ne peuvent pas être reliés aux apports en Gd d'origine anthropique.

Ces corrélations ont mis en évidence trois groupes distincts (*Figure 47*) qui peuvent être extrapolés à une nette séparation géographique des sites qui est représentée sur la *Figure 48* :

- (i) le site de référence (R) exempt de contamination au Gd d'origine anthropique localisé à l'extrême sud-est de la région Lorraine
- (ii) un groupe de sites fortement contaminés (soit 31 [4 ; 271] ng/L en période de basses eaux et 22 [3 ; 140] ng/L en période de hautes eaux) composé majoritairement de sites localisés à proximité des sites à pollution multiple (PW) et des rejets de STEP (S) situés au nord et à l'ouest de la Lorraine
- (iii) un groupe de sites faiblement contaminés (soit 11 [6 ; 22] ng/L en période de basses eaux et 8 [0 ; 21] ng/L en période de hautes eaux) composé majoritairement des sites localisés à proximité des zones de captage en eau potable (C) et de quelques rejets de STEP (S) situés au sud de la Lorraine

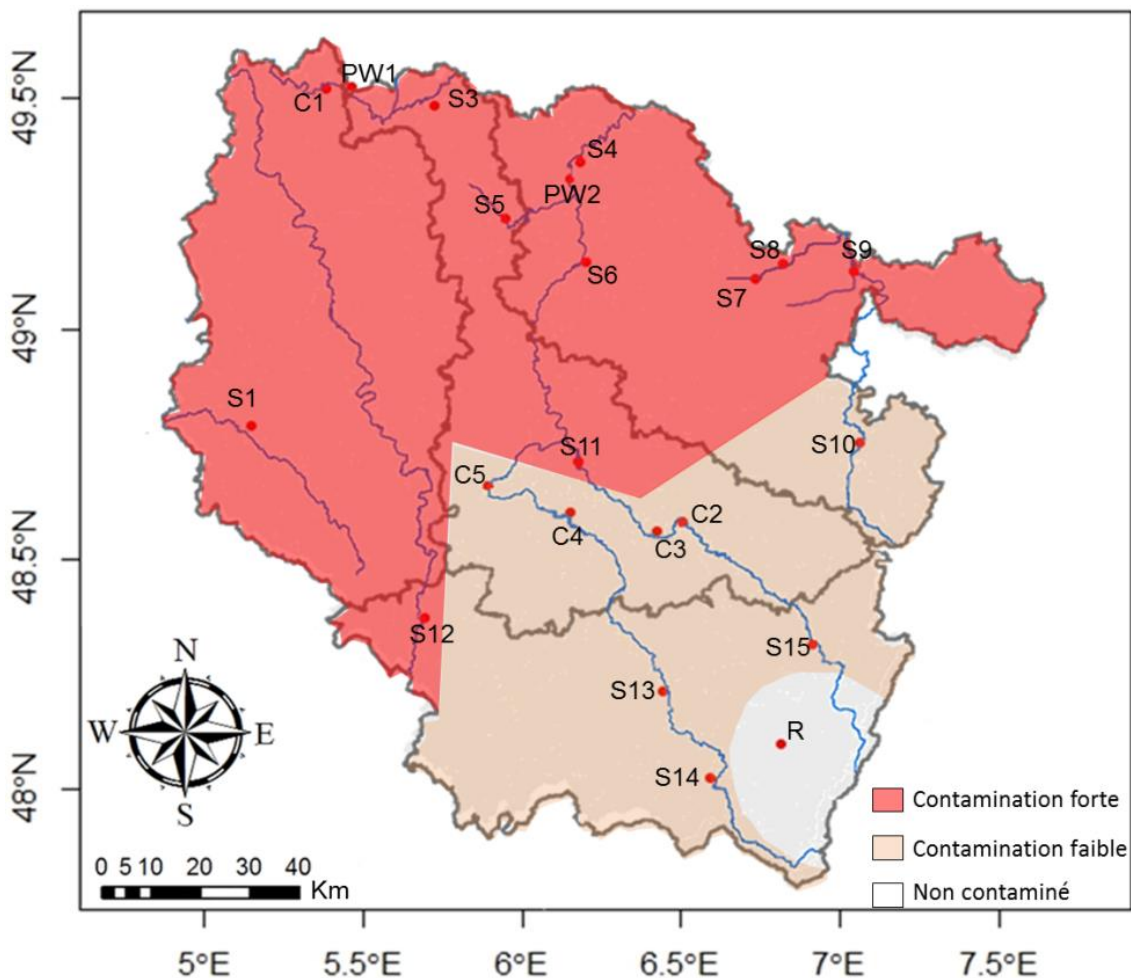


Figure 48 : Séparation géographique résultant des analyses en composantes principales réalisées en fonction des paramètres physico-chimiques et des concentrations en Gd d'origine anthropique mesurés pour chaque échantillon prélevé au cours des périodes de basses et de hautes eaux.

Les résultats montrant une séparation géographique de la région Lorraine sont probablement liés à la densité de population qui est plus concentrée dans les plus grandes villes, où la majeure partie des examens IRM est réalisée. Selon les prévisions de l'INSEE (Institut National d'Etudes Statistiques et Economiques), la région Lorraine est une zone géographique avec une population vieillissante qui est représentative du reste de la France. En conséquence, les installations IRM de cette région sont en constante augmentation pour répondre aux besoins croissants de la population. L'utilisation de produits de contraste gadolinés risque donc d'augmenter dans les années à venir et leur déversement dans le milieu aquatique pourrait alors suivre la même tendance sans contrôle des autorités sanitaires. [Tepe et al. \(2014\)](#) ont déjà étudié la question aux Pays-Bas où ils ont montré une augmentation de 20% de ces rejets en Gd d'origine anthropique entre 2009 et 2012.

Il est établi que les AC-Gd représentent la principale source de Gd d'origine anthropique dans le milieu aquatique ([Telgmann et al., 2013](#)) et ces composés ne sont pas retenus au cours du processus de recyclage des eaux usées en Europe en raison du manque de retraitement spécifique de ce type de déchets ([Rabiet, 2006](#) ; [Telgmann et al., 2012<sup>b</sup>](#)). Au vue de nos résultats, il est supposé que le Gd d'origine anthropique mesuré à proximité de nos sites d'étude (rejets de STEP, ZC et PW) correspond aux rejets en AC-Gd issus des examens IRM et que la contamination par ce type de produits pharmaceutiques se retrouve tout au long des cours d'eau.

Ces mesures en  $Gd_{anth}$  à proximité des zones de captage en eau potable soulèvent la question de la présence de ce Gd d'origine anthropique dans l'eau du robinet après le processus de potabilisation.

#### ***D. Contamination indicative de l'eau du robinet par du Gd d'origine anthropique***

A titre indicatif, nous nous alors sommes intéressés à la mesure de  $Gd_{anth}$  pour quelques points en eau du robinet. Ces prélèvements ont été réalisés à proximité des zones de captage en eau potable au cours de la période de hautes eaux et ont montré la présence de Gd d'origine anthropique dans ces échantillons. Les résultats indiquent une contamination au  $Gd_{anth}$  pour les sites localisés à proximité des stations C2 à C5 entre 0,5 et 1,4 ng/L en moyenne ([Tableau 22](#)).

Tableau 22: Valeurs d'anomalies positives en Gd et concentrations moyennes ( $\pm$  écarts-types) en Gd d'origine anthropique calculés pour les échantillons prélevés en eau du robinet.

Echantillon	Gd*	Gd <sub>anth</sub> (ng/L)
C1	0,45	absent
C2	1,64	0,5 $\pm$ 0,2
C3	2,45	3,2 $\pm$ 1,7
C4	2,08	1,0 $\pm$ 0,1
C5	3,15	1,4 $\pm$ 0,2

Les concentrations en Gd d'origine anthropique sont similaires à celles mesurées à proximité en amont des zones de captage de la région Lorraine. Il est donc supposé que le traitement de potabilisation de l'eau ne permet pas de limiter les concentrations en Gd d'origine anthropique dans l'eau destinée à la consommation, cependant d'autres études sur ce sujet sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

#### 4. Points clés/Conclusions

Les résultats décrits dans ce chapitre permettent de proposer plusieurs conclusions :

- La présence du Gd a été relevée sur l'ensemble des sites étudiés avec la plupart du temps une part du Gd qui peut être considérée comme étant d'origine anthropique.
- La méthode de calcul des concentrations en Gd d'origine anthropique se doit d'intégrer la valeur de l'anomalie en Gd naturelle présente au niveau du site de référence afin de ne pas surestimer ces concentrations dans le milieu aquatique.
- Le Gd d'origine anthropique représente des niveaux élevés pouvant atteindre jusqu'à près de 80 % du Gd total.
- La présence du Gd d'origine anthropique à proximité des sites d'étude est corrélée à des marqueurs d'effluents urbains connus. Ceci laisse à penser que le Gd d'origine anthropique mesuré provient du rejet en agents de contraste employés en IRM, puisque les sites les plus contaminés sont localisés au niveau des rejets de STEP.
- Ces rejets ont présenté de fortes variations au cours du temps qui ont été mises en évidence lors des mesures de cinétique sur plusieurs jours : les concentrations en Gd d'origine anthropique variaient de quelques ng/L jusqu'à près de 85  $\mu$ g/L.
- Les variations de rejets dans le milieu aquatique sont probablement liées au mode de fonctionnement des stations d'épuration. En France, les effluents sont soumis à un critère de qualité de l'eau impliquant un nombre de cycles de retraitements des eaux usées variable.



- En Lorraine, ces rejets dans le milieu aquatique montrent une séparation géographique des sites similaire tout au long de l'année. Les plus forts rejets sont localisés à proximité des villes les plus urbanisées. La région Lorraine est alors partagée en trois grandes parties : les sites les plus contaminés situés au nord et à l'ouest et plus on se dirige au sud-est, plus la contamination au Gd d'origine anthropique est faible avec le site de référence localisé à l'extrême sud-est.

Cette étude a donc suggéré la présence récurrente des agents de contraste gadolinés employés en IRM à proximité des rejets de STEP, et a permis de supposer leur dilution le long des cours d'eau. Les résultats présentés dans **ce chapitre** seront valorisés par la rédaction d'un article soumis dans le journal « *Science of the total Environment* » ([Parant et al., in submission](#) – “*Variations of anthropogenic gadolinium in rivers close to waste water treatment plants rejections*”).

Ces résultats soulèvent la question de la toxicité et de la bioaccumulation des AC-Gd pour les organismes aquatiques. Les mesures en Gd d'origine anthropique ont permis de choisir des concentrations en Gd pour les essais d'écotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®). Les concentrations choisies pour les essais de toxicité et de bioaccumulation de divers organismes dulçaquicoles (microalgues, microcrustacés, poissons et bivalves), sont comprises entre 20 ng(Gd)/L et 10 000 ng(Gd)/L, bien qu'il semble que les concentrations supérieures à 200 ng(Gd)/L soient peu fréquentes (19 % des mesures sur les deux suivis cinétiques pendant 14 jours).





## Chapitre 2 : Bioaccumulation du Gadolinium libre et sous formulation pharmaceutique chez les bivalves filtreurs d'eau douce – Ecotoxicité des AC-Gd

### 1. Accumulation du Gd lors de l'exposition *in situ*

#### A. Concentrations d'exposition au Gd total et d'origine anthropique

Afin de déterminer les capacités d'accumulation du Gd par les bivalves filtreurs d'eau douce, les concentrations en Gd ont été mesurées dans le milieu aquatique à proximité du rejet de la STEP de Metz (S6 localisé à : 49,143911 °N ; 6,197777 °E) au cours d'une exposition *in situ* des organismes. Les concentrations en Gadolinium total et anthropique ont été suivies et mesurées pendant 7 et 21 jours sur les différents sites d'exposition, c'est-à-dire en amont (- 65 m) et en aval (+ 400 m) du rejet de la STEP (*Figure 49*).

Nos résultats ont mis en évidence la présence de Gd d'origine anthropique ( $Gd_{anth}$ ) aussi bien en amont qu'en aval du rejet de la STEP. Les concentrations en Gd sont significativement plus élevées en aval de la station d'épuration (p-value < 0,001) avec des variations de plusieurs dizaines de ng(Gd)/L au cours du temps. Les valeurs moyennes de ces concentrations en  $Gd_{anth}$  mesurées pendant 7 jours sont de  $10 \pm 5,4$  ng/L en amont et  $24 \pm 10,8$  ng/L en aval du rejet. Les concentrations moyennes mesurées pendant 21 jours sont respectivement de  $13 \pm 5,2$  ng/L en amont et de  $36 \pm 19,4$  ng/L en aval du rejet. Ces mesures en  $Gd_{anth}$  représentent respectivement 28% et 53% du Gd total mesuré à proximité en amont et en aval du rejet.

Les bivalves ont donc été exposés *in situ* au  $Gd_{anth}$  qui provient très certainement de la présence d'agents de contraste à base de Gd (AC-Gd) dans le milieu aquatique, comme l'ont suggéré Birka *et al.* (2016) et Telgmann *et al.* (2012<sup>a</sup>).

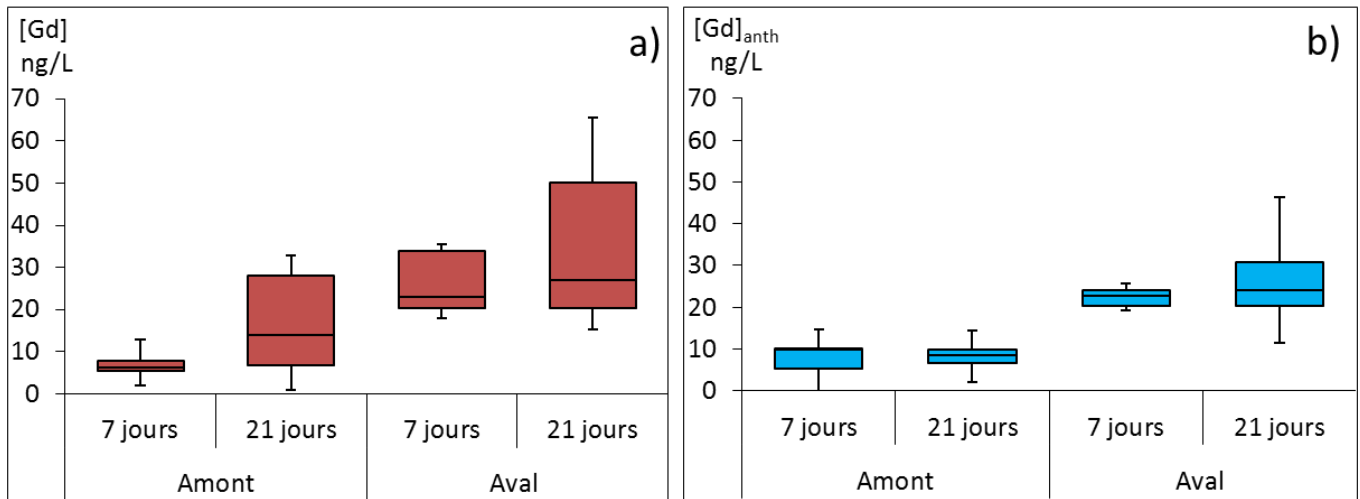
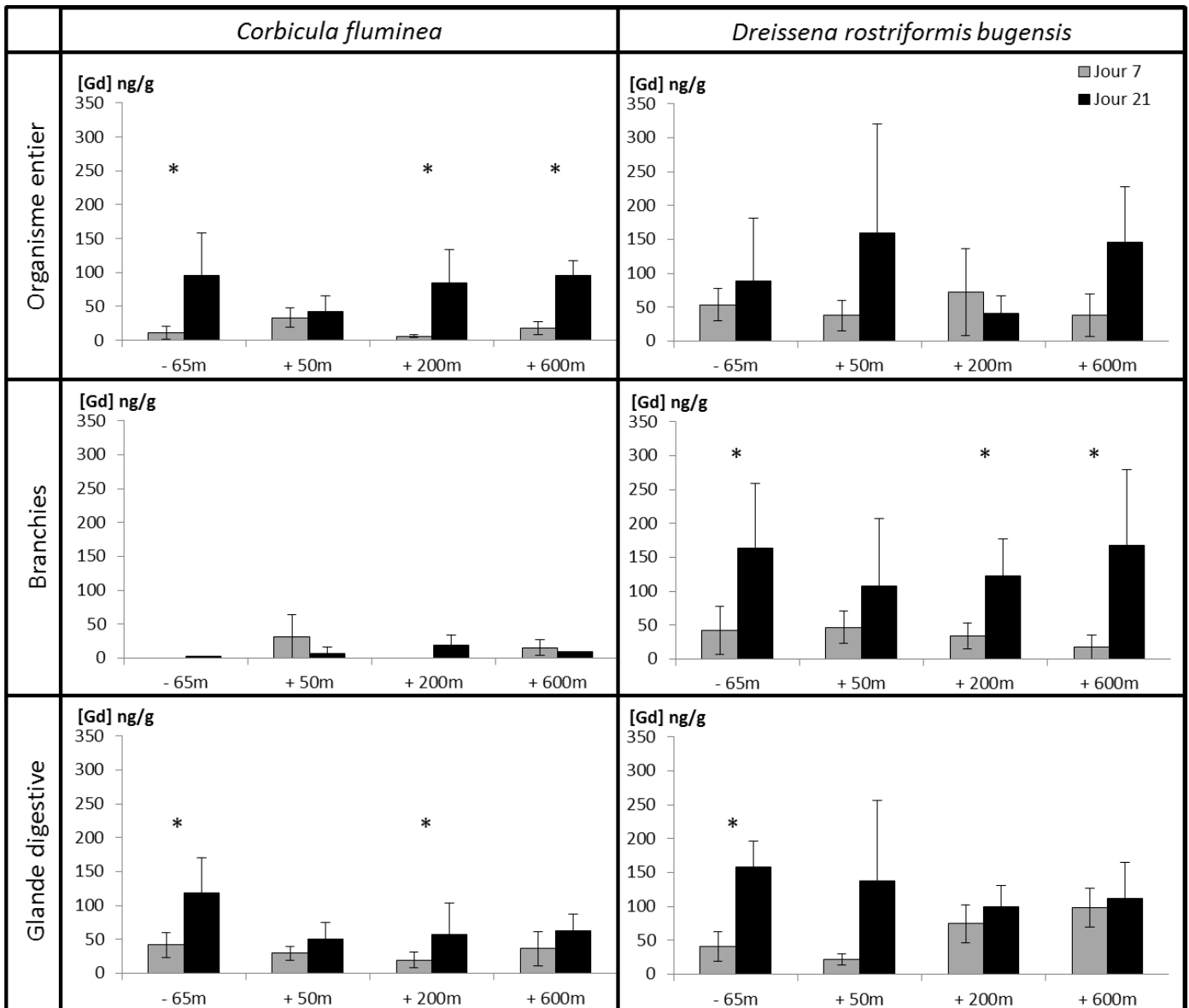


Figure 49: Concentrations en Gd total (a) et anthropique (b) mesurées en amont (- 65 m) et en aval (+ 400 m) du rejet de STEP de Metz au cours de l'exposition des bivalves in situ (c.à.d. pendant 7 et 21 jours)

### B. Accumulation du Gd total chez les bivalves

Ne disposant pas de moyens techniques permettant la mesure directe des AC-Gd, les concentrations en Gd mesurées dans les tissus des bivalves correspondent au Gd total (géogénique et anthropique) mesuré dans les organismes entiers, dans les branchies et dans la glande digestive de chaque individu (Figure 50). Nos résultats ont mis en évidence l'internalisation et l'accumulation du Gd dans les tissus des deux espèces choisies pour cette étude (*Corbicula fluminea* et *Dresseina rostriformis bugensis*). La présence du Gd dans les tissus des organismes a été mesurée pour les individus exposés aussi bien en amont qu'en aval du rejet de la STEP retraitant les eaux usées de la ville de Metz et de sa banlieue.



\* = accumulation significative ( $\alpha = 0,05$ ) du Gd dans les tissus des bivalves entre 7 et 21 jours d'exposition

Figure 50: Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd total mesurées dans les tissus des bivalves en amont et en aval de la STEP de Metz au cours de l'exposition de bivalves in situ (c.à.d. après 7 et 21 jours)

Les concentrations en Gd total dosées dans les tissus des organismes ont été comparées à celles des valeurs moyennes mesurées dans le milieu d'exposition afin d'en déduire les facteurs de bioconcentration (BCF) pour les organismes entiers et les facteurs de bioaccumulation (BAF) pour les tissus de chaque individu (Tableau 23). Ces facteurs ont été calculés pour les organismes exposés en amont de la STEP et pour les individus exposés en aval de la STEP.

Tableau 23 : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des facteurs de bioconcentration (BCF) et de bioaccumulation (BAF) en Gd total calculés pour les tissus des bivalves après 7 et 21 jours d'exposition en amont (-65 m) et en aval (+50 m ; + 200 m ; + 600 m) du rejet de STEP de Metz in situ (c.à.d. après 7 et 21 jours). Les valeurs en gras mettent en évidence une accumulation significative du Gd dans les tissus des bivalves à 21 jours.

Espèce	Tissu	Temps d'exposition	- 65m	+ 50m	+ 200m	+ 600m
<i>C. fluminea</i>	Organisme entier (BAF)	7 jours	490 $\pm$ 451	774 $\pm$ 334	142 $\pm$ 40	411 $\pm$ 230
		21 jours	<b>2905 <math>\pm</math> 1893</b>	717 $\pm$ 397	<b>1432 <math>\pm</math> 848</b>	<b>1627 <math>\pm</math> 371</b>
	Branchies (BCF)	7 jours	NC	715 $\pm$ 783	NC	363 $\pm$ 262
		21 jours	NC	81 $\pm$ 132	335 $\pm$ 241	NC
	Glandes digestives (BAF)	7 jours	1920 $\pm$ 842	691 $\pm$ 232	456 $\pm$ 272	737 $\pm$ 626
		21 jours	3616 $\pm$ 1556	862 $\pm$ 419	973 $\pm$ 782	1059 $\pm$ 412
<i>D. r. bugensis</i>	Organisme entier (BAF)	7 jours	2453 $\pm$ 1089	874 $\pm$ 509	1674 $\pm$ 1477	888 $\pm$ 730
		21 jours	2679 $\pm$ 2828	2702 $\pm$ 2730	695 $\pm$ 432	2478 $\pm$ 1387
	Branchies (BCF)	7 jours	1949 $\pm$ 1636	1082 $\pm$ 559	792 $\pm$ 440	399 $\pm$ 417
		21 jours	4984 $\pm$ 2865	1821 $\pm$ 1701	2079 $\pm$ 924	<b>2838 <math>\pm</math> 1912</b>
	Glandes digestives (BAF)	7 jours	1876 $\pm$ 1007	504 $\pm$ 187	1732 $\pm$ 643	2270 $\pm$ 660
		21 jours	<b>4810 <math>\pm</math> 1128</b>	2331 $\pm$ 2011	1691 $\pm$ 525	1895 $\pm$ 910

NC : valeur non calculable

L'ensemble des concentrations en Gd mesurées dans les tissus des bivalves ont mis en évidence une forte variabilité individuelle des organismes avec des écarts types représentant  $41 \pm 38$  % des concentrations moyennes calculées pour chaque condition (Figure 50). Cette variabilité se reflète sur les valeurs des BCF et des BAF correspondants (Tableau 23). Par exemple, les concentrations en Gd dans les tissus mous de *C. fluminea* sont en moyenne de  $71,3 \pm 23,4$  ng/g de tissu sec pour les organismes exposés pendant 21 jours à 50 m en aval du rejet de la STEP, ce qui correspond à un BAF moyen de  $717 \pm 397$ . Les écarts types calculés pour les BCF et les BAF correspondaient à  $63 \pm 3\%$  de ces valeurs. Malgré cette variabilité, une accumulation significative du Gd a été observée au cours du temps dans les tissus des deux espèces de bivalves.

D'une manière globale, les concentrations mesurées dans l'ensemble des tissus des bivalves sont plus faibles, pour *C. fluminea* que pour *D. r. bugensis* au bout de 21 jours d'exposition in situ sur l'ensemble des sites étudiés, mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Test Wilcoxon : p-values > 0,05). Ceci laisse supposer que *C. fluminea* élimine un peu plus facilement le Gd de son organisme que *D. r. bugensis*.

Chez *C. fluminea*, une augmentation significative des concentrations du Gd total de 4 à 10 fois plus élevée entre le 7<sup>e</sup> jour (45 [21 ; 82] ng/g) et 21<sup>e</sup> jour (87 [24 ; 159] ng/g) d'exposition) a été mesurée pour les organismes entiers exposés sur l'ensemble des sites, sauf en aval proche (+50m) (Figure 50). Chez cette espèce aucune accumulation en Gd n'a été relevée chez les organismes exposés à 50 m en aval du rejet entre 7 et 21 jours d'exposition

(Figure 50). Les branchies de *C. fluminea* n'accumulent pas le Gd total, quels que soient le site et la durée d'exposition. Dans la glande digestive, malgré une augmentation significative des concentrations en Gd après 21 jours pour les organismes exposés en amont et à 200 m en aval du rejet de la STEP (Test Wilcoxon : p-values < 0,05), les BAF calculés ne sont pas significativement différents compte tenu de la forte variabilité interindividuelle. Les BAF sont respectivement de  $1920 \pm 842$  et de  $3616 \pm 1556$  après 7 et 21 jours d'exposition en amont (-65m) et respectivement de  $456 \pm 272$  de  $973 \pm 782$  après 7 jours et 21 jours d'exposition des organismes en aval (+200 m).

Chez *D. r. bugensis* les concentrations en Gd accumulées dans les organismes entiers sont similaires et de l'ordre de  $105 \pm 44$  ng/L pour tous les individus quel que soit le site d'exposition (Figure 50). Aucune accumulation du Gd n'a été mesurée entre 7 jours (en moyenne BAF =  $68 \pm 21$ ) et 21 jours (en moyenne BAF =  $81 \pm 26$ ) dans les organismes entiers. Par contre, une accumulation a été mise en évidence dans la glande digestive des organismes exposés uniquement en amont de la STEP (BAF =  $1\ 876 \pm 1\ 007$  à 7 jours et BAF =  $4\ 810 \pm 1\ 128$  à 21 jours ; Tableau 23). Les concentrations en Gd mesurées dans les branchies de *D. r. bugensis* variaient de  $75 \pm 15$  ng/g à  $237 \pm 113$  ng/g de tissu sec. Une accumulation significative en Gd total dans les branchies entre 7 et 21 jours d'exposition n'a été mise en évidence que pour les organismes exposés le plus en aval du rejet (+600m) (Figure 50). En effet, au niveau de ce site, les BCF calculés dans les branchies sont respectivement de  $399 \pm 417$  de  $2\ 838 \pm 1\ 912$  après 7 jours et 21 jours d'exposition (Tableau 23).

Au cours de cette exposition *in situ*, les organismes ont été exposés à un mélange de Gd sous différentes formes : sous forme ionique libre et sous forme complexée à des composés organiques ou des particules inorganiques. La bioaccumulation du Gd a été évaluée dans les tissus des bivalves. Néanmoins, en raison de notre approche technique, qui permet de mesurer seulement les concentrations en Gd en utilisant l'analyse ICP-MS, nous n'avons pas pu distinguer la part correspondant à du gadolinium anthropique dans les tissus de ces bivalves. Afin d'étudier la bioaccumulation spécifique des AC-Gd dans les tissus des bivalves, des essais avec l'un des AC-Gd les plus fréquemment retrouvés en eaux de rivière (Gd-DOTA (Dotarem®)) (Birka et al., 2016 ; Telgmann et al., 2013) a été réalisé au laboratoire.



## 2. Accumulation du Gd sous forme de Gd-DOTA

### A. Concentrations en Gd-DOTA dans le milieu artificiel

Au cours de l'expérience en conditions contrôlées de laboratoire, les concentrations en Gd ont été mesurées dans le milieu d'exposition des bivalves pour chaque concentration pendant 7 et 21 jours (*Tableau 24*). Les concentrations moyennes mesurées dans le milieu sont proches des concentrations nominales, les concentrations nominales ont donc été employée pour le calcul des BAF de chaque tissu. L'ensemble des concentrations en Gd mesurées dans le milieu et les tissus des bivalves correspondent à celles en AC-Gd, puisque le Gd-DOTA (Dotarem®) représente la seule source de Gd dans le milieu. En raison de la stabilité de ce complexe, il est supposé que le Gd mesuré est présent sous la forme d'AC-Gd macrocyclique, y compris dans les tissus des bivalves.

*Tableau 24 : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd mesurées pendant 7 et 21 jours dans les milieux d'exposition des bivalves au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées.*

Concentration nominale (ng(Gd)/L)	Concentration moyenne mesurée pendant 7 jours (ng(Gd)/L)	Concentration moyenne mesurée pendant 21 jours (ng(Gd)/L)
0	0,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,5
20	15,9 $\pm$ 1,9	15,9 $\pm$ 2,4
60	63,0 $\pm$ 10,6	61,1 $\pm$ 7,4
1 000	990 $\pm$ 80	980 $\pm$ 70
10 000	9 900 $\pm$ 600	9 800 $\pm$ 600

### B. Accumulation spécifique du Gd-DOTA chez les bivalves

Après 7 et 21 jours d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®), les concentrations en Gd ont été mesurées dans les branchies, dans la glande digestive et dans le reste des tissus mous des organismes (*Tableau 25*). Le Gd n'a été détecté que dans les branchies et dans la glande digestive des bivalves.

Après 21 jours d'exposition des bivalves à 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (*Tableau 25*), les concentrations en Gd et les BAF calculés pour les différents tissus de *C. fluminea* et *D. r. bugensis* étaient de zéro, suggérant une absence d'accumulation du complexe à ces faibles concentrations.

Tableau 25 : Moyennes ( $\pm$ écarts-types) des concentrations en Gd-DOTA (ng(Gd)/g) mesurées dans les tissus des bivalves au cours de l'exposition des bivalves en conditions contrôlées de laboratoire (c.à.d. après 7 et 21 jours). Les valeurs en gras montrent l'accumulation du Gd entre 7 et 21 jours.

Espèce	Tissu	Concentrations nominales d'exposition (ng(Gd)/L)	Exposition pendant 7 jours		Exposition pendant 21 jours	
			Concentrations (ng(Gd)/g)	BAF ou BCF	Concentrations (ng(Gd)/g)	BAF ou BCF
<i>C. fluminea</i>	Glande digestive	20	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		60	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		1 000	6,4 $\pm$ 6,2	6,4 $\pm$ 6,2	<b>33,4 <math>\pm</math> 2,6</b>	<b>33,4 <math>\pm</math> 2,6</b>
		10 000	5,4 $\pm$ 6,0	0,5 $\pm$ 0,6	<b>100,4 <math>\pm</math> 19,0</b>	<b>10,0 <math>\pm</math> 1,9</b>
	Branchies	20	-	-	1,8 $\pm$ 2,4	0,0 $\pm$ 0,0
		60	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		1 000	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	5,4 $\pm$ 4,0	5,4 $\pm$ 4,0
		10 000	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	<b>57,4 <math>\pm</math> 3,0</b>	<b>5,7 <math>\pm</math> 0,3</b>
<i>D. r. bugensis</i>	Glande digestive	20	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		60	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		1 000	6,0 $\pm$ 5,8	6,0 $\pm$ 5,8	<b>77,8 <math>\pm</math> 11,8</b>	<b>77,8 <math>\pm</math> 11,8</b>
		10 000	25,0 $\pm$ 4,8	2,5 $\pm$ 0,5	<b>202,9 <math>\pm</math> 27,8</b>	<b>20,3 <math>\pm</math> 2,8</b>
	Branchies	20	-	-	0,2 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
		60	-	-	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
		1 000	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	4,7 $\pm$ 6,2	4,7 $\pm$ 6,2
		10 000	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	<b>22,8 <math>\pm</math> 8,0</b>	<b>2,3 <math>\pm</math> 0,8</b>

Lors de l'exposition des bivalves à 1 et 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$  pendant 7 jours, aucune accumulation de Gd n'a été observée dans les branchies quelle que soit l'espèce considérée. En revanche, dans la glande digestive ces concentrations étaient de l'ordre de quelques ng(Gd)/L, à l'exception de *D. r. bugensis* exposée à 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$  de Gd-DOTA où une accumulation du complexe a été mise en évidence (BAF = 2,5  $\pm$  0,5).

Après 21 jours d'exposition à 1 et 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$  en Gd-DOTA (Dotarem®), les concentrations en Gd mesurées dans les branchies étaient 2 fois plus élevées chez *C. fluminea* (57,4  $\pm$  3,0 ng(Gd)/g à 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$ ) que chez *D. r. bugensis* (22,8  $\pm$  8,0 ng(Gd)/g à 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$ ). La tendance inverse a été observée pour la glande digestive des individus. Ces résultats confirment alors ce qui avait été observé lors des expérimentations *in situ*, à savoir que les deux espèces répondent différemment à la présence de l'AC-Gd dans le milieu afin de limiter son accumulation dans les tissus.

Chez *C. fluminea*, une accumulation significative de l'AC-Gd a été mise en évidence dans les branchies uniquement pour les organismes exposés à la plus forte concentration en Gd-DOTA (10  $\mu\text{g(Gd)/L}$ ) pendant 21 jours (BCF = 5,7  $\pm$  0,3). Dans la glande digestive, l'accumulation du Gd-DOTA a été mesurée chez les organismes exposés à 1 et 10  $\mu\text{g(Gd)/L}$  (Dotarem®) (Tableau 25). Les BAF dans les glandes digestives de *C. fluminea* étaient en

moyennes de  $33,4 \pm 2,6$  pour une exposition à  $1 \mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  et de  $10,0 \pm 1,9$  pour une exposition à  $10 \mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  en Gd-DOTA (Dotarem®).

Chez *D. r. bugensis*, les mêmes tendances que chez *C. fluminea* ont été observées. Une accumulation de l'AC-Gd le Gd dans les branchies a été montrée uniquement chez les bivalves exposés à la plus forte concentration en Gd-DOTA ( $10\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$ ) pendant 21 jours (BCF =  $2,3 \pm 0,8$ ). Dans les glandes digestives, les BAF était en moyenne de  $77,8 \pm 11,8$  pour une exposition à  $1 \mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  et de  $20,3 \pm 2,8$  pour une exposition à  $10 \mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  en Gd-DOTA (Dotarem®).

Aux plus fortes concentrations testées, les concentrations en Gd et les BAF sont plus élevées dans la glande digestive que dans les branchies, quelle que soit l'espèce considérée, mais avec une accumulation plus élevée chez *D. r. bugensis*. Par exemple, chez les organismes exposés à  $1 \mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$ , l'accumulation est 30 fois plus élevée dans la glande digestive de *C. fluminea* que dans les branchies, tandis que chez *D. r. bugensis* elle est 75 fois plus élevée dans la glande digestive que dans les branchies. Ces résultats laissent supposer que les bivalves mettent en place des mécanismes d'efflux qui éliminent plus efficacement l'AC-Gd dans leurs branchies que dans leur glande digestive.

Les valeurs de Gd exprimées en nanogrammes par gramme de tissu sec sont du même ordre de grandeur entre l'expérience conduite *in situ* (de quelques  $\text{ng}(\text{Gd})/\text{g}$  à une centaine de  $\text{ng}(\text{Gd})/\text{g}$ ) et celle réalisée en conditions contrôlées (*Figure 50* et *Tableau 25*). Cependant, les facteurs d'accumulation (BAF et BCF) calculés au cours de l'expérience *in situ* [ $142 \pm 40$  ;  $2984 \pm 2865$ ] sont beaucoup plus élevés qu'au cours de l'expérience en laboratoire [ $0,0 \pm 0,0$  ;  $77,8 \pm 11,8$ ]. Cette différence entre les valeurs des facteurs d'accumulation pour les deux tests, est probablement liée à la présence de Gd sous forme libre présente dans le milieu *in situ*. En effet, le Gd libre est connu pour accumuler fortement dans les tissus mous des organismes (Herrmann et al., 2016 ; Qiang et al., 1994). De fait, malgré la grande différence de concentration en Gd dans les milieux d'exposition, le Gd sous forme d'AC-Gd est nettement moins accumulable que le Gd sous forme particulaire dans le milieu aquatique. A notre connaissance, cette étude est la première mesurant l'accumulation des produits de contraste dans les tissus mous des bivalves.

### 3. Ecotoxicité du Gd-DOTA chez les bivalves filtreurs

L'accumulation des produits de contraste a soulevé la question de leur toxicité pour les organismes filtreurs. La mortalité des individus était inférieure à 10% pendant toute la durée d'exposition des organismes au Gd-DOTA (Dotarem®), ce qui indique que ce contaminant n'est pas responsable d'effets létaux sur les bivalves aux concentrations d'exposition testées.

Les résultats de bioaccumulation du Gd ont suggéré la mise en place de mécanismes de défense en présence de Gd-DOTA (Dotarem®). Afin de vérifier cette hypothèse, les réponses cellulaires semblent être des paramètres appropriés pour la détection des effets découlant de la présence de ce produit de contraste dans le milieu. Une batterie de biomarqueurs a donc été mesurée dans les glandes digestives et les branchies des organismes exposés au Dotarem® au laboratoire. Ces différents biomarqueurs sont : les concentrations en protéines dans le broyat et dans la fraction cytosolique ; les concentrations en triglycérides ; la dépense énergétique par l'étude du système de transfert d'électrons mitochondriaux ; les concentrations en hydroperoxydes lipidiques ; l'activité des phosphatases acides ; l'activité de la catalase ; l'activité Glutathion-S-Transférase et l'activité de la lactate déshydrogénase.

Une analyse descriptive préliminaire a été effectuée à l'aide d'analyses en composantes principales (PCA) englobant l'ensemble des biomarqueurs mesurés pour chaque organe de chaque espèce aux différentes conditions d'exposition. Ces analyses graphiques ont mis en évidence la forte discrimination des réponses des marqueurs biochimiques selon l'espèce de bivalve testée (*C. fluminea* ou *D. r. bugensis*). La *Figure 51* illustre un exemple de cette discrimination pour les organismes exposés à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 21 jours.

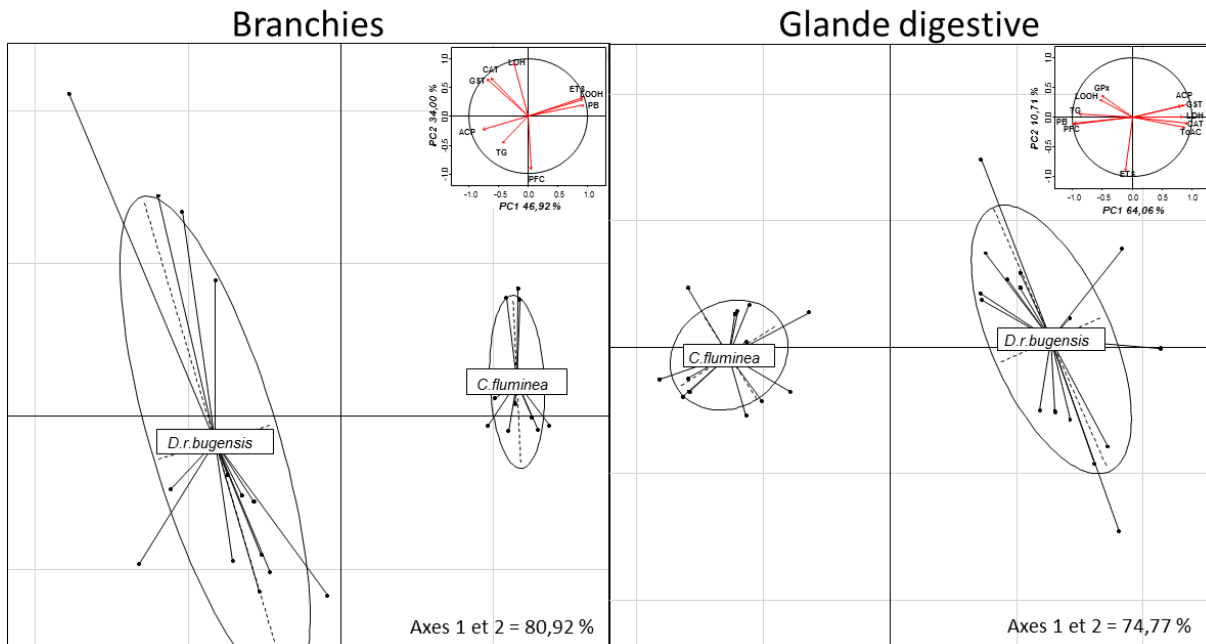


Figure 51 : PCA globales montrant un exemple graphique des différences d'expression des biomarqueurs dans les branchies et la glande digestive des deux espèces de bivalves exposées à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 21 jours

### A. Variabilité individuelle des réponses des biomarqueurs chez les individus témoins

Pour les individus témoins, des différences significatives (Test Kruskal-Wallis, p-values <0,05) entre les valeurs de biomarqueurs ont été observées dans les branchies et dans la glande digestive des bivalves.

Lors de l'essai permettant de déterminer les effets de l'AC-Gd à faibles concentrations (20 et 60 ng(Gd)/L ; [Annexe 6](#)), certains biomarqueurs branchiaux (les concentrations en protéines contenues dans la fraction cytosolique et l'activité de la lactate déshydrogénase) répondaient différemment entre les témoins pour *C. fluminea* alors qu'il n'y avait aucune différence pour *D. r. bugensis* ([Annexe 6](#)). Par exemple chez *C. fluminea*, les concentrations en protéines contenues dans la fraction cytosolique des branchies sont significativement plus élevées à 21 jours ( $36,96 \pm 4,42$  mg/gMF) qu'au premier jour ( $25,97 \pm 2,51$  mg/gMF). Cette augmentation a été mesurée en parallèle d'une diminution significative de l'activité de la lactate déshydrogénase à 0 et à 21 jours. A l'inverse, pour les biomarqueurs mesurés dans la glande digestive des bivalves, une augmentation significative de l'activité de la catalase a été mesurée dans la glande digestive chez les témoins de *D. r. bugensis* à 0 et 21 jours, alors qu'il n'y avait aucune différence chez *C. fluminea* ([Annexe 6](#)).

Concernant l'essai permettant de déterminer les effets de l'AC-Gd à fortes concentrations (1 et 10 µg(Gd)/L ; Perrat et al., 2017), les biomarqueurs branchiaux des témoins mesurés ont mis en évidence que seules les concentrations en protéines contenues dans la fraction cytosolique des témoins, diminuent significativement entre 7 et 21 jours chez *C. fluminea*. Dans la glande digestive, une diminution significative de la capacité antioxydante totale et de l'activité de la catalase des témoins a été mesurée chez *C. fluminea* entre 7 jours (respectivement  $39,14 \pm 20,81$  µmol(Teq)/gprot/min et  $219 \pm 102$  mmol(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/gprot/min) et 21 jours (respectivement  $4,30 \pm 1,60$  µmol(Teq)/gprot/min et  $65 \pm 22$  mmol(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/gprot/min). En parallèle, une augmentation de 290 % des activités des phosphatases acides a été mesurée entre 7 jours et 21 jours. Chez *D. r. bugensis*, les activités des phosphatases acides, de la lactate déshydrogénase et de la capacité antioxydante totale ont diminué entre 7 jours et 21 jours (Perrat et al., 2017). Les valeurs de ces biomarqueurs sont respectivement de 2,1 ; 1,7 et 4,1 fois plus élevées à 7 jours par rapport aux mesures à 21 jours.

Ces observations suggèrent que la dépuración n'était pas complète pour les deux espèces de bivalve, malgré les 21 jours d'acclimatation précédant les essais d'exposition des organismes au Gd-DOTA. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de comparer les réponses des biomarqueurs dans chaque tissu et pour chaque espèce à leurs témoins respectifs après 7 et 21 jours d'exposition.

### **B. Toxicité du Gd-DOTA sur les branchies des bivalves**

Les valeurs moyennes ( $\pm$  écarts types) des mesures des biomarqueurs dans les branchies des bivalves sont présentées en [Annexe 6](#) pour chaque condition d'exposition. Les réponses des biomarqueurs mesurés dans les branchies des bivalves présentent une forte variabilité individuelle à la présence de l'AC-Gd dans le milieu. Cette variabilité est comprise entre 0 et 85 % pour l'ensemble des biomarqueurs mesurés. Dans ce paragraphe, seuls les résultats des biomarqueurs montrant des variations significatives seront mis en évidence.

Chez *C. fluminea*, les résultats ont souligné que la présence de l'AC-Gd ne semble pas avoir d'impact sur les biomarqueurs mesurés dans les branchies quelle que soit la concentration d'exposition à l'AC-Gd (Tests Kruskal-Wallis et Wilcoxon ; p-values > 0,05) ([Annexe 6](#)).

