

Sommaire

Remerciements	2
Table des figures.....	5
Table des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	6
I) Introduction.....	7
A) Contexte	7
B) La structure d'accueil	8
C) Présentation et déroulé de la mission.....	10
II) Matériel et méthodes	10
A) Site étudié : l'estuaire de la Loire	10
B) Les échantillons	11
1) Prélèvements réalisés en 2014.....	11
2) Prélèvements réalisés en 2021.....	12
C) Préparation des échantillons pour l'analyse des ETR.....	16
1) Dissection	16
2) Congélation	16
3) Lyophilisation	16
4) Broyage.....	17
5) Minéralisation à froid et à chaud	17
6) Evaporation à sec	17
7) Mise en suspension	17
D) Analyse à l'aide de l'ICP-MS	17
1) Principe de l'ICP-MS	17
2) Etalon interne.....	18
3) Ajouts dosés	19
4) Dilution	20
E) Analyse	20
1) Les limites de détection et de quantification.....	20
2) Validation de la méthode	21
3) Calculs des concentrations en ETR	21
4) Analyse statistique	22
II) Résultats et discussion	22
A) Biométrie.....	22
B) Comparaison inter-espèces (Année 2021).....	23

C)	Distribution des terres rares (Année 2021).....	26
D)	Normalisation des terres rares (Année 2021).....	26
E)	Comparaison interannuelle 2014-2021 : <i>Anguilla anguilla</i> et <i>Chelon ramada</i>	28
F)	Discussion.....	29
1)	La dilution au sein du réseau trophique.....	29
2)	Prédominance des LREE	30
IV)	Conclusion	31
	Bibliographie.....	32
	Annexes	34

Table des figures

Figure 1 : Usages des terres rares industrielles, (LORTHOLARIE, 2021).....	7
Figure 2 : Champs disciplinaires de l'équipe ECEM, Source : MMS.....	9
Figure 3 : Carte de l'estuaire de la Loire, Source : Loire Atlantique	11
Figure 4 : <i>Anguilla anguilla</i> , Source : Olivier	12
Figure 5 : <i>Chelon ramada</i> , Source : Olivier	12
Figure 6 : <i>Scrobicularia plana</i> , Source : Doris	13
Figure 7 : <i>Limecola balthica</i> , Source : Doris.....	13
Figure 8 : <i>Nephtys hombergii</i> , Source : Marinespecies.....	14
Figure 9 : <i>Nereis diversicolor</i> , Source : Olivier	14
Figure 10 : <i>Heteromastus filiformis</i> , Source : Marinespecies	14
Figure 11 : <i>Coruphium volutator</i> , Source : Doris.....	15
Figure 12 : Place des différentes espèces dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire (Chouvelon 2015)	15
Figure 13 : La Lyophilisation Source : Biopharma Technologies France	16
Figure 6 :	16
Figure 15 : ICP-MS, Source : Olivier	18
Figure 16 : Etapes de l'ICP-MS, source : Olivier.....	18
Figure 17 : Concentrations ($\mu\text{g/g}$ poids sec (PS)) de LREE, MREE, HREE et REE TOT chez les différentes espèces étudiées	25
Figure 18: Distribution des différentes ETR au sein des espèces étudiées	26
Figure 19 : : Normalisation des terres rares (sur une échelle logarithmique) dans les différentes espèces avec l'European Shale.....	27
Figure 20 : Comparaison interannuelle des concentrations en ETR ($\mu\text{g/g}$ PS) chez <i>Anguilla anguilla</i> et <i>Chelon ramada</i>	28

Table des tableaux

Tableau 1: Gamme étalon interne	19
Tableau 2 : Préparation des solutions étalons pour ajout dosé.....	19
Tableau 3 : Facteur de dilution des différents organismes	20
Tableau 4 : LOQ, Limite de quantification ($\mu\text{g/L}$)	21
Tableau 5 : Biais relatifs obtenus pour les différents ETR analysés	21
Tableau 6: Pourcentage de quantification obtenu sur les espèces prélevées en 2014.....	22
Tableau 7 : Pourcentage de quantification obtenu sur les espèces prélevées en 2021	22
Tableau 8: Résumé des résultats biométriques 2021	22
Tableau 9 : Résumé résultats biométriques 2014.....	23
Tableau 10 : Pourcentage de quantification, Année 2014	24
Tableau 11 : Pourcentage de quantification, Année 2021.....	24
Tableau 12 : Statistiques complémentaires à la figure 9	25
Tableau 13 : Concentration en ETR (mg/kg) dans l'European Shale (Bau et al., 2018).....	27

Liste des abréviations

Ce : Cérium

CRM : Certified Reference Material

Dy : Dysprosium

Er : Erbium

ETR : Éléments terres rares

Eu : Europium

EUS : European Shale

Gd : Gadolinium

Ho : Holmium

HREE : High Rare Earth Element; Terres rares lourdes

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

IRM : Imagerie par résonnance magnétique

La : Lanthane

Lu : Lutécium

LREE: Light Rare Earth Element ;Terres rares légères

MMS : Mer molécules santé

MO : Matière organique

MREE : Medium Rare Earth Element;Terres rares moyennes

Nd : Néodyme

Pm: Prométhium

Pr : Praséodyme

Re : Rhénium

Sc : Scandium

Sm : Samarium

Tb : Terbium

Tm : Thulium

Y : Yttrium

Yb : Ytterbium

I) Introduction

A) Contexte

Afin d'acquérir de nouvelles compétences pour renforcer mes connaissances obtenues durant ma 4^e année d'école d'ingénieurs, j'ai réalisé un stage au sein d'un laboratoire de recherche ; Mer, Molécules, Santé de l'université de Nantes. Mon projet professionnel étant de m'orienter vers les milieux estuariens et marins ainsi que leur contamination en polluants, ce stage sur la distribution en éléments terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire était le projet parfait afin de vérifier ma future orientation professionnelle.

Depuis quelques années, les cycles naturels des éléments terres rares sont perturbés en raison de leurs multiples usages anthropiques. Avec leurs différentes propriétés magnétiques, électroniques et optiques très attrayantes, beaucoup de nouvelles technologies innovantes ont été créées que ce soit dans le domaine de l'éolien, des batteries, etc..(Christmann 2011). Par exemple, le lanthane est utilisé pour réaliser des alliages magnétiques ainsi que pour la fabrication de verres optiques. Le néodyme, lui, est utilisé dans l'industrie pharmaceutique comme pour la fabrication d'aimants puissants. Les terres rares sont utilisées dans de nombreux domaines d'industries tels que les aimants permanents, les alliages métallurgiques, les applications catalytiques..., ((Terres rares : Dossier complet | Techniques de l'Ingénieur s. d.), Figure 1.

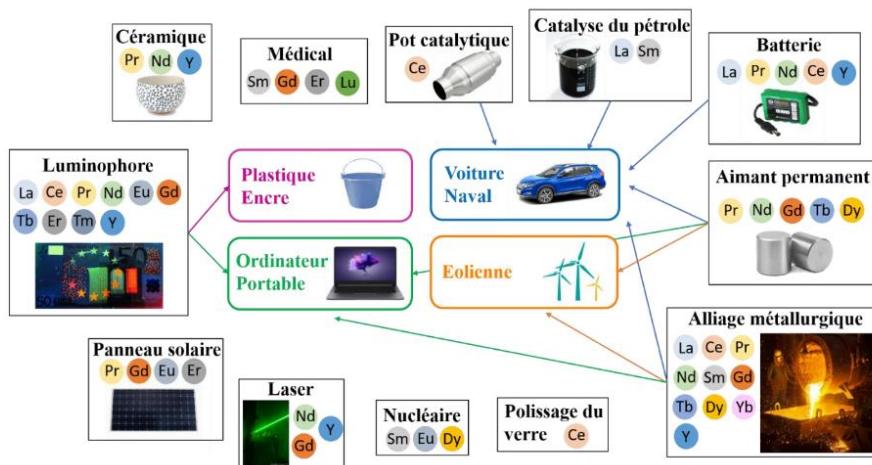


Figure 1 : Usages des terres rares industrielles, (LORTHOLARIE, 2021)

Entre 1990 et 2010, la production mondiale de terres rares a augmenté de 4% par an (Christmann 2011). Cette croissance d'utilisation des terres rares causent de nombreux déchets qui se retrouvent dans l'hydrosphère.

C'est en 1996, qu'une première étude a démontré qu'il y avait des anomalies anthropiques de terres rares présentes dans la nature. Dans les rivières drainant des zones à fortes populations ou très industrialisées, une anomalie anthropique de Gadolinium, terre rare utilisée dans l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a été détectée (Bau et Dulski 1996).