Chez *D. r. bugensis*, seule la concentration d'exposition à 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) est responsable de la réponse significative de plusieurs biomarqueurs mesurés dans les branchies (*Tableau 26*). La différence globale de réponse des individus à cette concentration d'exposition, a été mise en évidence par l'analyse de MANOVA réalisée sur l'ensemble des biomarqueurs mesurés à 21 jours (Pillai, df = 18, p-value = 0,004). Les variations significatives de chaque biomarqueur ont été montrées par la sélection des biomarqueurs de plus forte importance (*Variable Importance in the Projection* (VIP) > 1) (*Tableau 26*). Une diminution de 78 % de la concentration en protéines dosées dans la fraction cytosolique a été mesurée pour les individus exposés à 60 ng(Gd)/L par rapport aux témoins (*Annexe 6*). En parallèle, l'augmentation des activités de la lactate déshydrogénase, de la glutathion-S-transférase et de la catalase, étaient respectivement à 218 %, 272 % et 225 % par rapport aux témoins. Enfin, une augmentation non significative de la dépense énergétique a été notée entre des individus témoins ( $18,62 \pm 3,49 \mu\text{mol}(\text{O}_2)/\text{gMF}/\text{h}$ ) et les organismes exposés à 60 ng(Gd)/L d'AC-Gd ( $24,02 \pm 5,63 \mu\text{mol}(\text{O}_2)/\text{gMF}/\text{h}$ ). Ces observations suggèrent un coût énergétique de la présence de l'AC-Gd pour les cellules et mettent en évidence la toxicité du Gd-DOTA dans le milieu d'exposition à 60 ng(Gd)/L. En réponse à cette toxicité, des mécanismes de défenses se traduisant par l'augmentation des activités de la glutathion-S-transférase et de la catalase ont été mis en place au niveau branchial chez *D. r. bugensis*.

*Tableau 26 : Moyennes ( $\pm$  écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurées dans les branchies de *D. r. bugensis* après 0 et 21 jours d'exposition à 0 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®).*

*Les valeurs des VIP (Variable importance in the Projection) obtenues pour l'analyse PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) sont présentées pour décrire l'importance des variables sur la projection au seuil de 1 (Chong et Jun, 2005). Les valeurs en gras mettent en évidence une différence significative par rapport aux témoins.*

<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>	Jour 0 (0 ng(Gd)/L)		Jour 21		VIP (PLS-DA)
	0 ng(Gd)/L	60 ng(Gd)/L	0 ng(Gd)/L	60 ng(Gd)/L	
PB (mg/gMF)	17,58 $\pm$ 2,26	17,07 $\pm$ 1,34	14,41 $\pm$ 4,73	0,79	
PFC (mg/gMF)	51,35 $\pm$ 7,59	57,27 $\pm$ 13,56	<b>11,89 <math>\pm</math> 2,66</b>	1,17	
TG (mg/gMF)	0,07 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,02	1,04	
ETS ( $\mu\text{mol}(\text{O}_2)/\text{gMF}/\text{h}$ )	17,80 $\pm$ 4,43	17,53 $\pm$ 4,51	24,02 $\pm$ 5,63	1,00	
LOOH ( $\mu\text{mol}(\text{TBH})/\text{gMF}$ )	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,11	0,31 $\pm$ 0,10	0,44	
ACP ( $\mu\text{mol}/\text{gprot}/\text{h}$ )	105,73 $\pm$ 13,14	105,39 $\pm$ 21,64	106,04 $\pm$ 4,50	0,45	
CAT (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	21 $\pm$ 8	24 $\pm$ 7	<b>74 <math>\pm</math> 22</b>	1,17	
GST ( $\mu\text{mol}(\text{CDNB})/\text{gprot}/\text{min}$ )	34 $\pm$ 7	35 $\pm$ 7	<b>129 <math>\pm</math> 27</b>	1,29	
LDH ( $\mu\text{mol}(\text{NADH})/\text{gprot}/\text{h}$ )	30 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	<b>92 <math>\pm</math> 26</b>	1,24	

L'ensemble des mesures ont été intégrés dans les analyses globales de PLS-DA (*Partial Least Squares regression - Discriminant Analysis*), qui ont permis de discriminer les groupes de bivalves en fonction de leur réponse à l'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). Concernant

les individus exposés aux faibles concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®), les projections des groupes expérimentaux (les groupes témoins à 0 et 21 jours et les groupes exposés à 20 et 60 ng(Gd)/L), sont représentées graphiquement par analyse PLS-DA. Cette représentation des biomarqueurs mesurés dans les branchies de *D. r. bugensis*, montre l'absence de différence entre les biomarqueurs dosés pour les individus témoins et pour les organismes exposés à 20 ng(Gd)/L et illustre les différences de réponse des biomarqueurs mesurées pour les organismes exposés à 60 ng(Gd)/L (Figure 52).

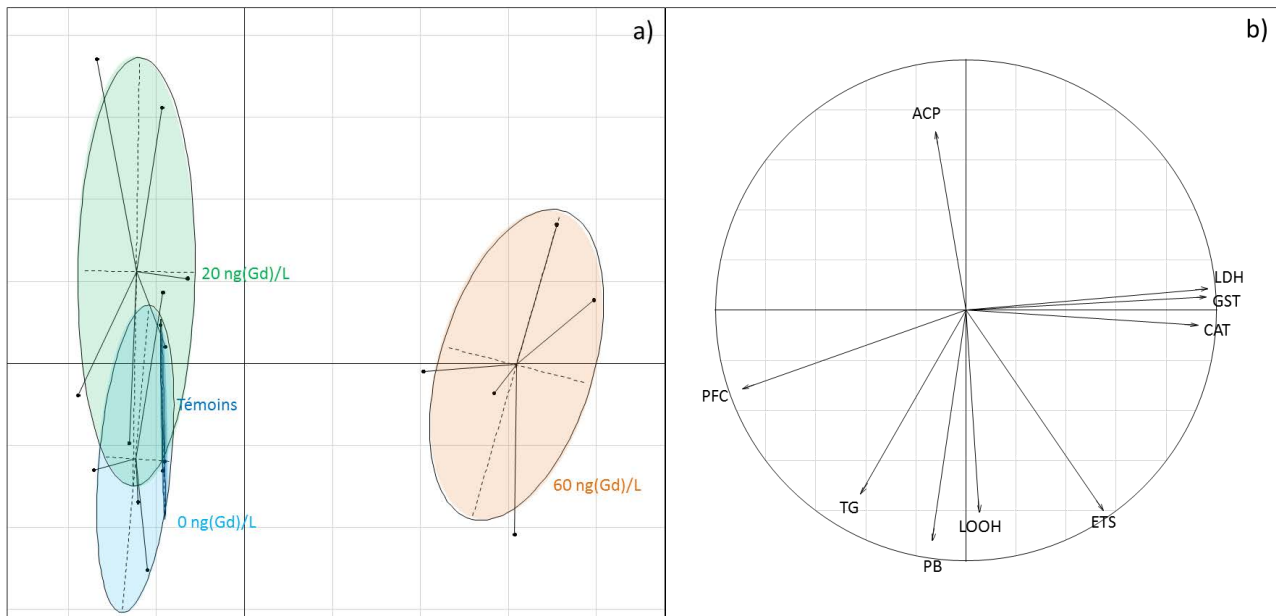


Figure 52 : Projection graphique (a) et cercle des corrélations et (b) de la PLS-DA des biomarqueurs étudiés chez *D. r. bugensis* exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) après 0 jours (Témoins) et 21 jours d'exposition à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L.

Nos résultats ont également souligné l'absence de réponse des biomarqueurs dans les branchies de *D. r. bugensis* exposées pendant 7 et 21 jours à 1 et 10 µg(Gd)/L d'AC-Gd. En effet, la différence moyenne des biomarqueurs mesurés pour les individus exposés à l'AC-Gd correspondait à une variation de  $16 \pm 11$  % des valeurs mesurées pour les individus témoins.

### C. Toxicité du Gd-DOTA sur la glande digestive des bivalves

Dans la glande digestive deux biomarqueurs supplémentaires ont été analysés : la capacité antioxydante totale et l'activité de la glutathion peroxydase. Les valeurs moyennes ( $\pm$  écarts types) des mesures de l'ensemble des biomarqueurs sont présentées en Annexe 6 pour chaque condition d'exposition. Comme pour les branchies, une forte variabilité individuelle pour la réponse des biomarqueurs en présence d'AC-Gd dans le milieu, de l'ordre de 1 à



282% de différence par rapport aux témoins. Dans ce paragraphe, seuls les résultats des biomarqueurs montrant des variations significatives sont présentés.

Après 7 jours d'exposition, seule la concentration d'exposition à 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) est responsable de la variation significative de plusieurs biomarqueurs mesurés dans la glande digestive des deux espèces de bivalves. Ces variations des réponses des biomarqueurs ont été mise en évidence par les analyses de MANOVA réalisées pour la globalité des biomarqueurs de *C. fluminea* (Pillai, df = 11, p-value =  $1,9 \cdot 10^{-07}$ ) et de *D. r. bugensis* (Pillai, df = 11, p-value =  $5,4 \cdot 10^{-06}$ ). Les variations significatives de chaque biomarqueur ont été montrées par la sélection des biomarqueurs de plus forte importance (*Variable Importance in the Projection* (VIP) > 1) (Tableau 27). Aucune variation (Test Kruskal-Wallis ; p-values > 0,05) n'a été observée par rapport aux témoins après 21 jours d'exposition quelle que soit la concentration d'exposition des organismes au Gd-DOTA (Dotarem®) (Annexe 6 et Perrat et al., 2017).

Tableau 27 : Valeurs des VIP calculées pour les biomarqueurs de la glande digestive des bivalves exposés à 0, 1 et 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 7 jours. Les valeurs en gras sont significatives. Cette significativité est liée uniquement aux variations d'activités enzymatiques mesurées pour les organismes exposés à 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) par rapport aux témoins

VIP 7j	<i>Corbicula fluminea</i>	<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>
PB (mg/gMF)	<b>1,13</b>	1,01
PFC (mg/gMF)	0,70	1,05
TG (mg/gMF)	0,80	0,94
ETS (µmol(O <sub>2</sub> )/gMF/h)	<b>1,67</b>	0,533
LOOH (µmol(TBH)/gMF)	<b>1,68</b>	1,23
ACP (µmol/gprot/h)	0,40	1,18
CAT (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	0,83	0,87
GST (µmol(CDNB)/gprot/min)	0,75	<b>1,17</b>
GPx (µmol(NADPH)/gprot/min)	0,36	0,83
ToAC (µmol(Teq)/gprot/min)	0,89	1,13
LDH (µmol(NADH)/gprot/h)	0,82	0,85

Dans la glande digestive de *C. fluminea*, l'augmentation significative des concentrations en hydroperoxydes lipidique, de la concentration en protéines dans le broyat et de la demande énergétique liée au système de transport des électrons attachés à la mitochondrie sont respectivement de 60 %, 48 % et 53 % par rapport aux témoins (Perrat et al., 2017). Ces observations mettent en évidence la toxicité de l'AC-Gd à 7 jours pour *C. fluminea* et suggère des dommages cellulaires dans la glande digestive des individus. Les résultats ont également montré une augmentation de la dépense énergétique, ce qui laisse supposer de l'activation de mécanismes déclenchés dans les cellules afin de parer à la toxicité du Gd-DOTA. En l'absence de réponse des biomarqueurs après 21 jours d'exposition à l'AC-Gd, il est suggéré que la réponse à la toxicité a lieu entre 7 et 21 jours d'exposition permettant la suppression

des effets liés à cette toxicité et un retour des niveaux des biomarqueurs similaires à ceux des individus témoins.

Chez *D. r. bugensis*, plusieurs biomarqueurs présentaient des VIP >1, suggérant des variations d'expression de ces biomarqueurs (Tableau 27). Seule une augmentation de 82 % de l'activité Glutathion-S-Transférase a été relevée dans la glande digestive des *D. r. bugensis* exposées à 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 7 jours (Perrat et al., 2017). Cette augmentation de la Glutathion-S-Transférase montre que la réponse à la toxicité de l'AC-Gd était déjà active au 7<sup>e</sup> jour d'exposition et laisse présumer de l'activité de mécanismes d'efflux permettant l'exclusion du complexe gadoliné hors des cellules, tels que les MXR (*Multi Xenobiotic Resistance*) par exemple.

Les réponses des biomarqueurs à 7 et 21 jours d'exposition à l'AC-Gd sont transitoires lors de l'exposition des organismes à 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®) avec une réponse de *D. r. bugensis* plus rapide que chez *C. fluminea*. Des études complémentaires seraient nécessaires pour valider cette hypothèse de l'activité de mécanismes d'efflux.

#### 4. Points clés/conclusions

Nos résultats ont montré :

- Une accumulation du Gd dans les branchies et dans les glandes digestives des bivalves exposés *in situ* à proximité des rejets de STEP. Bien que l'approche technique employée ne permette pas de différencier les concentrations en Gd sous forme ionique libre de celles sous forme d'AC-Gd ni de celles sous forme de complexes de Gd, la présence de Gd d'origine anthropique a été relevée dans le milieu aquatique à proximité du rejet de STEP (28 % en amont et 53 % en aval de la STEP). En conséquence, il est supposé qu'une partie du Gd mesurée dans les tissus mous des bivalves provient des produits de contraste gadolinés.
- La bioaccumulation du gadolinium anthropique (introduit dans le milieu sous forme de Gd-DOTA - Dotarem®) dans les tissus mous des bivalves exposés en conditions contrôlées de laboratoire, notamment dans leurs branchies et dans leur glande digestive.
- La mise en place de mécanismes de défense est suggérée (par exemple les systèmes d'exclusion des contaminants tels que les *Mdr* ou les *MXR*) dans les glandes digestives et les branchies des deux espèces de bivalves exposées au Gd-DOTA (Dotarem®). Ces

mécanismes permettent une dépuración du Gd-DOTA plus efficace dans les branchies de ces bivalves que dans leur glande digestive.

- Une augmentation des activités de la glutathion-S-transférase, de la catalase, du système de transfert d'électrons mitochondriaux et de la production d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à l'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®).
- Des différences de sensibilité entre les deux espèces de bivalves. Chez *C. fluminea*, la dépuración de ces composés pharmaceutiques semble plus forte que chez *D. r. bugensis*.
- Une réponse transitoire des biomarqueurs mesurée dans la glande digestive des bivalves après 7 jours d'exposition à 10 µg(Gd)/L de Gd-DOTA. Cette réponse n'a pas été mesurée pour les individus exposés pendant 21 jours à cette concentration en Gd-DOTA (Dotarem®).

Une partie des résultats de ce chapitre sur les effets de bioaccumulation et d'écotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) chez les bivalves filtreurs d'eau douce ont été sélectionnés. Ces résultats ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique, accepté dans le journal *Environmental Science and Pollution Research* (Perrat et al., 2017 – “Bioaccumulation of gadolinium in freshwater bivalves”).





## Chapitre 3 : Effets directs et indirects du Gd-DOTA (Dotarem®) sur d'autres organismes aquatiques (microalgues – microcrustacés – poissons)

### 1. Concentrations en Gd-DOTA dans les milieux artificiels

Les concentrations en Gd ont été dosées par analyses ICP-MS dans le milieu d'exposition des organismes pour chaque concentration d'essai. Le Gd a été mesuré dans le milieu de culture des microalgues vertes unicellulaires filtré afin de suivre les concentrations en Gd pendant les 6 jours de croissance des algues dans les milieux d'essai (*Tableau 28*). Concernant les microcrustacés, le Gd n'a été mesuré que lors du lancement du test afin de vérifier la concentration d'exposition des organismes (*Tableau 28*). Les concentrations en Gd ont également été quantifiées dans le milieu d'essai des poissons (*Figure 53*).

*Tableau 28 : Concentrations en Gd (ng/L) mesurées dans les milieux d'exposition des microalgues et des microcrustacés exposés au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire.*

Concentration d'exposition nominale (ng(Gd)/L)	Concentration d'exposition moyenne mesurée pendant 6 jours (ng(Gd)/L)		Concentration d'exposition nominale (ng(Gd)/L)	Concentration d'exposition mesurée au 1 <sup>er</sup> jour (ng(Gd)/L) <i>D. magna</i>
	<i>C. vulgaris</i>	<i>P. subcapitata</i>		
<b>Témoins</b>	18 ± 13	26 ± 16	<b>Témoins</b>	8
<b>200</b>	139 ± 106	246 ± 132	<b>20</b>	26
<b>500</b>	694 ± 214	480 ± 236	<b>200</b>	265
<b>1 000</b>	1 112 ± 160	1 183 ± 115	<b>600</b>	757
<b>1 500</b>	1 470 ± 262	1 421 ± 350	<b>1 000</b>	1 123
<b>5 000</b>	5 630 ± 1 083	5 623 ± 1 329	<b>5 000</b>	6 160
<b>10 000</b>	11 146 ± 2 222	11 309 ± 2 302	<b>10 000</b>	11 485

Des concentrations en Gd de l'ordre de la dizaine de ng/L ont été mesurées pour les milieux contrôles des organismes d'étude (*Tableau 28* et *Figure 53*). Ces valeurs correspondent aux concentrations en Gd présent dans l'eau déminéralisée employée pour la réalisation des milieux artificiel. En effet, les dosages de Gd dans l'eau déminéralisée ont été relevées à la concentration de 7,6 ng(Gd)/L (pour le milieu des daphnies) et de 10,0 ± 9,1 ng(Gd)/L (pour le milieu des poissons). Les concentrations en Gd moyennes mesurées dans le milieu des individus exposés à l'AC-Gd sont représentatives des concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®) et sont employées pour le calcul des facteurs de bioconcentration de l'AC-Gd dans les différents organismes (microalgues, daphnies et poissons).

Concernant les concentrations en Gd présent dans le milieu d'exposition des microalgues, les concentrations d'exposition nominales prévues pour cet essai étaient identiques à celle des daphnies, c'est-à-dire 20, 200, 600, 1 000, 5 000 et 10 000 ng(Gd)/L. Les dosages de tous les milieux d'essai ont été réalisés à la fin de l'exposition et ont souligné une forte variabilité (en moyenne de  $35 \pm 23$  % dans les dosages). Ces mesures étaient également plus élevées que les concentrations nominales prévues de 20, 200, 600 et 1 000 ng(Gd)/L, soit en moyenne une augmentation de  $298 \pm 382$  % dans les dosages. Ces valeurs et la variabilité de ces mesures ont mis en évidence une erreur de dilution lors de la préparation des milieux, et les valeurs nominales ont été réévaluées à 0, 200 et 500, 1 000, 1 500, 5 000 et 10 000 ng(Gd)/L (*Tableau 28*). Malgré cette observation, l'exposition des microalgues n'a pas été réitérée, car aucune accumulation et aucun effet de l'AC-Gd n'ont été mesurés à ces concentrations pour les deux espèces de microalgues vertes testées. Ces résultats seront développés dans les paragraphes traitant ce sujet.

Dans le milieu d'exposition des daphnies, les concentrations mesurées étaient similaires aux concentrations d'exposition nominales prévues (*Tableau 28*). Au cours de cette étude, les daphnies ont été exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) selon 3 modes : *via* le milieu de vie des organismes (appelé : « milieu contaminé ») ; *via* le phytoplancton frais cultivé en présence d'AC-Gd qui a représenté la seule source de nourriture des daphnies (appelé : « nourriture contaminée ») ; et *via* la combinaison de ces deux modes d'exposition (appelé : « nourriture et milieu contaminés »). Lors de l'exposition des daphnies *via* leur nourriture contaminée, l'apport en Gd (provenant du milieu algal) a été mesuré dans le milieu des daphnies. Cet apport représentait des quantités faibles en Gd ajouté dans le milieu d'exposition des daphnies soit en moyenne  $1,02 \pm 1,45$  % de Gd en plus. Ces valeurs en Gd ont été considérées comme négligeables et les concentrations en Gd mesurées dans le milieu de vie des organismes ont été employées pour nos calculs.

Un suivi de la concentration en Gd a été effectué dans le milieu d'essai des poissons pendant 14 jours d'exposition à l'AC-Gd, où les mâles et les femelles ont été exposés à des valeurs proches de la concentration d'exposition nominale de 1 mg(Gd)/L de Gd-DOTA dans des bacs séparés. Les mesures ont été réalisées avant et après chaque renouvellement de milieu. En moyenne, les mâles ont été exposés à de  $1,09 \pm 0,45$  mg(Gd)/L de Gd-DOTA et les femelles ont été exposées à  $1,31 \pm 0,28$  mg(Gd)/L de Gd-DOTA.

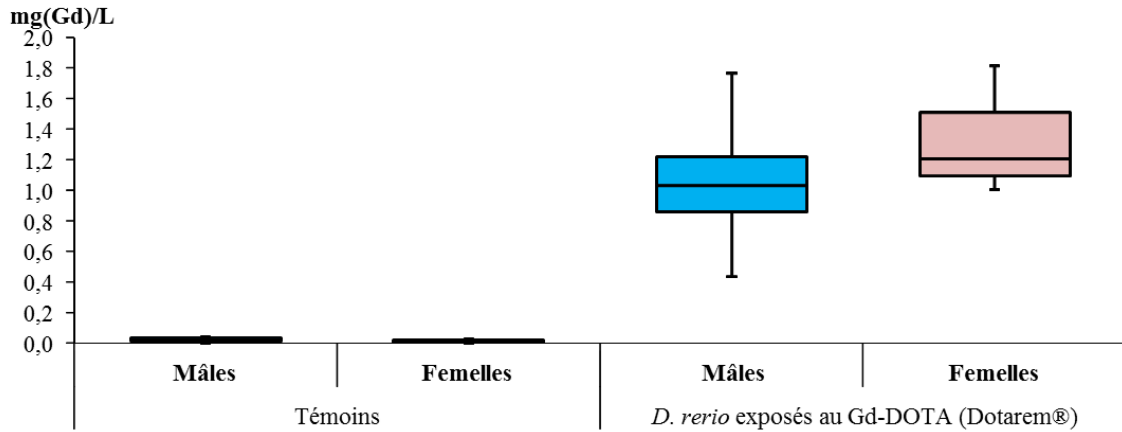


Figure 53 : Concentrations en Gd (mg/L) mesurées dans les milieux d'exposition des poissons exposés ou non au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire

## 2. Accumulation du Gd-DOTA chez les organismes aquatiques (microalgues – microcrustacés – poissons)

Comme pour les bivalves exposés au Gd-DOTA, les concentrations en Gd mesurées dans les microalgues vertes, daphnies et poissons ont été considérées comme équivalentes à celles en AC-Gd au cours de cette étude.

### A. Accumulation du Gd-DOTA chez les microalgues unicellulaires

Les concentrations en Gd dans les microalgues unicellulaires vertes sont exprimées par rapport à leur masse sèche. Les concentrations en Gd mesurées dans les algues en condition témoin ont été dosées pendant les six jours d'exposition à des valeurs médianes de 6,5 [3 ; 8] ng/mg de matière sèche pour *C. vulgaris* et 5,5 [4 ; 7] ng/mg pour *P. subcapitata*. Ces valeurs médianes sont similaires à celles mesurées pour les microalgues vertes exposées au Gd-DOTA. Le Gd a été dosé à des concentrations médianes de 10 [3 ; 33] ng/mg pour *C. vulgaris* et de 9 [4 ; 43] ng/mg pour *P. subcapitata* sans distinction de la durée ou de la concentration d'exposition à l'AC-Gd. Les valeurs des facteurs de bioconcentration ( $BCF_{\text{Algues}}$ ) du Gd sont proches de 0, avec une valeur médiane de 0,0004 [0 ; 0,06] pour les deux espèces algales. Ces observations montrent que le Gd n'est pas bioaccumulé par les algues. Par contre, la présence de Gd mesurée dans les algues suggère une internalisation du Gd-DOTA ou une adsorption de celui-ci à la surface des cellules algales.



### B. Accumulation du Gd-DOTA chez *D. magna*

Chez *D. magna*, les concentrations en Gd ont été mesurées dans l'organisme entier. Concernant les témoins, toutes les mesures effectuées ont montré des valeurs inférieures à la limite de quantification de l'appareil ICP-MS. Au cours de ces essais réalisés selon les trois conditions d'exposition (milieu contaminé, nourriture contaminée et la combinaison de ces deux conditions), le Gd a été dosé une fois par semaine dans les daphnies exposées au Gd-DOTA.

Quel que soit le mode de contamination des daphnies, une forte variabilité des concentrations en Gd mesurées a été observée, sans aucun lien avec les conditions d'exposition au produit de contraste. La valeur médiane dans les tissus est de 3 888 [137 ; 785 867] µg/g de tissus secs.

L'ensemble des mesures en Gd met en évidence l'internalisation de l'AC-Gd dans les tissus des microcrustacés dulçaquicoles. Le Gd-DOTA est bioconcentré par les daphnies exposées à 26 ng(Gd)/L pendant 7 jours *via* le milieu d'exposition (BCF = 9,3 ± 6,2), mais on ne retrouve pas cette bioconcentration après 14 jours d'exposition (BCF = 0,8 ± 1,1). Lorsque les daphnies sont exposées par la voie trophique, une bioaccumulation du Gd-DOTA par les organismes après 7 jours d'exposition a été mesurée à la concentration de 200 ng(Gd)/L (BAF = 2,2 ± 1,9). Comme lors de l'exposition directe, la bioaccumulation est transitoire et n'est pas retrouvée après 14 jours d'exposition (*Figure 54*).

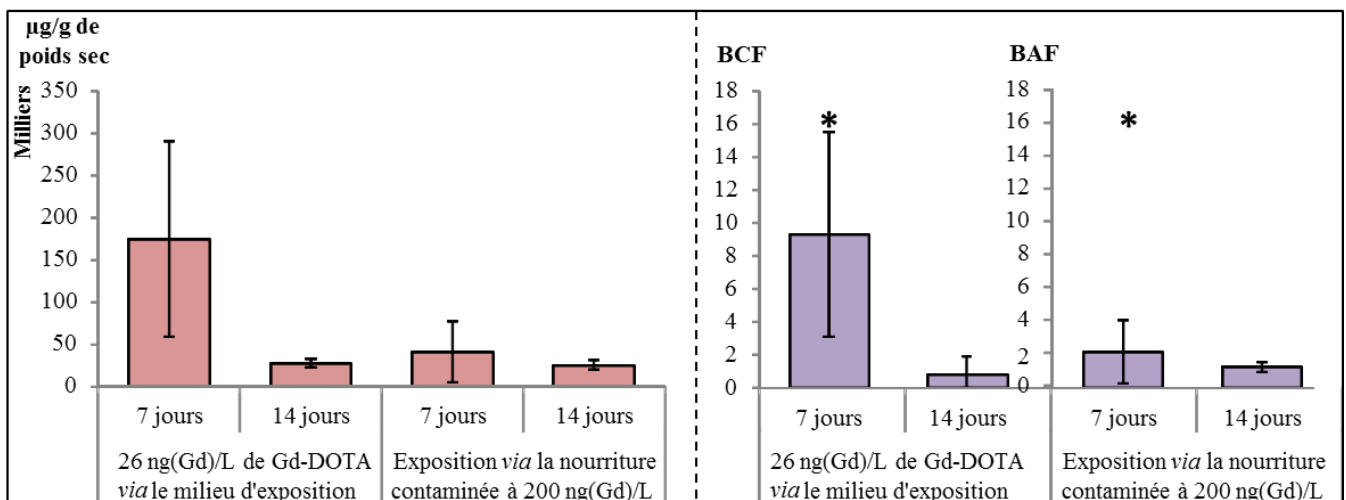


Figure 54 : Concentrations moyennes en Gd (µg/g de poids sec) et BCF respectifs mesurés dans les tissus des daphnies exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) en conditions contrôlées de laboratoire pendant 7 et 14 jours via le milieu d'exposition à 26 ng(Gd)/L ou à la nourriture contaminée à la plus faible concentration de culture en Gd-DOTA (200 ng(Gd)/L). Les étoiles montrent une accumulation significative du Gd dans les tissus ( $\alpha = 0,05$ ) (BCF ou BAF > 1)

L'absence d'accumulation significative au-delà de 7 jours *via* le milieu de vie et *via* la nourriture contaminée, suggère une dépuración complète du Gd-DOTA hors des tissus de *D. magna*. Cette dépuración pourrait s'expliquer la mue régulière des individus lors de leur croissance ou par la mise en place de mécanismes de défense et plus particulièrement des mécanismes d'efflux permettant l'exclusion du complexe Gd-DOTA hors des organismes

### C. Accumulation du Gd-DOTA chez *Danio rerio*

Les concentrations en Gd mesurées dans les tissus des poissons n'ont montré aucune différence significative entre individus, quel que soit leur sexe.

Les dosages ont mis en évidence la présence du Gd-DOTA dans les tissus des poissons après 14 jours d'exposition à 1 mg(Gd)/L d'AC-Gd (*Tableau 29*). Ces concentrations en Gd étaient globalement plus élevées chez les mâles ( $494 \pm 228 \mu\text{g(Gd)/g}$  de tissus secs) que chez les femelles ( $138 \pm 238 \mu\text{g(Gd)/g}$ ) et une forte variabilité interindividuelle a été observée. Le dosage du Gd dans les poissons a été réalisé avec et sans rinçage des poissons pour déterminer une éventuelle adsorption du Gd-DOTA à la surface des organismes. Les concentrations ne sont pas différentes qu'il y ait rinçage des poissons ou non (*Tableau 29*), ce qui suggère que l'AC-Gd est internalisé dans les organismes. Les valeurs de BCF <1 mettent en évidence l'absence de bioaccumulation du Gd-DOTA dans les poissons et confirment son internalisation.

Après 48 heures de dépuración des poissons exposés pendant 14 jours au Gd-DOTA, une forte diminution de la concentration en Gd a été observée dans les poissons mâles et femelles (*Tableau 29*). L'activation de mécanismes de dépuración du Gd-DOTA peut être pour les *D. rerio* exposés à l'AC-Gd pendant les 14 jours d'exposition et pendant les 48h de dépuración.

*Tableau 29 : Valeurs moyennes ( $\pm$  écart type) des concentrations en Gd et des facteurs de bioconcentration mesurés après 14 jours d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). Ces mesures ont été effectuées au 14<sup>e</sup> jour pour les organismes non exposés au produit de contraste (Contrôle), et pour les individus exposés au produit de contraste. La mesure dans les individus exposés a été réalisée soit directement après 14 jours d'exposition (E) ; soit suite à un rinçage des individus à l'eau claire (L) ; soit suite à la dépuración des individus pendant 48h en milieu non contaminé (D48). Les valeurs en gras montrent des concentrations en Gd dans les poissons exposés à l'AC-Gd significativement différentes des témoins ( $\alpha = 0,05$ ).*

	Mâles		Femelles	
	[Gd-DOTA] en $\mu\text{g(Gd)/g}$ de tissus secs	BCF	Gd-DOTA en $\mu\text{g(Gd)/g}$ de tissus secs	BCF
<b>Contrôle</b>	0 $\pm$ 0	-	0 $\pm$ 0	-
<b>E</b>	<b>494 <math>\pm</math> 228</b>	0,62 $\pm$ 0,24	138 $\pm$ 238	0,10 $\pm$ 0,17
<b>L</b>	<b>363 <math>\pm</math> 238</b>	0,50 $\pm$ 0,35	191 $\pm$ 274	0,18 $\pm$ 0,28
<b>D48</b>	24 $\pm$ 25	0,03 $\pm$ 0,04	27 $\pm$ 46	0,02 $\pm$ 0,03

### 3. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les microalgues vertes unicellulaires

Afin de déterminer la toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu aquatique, les microalgues ont fait l'objet de tests d'écotoxicité standardisés (NF EN ISO 8692, 2012 ; OCDE, 2006). Ces bioessais ont l'avantage d'être facile à mettre en place et rapides (réponse en 72h). Les conditions contrôlées permettent une forte répétabilité de l'essai en diminuant sa variabilité et facilitent l'extrapolation des liens de causes à effets entre les situations testées et les réponses des organismes (Vignati et al., 2007). La cytotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) a été évaluée par le calcul de la concentration efficace induisant 50% de l'inhibition maximale de la croissance algale après 72h d'exposition ( $CE_{50}$ ). La  $CE_{50}$  du Gd-DOTA (Dotarem®) est de 4 164 [4 070 - 4 280] mg(Gd)/L chez *P. subcapitata* (Figure 55). Afin de comparer la cytotoxicité de l'AC-Gd à celle de l'ion métallique Gd sous forme de  $GdCl_3$ , l'inhibition de la croissance algale a été mesurée pour ce sel de Gd chez *P. subcapitata*. La  $CE_{50}$  du  $GdCl_3$  est de 16,10 [15,50 ; 16,71] mg(Gd)/L (Figure 55), soit 260 fois plus faible que celle du Gd-DOTA (Dotarem®). La comparaison de ces valeurs de  $CE_{50}$  obtenues avec les concentrations environnementales en Gd d'origine anthropique retrouvées dans les milieux aquatiques de l'ordre de 200 ng(Gd)/L à une dizaine de  $\mu$ g(Gd)/L, montre une absence de cytotoxicité de l'ion Gd sous ses différentes formes, y compris sous la formulation Gd-DOTA (Dotarem®). En l'absence d'autres effets à ces concentrations, la NOEC du Gd-DOTA (Dotarem®) a été calculée à une valeur de 3 509 mg(Gd)/L pour l'espèce *P. subcapitata*.

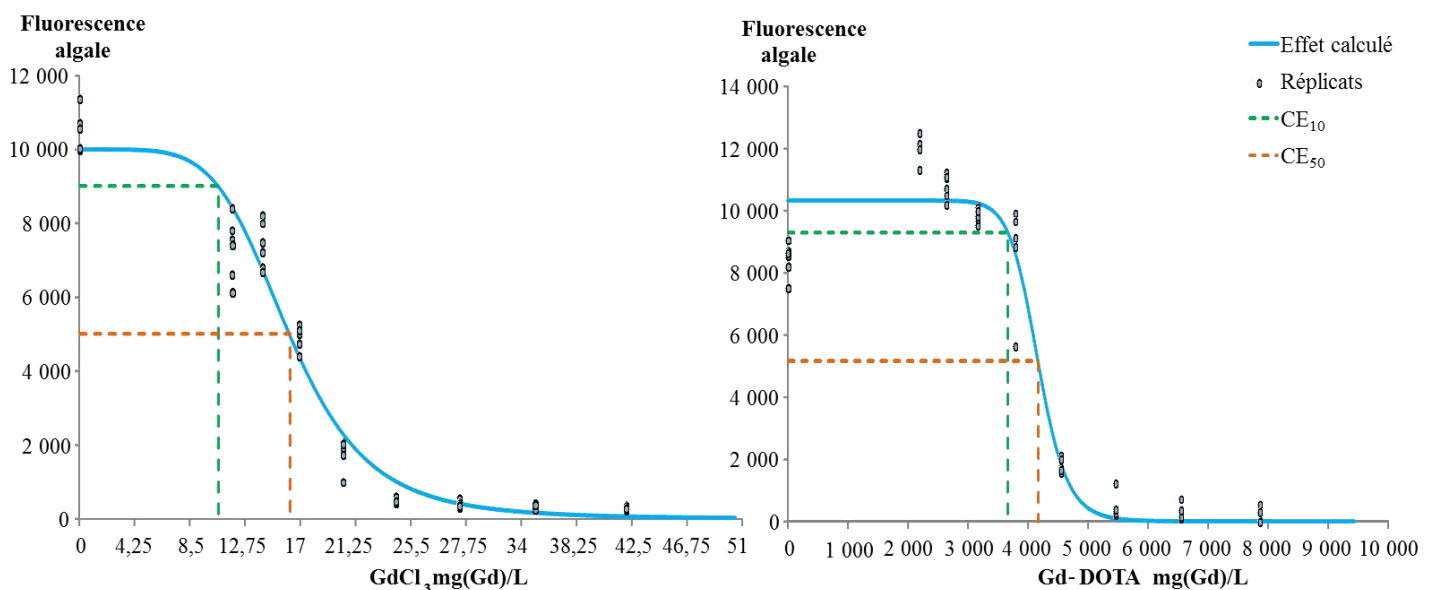


Figure 55 : Courbes de la relation dose-réponse de la fluorescence algale de *P. subcapitata* en fonction de la concentration d'exposition au  $GdCl_3$  et au Gd-DOTA (Dotarem®) en mg(Gd)/L calculées à l'aide de la macro Excel REGTOX.

La croissance de deux espèces de microalgues vertes, *P. subcapitata* et *C. vulgaris*, a été suivie pendant 6 jours lors de l'exposition à des concentrations en Gd-DOTA comprises entre  $18 \pm 13$  et  $11\,309 \pm 2\,302$  ng(Gd)/L. Les concentrations cellulaires de chaque espèce ont été mesurées quotidiennement par ballon de culture. Les courbes de croissance des algues exposées à l'AC-Gd ont été comparées à celles de leurs témoins respectifs à l'aide du test adapté du *log-rank*. Quelques exemples de courbes de croissance pour chaque espèce algale sont présentés sur la *Figure 56*. Aucune modification de la croissance algale n'a été mise en évidence pendant les 6 jours de suivi, quelle que soit la concentration d'exposition. Ces observations confirment l'absence de cytotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) pour ces deux espèces de microalgues vertes ( $p$ -values > 0,5).

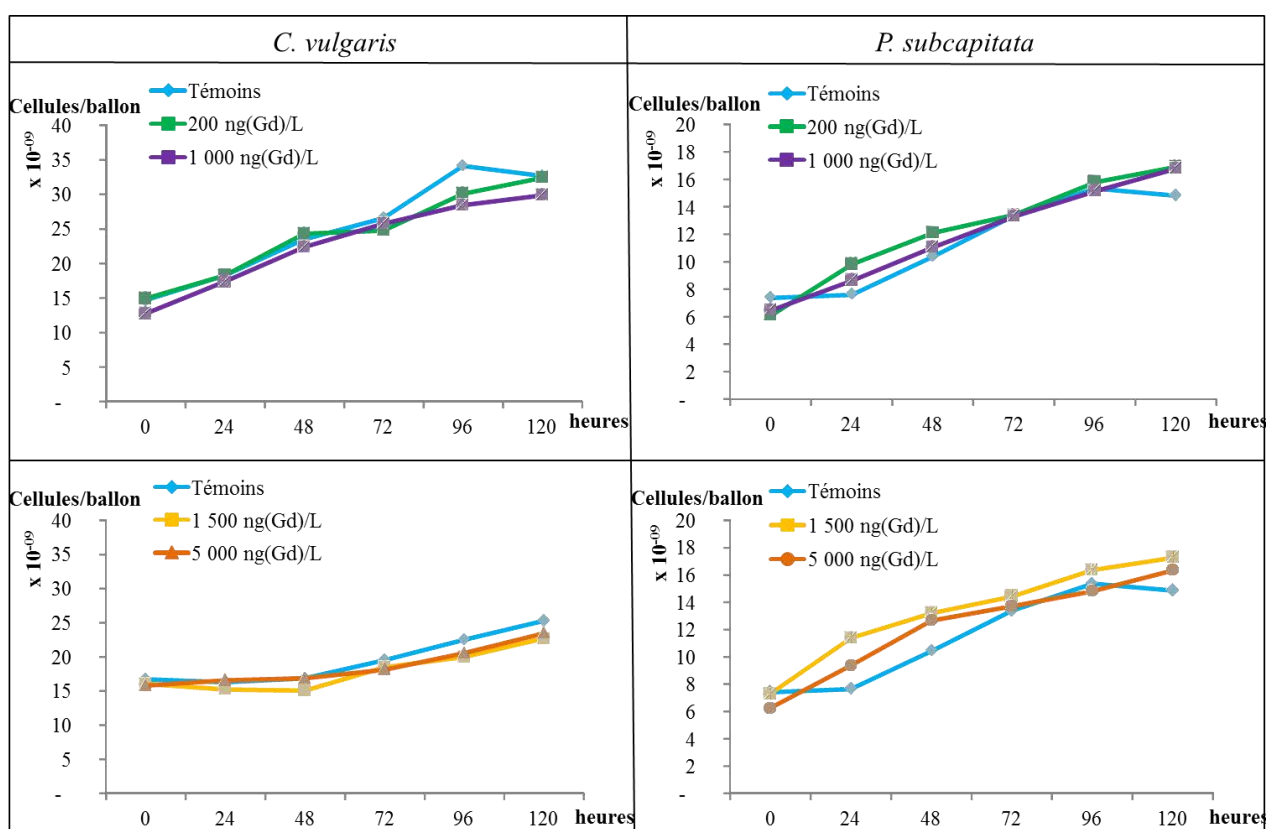


Figure 56 : Exemples de courbes de croissance des microalgues unicellulaires vertes exposées à différentes concentrations en Gd (Gd-DOTA - Dotarem®) d'ordre environnemental

En parallèle de la croissance, l'auto-fluorescence des cellules algales a été mesurée quotidiennement pour chaque espèce algale (BD Accuri CSampler ; FL3-A ;  $\lambda \geq 670$  nm). L'auto-fluorescence de ces algues correspond à celle des pigments intracellulaires telles que les chlorophylles *a* et *b*. La gamme d'auto-fluorescence des cellules algales témoins a été mesurée entre  $1,0 \cdot 10^5$  et  $1,7 \cdot 10^6$  (unité arbitraire), ce qui a permis de définir cette gamme comme des valeurs normales permettant de visualiser la synthèse de ces pigments. Concernant les algues exposées au Gd-DOTA (Dotarem®), la gamme d'auto-fluorescence

n'est pas différente de celle des témoins, quelles que soient la concentration d'exposition et l'espèce d'algues considérée. Ces mesures suggèrent que la présence de l'AC-Gd n'affecte pas la synthèse des pigments chlorophylliens et n'engendre pas la production d'organites, tels que les amyloplastes par exemple, pouvant masquer la fluorescence de ces pigments (van Donk et Hessen, 1993).

Enfin, la morphologie des cellules algales a été mesurée au cours de l'exposition aux différentes concentrations en AC-Gd pendant 6 jours. La morphologie de chaque cellule a été estimée quotidiennement par des mesures de taille et de granularité relatives des cellules les unes par rapport aux autres par cytométrie en flux (BD Accuri CSampler) pour chaque concentration d'exposition. La taille et la granularité moyennes relatives des cellules algales étaient similaires tout au long de l'exposition des organismes aux différences concentrations d'exposition (Figure 57). La variabilité de ces mesures au cours du temps était respectivement de 20 [16 ; 22] % pour la taille relative et de 53 [45 ; 63] % pour la granularité relative de *C. vulgaris* et de 8 [8 ; 9] % pour la taille relative et de 13 [10 ; 14] % pour la granularité relative de *P. subcapitata*. Pour les deux espèces algales, les mesures morphologiques des cellules sont restées du même ordre de grandeur que chez les témoins pour l'ensemble des concentrations d'exposition, suggérant que la morphologie des cellules algales n'est pas affectée par la présence de l'AC-Gd.

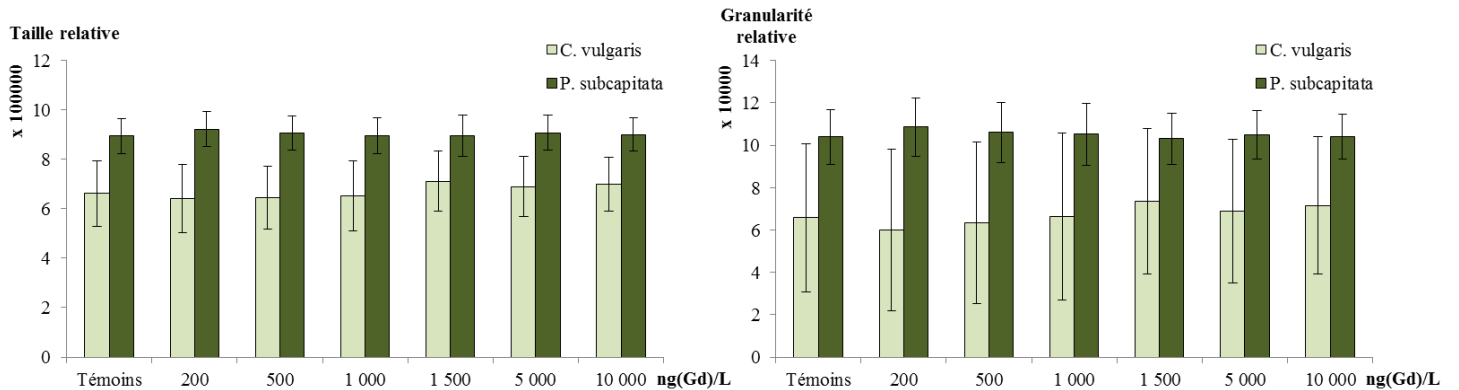


Figure 57 : Représentations graphique de la taille relative moyenne et de la granularité relative moyenne des cellules algales au cours des 6 jours d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®)

L'ensemble de ces résultats a montré que la présence de l'AC-Gd à des concentrations environnementales dans le milieu de culture des deux espèces de microalgues vertes, ne semble pas les affecter.

#### 4. Toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) pour les microcristacés d'eau douce

La toxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) a été évaluée pendant les 49 jours d'exposition de *D. magna* par le suivi de trois paramètres : la croissance (*Tableau 30*), la mortalité (*Figure 59a*) et la reproduction des individus (*Figure 59b*).

Au cours de ces essais, la mortalité cumulée des témoins est restée inférieure à 5 % tout au long des essais chroniques (*Figure 59a*).

Une augmentation de la mortalité des daphnies a été mise en évidence chez les daphnies exposées aux deux plus fortes concentrations en Gd-DOTA, à savoir 5 000 et 10 000 ng(Gd)/L (*Figure 59a*). Cette augmentation de la mortalité est observée à partir de 37 jours lorsque les daphnies sont exposées au Gd-DOTA par voie directe (*via* le milieu d'exposition) et dès 28 jours lors de l'exposition *via* le milieu et la nourriture contaminés. Une augmentation significative de la mortalité des daphnies a également été notée après 42 jours d'exposition directe à 1 000 ng(Gd)/L. Pour les autres concentrations et conditions d'exposition, le pourcentage de mortalité cumulée des daphnies est resté inférieur à 10% tout au long de l'exposition.

Concernant la taille des daphnies, aucune différence significative n'a été observée pour les organismes exposés *via* leur milieu de vie (*Tableau 30*). Chez les daphnies exposées par la voie trophique, une diminution significative de la taille des individus a été mise en évidence dès 35 jours d'exposition à 200, 500 et 1 000 ng(Gd)/L. Une diminution de leur taille a également été observée chez les daphnies exposées à la fois *via* leur milieu et leur nourriture contaminés, dès 21 jours d'exposition, pour la majorité des concentrations d'exposition. Cependant, pour cette condition d'exposition les réponses des daphnies sont irrégulières et transitoires et aucune tendance ne peut être dégagée. En effet, la taille des daphnies n'était pas significativement différente après 42 jours d'exposition entre les individus exposés par voie trophique à l'AC-Gd et les témoins, alors qu'à 49 jours d'exposition, la taille des organismes était significativement plus faible. Il semble donc que la croissance des organismes soit perturbée par la présence de nourriture contaminée par le Gd-DOTA, mais sans lien avec la concentration en AC-Gd.

Tableau 30 : Tableau des p-values des comparaisons de la taille moyenne des daphnies exposées à l'AC-Gd par rapport à la taille moyenne des individus témoins en fonction de chaque condition d'exposition au Gd-DOTA (Dotarem®). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide d'un test de Dunnett post-hoc lorsque l'ANOVA à 1 facteur pour chaque temps d'exposition était significative (NS = ANOVA non significative ;  $\alpha = 0,05$ ). Les valeurs en gras sont significatives ( $\alpha = 0,01$ ) et pour ces valeurs le pourcentage de différence de taille par rapport aux individus témoins est écrit entre parenthèses.

Concentration d'exposition au Gd-DOTA (ng(Gd)/L)	Jour 7	Jour 14	Jour 21	Jour 28	Jour 35	Jour 42	Jour 49
<b>Exposition à l'AC-Gd via le milieu</b>							
26			0,9476	0,5792	0,9942	0,9979	
265			0,1796	0,0120	0,9778	0,1647	
757	NS	NS	0,9720	0,5462	0,0697	0,7381	NS
1 123			0,0720	0,5454	0,0326	0,0653	
6 160			0,0749	0,0255	0,0777	0,0714	
11 485			0,1041	0,0172	0,0549	0,0101	
<b>Exposition à l'AC-Gd via le milieu et via la nourriture exposée</b>							
26		0,1999	0,0933	<b>0,0001 (-6,3)</b>	0,1675	0,2534	<b>0,0020 (-7,0)</b>
265		1,0000	0,1070	<b>0,0097 (-6,4)</b>	<b>0,0038 (-9,5)</b>	0,7238	<b>0,0000 (-8,6)</b>
757	NS	0,2044	0,7435	<b>0,0003 (-6,5)</b>	0,0684	0,2375	<b>0,0016 (-4,4)</b>
1 123		0,0300	0,9996	0,0191	0,9986	0,735	<b>0,0022 (-5,8)</b>
6 160		0,2092	0,6434	<b>0,0001 (-6,8)</b>	<b>0,0004 (-9,4)</b>	0,0137	<b>0,0005 (-8,5)</b>
11 485		0,4687	<b>0,0026 (-8,3)</b>	<b>0,0005 (-6,7)</b>	<b>0,0000 (-9,1)</b>	0,0396	<b>0,0019 (-6,6)</b>
<b>Exposition à l'AC-Gd via la nourriture exposée (Concentration d'exposition nominale des algues au Gd-DOTA (ng(Gd)/L)</b>							
200		0,3787	1,0000	0,9970	0,1634	<b>0,0015 (-5,3)</b>	<b>0,0043 (-8,1)</b>
500		1,0000	1,0000	0,9999	<b>0,0000 (-7,2)</b>	<b>0,0006 (-6,7)</b>	<b>0,0001 (-8,2)</b>
1 000	NS	0,9923	0,4557	0,6919	<b>0,0002 (-6,8)</b>	<b>0,0019 (-7,0)</b>	0,0326
1 500		0,2473	0,0185	1,0000	0,8004	0,0260	0,9783
5 000		0,0139	0,0239	0,2399	0,9991	0,9330	0,0568
10 000		0,6747	0,9235	0,8730	0,2755	0,8090	0,0169

Concernant la reproduction des daphnies, aucune éphippie n'a été produite, les daphnies se sont toutes reproduites par parthénogénèse quels que soient le mode, la durée et la concentration d'exposition en Gd-DOTA. Aucune différence significative du nombre de petits produits par daphnies n'a été observée entre les témoins et les individus exposés au Gd-DOTA (Dotarem®) que ce soit pour l'exposition directe *via* leur milieu de vie (173 à 221 petits pendant 42 jours) ou lors de l'exposition par voie trophique (124 à 153 petits pendant 42 jours) (Figure 59b). En revanche, chez les daphnies exposées au Gd-DOTA à la fois par voie directe et par voie trophique, le nombre de petits produits par daphnie est diminué de 28 % par rapport aux témoins dès 25 jours d'exposition, quelle que soit la concentration en Gd-DOTA (Figure 59b).

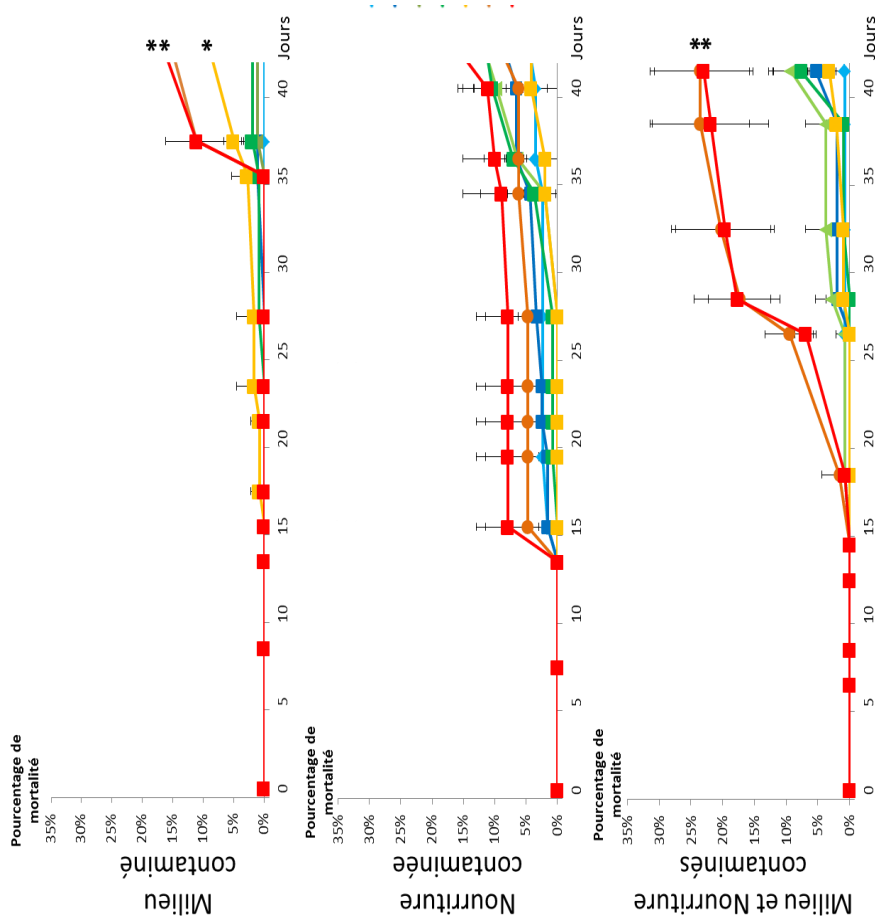


Figure 59 a : Pourcentage de mortalité de *D. magna* mesurée pendant 42 jours en fonction de leur mode d'exposition aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®). Les courbes avec une étoile sont significativement différentes des témoins ( $\alpha = 0,05$ ).

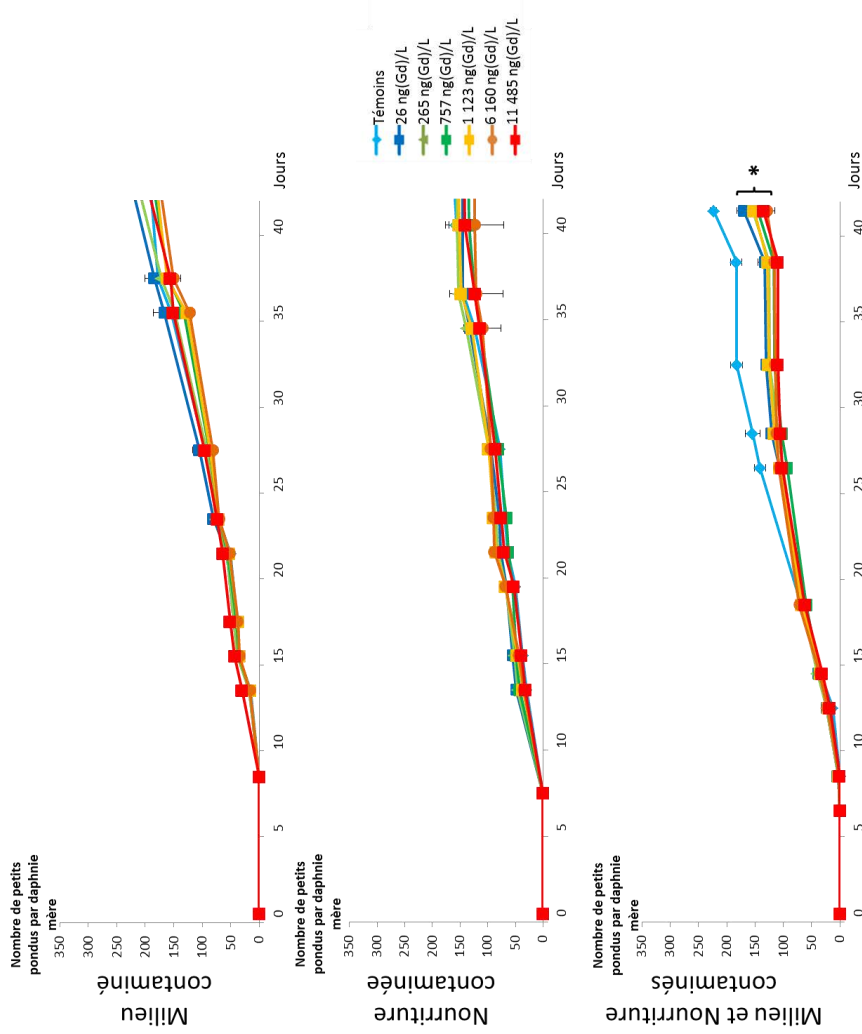


Figure 59 b: Nombre de juvéniles pondus par femelle adulte *D. magna* pendant 42 jours en fonction de leur mode d'exposition aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®). Les courbes avec une étoile sont significativement différentes des courbes témoins ( $\alpha = 0,05$ ).



Les résultats montrent que la contamination du milieu de vie à l'AC-Gd affecte uniquement la survie de *D. magna* lorsque ces organismes sont exposés à des concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®) élevées (5 000 et 10 000 ng(Gd)/L). La croissance et la reproduction des daphnies sont perturbées par la présence de Gd-DOTA dans le milieu et *via* la nourriture contaminée. Même si le Gd-DOTA semble peu écotoxique pour les microalgues, ces dernières pourraient être moins appétentes pour les daphnies, ce qui expliquerait les effets observés sur la croissance et la reproduction des microcrustacés.

En ne considérant que les effets directs de l'AC-Gd dans le milieu de vie des daphnies, la NOEC du Gd-DOTA (Dotarem®) est estimée à 757 ng(Gd)/L.

## 5. Points clés/conclusions

Parmi l'ensemble des résultats décrits dans **ce chapitre**, plusieurs conclusions seront retenues:

- Le Gd-DOTA (Dotarem®) est internalisé dans les organismes aquatiques (microalgues vertes, daphnies et poissons), et ne s'accumule ni dans les microalgues vertes, ni dans les tissus des poissons. Par contre chez les daphnies, une bioaccumulation transitoire a été mise en évidence et n'a été observée qu'après 7 jours d'exposition.
- La dépuración du complexe de Gd a été observée chez les poissons en 48 heures dès leur retour à un milieu non contaminé.
- La CE<sub>50</sub> du Gd-DOTA (Dotarem®) est de 4 164 mg(Gd)/L chez *P. subcapitata*.
- Aucun effet sur la croissance cellulaire algale, la morphologie des cellules ou sur la fluorescence algale n'a été mis en évidence aux concentrations environnementales (de l'ordre du ng(Gd)/L au µg(Gd)/L). Ce qui laisse à penser que le Gd-DOTA n'affecte pas les microalgues vertes unicellulaires.
- Des effets directs à long terme ont été observés chez *D. magna*. La présence du Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu semble conduire à une mortalité plus élevée des organismes exposés aux concentrations supérieures à 1 µg(Gd)/L, mais ne dépassait pas 30% de la population au bout de 49 jours d'exposition. Ces observations semblent confirmer la faible toxicité des AC-Gd rejetés dans le milieu aquatique. La NOEC du Gd-DOTA a été estimée à 757 ng(Gd)/L.

- Des effets indirects ont été observée chez *D. magna* suite à l'exposition des individus à la nourriture contaminée. Des variations de taille des individus et une diminution du nombre de petits pondus par daphnie ont suggéré que les microalgues vertes cultivées en présence de produit de contraste les rends moins appétentes pour les organismes brouteurs qui les consomment moins.

Les résultats de cette étude ont souligné que le Gd-DOTA (Dotarem®) n'est pas inerte pour les organismes aquatiques pluricellulaires bien que ceux qui l'internalisent dans leur tissus semblent capable de mettre en place des mécanismes de défense afin d'éliminer ces complexes.



## Chapitre 4 : Impact du Gd-DOTA (Dotarem®) sur la croissance d'une lignée cellulaire de poissons zèbres (ZF4 - ATCC 2050)

### 1. Détermination de la cytotoxicité du Dotarem® pour les cellules ZF4

La structure moléculaire du Gd-DOTA a été développée pour prévenir la cytotoxicité de l'ion Gd lors des examens IRM (Idée et al., 2015). D'autres études, ont montré que la cytotoxicité des AC-Gd linéaires est supérieure à 84 mg(Gd)/L pour divers systèmes cellulaires mammifères, tels que HTC ou C6 chez le rat (Cabella et al., 2006) ; LLC-PK1 chez le porc (Heinrich et al., 2007 ; Tableau 7). Au vu des données de la littérature, il est donc supposé que la valeur de la  $CI_{50}$  du complexe Gd-DOTA macrocyclique est également supérieure à 84 mg(Gd)/L pour les systèmes cellulaires de mammifères terrestres tels que le rat ou le porc ou pour les systèmes cellulaires de vertébrés aquatiques. Afin de vérifier cette hypothèse, des essais de cytotoxicité au MTT ont été réalisés sur les fibroblastes de *D. rerio* (cellules ZF4, ATCC® CRL-2050). Les cellules ZF4 ont donc été exposées pendant 24 h, 48 h et 72 h à une large gamme de concentrations en Gd-DOTA sous formulation pharmaceutique (Dotarem®) préparée entre 20 ng(Gd)/L et 200 mg(Gd)/L. Nos mesures ont mis en évidence que le pourcentage de fluorescence des cristaux de formazan produits par les cellules ZF4 exposées aux différentes concentrations en Gd-DOTA (Dotarem®), sont supérieurs à 50% pour l'ensemble des conditions d'exposition testées. Ces mesures ont mis en évidence l'absence de modification de la viabilité cellulaire des cellules ZF4 en présence de cet AC-Gd dans le milieu de culture. La  $CI_{50}$  du complexe Gd-DOTA (Dotarem®) peut alors être considéré comme supérieure à 200 mg(Gd)/L pour les cellules ZF4.

Dans ces conditions, la cytotoxicité du Gd-DOTA sur les cellules ZF4 à des concentrations en Gd de l'ordre de celles mesurées dans les cours d'eau de la région Lorraine peut être exclue. Cependant, une absence de cytotoxicité ne signifie pas l'absence d'effets sur ces cellules lors d'expositions à court ou long terme. De fait, l'ensemble des autres essais *in vitro* ont été réalisés à des concentrations de 20 ng(Gd)/L et de 10 µg(Gd)/L par exposition au

Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu de culture soit respectivement à 0,125 nM et 63,59 nM d'AC-Gd.

## 2. Effets à court terme de la formulation pharmaceutique du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les cellules ZF4

Afin d'évaluer l'effet de l'AC-Gd sur la croissance des cellules ZF4, le milieu de culture a été supplémenté en Gd-DOTA (Dotarem®). Au cours de cet essai, les cellules ont été cultivées pendant 6 jours sans renouvellement du milieu et ont été comptées quotidiennement à l'aide d'un hémato-cytomètre (cellule de Thoma). Nos mesures ont mis en évidence un ralentissement de la croissance des cellules ZF4 en présence de Gd-DOTA dans le milieu de culture. Ce ralentissement apparaît clairement à partir du 4<sup>e</sup> jour d'exposition à 0,125 nM et 63,59 nM de Gd-DOTA (Test KW, p-value = 0,001) et reste similaire à ces concentrations (Test KW, p-value = 0,508) jusqu'à 6 jours d'exposition (Figure 60). Les concentrations cellulaires mesurées au 6<sup>e</sup> jour d'exposition à l'AC-Gd correspondaient à  $61 \pm 2$  % des concentrations cellulaires mesurées pour les témoins. D'autre part, les concentrations cellulaires mesurées, ont suggéré que le ralentissement de la croissance cellulaire est sans lien avec la concentration d'exposition à l'AC-Gd.

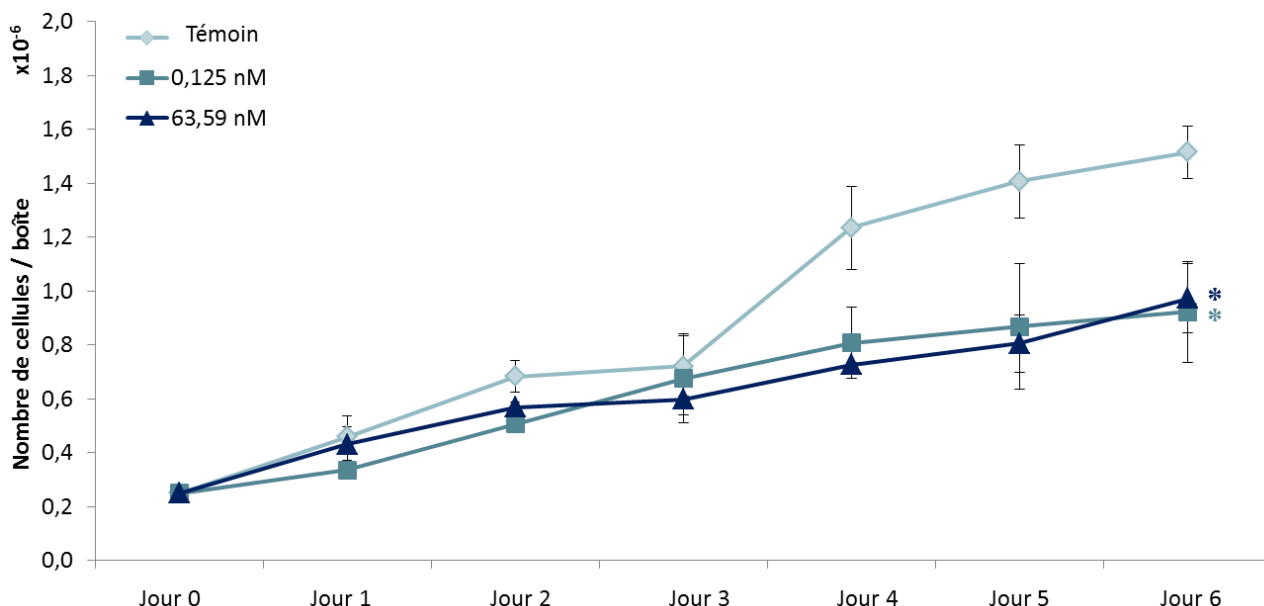


Figure 60 : Croissance des cellules ZF4 cultivées en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) sans renouvellement de milieu pendant 6 jours. Les courbes avec une étoile sont significativement différentes de la courbe des témoins

Pour les expériences suivantes, les mesures ont été effectuées uniquement aux jours 1, 3 et 6 afin d'évaluer les effets liés au renouvellement du milieu de culture au cours de l'exposition des cellules ZF4 et ceux liés à la formulation du complexe pharmaceutique.

Les effets du renouvellement du milieu de culture ont été évalués par comparaison de la croissance normale des cellules ZF4 cultivées sans contaminant à celle des cellules ZF4 cultivées en présence des deux concentrations en AC-Gd avec ou sans renouvellement du milieu (avec du milieu contaminé ou non) après 3 jours de culture (*Figure 61*). Au sixième jour d'exposition, les concentrations en cellules ZF4 mesurées correspondaient à  $62 \pm 4 \%$  de la concentration cellulaire des témoins. Ce ralentissement de la croissance a été mesuré pour les cellules ZF4 exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) et aucune différence n'a été observée entre les conditions de renouvellement ou de non renouvellement de milieu (soit en moyenne  $1,24 \cdot 10^6 \pm 3,02 \cdot 10^5$  cellules/boîte). Ces résultats suggèrent que l'AC-Gd impacte la croissance cellulaire dès sa présence dans le milieu de manière non réversible à court terme.

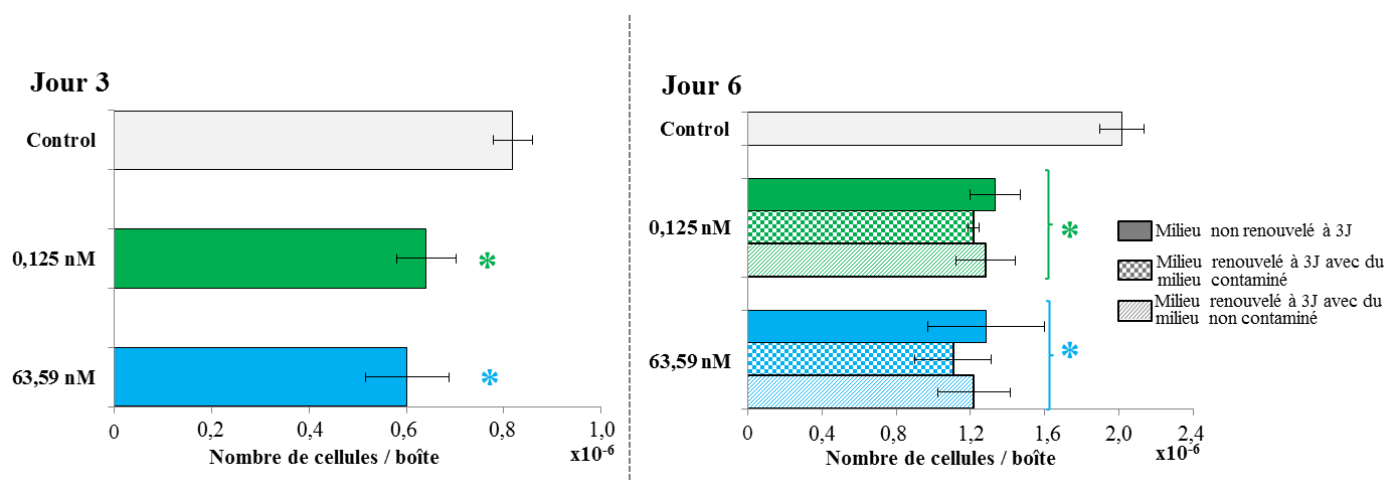


Figure 61: Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 3 et 6 jours en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) sans renouvellement de milieu ou avec renouvellement de milieu après 3 jours d'exposition avec du milieu enrichi en Gd-DOTA (Dotarem®). \* : ralentissement de croissance significatif par rapport aux contrôles.

La formulation pharmaceutique du Dotarem® est composée de l'acide gadotérique (Gd-DOTA) et de méglumine, un adjuvant fréquemment employé dans les composés pharmaceutiques. De fait, la formulation de cet AC-Gd soulève la question de l'origine des effets observés sur la croissance des cellules ZF4. A savoir, si le ralentissement de la croissance cellulaire est lié à l'ion Gd<sup>3+</sup> provenant de la molécule de Gd-DOTA, au complexe d'acide gadotérique seul (Gd-DOTA), à l'adjuvant seul (méglumine) ou à la formulation complète de l'AC-Gd (Gd-DOTA + méglumine).

Afin de déterminer la partie spécifique de la solution pharmaceutique de Dotarem® responsable de ces effets sur la croissance des cellules ZF4, un essai de croissance a été

réalisé avec des milieux de culture supplémentés avec chacun des composants de la solution de Dotarem® de manière isolée les uns des autres. Les cellules ont donc été exposées à l'excipient seul (mégлумine), à l'acide gadotérique seul (Na-Gd-DOTA, 6H<sub>2</sub>O), à un complexe permettant de déterminer les effets de l'élément métallique (Zn-DOTA, H<sub>2</sub>) ou au complexe macrocyclique sans l'élément métallique (DOTA, H<sub>4</sub>). Ces composants ont été ajoutés au milieu de culture afin d'obtenir des molarités identiques à celles du Dotarem®, c'est-à-dire à 0,125 nM et 63,59 nM. Les valeurs des concentrations en cellules par boîte de culture ont souligné que la mégлумine est la seule molécule du Dotarem® qui n'affecte pas significativement la croissance des cellules ZF4 pendant le test de croissance (Figure 62). Les quatre autres composants (Dotarem®, Gd-DOTA, Zn-DOTA et DOTA) sont responsables d'un ralentissement similaire de la croissance cellulaire (Figure 62). Les résultats semblent indiquer que le ralentissement de la croissance des cellules ZF4 observé en présence de Dotarem® est uniquement dû à la structure macrocyclique du principe actif (le DOTA) et excluent l'effet de l'ion gadolinium.

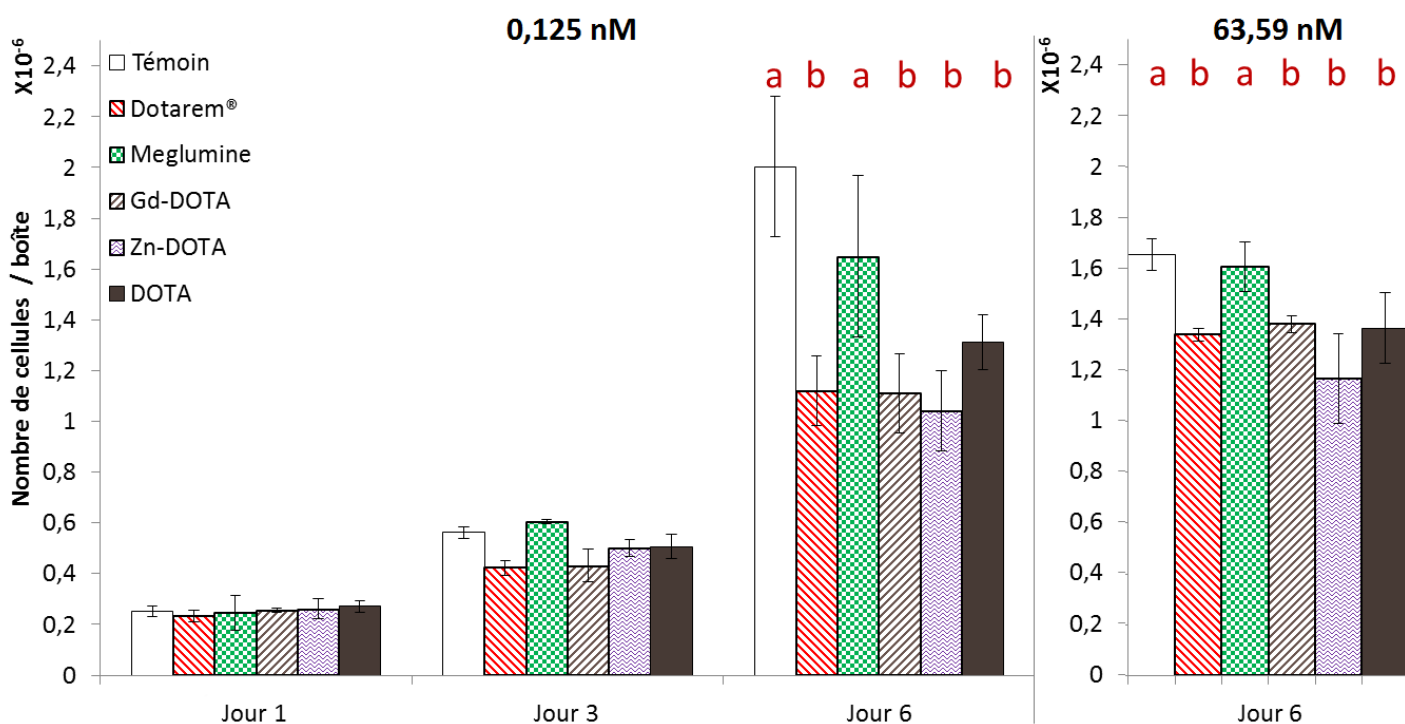


Figure 62 : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 6 jours en présence des différentes molécules à des concentrations équivalentes à celles du Dotarem® (à 0,125 nM et 63,59 nM). Lors de cet essai le milieu de culture n'a pas été renouvelé. A 6 jours, les lettres correspondent aux différences de croissance significatives entre les cellules exposées aux différentes molécules ( $p$ -value < 0,05, ANOVA et test de Tukey post-Hoc).

Au vue de ces résultats, trois hypothèses peuvent être émises :

- (i) Le complexe macrocyclique X-DOTA peut être internalisé par les cellules et agir directement sur les éléments induisant la prolifération cellulaire tels que les

facteurs de croissance, les processus de transcription/traduction des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ou directement sur ces protéines. Ceci modifierait les concentrations en ADN mesurées pour les différentes phases du cycle cellulaire (Sehgal, 1998).

- (ii) Le complexe macrocyclique X-DOTA peut se lier aux protéines de la membrane plasmique, ce qui bloquerait un groupe de canaux échangeurs d'ions probablement de manière partielle limitant ainsi l'accès aux éléments essentiels nécessaires au développement normal des cellules (van der Valk et al., 2010).
- (iii) Le complexe macrocyclique X-DOTA peut se lier à un élément cationique du milieu apporté sous différentes formes telles que les ions métallique  $Fe^{3+}$  ( $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  et  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ) ou  $Na^{2+}$  ( $NaHCO_3$ ;  $NaCl$ ;  $Na_2HPO_4$  et  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) (milieu DMEM:F-12 ; ATCC® 30-2006). Dans ce cas, le complexe limiterait l'accessibilité aux éléments essentiels pour les cellules donc le ralentissement de la croissance serait dû aux conditions limitantes du milieu.

Les résultats mettant en évidence l'absence d'effet dose-réponse du composé pharmaceutique sur la croissance cellulaire à court terme suggère que la concentration du complexe est saturante à ces concentrations (0,125 nM et 63,59 nM). Les expériences menées afin de déterminer les effets de l'AC-Gd sur le cycle cellulaire et les effets à long terme ont donc été réalisées par exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) à la concentration la plus élevée (63,59 nM).

### 3. Cycle cellulaire et effets sur la croissance des cellules

Afin de vérifier la validité de la première hypothèse concernant la modification des concentrations en ADN pour les différentes phases du cycle cellulaire en présence d'AC-Gd, celui-ci a été étudié par cytométrie en flux après culture des cellules ZF4 avec ou sans Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu de culture pendant 5 et 7 jours. Le cycle cellulaire est réparti en 4 grandes phases permettant aux cellules de proliférer en passant d'une cellule mère à sa division en 2 cellules filles : G0/G1 constitue la phase d'initiation permettant la croissance de la cellule et sa préparation pour répliquer correctement l'ADN en phase S, la phase G2 correspond de nouveau à une phase de croissance de la cellule préparant celle-ci à entrer en mitose (phase M) où a lieu la division cellulaire. Aucune différence n'a été observée



dans les pourcentages des phases du cycle cellulaire entre les cellules exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) et les cellules non exposées (Figure 63). Les profils de cycle cellulaire aux jours 5 et 7, ont souligné que les cellules sont majoritairement synchronisées dans la phase G0/G1. Lors de l'analyse en cytométrie, les parties du spectre correspondant aux cellules en phase G0/G1, S et G2/M sont délimitées par le positionnement des fenêtres M1, M2, M3 (Figure 63). Les signaux hors fenêtre ne sont pas pris en compte. L'ensemble des cellules comptées dans les fenêtres M1, M2 et M3 représente alors 100% des cellules considérées lors des différents calculs. Les pourcentages de cellules se préparant à la division cellulaire (phase G0/G1 et phase S) sont plus élevés à 5 jours ( $82,62 \pm 1,75$  % pour les cellules exposées à 65,59 nM) qu'à 7 jours ( $79,64 \pm 0,39$  % à 65,59 nM), alors que les pourcentages de cellules en division cellulaire (phase G2/M) sont similaires entre 5 ( $17,38 \pm 1,75$  % à 65,59 nM) et 7 jours ( $20,36 \pm 0,39$  % à 65,59 nM) (Figure 63). Ces résultats concordent avec la fin de leur phase exponentielle de croissance.

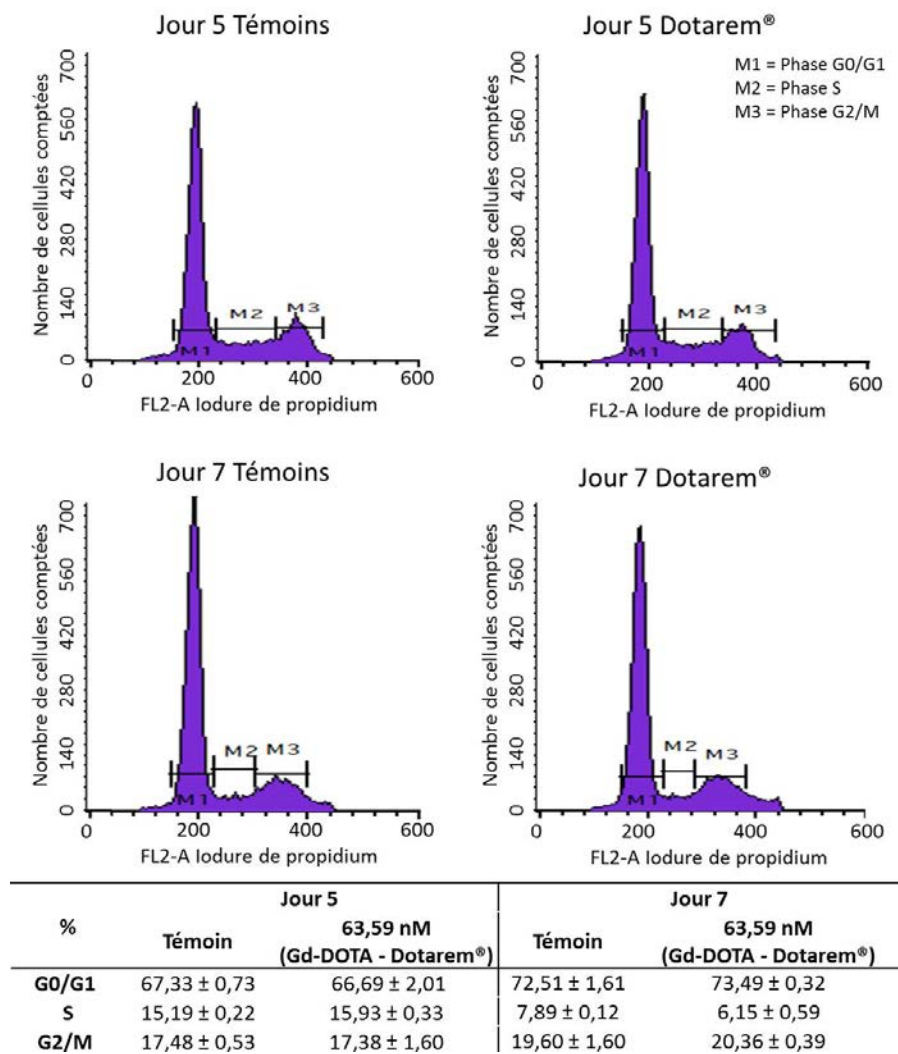


Figure 63: Analyse de cycle cellulaire des cellules ZF4 (BD FACS Calibur™ – Biosciences) après exposition au Gd-DOTA (Dotarem®) pendant 5 et 7 jours à 63,59 nM et pourcentage moyen (± écart type) des différentes phases du cycle entre les différentes phases du cycle cellulaire.

L'absence d'effet du complexe sur le cycle cellulaire des cellules ZF4 suggère que l'AC-Gd n'est pas ou peu internalisé. Ces résultats ont été corroborés par un essai de bioaccumulation du Gd-DOTA (Dotarem®) mené en parallèle de cette étude (Parant *et al.*, en *préparation*). La quantité de Gd dans la fraction cellulaire mesurée après 6 jours d'exposition à des concentrations fortes en Gd-DOTA (Dotarem®) (635,9 nM et 6,359 µM) est restée très faible et les facteurs de bioaccumulation correspondants à ces concentrations d'exposition ont été respectivement estimés à  $0,78 \pm 0,04$  et  $0,30 \pm 0,01$ . Ces mesures ont montré l'internalisation du complexe dans les cellules mais à des valeurs infimes. Nos observations ont mis en évidence que la faible quantité de Gd internalisé sous forme de Gd-DOTA (Dotarem®) n'affecte pas les éléments induisant la prolifération cellulaire.

#### 4. Réversibilité des effets observés sur la croissance cellulaire

Afin de déterminer les effets de l'AC-Gd à long terme et de vérifier les deux hypothèses concernant l'accessibilité des cellules ZF4 aux éléments essentiels à leur croissance, ces fibroblastes ont été cultivés pendant 9 et 35 jours en présence de la plus forte concentration d'exposition en Dotarem® dans le milieu de culture (63,59 nM).

Lors de l'expérimentation sur 9 jours, les cellules suivent une croissance normale en l'absence de Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu de culture sans renouvellement de ce milieu. Les cellules ZF4 atteignent la surface maximale d'occupation par boîte de T-75 au 9<sup>e</sup> jour d'exposition (*Figure 64*). En présence de l'AC-Gd dans le milieu de culture, l'absence de renouvellement du milieu de culture limite la croissance exponentielle des cellules jusqu'à 7 jours comme cela a été observé lors des expositions précédemment décrites pendant 6 jours. Cependant, ce retard de vitesse semble être rattrapé entre le 7<sup>e</sup> (taux de croissance = 3) et le 9<sup>e</sup> (taux de croissance = 5) jour de croissance (*Figure 64*). Cette observation laisse supposer qu'entre 7 et 9 jours d'exposition, les cellules qui n'étaient pas à confluence au 7<sup>e</sup> jour ont pu continuer de croître dans les boîtes contaminées à l'AC-Gd ; contrairement aux cellules en milieu témoin qui étaient presque à confluence dès le 7<sup>e</sup> jour, et ont donc vu leur croissance ralentir entre le 7<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour. Le renouvellement de milieu au 5<sup>e</sup> jour pour les cellules témoins, apporte de nouveau les éléments essentiels à la croissance des cellules. Les apports en vitamines, acides aminés, glutamine et éléments traces qui sont des éléments indispensables à la prolifération rapide des cellules (van der Valk *et al.*, 2010) semblent

améliorer la vitesse de croissance au moment de la phase exponentielle. Cela permet aux cellules ZF4 d'atteindre la surface maximale d'occupation par boîte de T-75 dès le 7<sup>e</sup> jour avec un taux de croissance 5 fois supérieur à la concentration cellulaire initiale (*Figure 64*). Le renouvellement du milieu de culture contaminé avec du Gd-DOTA (Dotarem®) au 5<sup>e</sup> jour d'exposition limite la croissance des cellules entre le 7<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour d'exposition, où les cellules ZF4 sont toujours en phase de croissance (taux de croissance = 4) (*Figure 64*). Ces observations montrent que la présence de l'AC-Gd dans le milieu de culture limite la croissance des cellules et ne leur permet pas de rattraper leur retard de croissance si ce milieu est renouvelé avec du milieu enrichi en Gd-DOTA(Dotarem®).

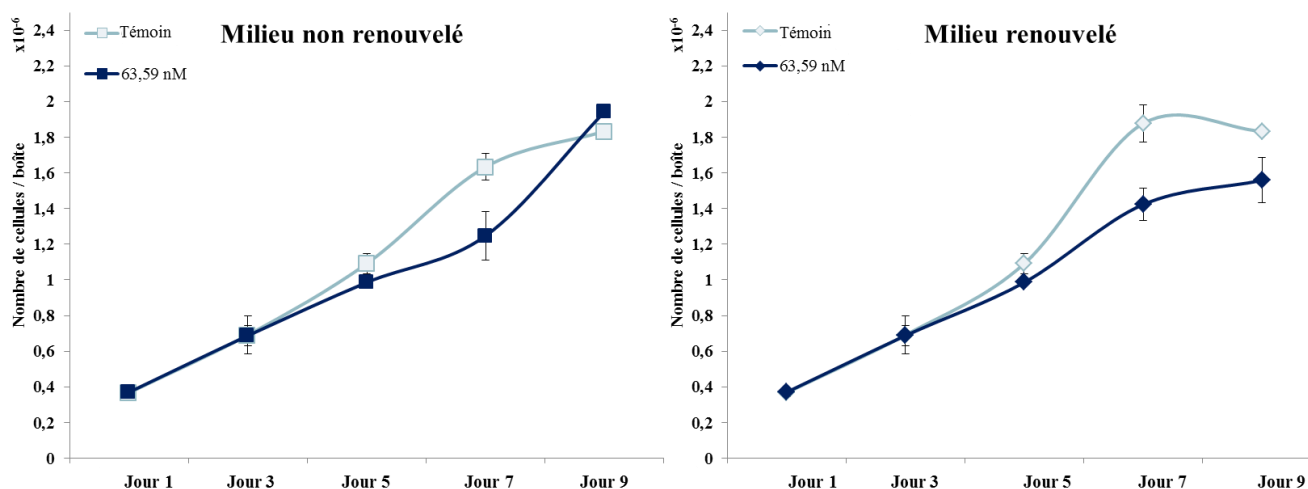


Figure 64 : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 9 jours en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) (63,59 nM) sans renouvellement ou avec renouvellement de milieu après 5 jours d'exposition.

En dehors du ralentissement de la croissance cellulaire observé en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) dans le milieu de culture, aucune modification de la morphologie des cellules ZF4 ou de leur pourcentage de confluence dans la boîte de culture n'a été notée.

Le comportement des cellules ZF4 a également été suivi à long terme, pendant 5 semaines (35 jours) avec du milieu de culture supplémenté en Gd-DOTA (Dotarem®) à 63,59 nM. La croissance des cellules ZF4 exposées à l'AC-Gd a montré un net ralentissement par rapport aux témoins. Ce ralentissement a été mesuré chaque semaine à 7, 14, 21, 28 et 35 jours (*Figure 65*). Bien que les concentrations cellulaires soient plus élevées au bout de 7 et 14 jours (probablement en lien avec le nombre de cellulesensemencées plus fort à 0 et 7 jours que lors des autres repiquages), le nombre de cellules exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) représentait entre 65 % et 89 % de celle des cellules en conditions témoin.