Les terres rares (ETR) regroupent un ensemble de 17 métaux aux propriétés physico-chimiques très intéressantes, dépendant de leur rayon ionique ainsi que de leur degrés d'oxydation. Elles possèdent une configuration électronique similaire à une couche 4f interne partiellement remplie leur conférant alors des propriétés magnétiques. Les 15 lanthanides (du Lanthane Z = 57 au Lutétium Z = 71) ainsi que le Scandium Z = 21 et l'Yttrium Z = 39 (Annexe 1) y sont compris. Ce groupe de métaux est présent

dans la croûte terrestre naturellement (de 0.5 à 66,5 ppm selon les ETR), cependant des anomalies positives peuvent être détectées s'il y a une surutilisation de celles-ci.

Avec la révolution industrielle, des technologies innovantes ne cessent d'être inventées. De plus, avec l'expansion des énergies vertes ; l'éolien, les panneaux solaires, les voitures électriques, étant de grandes consommatrices de terres rares, la consommation en terres rares augmente alors d'années en années. Néanmoins, l'extraction des ETR nécessitent des processus très polluants. En effet, il est quasiment impossible de trouver une ETR seule dans la nature, elles sont toujours associées à d'autres molécules, ce qui en rend l'extraction extrêmement difficile et polluante.

Concernant la contamination des milieux par les ETR, certaines peuvent être bioaccumulées par certaines espèces ; c'est-à-dire qu'elles peuvent s'accumuler dans une espèce. Cela va dépendre de leur biodisponibilité, si la quantité de terre rare ingérée par une espèce est supérieure à celle excrétée par l'espèce, il y aura alors bioaccumulation. D'après une étude, certaines terres rares peuvent se bioaccumuler dans le foie des poissons, ce qui va donc affecter les enzymes de ceux-ci (Y. Chen et al. 2000). Les terres rares peuvent avoir des effets nocifs sur les organismes aquatiques, (Robert et al. 2018), c'est pour cela qu'un travail sur leur distribution dans le réseau trophique représentant les différents échanges au sein d'un écosystème à travers la chaîne alimentaire ; est nécessaire.

Dans le cadre de ce stage, la distribution en terres rares sera étudiée dans un milieu particulier ; les estuaires. Ceux-ci sont des milieux naturels vulnérables susceptibles d'être impactés en raison de la forte pression anthropique dans ces zones.

L'estuaire de la Loire est l'exutoire du plus grand bassin versant de France, 117 km², (Thibault de Chanvalon et al. 2016). Celui-ci s'étend sur plus de 80 km en amont de Saint-Nazaire, (IFREMER, 1992). Il est le réceptacle de nombreux polluants provenant des activités industrielles, agricoles et des aires urbaines. De plus, cet estuaire contient le 4^e port français ; le port de Nantes et Saint-Nazaire. Cet estuaire a donc une forte valeur économique et sociétale.

Cependant, ces zones estuariennes sont primordiales pour la faune et la flore, ce sont des écotones entre mer et eau douce. Cela les rend alors à haute productivité et crée des habitats très spécifiques recherchés par différentes espèces, (IFREMER, 1992).

L'approfondissement des connaissances sur la distribution des terres rares dans les estuaires est un réel enjeu environnemental. Ces milieux récoltent les nombreuses pollutions qui ont été rejetées dans les fleuves et rivières. Dans ces estuaires cohabitent une faune et une flore, il est donc primordial d'étudier ces différentes pollutions rejetées dans les cours d'eau. L'objectif de ce stage est d'évaluer les niveaux de contamination et la distribution des terres rares dans différentes espèces des réseaux trophiques de l'estuaire de Loire, de la macrofaune aux poissons.

Dans un premier temps, une présentation de la structure d'accueil sera effectuée et une présentation des missions et du déroulement du stage sera fait. Ensuite, les matériels et les méthodes de cette expertise seront présentés. Pour poursuivre, une interprétation des résultats et une discussion sera proposée. Pour finir, un retour sur cette première expérience en laboratoire de recherche sera réalisé.

B) La structure d'accueil

Le laboratoire Mer Molécules Santé (MMS) est la structure qui m'a accueillie durant mon stage de 4^e année d'école d'ingénieurs. C'est une équipe d'accueil de recherche ayant été créée en 2008 et reliée à l'Université de Nantes, l'UFR Sciences et Techniques ainsi qu'à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. Cette structure est située sur 4 sites : à Nantes, au Mans, à Laval ainsi qu'à Angers. 130 personnes travaillent au sein de ce laboratoire dont 53 enseignants-chercheurs, 55 doctorants et post-doctorants et 22 personnels administratifs et techniques.

L'objectif premier de ce laboratoire de recherche est d'étudier la diversité, le fonctionnement et les perturbations des écosystèmes marins côtiers afin de proposer une gestion durable et intégrée et de valoriser ces écosystèmes pour la santé humaine ou l'industrie.

En 2012, il y avait seulement trois équipes dans le laboratoire, mais depuis 2017, il compte cinq équipes :

- Equipe 1 : Remote Sensing & Benthic Ecology, RSBE ; spécialisée en écosystèmes benthiques intertidaux et utilisent une approche à multi-échelle grâce à la télédétection.
- Equipe 2 : Écotoxicologie des contaminants émergents en milieux côtiers et estuariens, ECEM
- Equipe 3 : Métabolisme, Bio-Ingénierie des molécules de micro-algues et applications, MIMMA ; spécialisée dans l'étude des réponses des différents organismes aux variations des facteurs environnementaux, les biomarqueurs de stress...
- Equipe 4 : Chimiodiversité des champignons marins et valorisations, ChichaMVA ; spécialisée dans l'étude des métabolites produits par les champignons d'origine marine.
- Equipe 5 : Application des métabolites marins en santé, nutrition et cosmétologie, ANC ; spécialisée dans la valorisation d'ingrédients marins dans le domaine de la santé, nutrition et de la cosmétologie.

Mon stage se déroule au sein de l'équipe 2. Les membres de l'équipe ECEM étudient les différentes perturbations des milieux côtiers ou estuariens dues aux contaminants émergents comme les terres rares ou les microplastiques. Ils touchent à différentes compétences comme la chimie, l'écologie ainsi que la biologie et l'écotoxicologie, Figure 2.

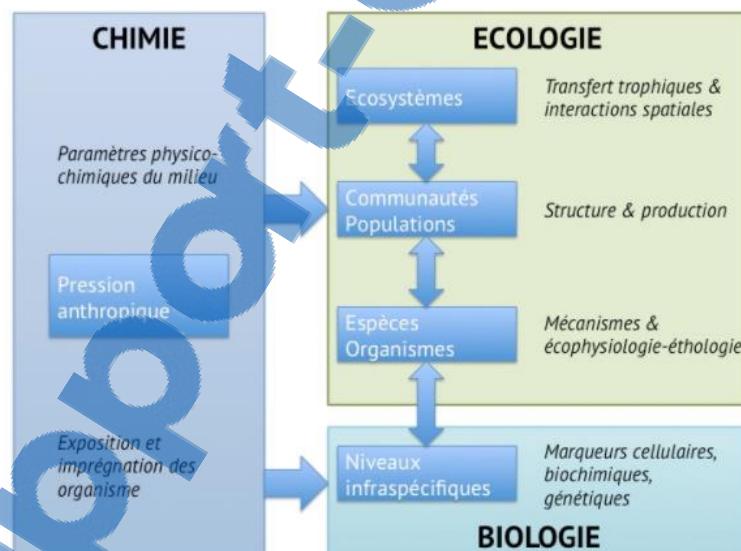


Figure 2 : Champs disciplinaires de l'équipe ECEM, Source : MMS

L'équipe ECEM publie en moyenne 32.5 articles par an et a participé à 10 conférences cette année, ainsi qu'à la rédaction de 7 livres scientifiques.

En janvier 2022, un changement au niveau des équipes du laboratoire de recherche est prévu. Les équipes 1 et 2 deviendront une seule et même équipe, RSBE2. Le laboratoire de recherche ne portera plus le nom de MMS, mais d'ISOMER. Les principales thématiques de recherche seront : la

connaissance et la diversité de la biologie des organismes marins, l'étude des réseaux trophiques marins et les relations inter organismes et la valorisation des bioproduits marins et des biotechnologies bleues.

C) Présentation et déroulé de la mission

Tout au long des 3 mois au laboratoire, différentes missions m'ont été confiées. La mission principale étant d'évaluer la contamination en terres rares dans les espèces aquatiques du réseau trophique de l'estuaire de la Loire. Ce stage s'inscrit dans la thèse de Julie Rétif qui étudie la bioaccumulation d'éléments de terres rares par les organismes aquatiques ainsi que les sédiments et l'eau de l'estuaire de la Loire.

Dans un premier temps, il a fallu se spécialiser sur le sujet des terres rares. Une étude bibliographique a été réalisée au cours de laquelle mes recherches se sont basées sur les terres rares, les métaux au sein des réseaux trophiques, les estuaires ainsi que les effets des terres rares sur les organismes aquatiques. Les différents articles de ma bibliographie ont été soit transmis par ma maître de stage, Laurence Poirier, chercher sur Google Scholar ou sur la bibliothèque numérique de l'université de Tours.