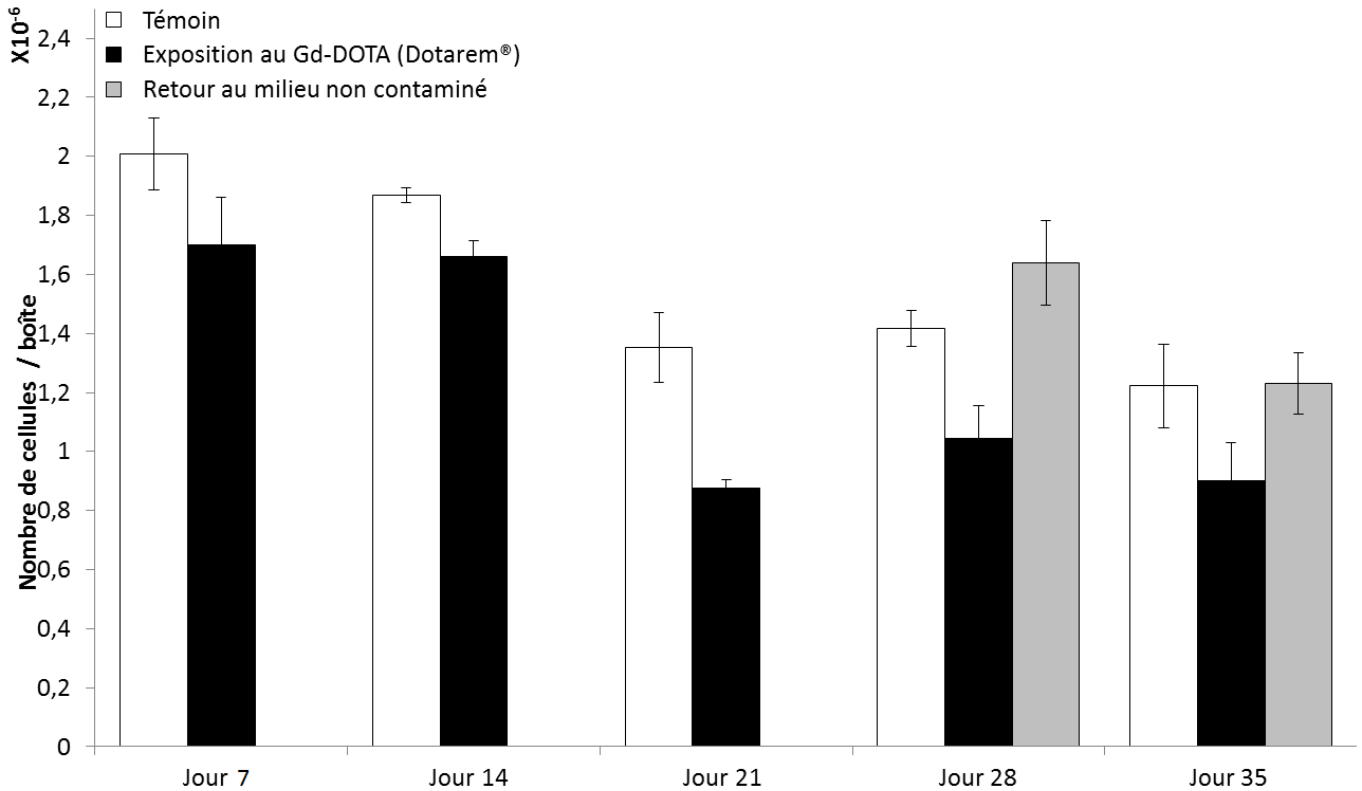


Figure 65 : Croissance des cellules ZF4 cultivées pendant 5 semaines en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) (63.59 nM) sans renouvellement de milieu. Au 21<sup>e</sup> jour, une partie des cellules jusqu' alors exposées à l'AC-Gd ont été de nouveau cultivées dans du milieu non contaminé.

Après 21 jours de culture dans le milieu enrichi en Gd-DOTA (Dotarem®), une partie de ces cellules ont été repiquées dans un milieu de culture témoin (sans contaminant). La croissance des cellules ZF4 était significativement plus élevée par rapport à la croissance des cellules traitées (Test Wilcoxon ; p-value = 0,006) et ne différait pas significativement du contrôle (Test Wilcoxon ; p-value = 0,423) au 28<sup>e</sup> jour d'essai. Cette observation suppose la réversibilité du ralentissement de la croissance à long terme.

L'ensemble de ces résultats ont suggéré que le ralentissement de la croissance cellulaire est probablement dû à l'interaction du complexe macrocyclique DOTA avec une composante du milieu de culture telle que les nutriments nécessaires à la croissance normale des cellules ZF4, plutôt qu'une interaction avec un composant cellulaire. Dans l'hypothèse où la molécule macrocyclique interagirait directement avec les cellules, celles-ci pourraient mettre en place des mécanismes de défense permettant d'encapsuler la partie de la membrane où est accroché le complexe avant de l'expulser dans le milieu. Ce type de mécanisme autophagique découlant d'une hypoxie ou de la limitation des nutriments dans les fibroblastes a été décrit par [Martinez-Outschoorn et al. \(2010\)](#). Cependant, cela laisse supposer que le complexe expulsé par les cellules se retrouve à nouveau disponible dans le milieu de culture jusqu'à sa disparition complète au fil des renouvellements sur plusieurs semaines. Nos résultats ont mis

en évidence le retour à une croissance normale des cellules dès la suppression de la supplémentation du milieu de culture en Gd-DOTA (Dotarem®).

Ces résultats semblent donc valider l'hypothèse concernant la limitation de l'accessibilité aux éléments essentiels du milieu par l'interaction du complexe macrocyclique X-DOTA avec ces éléments, induisant un ralentissement réversible de la croissance des cellules.

## 5. Points clés/conclusions

Les résultats décrits dans **ce chapitre** constituent la première approche réalisée avec des concentrations environnementales d'AC-Gd pour en évaluer les impacts cellulaires *in vitro*. Ils permettent d'en déduire plusieurs conclusions :

- Aucune toxicité n'a été observée sur les fibroblastes de poisson zèbre (ZF4, ATCC® CRL-2050) en présence de Gd-DOTA (Dotarem®), mais un net ralentissement de la croissance a été mis en évidence.
- Le ralentissement de la croissance cellulaire semble être lié à la structure macrocyclique chélatante de l'ion Gd (le DOTA seul). Ceci a suggéré que la structure DOTA pourrait facilement réagir avec d'autres molécules dans le milieu de culture cellulaire induisant une biodisponibilité plus faible de ces composés essentiels à la prolifération des cellules, phénomène qui peut être à l'origine du ralentissement de la croissance des cellules ZF4.
- Les effets des AC-Gd concernant le ralentissement de la croissance des cellules paraissent être réversibles rapidement en cultivant les cellules dans un milieu non contaminé.

Dans cette étude l'impact des produits de contraste gadolinés n'a été réalisé que sur des cultures cellulaires de fibroblastes de poisson zèbre (ZF4) avec l'AC-Gd le plus stable : le Gd-DOTA (Dotarem®). D'autres essais ont été développés en parallèle de ceux-ci pour évaluer les effets d'autres AC-Gd sur les cultures cellulaires. Une étude a montré le même type d'effets du ralentissement de la croissance cellulaire en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) sur une culture cellulaire branchiale de truite (RT W1 gills ; ATCC CRL-2523) (Parant *et al.*, *en préparation*). Dans cette même étude, les auteurs ont montré le ralentissement de la croissance des cellules ZF4 et des cellules RT W1 gills en présence d'un

AC-Gd linéaire : le Gd-DTPA-BMA (Omniscan®). Bien que cet AC-Gd soit un complexe moins stable que le complexe macrocyclique Gd-DOTA (Dotarem®), des effets similaires de ces produits de contraste sur différents systèmes cellulaires de poissons laisse supposer que les AC-Gd linéaires et macrocycliques présentent des propriétés similaires pouvant interagir avec le milieu de culture des cellules. Au travers de ces études, il a été montré que les AC-Gd présent dans les milieux de culture, affectent indirectement les lignées cellulaires en conditions *in vitro*.

Les résultats présentés dans **ce chapitre**, à propos des effets de toxicité *in vitro* des AC-Gd sur les fibroblastes de poisson zèbre, seront complétés par des essais complémentaires et contribueront à la rédaction d'un article scientifique (Parant *et al.*, *en préparation* – « *Impact of gadoteric acid on the growth of zebra fish cells (ZF4 – ATCC 2050)* »).



## ***Partie 4 : Discussion générale***

---





Jusqu' alors, la recherche sur les effets des AC-Gd a été très développée d'un point de vue médical, notamment par des expérimentations chez les mammifères (chez le rat, la souris, le lapin et l'humain) (Corot *et al.*, 1998 ; Heinrich *et al.*, 2007 ; Rogosnitzky et Branch, 2016 ; Wermuth et Jimenez, 2012). Ces études étaient essentiellement focalisées sur le risque de développer une fibrose néphrotique systémique qui est associée à l'injection d'AC-Gd pour des patients souffrants déjà de problèmes rénaux : (Cowper *et al.*, 2007 ; Morcos, 2007 ; Thomsen, 2016<sup>a</sup>, 2016<sup>b</sup>). Cependant, quelques études récentes ont montré l'accumulation du Gd dans les tissus des patients, dont les tissus cérébraux, découlant de l'injection d'AC-Gd linéaires au cours des examens IRM (Kanda *et al.*, 2015 ; McDonald *et al.*, 2015 ; Murata *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017). Ceci a conduit à la suppression des autorisations des 4 AC-Gd concernés (Multihance®, Omniscan®, Magnévist® et OptiMARK® ; European Medicines agency, 2017) en mars 2017. Ces 4 produits de contraste seront donc remplacés par l'utilisation d'AC-Gd plus stables et permettant leur diffusion dans les tumeurs ou leur passage de la barrière hémato-encéphalique. L'utilisation du Multihance® sera remplacée par celle du Primovist® pour l'imagerie hépatique, et les utilisations de l'Omniscan®, du Magnévist® et de l'OptiMARK® seront probablement remplacées par celle du Dotarem® qui est actuellement le plus utilisé pour l'imagerie cérébrale. La nécessité de l'utilisation de ces AC-Gd au cours des examens de diagnostic IRM ayant été de plus en plus fréquente au cours de ces 30 dernières années, leurs rejets dans le milieu aquatique ont considérablement augmenté (Tepe *et al.*, 2014) et la présence des AC-Gd dans ce milieu a largement été décrite (Bau *et al.*, 2006 ; Birka *et al.*, 2013 ; Kulaksız et Bau, 2011 ; Lawrence, 2010 ; Lawrence et Barel, 2010 ; Telgmann *et al.*, 2013). Dans ce contexte, quelques études ont commencé à étudier les effets des AC-Gd sur les organismes aquatiques. Cependant, ces études ont été réalisées à des concentrations de l'ordre de celles injectées par voie intraveineuse chez les patients (de l'ordre du mg(Gd)/L) (Aga, 2008 ; Lindner *et al.*, 2013 ; Lingott *et al.*, 2016), alors que dans le milieu aquatique les concentrations sont beaucoup plus faibles (de l'ordre du ng(Gd)/L).

C'est dans ce contexte que cette thèse a été initiée, afin de s'intéresser pour la première fois aux effets des AC-Gd en conditions réalistes d'un point de vue environnemental. Le Gd-DOTA (Dotarem®) et l'un des AC-Gd les plus fréquemment retrouvés dans le milieu aquatique (Birka *et al.*, 2016<sup>b</sup> ; Telgmann *et al.*, 2012<sup>a</sup> et <sup>b</sup>) et le produit de contraste le plus stable (Port *et al.*, 2008). Son utilisation en tant que molécule représentative des AC-Gd, a permis de déterminer la toxicité liée uniquement au complexe gadoliné. Les principaux

résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche ont fait ressortir trois grands axes de discussion. Le premier permet de discuter des rejets des AC-Gd dans les rivières de la région Lorraine à proximité des sites stratégiques, à savoir principalement les rejets de stations d'épuration. Le second axe permet de définir l'interaction des organismes aquatiques avec ces complexes, par leur capacité à les internaliser et/ou les bioaccumuler du niveau tissulaire jusqu'au niveau cellulaire. Enfin, le troisième axe met en évidence la toxicité du Gd-DOTA pour les organismes aquatiques et permet de fournir une approche à l'évaluation du risque environnemental que représentent les rejets de ces produits de contraste dans le milieu aquatique.

### **1. De la mesure des REE à l'estimation des concentrations en Gd d'origine anthropique au l'échelle régionale**

Une étape majeure de ce travail a été de réaliser un état des lieux des concentrations en Gadolinium à proximité des sites stratégiques choisis, c'est-à-dire à proximité des rejets des STEP à fortes capacité de retraitement des eaux usées en Lorraine et des zones de captage en eau potable destinées à la consommation humaine localisées en aval de ces STEP.

Afin d'estimer les concentrations en Gd d'origine géogénique et en Gd d'origine anthropique pour chaque échantillon, le calcul employé est basé sur le profil des concentrations en REE mesurées pour chaque échantillon aqueux. Une des premières limites notées au cours de cette étude concerne les méthodes de calcul diverses et variées employées actuellement pour déterminer les taux de Gd d'origine géogénique et d'origine anthropique dans le milieu aquatique. Les méthodes de calcul utilisées par les différents auteurs au cours de ces 20 dernières années ne sont pas homogènes. Ces méthodes ont été basées soit sur des extrapolations ou des interpolations linéaires ou géométriques utilisant les REE lourdes ou les REE légères (Bau *et al.*, 2006 ; Bau et Dulski, 1996 ; Kulaksiz et Bau, 2013, 2011<sup>b</sup>) ; soit sur une modélisation de la forme du profil des REE normalisées à l'aide d'un ajustement polynomial de troisième degré (Rabiet *et al.*, 2009 ; Verplanck *et al.*, 2010). Bien que ces différentes approches infèrent une variabilité des concentrations en Gd d'origine anthropique relativement faible pour les mêmes échantillons (Hatje *et al.*, 2016), la majorité de ces méthodes de calcul ne prend pas en compte la variabilité naturelle du Gd dans le profil des REE des échantillons (Lawrence, 2010 ; Petelet-Giraud *et al.*, 2009). Cette variabilité naturelle en Gd ne peut être estimée que par comparaison aux concentrations en Gd mesurées

dans des échantillons de référence. En effet, les échantillons de référence mettent en évidence les concentrations de base en éléments métalliques mesurées dans le milieu aquatique. Il est connu que ces concentrations peuvent varier en fonction du socle géogénique sur lequel se situent les prélèvements (Johannesson et al., 2000). La variabilité naturelle en Gd sur les profils des REE du site de référence laisse supposer qu'une partie du Gd libre provient probablement d'un apport en Gd d'origine anthropique antérieur aux périodes de prélèvement. Il est supposé que les complexes de Gd employés depuis près de 30 ans se sont soit décomplexés et ont libéré leur ion Gd dans le milieu aquatique ; soit ces complexes se sont répartis dans les différents compartiments du milieu aquatique induisant une accumulation, et donc une augmentation du bruit de fond du Gadolinium. Nos calculs ont alors soulevé que cette part en Gd est ce que l'on peut appeler du « faux géogénique ». En conséquence, la non-prise en compte de ce « faux géogénique » dans les méthodes de calcul est responsable d'une surestimation des concentrations en Gd d'origine anthropique dans les échantillons d'eau. Il serait aujourd'hui utile que les méthodes de calcul des parts en Gd d'origines géogénique et anthropique actuellement employées soient homogénéisées et édictées plus clairement par un calcul standardisé. La méthode de calcul que nous proposons se rapproche de celle employée par Lawrence et al. (2010), où la valeur de l'anomalie en Gd de l'échantillon de référence (estimée en se basant sur les profils en REE) et considérée comme une valeur seuil est introduite dans le calcul des concentrations en Gd. Avec cette méthode de calcul, l'étude des profils des REE mesurés dans chaque échantillon aqueux a mis en évidence les apports en Gd associés à une origine anthropique par rapport au bruit de fond des concentrations en Gd géogénique sur l'ensemble des sites d'étude.

Au cours de cette étude, la mesure des concentrations en REE a été réalisée dans chaque échantillon d'eau prélevé afin de déterminer les niveaux en REE correspondant aux apports du socle géogénique. Ces concentrations en REE ont été mesurées et ont permis d'estimer les concentrations en Gd géogénique pour chaque site de prélèvement au cours d'une période estivale correspondant à une période de basses eaux et de deux périodes hivernales correspondant aux périodes de hautes eaux. Lors de ces trois périodes d'échantillonnage, les mesures ont mis en évidence de fortes variations dans les concentrations en REE géogénique totales ( $\Sigma$ REE) en fonction de la localisation des sites de prélèvements sans lien avec les périodes d'échantillonnage (Figure 66). D'une part, ces observations ont permis de suggérer que les phénomènes d'érosion des roches sédimentaires et de dilution des REE dans le cours d'eau due au volume de celui-ci se compensent

(Johannesson *et al.*, 2000). D'autre part, les variations en  $\Sigma$ REE mesurées entre les différents sites ont été reliées à l'augmentation des concentrations de quatre REE spécifiques (La, Ce, Eu et Gd), notamment pour S8 et S12 au cours de la période des hautes eaux en 2015. Ces quatre REE sont connues pour présenter des anomalies positives liées à leur utilisation croissante dans les produits et procédés à haute technologie (Goonan et Survey, 2011 ; Grawunder et Merten, 2012 ; Jiachen *et al.*, 2006 ; Laveuf et Cornu, 2009). En lien avec le Gd d'origine anthropique mesuré dans ces eaux, il est alors supposé que ces éléments ont été rejetés ponctuellement dans le milieu aquatique en raison des rejets industriels à proximité des sites.

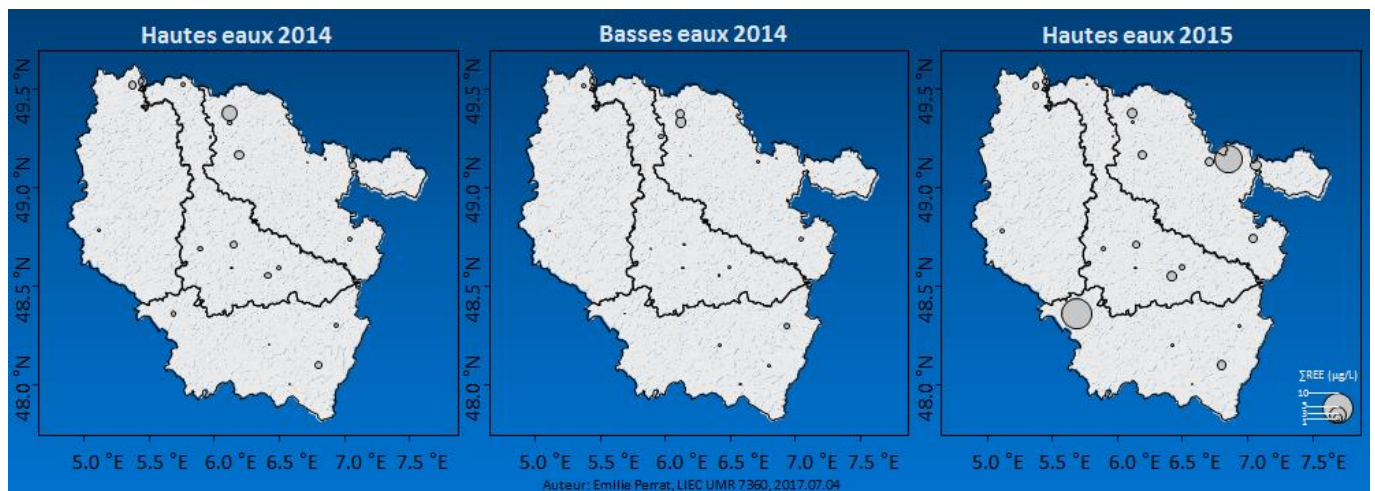


Figure 66 : Représentation graphique des concentrations en REE totales mesurées dans les échantillons d'eau prélevés au cours des trois périodes d'échantillonnage en région Lorraine

Même si les variations de concentrations en Gd géogénique mesurées à proximité des sites d'étude vont de pair avec celle en REE géogéniques, les concentrations en Gd total sont d'autant plus modulées au cours du temps par les apports en Gd liés aux activités d'origine anthropique. Ceci soulève les questions de savoir quelle proportion représente ce Gd d'origine anthropique par rapport au Gd total et quelles sont les concentrations en Gd d'origine anthropique mesurées à proximité des sites d'étude en Lorraine.

La contamination des sites d'étude par le Gd d'origine anthropique a été détectée pour la majorité des échantillons. Les résultats ont permis de mettre en évidence un impact des rejets de STEP entre l'amont et l'aval de celle-ci concernant l'apport en Gd d'origine anthropique dans le cours d'eau. Au niveau de ces rejets, la part en Gd d'origine anthropique pouvait atteindre près de 80 % du Gd total mesuré, ce qui est en accord avec de précédentes études qui ont montré que cette part dans les effluents de STEP pouvait atteindre de 85 % à 97 % du Gd total (Birka *et al.*, 2013 ; Migaszewski et Gajuszka, 2016 ; Möller *et al.*, 2002). Cette part en Gd d'origine anthropique a pu être mise en lien avec des traceurs d'effluents

urbains tels que les concentrations en Bore ou la demande chimique en oxygène, ce qui tend à confirmer que l'origine de cette part en Gd provient bien du retraitement des eaux usées en STEP. Comme cela a déjà pu être énoncé dans la littérature (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2002 ; Kulaksız et Bau, 2011<sup>b</sup> ; Py *et al.*, 2011 ; Rabiet, 2006), il a été suggéré que le Gd d'origine anthropique est un bon traceur d'effluents urbains. A proximité des rejets de STEP, de fortes variations des concentrations en Gd d'origine anthropique ont été observées intersites en raison de la période de prélèvement ponctuelle des échantillons. Un suivi pendant 14 jours consécutifs en aval de ces rejets a mis en avant de fortes variations des concentrations en Gd d'origine anthropique au cours du temps (de quelques ng(Gd)/L jusqu'à près de 85 µg(Gd)/L). L'ensemble de ces variations sont supposées liées au mode de fonctionnement des stations d'épuration qui est différent selon le pays. En effet, nos résultats sont contradictoires avec ceux de Telgmann *et al.* (2012<sup>b</sup>). Ces auteurs avaient montré que les rejets en Gd d'origine anthropique suivaient un profil modèle régulier au cours des semaines en raison d'un temps de rétention fixe de 24 h dans les STEP en Allemagne. Nos résultats ont suggéré qu'en France ce temps de rétention est modulé par la qualité de l'eau au cours de la dernière phase de retraitement.

A l'échelle de la région Lorraine, les mesures en Gd d'origine anthropique au niveau de ces rejets ont mis en évidence une séparation géographique des sites similaires tout au long de l'année. Les sites les plus contaminés par le Gd d'origine anthropique étant localisés en aval proche des rejets de STEP des villes les plus urbanisées et densément peuplées où la majeure partie des examens IRM est réalisée. La région Lorraine est alors partagée en trois grandes zones géographiques : les sites les plus contaminés se trouvent au Nord et à l'Ouest, les sites où la contamination par le Gd d'origine anthropique est la plus faible se situent au sud-est et le site de référence est localisé à l'extrême Sud-Est de la région. Cette répartition géographique de la contamination par le Gd d'origine anthropique a déjà été observée à plus petite échelle sur la ville de Berlin où la séparation du réseau égoutier et de la distribution de l'eau potable a été conservée après la chute du Mur de Berlin (1989) (Tepe *et al.*, 2014). Tepe *et al.* (2014), ont montré que sur la partie ouest de Berlin entre 56 et 98 % du Gd mesuré dans l'eau est d'origine anthropique et est liée aux agents de contraste au Gd utilisés en IRM. A l'inverse, l'Est de la ville de Berlin n'est pas affectée par ce type de contamination d'origine anthropique puisqu'elle ne comporte pas d'installations hospitalières. Au cours de cette étude, la contamination globale mesurée en Lorraine en Gd d'origine anthropique à proximité des rejets de STEP (quelques dizaines de ng(Gd)/L jusqu'à près de 85 µg(Gd)/L) et des zones de

captage en eau potable (quelques ng(Gd)/L) est cohérente avec les observations de [Kulaksız et Bau \(2011<sup>b</sup>\)](#) et de [Raju et al. \(2010\)](#).

Une limite notée au cours de cette étude concerne l'absence de dosage spécifique des AC-Gd dans les échantillons aqueux. Cette technique analytique est couramment employée en chimie analytique sur un nombre restreint d'échantillons ( $N < 10$ ) ([Birka et al., 2016<sup>b</sup>, 2013](#) ; [Kunemeyer et al., 2009](#) ; [Lindner et al., 2015, 2013](#)). Cependant, cette technique est chronophage, onéreuse et n'est pas optimisée pour pouvoir être employée en routine sur un grand nombre d'échantillons comme c'est le cas pour notre étude (*par exemple* : 36 prélèvements x 3 répliques = 106 échantillons pour les prélèvements en période de basses eaux).

De nombreuses études, y compris la nôtre, ont jusqu'alors permis de supposer que les concentrations en Gd d'origine anthropique mesurées dans les échantillons d'eau correspondaient essentiellement aux AC-Gd issus d'examens IRM aussi bien à proximité des rejets de STEP ([Kulaksız et Bau, 2011<sup>b</sup>](#) ; [Raju et al., 2010](#) ; [Tepe et al., 2014](#)) que loin en aval de ces rejets ([Birka et al., 2016<sup>b</sup>](#)). Quatre de ces composés gadolinés (Gd-DTPA - Magnévist®, Gd-BOPTA – Multihance®, Gd-DOTA - Dotarem® et Gd-BT-DO3A - Gadobutrol®) ont été détectés dans des échantillons provenant de plusieurs rejets de STEP et à proximité de zones de captage en eau potable localisées en aval de celles-ci dans les mêmes proportions (*Tableau 10*). Ces quatre molécules ont ainsi pu être tracées le long d'un cours d'eau en Allemagne (*La Ruhr*) sur près de 90 km ([Birka et al., 2016](#)). L'ensemble des observations laisse à penser que le Gd d'origine anthropique provenant des rejets de STEP en Lorraine correspond également au rejet des AC-Gd les plus fréquemment employés lors des examens IRM des centres hospitaliers de la région (Gd-DOTA - Dotarem®, Gd-DTPA - Magnévist®, Gd-BOPTA – Multihance®, Gd-DTPA-BMA - Omniscan® et Gd-BT-DO3A - Gadobutrol®). D'autre part, cela suggère qu'au niveau des autres sites d'étude localisés loin en aval des rejets de STEP (zone de captage en eau potable et sites à pollution multiple), le Gd d'origine anthropique correspond majoritairement à ces AC-Gd répartis dans les mêmes proportions qu'à proximité des rejets de STEP. Cependant, en raison de la variabilité d'utilisation des différents AC-Gd selon les établissements hospitaliers, nous n'avons pas pu établir de ratio permettant de déterminer la part théorique de chaque AC-Gd présente dans les échantillons d'eau comme cela a été réalisé sur des sites allemands (*Tableau 10*).

Selon les prévisions de l'INSEE (Institut National d'Etudes Statistiques et Economiques), la région Lorraine est une zone géographique avec une population vieillissante qui est représentative du reste de la France. En conséquence, les installations IRM de cette

région sont en constante augmentation pour répondre aux besoins croissants de la population. L'utilisation de produits de contraste gadolinés ne va donc cesser d'augmenter dans les années à venir et leur déversement dans le milieu aquatique suivra une évolution croissante sans contrôle des autorités sanitaires. Ainsi, l'environnement aquatique sera de plus en plus contaminé par le Gd d'origine anthropique notamment à proximité des villes à fortes densité de population. [Tepe et al. \(2014\)](#) ont déjà étudié la question aux Pays-Bas où ils ont montré une augmentation de 20% de ces rejets en Gd d'origine anthropique entre 2009 et 2012. Sans contrôle de ces rejets par les autorités sanitaires, il se pourrait que les concentrations mesurées en Lorraine évoluent selon un schéma similaire.

En résumé, nos observations ont permis de supposer que les concentrations en Gd anthropique mesurées en Lorraine correspondent certainement aux rejets des AC-Gd, notamment à ceux en Gd-DOTA fréquemment employé au cours des examens IRM dans les centres de radiologie de la région Lorraine. Ces rejets d'AC-Gd dans le milieu aquatique représentent un apport conséquent dans le milieu aquatique surtout en période estivale (jusqu'à 80% à proximité des rejets de STEP) et pourraient devenir de plus en plus importants dans un avenir proche. Pour la suite des recherches sur ce sujet, il serait intéressant de faire de la spéciation des AC-Gd tout au long des cours d'eau. Ceci permettrait d'une part de suivre l'évolution des concentrations de ces AC-Gd dans le milieu et d'autre part de déterminer les taux de dégradation de ces complexes le long des rivières.

## **2. Internalisation et bioaccumulation du Gd-DOTA dans les organismes dulçaquicoles**

La présence avérée de ces AC-Gd dans le milieu aquatique a conduit à déterminer leurs effets sur les organismes dulçaquicoles (microalgues vertes unicellulaires, microcrustacé, poissons et bivalves). Le choix de l'utilisation spécifique du Gd-DOTA (Dotarem®) pour nos études d'écotoxicité en lien avec ses caractéristiques (fréquente utilisation lors des examens IRM en Lorraine et à forte stabilité limitant la déstructuration du complexe), a permis de supposer que les mesures de Gd dans les milieux artificiels et dans les organismes correspondaient très certainement à celles en AC-Gd. En lien avec les caractéristiques de solubilité et du caractère hydrophile du Gd-DOTA, la présence de cet AC-Gd a soulevé plusieurs questions auxquelles nous allons répondre dans cette partie : (i) Dans quelle mesure ce produit de contraste est-il internalisé, voire bioaccumulé, par les différents organismes ? ;



(ii) Existe-t-il une spécificité de l'internalisation et/ou de l'accumulation du Gd-DOTA en fonction des organismes voire en fonction des caractéristiques des cellules ? ; (iii) Dans le cas où les organismes internalisent et/ou accumulent le Gd-DOTA, mettent-ils en place des mécanismes permettant la dépuration de ces complexes ?

Les mesures des concentrations en Gd pour chaque organisme et chaque condition testée ont permis de montrer l'internalisation de l'AC-Gd dans tous les organismes aquatiques (microalgues vertes unicellulaires, daphnies, poissons et bivalves). Les concentrations en Gd mesurées dans les microalgues vertes unicellulaires étaient beaucoup plus faibles que celles des autres organismes ce qui laisse suggérer que les systèmes végétaux peuvent avoir une sélectivité plus forte dans l'internalisation cellulaire des composés du milieu environnant puisque les cellules végétales ont une paroi cellulosique externe en plus de la membrane plasmique. Il est supposé que la complémentarité de ce double agencement peut être un frein à l'internalisation cellulaire de grosses molécules telles que les AC-Gd (entre 500 et 1000 Da) induisant la sélectivité en taille des éléments essentiels, des nutriments ou d'autres composés. [Lingott et al. \(2016\)](#) ont montré que les plantes peuvent absorber ces complexes gadolinés *via* leur système racinaire. Les AC-Gd absorbés dans les organismes végétaux sont alors probablement localisés essentiellement dans le système vasculaire des plantes permettant le transport des nutriments ([Maurel et al., 2015](#)) et ne sont que peu internalisés dans les cellules végétales.

Concernant les organismes aquatiques pluricellulaires testés, l'internalisation du Gd sous la formulation pharmaceutique Dotarem® dans les tissus des daphnies et des poissons a été observée au niveau individuel et dans les tissus des bivalves cette internalisation a été mesurée au niveau tissulaire (glande digestive et branchies). De plus, [Parant et al. \(en préparation\)](#) ont montré que le Gd est internalisé dans les cellules des poissons en faibles quantités. Au cours de cette étude *in vitro*, le Gd a été détecté par analyses ICP-MS dans les fibroblastes de *D. rerio* (cellules ZF4) exposées au Gd-DOTA (Dotarem®) *via* leur milieu de culture pendant 6 jours. L'ensemble de ces observations a permis de supposer que le Gd-DOTA est internalisé dans les tissus des organismes animaux jusqu'au niveau cellulaire. Cependant, la localisation exacte de l'AC-Gd dans les cellules n'a pu être définie. Le Gd-DOTA internalisé est donc soit incorporé au sein des cellules soit fortement adsorbé sur la membrane plasmique de ces cellules.

Les mesures en Gd relevées dans les cellules et tissus des organismes exposés uniquement au Gd-DOTA (Dotarem®), ont permis de montrer que de nombreux organismes dulçaquicoles sont capables d'internaliser cet AC-Gd. Cependant, les résultats ont également

mis en évidence que seuls les bivalves peuvent accumuler cet AC-Gd dans leurs tissus (dans les branchies et dans la glande digestive) au cours du temps (*Tableau 31*). Les bivalves sont connus pour être de bons bioaccumulateurs des composés organométalliques et des métaux en raison de leur comportement de filtration et de leur mode de nourrissage (Bryan et Langston, 1992). Les BAF calculés ont permis d'estimer que l'accumulation du Gd-DOTA dans les organes des bivalves devenait significative seulement entre le 7<sup>e</sup> et le 21<sup>e</sup> jour d'exposition aux fortes concentrations en AC-Gd (1 000 et 10 000 ng(Gd)/L) (*Tableau 31*). D'une part, ceci suggère que l'accumulation de ce complexe dans les tissus des bivalves pourrait continuer à augmenter si l'exposition au produit de contraste dans leur milieu avait été plus longue. D'autre part, bien que les facteurs d'accumulation du Gd-DOTA ne soient pas significatifs aux faibles concentrations d'exposition testées (20 et 60 ng(Gd)/L), il peut être supposé que les bivalves pourraient accumuler ce complexe gadoliné à long terme (sur plusieurs mois, voire plusieurs années).

*Tableau 31 : Tableau récapitulatif des facteurs de bioconcentration (BCF) et de bioaccumulation (BAF) du Gd-DOTA calculés pour chaque organisme dulçaquicole internalisant l'AC-Gd en fonction des conditions d'exposition. Les valeurs en gras montrent une accumulation significative de l'AC-Gd dans les tissus au cours du temps.*

Espèce	Durée d'exposition (jour)	Concentration d'exposition nominale dans le milieu							
		20 ng(Gd)/L	60 ng(Gd)/L	200 ng(Gd)/L	600 ng(Gd)/L	1 000 ng(Gd)/L	5 000 ng(Gd)/L	10 000 ng(Gd)/L	10 mg(Gd)/L
<b>BCF des Microcrustacés (Pool de 4 individus)</b>									
<i>D. magna</i>	7	9,3 ± 6,2		0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,3	nd	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	14	0,8 ± 1,1		0,1 ± 0,2	nd	nd	nd	nd	
	21	0,8 ± 1,4		nd	nd	nd	0,0 ± 0,0	nd	
	28	nd	nd	nd	nd	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	nd
	35	0,1 ± 0,1		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	42	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	49	nd		nd	nd	nd	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
<b>BCF des Poissons (Individu)</b>									
<i>D. rerio</i> (mâles)	14				nd				0,62 ± 0,24
<i>D. rerio</i> (femelles)	14				nd				0,10 ± 0,17
<b>Bivalves (Organe)</b>									
<b>BAF dans la glande digestive</b>									
<i>C. fluminea</i>	7	nd	nd			6,4 ± 6,2		0,5 ± 0,6	
	21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	nd	nd	<b>33,4 ± 2,6</b>	nd	<b>10,0 ± 1,9</b>	nd
<i>D. r. bugensis</i>	7	nd	nd			6,0 ± 5,8		2,5 ± 0,5	nd
	21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0			<b>77,8 ± 11,8</b>		<b>20,3 ± 2,8</b>	
<b>Branchies</b>									
<i>C. fluminea</i>	7	nd	nd			0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	
	21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	nd	nd	<b>5,4 ± 4,0</b>	nd	<b>5,7 ± 0,3</b>	nd
<i>D. r. bugensis</i>	7	nd	nd			0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0	nd
	21	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0			4,7 ± 6,2		<b>2,3 ± 0,8</b>	

nd = non déterminé

Dans le milieu aquatique naturel, le Gd est présent sous de nombreuses formes (Gd libre ou complexé). Une précédente étude réalisée par [Merschel et Bau \(2015\)](#), avait mis en évidence que le Gd d'origine anthropique ne pouvait être incorporé dans la coquille des bivalves, suggérant une forte discrimination de l'accumulation du Gd selon sa spéciation. Il est connu que le Gd sous sa forme ionique libre ou complexée ( $\text{GdCl}_3$ ,  $\text{GdNO}_3$ ,  $\text{GdPO}_4$ ) est bioaccumulé par les organismes aquatiques ([Bendakovská et al., 2016](#) ; [Courant, 2011](#) ; [Qiang et al., 1994](#)). Nos résultats ont mis en évidence l'accumulation du Gd sous forme Gd-DOTA dans les tissus des bivalves. Les expériences menées *in situ* à proximité des rejets de STEP ont mis en évidence l'accumulation du Gd dans les principaux sites d'accumulation des métaux et des contaminants chez les mollusques, c'est-à-dire dans les branchies et la glande digestive ([Miramand et Bentley, 1992](#) ; [Sokolova et al., 2005](#)). Bien que l'approche technique employée ne permette pas de différencier la spéciation du Gd dans les tissus des bivalves lors de l'exposition *in situ*, il a été supposé qu'une partie de ce Gd provient du Gd libre et une plus petite partie provient des produits de contraste gadolinés. En effet, l'accumulation du Gd sous forme Gd-DOTA ([Tableau 31](#)) a été calculée à des niveaux nettement moins importants que lorsque les organismes ont été exposés au Gd *in situ* (BAFs de l'ordre du millier). Cette accumulation moindre du Gd sous sa forme d'AC-Gd que celle des autres spéciations du Gd probablement liée à la solubilité et au caractère fortement hydrophile de ces complexes de gadolinium ([Chiou, 2002](#)).

La capacité d'internalisation et d'accumulation du produit de contraste dans les tissus des organismes pluricellulaires (daphnies, poissons et bivalves) semble également être régulée par la capacité de ces organismes à dépurifier le produit de contraste. Chez *D. magna* et *D. rerio*, les résultats obtenus au cours de ces études mesurant l'accumulation du Gd-DOTA dans les organismes ont suggéré la mise en place de mécanismes permettant la dépurification complète de l'AC-Gd hors des cellules où il est internalisé. Chez *D. magna*, l'accumulation du Gd-DOTA a été notée uniquement pour les organismes exposés au produit de contraste pendant 7 jours *via* leur milieu de vie à la plus faible concentration d'exposition mais pas au-delà de cette durée d'exposition ([Tableau 31](#)). Ces observations laissent présumer de l'activation de la détoxification et de la dépurification du Gd-DOTA et suppose deux possibilités quant au mécanisme impliqué. La première hypothèse suggère que la détoxification et la dépurification du complexe gadoliné sont déclenchées à partir d'un certain seuil d'internalisation du complexe dans les organismes. Dans ce cas, nos résultats indiquent que le seuil responsable de la dépurification par des mécanismes d'exclusion du complexe hors de l'organisme, est estimé à

une concentration supérieure à une vingtaine de ng(Gd)/ $\mu$ g de poids sec de daphnie. La seconde hypothèse présume d'une latence entre l'activation des systèmes de détoxification et leur efficacité, laissant ainsi la possibilité au Gd-DOTA de s'accumuler dans l'organisme au cours de cette phase. La dépuración efficace du Gd-DOTA a également été observée chez *D. rerio*. Chez ces poissons, le produit de contraste internalisé n'est pas accumulé un niveau tissulaire (BCF <1 (*Tableau 31*)), ni au niveau cellulaire (*Parant et al., en préparation*). Cependant, ces facteurs d'accumulation étaient plus élevés dans les tissus mous des mâles que des femelles *D. rerio*. Cette différence d'internalisation du Gd-DOTA est probablement liée à la différence de la teneur lipidique entre les deux sexes. Les essais ayant été réalisés sur des organismes adultes aptes à se reproduire, les femelles ont probablement une teneur lipidique plus élevée que celle des mâles au moment de la reproduction. Le ratio en Gd-DOTA internalisé dans les tissus se trouve alors réduit dans les femelles car le complexe hydrophile n'est probablement pas internalisé dans les cellules graisseuses. Les observations concernant l'internalisation du Gd-DOTA dans les tissus mous des organismes aquatiques animaux (daphnies, poissons et bivalves) jusqu'au niveau cellulaire (*Parant et al., en préparation*) et l'accumulation de ce complexe dans les tissus des bivalves ont suggéré la mise en place de mécanismes de défense permettant de réguler, voire d'éliminer totalement la quantité de produit de contraste internalisée.

Dans la littérature, la dépuración efficace des composés métalliques par les daphnies est souvent associée à la physiologie de ces arthropodes qui muent régulièrement pour croître et libérer leurs œufs lors de l'éclosion (*Ebert, 2005*). En effet, la mue de ces organismes a souvent été notée comme un atout supplémentaire quant à la dépuración des composés métalliques et leur excrétion hors des organismes. Cette hypothèse fréquemment mise en avant est peu probable ici puisque ce type de dépuración suppose l'incorporation des éléments métalliques dans la cuticule des arthropodes. Bien que ce phénomène ait déjà été observé pour de nombreux métaux chez d'autres arthropodes notamment chez *Uca pugnax* (*Bergey et Weis, 2007*), chez *Palaemon elegans* (*White et Rainbow, 1986*), ou chez *Palaemonetes pugio* (*Keteles et Fleeger, 2001*), dans cette étude, *D. magna* a été exposée à un complexe organométallique. Le Gd-DOTA étant un complexe fortement hydrophile (*Brücher, 2002 ; Fretellier, 2013*) et stable (*Port et al., 2008*), il est alors peu probable que ces complexes soient incorporés dans la cuticule des microcrustacés qui contient essentiellement des lipides et des minéraux (*Cribb et al., 2009 ; Nagasawa, 2012*). Dans ce sens, *Lingott et al. (2016)* ont montré que le Gd injecté dans le milieu sous forme de Gd-DTPA, un AC-Gd

linéaire moins stable que le Gd-DOTA, est présent essentiellement dans le tube digestif et ne semble pas être incorporé dans la cuticule des daphnies (Figure 67).

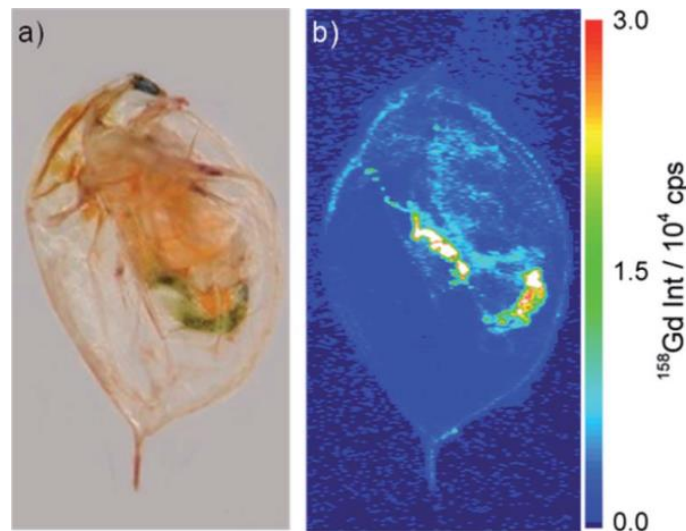


Figure 67 : Image de *D. magna* exposée pendant 19 heures à 100 mg(Gd)/L de Gd-DTPA (a) et profil d'intensité du Gd obtenu par LA-ICP-MS dans l'organisme (b). Tiré de Lingott et al., (2016).