Ensuite, une partie manipulation a été effectuée. C'est cette mission qui a demandé le plus de temps, car un travail conséquent en amont doit être réalisé afin d'analyser les ETR à l'aide d'un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif). Cette préparation et ces analyses seront expliquées dans la partie Matériel et Méthodes.

Puis, l'analyse des résultats obtenus par ICP-MS a été conduite. Ces analyses se sont faites sous Excel et Statistica.

Pour finir, une interprétation et une explication des résultats afin d'évaluer quantitativement et qualitativement la contamination des terres rares dans l'estuaire de la Loire ont été réalisées.

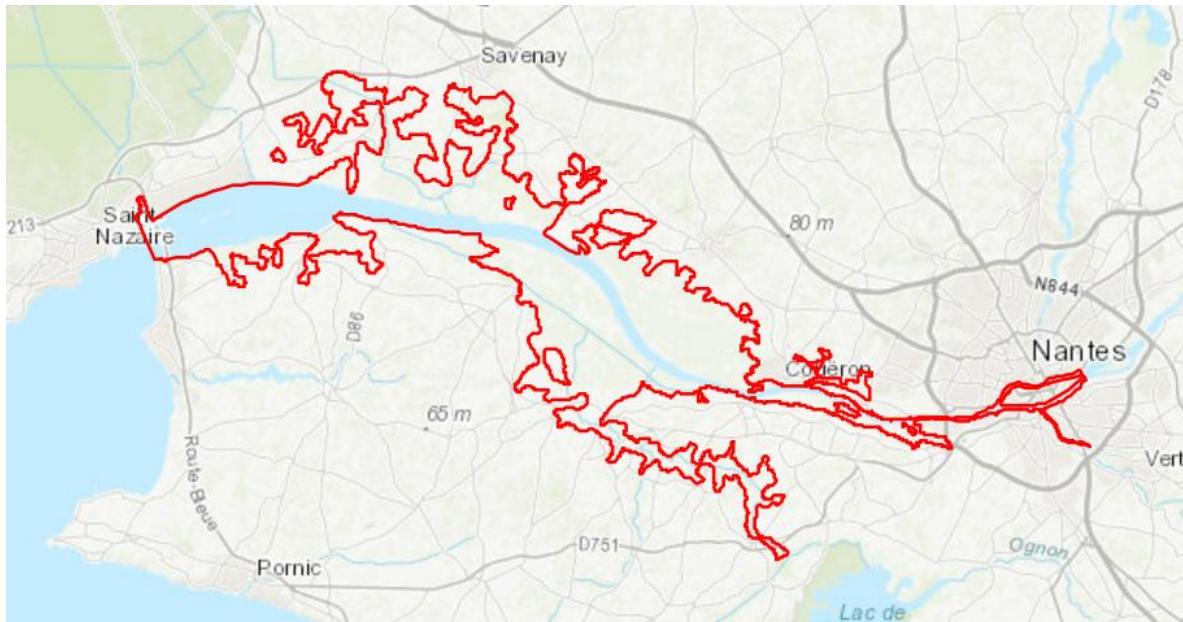
II) Matériel et méthodes

Pour évaluer la distribution des terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire, il a fallu réaliser un protocole d'action précis ; de l'échantillonnage à l'analyse des résultats obtenus. Il sera détaillé dans cette partie du rapport.

A) Site étudié : l'estuaire de la Loire

Un estuaire peut être défini comme étant un plan d'eau côtier semi-fermé qui est relié de manière permanente ou temporaire à l'océan et qui a donc un biote caractéristique de ces conditions particulières, (Elliott et Whitfield 2011). Ce sont des habitats à haute productivité, car ils contiennent des propriétés d'eau douce et salée, (Coynel et al. 2016). Cependant, avec l'anthropocène, ces habitats sont devenus très sujets aux différentes pollutions chimiques dues à l'augmentation de l'industrialisation. Les estuaires peuvent donc être des zones importantes afin de retracer diverses pollutions.

Les différentes espèces sur lesquelles j'ai travaillé ont été prélevé dans l'estuaire de la Loire, Figure 3. De plus, l'estuaire de la Loire est une zone Natura 2000.



site Natura 2000 estuaire de la Loire



Figure 3 : Carte de l'estuaire de la Loire, Source : Loire Atlantique

La Loire est l'un des plus grands fleuves de France, elle draine un bassin versant de 117 km², (Thibault de Chanvalon et al. 2016). Elle prend sa source à Mont Gerbier de Jonc, dans le Sud-Est de la France. Son estuaire quant à lui est d'une longueur de 80 km, un mélange entre les eaux de la Loire et de l'océan Atlantique s'y effectue. L'estuaire de la Loire est un estuaire macrotidal, c'est-à-dire qu'il est influencé par une grande amplitude de marée. Le débit moyen de l'estuaire de la Loire est de 890 m³s⁻¹, (Thibault de Chanvalon et al. 2016).

B) Les échantillons

Une grande diversité d'échantillons a été mis à ma disposition afin d'évaluer la distribution des terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire.

Deux ensembles d'espèces ont été analysés. Des prélèvements ont été effectués en 2014 dans le cadre d'un projet réalisé par IFREMER et d'autres ont été récoltés en 2021 pour la thèse de Julie Rétif.

L'identification des différentes espèces a été basée sur des critères macroscopiques ; pour *Heteromastus filiformis* l'identification doit être confirmée.

1) Prélèvements réalisés en 2014

En 2014, les organismes ont été récoltés par Ifremer, une partie d'entre eux ont ensuite été transmis au laboratoire MMS afin que nous puissions évaluer la contamination de terres rares. Ces échantillons ont été prélevé à Saint-Nazaire.

L'anguille européenne, *Anguilla anguilla* : (Figure 4) L'anguille européenne est comprise dans la famille des Anguillidés. Cette espèce vit dans les eaux douces ainsi que dans les estuaires. Elle a un corps serpentiforme et sa peau est recouverte d'un épais mucus. Au sein de l'espèce, est présent un

dimorphisme sexuel ; les mâles mesurent au plus 40 cm tandis que les femelles peuvent mesurer jusqu'à un mètre. Ce critère est pratique pour la détermination du sexe.

L'anguille européenne passe par plusieurs stades de croissance : les larves de l'anguille européenne quittent la mer des Sargasses pour se rendre en eau douce, puis celles-ci deviennent des civelles. Elles deviennent ensuite des anguilles jaunes de couleur brun vert avec une face ventrale jaune. Après une période de croissance, elles deviennent des anguilles argentées c'est à ce moment que s'opère la différenciation sexuelle.

Au niveau alimentation, l'anguille se nourrit de poissons, de crustacés ainsi que de vers et d'invertébrés.



Figure 4 : *Anguilla anguilla*, Source : Olivier

Le mullet porc, *Chelon Ramada* : (Figure 5) Le mullet porc fait partie de la famille des Mugilidés. Il vit dans les zones côtières, les estuaires ainsi qu'en eau douce. Sa taille peut varier de 30 à 40 cm et son poids de 2 à 4 kg. A l'automne, il migre en mer où il pond ces œufs près de la côte. Les œufs se développent et après les juvéniles remontent le long du littoral ainsi que dans les zones estuariennes.

Le mullet porc va se nourrir d'algues et de petits organismes benthiques ou planctoniques.



Figure 5 : *Chelon ramada*, Source : Olivier

2) Prélèvements réalisés en 2021

Concernant 2021, le laboratoire MSS s'est associé au bureau d'étude Biolittoral. Durant leur campagne de terrain, des échantillons de biote ont été récolté pour la thèse de Julie Rétif.

Il a été prélevé 8 espèces différentes :

La scrobiculaire, *Scrobicularia plana* : (Scrobicularia plana | DORIS s. d.) (Figure 6) La scrobiculaire fait partie de l'embranchement des mollusques. Sa détermination est faite grâce à sa coquille équivalve, ovale, mince, aplatie et de couleur jaunâtre à blanchâtre pouvant aller jusqu'à 4 à 5cm. De nombreuses stries d'accroissement sont présentes sur sa coquille. C'est un organisme caractéristique des zones estuariennes, c'est une espèce euryhaline.

Son régime alimentaire varie selon les marées. A marée basse, c'est un dépositivore, il va fouiller les sédiments afin d'aspirer les micro-organismes. Tandis qu'à marée haute, il va filtrer le plancton.



Figure 6 : *Scrobicularia plana*, Source : Doris

La telline de la baltique, *Limecola balthica* : (*Limecola balthica* | DORIS s. d.)Figure 7 La telline de la baltique fait partie de la classe des bivalves ainsi que de la famille des Tellinidés. On peut facilement la confondre avec la scrobiculaire, cependant elle a une coquille avec une extrémité antérieure plus anguleuse que son extrémité postérieure qui elle est bien arrondie. La surface de sa coquille est bien lisse et brillante avec quelques stries de croissance.

Le régime alimentaire de ce bivalve dépend des saisons ; en hiver il est suspensivore, tandis qu'en été il est dépositivore.



Figure 7 : *Limecola balthica*, Source : Doris

La gravette blanche, *Nephtys hombergii* : (*Nephtys spp.* | DORIS s. d.) (Figure 8). La gravette blanche fait partie de l'embranchement des annélides et est comprise dans la famille des Nephtyidés. Elle vit dans des milieux marins. C'est un petit vers compris entre 5 à 20 centimètres d'une couleur claire. Le vaisseau sanguin est visible sur son corps. Leur tête est petite et présente quatre antennes courtes et coniques. Elle se nourrit de petits invertébrés à l'aide de sa trompe. Ce sont des prédateurs intermédiaires importants, car elles se font manger par d'autres animaux plus gros.



Figure 8 : *Nephtys hombergii*, Source : [Marinespecies](#)

Néréis multicolore, *Nereis diversicolor* : (Hediste diversicolor | DORIS s. d.),(Figure 9). Cet organisme fait partie de la famille des Néréididés. C'est un petit vers à corps peu rigide, aplati et annelé pouvant aller de 50 à 120 mm de longueur. Sur la ligne médiodorsale, le vaisseau sanguin est visible. La couleur de ce vers est variable ; brune, jaune à rougeâtre. Sa tête est composée d'une paire de palpes, d'une paire de petites antennes, de quatre paires de cirres tentaculaires ainsi que de quatre tâches oculaires.

A marée basse, *Nereis diversicolor* s'alimente en filtrant l'eau, tandis qu'à marée haute, elle chasse grâce à proboscis composé d'une paire de mâchoires des petits crustacés, vers ou mollusques.



Figure 9 : *Nereis diversicolor*, Source : Olivier

Heteromastus filiformis: (*Heteromastus filiformis* s. d.)(Figure 10). *Heteromastus filiformis* fait partie de la famille des Capitellidées, famille de vers annélides polychètes. C'est un petit vers à taille maximale de 10 cm et d'une couleur rougeâtre. Il vit dans les substrats benthiques, de préférence des sédiments à grains fins à boueux, et dans les eaux saumâtres. Il se trouve aussi en bordure des zones côtières. Il mange des petits organismes présents dans le substrat.



Figure 10 : *Heteromastus filiformis*, Source : [Marinespecies](#)

Le corophie tourneur, *Corophium volutator* : (*Corophium volutator* / arenarium | DORIS s. d.)(Figure 11). Le corophie tourneur est un crustacé faisant partie de la famille des Corophidés. C'est une petite crevette avec deux antennes très larges et grandes. Le corophie possède un corps blanchâtre segmenté et aplati dorso-ventralement. Il se nourrit de 3 manières différentes selon les marées ; à marée haute

il est un filtreur suspensivore, à marée basse un brouteur tandis qu'entre les deux un dépositivore. Il se nourrit de différentes bactéries, de microalgues ainsi que de diatomées.



Figure 11 : *Corophium volutator*, Source : Doris

Les espèces étudiées durant ce stage ont pour but de caractériser le réseau trophique de l'estuaire de la Loire. Un réseau trophique est un ensemble de chaînes alimentaires reliées entre elles, au sein desquelles de l'énergie ainsi que de la biomasse circulent. Utiliser le réseau trophique comme outil de mesure de la contamination des terres rares permettra de voir si une potentielle bioaccumulation ; substance polluante présente dans un biotope qui va s'accumuler dans une espèce et peut devenir nocive ; est possible au sein de lui-même.

Grâce à une étude des isotopes stables du carbone et de l'azote, les différentes espèces étudiées ont pu être classées selon leur niveau dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire (Chouvelon et al. 2015). En effet, le $\delta^{13}\text{C}$ permet de tracer d'où provient la matière organique consommée par les espèces, ajouté à la provenance des ressources alimentaires, nous pouvons savoir d'où la matière organique vient, plus vers l'amont ou l'aval de l'estuaire. Tandis que le $\delta^{15}\text{N}$ permet de positionner les différentes espèces dans le réseau trophique, Figure 12.

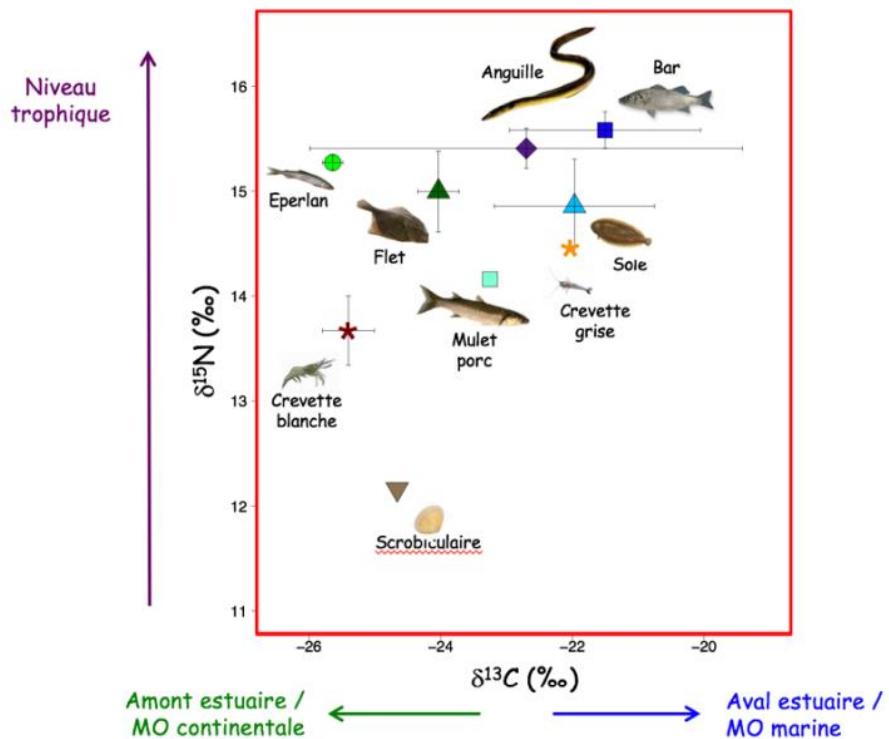


Figure 12 : Place des différentes espèces dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire (Chouvelon 2015)

Pour les poissons, plusieurs espèces ont été prélevées en 2021 : *Solea solea*, *Platichthys flesus*, *Dicentrarchus labrax*, *Trisopterus luscus*, *Osmerus eperlanus*, *Sprattus sprattus*. Dans le temps imparti au stage, la décision a été prise d'analyser uniquement l'anguille européenne et le mullet porc afin de pouvoir réaliser une comparaison avec l'année 2014. Avec en 2014, 3 anguilles européennes et 1 mullets porc et en 2021 4 anguilles européennes et 4 mulets porc.

Les mulets porcs ont été prélevés dans le secteur de Saint-Nazaire et de Cordemais et les anguilles européennes au niveau de Cordemais et de Saint-Nazaire.

C) Préparation des échantillons pour l'analyse des ETR

Une préparation des échantillons est nécessaire avant de les analyser par ICP-MS. Cette préparation impliquant plusieurs étapes, vise à extraire les ETR en phase liquide afin qu'ils puissent être analysés.

La verrerie et les outils de dissection sont nettoyés avant chaque utilisation avec de l'acide nitrique à 10% pendant une nuit et rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée afin d'éviter toute contamination extérieure. Sont exemptés les flacons et les cônes par la qualité du fabricant.

1) Dissection

La première étape consiste à effectuer des mesures biométriques de l'intégralité de chaque organisme. Sont mesurés le poids (g) et la taille (cm).

Pour les poissons, une dissection est nécessaire afin de séparer en 3 parties leur intégralité : le muscle, les gonades et le reste. Ce choix a été fait, car analyser le muscle séparément permet de vérifier si des terres rares peuvent contaminer l'alimentation humaine. Tandis que l'isolation des gonades sera réalisée par Julie Rétif afin de vérifier un résultat précédemment obtenu au laboratoire concernant des concentrations en Gd élevée dans les gonades de l'anguille argentée.

Concernant les bivalves, les tissus mous ont été extraits des coquilles et pesées. Néanmoins, le poids total et la taille de chaque coquille ont été évalué.

2) Congélation

La deuxième étape a été de congeler les échantillons à -80° pendant quelques jours afin de les préparer à la lyophilisation. C'est un processus nécessaire, car pour la lyophilisation, une sublimation est effectuée.

3) Lyophilisation

Le principe de la lyophilisation, Figure 13, consiste à enlever l'eau contenue dans un échantillon. C'est un processus de séchage à basse température. Tout d'abord, il faut congeler l'échantillon (ici à -80°), ensuite il y a sublimation (passage de l'état solide à l'état gazeux) et il y a désorption (les molécules d'eau adsorbées se détachent des substrats).