L'ensemble des résultats d'accumulation du Gd-DOTA dans les tissus de ces organismes filtreurs a également suggéré que la capacité d'accumulation du complexe gadoliné est différente selon l'espèce de bivalve. En effet, *C. fluminea* paraît moins accumuler le Gd-DOTA que *D. r. bugensis* (Tableau 31). D'une part, il pourrait être supposé que cette différence d'accumulation entre les deux espèces de bivalves soit liée directement à leur mode de vie. Cependant l'exposition des bivalves en conditions contrôlées de laboratoire a permis aux deux espèces d'être exposées de la même manière au milieu enrichi en AC-Gd puisque ces bivalves ont des taux de filtration du milieu aquatique similaires (Marescaux et al., 2016). En effet, bien que *C. fluminea* soit un bivalve qui filtre le milieu à l'interface eau/sédiment alors que *D. r. bugensis* filtre directement dans la colonne d'eau où est supposé être localisé la majorité du Gd d'origine anthropique fortement soluble, les dispositifs expérimentaux ont permis de parer à ce biais. Tout au long de leur exposition, la fermeture prolongée des coquilles des bivalves n'a pas été notée suggérant ainsi que les organismes ont filtré le milieu en continu. D'autre part, les mesures d'accumulation du Gd-DOTA au cours du temps dans les tissus des deux espèces de bivalve laissent présumer de la mise en place des mécanismes de dépuraction permettant de limiter l'accumulation de l'AC-Gd pendant les 21 jours d'exposition. Ces mécanismes ont probablement été activés différemment selon l'espèce ce qui permet à *C. fluminea* d'éliminer plus efficacement et/ou plus rapidement le complexe gadoliné que *D. r. bugensis*. Cette dernière hypothèse semble être appuyée par les résultats des mesures biochimiques. Chez *D. r. bugensis* l'augmentation de l'activité Glutathion-S-

Transférase (GST) a été observée dans les branchies au bout de 7 jours d'exposition à faibles concentrations (60 ng(Gd)/L) et dans la glande digestive au bout de 21 jours d'exposition à fortes concentrations (10 000 ng(Gd)/L). La présence de cette enzyme de conjugaison laisse supposer qu'un composé hydrophile a été ajouté au complexe de Gd déjà fortement hydrophile dans les cellules. L'augmentation du caractère hydrophile de l'AC-Gd permet alors de l'exclure plus facilement. De plus, la présence de la GST suggère la présence de protéines de transport et/ou d'efflux permettant l'élimination du complexe hors de la cellule (Goldstone *et al.*, 2006 ; Parant, 1998). Les protéines de transport et/ou d'efflux ont plusieurs fois été caractérisées chez divers organismes aquatiques tels que les vers, les éponges, les bivalves, les gastéropodes et les poissons sous l'appellation des mécanismes MXR (*Multi-xenobiotic resistance*) (Pain et Parant, 2007 ; Smital et Kurelec, 1998). Smital et Kurelec (1998) ont montré que les mécanismes de type MXR regroupent l'induction simultanée de l'expression des gènes Mdr (*Multi-drug resistance*), de la GST, des protéines *heat-shock* et/ou d'une série de mécanismes appartenant au système de défense biologique général. Concernant notre étude, il peut alors être supposé que de tels mécanismes sont mis en place dans les cellules. Comme l'ont montré Bonnafé *et al.* (2015), de nombreux biomarqueurs tels que la GST ou les protéines de la famille des cytochromes P450 (CYP4) peuvent être très transitoirement augmentés ou diminués au niveau de l'activité transcriptionnelle ou enzymatique contrairement aux mécanismes d'efflux. Ces mécanismes d'efflux ont de nombreuses fois été montrés chez les bivalves dès lors que les individus sont exposés à un contaminant (Achard, 2004 ; Galgani *et al.*, 1996 ; Keppler et Ringwood, 2001 ; Minier *et al.*, 2000). La différence d'accumulation du Gd entre les deux espèces de bivalves est probablement liée à une capacité de prise en charge du complexe gadoliné et de son exclusion plus importante chez *C. fluminea* que chez les *D. r. bugensis*. L'augmentation transitoire de la GST dans les tissus permet de supposer que les bivalves ont pu mettre en place ces mécanismes de défenses au tout début de leur exposition à ces fortes concentrations en AC-Gd, mais que les cellules se sont adaptées en ne conservant qu'un mécanisme d'exclusion. Les résultats de l'accumulation du Gd provenant du Gd-DOTA dans les tissus mous des bivalves ont clairement mis en évidence que cette dépuration est partielle chez ces organismes et semble être accentuée fortement lors de l'exposition au produit de contraste entre 1 et 10 µg(Gd)/L. Ces résultats ont suggéré que les bivalves peuvent accumuler le Gd-DOTA selon 3 modes en fonction des activités de dépuration des organismes. A long terme, il a ainsi été supposé que :

- (i) à faibles concentrations (à 20 et 60 ng(Gd)/L), la bioaccumulation du Gd est totalement inhibée en lien avec l'efficacité des mécanismes de dépuración des organismes.
- (ii) entre 60 ng(Gd)/L et 1 µg(Gd)/L dans le milieu, les mécanismes de dépuración sont actifs mais ne compensent pas l'accumulation de l'AC-Gd dans les organismes sans induire de toxicité. Les bivalves semblent donc tolérer la présence de ce contaminant dans le milieu aquatique environnant jusqu'à un certain seuil d'accumulation entre ces deux concentrations d'exposition.
- (iii) entre 1 µg(Gd)/L et 10 µg(Gd)/L (voire au-delà de 10 µg(Gd)/L), les mesures des concentrations en Gd dans les tissus ont supposé le fort accroissement de ces mécanismes de dépuración permettant de limiter la quantité de Gd accumulée dans les cellules minimisant ainsi la toxicité.

### 3. Toxicité du Gd-DOTA

Au travers des différents essais d'écotoxicité présentés dans ce manuscrit, les résultats ont montré que le Gd-DOTA n'est pas un composé inerte pour les organismes aquatiques. De précédentes études réalisées chez *Caenorhabditis elegans* (Williams et al., 2000) et chez *D. rerio* (Neubert, 2008), avaient suggéré que les autres AC-Gd ne présentent pas d'effets pour les organismes aquatiques aux concentrations inférieures au mg(Gd)/L. Cependant, nos résultats ont mis en évidence que la présence du Gd-DOTA dans le milieu de vie des organismes est responsable d'effets aux concentrations d'ordre environnemental par deux modes d'action : le premier par une toxicité directe pour les organismes qui peuvent internaliser ce complexe dans leurs cellules et le second par une toxicité indirecte sur le zooplancton du milieu aquatique *via* leur nourriture.

L'internalisation du Gd-DOTA à faibles concentrations chez les microalgues vertes unicellulaires s'est traduite par une absence de toxicité directe du complexe pour ces organismes aux concentrations d'ordre environnemental. L'inhibition de la croissance de ces cellules algales a été montrée à des concentrations bien supérieures de l'ordre de 3,5 g(Gd)/L (Gd-DOTA - Dotarem®) et aucun autre effet sur la morphologie ou la fluorescence des cellules algales n'a été relevé. Une précédente étude avait montré l'inhibition de la croissance cellulaire à des concentrations supérieures à 20 mg(Gd)/L pour les autres AC-Gd (Aga, 2008). Ces observations suggèrent que la toxicité des produits de contraste gadoliné à ces

concentrations est probablement lié à une limitation en nutriments nécessaires à la croissance des microalgues dans milieu sans lien direct avec ces complexes. D'autre part, la cytotoxicité algale du Gd-DOTA a été évaluée à des concentrations nettement plus fortes que celle de l'ion Gd. Ces résultats paraissent confirmer la limitation de la toxicité du Gd lorsque celui-ci est présent dans le milieu sous la formulation pharmaceutique stable du Gd-DOTA.

Bien que les microalgues vertes unicellulaires n'aient pas présenté de toxicité apparente aux concentrations environnementales, un effet indirect du Gd-DOTA a été observé sur la croissance des organismes brouteurs se nourrissant de ce phytoplancton : les daphnies. La toxicité indirecte observée chez *D. magna* sur leur croissance et leur reproduction a suggéré deux hypothèses. Il pourrait être supposé que la valeur nutritive des algues est diminuée par leur culture en présence d'AC-Gd. Cependant, cette première hypothèse est peu probable au vu de l'absence d'effet mesuré chez les microalgues vertes aux concentrations d'ordre environnemental. [Van Donk et Hessen \(1993\)](#) ont montré que la qualité nutritive des algues est souvent liée à leur faible teneur en amidon et que les algues limitées en phosphore dans leur milieu de culture produisent des granules d'amidon à l'intérieur de celles-ci ce qui les rends moins appétentes pour certains brouteurs. Ce type de modification n'affecte effectivement pas le taux de croissance de l'algue et n'impacte pas nécessairement sa morphologie ([van Donk et Hessen, 1993](#)) comme cela a été suggéré dans notre étude. Il est également probable que la production des chlorophylles *a* et *b* ne soient pas affectées, mais la présence des granules d'amidon dans les cellules masquerait probablement les thylakoïdes permettant la production de ces chlorophylles et l'auto-fluorescence de la population algale serait diminuée. Les résultats de notre étude ont permis de montrer que la présence du Gd-DOTA n'affecte pas l'auto-fluorescence des cellules algale et donc la production des chlorophylles *a* et *b* aux concentrations d'exposition testées. La seconde hypothèse concernant la toxicité indirecte observée chez *D. magna* pourrait être expliquée par une diminution de l'appétence pour ces algues. Il est connu que les chlorophycées peuvent produire des phycotoxines (alkaloides, esthers, ...) qui peuvent impacter les consommateurs de ces microalgues tels que le zooplancton ([Leflaive et Ten-Hage, 2007](#)). Ceci pourrait être à l'origine d'un stress nutritif pour les daphnies et donc une réduction du broutage des algues ([van Donk et Hessen, 1993](#)). La présence de l'AC-Gd dans le milieu de culture des algues pourrait alors induire la production de métabolites secondaires, externe aux cellules algales, ou d'autres composés non identifiés (*Figure 68*). De fait, ces observations laissent supposer que les daphnies se nourrissent moins avec les algues exposées à l'AC-Gd et relocalisent



l'énergie normalement allouée à leur croissance et à leur reproduction, pour leur survie (vu que cette nourriture ne semble pas impacter la mortalité des organismes).

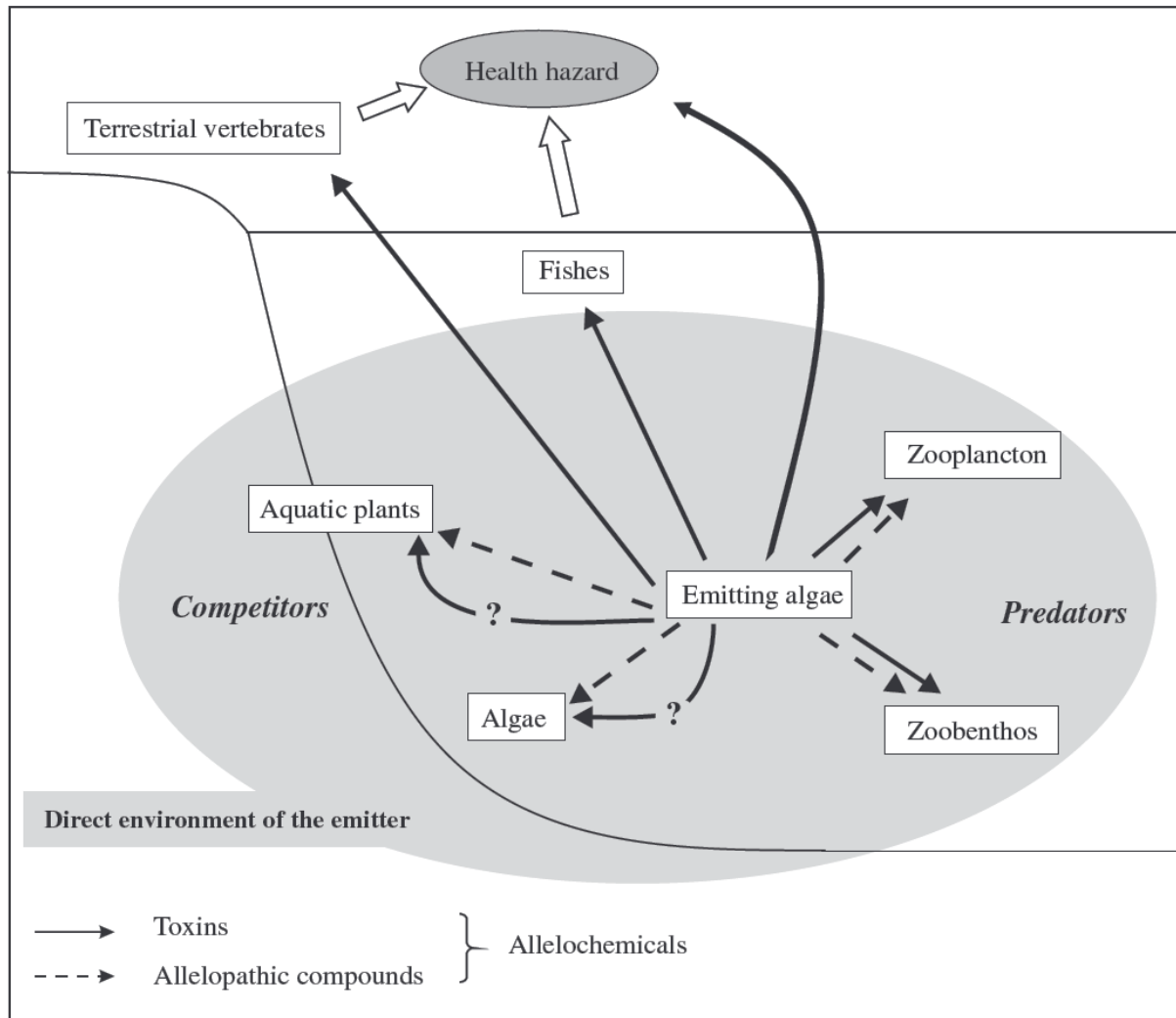


Figure 68: Exemples d'interactions impliquant des allo-chimiques (composés allélopathiques et toxines) produits par des microalgues d'eau douce. Tiré de Leflaive et Ten-Hage (2007)

Chez les daphnies, des effets liés à la présence de l'AC-Gd dans leur milieu de vie ont également été notés, indiquant une toxicité directe liée au Gd-DOTA. Malgré la capacité de dépuration complète observée chez *D. magna*, les résultats ont mis en évidence une mortalité plus élevée de *D. magna* exposée à long terme aux concentrations entre 1 et 10  $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  mais ne dépassait pas 30% de la population au bout de 49 jours d'exposition. Aucun autre effet sur la croissance en taille des daphnies ou sur leur reproduction n'a été noté. L'ensemble de ces observations laissent supposer que les microcrustacés dulçaquicoles privilégient leur reproduction plus que leur survie à long terme ce qui affecterait peu, voire pas, ces communautés. En effet, le maintien du nombre de descendants produit permet de conserver la taille des populations de daphnies exposées à l'AC-Gd *via* leur milieu de vie et donc de conserver cette espèce au sein des écosystèmes aquatiques.

Dans le cas où les organismes accumulent l'AC-Gd dans leurs tissus, nos résultats ont mis en évidence une réponse à la toxicité du Gd-DOTA plus rapide chez *D. r. bugensis* que chez *C. fluminea*. Une preuve de la toxicité de l'AC-Gd (peroxydation lipidique) et une augmentation de la dépense énergétique ont été observées chez *C. fluminea* après une exposition de 7 jours mais ont disparu après une période de 21 jours. Ces mesures réalisées à 7 jours laissent entrevoir une réponse transitoire des mécanismes de défense des bivalves qui était déjà effective chez *D. r. bugensis* après 7 jours d'exposition (augmentation de la GST). Les observations suggèrent que des mécanismes de détoxification complémentaires tels que la GST ou la Catalase (CAT) ont probablement été exprimés plus tôt chez *D. r. bugensis*. Il semble donc que l'efficacité des mécanismes de dépuraction mis en place par les bivalves permette de parer à la toxicité du Gd-DOTA. Les bivalves paraissent donc capables de s'adapter à la présence de ce contaminant dans le milieu.

Au niveau cellulaire, nos résultats ont clairement mis en évidence l'absence de cytotoxicité du Gd-DOTA (Dotarem®) sur les fibroblastes de poisson zèbre (ZF4, ATCC® CRL-2050). Les résultats ont montré un ralentissement de la croissance cellulaire en présence d'AC-Gd. Une étude complémentaire a souligné le ralentissement de la croissance des cellules ZF4 et des cellules branchiales de truite (RT W1 gills; ATCC CRL-2523) en présence de Gd-DOTA (Dotarem®) ou de Gd-DTPA-BMA (Omniscan®) (Parant et al., en préparation). Cependant, les effets observés *in vitro* pour les lignées cellulaires de vertébrés aquatiques sont vraisemblablement dus à une toxicité indirecte liée à l'interaction des AC-Gd avec le milieu de culture les effets observés au niveau cellulaire. Dans les tissus des animaux, la plupart des cellules sont en contact et interagissent spécifiquement avec d'autres cellules *via* diverses jonctions cellulaires. Bien que les essais *in vitro* permettent de mimer ces interactions, de nombreux autres processus entrent en jeu *in vivo* et la pertinence de ces essais ne peut être utilisée seule pour évaluer l'impact d'un contaminant sur un organisme. Il est donc peu probable que le ralentissement de la croissance cellulaire observé en réponse à la présence du produit de contraste dans le milieu soit un effet récurrent observable *in vivo* pour les vertébrés aquatiques. Il est néanmoins intéressant de souligner que les produits de contraste gadolinés semblent limiter la biodisponibilité des composés essentiels à la croissance et à la prolifération des cellules. De plus, il semble que la diminution de la biodisponibilité de ces nutriments dans le milieu de culture soit uniquement liée à leur interaction avec la structure polyaminocarboxylate des AC-Gd sans lien avec l'ion Gd qui les compose. Nos résultats ont mis en évidence que seule la structure DOTA du Dotarem® était à

l'origine de la diminution de la croissance des cellules. Les résultats ont également montré que la suppression du complexe gadoliné dans le milieu permet un retour à la croissance normale des cellules. Les effets des AC-Gd concernant le ralentissement de la croissance des cellules semblent donc réversibles rapidement en cultivant les cellules dans un milieu non contaminé. Des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier les effets des AC-Gd sur les cellules de vertébrés aquatiques en contournant le biais de l'interaction entre ces molécules et la biodisponibilité des nutriments *in vitro*.

L'évaluation du risque est une application de l'écotoxicologie permettant d'apporter aux décideurs et aux gestionnaires de l'environnement les outils nécessaires pour une évaluation raisonnée et objective des risques liés à la présence d'une substance dans l'environnement (Caquet, 2012). Pour cela, la procédure standardisée consiste à calculer un quotient de risque (QR), sur la base des concentrations de la substance mesurée dans l'environnement (MEC) et des concentrations de cette substance qui sont prédites sans effets pour les organismes (PNEC) (Figure 69). Si ce QR a une valeur supérieure à 1, alors des analyses complémentaires et des mesures de réduction du risque lié à la substance concernée sont instaurées.

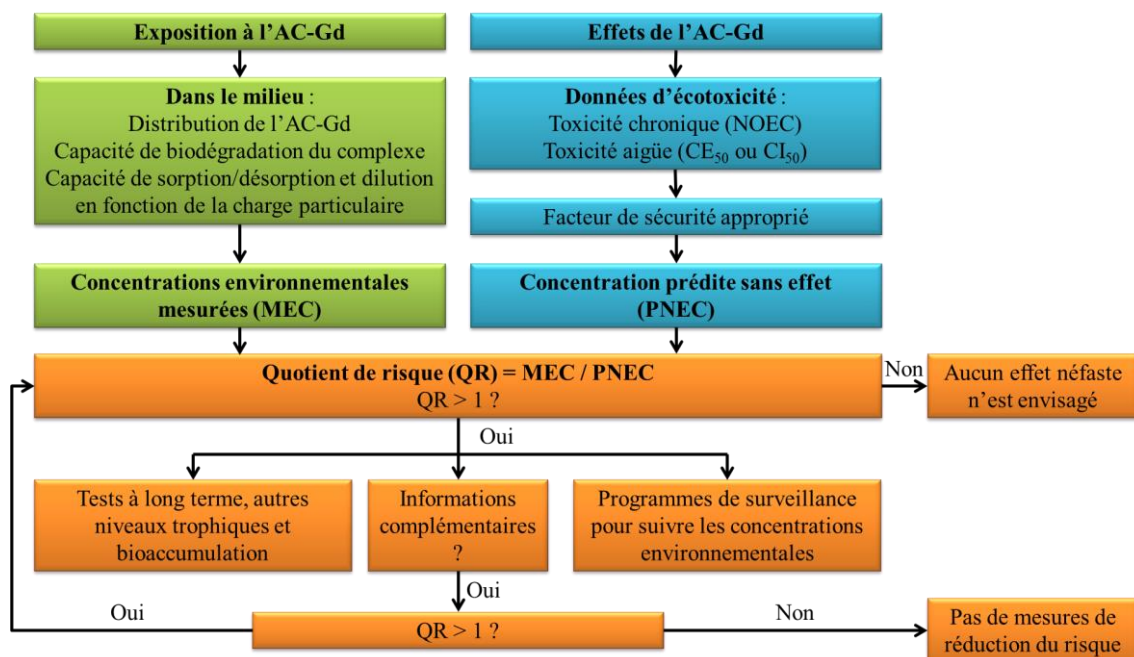


Figure 69 : Procédure d'évaluation du risque par rapport au ration entre la concentration prédite sans effet et les concentrations environnementales mesurées (Tiré de European Communities (2003))

Dans le cadre de notre étude, les observations ne permettent pas de faire évaluation du risque fiable mais ont seulement permis une approche de l'évaluation du risque. En effet, en raison du faible nombre de taxons sur lequel ce produit de contraste a été testé et compte tenu

d'une possible toxicité indirecte chez les consommateurs primaires. Les effets pourraient se répercuter sur l'ensemble des organismes consommateurs (Leflaive et Ten-Hage, 2007) et ce dès la présence du produit de contraste dans le milieu. La PNEC du Gd-DOTA (Dotarem®) a donc été estimée à partir de la valeur de NOEC la plus faible obtenue sur l'ensemble de nos résultats. La NOEC retenue pour notre évaluation du risque est la concentration d'exposition à 20 ng(Gd)/L, choisie sur la base des résultats mis en évidence chez les bivalves où la bioaccumulation du Gd-DOTA et ses effets sur la réponse d'une batterie de biomarqueurs ont été observés. En prenant un facteur de sécurité de 10, nous en avons déduit une PNEC de 2 ng(Gd)/L pour le Gd-DOTA. Pour le calcul du quotient de risque (QR), les concentrations environnementales mesurées (MEC) utilisées, correspondent aux valeurs médianes mesurées en amont et en aval de STEP en période de hautes et de basses eaux. Les valeurs médianes des MEC mesurées sur les sites secondaires, c'est-à-dire très en aval des rejets de STEP ont également été considérées au cours de ces deux périodes (Tableau 32). Quelle que soit la situation envisagée, la MEC est toujours supérieure à la PNEC et le QR >1, ce qui traduit un risque environnemental non négligeable du Gd-DOTA. Pour être complet dans l'évaluation du risque, il faut également considérer les autres AC-Gd moins stables que le Gd-DOTA (Port et al., 2008), et qui sont rejetés dans le milieu aquatique en plus du Gd-DOTA. Des informations complémentaires sur la toxicité et la bioaccumulation de ces AC-Gd sont donc nécessaires avant de statuer définitivement sur le risque imputable à ces rejets en AC-Gd dans le milieu aquatique. Il pourrait toutefois être envisagé de mettre en place des mesures de réduction de ce risque par des systèmes d'ultrafiltration permettant de retenir les AC-Gd lors du retraitement des eaux usées en STEP comme cela est déjà le cas en Australie par exemple (Lawrence et al., 2010).

Tableau 32 : Tableau de l'évaluation du risque du Gd-DOTA (Dotarem®) sur la base des concentrations prédies sans effet (PNEC) obtenues à partir des NOECs et des concentrations en Gd d'origine anthropique mesurées au cours des périodes de hautes et basses eaux en 2015.

Paramètre de calcul	PNEC ng(Gd)/L	Facteur de sécurité associé*	QR		
			STEP Amont	STEP Aval	Sites secondaires
<b>Hautes eaux 2015</b>					
Directe (NOEC la plus faible)	2	10	5,75	13,00	4,50
MEC médiane (ng(Gd)/L)	-	-	12	26	9
<b>Basses eaux 2015</b>					
Directe (NOEC la plus faible)	2	10	11,00	15,00	4,50
MEC médiane (ng(Gd)/L)	-	-	22	30	9

\* Facteur de sécurité associé obtenu à partir des données de EU (2003)

Au travers de ces essais, il a été montré que les AC-Gd ne pouvaient pas être considérés comme des composés inertes pour les organismes aquatiques. Cependant, l'ensemble des

observations paraît confirmer la faible toxicité directe des AC-Gd rejetés dans le milieu aquatique sur les individus exposés au Gd-DOTA (Dotarem®) en lien avec leur forte capacité de dépuraton et de détoxication. Par ailleurs, les résultats ont démontré une toxicité indirecte à différents niveaux d'organisation biologique, ce qui est à prendre en compte dans l'évaluation du risque et ne permet pas de conclure quant à l'innocuité environnementale de ces composés médicamenteux. Enfin, la présence des agents de contraste en mélange avec d'autres xénobiotiques nécessite une approche plus poussée en tenant compte des effets cocktails de polluants probables.





## ***Conclusions et Perspectives***

---





Ce travail de thèse s'est inscrit dans les programmes de l'ANR via le programme national Investissements d'avenir (Labex Ressources21) et du CNRS-INSU le programme EC2CO-ECODYN. Cette étude a permis de déterminer les effets de l'AC-Gd le plus stable et l'un des plus fréquemment retrouvé dans le milieu aquatique (le Gd-DOTA – Dotarem®) sur les organismes dulçaquicoles en lien avec les conditions environnementales. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles biologiques représentatifs du milieu dulçaquicole : les microalgues vertes unicellulaires (*Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata*), les microcrustacés (*Daphnia magna*), les bivalves filtreurs (*Corbicula fluminea* et *Dresseina rostriformis bugensis*) et les vertébrés aquatiques (*D. rerio*). Les effets du Gd-DOTA (Dotarem®) ont été étudiés chez ces organismes au niveau individuel à travers des mesures de croissance, de reproduction et de mortalité. Ces effets ont également été étudiés aux niveaux tissulaire et cellulaire par l'analyse de marqueurs biochimiques ciblant les réserves énergétiques, la respiration cellulaire, la détection d'espèces réactives de l'oxygène, la digestion intracellulaire, les défenses antioxydantes et les dommages tissulaires.

La première partie de ces travaux a concerné l'étude des rejets en Gd d'origine anthropique à proximité des rejets de STEP de la région Lorraine (41 [7 ; 332] ng/L en période de basses eaux et 46 [10 ; 191] ng/L en période de hautes eaux). Il a été montré que ce Gd d'origine anthropique représentait une part importante du Gd présent dans les cours d'eau surtout en période estivale (jusqu'à près de 80%), y compris à proximité des zones de captage en eau potable. Nos observations ont permis de montrer que cette part en Gd d'origine anthropique correspondait certainement aux rejets des AC-Gd, notamment à ceux en Gd-DOTA fréquemment employé au cours des examens IRM dans les centres de radiologie de la région Lorraine. L'importance de ces rejets a mis en évidence leur interaction avec les organismes dulçaquicoles.

La seconde partie concernait l'étude de l'interaction entre divers organismes du milieu aquatique et le Gd-DOTA (Dotarem®). Nous avons mis en évidence l'internalisation de cet AC-Gd dans les cellules des organismes aquatiques. Cependant, les observations laissent supposer que la taille élevée des AC-Gd (entre 500 et 1000 Da) limite le passage de ces molécules au travers de la paroi cellulosique des cellules végétales. Cette barrière physique à l'incorporation des AC-Gd présents dans le milieu environnant est absente pour les espèces animales. Les organismes animaux incorporent alors plus ces complexes dans leurs cellules sont capables de mettre en place des mécanismes d'exclusion afin de limiter, voire d'inhiber

son accumulation. Il semble que les daphnies et les poissons puissent exclure totalement le complexe de leur organisme alors que les bivalves l'accumulent. Des mécanismes d'exclusion du complexe tels que les systèmes d'exclusion des contaminants (*Mdr* ou *MXR*) ont ainsi été suggérés au sein des cellules de ces organismes, cependant, notre étude n'a pas permis de les définir. Il serait donc intéressant de les caractériser par des études génomiques et protéomiques afin de déterminer avec précision si les gènes *Mdr* sont exprimés et si des protéines de fonctionnalisation, de conjugaison (autres que la GST) et/ou de transport sont produites chez les différents organismes testés en présence de l'AC-Gd. D'autre part, chez *D. magna*, il a été suggéré que ces mécanismes d'exclusion sont soit déclenchés par les organismes à partir d'un seuil de concentration en AC-Gd dans les cellules ; soit qu'il y a une latence entre l'activation des systèmes de détoxification et leur efficacité. Il serait donc souhaitable d'étudier avec précision les mécanismes de ces systèmes d'efflux soit par voie enzymatique classique ou par des études moléculaires chez les daphnies comme cela a pu être mis en évidence par (Campos et al., 2014). Il serait alors utile de vérifier si ces systèmes d'efflux sont mis en place de la même manière pour d'autres organismes dont le génome est séquencé (par exemple les embryons de poissons zèbre ; Cunha et al., 2017), ou non (par exemple les bivalves ; Pain et Parant, 2007 ; Parant et Pain, 2001).

La troisième partie de cette étude concernait les effets liés au Gd-DOTA chez les organismes aquatiques. Les résultats ont mis en évidence que l'absence d'internalisation du complexe chez les microalgues vertes unicellulaires était liée à une absence de toxicité de l'AC-Gd pour ces communautés phytoplanctoniques. Cependant, la présence de ce produit de contraste semble induire la production de composés par ces cellules algales qui les rendent moins appétentes pour les organismes brouteurs (Daphnies). Il serait alors intéressant de poursuivre notre étude dans ce sens afin de déterminer la nature de ces complexes produits (toxines ou autres composés). Leur caractérisation permettrait alors de déterminer dans quelle mesure ces complexes peuvent réellement avoir un impact dans le milieu aquatique (dispersion ou précipitation avec des éléments du milieu naturel) et sur les consommateurs primaires. Nos résultats ont aussi mis en évidence que la toxicité du Gd-DOTA liée à l'internalisation de ce complexe chez les espèces dulçaquicoles reste faible. Cependant, ces produits de contraste gadolinés ne sont pas inertes face à certains organismes vivants (*D. magna*, *C. fluminea* et *D. r. bugensis*) présents dans le milieu aquatique naturel. Enfin, au vu de l'ensemble des observations, notre étude a permis de réaliser une approche du risque lié aux rejets au Gd-DOTA dans le milieu aquatique. Cette étude ayant été réalisée sur un nombre restreint de taxons, des informations complémentaires seraient préférables avant de se

prononcer sur le risque que représente le rejet des AC-Gd dans le milieu aquatique. De fait, des études complémentaires nécessitent d'être réalisées sur un plus grand nombre de taxons afin d'obtenir une meilleure représentativité environnementale. Ces essais pourraient être couplés à des analyses SSD (« *Species Sensitivity Distributions* »), ce qui permet de prendre en compte la variabilité biologique des communautés entraînant une réponse différente des organismes pour ces produits (Larras, 2013). D'autre part, ces produits de contraste sont rejetés dans les effluents de STEP au travers d'un cocktail de polluants, qui peuvent potentiellement interagir avec les différents AC-Gd. Il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre les différents contaminants du milieu pour déterminer si des effets synergiques avec les complexes de Gd découlent de ces mélanges de polluant.

Cette étude étant la première dans son genre, elle a soulevé de nombreuses questions qui laissent entrevoir plusieurs perspectives de recherche complémentaires dans les domaines de l'écotoxicologie afin d'évaluer plus précisément le risque environnemental lié aux rejets en AC-Gd :

- (i) D'une part, il serait intéressant d'étudier la spéciation de chacun des AC-Gd employé en IRM tout au long des cours d'eau afin de suivre l'évolution des concentrations de ces AC-Gd dans le milieu et de déterminer les taux de décomplexation par démétallation ou transmétallation de ces molécules le long des rivières. D'autre part, si ces concentrations sont amenées à augmenter dans les eaux de surface dans les années à venir en lien avec le vieillissement de la population (Tepe et al., 2014), leur toxicité pour les organismes aquatiques pourrait augmenter. Un suivi de ces produits de contraste sur plusieurs années doit donc être envisagé afin de vérifier l'accumulation de ces complexes au cours du temps et, dans le cas d'une accumulation importante, il serait nécessaire de mettre en place des mesures drastiques de contrôle de ces rejets.
- (ii) Il serait intéressant de déterminer la localisation des AC-Gd dans les cellules des organismes car les observations au cours de cette thèse ont seulement permis de mettre en évidence leur incorporation au sein des cellules, sans connaître leur localisation intracellulaire. Pour mener cette étude, des coupes histologiques des différents organismes ou la lignée cellulaire ZF4 employées pour l'exposition aux AC-Gd et leur localisation pourrait être déterminée à l'aide de la microscopie hyperspectrale.
- (iii) Au cours de cette thèse, le Gd-DOTA a été le seul AC-Gd employé pour déterminer les effets de ces produits de contraste. Cette singularité induit une

limite à notre étude puisque ce produit de contraste gadoliné n'est pas le seul à être rejeté dans le milieu aquatique. Il serait alors intéressant de compléter ce travail en étudiant l'accumulation et les effets des autres AC-Gd. Les autres AC-Gd étant moins stables que le Gd-DOTA (Port et al., 2008), il faudrait considérer le risque secondaire lié au relargage du Gd libre dans le milieu aquatique par transmétallation.





## **Références bibliographiques**

---





- A -

- Achard, M., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–357. doi:[10.1016/j.aquatox.2004.01.014](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.014)
- Aga, D.S. (Ed.), 2008. Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. CRC Press, Boca Raton.
- Aime, S., Botta, M., Terreno, E., 2005. Gd(III)-based contrast agents for MRI, *in*: *Advances in Inorganic Chemistry*. Elsevier, pp. 173–237.
- Aime, S., Caravan, P., 2009. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J. Magn. Reson. Imaging* 30, 1259–1267. doi:[10.1002/jmri.21969](https://doi.org/10.1002/jmri.21969)
- Amet, S., Deray, G., 2012. Toxicité rénale des produits de contraste chez le patient oncologique. *Bull. Cancer (Paris)* 99, 295–307. doi: [10.1684/bdc.2011.1477](https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1477)
- Angerville, R., 2009. Évaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de rejets urbains par temps de pluie (RUTP) dans les cours d'eau : application à une ville française et à une ville haïtienne. Lyon.
- Aruoja, V., 2011. Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles. Estonian University of Life Sciences.

- B -

- Bach, J.-F., Dinh-Audouin, M.-T., Colloque Chimie et Santé, au Service de l'Homme, Maison de la Chimie (Eds.), 2010. La chimie et la santé, au service de l'homme: Colloque "Chimie et Santé, au Service de l'Homme" qui s'est déroulé le 1er octobre 2008 à la Maison de la Chimie], *L'actualité chimique Livres*. EDP Sciences, Les Ulis, France.
- Bachmann, V., Cegiela, E., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., Moreteau, J.-C., 1995. Installation de l'Amphipode *Corophium curvispinum* et de la palourde asiatique *Corbicula sp.* dans la partie française de la Moselle. *Hydroécologie Appliquée* 7, 185–190. doi:[10.1051/hydro:1995010](https://doi.org/10.1051/hydro:1995010)
- Badger, D.A., Kuester, R.K., Sauer, J.M., Sipes, I.G., 1997. Gadolinium chloride reduces cytochrome P450: relevance to chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 121, 143–53. doi: [10.1016/S0300-483X\(97\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00065-6)
- Barber, L.B., Loyo-Rosales, J.E., Rice, C.P., Minarik, T.A., Oskouie, A.K., 2015. Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. *Sci. Total Environ.* 517, 195–206. doi:[10.1016/j.scitotenv.2015.02.035](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.035)
- Bartolini, M.E., Pekar, J., Chettle, D.R., McNeill, F., Scott, A., Sykes, J., Prato, F.S., Moran, G.R., 2003. An investigation of the toxicity of gadolinium based MRI contrast agents using neutron activation analysis. *Magn Reson Imaging* 21, 541–4. doi: [10.1016/S0730-725X\(03\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(03)00081-X)
- Bau, M., Dulski, P., 1996. Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth Planet. Sci. Lett.* 143, 245–255. doi:[10.1016/0012-821X\(96\)00127-6](https://doi.org/10.1016/0012-821X(96)00127-6)

- Bau, M., Knappe, A., Dulski, P., 2006. Anthropogenic gadolinium as a micropollutant in river waters in Pennsylvania and in Lake Erie, northeastern United States. *Chem. Erde - Geochem.* 66, 143–152. doi:[10.1016/j.chemer.2006.01.002](https://doi.org/10.1016/j.chemer.2006.01.002)
- Bellin, M.F., Van Der Molen, A.J., 2008. Extracellular gadolinium-based contrast media: an overview. *Eur J Radiol* 66, 160–7. doi: [10.1016/j.ejrad.2008.01.023](https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.01.023)
- Bendakovská, L., Krejčová, A., Černohorský, T., Zelenková, J., 2016. Development of ICP-MS and ICP-OES methods for determination of gadolinium in samples related to hospital waste water treatment. *Chem. Pap.* 70. doi:[10.1515/chempap-2016-0057](https://doi.org/10.1515/chempap-2016-0057)
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Series B: Methodological*, 289–300. doi:[10.2307/2346101](https://doi.org/10.2307/2346101)
- Bergey, L.L., Weis, J.S., 2007. Molting as a mechanism of depuration of metals in the fiddler crab, *Uca pugnax*. *Mar. Environ. Res.* 64, 556–562. doi:[10.1016/j.marenvres.2007.04.009](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.04.009)
- Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), 2015. *Marine Anthropogenic Litter*. Springer International Publishing, Cham.
- 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*. *Ecol. Indic.* 74, 334–342. doi:[10.1016/j.ecolind.2016.11.029](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.11.029)
- Bigot, A., 2009. Identification et étude de l'expression de gènes de détoxification chez les bivalves d'eau douce *Unio tumidus* et *Corbicula fluminea*: Approches en laboratoire et en milieu naturel. Université Paul Verlaine de Metz, Metz (France).
- Bilos, C., Colombo, J.C., Presa, M.J., 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Pollut.* 99, 1–11. doi:[10.1016/S0269-7491\(97\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00177-2)
- Birka, M., Roscher, J., Holtkamp, M., Sperling, M., Karst, U., 2016<sup>a</sup>. Investigating the stability of gadolinium based contrast agents towards UV radiation. *Water Res.* 91, 244–250. doi:[10.1016/j.watres.2016.01.012](https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.012)
- Birka, M., Wehe, C.A., Hachmöller, O., Sperling, M., Karst, U., 2016<sup>b</sup>. Tracing gadolinium-based contrast agents from surface water to drinking water by means of speciation analysis. *J. Chromatogr. A* 1440, 105–111. doi:[10.1016/j.chroma.2016.02.050](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.050)
- Birka, M., Wehe, C.A., Telgmann, L., Sperling, M., Karst, U., 2013. Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1308, 125–131. doi:[10.1016/j.chroma.2013.08.017](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.017)
- Boillot, C., 2008. Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets ». Lyon.
- Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., Geret, F., 2015. Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 11033–11046. doi:[10.1007/s11356-015-4309-x](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4309-x)

- Bonnet, C., 2006. Complexation des cations lanthanides trivalents par des ligands d'origine biologique pour l'IRM : Structure, thermodynamique et méthodes. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, Grenoble.
- Bopp, S.K., Minuzzo, M., Lettieri, T., 2006. The Zebrafish (*Danio rerio*): an Emerging Model Organism in the Environmental Field (N° EUR 22598 EN). Institute for Environment and Sustainability.
- Boulay, A., 2013. Sondes hétérobimétaboliques pour l'Imagerie bimodale. Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse.
- Bourrachot, S., 2009. Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (*D. rerio*). Impact sur les stades de vie. Université d'Aix-Marseille 1 - Université de Provence, Aix-Marseille.
- Brooks, M.H., Barry, K.G., 1974. Removal of Iodinated Contrast Material by Peritoneal Dialysis. *Nephron* 12, 10–14. doi:[10.1159/000180251](https://doi.org/10.1159/000180251)
- Brown, G.V., 1976. Magnetic heat pumping near room temperature. *J. Appl. Phys.* 47, 3673–3680. doi:[10.1063/1.323176](https://doi.org/10.1063/1.323176)
- Brücher, E., 2002. Kinetic Stabilities of Gadolinium(III) Chelates Used as MRI Contrast Agents, in: Krause, W. (Ed.), *Contrast Agents I, Topics in Current Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 103–122.
- Bryan, G.W., Langston, W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76, 89–131. doi:[10.1016/0269-7491\(92\)90099-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90099-V)

- 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 Gd<sup>3+</sup> ions. *Contrast Media Mol Imaging* 1, 23–9. doi:[10.1002/cmml.88](https://doi.org/10.1002/cmml.88)
- Campos, B., Altenburger, R., Gómez, C., Lacorte, S., Piña, B., Barata, C., Luckenbach, T., 2014. First evidence for toxic defense based on the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 148, 139–151. doi:[10.1016/j.aquatox.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.001)
- Caquet, T., 2012. Evaluation des risques et écotoxicologie : le cas des pesticides. *Innov. Agron.* INRA 23, 29–54.
- Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., Lauffer, R.B., 1999. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* 99, 2293–2352. doi:[10.1021/cr980440x](https://doi.org/10.1021/cr980440x)
- Castor, S.B., Hedrick, J.B., 2006. Rare Earth Elements, in: *Industrial Mineral and Rocks*. Jessica Elzea Kogel, Nikhil C. Trivedi and James M. Barker., pp. 769–792.
- Cataldo, D., Colombo, J.C., Boltovskoy, D., Bilos, C., Landoni, P., 2001. Environmental toxicity assessment in the Paraná river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environ. Pollut.* 112, 379–389. doi:[10.1016/S0269-7491\(00\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00145-7)

- Cauzzi, N., 2007. Evaluation de l'éco-compatibilité des sédiments contaminée, traités et non-traités par un procédé physicochimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- CCLA, 2013. Culture collection of Autotrophic Organisms.
- Cheng, K.T., 2004<sup>a</sup>. Gadoversetamide Gd-DTPA-BMEA, *in*: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Cheng, K.T., 2004<sup>b</sup>. Gadobutrol, *in*: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Chèvre, N., 2000. Etude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Lausanne, EPFL.
- Chiou, C.T., 2002. Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- Chong, I.-G., Jun, C.-H., 2005. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 78, 103–112. doi:[10.1016/j.chemolab.2004.12.011](https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011)
- Chuburu, F., 2014. Réunion EC2CO du Comité de pilotage de la thèse d'Emilie PERRAT.
- Clement-Larosière, B., 2012. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO<sub>2</sub>. Ecole centrale, Paris.
- Colombo, J.C., Bilos, C., Campanaro, M., Rodriguez Presa, M.J., Catoggio, J.A., 1995. Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Chlorinated Pesticides by the Asiatic Clam *Corbicula fluminea*; Its Use as Sentinel Organism in the Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 29, 914–927. doi:[10.1021/es00004a011](https://doi.org/10.1021/es00004a011)
- Conseil canadien de protection des animaux, 2005. Lignes directrices sur le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests. Conseil canadien de protection des animaux, Ottawa.
- Corot, C., Idee, J.M., Hentsch, A.M., Santus, R., Mallet, C., Goulas, V., Bonnemain, B., Meyer, D., 1998. Structure-activity relationship of macrocyclic and linear gadolinium chelates: investigation of transmetallation effect on the zinc-dependent metallopeptidase angiotensin-converting enzyme. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 8, 695–702. doi:[10.1002/jmri.1880080328](https://doi.org/10.1002/jmri.1880080328)
- Courant, T., 2011. Nanoparticules incorporant des complexes inorganiques à visée diagnostique. Université Reims Champagne-Ardenne, Reims.
- Cowper, S.E., Kuo, P.H., Bucala, R., 2007. Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium exposure: association and lessons for idiopathic fibrosing disorders. *Arthritis Rheum.* 2007 Oct;56(10):3173-5. doi: [10.1002/art.22926](https://doi.org/10.1002/art.22926)
- Cowper, S.E., Robin, H.S., Steinberg, S.M., Su, L.D., Gupta, S., LeBoit, P.E., 2000. Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients. *The Lancet* 356, 1000–1001. doi:[10.1016/S0140-6736\(00\)02694-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02694-5)
- Crespo, D., Leston, S., Martinho, F., Pardal, M.A., Dolbeth, M., 2017. Survival of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in a natural salinity and temperature gradient: a field experiment in a temperate estuary. *Hydrobiologia* 784, 337–347. doi:[10.1007/s10750-016-2887-3](https://doi.org/10.1007/s10750-016-2887-3)

- Cribb, B.W., Rathmell, A., Charters, R., Rasch, R., Huang, H., Tibbetts, I.R., 2009. Structure, composition and properties of naturally occurring non-calcified crustacean cuticle. *Arthropod Struct. Dev.* 38, 173–178. doi:[10.1016/j.asd.2008.11.002](https://doi.org/10.1016/j.asd.2008.11.002)
- Cullers, R.L., 1994. The chemical signature of source rocks in size fractions of Holocene stream sediment derived from metamorphic rocks in the Wet Mountains region, Colorado, U.S.A. *Chem. Geol.* 113, 327–343. doi:[10.1016/0009-2541\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0009-2541(94)90074-4)
- Cunha, V., Burkhardt-Medicke, K., Wellner, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Luckenbach, T., Ferreira, M., 2017. Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 136, 14–23. doi:[10.1016/j.ecoenv.2016.10.022](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.022)

## - D -

- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Bedner, E., 2001. Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry, *in*: Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J., Yamada, K.M. (Eds.), *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- de Saint Pol, T., 2007. L'obésité en France : les écarts entre catégories sociales s'accroissent. INSEE 4.
- Dillman, J.R., Ellis, J.H., Cohan, R.H., Strouse, P.J., Jan, S.C., 2007. Frequency and Severity of Acute Allergic-Like Reactions to Gadolinium-Containing IV Contrast Media in Children and Adults. *Am. J. Roentgenol.* 189, 1533–1538. doi:[10.2214/AJR.07.2554](https://doi.org/10.2214/AJR.07.2554)
- Doherty, F.G., Failla, M.L., S. Cherry, D., 1987. Identification of a metallothionein-like, heavy metal binding protein in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 87, 113–120. doi:[10.1016/0742-8413\(87\)90191-5](https://doi.org/10.1016/0742-8413(87)90191-5)
- 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.