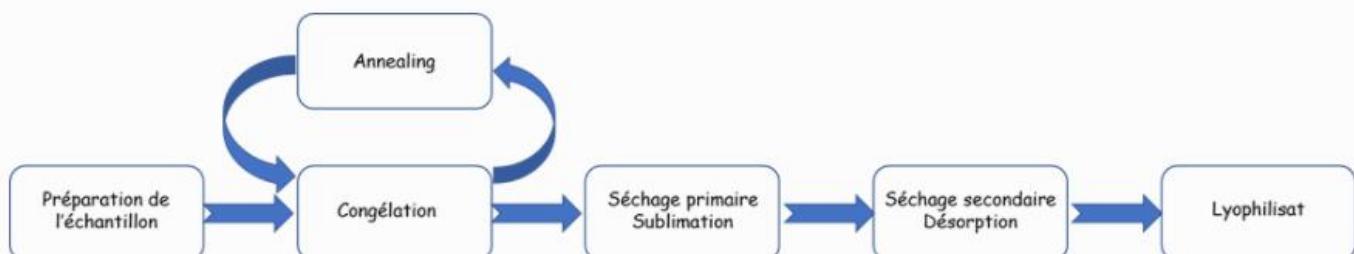


Figure 13 : La Lyophilisation Source : Biopharma Technologies France

4) Broyage

Avant de minéraliser les échantillons, ceux-ci ont besoin d'être homogénéiser pour pouvoir prélever des aliquotes. Les échantillons de poissons lyophilisés sont alors passés au broyeur afin d'obtenir une poudre homogène.

5) Minéralisation à froid et à chaud

La minéralisation a pour objectif de casser les liaisons chimiques entre la matière organique, la matière minérale et les terres rares. Pour réaliser une minéralisation, il faut tout d'abord peser 200 mg d'échantillons lyophilisés à l'aide d'une balance scientifique. Ensuite, une première minéralisation à froid est réalisée pendant une heure à l'aide de 4,5 mL d'acide nitrique à 65% ainsi que 0,5 mL d'acide chlorhydrique à 37% dans les tubes du micro-ondes.

Ensuite, une minéralisation à chaud est réalisée dans le micro-ondes avec un programme adapté aux échantillons de biote. La température du four est fixée à 100°C puis augmente jusqu'à 170°C, durant 1h et 30 minutes.

Après cette deuxième minéralisation, le contenu des tubes du micro-ondes est versé dans des tubes en pyrex afin de pouvoir évaporer.

Lors de cette étape, des blancs sont créés afin de vérifier les mesures de l'ICP-MS. Ils sont préparés de la même manière que les autres échantillons, exceptés qu'ils ne contiennent pas de matière.

6) Evaporation à sec

Après la minéralisation, une évaporation à sec du minéralisat est nécessaire afin de concentrer la solution ainsi qu'évaporer tout l'acide restant. L'ICP-MS ne tolère pas plus de 5% d'acide, car cela abîme les cônes. Les échantillons sont alors mis à évaporer sur un bloc chauffant à environ 100° durant au moins 12h.

7) Mise en suspension

Ensuite, il est nécessaire de mettre en suspension les culots obtenus lors de l'évaporation afin qu'ils soient sous forme liquide pour passer à l'ICP-MS. Une resuspension du culot dans l'acide nitrique est alors effectué afin d'éviter les phénomènes d'adsorption sur les parois ou de complexation qui biaisaient les mesures. Tous les culots sont ainsi repris avec 100 µL d'HNO₃, 65%. Dépendamment de la manière dont l'échantillon est traité (dilution, ajouts dosés), de l'eau est ensuite ajoutée. Une fois, les échantillons mis en suspension. Il faut ajouter du rhénium car il est utilisé comme étalon interne dans la procédure de quantification. La dilution des échantillons est adapté en fonction de la gamme d'étalonnage présentée ci-après.

Après cette étape, les échantillons sont passés aux ultrasons afin d'assurer leur remise en suspension. Ils sont aussi centrifugés (3 RCF/min, durant 5 minutes) afin de récupérer le surnageant, la présence de particules pouvant en effet boucher l'ICP-MS.

D) Analyse à l'aide de l'ICP-MS

1) Principe de l'ICP-MS

L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry), Figure 15, est la technique analytique la plus utilisée pour doser les terres rares. De par le faible coût du plasma, l'automatisation de son utilisation ainsi que la bonne ionisation des métaux grâce au plasma d'argon, cette technique est très répandue pour l'analyse d'éléments terres rares, (ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse : Dossier complet | Techniques de l'Ingénieur s. d.).



Figure 15 : ICP-MS, Source : Olivier

Le principe de l'ICP-MS est d'analyser la forme ionisée des métaux grâce au spectrophotomètre de masse qui sont générés par le plasma d'argon. Le plasma monte à une température comprise entre 6000 à 8000 K ce qui va donc ajouter ou enlever un électron aux atomes et les faire passer à un état d'ionisation. Ensuite, ils seront analysés en quantité masse/charge.

L'analyse par ICP-MS peut être découpée en quatre étapes, Figure 16.

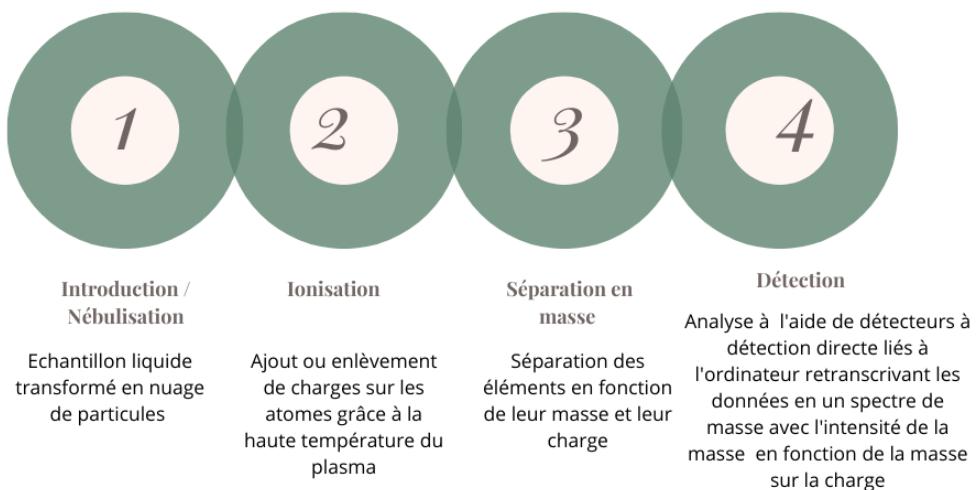


Figure 16 : Etapes de l'ICP-MS, source : Olivier

Afin de pouvoir quantifier les ETR, une méthode d'étalonnage interne est utilisée, parfois supplémentée d'un étalonnage par ajouts dosés.

Seulement 15 terres rares ont été quantifiés. Le scandium ne donne pas de résultats analytiques satisfaisants et le prométhium n'est pas présent dans le milieu naturel.

2) Etalon interne

Le principe de l'étalonnage interne est assez similaire à l'étalonnage externe plus fréquent, sauf qu'on ajoute un étalon interne, en concentration connue et constante, aux solutions de la gamme étalon et aux échantillons. Ici, le rhénium est choisi, car il a des propriétés similaires aux terres rares.

C'est un isotope proche chimiquement des ETR et absent des échantillons. Le but de cet étalonnage est de tracer une droite $y = ax + b$ avec en ordonnée l'intensité de terres rares sur l'intensité de Rhénium et en abscisse la concentration de terre rare sur la concentration de Rhénium. Le but est de normaliser les intensités obtenues et permet de prendre en compte les variations instrumentales de l'ICP-MS et les possibles variations liées à la température ou bien à l'évaporation.

Une gamme d'étalonnage interne est alors réalisée avec une concentration de rhénium constante dans toutes les solutions ; 1 μ g/L. Les concentrations d'ETR varient dans la gamme de 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 μ g/L.

Pour réaliser cette gamme étalon (Tableau 1) des solutions filles en ETR, obtenues à l'aide d'une solution mère en ETR à 1000 mg/L, ont été utilisées

- S1, 10mg/L
- S2, 100 μ g/L
- S3, 10 μ g /L
- S4, 100ng/L

Tableau 1: Gamme étalon interne

Concentration en ETR (μ g/L)	Rhénium (10 μ g/L En mL)	S1	S2	S3	S4	HNO ₃ , 2% En mL	Vf en mL
0	1					9	10
0,01	1				1 mL	8	10
0,05	1			50 μ L		8,95	10
0,1	1			100 μ L		8,9	10
0,5	1			500 μ L		8,5	10
1	1		100 μ L			8,9	10
5	1		500 μ L			8,5	10
10	1		1 mL			8	10
50	1	50 μ L				8,95	10

3) Ajouts dosés

En parallèle de la gamme d' étalonnage interne, la méthode des ajouts dosés a été réalisée. Le but des ajouts dosés est de prendre en compte l'effet matrice de l'échantillon. Prenons l'exemple d'un échantillon d'anguilles, il n'y a pas que les terres rares dans celui-ci, il y a d'autres composés organiques et inorganiques pouvant interférer avec le signal des ETR. Pour tenir compte de ces interférences potentielles, il est nécessaire de de réaliser l'étalonnage dans la matrice de l'échantillon.

Pour effectuer cette méthode, il faut ajouter une concentration de terres rares, connue et croissante dans différents réplicats d'un échantillon. Dans le tableau ci-dessous, les ajouts dosés ont été fait en ajoutant une concentration de : 0,1 ,5,10 μ g d'ETR/L à chaque réplicat d'échantillon (Tableau 2)

Tableau 2 : Préparation des solutions étalons pour ajout dosé

Nom de l'échantillon/ Solution	1	2	3	4
HNO ₃ (65%) (μ L)	100	100	100	100
H ₂ O (mL)	1.7	1.68	1.6	1.5
Rhénium S3 (μ L)	200	200	200	200

ETR S3 (μ L)	0	20	100	200
Concentration finale en ETR (μ g/L)	0	0.1	0.5	1

Pour vérifier si un effet matrice s'opère, il faut comparer l'étalonnage interne avec celui obtenu par ajouts dosés pour chaque terre rare et chaque organisme. Si les deux droites ont un coefficient directeur avec moins de 10 % de différence, cela signifie que l'effet matrice est négligeable, la droite d'étalonnage interne peut donc être exploitée. Si elles ne le sont pas, cela veut dire qu'il y a un effet matrice et qu'il faudra se servir de la droite des ajouts dosés.

4) Dilution

Si lors d'un premier passage à l'ICP-MS, les intensités en ETR obtenues pour un échantillon saturaient, il fallait le diluer. Voici les organismes qui ont subi une dilution, Tableau 3.

Tableau 3 : Facteur de dilution des différents organismes

Organismes	Dilution	Facteur de dilution
<i>Chelon ramada</i>	1/10	10
<i>Heteromastus filiformis</i>	1/20	20
<i>Scrobicularia plana</i>		
<i>Nereis diversicolor CRM</i>	9/10	1,1
<i>Limecola balthica</i>		
<i>Scrobicularia plana</i>	1/4	4

Le facteur de dilution s'exprimant de la manière suivante :

$$F = \frac{\text{Volume Fille}}{\text{Volume mère}}$$

E) Analyse

1) Les limites de détection et de quantification

Avant de débuter toute analyse des concentrations en terres rares présentes dans les échantillons, il faut vérifier si celles-ci sont quantifiables. Il est nécessaire de calculer les limites de quantification ; concentration à partir de laquelle un ETR peut être quantifié. La limite de détection quant à elle renseigne sur la plus petite concentration d'un ETR à doser que la méthode analytique est capable de détecter.

Pour ce faire, il suffit de prendre 6 blancs et de calculer leur concentration en ETR, puis de calculer l'écart-type obtenu sur ces 6 concentrations. Les limites de détection et de quantification sont ensuite calculées selon les formules suivantes :

$$\text{Limite de détection (LOD)} = \sigma * 3$$

$$\text{Limite de quantification (LOQ)} = \sigma * 10$$

La LOQ est alors exprimée en μ g/L, Tableau 4.

Tableau 4 : LOQ, Limite de quantification (µg/L)

ETR	Y 89	La 139	Ce 140	Pr 141	Nd 142	Sm 147	Eu 153	Gd 155	Tb 159	Dy 163	Ho 165	Er 166	Tm 169	Yb 171	Lu 175
LOQ	0,54755	0,850825	1,59465	0,223963	0,859612	1,122212	0,09625	1,272931	0,087462	0,142597	0,08401	0,110133	0,077867	0,329849	0,075188

Si les concentrations en ETR dans les échantillons sont supérieures à la LOQ mais inférieures au dernier niveau de la gamme étalon, cela signifie qu'elles sont quantifiables. Si les concentrations sont inférieures à la LOQ ou supérieures au dernier niveau de la gamme étalon, il faut alors ajuster le facteur de dilution. Lorsque les concentrations sont inférieures à la LOQ et que l'échantillon est non dilué, cela signifie qu'on ne peut pas quantifier les terres rares au sein de cet échantillon.

2) Validation de la méthode

Afin de vérifier l'exactitude des mesures, un CRM (Certified Reference Material) de moule est utilisé. Les concentrations en ETR sont déjà connues, exemptée pour le Yb, dans cet échantillon, donc la méthodologie de préparation et d'analyse peut être vérifiée. Le CRM a été préparé de la manière que les autres échantillons, il a été dilué au 9/10.

Le biais relatif a été calculé pour chaque ETR de la manière suivante :

$$Biais\ relatif = 100 - \left(\frac{(Valeur\ théorique\ du\ CRM - valeur\ obtenue\ du\ CRM)}{valeur\ théorique\ du\ CRM} \right) * 100$$

Les biais relatifs obtenus sont compris dans une gamme acceptable de 77% à 123%; Tableau 5.

Tableau 5 : Biais relatifs obtenus pour les différents ETR analysés

Y 89 (cps)	La 139 (cps)	Ce 140 (cps)	Pr 141 (cps)	Nd 142 (cps)	Sm 147 (cps)	Eu 153 (cps)	Gd 155 (cps)	Tb 159 (cps)	Dy 163 (cps)	Ho 165 (cps)	Er 166 (cps)	Tm 169 (cps)	Yb 171 (cps)	Lu 175 (cps)
80,85	102,89	118,86	95,01	90,19	79,19	77,33	123,66	94,36	89,15	85,71	89,67	101,08	NA	95,56

3) Calculs des concentrations en ETR

Après analyse par ICP-MS, les intensités de terres rares sont mesurées dans les échantillons. L'ICP-MS renvoie une intensité pour chaque terre rare dans l'échantillon.

Pour connaître leurs concentrations, il faut soit utiliser la courbe des ajouts dosés soit la courbe d'étalonnage interne. Si les coefficient des deux droites présentent un pourcentage d'erreur inférieur à 10%, la courbe d'étalonnage interne est choisi, sinon cela signifie qu'il y a un effet matrice et la courbe des ajouts dosés est utilisée. Pour tracer cette courbe, il faut calculer le Y, représentant l'intensité brute d'ETR moins le blanc, de chaque échantillon. Celui-ci est calculé en retranchant le blanc et l'étalon interne de la manière suivante :

$$Y_{échantillon} = \left(\frac{Intensité\ ETR}{Intensité\ Rhénium} \right) échantillon - \left(\frac{Intensité\ moyenne\ blancs\ ETR}{Intensité\ du\ blanc\ du\ Rhénium} \right)$$

Pour connaître la concentration dans l'échantillon, il suffit d'utiliser l'équation de la courbe de la droite soit des ajouts dosés soit de l'étalon interne, dépendamment de si l'échantillon présente l'effet matrice expliqué ci-dessus.

On revient à calculer :

$$\text{Concentration ETR} = \left(\frac{Y_{\text{échantillon}} - b}{a} \right) * \text{Facteur de dilution}$$

Avec :

- Concentration ETR en $\mu\text{g/L}$
- a : coefficient directeur de la courbe d'étalonnage interne ou de celle des ajouts dosés
- b : ordonnée à l'origine,

Pour arriver à la concentration d'ETR dans l'échantillon (exprimée en microgramme par gramme de tissus lyophilisés), le calcul suivant est effectué :

$$C_{\text{échantillon}}^{\text{ETR}} (\mu\text{g/g de lyophilisat}) = \frac{\text{Concentration ETR} * V_f}{\text{Masse lyophilisée}}$$

4) Analyse statistique

Afin d'interpréter les données, des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica.

Pour faciliter les différents calculs, les ETR ont été regroupés en trois groupes :

- Les ETR légères ; incluant les ETR suivants : Lanthane, Cérium, Praséodyme, Néodyme
- Les ETR moyennes ; incluant les ETR suivants : Samarium, Europium, Gadolinium
- Les ETR lourdes ; incluant les ETR suivants : Terbium, Dysprosium, Holmium, Erbium, Thulium, Ytterbium, Yttrium, Lutécium

Les données ne suivant pas une distribution normale, des tests non-paramétriques ont dû être réalisés.

II) Résultats et discussion

A) Biométrie

Les moyennes des résultats biométriques sont récapitulées dans le tableau suivant, Tableau 8 et Tableau 9.