## - E -

- Ebert, D., National Center for Biotechnology Information (U.S.), 2005. Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
- Edward, M., Quinn, J.A., Burden, A.D., Newton, B.B., Jardine, A.G., 2010. Effect of different classes of gadolinium-based contrast agents on control and nephrogenic systemic fibrosis-derived fibroblast proliferation. *Radiology* 256 (3), 735–43. doi: [10.1148/radiol.10091131](https://doi.org/10.1148/radiol.10091131)
- Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.L., Othoniel, C., 2002. Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of southern France. *Water Res* 36, 1102–5. doi:[10.1016/S0043-1354\(01\)00370-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00370-0)
- EN ISO 10304-1, 2009. Qualité de l'eau - Dosage des anions dissous par chromatographie des ions en phase liquide - Partie 1 : dosage du bromure, chlorure, fluorure, nitrate, nitrite, phosphate et sulfate.

- Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., Wikström, C., 2013. Multi- and megavariable data analysis - Basic principles and applications, third revised edition. ed, Multi- and megavariable data analysis. Umetrics, Umeå.
- Ersoy, H., Rybicki, F.J., 2007. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J. Magn. Reson. Imaging* 26, 1190–1197. doi:[10.1002/jmri.21135](https://doi.org/10.1002/jmri.21135)
- ESUR, 2014. Contrast Media Safety Committee, ESUR Guidelines on Contrast Media 9.0. ESUR Office, Vienna.
- EU, 2003. Technical Guidance Document (TGD) on Risk Assessment — Part II, in support of commission directive 96/67/EEC on risk assessment for new notified substances, commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Institute for Health and Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre.
- European Communities, 2003. Technical guidance document on risk assessment Part II.
- European Medicines Agency, 2017. PRAC concludes assessment of gadolinium agents used in body scans and recommends regulatory actions, including suspension for some marketing authorisations - Review finds evidence of gadolinium deposits in the brain after MRI body scans but no signs of harm (N° 157486), Media and Public Relations. European Medicines Agency.
- Evans, C.H., 2013. Biochemistry of the lanthanides, *Biochemistry of the elements*. Plenum Press, New York, NY.
- Evans, L., Murphy, C., Britton, J., Newland, L., 1977. Salinity relationships in *Corbicula fluminea* (Müller). *Proc. First Int. Corbicula Symp.* 193–214.

## - F -

- Feyerabend, F., Fischer, J., Holtz, J., Witte, F., Willumeit, R., Drucker, 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 Biomater* 6, 1834–42. doi:[10.1016/j.actbio.2009.09.024](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.024)
- Fretellier, N., 2013. Rôle des complexes de gadolinium dans le mécanisme de la fibrose systémique néphrogénique. Université Paris V - René Descartes.

## - G -

- Galera, C., Ozygit, L.P., Demoly, P., 2010. Anaphylaxie aux produits de contraste gadolines. *Rev. Fr. Allergol.* 50, 556–562. doi:[10.1016/j.reval.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.09.002)
- Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B.H., Epel, D.D., 1996. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 325–331. doi:[10.1002/etc.5620150316](https://doi.org/10.1002/etc.5620150316)

- Gambogi, J., 2015. Rare earths, *in*: Mineral Commodity Summaries, 2015. Geological Survey (USGS), [s.l.], pp. 128–129.
- Garaud, M., 2015. Effets des nanoparticules manufacturées (nCeO<sub>2</sub> et nAg) sur la biologie du bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Université de Lorraine. Metz
- Garric, J., Férard, J.-F., Vindimian, E., 1993. Essais biologiques pour l'évaluation de la toxicité chronique des rejets, Étude inter-agences (Antony, France). Hors série. Cemagref, Lyon.
- Gill, D.S., Anderson, A.A., Eason, R.W., Warburton, T.J., Shepherd, D.P., 1996. Laser operation of an Nd:Gd<sub>3</sub>Ga<sub>5</sub>O<sub>12</sub> thin-film optical waveguide fabricated by pulsed laser deposition. *Appl. Phys. Lett.* 69, 10. doi:[10.1063/1.118091](https://doi.org/10.1063/1.118091)
- Gobas, F.A., Burkhard, L.P., Doucette, W.J., Sappington, K.G., Verbruggen, E.M., Hope, B.K., Bonnell, M.A., Arnot, J.A., Tarazona, J.V., 2016. Review of existing terrestrial bioaccumulation models and terrestrial bioaccumulation modeling needs for organic chemicals: Terrestrial Bioaccumulation Models. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 12, 123–134. doi:[10.1002/ieam.1690](https://doi.org/10.1002/ieam.1690)
- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahn, M.E., Stegeman, J.J., 2006. The chemical defensesome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev. Biol.* 300, 366–384. doi:[10.1016/j.ydbio.2006.08.066](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.066)
- 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. *Environ. Pollut.* 199, 139–147. doi:[10.1016/j.envpol.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.020)
- Goonan, T.G., Survey, G., 2011. Rare Earth Elements - End Use and Recyclability. U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.
- Grawunder, A., Merten, D., 2012. Rare Earth Elements in Acidic Systems – Biotic and Abiotic Impacts, *in*: Kothe, E., Varma, A. (Eds.), *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 81–97.
- Grobner, T., 2005. Gadolinium - a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 1104–1108. doi:[10.1093/ndt/gfk062](https://doi.org/10.1093/ndt/gfk062)
- Gupta, C.K., Krishnamurthy, N., 2005. Extractive metallurgy of rare earths. CRC Press, Boca Raton, Fla.

## - H -

- Hao, D., Ai, T., Goerner, F., Hu, X., Runge, V.M., Tweedle, M., 2012. MRI contrast agents: Basic chemistry and safety. *J. Magn. Reson. Imaging* 36, 1060–1071. doi:[10.1002/jmri.23725](https://doi.org/10.1002/jmri.23725)
- Hardonk, M.J., Dijkhuis, F.W., Hulstaert, C.E., Koudstaal, J., 1992. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J. Leukoc. Biol.* 52, 296–302.
- Harrington, D.P., Fleming, T.R., 1982. A class of rank test procedures for censored survival data. *Biometrika* 69, 553–566. doi: [10.2307/2335991](https://doi.org/10.2307/2335991)



- 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. doi:[10.1021/acs.est.5b04322](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04322)
- Heinrich, M.C., Kuhlmann, M.K., Kohlbacher, S., Scheer, M., Grgic, A., Heckmann, M.B., Uder, M., 2007. Cytotoxicity of Iodinated and Gadolinium-based Contrast Agents in Renal Tubular Cells at Angiographic Concentrations: In Vitro Study. *Radiology* 242, 425–434. doi:[10.1148/radiol.2422060245](https://doi.org/10.1148/radiol.2422060245)
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 213–238. doi:[10.1016/j.ecoenv.2015.09.033](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.033)
- Holzbecher, E., Knappe, A., Pekdeger, A., 2005. Identification of degradation characteristics – exemplified by Gd–DTPA in a large experimental column. *Environ. Model. Assess.* 10, 1–8. doi:[10.1007/s10666-004-4269-x](https://doi.org/10.1007/s10666-004-4269-x)

- I -

- Idée, J.-M., Fretellier, N., Thurnher, M.M., Bonnemain, B., Corot, C., 2015. Physico-chimie et profil toxicologique d'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, les chélates de gadolinium. *Ann. Pharm. Fr.* 73, 266–276. doi:[10.1016/j.pharma.2015.01.001](https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.01.001)
- Idee, J.M., Port, M., Medina, C., Lancelot, E., Fayoux, E., Ballet, S., Corot, C., 2008. Possible involvement of gadolinium chelates in the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis: a critical review. *Toxicology* 248, 77–88. doi: [10.1016/j.tox.2008.03.012](https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.03.012)
- Idée, J.-M., Port, M., Raynal, I., Schaefer, M., Le Greneur, S., Corot, C., 2006. Clinical and biological consequences of transmetallation induced by contrast agents for magnetic resonance imaging: a review. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20, 563–576. doi:[10.1111/j.1472-8206.2006.00447.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2006.00447.x)
- Idee, J.M., Port, M., Robic, C., Medina, C., Sabatou, M., Corot, C., 2009. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *J Magn Reson Imaging* 30, 1249–58. doi: [10.1002/jmri.21967](https://doi.org/10.1002/jmri.21967)
- Iimuro, Y., Yamamoto, M., Kohno, H., Itakura, J., Fujii, H., Matsumoto, Y., 1994. Blockade of liver macrophages by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats--analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 55, 723–728.
- ISO 6341, 2012. Qualité de l'eau -- Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë.
- ISO 8692, 2012. Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.
- ISO 17294-2:2016. Qualité de l'eau -- Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) -- Partie 2: Dosage des éléments sélectionnés y compris les isotopes d'uranium.

- J -

- Jiachen, W., Xiangsheng, L., Jun, Y., He, Z., Ying, L., Yubin, F., Yanping, W., Xuewei, H., 2006. Development and Prospect of Rare Earth Functional Biomaterials for Agriculture in China. *J. Rare Earths* 24, 427–431. doi:[10.1016/S1002-0721\(07\)60419-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(07)60419-0)
- Johannesson, K.H., Stetzenbach, K.J., Hodge, V.F., Berry Lyons, W., 1996. Rare earth element complexation behavior in circumneutral pH groundwaters: Assessing the role of carbonate and phosphate ions. *Earth Planet. Sci. Lett.* 139, 305–319. doi:[10.1016/0012-821X\(96\)00016-7](https://doi.org/10.1016/0012-821X(96)00016-7)
- Johannesson, K.H., Zhou, X., Guo, C., Stetzenbach, K.J., Hodge, V.F., 2000. Origin of rare earth element signatures in groundwaters of circumneutral pH from southern Nevada and eastern California, USA. *Chem. Geol.* 164, 239–257. doi:[10.1016/S0009-2541\(99\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(99)00152-7)
- Johns, C., Timmerman, B.E., 1998. Total Cadmium, Copper, and Zinc in Two Dreissenid Mussels, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, at the Outflow of Lake Ontario. *J. Gt. Lakes Res.* 24, 55–64. doi:[10.1016/S0380-1330\(98\)70799-3](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(98)70799-3)

- K -

- Kanda, T., Fukusato, T., Matsuda, M., Toyoda, K., Oba, H., Kotoku, J., Haruyama, T., Kitajima, K., Furui, S., 2015. Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology* 276, 228–232. doi:[10.1148/radiol.2015142690](https://doi.org/10.1148/radiol.2015142690)
- Karimi, S., Hunter, G., Moriggi, L., Platas-Iglesias, C., Helm, L., 2016. Complexation of [Gd(DTTA–Me)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] by Fluoride and Its Consequences to Water Exchange. *Inorg. Chem.* 55, 6231–6239. doi:[10.1021/acs.inorgchem.6b00861](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00861)
- Keppler, C., Ringwood, A.H., 2001. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. *Aquat. Toxicol.* 54, 195–204. doi:[10.1016/S0166-445X\(01\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00151-5)
- Keteles, K.A., Fleeger, J.W., 2001. The Contribution of Ecdysis to the Fate of Copper, Zinc and Cadmium in Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio* Holthius. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 1397–1402. doi:[10.1016/S0025-326X\(01\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00172-2)
- Knappe, A., Möller, P., Dulski, P., Pekdeger, A., 2005. Positive gadolinium anomaly in surface water and ground water of the urban area Berlin, Germany. *Chem. Erde - Geochem.* 65, 167–189. doi:[10.1016/j.chemer.2004.08.004](https://doi.org/10.1016/j.chemer.2004.08.004)
- Krause, W. (Ed.), 2002. Magnetic resonance imaging, Contrast agents. Springer, Berlin.
- Kubota, Y., Takahashi, S., Takahashi, I., Patrick, G., 2000. Different cytotoxic response to gadolinium between mouse and rat alveolar macrophages. *Toxicol Vitro* 14, 309–19. doi:[10.1016/S0887-2333\(00\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00027-8)
- 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 Planet. Sci. Lett.* 362, 43–50. doi:[10.1016/j.epsl.2012.11.033](https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.11.033)

- Kulaksız, S., Bau, M., 2011<sup>a</sup>. Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities. *Appl. Geochem.* 26, 1877–1885. doi:[10.1016/j.apgeochem.2011.06.011](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.06.011)
- Kulaksız, S., Bau, M., 2011<sup>b</sup>. Rare earth elements in the Rhine River, Germany: First case of anthropogenic lanthanum as a dissolved microcontaminant in the hydrosphere. *Environ. Int.* 37, 973–979. doi:[10.1016/j.envint.2011.02.018](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 Planet. Sci. Lett.* 260, 361–371. doi:[10.1016/j.epsl.2007.06.016](https://doi.org/10.1016/j.epsl.2007.06.016)
- Kumar, K., Sukumaran, K., Taylor, S., Chang, C.A., Nunn, A.D., Tweedle, M.F., 1994. Partition Coefficients (log P) and HPLC Capacity Factors (k') of Some Gd(III) Complexes of Linear and Macrocyclic Polyamino Carboxylates. *J. Liq. Chromatogr.* 17, 3735–3746. doi:[10.1080/10826079408013989](https://doi.org/10.1080/10826079408013989)
- Kümmerer, K. (Ed.), 2008. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects, and risks*, 3rd ed. ed. Springer, Berlin.
- Kümmerer, K., Helters, E., 2000. Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment. *Env. Sci Technol* 34, 573–577. doi:[10.1021/es990633h](https://doi.org/10.1021/es990633h)
- Künemeyer, J., Terborg, L., Meermann, B., Brauckmann, C., Möller, I., Scheffer, A., Karst, U., 2009. Response to Comment on “Speciation Analysis of Gadolinium Chelates in Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant Sewage by a Novel HILIC/ICP-MS Method.” *Environ. Sci. Technol.* 43, 5549–5550. doi:[10.1021/es901550c](https://doi.org/10.1021/es901550c)
- Künemeyer, J., Terborg, L., Nowak, S., Brauckmann, C., Telgmann, L., Albert, A., Tokmak, F., Kramer, B.K., Günsel, A., Wiesmuller, G.A., Karst, U., 2009. Quantification and excretion kinetics of a magnetic resonance imaging contrast agent by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 30, 1766–73. doi: [10.1002/elps.200800831](https://doi.org/10.1002/elps.200800831)

## - L -

- Lansman, J.B., 1990. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. *J. Gen. Physiol.* 95, 679–696. doi:[10.1085/jgp.95.4.679](https://doi.org/10.1085/jgp.95.4.679)
- Larras, F., 2013. L’approche de modélisation SSD (Species Sensitivity Distributions) appliquée à l’évaluation du risque des herbicides pour les diatomées benthiques : éléments d’amélioration et pertinence écologique. Université de Grenoble, Grenoble.
- Laurent, S., Vander Elst, L., Henoumont, C., Muller, R.N., 2010. How to measure the transmetallation of a gadolinium complex. *Contrast Media Mol Imaging* 5, 305–8. doi:[10.1002/cmml.388](https://doi.org/10.1002/cmml.388)
- Laveuf, C., Cornu, S., 2009. A review on the potentiality of Rare Earth Elements to trace pedogenetic processes. *Geoderma* 154, 1–12. doi:[10.1016/j.geoderma.2009.10.002](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.10.002)
- Lawrence, M.G., 2010. Detection of anthropogenic gadolinium in the Brisbane River plume in Moreton Bay, Queensland, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 1113–1116. doi:[10.1016/j.marpolbul.2010.03.027](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.027)

- Lawrence, M.G., Bariel, D.G., 2010. Tracing treated wastewater in an inland catchment using anthropogenic gadolinium. *Chemosphere* 80, 794–799. doi:[10.1016/j.chemosphere.2010.05.001](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.001)
- Lawrence, M.G., Keller, J., Poussade, Y., 2010. Removal of magnetic resonance imaging contrast agents through advanced water treatment plants. *Water Sci. Technol.* 61, 685. doi:[10.2166/wst.2010.885](https://doi.org/10.2166/wst.2010.885)
- Lawrence, M.G., Ort, C., Keller, J., 2009. Detection of anthropogenic gadolinium in treated wastewater in South East Queensland, Australia. *Water Res.* 43, 3534–3540. doi:[10.1016/j.watres.2009.04.033](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.033)
- LeBoit, P.E., 2003. What Nephrogenic Fibrosing Dermopathy Might Be. *Arch. Dermatol.* 139. doi:[10.1001/archderm.139.7.928](https://doi.org/10.1001/archderm.139.7.928)
- Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52, 199–214. doi:[10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x)
- Lide, D.R., Chemical Rubber Company (Eds.), 2009. CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data, 90. ed., 2009-2010. ed. CRC Press, Boca Raton, FLA.
- Lindner, U., Lingott, J., Richter, S., Jakubowski, N., Panne, U., 2013. Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 1865–73. doi:[10.1007/s00216-012-6643-x](https://doi.org/10.1007/s00216-012-6643-x)
- Lindner, U., Lingott, J., Richter, S., Jiang, W., Jakubowski, N., Panne, U., 2015. Analysis of Gadolinium-based contrast agents in tap water with a new hydrophilic interaction chromatography (ZIC-chILIC) hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2415–2422. doi:[10.1007/s00216-014-8368-5](https://doi.org/10.1007/s00216-014-8368-5)
- Lingott, J., Lindner, U., Telgmann, L., Esteban-Fernández, D., Jakubowski, N., Panne, U., 2016. Gadolinium-uptake by aquatic and terrestrial organisms-distribution determined by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Env. Sci Process. Impacts* 18, 200–207. doi:[10.1039/C5EM00533G](https://doi.org/10.1039/C5EM00533G)
- Liu, T.K., Liu, S.H., Chang, C.H., Yang, R.S., 1998. Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty. *Tohoku J. Exp. Med.* 185, 253–262. doi: [10.1620/tjem.185.253](https://doi.org/10.1620/tjem.185.253)

## - M -

- Ma, J., Lin, F., Zhang, R., Yu, W., Lu, N., 2004. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*, to 14 pesticide adjuvants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 61–67. doi:[10.1016/j.ecoenv.2003.08.023](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.023)
- Manar, R., 2008. Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés cladocères *Daphnia sp.* dans une perspective d'évaluation des risques. Université de Lorraine, Metz.
- Marckmann, P., Skov, L., Rossen, K., Thomsen, H.S., 2008. Clinical manifestation of gadodiamide-related nephrogenic systemic fibrosis. *Clin. Nephrol.* 69, 161–168. doi:[10.5414/CNP69161](https://doi.org/10.5414/CNP69161)

- Marescaux, J., bij de Vaate, A., Van Doninck, K., 2012. First records of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Meuse River. *BioInvasions Rec.* 1, 109–114. doi:[10.3391/bir.2012.1.2.05](https://doi.org/10.3391/bir.2012.1.2.05)
- Marescaux, J., Falisse, E., Lorquet, J., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., Descy, J.-P., 2016. Assessing filtration rates of exotic bivalves: dependence on algae concentration and seasonal factors. *Hydrobiologia* 777, 67–78. doi:[10.1007/s10750-016-2764-0](https://doi.org/10.1007/s10750-016-2764-0)
- Martinez-Outschoorn, U.E., Trimmer, C., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Zhou, J., Wang, C., Pavlides, S., Martinez-Cantarín, M.P., Capozza, F., Witkiewicz, A.K., Flomenberg, N., Howell, A., Pestell, R.G., Caro, J., Lisanti, M.P., Sotgia, F., 2010. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle* 9, 3515–3533. doi:[10.4161/cc.9.17.12928](https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12928)
- Mason, R.P., 2013. Trace metals in aquatic systems. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., Verdoucq, L., 2015. Aquaporins in Plants. *Physiol. Rev.* 95, 1321–1358. doi:[10.1152/physrev.00008.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015)
- McDonald, R.J., McDonald, J.S., Kallmes, D.F., Jentoft, M.E., Murray, D.L., Thielen, K.R., Williamson, E.E., Eckel, L.J., 2015. Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging. *Radiology* 275, 772–782. doi:[10.1148/radiol.15150025](https://doi.org/10.1148/radiol.15150025)
- Merbach, A.E., Helm, L., Tóth, É. (Eds.), 2013. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, Second edition. ed. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- 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. *Sci. Total Environ.* 533, 91–101. doi:[10.1016/j.scitotenv.2015.06.042](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.042)
- Migaszewski, Z.M., Gałuszka, A., 2016. The use of gadolinium and europium concentrations as contaminant tracers in the Nida River watershed in south-central Poland. *Geol. Q.* 60. doi:[10.7306/gq.1241](https://doi.org/10.7306/gq.1241)
- Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 50, 167–176. doi:[10.1016/S0166-445X\(99\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00104-6)
- Miramand, P., Bentley, D., 1992. Concentrations and distributions of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis* from the French coast of the English Channel. *Mar. Biol.* 114, 407–414. doi: [10.1007/BF00350031](https://doi.org/10.1007/BF00350031)
- Möller, P., Dulski, P., Bau, M., Knappe, A., Pekdeger, A., Sommer-von Jarmersted, C., 2000. Anthropogenic gadolinium as a conservative tracer in hydrology. *J. Geochem. Explor.* 69–70, 409–414. doi:[10.1016/S0375-6742\(00\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(00)00083-2)
- 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. doi:[10.1021/es010235q](https://doi.org/10.1021/es010235q)
- Morcos, S.K., 2007. Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition? *Br J Radiol* 80, 73–6. doi: [10.1259/bjr/17111243](https://doi.org/10.1259/bjr/17111243)
- Murata, N., Gonzalez-Cuyar, L.F., Murata, K., Fligner, C., Dills, R., Hippe, D., Maravilla, K.R., 2016. Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels

of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results From 9 Patients With Normal Renal Function. *Invest. Radiol.* 51, 447–453. doi:[10.1097/RLI.0000000000000252](https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000252)

- N -

- Nadler, S.B., Hidalgo, J.H., Bloch, T., 1962. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 51, 224–232.
- Naessens-Perez, M., 1998. Contribution à l'écotoxicologie analytique par des cellules végétales, applications en microscopie et à la réalisation de biocapteurs. Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint Etienne.
- Nagasawa, H., 2012. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci. Elite Ed.* 4, 711–720. doi: [10.2741/E412](https://doi.org/10.2741/E412)
- Neubert, C., 2008. Umweltverhalten und Ökotoxikologie von gadoliniumhaltigen Magnetresonanztomographie-Kontrastmitteln. doi:[10.14279/depositonce-1924](https://doi.org/10.14279/depositonce-1924)
- NF EN 1484, 1997. Analyse de l'eau - Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD).
- NF EN 1899-1, 1998. Qualité de l'eau - Détermination de la demande biochimique en oxygène après n jours (DBOn) - Partie 1 : méthode par dilution et ensemencement avec apport d'allylthio-urée.
- NF EN ISO 6341, 2012. Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë.
- NF EN ISO 7346-1, 1998. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)) - Partie 1 : méthode statique.
- NF EN ISO 7346-2, 1998. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)) - Partie 2 : méthode semi-statique.
- NF EN ISO 7346-3, 1998. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)) - Partie 3 : méthode avec renouvellement continu.
- NF EN ISO 8692, 2012. Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.
- NF EN ISO 9963-1, 1996. Qualité de l'eau - Détermination de l'alcalinité - Partie 1 : détermination de l'alcalinité totale et composite.
- NF T 90-101, 2001. Qualité de l'eau - Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO).
- Nicolas, J., 1974. Les ferrites pour hyperfréquences. *Rev. Phys. Appliquée* 9, 847–858. doi:[10.1051/rphysap:0197400905084700](https://doi.org/10.1051/rphysap:0197400905084700)
- Nielsen, S.L., Banta, G.T., Pedersen, M.F. (Eds.), 2004. Estuarine nutrient cycling: the influence of primary producers: the fate of nutrients and biomass, Aquatic ecology series. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston.

Nixdorf, B., Mischke, U., Leßmann, D., 1998. Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH<3) in Lusatia (Germany). *Hydrobiologia* 369, 315–327. doi:[10.1023/A:1017010229136](https://doi.org/10.1023/A:1017010229136)

- O -

- OCDE, 2012<sup>a</sup>. Essai n° 211: *Daphnia magna*, essai de reproduction. OECD Publishing, Paris.
- OCDE, 2012<sup>b</sup>. Essai n° 305 : Bioaccumulation chez le poisson : exposition via le milieu aquatique et via la voie alimentaire, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 3. Éditions OCDE.
- OCDE, 2009<sup>a</sup>. Essai n° 229 : Essai à court terme de reproduction des poissons, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Éditions OCDE.
- OCDE, 2009<sup>b</sup>. Essai n° 230 : Essai de 21 jours sur les poissons, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Éditions OCDE.
- OCDE, 2006. Essai n° 201: Algues, Essai d'inhibition de la croissance, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2 : Effets sur les systèmes biologiques. Éditions OCDE.
- OCDE, 2004. Essai n° 202: *Daphnia sp.*, essai d'immobilisation immédiate, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Éditions OCDE.
- OCDE, 1998. Essai n° 212: Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin. OECD Publishing, Paris.
- OCDE, 1992<sup>a</sup>. Essai n° 210: Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2. Éditions OCDE.
- OCDE, 1992<sup>b</sup>. Essai n° 203: Poisson, essai de toxicité aiguë. OECD Publishing, Paris.
- OCDE, 1984. Essai n° 204: Poisson, toxicité prolongée étude sur 14 jours. OECD Publishing, Paris.
- Okamura, T., Yamada, K., Hirano, N., Nagaya, S., 2006. Performance of a room-temperature rotary magnetic refrigerator. *Int. J. Refrig.* 29, 1327–1331. doi:[10.1016/j.ijrefrig.2006.07.020](https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2006.07.020)
- ONEMA-INERIS, Staub, P.F., Dulio, V., Morin, A., 2009. Les substances émergentes dans l'environnement - Note de synthèse sur l'état de l'art concernant les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle (Convention de partenariat ONEMA-INERIS 2008 N° DRC-09-95687-06381C).

- P -

- Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67, 1258–1263. doi:[10.1016/j.chemosphere.2006.11.017](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.017)
- Parant, M., 1998. Le métabolisme des xénobiotiques chez les bivalves. *Life Sci.* 321, 485–494.

- Parant, M., Pain, S., 2001. Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *Water Res.* 35, 3743–3748. doi:[10.1016/S0043-1354\(01\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00074-4)
- Parant, M., Perrat, E., Wagner, P., Py, J.-S., Cossu-Leguille, C., *in submission*. Variations of anthropogenic gadolinium in rivers close to waste water treatment plants rejections. *Sci. Total Environement*.
- Parant, M., Perrat, E., Benzakour, S., Chuburu, F., Shom-Rederstorff, B., Flayac, J., Rosin, C., Cossu-Leguille, C., *en préparation*. Impact of gadoteric acid on the growth of zebra fish cells (ZF4 – ATCC 2050).
- Parant, M., Perrat, E., Cossu-Leguille, C., Deschamps-Olivier, I., Chuburu, F., Shom-Rederstorff, B., Cadiou, C., Wagner, P., 2016. Rapport d'activité - Impacts environnementaux des agents de contraste au gadolinium (N° Programme EC2CO ECODYN 869543).
- 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. doi:[10.1007/s11356-017-8869-9](https://doi.org/10.1007/s11356-017-8869-9)
- Petelet-Giraud, E., Klaver, G., Negrel, P., 2009. Natural versus anthropogenic sources in the surface- and groundwater dissolved load of the Dommel river (Meuse basin): Constraints by boron and strontium isotopes and gadolinium anomaly. *J. Hydrol.* 369, 336–349. doi:[10.1016/j.jhydrol.2009.02.029](https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2009.02.029)
- Pieck, D., 2013. Optimisation de l'utilisation du gadolinium comme poison consommable dans le combustible nucléaire : Vers un REP sans bore. Université d'Aix-Marseille 1, Saint-Paul-lez-Durance, France.
- Pohlmann, K.C., 1992. *The compact disc handbook*, 2. ed, Computer music and digital audio series. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Popplewell, J., Tebble, R.S., 1963. Microwave Absorption in Gadolinium-Yttrium Alloys. *J. Appl. Phys.* 34, 1343. doi:[10.1063/1.1729500](https://doi.org/10.1063/1.1729500)
- Port, M., Idee, J.M., Medina, C., Robic, C., Sabatou, M., Corot, C., 2008. Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review. *Biometals* 21, 469–90. doi:[10.1007/s10534-008-9135-x](https://doi.org/10.1007/s10534-008-9135-x)
- Py, J.S., Garnier, A., Vo Van Regnault, G., Munoz, J.F., 2011. Occurrence du gadolinium anthropique dans les eaux destinées à la consommation humaine. *Cachiers Réf.* 5, 26–29.

- 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*). *Environ. Pollut.* 85, 345–350. doi:[10.1016/0269-7491\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90057-4)



## - R -

- Rabiet, M., 2006. Contamination de la ressource en eau par les eaux usées dans un bassin versant Méditerranéen - Apport des éléments majeurs, traces et terres rares. Université Montpellier II, Montpellier.
- 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, 1057–64. doi:[10.1016/j.chemosphere.2009.01.036](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.036)
- Rabiet, M., Letouzet, M., Hassanzadeh, S., Simon, S., 2014. Transmetallation of Gd-DTPA by  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in water: Batch experiments and coagulation–flocculation simulations. *Chemosphere* 95, 639–642. doi:[10.1016/j.chemosphere.2013.09.102](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.102)
- Raju, C.S.K., Cossmer, A., Scharf, H., Panne, U., Lück, D., 2010. Speciation of gadolinium based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Spectrom* 25, 55–61. doi:[10.1039/B919959D](https://doi.org/10.1039/B919959D)
- Reinstorf, F., Strauch, G., Schirmer, K., Gläser, H.R., Möder, M., Wennrich, R., Osenbrück, K., Schirmer, M., 2008. Mass fluxes and spatial trends of xenobiotics in the waters of the city of Halle, Germany. *Environ. Pollut.* 152, 452–460. doi:[10.1016/j.envpol.2007.05.033](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.033)
- Robert, P., Lehericy, S., Grand, S., Violas, X., Fretellier, N., Idée, J.-M., Ballet, S., Corot, C., 2015. T1-Weighted Hypersignal in the Deep Cerebellar Nuclei After Repeated Administrations of Gadolinium-Based Contrast Agents in Healthy Rats: Difference Between Linear and Macrocyclic Agents. *Invest. Radiol.* 50, 473–480. doi:[10.1097/RLI.0000000000000181](https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000181)
- Rogosnitzky, M., Branch, S., 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* 29, 365–376. doi:[10.1007/s10534-016-9931-7](https://doi.org/10.1007/s10534-016-9931-7)
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of Zebra and Quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. *Chemosphere* 40, 1353–1356. doi:[10.1016/S0045-6535\(99\)00281-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00281-7)

## - S -

- Santiago, S., Thomas, R.L., Larbaigt, G., Rossel, D., Echeverria, M.A., Tarradellas, J., Loizeau, J.L., McCarthy, L., Mayfield, C.I., Corvi, C., 1993. Comparative ecotoxicity of suspended sediment in the lower Rhone River using algal fractionation, Microtox® and *Daphnia magna* bioassays. *Hydrobiologia* 252, 231–244. doi:[10.1007/bf00005472](https://doi.org/10.1007/bf00005472)
- Segner, H., 1998. Fish cell lines as a tool in aquatic toxicology, *in*: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 1–38.
- Sehgal, S.N., 1998. Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin. Biochem.* 31, 335–340. doi:[10.1016/S0009-9120\(98\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(98)00045-9)
- Senet, P., Francès, C., Lipsker, D., 2009. Fibrose systémique néphrogénique - Nephrogenic systemic fibrosis. *Ann. Dermatol. Vénérologie* 136, 380–385. doi:[10.1016/j.annder.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.annder.2009.01.005)

- Shimokozono, M., Sugimoto, N., Tate, A., Katoh, Y., Tanno, M., Fukuda, S., Ryuoh, T., 1996. Room-temperature operation of an Yb-doped Gd<sub>3</sub>Ga<sub>5</sub>O<sub>12</sub> buried channel waveguide laser at 1.025 μm wavelength. *Appl. Phys. Lett.* 68, 2177. doi:[10.1063/1.116004](https://doi.org/10.1063/1.116004)
- Sholkovitz, E.R., 1978. The flocculation of dissolved Fe, Mn, Al, Cu, Ni, Co and Cd during estuarine mixing. *Earth Planet. Sci. Lett.* 41, 77–86. doi:[10.1016/0012-821X\(78\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0012-821X(78)90043-2)
- Silva, R.E. da, Toledo Júnior, A., Senna, M.C., Rabello, A., Cota, G., 2016. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 512–516. doi:[10.1590/0074-02760160183](https://doi.org/10.1590/0074-02760160183)
- Smital, T., Kurelec, B., 1998. The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 399, 43–53. doi:[10.1016/S0027-5107\(97\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00265-0)
- Sokolova, I.M., Ringwood, A.H., Johnson, C., 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat. Toxicol.* 74, 218–228. doi:[10.1016/j.aquatox.2005.05.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.012)
- Stacey, W.M., 2007. Nuclear reactor physics, 2<sup>nd</sup> ed., completely rev. and enlarged. ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Strasser, A., Vogler, A., 2004. Phosphorescence of gadolinium(III) chelates under ambient conditions. *Inorganica Chim. Acta* 357, 2345–2348. doi:[10.1016/j.ica.2004.01.024](https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.01.024)

## - T -

- Tallec, G., 2011. Nouveaux complexes de lanthanides pour le développement d'agents de contraste bimodaux IRM/luminescence. Université de Grenoble, Laboratoire de reconnaissance ionique et chimique de coordination, Service de chimie inorganique et biologique, INAC, CEA Grenoble.
- 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. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2321–2339. doi:[10.1016/S0016-7037\(02\)01413-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01413-8)
- Taylor, S.R., McLennan, S.M., 1985. *The Continental Crust: Its Composition and Evolution*. 312 pp. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: Blackwell Scientific., Geological Magazine.
- Telgmann, L., Faber, H., Jahn, S., Melles, D., Simon, H., Sperling, M., Karst, U., 2012<sup>a</sup>. Identification and quantification of potential metabolites of Gd-based contrast agents by electrochemistry/separations/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1240, 147–155. doi:[10.1016/j.chroma.2012.03.088](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.088)
- Telgmann, L., Sperling, M., Karst, U., 2013. Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: a review. *Anal. Chem. Acta* 764, 1–16. doi:[10.1016/j.aca.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.007)
- Telgmann, L., Wehe, C.A., Birka, M., Künnemeyer, J., Nowak, S., Sperling, M., Karst, U., 2012<sup>b</sup>. Speciation and Isotope Dilution Analysis of Gadolinium-Based Contrast Agents in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11929–11936. doi:[10.1021/es301981z](https://doi.org/10.1021/es301981z)

- 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. *Appl. Geochem.* 45, 191–197. doi:[10.1016/j.apgeochem.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.04.006)
- Thomsen, H.S., 2016<sup>a</sup>. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious adverse reaction to gadolinium - 1997-2006-2016. Part 2. *Acta Radiol.* 57, 643–648. doi:[10.1177/0284185115626481](https://doi.org/10.1177/0284185115626481)
- Thomsen, H.S., 2016<sup>b</sup>. Nephrogenic systemic fibrosis: a serious adverse reaction to gadolinium - 1997-2006-2016. Part 1. *Acta Radiol.* 57, 515–520. doi:[10.1177/0284185115626480](https://doi.org/10.1177/0284185115626480)
- Thomsen, H.S. (Ed.), 2006. Contrast media: safety issues and ESUR guidelines, Medical radiology. Springer, Berlin.
- Tollrian, R., 1994. Fish-kairomone induced morphological changes in *Daphnia lumholtzi* (Sars). *Arch. Für Hydrobiol.* 130, 69–75.
- Toumi, H., 2013. Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires. Université de Lorraine, Metz.
- Toumi, H., Boumaiza, M., Immel, F., Sohm, B., Felten, V., Féraud, J.-F., 2014. Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation. *Aquat. Toxicol.* 148, 40–47. doi:[10.1016/j.aquatox.2013.12.022](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.022)
- Trivedi, E.R., Ma, Z., Waters, E.A., Macrenaris, K.W., Subramanian, R., Barrett, A.G.M., Meade, T.J., Hoffman, B.M., 2014. Synthesis and characterization of a porphyrazine-Gd(III) MRI contrast agent and *in vivo* imaging of a breast cancer xenograft model: TUMOR IMAGING. *Contrast Media Mol. Imaging* 9, 313–322. doi:[10.1002/cmml.1577](https://doi.org/10.1002/cmml.1577)
- Troy, D.B. (Ed.), 2005. Remington: the science and practice of pharmacy, 21. ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Turetschek, K., Floyd, E., Helbich, T., Roberts, T.P.L., Shames, D.M., Wendland, M.F., Carter, W.O., Brasch, R.C., 2001. MRI assessment of microvascular characteristics in experimental breast tumors using a new blood pool contrast agent (MS-325) with correlations to histopathology. *J. Magn. Reson. Imaging* 14, 237–242. doi:[10.1002/jmri.1179](https://doi.org/10.1002/jmri.1179)
- Turner, D., Whitfield, M., Dickson, A., 1981. The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and sea water at 25°C and 1 atm pressure. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 855–881. doi:[10.1016/0016-7037\(81\)90115-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90115-0)
- Tušek, J., Kitanovski, A., Zupan, S., Prebil, I., Poredoš, A., 2013. A comprehensive experimental analysis of gadolinium active magnetic regenerators. *Appl. Therm. Eng.* 53, 57–66. doi:[10.1016/j.applthermaleng.2013.01.015](https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2013.01.015)

- V -

- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, å., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G., 2010. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicol. In Vitro* 24, 1053–1063. doi:[10.1016/j.tiv.2010.03.016](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016)
- van Donk, E., Hessen, D.O., 1993. Grazing resistance in nutrient-stressed phytoplankton. *Oecologia* 93, 508–511. doi:[10.1007/BF00328958](https://doi.org/10.1007/BF00328958)

- 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. doi:[10.1021/es903888t](https://doi.org/10.1021/es903888t)
- Vidal, M.-L., 2001. Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (Müller) - Purification et caractérisation des Glutathion S-tranfêrases. Université de Bordeaux 1, Bordeaux.
- Vignati, D.A.L., Ferrari, B.J.D., Dominik, J., 2007. Laboratory-to-Field Extrapolation in Aquatic Sciences. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1067–1073. doi:[10.1021/es0724745](https://doi.org/10.1021/es0724745)
- Von der Hardt, P., Röttger, H., 2013. Neutron Radiography Handbook Nuclear Science and Technology. Springer Verlag.

## - W -

- Wang, K., 1997. The analogy in chemical and biological behaviour between non-essential ions compared with essential ions. *South Afr. J. Chem.* 4, 232–239.
- Wang, K., Li, R., Cheng, Y., Zhu, B., 1999. Lanthanides—the future drugs? *Coord. Chem. Rev.* 190–192, 297–308. doi:[10.1016/S0010-8545\(99\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00072-7)
- Wáng, Y.-X.J., Schroeder, J., Siegmund, H., Idée, J.-M., Fretellier, N., Jestin-Mayer, G., Factor, C., Deng, M., Kang, W., Morcos, S.K., 2015. Total gadolinium tissue deposition and skin structural findings following the administration of structurally different gadolinium chelates in healthy and ovariectomized female rats. *Quant. Imaging Med. Surg.* 5, 534–545. doi:[10.3978/j.issn.2223-4292.2015.05.03](https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.05.03)
- Weinmann, H.-J., Schuhmann-Giampieri, G., Schmitt-Willich, H., Vogler, H., Frenzel, T., Gries, H., 1991. A new lipophilic gadolinium chelate as a tissue-specific contrast medium for MRI. *Magn. Reson. Med.* 22, 233–237. doi:[10.1002/mrm.1910220214](https://doi.org/10.1002/mrm.1910220214)
- Wermuth, P.J., Jimenez, S.A., 2012. Gadolinium compounds signaling through TLR4 and TLR7 in normal human macrophages: establishment of a proinflammatory phenotype and implications for the pathogenesis of nephrogenic systemic fibrosis. *J Immunol* 189, 318–27. doi: [10.4049/jimmunol.1103099](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103099)
- White, S.L., Rainbow, P.S., 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 17–25. doi: [10.3354/meps032017](https://doi.org/10.3354/meps032017)
- Wiegers, C.B., Welch, M.J., Sharp, T.L., Brown, J.J., Perman, W.H., Sun, Y., Motekaitis, R.J., Martell, A.E., 1992. Evaluation of two new gadolinium chelates as contrast agents for MRI. *Magn. Reson. Imaging* 10, 903–911. doi:[10.1016/0730-725X\(92\)90444-5](https://doi.org/10.1016/0730-725X(92)90444-5)
- Williams, P.L., Anderson, G.L., Johnstone, J.L., Nunn, A.D., Tweedle, M.F., Wedeking, P., 2000. *Caenorhabditis elegans* as an alternative animal species. *J. Toxicol. Environ. Health A* 61, 641–647. doi:[10.1080/00984100050195125](https://doi.org/10.1080/00984100050195125)

- Z -

- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 133, 378–387. doi:[10.1016/j.jenvman.2013.12.017](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017)
- Zhang, K., Dai, L., Chetwyn, N.P., 2010. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. *J. Chromatogr. A* 1217, 5776–5784. doi:[10.1016/j.chroma.2010.07.035](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.035)
- Zhang, Y., Cao, Y., Shih, G.L., Hecht, E.M., Prince, M.R., 2017. Extent of Signal Hyperintensity on Unenhanced T1-weighted Brain MR Images after More than 35 Administrations of Linear Gadolinium-based Contrast Agents. *Radiology* 282, 516–525. doi:[10.1148/radiol.2016152864](https://doi.org/10.1148/radiol.2016152864)
- Zheng, S., Lu, Q., Xu, Y., Wang, X., Shen, J., Wang, W., 2015. GdCl<sub>3</sub> Attenuates *Schistosomiasis japonicum* Egg-Induced Granulomatosis Accompanied by Decreased Macrophage Infiltration in Murine Liver. *PLOS ONE* 10, e0132222. doi:[10.1371/journal.pone.0132222](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132222)





## **Annexes**

---



## Annexe 1

Tableau récapitulatif de l'enquête préliminaire concernant le type d'AC-Gd employés pour chaque centre de soin (hôpitaux, cliniques, centres de radiologie) en Lorraine, le nombre de patients auxquels sont injectés ces produits par an en moyenne et le mode de retraitement des déchets au sein de chaque centre de soin. (Enquête octobre-novembre 2013)

Centre de soin	Ville	Dpt	IRM	AC-Gd employés	Zone prétraitement des eaux usées	Nb patients injectés/an en moyenne
Hôpital Maillot de Briey	Briey	54	Fixe	tous	non mais DASRI	2296
Clinique Louis Pasteur	Essey-lès-Nancy		Fixe	tous	oui	2870
Centre imagerie Jacques Callot	Maxéville		Fixe	tous	non mais DASRI	4879
Centre Hospitalier Hôtel Dieu	Mont-Saint-Martin		Fixe	Multihance®	non mais DASRI	5453
Hôpital Central	Nancy		Fixe	tous	non mais DASRI	4305
Hôpital de Brabois	Vandœuvre-lès-Nancy		Fixe	tous mais essentiellement Dotarem®	non mais DASRI	5166
Maternité Régionale Adolphe Pinard	Nancy		Fixe	tous	non mais DASRI	1435
Polyclinique du parc	Bar le Duc	55	Fixe	Gadovist®, Omniscan® et Dotarem®	non mais DASRI	2296
Centre hospitalier	Bar le Duc		Fixe	Gadovist®, Omniscan® et Dotarem®	non mais DASRI	2583
Centre Hospitalier de Verdun	Verdun		Fixe	Magnévist®, Omniscan®, Dotarem® et Multihance®	non mais DASRI	1722
Hôpital FILIERIS	Freyming-Merlebach	57	Fixe	tous	non mais DASRI	1148
Hôpital Clinique Claude Bernard	Metz		Fixe	Gadovist®, Omniscan®, Dotarem® et Multihance®	non mais DASRI	4305
Hôpital d'Instruction des Armées Legouest	Metz		Fixe	tous	non mais DASRI	1579
Hôpital de Mercy	Metz		Fixe	tous	non mais DASRI	4305
Hôpital Hospitalor Saint-Avold	Saint-Avold		Fixe	tous	non mais DASRI	1148
Hôpital Saint-Nicolas	Sarrebourog		Fixe	tous	non mais DASRI	2870
Hôpital de Hoff	Sarrebourog		Fixe	tous	non mais DASRI	2870
Centre Hospitalier de Sarreguemines	Sarreguemines		Fixe	tous	non mais DASRI	1148
Hôpital Robert Pax						
Hôpital Bel Air	Thionville		Fixe	tous	oui	2870
Hôpital R. Schumann	Vantoux	Fixe	tous	non mais DASRI	3157	
Polyclinique La Ligne Bleue	Epinal	88	Mobile	tous	non mais DASRI	1722
Centre Hospitalier Jean Monnet	Epinal		Fixe	tous	non mais DASRI	3731
Clinique Saint-Jean	Epinal		Mobile	tous	non mais DASRI	1722
Clinique L'Arc-en-Ciel	Epinal		Mobile	tous	non mais DASRI	1722
Centre Hospitalier de l'Ouest Vosgien Site de Neufchâteau	Neufchâteau		Mobile	tous	non mais DASRI	1722
Centre Hospitalier	Remiremont		Fixe	tous	non mais DASRI	2009
Centre Hospitalier Saint Dié	Saint-Dié		Fixe	tous	non mais DASRI	2870

## Annexe 2

Les valeurs des concentrations en Gd d'origine anthropique obtenues pour chaque sites ont été comparées deux à deux à l'aide d'un test Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ )

*Comparaison des valeurs en Gd d'origine anthropique estimées à l'aide de la table NASC (Nord American Shale Composition) et de la table UCC (Upper Continental Crust) sur les premiers échantillons analysés à l'aide d'un test de Wilcoxon ( $\alpha = 0,05$ ). Les valeurs en gras sont significativement différentes.*

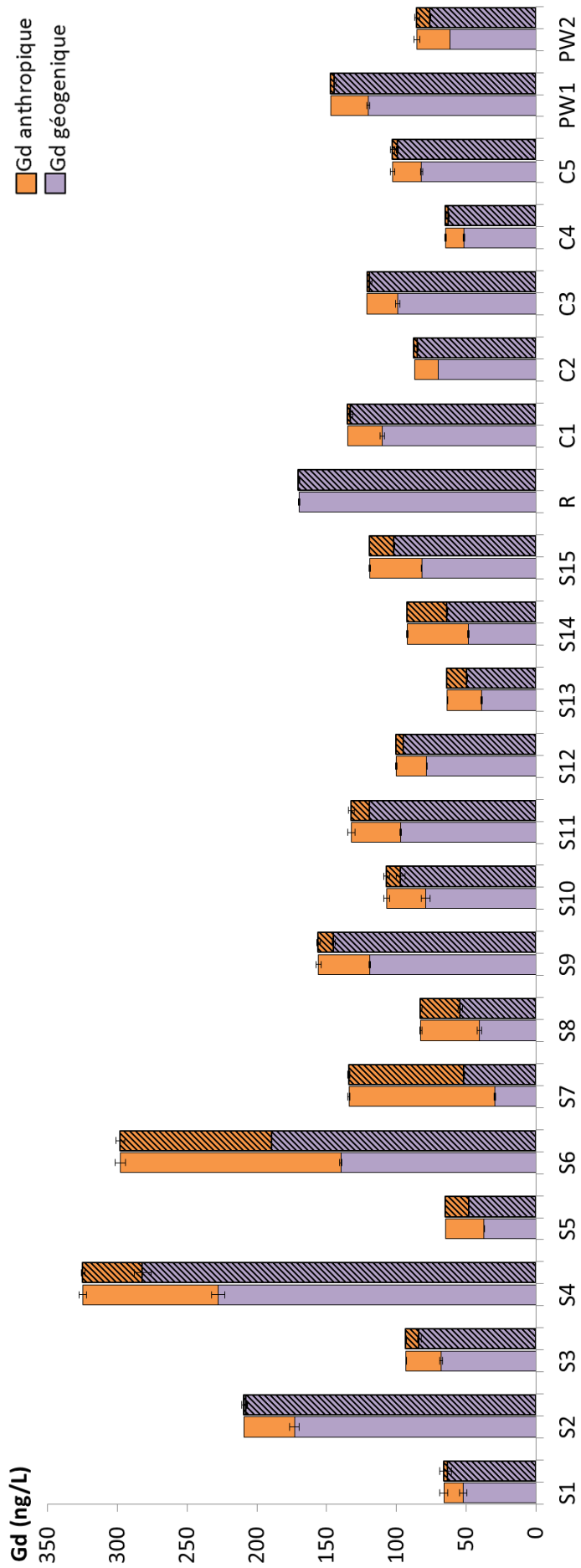
Site	[Gd <sub>anth</sub> ] (ng(Gd)/L)	
	NASC	UCC
S1-D	1,4 ± 2	2,8 ± 2,8
S2-D	0 ± 0	1,3 ± 1,9
S3-D	<b>0 ± 0</b>	<b>2,4 ± 0,2</b>
S4-D	<b>0 ± 0</b>	<b>2,9 ± 0,3</b>
S5-D	<b>6,8 ± 0,4</b>	<b>9,5 ± 0,3</b>
S6-D	<b>33,3 ± 1,2</b>	<b>42,8 ± 1,4</b>
S7-D	6,9 ± 1,8	9,4 ± 1,8
S8-D	<b>15,3 ± 0</b>	<b>16,8 ± 0</b>
S9-D	102,6 ± 3,3	108,4 ± 3,2
S10-D	81,1 ± 0,6	82,2 ± 0,7
S11-D	26,8 ± 0,9	28,5 ± 0,9
S12-D	<b>6,1 ± 1,4</b>	<b>10,9 ± 1,5</b>
S13-D	6,9 ± 2,5	10,1 ± 2,3
S14-D	9,2 ± 2,2	13,2 ± 2,2
S15-D	<b>0 ± 0</b>	<b>2,6 ± 0,3</b>
R	<b>0 ± 0</b>	<b>1,6 ± 0,1</b>
C1	<b>0,3 ± 0,4</b>	<b>2,2 ± 0,7</b>
C2	<b>0,6 ± 0,9</b>	<b>3,6 ± 1,5</b>
C3	<b>1,8 ± 0,3</b>	<b>5,1 ± 0,3</b>
C4	<b>12,2 ± 0</b>	<b>13,9 ± 0</b>
C5	<b>26,3 ± 0,2</b>	<b>28,4 ± 0,2</b>
PW1	0 ± 0	0 ± 0
PW2	<b>14,1 ± 0,2</b>	<b>17,5 ± 0,3</b>

## Annexe 3

Tableau des concentrations en REE et de la somme des REE en ng/L mesurées par ICP-MS et valeurs de l'anomalie en Gd (Gd\*) calculés au cours de l'étude préliminaire en période de hautes eaux (hiver 2014)

Site	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm, Yb & Lu	ΣREE	Gd*
S1	207	465	56	229	51	15	<b>66</b>	9	37	9	22	< 0,1	1 166	<b>1,3</b>
S2	623	1295	209	894	199	51	<b>209</b>	29	139	28	68	< 0,1	3744	<b>1,2</b>
S3	263	611	82	342	76	21	<b>93</b>	12	63	12	34	< 0,1	1610	<b>1,4</b>
S4	868	1950	286	1201	274	68	<b>325</b>	38	196	37	97	< 0,1	5 338	<b>1,4</b>
S5	173	372	50	215	44	12	<b>65</b>	6	32	6	17	< 0,1	993	<b>1,8</b>
S6	538	1155	169	716	168	42	<b>298</b>	23	122	23	69	< 0,1	3 323	<b>2,1</b>
S7	88	169	22	99	27	17	<b>134</b>	5	36	8	24	< 0,1	628	<b>4,6</b>
S8	206	345	44	221	44	21	<b>82</b>	7	41	8	26	< 0,1	1 046	<b>2,1</b>
S9	410	917	126	538	135	41	<b>156</b>	20	107	20	53	< 0,1	2 523	<b>1,3</b>
S10	285	656	85	363	88	28	<b>107</b>	14	73	14	38	< 0,1	1 750	<b>1,3</b>
S11	382	771	112	487	115	38	<b>132</b>	16	85	16	43	< 0,1	2 198	<b>1,4</b>
S12	281	592	96	435	96	25	<b>100</b>	13	65	12	32	< 0,1	1 749	<b>1,3</b>
S13	131	224	43	185	48	16	<b>63</b>	6	36	7	21	< 0,1	779	<b>1,6</b>
S14	173	321	58	255	67	16	<b>92</b>	7	37	7	21	< 0,1	1 055	<b>1,9</b>
S15	306	590	86	371	100	29	<b>119</b>	13	71	14	37	< 0,1	1737	<b>1,5</b>
R	665	488	150	616	137	27	<b>170</b>	28	160	32	83	< 0,1	2555	<b>1,1</b>
C1	472	1135	145	590	129	34	<b>135</b>	18	97	19	48	< 0,1	2 823	<b>1,2</b>
C2	227	481	70	312	82	27	<b>87</b>	12	62	12	35	< 0,1	1 407	<b>1,2</b>
C3	352	720	110	472	116	37	<b>121</b>	17	90	17	45	< 0,1	2 097	<b>1,2</b>
C4	180	371	59	261	63	22	<b>65</b>	8	51	10	25	< 0,1	1 115	<b>1,3</b>
C5	287	629	98	423	100	28	<b>103</b>	14	72	13	37	< 0,1	1 803	<b>1,3</b>
PW1	526	1300	156	667	139	35	<b>147</b>	20	108	21	55	< 0,1	3 175	<b>1,2</b>
PW2	257	569	77	321	71	20	<b>85</b>	10	58	11	31	< 0,1	1 509	<b>1,4</b>

# Annexe 4



Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-types) en Gd d'origine géogénique et en Gd anthropique en ng/L calculées pour chaque échantillon d'eau prélevé au cours de la première période de basses eaux à proximité des rejets de STEP (S), des zones de captage en eau potable (C) et des sites de référence (non contaminé (R) et à pollution multiple (PW)). Les barres hachurées correspondent aux mesures réévaluées après intégration de la valeur du Gd\* seuil dans le calcul.

## Annexe 5

### Préparation du milieu Lefebvre-Czarda (milieu LC) :

Tableau des solutions mères employées pour la formulation du milieu Lefebvre-Czarda (milieu LC), décrit dans la norme AFNOR NF EN ISO 8692 (2012).

	Nom chimique	Quantité	
<b>Solutions de base</b>			
<b>Solution 1</b>	Nitrate de Calcium : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	4 g	qsp 100 mL
<b>Solution 2</b>	Nitrate de Potassium : $\text{KNO}_3$	10 g	qsp 100 mL
<b>Solution 3</b>	Sulfate de Magnésium : $\text{MgSO}_4$	3 g	qsp 100 mL
<b>Solution 4</b>	Monohydrogénophosphate de potassium anhydre	4 g	qsp 100 mL
<b>Solutions d'oligo-éléments</b>			
<b>Solution I</b>	Sulfate de cuivre : $\text{CuSO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$	30 mg	qsp 1 L
	Heptamolybdate d'ammonium : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg	
	sulfate de Zinc : $\text{ZnSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg	
	Chlorure de Cobalt : $\text{CoCl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg	
	Nitrate de Manganèse : $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{ H}_2\text{O}$	60 mg	
	Acide citrique : $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$	60 mg	
<b>Solution II</b>	Acide borique : $\text{H}_3\text{BO}_3$	60 mg	qsp 1 L
	Citrate de Fer (III) : $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7, 5 \text{ H}_2\text{O}$	1,625 g	
	Sulfate de Fer (II) : $\text{FeSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,625 g	
	Chlorure de Fer (III) : $\text{FeCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,625 g	

Préparer le milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères 1 à 6 à de l'eau déminéralisée :

Ajouter à 500 ml d'eau déminéralisée :

- 1 mL des solutions de base 1, 2, 3 et 4
- 0,5 mL des solutions d'oligo-éléments I et II

Compléter à 1 L puis stériliser à l'autoclave (20 minutes à  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Stocker les solutions à l'obscurité et à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 1 mois maximum.

## Annexe 6

### Biomarqueurs mesurés dans les branchies des bivalves

Moyennes ( $\pm$  écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurés dans les branchies de *C. fluminea* et *D. r. bugensis* après 0 et 21 jours d'exposition à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®). Les valeurs sur fond bleu sont significativement différentes entre les témoins à 0 et 21 jours. Les valeurs sur fond rouge sont significativement différentes des témoins et montrent un effet de l'exposition au Gd-DOTA sur la concentration du biomarqueur ( $\alpha = 0,05$ ). Les valeurs des VIP (Variable importance in the Projection) obtenues pour l'analyse PLS-DA (Partial Least-Squares Discriminant Analysis) sont présentées pour décrire l'importance des variables sur la projection au seuil de 1 (Chong et Jun, 2005). Les valeurs en gras sont significatives.

	Jour 0	Jour 21			VIP (PLS-DA)
	(0 ng(Gd)/L)	0 ng(Gd)/L	20 ng(Gd)/L	60 ng(Gd)/L	
<b><i>Corbicula fluminea</i></b>					
PB (mg/gMF)	29,01 $\pm$ 5,54	31,74 $\pm$ 5,95	29,22 $\pm$ 3,14	27,62 $\pm$ 7,04	
PFC (mg/gMF)	<b>25,97 <math>\pm</math> 2,51</b>	<b>36,96 <math>\pm</math> 4,42</b>	39,85 $\pm$ 19,48	26,81 $\pm$ 16,56	
TG (mg/gMF)	0,01 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,03	
ETS ( $\mu$ mol(O <sub>2</sub> )/gMF/h)	46,31 $\pm$ 7,96	55,10 $\pm$ 1,76	54,72 $\pm$ 5,16	55,62 $\pm$ 7,14	
LOOH ( $\mu$ mol(TBH)/gMF)	0,76 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,37	nd
ACP ( $\mu$ mol/gprot/h)	42,13 $\pm$ 3,91	38,81 $\pm$ 4,46	48,59 $\pm$ 4,33	42,98 $\pm$ 2,95	
CAT (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	23 $\pm$ 3	16 $\pm$ 6	14 $\pm$ 6	20 $\pm$ 9	
ToAC ( $\mu$ mol(Teq)/gprot/min)	nd	nd	nd	nd	
LDH ( $\mu$ mol(NADH)/gprot/h)	<b>55 <math>\pm</math> 10</b>		43 $\pm$ 12	61 $\pm$ 11	
<b><i>Dreissena rostriformis bugensis</i></b>					
PB (mg/gMF)	17,58 $\pm$ 2,26	17,07 $\pm$ 1,34	12,64 $\pm$ 4,42	14,41 $\pm$ 4,73	0,7919450
PFC (mg/gMF)	51,35 $\pm$ 7,59	57,27 $\pm$ 13,56	52,71 $\pm$ 17,05	<b>11,89 <math>\pm</math> 2,66</b>	<b>1,1687464</b>
TG (mg/gMF)	0,07 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	<b>1,0324460</b>
ETS ( $\mu$ mol(O <sub>2</sub> )/gMF/h)	17,80 $\pm$ 4,43	17,53 $\pm$ 4,51	11,61 $\pm$ 5,60	24,02 $\pm$ 5,63	0,9950289
LOOH ( $\mu$ mol(TBH)/gMF)	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,10	0,4366730
ACP ( $\mu$ mol/gprot/h)	105,73 $\pm$ 13,14	105,39 $\pm$ 21,64	135,32 $\pm$ 83,13	106,04 $\pm$ 4,50	0,4502850
CAT (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	21 $\pm$ 8	24 $\pm$ 7	25 $\pm$ 12	<b>74 <math>\pm</math> 22</b>	<b>1,1671785</b>
GST ( $\mu$ mol(CDNB)/gprot/min)	34 $\pm$ 7	35 $\pm$ 7	31 $\pm$ 8	<b>129 <math>\pm</math> 27</b>	<b>1,2863825</b>
LDH ( $\mu$ mol(NADH)/gprot/h)	30 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3	23 $\pm$ 8	<b>92 <math>\pm</math> 26</b>	<b>1,2410892</b>

Moyennes ( $\pm$  écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires mesurées dans les branchies de *C. fluminea* et *D. r. bugensis* après 7 et 21 jours d'exposition à 0, 1 et 10  $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$  de Gd-DOTA (Dotarem®). Les valeurs sur en gras sont significativement différentes entre les témoins à 7 et 21 jours.

	Jour 7			Jour 21		
	0 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$	1 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$	10 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$	0 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$	1 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$	10 $\mu\text{g}(\text{Gd})/\text{L}$
<b><i>Corbicula fluminea</i></b>						
<b>PB</b> (mg/gMF)	40,93 $\pm$ 5,99	27,26 $\pm$ 11,46	26,69 $\pm$ 1,49	25,23 $\pm$ 12,99	24,15 $\pm$ 6,96	37,35 $\pm$ 17,14
<b>PFC</b> (mg/gMF)	<b>28,87 <math>\pm</math> 1,39</b>	26,87 $\pm$ 8,5	25,15 $\pm$ 1,43	<b>16,71 <math>\pm</math> 6,63</b>	17,35 $\pm$ 3,17	19,71 $\pm$ 5,18
<b>TG</b> (mg/gMF)	4,63 $\pm$ 0,48	2,23 $\pm$ 1,46	2,12 $\pm$ 0,33	2,45 $\pm$ 1,96	2,61 $\pm$ 1,36	3,61 $\pm$ 1,88
<b>ETS</b> ( $\mu\text{mol}(\text{O}_2)/\text{gMF}/\text{h}$ )	39,69 $\pm$ 20,73	47,07 $\pm$ 13,45	47,20 $\pm$ 8,00	101,06 $\pm$ 44,07	53,33 $\pm$ 18,60	44,06 $\pm$ 9,47
<b>LOOH</b> ( $\mu\text{mol}(\text{TBH})/\text{gMF}$ )	0,85 $\pm$ 0,41	1,12 $\pm$ 0,33	1,08 $\pm$ 0,19	0,47 $\pm$ 0,18	0,34 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,16
<b>ACP</b> ( $\mu\text{mol}/\text{gprot}/\text{h}$ )	37,32 $\pm$ 9,76	38,00 $\pm$ 5,77	33,21 $\pm$ 2,66	27,69 $\pm$ 4,45	31,55 $\pm$ 3,60	29,97 $\pm$ 5,39
<b>CAT</b> (mmol( $\text{H}_2\text{O}_2$ )/gprot/min)	46 $\pm$ 22	41 $\pm$ 10	45 $\pm$ 17	24 $\pm$ 11	34 $\pm$ 7	46 $\pm$ 9
<b>GST</b> ( $\mu\text{mol}(\text{CDNB})/\text{gprot}/\text{min}$ )	31 $\pm$ 6	33 $\pm$ 8	28 $\pm$ 7	19 $\pm$ 10	31 $\pm$ 10	25 $\pm$ 4
<b>LDH</b> ( $\mu\text{mol}(\text{NADH})/\text{gprot}/\text{h}$ )	60 $\pm$ 13	72 $\pm$ 44	44 $\pm$ 11	56 $\pm$ 27	70 $\pm$ 13	70 $\pm$ 12
<b><i>Dreissena rostriformis bugensis</i></b>						
<b>PB</b> (mg/gMF)	15,31 $\pm$ 2,73	13,46 $\pm$ 3,08	14,04 $\pm$ 2,4	10,48 $\pm$ 3,46	11,75 $\pm$ 2,32	11,3 $\pm$ 1,05
<b>PFC</b> (mg/gMF)	12,23 $\pm$ 1,96	11,74 $\pm$ 1,5	10,77 $\pm$ 1,58	8,44 $\pm$ 2,71	11,62 $\pm$ 1,39	9,97 $\pm$ 1,37
<b>TG</b> (mg/gMF)	0,08 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,03	0,11 $\pm$ 0,07	0,1 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,08	0,14 $\pm$ 0,05
<b>ETS</b> ( $\mu\text{mol}(\text{O}_2)/\text{gMF}/\text{h}$ )	9,35 $\pm$ 1,78	7,43 $\pm$ 1,14	7,56 $\pm$ 1,66	11,27 $\pm$ 3,58	11,11 $\pm$ 2,62	9,67 $\pm$ 0,89
<b>LOOH</b> ( $\mu\text{mol}(\text{TBH})/\text{gMF}$ )	0,47 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,15	0,52 $\pm$ 0,11	0,41 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,13	0,44 $\pm$ 0,05
<b>ACP</b> ( $\mu\text{mol}/\text{gprot}/\text{h}$ )	61,95 $\pm$ 9,34	70,39 $\pm$ 10,81	73,76 $\pm$ 15,28	59,86 $\pm$ 12,17	68,86 $\pm$ 8,92	71,05 $\pm$ 10,35
<b>CAT</b> (mmol( $\text{H}_2\text{O}_2$ )/gprot/min)	100 $\pm$ 21	99 $\pm$ 26	90 $\pm$ 18	171 $\pm$ 77	122 $\pm$ 37	137 $\pm$ 32
<b>GST</b> ( $\mu\text{mol}(\text{CDNB})/\text{gprot}/\text{min}$ )	200 $\pm$ 35	227 $\pm$ 18	214 $\pm$ 53	276 $\pm$ 88	193 $\pm$ 50	257 $\pm$ 45
<b>LDH</b> ( $\mu\text{mol}(\text{NADH})/\text{gprot}/\text{h}$ )	119 $\pm$ 40	123 $\pm$ 38	154 $\pm$ 47	154 $\pm$ 70	127 $\pm$ 51	113 $\pm$ 35

## Biomarqueurs mesurés dans les Glandes digestives des bivalves

Moyennes ( $\pm$  écart-types) des différentes valeurs obtenues pour les biomarqueurs cellulaires\* mesurés dans les glandes digestives de *C. fluminea* et *D. r. bugensis* après 0 et 21 jours d'exposition à 0, 20 et 60 ng(Gd)/L de Gd-DOTA (Dotarem®).  
Les valeurs sur fond bleu sont significativement différentes entre les témoins à 0 et 21 jours.

	0 jour	21 jours		
	0 $\mu\text{g(Gd)/L}$	0 $\mu\text{g(Gd)/L}$	20 $\text{ng(Gd)/L}$	60 $\text{ng(Gd)/L}$
<b><i>Corbicula fluminea</i></b>				
<b>PB</b> (mg/gMF)	71,94 $\pm$ 6,99	70,29 $\pm$ 9,53	69,29 $\pm$ 8,53	66,73 $\pm$ 10,58
<b>PFC</b> (mg/gMF)	57,34 $\pm$ 8,32	55,26 $\pm$ 7,35	52,7 $\pm$ 6,07	48,22 $\pm$ 7,26
<b>TG</b> (mg/gMF)	0,6 $\pm$ 0,08	0,53 $\pm$ 0,08	0,55 $\pm$ 0,1	0,54 $\pm$ 0,06
<b>ETS</b> ( $\mu\text{mol(O}_2\text{)}/\text{gMF/h}$ )	54,91 $\pm$ 2,08	58,10 $\pm$ 5,26	60,00 $\pm$ 5,44	61,31 $\pm$ 7,69
<b>LOOH</b> ( $\mu\text{mol(TBH)}/\text{gMF}$ )	0,92 $\pm$ 0,08	0,96 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,19	1,09 $\pm$ 0,18
<b>ACP</b> ( $\mu\text{mol/gprot/h}$ )	43,99 $\pm$ 9,68	45,11 $\pm$ 5,84	45,82 $\pm$ 8,04	51,62 $\pm$ 9,66
<b>CAT</b> (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	42 $\pm$ 24	39 $\pm$ 28	61 $\pm$ 26	55 $\pm$ 20
<b>GST</b> ( $\mu\text{mol(CDNB)}/\text{gprot/min}$ )	41 $\pm$ 13	43 $\pm$ 16	45 $\pm$ 10	54 $\pm$ 13
<b>GPx</b> ( $\mu\text{mol(NADPH)}/\text{gprot/min}$ )	21,14 $\pm$ 7,65	18,03 $\pm$ 17,46	20,71 $\pm$ 14,27	21,00 $\pm$ 14,35
<b>ToAC</b> ( $\mu\text{mol(Teq)}/\text{gprot/min}$ )	11,61 $\pm$ 1,35	11,69 $\pm$ 1,59	12,04 $\pm$ 2,77	14,83 $\pm$ 2,45
<b>LDH</b> ( $\mu\text{mol(NADH)}/\text{gprot/h}$ )	54 $\pm$ 13	52 $\pm$ 13	59 $\pm$ 12	88 $\pm$ 23
<b><i>Dreissena rostriformis bugensis</i></b>				
<b>PB</b> (mg/gMF)	31,85 $\pm$ 5,00	29,99 $\pm$ 5,47	32,58 $\pm$ 3,85	30,33 $\pm$ 6,47
<b>PFC</b> (mg/gMF)	5,98 $\pm$ 0,88	5,10 $\pm$ 2,68	8,57 $\pm$ 1,46	9,42 $\pm$ 2,5
<b>TG</b> (mg/gMF)	0,21 $\pm$ 0,15	0,17 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 0,13
<b>ETS</b> ( $\mu\text{mol(O}_2\text{)}/\text{gMF/h}$ )	42,76 $\pm$ 9,96	60,76 $\pm$ 21,71	47,92 $\pm$ 11,07	54,11 $\pm$ 12,63
<b>LOOH</b> ( $\mu\text{mol(TBH)}/\text{gMF}$ )	0,32 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,21	0,89 $\pm$ 0,93	0,34 $\pm$ 0,05
<b>ACP</b> ( $\mu\text{mol/gprot/h}$ )	93,45 $\pm$ 15,61	84,35 $\pm$ 19,22	89,07 $\pm$ 18,07	82,55 $\pm$ 17,44
<b>CAT</b> (mmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/gprot/min)	<b>243 <math>\pm</math> 52</b>	<b>503 <math>\pm</math> 153</b>	398 $\pm$ 81	355 $\pm$ 126
<b>GST</b> ( $\mu\text{mol(CDNB)}/\text{gprot/min}$ )	97 $\pm$ 21	136 $\pm$ 40	134 $\pm$ 18	104 $\pm$ 40
<b>GPx</b> ( $\mu\text{mol(NADPH)}/\text{gprot/min}$ )	nd	9,16 $\pm$ 9,60	5,50 $\pm$ 8,53	10,63 $\pm$ 8,12
<b>ToAC</b> ( $\mu\text{mol(Teq)}/\text{gprot/min}$ )	21,48 $\pm$ 15,85	33,74 $\pm$ 11,78	27,96 $\pm$ 5,62	25,90 $\pm$ 6,73
<b>LDH</b> ( $\mu\text{mol(NADH)}/\text{gprot/h}$ )	525 $\pm$ 2	375 $\pm$ 158	243 $\pm$ 124	267 $\pm$ 84





# **Communications scientifiques issues du travail de thèse**

---

## **➤ Communications orales dans des congrès internationaux**

Perrat, E., Bouyer L., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2016.05.24. *Effects of Gadolinium-based contrast agents used in magnetic resonance imaging on freshwater mussels*. SETAC (Nantes, France).

## **➤ Communications orales dans des congrès nationaux**

Perrat, E., Parant M., Rosin C., Py J-S., Wagner P., Shom B., Chuburu F., Deschamps I., Cadiou C., Cossu-Leguille C., 2015.10.16. *Impacts des agents de contraste au Gadolinium dans l'environnement Lorrain : Avancement des travaux*. Atelier Terres Rares, Labex Ressources 21 (Nancy, France).

Parant M., Perrat, E., Rosin C., Py J-S., Wagner P., Shom B., Chuburu F., Deschamps I., Cadiou C., Cossu-Leguille C., 2015.01.23. *Impacts environnementaux des agents de contraste au gadolinium : situation locale, approches cellulaires et in vivo*, Labex Ressources 21 (Nancy, France).

Perrat E., Parant M., Dauchy X., Wagner P., Rousselle P., Cossu-Leguille C., 2014.06.16. *Impacts des agents de contraste au Gadolinium dans l'environnement Lorrain : Premiers résultats*. Atelier Terres Rares, Labex Ressources 21 (Nancy, France).

## **➤ Communications orales dans des séminaires**

Perrat, E., Bouyer L., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2017.02.02. *Les agents de contraste à base de Gadolinium : contamination du milieu aquatique et impacts sur les organismes filtreurs*. Séminaire de l'école doctorale RP2E, (Nancy, France).

## **➤ Communications affichées dans des congrès internationaux**

Perrat, E., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rousselle P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2015.06.29. *Anthropogenic gadolinium: environmental concentrations in Lorraine region (France) and effects on living organisms*. EDA-EMERGE PhD student conference, Leipzig (Germany).

Perrat, E., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rousselle P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2015.05.04 *Anthropogenic gadolinium: environmental concentrations in Lorraine region (France) and effects on living organisms*. SETAC, Barcelone (Spain).

➤ *Communications affichées dans des congrès nationaux*

Perrat, E., Parant M., Rosin C., Py J-S., Wagner P., Shom B., Chuburu F., Deschamps I., Cadiou C., Cossu-Leguille C., 2015.10.16. *Impacts des agents de contraste au Gadolinium : Année 1*. Rapport EC2CO, Paris (France)

➤ *Communications affichées dans des séminaires*

Perrat, E., Bouyer L., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2016.04.19. *Effets des agents de contraste à base de gadolinium sur les bivalves d'eau douce*. Journée des doctorants, Metz (France)

Perrat, E., Bouyer L., Parant M., Py J-S., Wagner P., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2016.01.28. *Effets des agents de contraste à base de gadolinium sur les bivalves d'eau douce*. Séminaire de l'école doctorale RP2E, Nancy (France)

Perrat E., Parant M., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2016.01.20. *Les agents de contraste au Gadolinium : présence dans le milieu aquatique Lorrain et impacts sur les organismes*. Labex Ressources 21, Nancy (France)

Perrat E., Parant M., Rosin C., Cossu-Leguille C., 2015.01.23. *Evaluation de la présence des agents de contraste au Gadolinium sur le secteur lorrain*. Labex Ressources 21, Nancy (France)





## **Publications scientifiques**

---

RESEARCH ARTICLE

# Bioaccumulation of gadolinium in freshwater bivalves

Emilie Perrat<sup>1</sup> · Marc Parant<sup>1</sup> · Jean-Sebastien Py<sup>2</sup> · Christophe Rosin<sup>2</sup> · Carole Cossu-Leguille<sup>1</sup>

Received: 28 November 2016 / Accepted: 20 March 2017 / Published online: 30 March 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

**Abstract** In this study, the presence of anthropogenic gadolinium (Gd) was evaluated in rivers, close to wastewater treatment plant outputs. Then, one site was selected for in situ experiments to assess the bioaccumulation of Gd in the digestive gland and in the gills of two bivalves (*Dreissena rostriformis bugensis* and *Corbicula fluminea*). For both organisms, the results suggested that the bioaccumulation of Gd can be observed when organisms are exposed in a geogenic and anthropogenic Gd mixture. In order to observe if Gd can bioaccumulate in tissues of bivalves when the ion is only present as the main anthropogenic speciation of Gd, i.e., Gd-contrast agents (Gd-CAs), the gadoteric acid was used for a laboratory experiment. In this case, the presence of Gd was clearly detected in a significant amount in the digestive glands of *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea* while low concentrations are measured in the gills. For the first time, these results clearly showed that Gd can bioaccumulate in bivalve tissues even when it is only present as Gd-CAs. Biochemical activities were measured in the digestive gland and in the gills of the bivalves to assess the effects of Gd-CA bioaccumulation. No significant variations were observed in the gills. Concerning the digestive gland, after 7 days of exposure at

10 µg L<sup>-1</sup> of Gd as Gd-CA speciation, GST activity in *D. rostriformis bugensis* and lipid hydroperoxide and mitochondrial electron transfer system in *C. fluminea* had increased. The results suggest an acclimation of the organisms to the presence of Gd-CAs in the medium within less than 21 days.

**Keywords** Anthropogenic gadolinium · Wastewater treatment plants · Rare earth elements · Contrast agents · Bivalve tissues · Rare earth elements

## Introduction

Gadolinium (Gd) is a toxic ion belonging to the group of the rare earth elements (REE) (Abraham and Thakral 2008). Its toxicity is neutralized when it is chelated to an organic part to form gadolinium contrast agents (Gd-CAs) (Bellin and Van Der Molen 2008). These agents can be subdivided into two main categories, macrocyclic complexes (whose trade names are Dotarem®, Gadovist®, and Prohance®) and linear ones (with the trade names of Omniscan®, MultiHance®, Magnevist®, Primovist®, OptiMark®, and Vasovist®) (Idée et al. 2015). These molecules are daily used worldwide during magnetic resonance imaging (MRI), an indispensable method for clinical diagnosis (Kulaksız and Bau 2013).

In 1996, about 12 years after their first use in 1984, the presence of gadolinium anomalies (the presence of anthropogenic gadolinium in the environment) was observed in German rivers (Bau and Dulski 1996). Since then, such observations have been reported in several countries such as France, Australia, the USA, Brazil, and Japan (Elbaz-Poulichet et al. 2002; Lawrence et al. 2009; Zhu et al. 2004; Nozaki et al. 2000; Möller et al. 2002; Merschel et al. 2015). It is now commonly accepted that the origin of these anomalies

Responsible editor: Cinta Porte

✉ Marc Parant  
marc.parant@univ-lorraine.fr

✉ Carole Cossu-Leguille  
carole.leguille@univ-lorraine.fr

<sup>1</sup> Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360 Campus Bridoux—Bâtiment IBiSE—8, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

<sup>2</sup> Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du 11 Travail (ANSES), 40 rue Lionnois, 54000 Nancy 12, France

is the release of Gd-CA from wastewater treatment plants (WWTPs) following hospital waste treatment (Telgmann et al. 2013). Gadoterate (Gd-DOTA—Dotarem®) and gadobutrol (Gd-BT-DO3A—Gadovist®) acids have been clearly identified in WWTP effluents (Telgmann et al. 2012). Lindner et al. (2013) showed that the decrease in the Gd concentration fits well into the calculated dilution factor representing the ratio between the average upstream flow rate and the typical outlet water flow rate of a WWTP. Consequently, on their experimental site, the concentration of Gd decreased in the first kilometer from downstream a WWTP output and remained constant for another 2 km.

Concerning the Gd-CA bioaccumulation, the number of investigations is rather low. Hao et al. (1997) compared the accumulation of Gd in algae when Gd is present in a growing medium such as  $GdCl_3$  or Gd-EDTA. The results suggested that chelators clearly reduced the incorporation of Gd in algae. Lindner et al. (2013) showed the presence of the most frequently used Gd-CAs (Gadovist® (Gd-BT-DO3A), Magnevist® (Gd-DTPA), Omniscan® (Gd-DTPA-BMA), Dotarem® (Gd-DOTA), and Multihance® (Gd-BOPTA)) in cress leaves under controlled conditions. They suggested that the uptake of Gd-CAs could take place through the roots of the cress plant. The bioconcentration factors (BCFs) of several Gd-CAs were calculated and showed values close to 1, suggesting that Gd-CAs can be taken up in significant amounts without bioconcentration in organisms. Sato et al. (2013) quantified the Gd deposition tissue in rats exposed to Gd-CAs such as Gd-EOB-DTPA (Primovist®), Gd-DTPA-BMA (Omniscan®), and Gd-HP-DO3A (Prohance®). They showed that the Gd deposition tissue in all organs was significantly higher for the Gd-DTPA-BMA group than for the Gd-HP-DO3A and Gd-EOB-DTPA groups, suggesting that linear contrast agents are less stable than other categories. In the Rhine river, where the speciation of Gd is dominated by Gd-CAs, Merschel and Bau (2015) showed that Gd is not bioavailable to be incorporated into the shells of bivalves. At the same time, they explained that this observation does not mean that Gd-CAs are not bioavailable for the entire organism and they raised the question as to whether or not anthropogenic Gd can be found in the tissues of bivalves. Currently, nothing is known about it and how Gd-CAs can be taken up by freshwater bivalves.

In this study, the bioaccumulation of gadolinium in the tissues of two bivalves, *Dreissena rostriformis bugensis* and *Corbicula fluminea*, has been examined. First, the level of Gd was assessed on 14 sites close to the output of WWTPs and after the analysis of the results, an in situ experiment of bioaccumulation was conducted on one of these sites. Then, a laboratory approach was applied in the presence of Gd-DOTA (Dotarem®) as the only Gd source in the medium. Biochemical activities were measured in order to assess the impact of Gd-CA bioaccumulation in freshwater bivalves.

The fate of Gd-CAs after the bivalve incorporation will be discussed later.

## Materials and methods

### Sampling of freshwater close to WWTP

In February 2015, freshwater was sampled from 14 sites close to WWTP outputs with the highest recycling ability in the Lorraine region (Fig. 1). All water samples were stored in high-density polyethylene (HDPE) tanks that all belonged to the same REE-free batch (information checked by ICP-MS analysis (X Series II ICP-MS from Thermo Fisher Scientific)).

Sampling was conducted from Tuesday morning to Friday morning as advised in the literature (Telgmann et al. 2012). For each sampling, triplicate samples were taken, 10 cm deep from the water surface and 2 m from the riverbank. Samplings were performed 50 m from downstream the WWTPs.

During each sampling, physicochemical parameters such as pH and water temperature were measured with a pH meter 3430 (WTW®). The total alkalinity (TA) was measured by the acidic neutralization of bicarbonates, carbonates, and hydroxides with  $H_2SO_4$  (NF EN ISO 9963-1 1996).

### Sampling during in situ experiment of bioaccumulation

Freshwater was sampled daily upstream (−65 m) and downstream (+200 m) the selected WWTP (49.143911° N–6.197777° E). Each sampling was performed in triplicate 10 cm deep from the water surface and 2 m from the riverbank. Samples were stored in HDPE tanks as for the previous sampling.

### REE analyses by ICP-MS

All samples were acidified to 1% with  $HNO_3$  70% (Ultrapure®). They were analyzed by ICP-MS to determine the Gd, Sm, and Tb concentrations. These analyses were performed in the Laboratory of hydrology of the ANSES in Nancy, France. ICP-MS enabled the detection of REE concentrations in the nanograms per liter range.

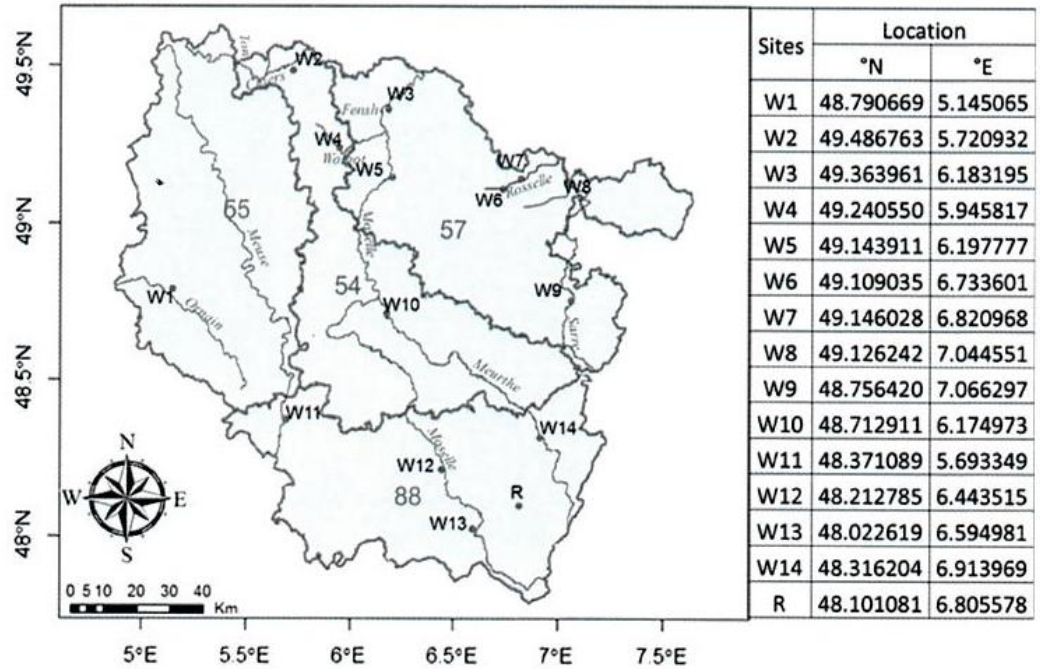
### Anthropogenic Gd concentrations

The Gd, Sm, and Tb concentrations measured by ICP-MS ( $Gd_{mes}$ ,  $Sm_{mes}$ ,  $Tb_{mes}$ ) were normalized ( $Gd_N$ ,  $Sm_N$ ,  $Tb_N$ ) with the Upper Continental Crust (UCC) table, which is the most realistic table for the aquatic environment in the Lorraine region.

Then, the Gd anomaly ( $Gd^*$ ) was estimated as previously described by Taylor and McLennan (1985) using the following equation



**Fig. 1** Map and locations of sampling sites in the Lorraine region near wastewater treatment plants (W) (Photoshop®)



$$Gd^* = Gd_N / (Sm_N \times 0.33 + Tb_N \times 0.67)$$

Finally, if Gd\* was superior to the anomaly threshold (value of 1.2 determined with the reference site (R)—data not shown), we deduced the anthropogenic (Gd<sub>anth</sub>) and geogenic (Gd<sub>geo</sub>) part of Gd using the following calculation

$$Gd_{anth} = Gd_{mes} - Gd_{geo} = Gd_{mes} - (Gd_{mes} / Gd^*)$$

**Organisms**

Experiments were carried out with two species of bivalve, i.e., *C. fluminea* (25 ± 2 mm in shell length) and *D. rostriformis bugensis* (15 ± 2 mm in shell length). Both species were collected without gender distinction in natural media in the Mosel River (49.118523° N–6.160517° E) and acclimatized in our laboratory (LIEC laboratory, Lorraine University, FR) for 3 weeks before assays. During the acclimation period, the bivalves were kept at 15 ± 2 °C, under a 16:8-h illumination. The mussels were first exposed to the natural medium from their sampling site (1 L of media in 2 L aquaria) and then, this medium was gradually replaced within 21 days by an artificial medium. The artificial medium contained aerated demineralized water/Volvic® medium in proportion (7/8; 1/8 v/v) spiked with CaSO<sub>4</sub> (105 mg L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub> (4 mg L<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (15 mg L<sup>-1</sup>), and KCl (1.5 mg L<sup>-1</sup>). This process eliminated natural ionic species which could interfere with our measurements during further experiments.

The two bivalve species were fed with 3.10<sup>5</sup> cells of dried unicellular green algae *C. vulgaris* for each individual per day. These algae were purchased in powder form (Bio Chlorella

Naturland®) and were rehydrated before their addition in aquaria.

During in situ and laboratory experiments (7 and 21 days of exposure), the mortality was less than 10%. During laboratory experiments, the observation of opened shells (a visual proof of filtering by the bivalves) attested daily to the health of the organisms.

**Experimental design**

After the acclimation period, the mussels were randomly divided into 2 experimental groups of 320 and 270 organisms of each species; these groups were, respectively, used for in situ and in laboratory experiments.

**In situ experiment**

For the in situ experiment, the mussels were exposed for 7 and 21 days along the Mosel River close to the WWTP output of Metz city. They were introduced by a batch of 20 organisms of each species and each condition in 4 locations: from upstream (–65 m) close to the output and from downstream close to (50 m) and far from (200 and 600 m) the output. Each batch was duplicated.

**In laboratory experiment**

Concerning the laboratory experiment, the mussels were exposed for 7 and 21 days to concentrations of Gd (0; 1 and 10 µg L<sup>-1</sup>). To achieve these conditions, the artificial medium was spiked with Gd-DOTA (Dotarem®) purchased from a pharmacy. Dilutions were performed into the artificial medium.

For *C. fluminea*, some glass beads between 0.5 and 2 cm in diameter were placed in their aquaria as substrates and for *D. rostriformis bugensis*, a ceramic tile (20 cm × 20 cm) was used per aquarium as a mussel byssus attachment support. During the 21 days of the experiment, both species were fed with algae, including the acclimatization period, i.e., with  $3.10^5$  cells of dried unicellular green algae *Chlorella vulgaris* per individual per day.

### Bioaccumulation measurements

During the in situ experiments, mortality and Gd concentrations in the medium were monitored every day. Mortality was less than 10% after 7 and 21 days of exposure and the average Gd concentration was  $43 \pm 17$  and  $59 \pm 30$  ng L<sup>-1</sup> for 7 and 21 days of exposure, respectively. For each experiment, the Gd concentrations in the organisms were measured after 7 and 21 days of exposure. Due to the lack of direct Gd-CA measurements, the Gd concentrations were measured by ICP-MS analysis (X Series II ICP-MS by Thermo Fisher Scientific). So, Gd concentrations measured corresponded to the natural and anthropogenic Gd in the in situ samples. In controlled conditions, the artificial medium was renewed twice a week. Mortality was monitored every day and was less than 10% after 7 and 21 days of exposure. Gd concentrations were measured in each medium renewing old and new media. Analytical results displayed values of Gd concentrations close to the nominal values for each experiment, i.e., for the nominal value of 1 μg L<sup>-1</sup>:  $0.99 \pm 0.08$  and  $0.98 \pm 0.07$  μg L<sup>-1</sup> after 7 and 21 days of exposure, respectively, and for the nominal value of 10 μg L<sup>-1</sup>:  $9.9 \pm 0.6$  and  $9.8 \pm 0.6$  μg L<sup>-1</sup> after 7 and 21 days of exposure, respectively. Consequently, concerning laboratory experiments, all the calculations were realized with the nominal values of Gd concentrations. The Gd measured corresponded to Gd-DOTA (the only source of Gd in the medium) concentrations due to the high stability of the complex in an aquatic medium as previously described (Brücher 2002).