Tableau 8: Résumé des résultats biométriques 2021

Espèces	Poids frais moyen (g)	Poids frais min (g)	Poids frais max (g)	Ecart-type poids	Taille moyenne individu (g)	Taille min (cm)	Taille max (cm)	Ecart type taille	Nombre d'individus
<i>Anguilla anguilla</i>	229,5	25,28	765	267,7	40	24	69	14,5	4
<i>Chelon ramada</i>	55,16	34,89	67,88	10,1	18,87	16,5	19,5	0,94	4
<i>Scrobicularia plana</i>	0,921	0,015	2,338	0,65	2,89	2,337	4,1	0,94	30
<i>Coruphium volutator</i>	0,02	0,0002	0,007	0,001	0,8	0,5	1,1	0,19	15

<i>Heteromastus filiformis</i>	0,483	0,112	0,786	0,18	NA	NA	NA	NA	5
<i>Nereis diversicolor</i>	0,07	0,004	0,336	0,04	3,841	0,5	10,8	2,02	46
<i>Limecola balthica</i>	0,066	0,046	0,085	0,012	0,800	0,7	0,90	0,05	4
<i>Nephtys hombergii</i>	0,03	0,016	0,054	0,011	3,550	2,300	4,5	0,9	4

Tableau 9 : Résumé résultats biométriques 2014

Espèces	Poids frais moyen (g)	Poids frais min (g)	Poids frais max (g)	Ecart-type poids	Taille moyenne individu (g)	Taille min (cm)	Taille max (cm)	Ecart type taille	Nombre d'individus
<i>Anguilla anguilla</i>	176,9	33,20	254,9	95,8	41,5	26,6	51,1	9,93	3
<i>Chelon ramada</i>	2160	NA	NA	NA	51,5	NA	NA	NA	1

Au sein des anguilles, une variation importante au niveau du poids est remarquée. Pour l'année 2014, le poids des individus prélevés est compris entre 33,20 g et 254,9 g et pour l'année 2021 entre 25,28 g et 765 g.

De plus, les mulets échantillonnés entre les deux années de mesures n'ont pas des poids similaires. En 2014, un seul individu fut prélevé, c'était un adulte, alors qu'en 2021, ce sont des juvéniles.

Concernant les bivalves, *Scrobicularia plana* et *Limecola balthica*, la scrobiculaire a un poids et une taille plus importante que *Limecola balthica*.

Au sein des annélides, *Nereis diversicolor*, *Heteromastus filiformis*, *Nephtys hombergii*, les organismes les plus grands sont trouvés pour *Heteromastus filiformis*.

Grâce aux deux tableaux présentés ci-dessus, un classement de selon la biométrie croissante des espèces peut être fait :

Coruphium volutator < *Nephtys hombergii* < *Nereis diversicolor* < *Limecola balthica*
< Annélides < *Scrobicularia plana* < *Anguilla anguilla* < *Chelon ramada*

B) Comparaison inter-espèces (Année 2021)

Certaines terres rares n'ont pas pu être quantifiées dans divers organismes (concentrations < LOQ). Afin que l'analyse soit plus représentative, un pourcentage de quantification au sein de chaque espèce a été calculé pour chaque terre rare pour les années 2014 et 2021, Tableau 10 et Tableau 11.

Tableau 10 : Pourcentage de quantification, Année 2014

	Y	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
<i>Anguilla anguilla</i>	100	100	100	100	100	67	100	100	67	100	67	100	67	100	67
<i>Chelon ramada</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 11 : Pourcentage de quantification, Année 2021

	Y	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
<i>Anguilla anguilla</i>	100	100	100	75	75	50	75	50	50	100	50	100	50	50	50
<i>Chelon ramada</i>	100	100	75	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Scrobicularia plana</i>	83	103	90	103	103	100	103	100	100	103	100	103	73	93	70
<i>Limecola balthica</i>	100	100	100	100	100	50	100	50	100	100	50	100	0	0	0
<i>Nereis diversicolor</i>	15	24	7	4	7	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Coruphium volutator</i>	93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93	100
<i>Heteromastus filiformis</i>	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	80
<i>Nephtys hombergii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Il est important de noter que le pourcentage de détection de toutes les ETR dans *Nephtys hombergii* est de 0%. Cette espèce a donc été exclue des graphiques à suivre. *Nereis diversicolor* présente un pourcentage de détection très faible aussi (de 0% à 23,9%), les résultats sont donc à prendre avec précaution.

La Figure 17 représente les différentes concentrations en µg/g de poids sec de LREE, MREE, HREE et REE totales au sein des individus étudiés lors de ce stage. La Figure 17 permet de mettre en évidence que c'est *Limecola balthica* qui possède la concentration en terres rares la plus élevée, 18,890 µg/g de poids sec. C'est à peu près 43 fois plus que la concentration totale en terres rares d'*Anguilla anguilla* qui s'élève à 0,44 µg/g de poids sec. Grâce à cette figure, un classement croissant en ETR peut être réalisé :

Anguilla anguilla < *Chelon ramada* < *Nereis diversicolor* < *Heteromastus filiformis* <*Coruphium volutator* < *Scrobicularia plana* < *Limecola balthica*

De plus, on remarque que pour chaque espèce, c'est les terres rares légères qui dominent la répartition des terres rares totales. Allant de 4 à 12 fois plus comparées aux terres rares moyennes et de 2 fois à 6 fois plus pour les terres rares lourdes.

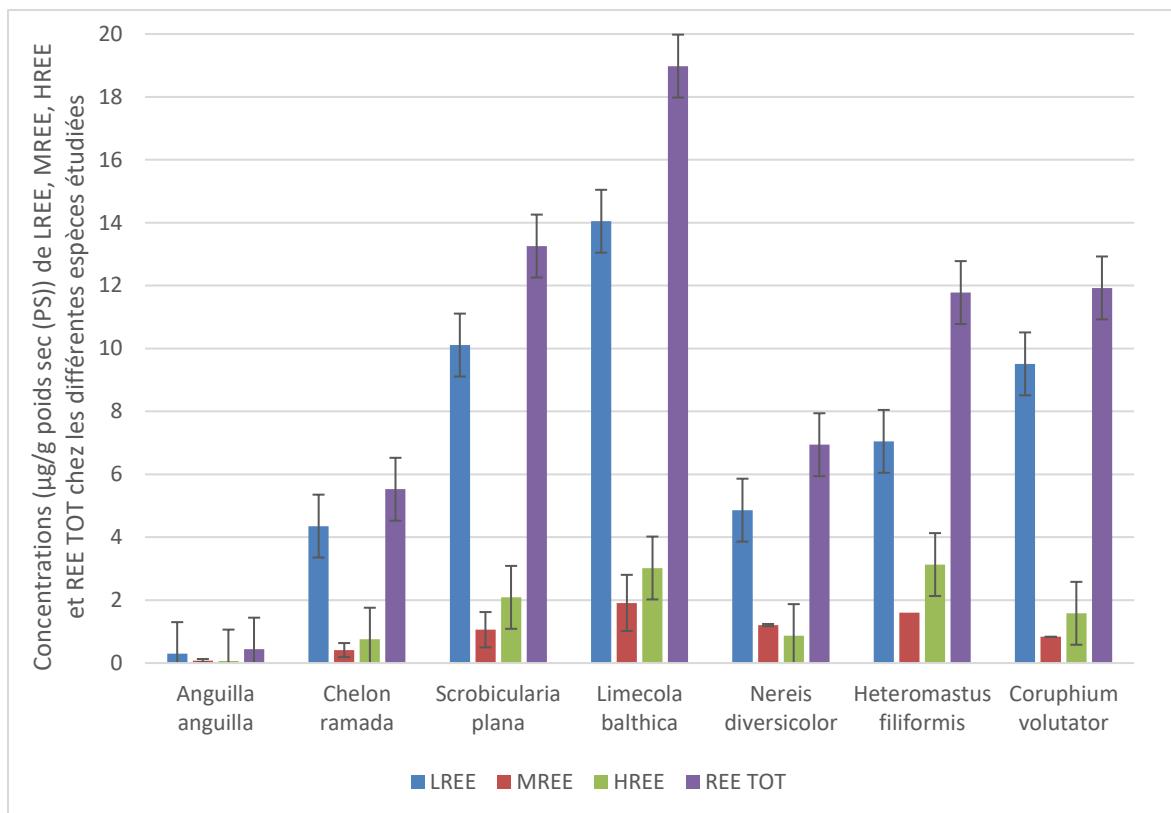


Figure 17 : Concentrations ($\mu\text{g/g}$ poids sec (PS)) de LREE, MREE, HREE et REE TOT chez les différentes espèces étudiées

Le Tableau 12 signifie les différences statistiques entre les concentrations des différents groupes d'ETR. Si deux espèces ont la même lettre, leurs concentrations en groupe d'ETR sont statistiquement similaires. Les différents tests de Mann-Whitney réalisés ont montré que pour les REE totale, les concentrations d'*Anguilla anguilla* et de *Nereis diversicolor* étaient similaires. Les concentrations de *Chelon ramada* et *Nereis diversicolor* sont statistiquement identiques aussi. Tandis que *Chelon ramada* est identique avec *Scrobicularia plana*, *Limecola balthica*, *Heteromastus filiformis* et *Corophium volutator*. Et que les concentrations en ETR totales de *Scrobicularia plana* et de *Limecola balthica* sont statistiquement similaires.

Tableau 12 : Statistiques complémentaires à la figure 9

Espèces	LREE	MREE	HREE	REE tot
<i>Anguilla anguilla</i>	a	a	a	a
<i>Chelon ramada</i>	b	ab	bd	bd
<i>Scrobicularia plana</i>	cd	bc	bc	cd
<i>Limecola balthica</i>	d	bc	c	cd
<i>Nereis diversicolor</i>	ab	ac	d	ab
<i>Heteromastus filiformis</i>	bcd	bc	bc	d
<i>Corophium volutator</i>	bc	bc	c	d

C) Distribution des terres rares (Année 2021)

La Figure 18 montre la distribution de chaque terre rare au sein des différentes espèces étudiées. Les terres rares légères ; La, Ce, Pr et Nd, sont les plus présentes dans chaque organisme ; entre 59,83% chez *Corophium volutator* et 79,75% chez *Heteromastus filiformis*. Ensuite, viennent les terres rares lourdes puis les terres rares moyennes.