The concentration of total Gd was measured in the medium, in the digestive gland, and in the gills, and the bioaccumulation factor (BAF) was calculated for each experiment using the following equation

$$\text{BAF} = \frac{([\text{Gd}]_{\text{organ after 7 or 21 days}} - [\text{Gd}]_{\text{organ at 0 day}})}{[\text{Gd}]_{\text{medium after 7 or 21 days}}}$$

### Biomarker measurements

After the laboratory experiment, the toxicity of Gd-DOTA was assessed in the digestive gland and in the gills of the two bivalves *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea*. For both bivalves, six pools of two digestive glands (DG) and six pairs

of gills (G) were taken per condition. Tissues were weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until biomarker analyses. Biochemical biomarkers such as acid phosphatase (ACP), glutathione peroxidase (GPx), lactate dehydrogenase (LDH), lipid peroxidation (LOOH), glutathione-S-transferase (GST), electron transport system attached to the mitochondria (ETS), catalase (CAT), and the total antioxidant capacity (TAC) were measured. Except for the catalase activity, the analyses were performed on the automated chemistry analyzer Konelab 20 Xti (Thermo Scientific) with protocols adapted by Garaud et al. (2015). The catalase activity was measured with a classical spectrophotometric method adapted from Beers and Sizer (1952). The experimental design was summarized in the flow chart presented in Fig. 2.

Thawed samples of DG and G were crushed at 4 °C in phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors at a 8/1 (v/w) ratio. Then, homogenates were centrifuged at 250×g for 5 min at 4 °C, and 135 μL of each supernatant was collected and diluted by half in phosphate buffer to measure energetic parameters (proteins and triglyceride concentrations), cell respiration (via ETS), intracellular digestion (via ACP), and the level of reactive oxygen species (via LOOH). The remaining supernatant was centrifuged at 1,000×g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was collected and centrifuged at 20,000×g for 50 min at 4 °C to obtain the cytosolic fraction. This fraction was separated in two parts: 160 μL were used to measure activities of GST, GPx, TAC, and LDH with the Konelab® analyzer and 25 μL were used to determine the catalase activity with a classic spectrophotometer.

### Statistical analysis

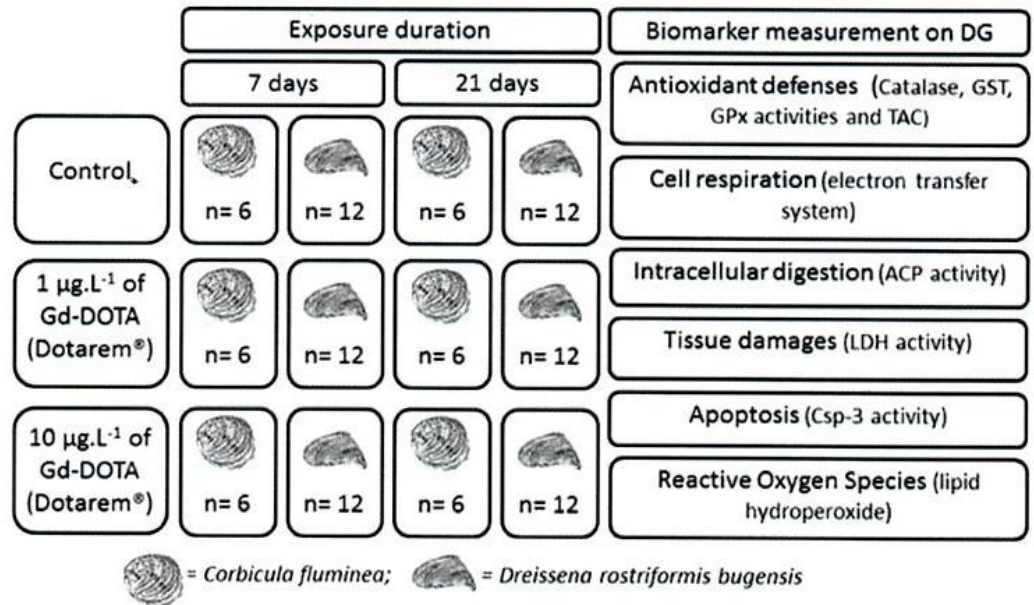
The statistical analyses were conducted using R (R development core team). Homoscedasticity and normality were verified by Levene and Shapiro–Wilk tests, respectively. When the conditions were fulfilled, a one-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) was performed to compare the accumulation of Gd-DOTA in the tissues of the mussels during the 7- and 21-day exposures.

## Results and discussion

### Gadolinium concentrations close to WWTPs

Freshwater was sampled in 14 locations close to WWTPs in the Lorraine region. REE of interest (Gd, Sm, and Tb) were measured by ICP-MS. Anthropogenic and geogenic gadoliniums were estimated by calculation as described in the “Materials and methods” section. As shown in Fig. 3, total gadolinium varies from 40 to 630 ng L<sup>-1</sup>. The presence of anthropogenic gadolinium was observed in all samples

**Fig. 2** Flow chart of experimental design used for biomarker analyses after exposure to Gd-DOTA under its pharmaceutical formulation in laboratory (Photoshop®)



reaching up to 67% of the total gadolinium. In 11 cases, the concentrations of anthropogenic Gd were significantly higher downstream the WWTPs when compared to the corresponding upstream locations.

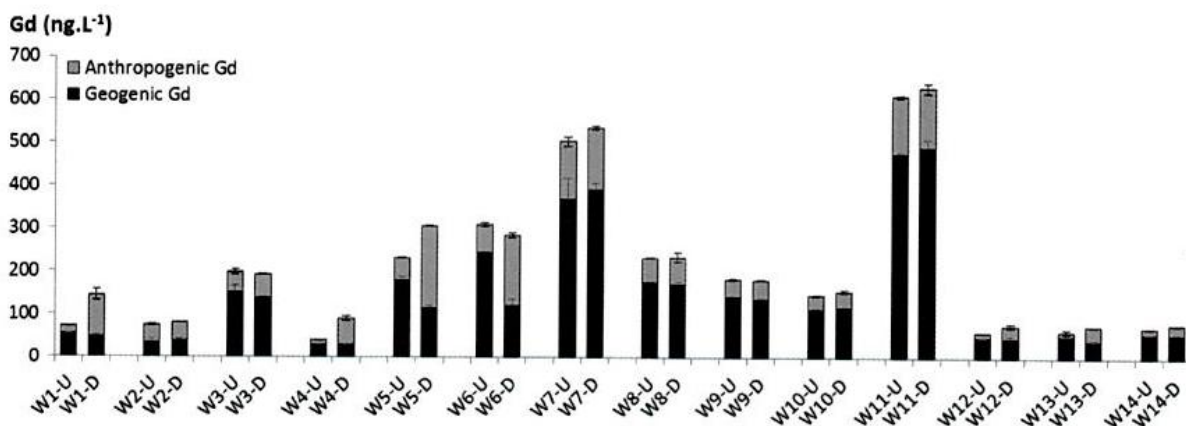
For two sites (W5 and W6), the geogenic part of Gd decreased from the upstream to the downstream location. At these sites, the same phenomenon was also observed for all rare earth elements and many other cations such as Al, Cr, Fe, Cu, and Pb (data not shown). It may be linked to the rejection from the WWTPs which might induce a precipitation of cationic elements. This hypothesis is supported by the observation of an increase in total alkalinity (TA) between the upstream and downstream locations of these two sites. The anthropogenic part of Gd is not concerned because of the chelation of Gd in this speciation. Concerning these two sites, the anthropogenic part of Gd showed significantly higher values in the downstream location when compared to the upstream one.

As previously shown in the literature (Telgmann 2013), contrast agents are the main origin of anthropogenic Gd in the

environment and these compounds are not retained by WWTPs in Europe due to the lack of specific treatments. The two sites W5 and W6 are located near WWTPs linked to the waste of important cities (Metz and Nancy). Then, it could be supposed that the difference in anthropogenic Gd between upstream and downstream locations is due to the rejection of Gd-CAs.

According to the amount of total and anthropogenic gadolinium concentrations and to the difference between upstream and downstream locations, we selected the station of Metz City (W5) (49.143911° N–6.197777° E) for an in situ experiment to determine whether a bioaccumulation of gadolinium in bivalves after 7- and 21-day exposures can occur.

Gadolinium concentrations and REE of interest were measured daily during the experiment. As previously described in the “Materials and methods” section, the anthropogenic and geogenic gadoliniums were obtained after measurements and calculations. The average anthropogenic gadolinium was significantly higher downstream the WWTP ( $24 \pm 10.8 \text{ ng L}^{-1}$  for

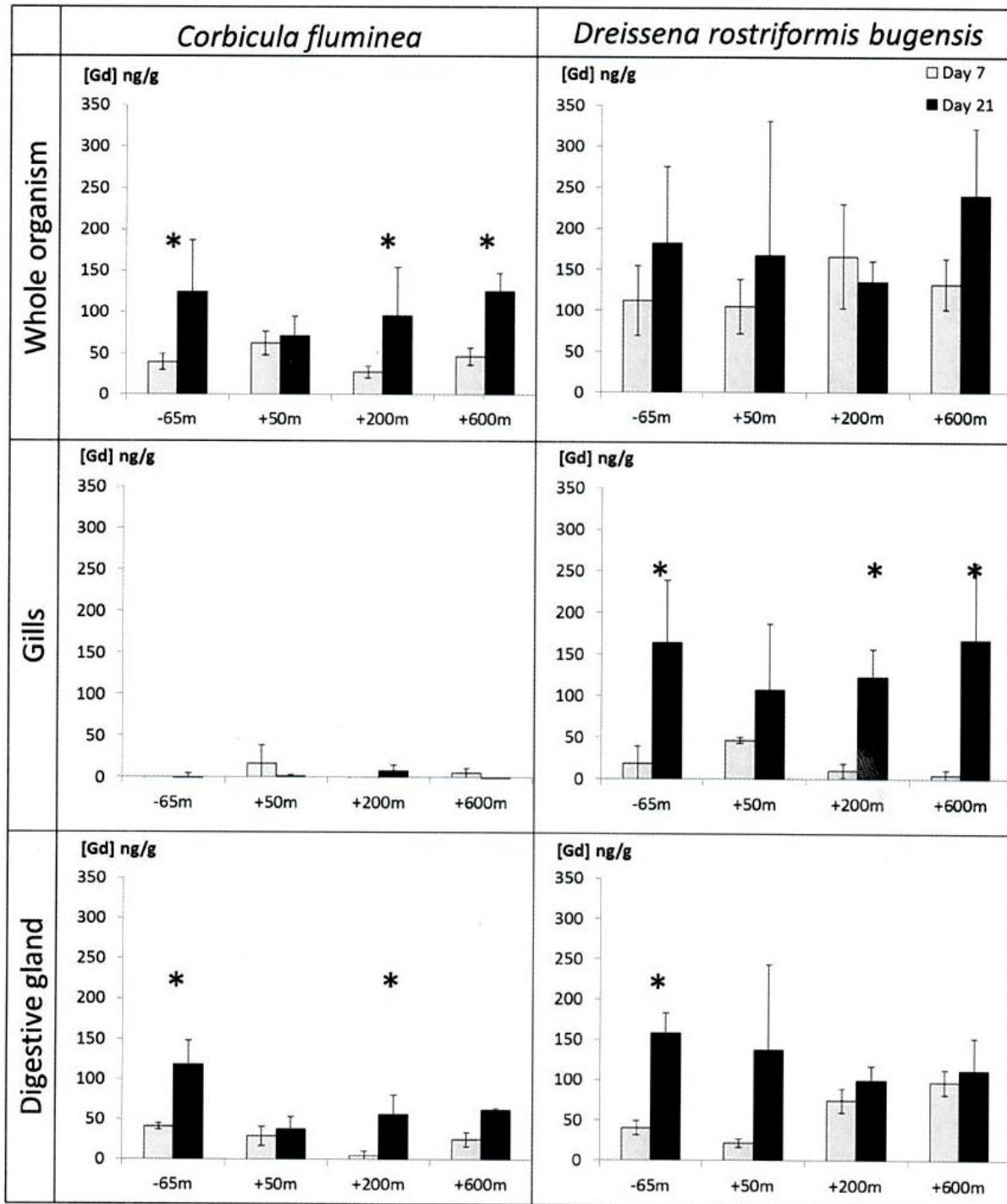


**Fig. 3** Anthropogenic and geogenic Gd concentrations measured upstream (U) and downstream (D) of each WWTP (W) (Photoshop®)

the 7-day exposure and  $36 \pm 19.4 \text{ ng L}^{-1}$  for the 21-day exposure) when compared to the upstream location ( $10 \pm 5.4 \text{ ng L}^{-1}$  for the 7-day exposure and  $13 \pm 5.2 \text{ ng L}^{-1}$  for the 21-day exposure). A high standard deviation was observed for the downstream values; this is in relation to important variations of anthropogenic gadolinium observed at the downstream location, certainly due to punctual release of WWTP effluents.

### Bioaccumulation of Gd after in situ exposure

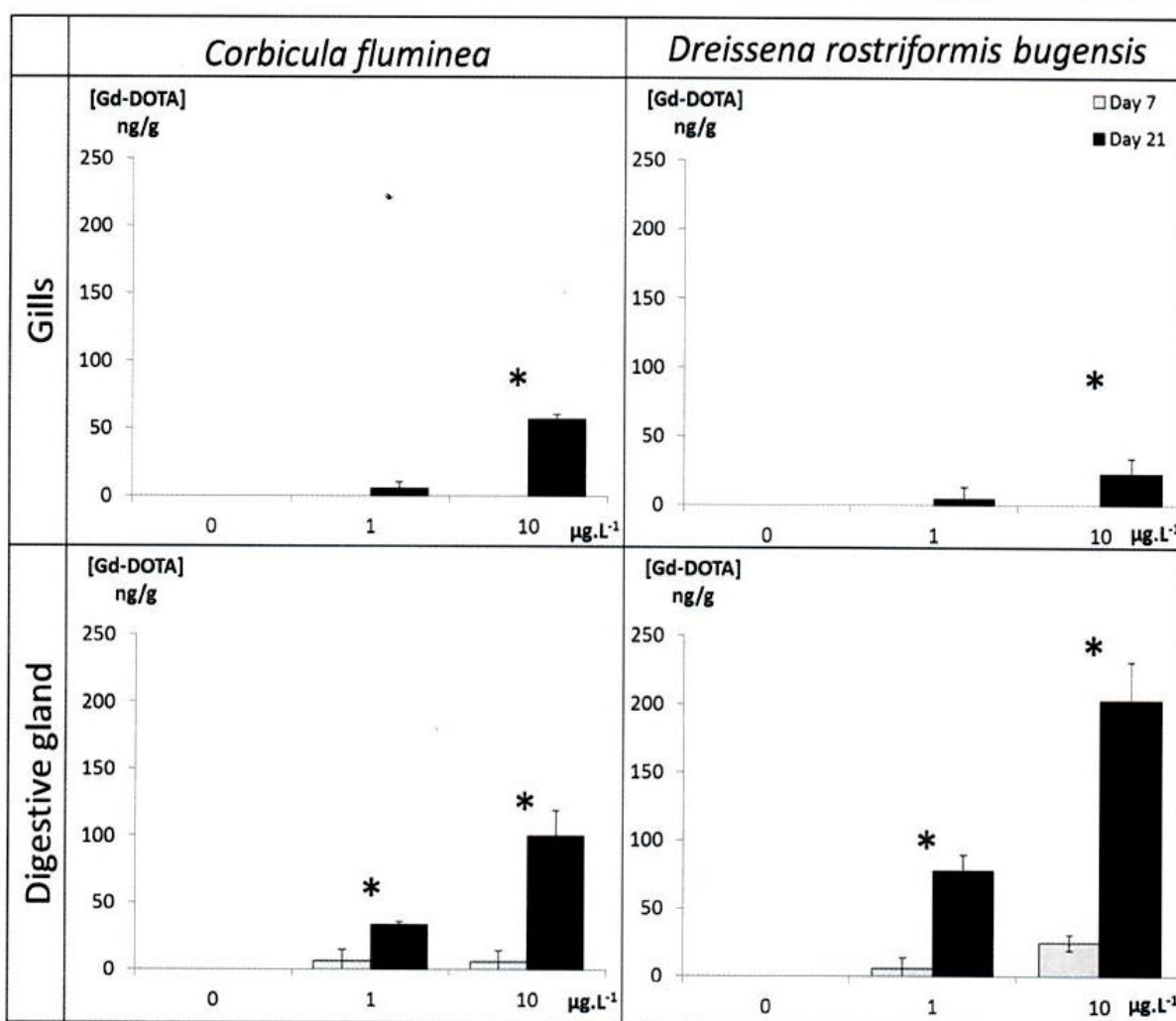
The results of the bioaccumulation of gadolinium in bivalves after a 7- and 21-day exposure upstream and downstream the WWTP are shown in Fig. 4. In the whole organism, for both organisms, no significant difference was observed between the upstream and the 600 m downstream locations after



Legend: \* = significant accumulation ( $\alpha = 0,05$ ) of Gd-DOTA into mussel's tissues between 7 and 21 days of exposure

**Fig. 4** Concentrations of Gd (nanograms per gram of dry weight tissue) in the whole organism, in the gills, and in the digestive gland of *Corbicula fluminea* and *Dreissena rostriformis bugensis*. Organisms were exposed

for 7 and 21 days along a section of the Mosel River close to a WWTP output (49.143911° N–6.197777° E) (Photoshop®)



Legend: \* = significant accumulation ( $\alpha = 0,05$ ) of Gd-DOTA into mussel's tissues between 7 and 21 days of exposure

Fig. 5 Concentrations of Gd based contrast agent in nanograms per gram of dry weight tissue, in the gills and the digestive gland of the two bivalve species after 7 and 21 days of exposure to 1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Gd-DOTA (Photoshop®)

21 days of exposure. This observation suggests that the WWTP effluents had no impact on the bioaccumulation of gadolinium in bivalves in our experimental conditions. For *C. fluminea* only, a significant increase in the bioaccumulation was observed between 7 and 21 days of exposure at -65, +200, and +600 m showing no differences between upstream and downstream locations too.

Considering the bioaccumulation in the gills, the values were close to zero after 7 and 21 days of exposure for *C. fluminea* and a time-dependent accumulation was observed for *D. rostriformis bugensis*. Considering the bioaccumulation in the digestive gland, this time dependence is only partially observed. The concentrations of gadolinium after 21 days of exposure are higher for *D. rostriformis bugensis*. The

Table 1 In situ and in laboratory calculation of bioaccumulation factors (BAF) for the digestive gland (DG) and the pair of gills (G) after exposure of each bivalve species

	<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>				<i>Corbicula fluminea</i>			
	DG		G		DG		G	
	7 days	21 days	7 days	21 days	7 days	21 days	7 days	21 days
In situ (200 m)	1732 ± 643	1691 ± 525	792 ± 440	2079 ± 924	456 ± 272	973 ± 782	0 ± 0	335 ± 241
In lab								
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	6.0 ± 5.8	77.8 ± 11.8	0.0 ± 0.0	4.7 ± 6.2	6.4 ± 6.2	33.4 ± 2.6	0.0 ± 0.0	5.4 ± 4.0
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.5 ± 0.5	20.3 ± 2.8	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.8	0.5 ± 0.6	10.0 ± 1.9	0.0 ± 0.0	5.7 ± 0.3

differences between the two bivalve species could be explained by a higher activity of the defense mechanisms in *C. fluminea*, especially in the gills. We can assume that the defense is mainly performed by multixenobiotic resistance mechanisms as previously described, (Achar 2004). This type of mechanisms could expel out of the gills the Gd part which is under Gd-CA speciation (main anthropogenic Gd) as well as other speciations of Gd which could be chelated to organic compounds or particles. To our knowledge, no specific pathways for the exclusion of free Gd and other REE have been described so far in the literature.

### Bioaccumulation of Gd after Gd-CA exposure

In order to investigate the bioaccumulation of anthropogenic gadolinium in bivalves, we have developed an experiment with gadoteric acid (trade name: Dotarem®) in controlled conditions of exposure in the lab. After 7 and 21 days of exposure to 1 or 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Dotarem®, the presence of gadolinium in the digestive gland and in the gills of the organisms was measured. As previously described (Telgmann et al. 2013; Brücher 2002), due to the high stability of the gadoteric acid (Dotarem®), no other origin of gadolinium was possible during this experiment. The results are presented in Fig. 5. Concerning the exposure to 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Dotarem®, no bioaccumulation was observed in the gills for *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea* after 7 days of exposure and very low concentrations of Gd were measured in this tissue after 21 days of exposure for both organisms. At the same exposure, a time-dependent bioaccumulation was observed in the digestive gland of both organisms and the values of Gd were higher in this tissue when compared to the gills. It could be assumed that the defense mechanisms are more efficient in the gills which are the first tissues in touch with the external medium due to the filtering activity. When the organisms were exposed to 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Dotarem®, the bioaccumulation was time-dependent for *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea* and the concentrations of Gd were always higher in the digestive gland when compared to the concentrations of the gills. Nevertheless, the concentrations of Gd in the digestive gland

were more important for *D. rostriformis bugensis* when compared to *C. fluminea* suggesting that the defense mechanisms in this tissue are more efficient for *C. fluminea*.

### Bioaccumulation factors

Bioaccumulation factors of gadolinium in the digestive gland and in the gills were calculated for both tissues after in situ and laboratory experiments. As described in Table 1, gadolinium accumulates in the bivalve tissues when organisms are exposed to a mixed solution of gadolinium (geogenic and anthropogenic during in situ experiment) or to only one gadolinium speciation (Gd-CAs during laboratory experiment). As observed in this table, BAF shows low values after the laboratory experiment when compared to the “in situ” experiment. It could be noted that the values of Gd expressed as nanograms per gram of dry tissue are of the same order in the two experiments (Table 2). Considering the equation described previously in the “Bioaccumulation measurements—Materials and methods” section, the difference of BAF values between in situ and in laboratory experiments can be attributed to the large difference in the concentration of Gd in the medium (1 or 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  during the laboratory experiment, an average of  $43 \pm 17 \text{ ng L}^{-1}$  after 7 days of exposure and an average of  $59 \pm 30 \text{ ng L}^{-1}$  after 21 days of exposure during the in situ experiment). It can be noted that high BAF are observed for *D. rostriformis bugensis* during the in situ experiment including in the gills after 7 days of exposure (timing without bioaccumulation in the gills for the other experiments). It can be assumed that *D. rostriformis bugensis* are particularly perturbed with in situ conditions may be due to the mixed pollution of WWTP waste.

Except for the digestive gland of *D. rostriformis bugensis* which show a similar BAF between 7 and 21 days of exposure during in situ experiment, BAFs are more important after 21 days of exposure during in situ and in laboratory experiments suggesting that the defense mechanism acts to minimize the bioaccumulation of Gd without stopping it.

As previously discussed (Bau and Dulski 1996; Kulaksız and Bau 2011; Telgmann et al. 2013), the main origin of

**Table 2** In situ and in laboratory measurements of Gd concentrations expressed in nanograms of Gd per gram of dry weight tissue for the digestive gland (DG) and the pair of gills (G) after exposure of each bivalve species

	<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>				<i>Corbicula fluminea</i>			
	DG		G		DG		G	
	7 days	21 days	7 days	21 days	7 days	21 days	7 days	21 days
In situ (200 m)	75 ± 15	100 ± 18	11 ± 9	123 ± 34	6 ± 0	57 ± 24	0 ± 0	8 ± 7
In lab								
1 $\mu\text{g L}^{-1}$	6.0 ± 5.8	77.8 ± 11.8	0.0 ± 0.0	4.7 ± 6.2	6.4 ± 6.2	33.4 ± 2.6	0.0 ± 0.0	5.4 ± 4.0
10 $\mu\text{g L}^{-1}$	25.0 ± 4.8	203 ± 27.8	0.0 ± 0.0	22.8 ± 8	5.4 ± 6.0	100.4 ± 19	0.0 ± 0.0	57.4 ± 3.0

**Table 3** Enzymatic activities measured for the digestive gland (a) and gills (b) after exposure of each bivalve species

	7 days			21 days		
	0 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>	0 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>
<b>(a)</b>						
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>						
ETS (µmol O <sub>2</sub> gFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	30.03 ± 7.32	28.15 ± 8.5	23.60 ± 7.7	17.80 ± 6.97	25.66 ± 12.66	17.33 ± 8.9
LOOH (µmol TBH gFW <sup>-1</sup> )	0.42 ± 0.09	0.18 ± 0.12	0.1 ± 0.02	0.14 ± 0.10	0.13 ± 0.12	0.20 ± 0.16
ACP activity (µmol gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	123.28 ± 23.17	78.18 ± 25.96	59.64 ± 5.5	60.18 ± 18.71	65.04 ± 21.31	71.49 ± 17.48
GST (µmol CDNB gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	276 ± 71	314 ± 108	503 ± 103*	291 ± 67	284 ± 121	303 ± 100
GPx (µmol NADPH gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	9.95 ± 8.11	37.99 ± 16.43	31.93 ± 19	21.31 ± 9.92	15.42 ± 8.84	15.23 ± 6.37
TAC (µmol Teq gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	41.24 ± 4.90	14.37 ± 2.37	18.77 ± 13.64	10.36 ± 3.68	12.48 ± 5.03	15.10 ± 9.65
LDH (µmol NADH gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	264 ± 42	201 ± 63	267 ± 72	153 ± 3	170 ± 20	171 ± 62
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	296 ± 92	169 ± 45	203 ± 95	165 ± 96	137 ± 50	139 ± 60
<i>Corbicula fluminea</i>						
ETS (µmol O <sub>2</sub> gFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	35.9 ± 7.85	36.14 ± 10.15	54.98 ± 13.59*	29.97.0 ± 3.46	21.52 ± 6.61	21.04 ± 1.69
LOOH (µmol TBH gFW <sup>-1</sup> )	0.48 ± 0.18	0.40 ± 0.14	0.77 ± 0.22*	0.33 ± 0.02	0.23 ± 0.10	0.23 ± 0.01
ACP activity (µmol gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	62.32 ± 27.72	55.09 ± 16.37	60.00 ± 12.84	180.06 ± 38.90	173.24 ± 7.01	177.23 ± 14.23
GST (µmol CDNB gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	487 ± 321	361 ± 125	483 ± 129	426 ± 50	624 ± 205	593 ± 144
GPx (µmol NADPH gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	58.40 ± 26.12	62.24 ± 12.15	65.81 ± 19.51	32.29 ± 10.13	41.31 ± 8.32	34.07 ± 5.29
TAC (µmol Teq gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	39.14 ± 20.81	24.94 ± 5.65	35.95 ± 6.97	4.30 ± 1.60	5.23 ± 2.39	7.22 ± 1.95
LDH (µmol NADH gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	164 ± 74	130 ± 15	159 ± 22	104 ± 13	122 ± 28	125 ± 11
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	219 ± 102	123 ± 49	150 ± 43	65 ± 22	114 ± 37	95 ± 32
<b>(b)</b>						
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>						
ETS (µmol O <sub>2</sub> gFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	9.35 ± 1.78	7.43 ± 1.14	7.56 ± 1.66	11.27 ± 3.58	11.11 ± 2.62	9.67 ± 0.89
LOOH (µmol TBH gFW <sup>-1</sup> )	0.47 ± 0.10	0.38 ± 0.15	0.52 ± 0.11	0.41 ± 0.04	0.50 ± 0.13	0.44 ± 0.05
ACP activity (µmol gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	61.95 ± 9.34	70.39 ± 10.81	73.76 ± 15.28	59.86 ± 12.17	68.86 ± 8.92	71.05 ± 10.35
GST (µmol CDNB gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	200 ± 35	227 ± 18	214 ± 53	276 ± 88	193 ± 50	257 ± 45
GPx (µmol NADPH gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TAC (µmol Teq gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LDH (µmol NADH gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	119 ± 40	123 ± 38	154 ± 47	154 ± 70	127 ± 51	113 ± 35
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	100 ± 21	99 ± 26	90 ± 18	171 ± 77	122 ± 37	137 ± 32
<i>Corbicula fluminea</i>						
ETS (µmol O <sub>2</sub> gFW <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	39.69 ± 20.73	47.07 ± 13.45	47.20 ± 8.00	101.06 ± 44.07	53.33 ± 18.60	44.06 ± 9.47
LOOH (µmol TBH gFW <sup>-1</sup> )	0.85 ± 0.41	1.12 ± 0.33	1.08 ± 0.19	0.47 ± 0.18	0.34 ± 0.09	0.55 ± 0.16
ACP activity (µmol gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	37.32 ± 9.76	38.00 ± 5.77	33.21 ± 2.66	27.69 ± 4.45	31.55 ± 3.60	29.97 ± 5.39
GST (µmol CDNB gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	31 ± 6	33 ± 8	28 ± 7	19 ± 10	31 ± 10	25 ± 4
GPx (µmol NADPH gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TAC (µmol Teq gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LDH (µmol NADH gprot <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	60 ± 13	72 ± 44	44 ± 11	56 ± 27	70 ± 13	70 ± 12
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gprot <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	46 ± 22	41 ± 10	45 ± 17	24 ± 11	34 ± 7	46 ± 9

n.d. not determined

\*Significant effect of Gd-DOTA exposure on biomarker concentration (α = 0.05)

anthropogenic gadolinium in the rivers is contrast agents released after MRI examinations. So, the presence of anthropogenic gadolinium in the areas for field study suggests the presence of contrast agents in the river. During the in situ exposure, the bivalves were in the presence of a mixture of geogenic and

anthropogenic gadoliniums and in these conditions, we observed that gadolinium can bioaccumulate in the bivalve tissues. Nevertheless, due to our technical approach, i.e., measurement of gadolinium concentrations by using ICP-MS analysis, we could not distinguish the part of the anthropogenic

gadolinium in the bivalve tissues. The proof of a possible bioaccumulation of gadolinium coming from a contrast agent structure was observed during the experiment with gadoteric acid (Dotarem®) conducted in controlled conditions.

### Biochemical impacts after Gd-CA exposure

The bioaccumulation of Gd-CAs in bivalve tissues raises the question of the induction of effects in these tissues. In order to assess potential effects, the activities of several biomarkers were measured in the same conditions of exposure (7 and 21 days with 1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of gadoteric acid (Dotarem®)). The results of the enzymatic activities in the digestive gland are summarized in Table 3 (a). On the one hand, no variation was observed when compared to controls neither after a 21-day exposure in the presence of 1 or 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Gd-DOTA nor after a 7-day exposure in the presence of 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Gd-DOTA. On the other hand, after a 7-day exposure to 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  Gd-DOTA in the medium, a significant increase of GST activity compared to controls was observed in the digestive gland of *D. rostriformis bugensis* when an increase in lipid hydroperoxide and mitochondrial electron transfer system was observed in the digestive gland of *C. fluminea*.

These variations suggested a transient response in both organisms with a faster response in *D. rostriformis bugensis*. Indeed, the response (GST activity increase) was already functional in *D. rostriformis bugensis* after 7 days of exposure suggesting an early suppression of any effects. In the case of *C. fluminea*, a proof of toxicity (lipid peroxidation) and an increase in energy expenditure (mitochondrial electron transfer system) were observed after a 7-day exposure but disappeared after a 21-day one. Moreover, all biomarkers displayed a basic value at 21 days of exposure, suggesting a response and the deletion of toxic effects between 7 and 21 days of exposure in the digestive gland of *C. fluminea*.

All these responses in the digestive gland of *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea* are supposed to be a consequence of the substantial bioaccumulation, previously described, in this tissue. As for the biochemical activities in the gills, no significant variations were observed during our experiments (Table 3 (b)). Combined with the results previously described, i.e., low bioaccumulation of Gd in the gill tissue, these results agree with the hypothesis assuming that the first defense mechanism (supposed to be an exclusion system such as the multixenobiotic resistance mechanism) acts to expel xenobiotics out of the cell. In this way, the bioaccumulation of Gd is limited, minimizing cell toxicity and therefore biochemical responses.

### Conclusion

Bau and Dulski (1996), Telgmann et al. (2013), and Lindner et al. (2013) demonstrated that the presence of anthropogenic

gadolinium in the environment originates from the release of Gd-CAs from wastewater treatment plants after hospital waste treatment. These results concur with the speciation of Gd in this river which is mostly dominated by Gd-based MRI contrast agents. These compounds avoid the release of free Gd in the river but little is known concerning their bioavailability for aquatic organisms. Merschel and Bau (2015) showed that the anthropogenic Gd located in the Rhine river is not incorporated into the shells of bivalves. In this study, in situ experiments conducted close to WWTP releases enabled us to observe the accumulation of Gd in the gills and in the digestive glands of bivalves. Although our technical approach could not differentiate between free Gd and Gd-based contrast agents, we observed a high Gd anomaly; therefore, we can assume that a part of the Gd measured into the gills and the digestive glands of the bivalves certainly comes from Gd-CA speciation. Moreover, during laboratory experiments, we observed that anthropogenic gadolinium (introduced into the medium as Gd-DOTA) can be bioaccumulated under controlled conditions into the smooth tissues of bivalves such as the digestive gland and the gills. Gd-DOTA is the most stable contrast agent used during MRI exams, so, it can be assumed that Gd-DOTA can be bioaccumulated in tissues of bivalves in rivers close to WWTP outputs. The results of Gd bioaccumulation and biochemical responses measured in *D. rostriformis bugensis* and *C. fluminea* suggest that the first defense mechanisms (i.e., the exclusion system) are more relevant to the gills of these organisms when compared to the digestive gland and do not perform with the same efficiency in the two bivalves.

Our biochemical approach suggested that Gd bioaccumulation can induce some responses, i.e., an induction of GST activity, lipid hydroperoxide, and mitochondrial electron transfer system, but a return to the basic activities is observed within 21 days of exposure. This observation is characteristic of a biochemical acclimation to the presence of a pollutant.

As demonstrated by McDonald et al. (2015) in humans after intravenous administration of Gd-CAs, our findings suggest that Gd-CAs could accumulate in the tissues of bivalves without any diseases at that moment but it is now time to wonder about the fate of that bioaccumulated Gd-CAs in bivalves. Even if showing a high stability, how long will Gd-CAs stay unmodified after bioaccumulation? Will Gd be released from the contrast agent and such a case, what will be the risk of toxicity concerning the released Gd in the tissues be?

It could be interesting to observe the bioaccumulation for more than 21 days of exposure to assess if a stability could be achieved after long exposure.

**Acknowledgments** The authors are grateful to Philippe Wagner for his help with water sampling, and they warmly thank Mrs. Doyen for her English corrections.

This work has been supported by the Lorraine region; by the French National Research Agency through the Investissements d'avenir national program, with the following reference: ANR-10-LABX-21-01/LABEX



RESSOURCES 21; and by the CNRS-INSU coordination through the EC2CO-ECODYN program.

## References

- Abraham JL, Thakral C (2008) Tissue distribution and kinetics of gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol* 66:200–207
- Achard M (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat Toxicol* 67:347–357. doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.014
- Bau M, Dulski P (1996) Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters. *Earth Planet Sci Lett* 143:245–255. doi:10.1016/0012-821X(96)00127-6
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133–140
- Bellin MF, Van Der Molen AJ (2008) Extracellular gadolinium-based contrast media: an overview. *Eur J Radiol* 66:160–167
- Brücher E (2002) Kinetic stabilities of gadolinium(III) chelates used as MRI contrast agents. In: Krause W (ed) *Contrast agents I. Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 103–122
- Elbaz-Poulichet F, Seidel JL, Othoniel C (2002) Occurrence of an anthropogenic gadolinium anomaly in river and coastal waters of southern France. *Water Res* 36:1102–1105. doi:10.1016/S0043-1354(01)00370-0
- Garaud M, Trapp J, Devin S, Cossu-Leguille C, Pain-Devin S, Felten V, Giamberini L (2015) Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO<sub>2</sub>) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquat Toxicol* 158:63–74. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.004
- 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. doi:10.1016/S0045-6535(97)00031-3
- Idée J-M, Fretellier N, Thurnher MM, Bonnemain B, Corot C (2015) Physico-chimie et profil toxicologique d'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique, les chélates de gadolinium. *Ann Pharm Fr* 73:266–276. doi:10.1016/j.pharma.2015.01.001
- 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 Planet Sci Lett* 362:43–50. doi:10.1016/j.epsl.2012.11.033
- Kulaksız S, Bau M (2011) Anthropogenic gadolinium as a microcontaminant in tap water used as drinking water in urban areas and megacities. *Appl Geochem* 26:1877–1885. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.06.011
- Lawrence MG, Ort C, Keller J (2009) Detection of anthropogenic gadolinium in treated wastewater in South East Queensland. *Australia Water Res* 43:3534–3540. doi:10.1016/j.watres.2009.04.033
- Lindner U, Lingott J, Richter S, Jakubowski N, Panne U (2013) Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405:1865–1873
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, Williamson EE, Eckel LJ (2015) Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 275:772–782. doi:10.1148/radiol.15150025
- 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. *Sci Total Environ* 533:91–101. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.042
- Merschel G, Bau M, Baldewein L, Dantas EL, 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 Geosci* 347:284–293. doi:10.1016/j.crte.2015.01.004
- 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. doi:10.1021/es010235q
- NF EN ISO 9963-1 (1996) *Qualité de l'eau—Détermination de l'alcalinité - Partie 1 : détermination de l'alcalinité totale et composite*
- Nozaki Y, Lerche D, Alibo DS, Tsutsumi M (2000) Dissolved indium and rare earth elements in three Japanese rivers and Tokyo Bay: evidence for anthropogenic Gd and In. *Geochim Cosmochim Acta* 64:3975–3982. doi:10.1016/S0016-7037(00)00472-5
- Sato T, Ito K, Tamada T, Kanki A, Watanabe S, Nishimura H, Tanimoto D, Higashi H, Yamamoto A (2013) Tissue gadolinium deposition in renally impaired rats exposed to different gadolinium-based MRI contrast agents: evaluation with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Magn Reson Imaging* 31:1412–1417. doi:10.1016/j.mri.2013.03.025
- Taylor, S.R., McLennan, S.M. (1985) *The continental crust: its composition and evolution*. 312 pp. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne: Blackwell Scientific., *Geological Magazine*
- Telgmann L, Sperling M, Karst U (2013) Determination of gadolinium-based MRI contrast agents in biological and environmental samples: a review. *Anal Chem Acta* 764:1–16. doi:10.1016/j.aca.2012.12.007
- Telgmann L, Wehe CA, Birka M, Künnemeyer J, Nowak S, Sperling M, Karst U (2012) Speciation and isotope dilution analysis of gadolinium-based contrast agents in wastewater. *Environ Sci Technol* 46:11929–11936. doi:10.1021/es301981z
- 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. *Bull Chem Soc Jpn* 77:1835–1842. doi:10.1246/bcsj.77.1835







# Résumé

L'utilisation de plus en plus fréquente des agents de contraste à base de Gd (AC-Gd) au cours des examens d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), engendre le rejet de ces produits pharmaceutiques dans les eaux usées retraitées en Station d'Épuration (STEP). En l'absence de retraitement spécifique de ces AC-Gd en STEP, ils sont rejetés dans le milieu aquatique, où de nombreuses études ont relevé leur présence aussi bien dans les eaux de surface que dans les eaux souterraines et jusqu'à l'eau du robinet. Le manque de connaissances concernant les effets des AC-Gd suite à leur rejet a mis en évidence la nécessité d'étudier leurs impacts environnementaux sur les organismes vivants dans les milieux aquatiques.

Dans ce contexte, nous avons choisi de déterminer les concentrations en Gd d'origine anthropique à proximité de rejets de STEP et de zones de captage en eau potable situés en région Lorraine. Nos mesures ont permis de montrer la présence Gd d'origine anthropique sur l'ensemble des échantillons prélevés, avec des concentrations mesurées comprises de quelques ng(Gd)/L à quelques dizaines de µg(Gd)/L. Ces concentrations de Gd anthropique seraient dues à la présence d'AC-Gd.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effets de l'AC-Gd le plus stable et l'un des plus fréquemment commercialisé : le Gd-DOTA (Dotarem®). Pour cela, nous avons choisis plusieurs espèces représentatives des taxons rencontrés dans les cours d'eau Lorrains. Des essais ont été menés en conditions contrôlées de laboratoire afin de mesurer l'accumulation du Gd-DOTA dans les tissus et les effets de l'AC-Gd ont été appréhendés au travers de mesures de croissance, de reproduction et de mortalité au niveau individuel chez les microalgues vertes unicellulaires (*Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata*), chez un microcrustacé (*Daphnia magna*) et chez un vertébré aquatique (*Danio rerio*) exposés à des concentrations en Gd-DOTA réalistes d'un point de vue environnemental. L'accumulation du Gd-DOTA a aussi été mesurée chez les bivalves (*Corbicula fluminea* et *Dreissena rostriformis bugensis*) et comparée à des mesures d'accumulation du Gd *in situ*. Les réponses physiologiques des bivalves ont été évaluées à l'aide d'une batterie de 11 biomarqueurs dans leurs branchies et leur glande digestive. Les effets de l'AC-Gd ont également été étudiés *in vitro* sur des fibroblastes de *D. rerio* (cellules ZF4 - ATCC-2050). Nos travaux ont montré que les AC-Gd et le Gd-DOTA en particulier étaient responsables d'effets écotoxiques indirects à différents niveaux d'organisation biologiques. Seuls les bivalves accumulent le Gd-DOTA mais tous les individus semblent mettre en place des mécanismes de dépuración pour parer à la toxicité de l'AC-Gd.

Les résultats obtenus au cours de cette recherche ont confirmé la nécessité d'un suivi des concentrations en AC-Gd dans le milieu aquatique et la nécessité d'approfondir les études de l'écotoxicité de ces produits pharmaceutiques. Ceci pourra aboutir à une évaluation pertinente de leur risque environnemental et de proposer des solutions pour la gestion environnementale de ces composés.

**Mots-clés :** Gd-DOTA (Dotarem®) ; Bioaccumulation ; Ecotoxicité des agents de contraste à base de Gadolinium ; Biomarqueurs ; Gadolinium d'origine anthropique ; Analyses ICP-MS.

---

## Abstract

The increasing use of Gadolinium-based Contrast Agents (Gd-CA) for Magnetic Resonance Imaging (MRI) results in their rejection in Waste Water Treatment Plants (WWTPs). Due to the lack of specific recycling process in European WWTPs, these pharmaceutical produces enter the aquatic environment from river to tap water. The effects of Gd-CA in aquatic media have been not studied yet. The lack of knowledge about these effects highlighted the need to study their environmental impacts on aquatic organisms.

In this context, we decided to measure anthropogenic concentrations of Gd in the aquatic environment in the Lorraine region (France) closed to WWTPs outputs and catchment areas used for drinking water. Our measurements underlined the presence of anthropogenic Gd on all the collected samples at concentrations ranging from few ng/L to several dozen of µg/L.

In this research we focused on the effects of the most frequently used Gd-CA, the gadoteric acid (Gd-DOTA - Dotarem®) which is also the most stable one. Several representative species of aquatic environment were selected for ecotoxicological assays: *i.e.* unicellular green microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*), microcrustacean (*Daphnia magna*) and aquatic vertebrate (*Danio rerio*). Assays were conducted in laboratory under controlled conditions as well as *in situ*. Gd-DOTA accumulation was measured in the tissues of the different organisms. Environmental realistic concentrations of Gd-CA were used to assess their effects at the individual level by means of growth, reproduction and mortality measurements. The Gd-DOTA accumulation was also measured in bivalves' tissues (*Corbicula fluminea* and *Dreissena rostriformis bugensis*) and compared to Gd ones *in situ* in these organisms. Physiological responses were assessed based on a battery of 11 complementary biomarkers measured in the digestive gland and in the gills of both bivalve species. At cellular level, the effects of Gd-DOTA were studied *in vitro* on *D. rerio* fibroblasts (ZF4 – ATCC-2050). Indirect ecotoxicological effects of Gd-CA and of Gd-DOTA especially have been highlighted at all biological levels. Accumulation of Gd-DOTA was observed in bivalves only, but defense systems were mobilized in all organisms to limit toxicity.

Our results demonstrated that following both research on ecotoxicological effects of the Gd-CA and evolution of their concentrations in aquatic ecosystem are necessary to assess more precisely their environmental risk and to propose solutions for their environmental management.

**Key-words:** Gd-DOTA (Dotarem®); Bioaccumulation; Gadolinium-based Contrast Agents ecotoxicity; Biomarkers; Anthropogenic Gadolinium; ICP-MS analysis.