De plus, ce graphique met en évidence la prédominance du Cérium chez toutes les espèces ; allant de 28,13 % chez *Corophium volutator* à 41,14 % chez *Heteromastus filiformis*. Le lanthane est la deuxième terre rare légère la plus présente dans les organismes. Du côté des terres rares moyennes ; Sm, Eu et Gd, leur pourcentage de distribution varie de 6,99 % chez *Heteromastus filiformis* à 17,61 % chez *Anguilla anguilla*. Le gadolinium est la terre rare moyenne la plus présente chez toutes les différentes espèces.

Au regard des terres rares lourdes, *Corophium volutator* présente une part plus importante, 26,58 %, que les autres espèces. *Nereis diversicolor* est celle qui compte le moins de terres rares lourdes, 12,58 %. L'Yttrium est la terre rare lourde la plus présente dans les espèces allant de 6,33%chez *Nereis diversicolor* à 12,66 % chez *Limecola balthica*.

En conclusion, cette figure démontre le classement de groupes des terres rares de la manière suivante :

$$MREE < HREE < LREE$$

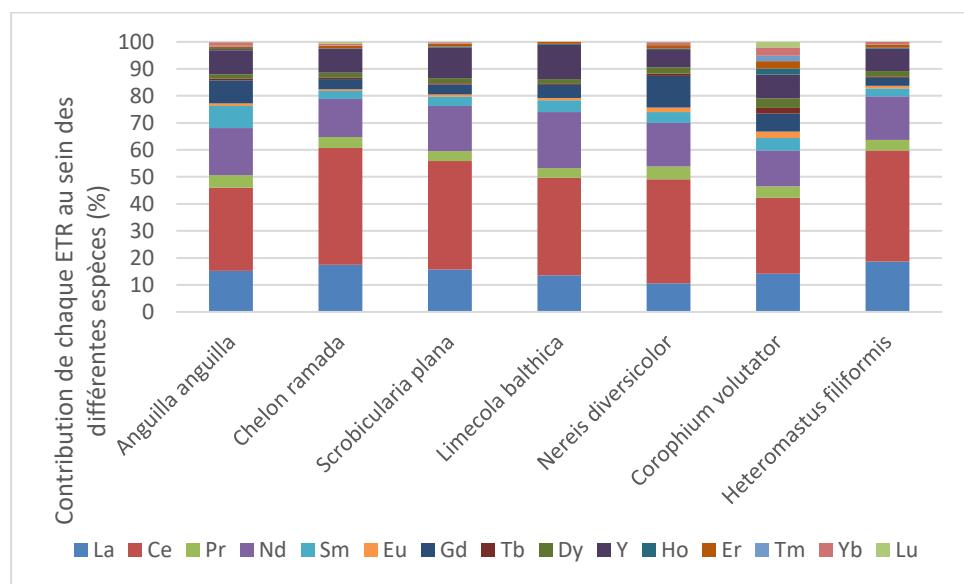


Figure 18: Distribution des différentes ETR au sein des espèces étudiées

D) Normalisation des terres rares (Année 2021)

La répartition des différentes terres rares dans le schiste est déterminée comme étant représentative de celle de la croûte continentale supérieure post-arabe moyenne,(Bau et al. 2018). Une normalisation peut donc être appliquée aux concentrations environnementales de terres rares afin de différencier

les apports anthropiques des apports naturels. Cela permet donc de détecter une anomalie positive ou négative dans les organismes vivants.

La normalisation des concentrations en ETR se fait en divisant les concentrations obtenues dans les organismes en ETR par les concentrations présentes dans un matériau de référence. Plusieurs sont utilisés. Néanmoins, le PAAS (Post Archean Australian Shale) ainsi que le EUS (European Shale) sont les plus fréquents. Pour des échantillons en provenance d'Europe, le EUS correspond plus spécialement, (Bau et al. 2018), Tableau 13.

Tableau 13 : Concentration en ETR (mg/kg) dans l'European Shale (Bau et al., 2018)

ETR	Y	La	Ce	Pr	Nd	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Concentration (mg/kg)	31,9	44,3	88,5	10,6	39,5	7,3	1,48	6,34	0,944	5,86	1,17	3,43	0,492	3,26	0,485

Une anomalie positive explique un enrichissement en ETR probablement causée par les différentes activités anthropiques. Celle-ci est détectée quand la courbe présente un léger pic.

Voici les différentes normalisations obtenues pour les espèces prélevées en 2021 ; Figure 19.

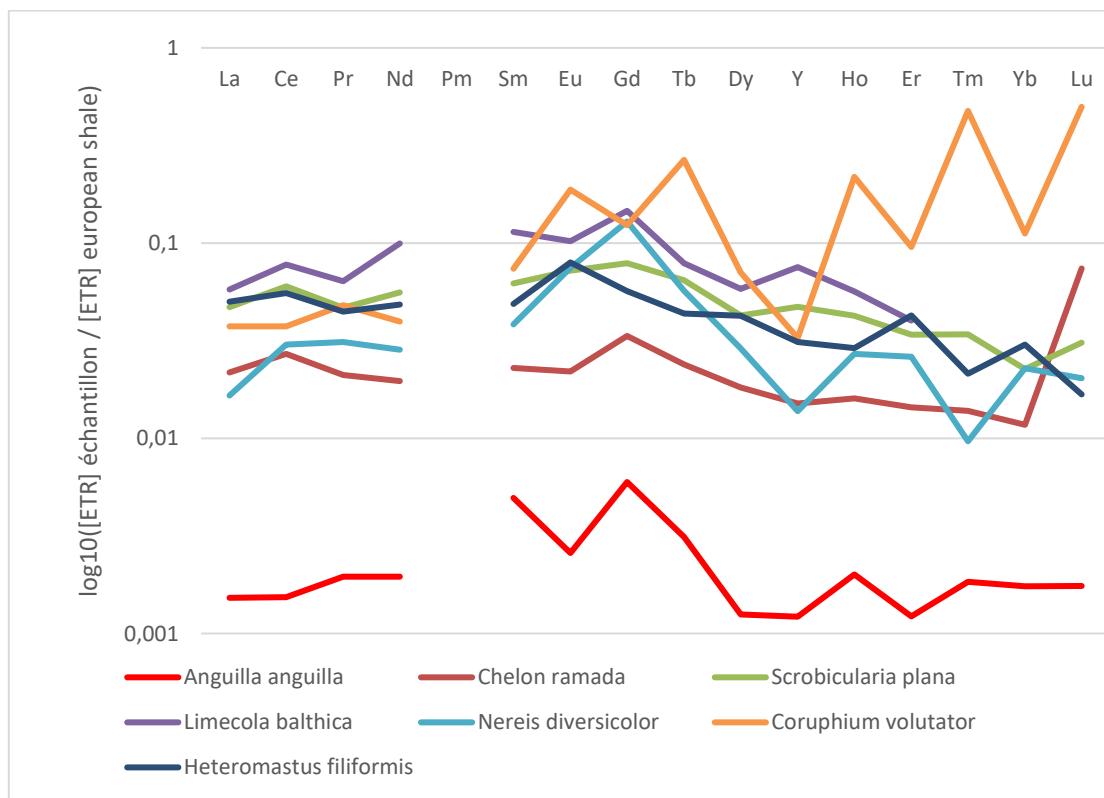


Figure 19 : Normalisation des terres rares (sur une échelle logarithmique) dans les différentes espèces avec l'European Shale

Les courbes de normalisation d'*Anguilla anguilla* et de *Chelon ramada* montrent une anomalie positive en Gd et en Ho. Celle du *Chelon ramada* possède aussi une anomalie positive en Ce et en Lu.

Pour *Scrobicularia plana* et *Limecola balthica*, des anomalies positives en Ce, Nd, Gd et Y sont détectées. De plus, la courbe de *Scrobicularia plana* présente un léger pic à Tm.

Pour les annélides, *Nereis diversicolor* ainsi qu'*Heteromastus filiformis*, leurs courbes sont beaucoup plus variables et différentes que les espèces mentionnées précédemment. *Nereis diversicolor* présente une forte anomalie positive en Gd et deux anomalies négatives en Y et Tm. Tandis qu' *Heteromastus filiformis* a un léger pic en Ce et présente trois anomalies positives en Er, Eu et Yb.

Pour *Corophium volutator* , sa courbe est beaucoup plus fluctuante que les autres. On remarque au début une anomalie positive en Pr, mais ensuite sa courbe fait des dents de scies, ce qui rend l'analyse des anomalies compliquée.

E) Comparaison interannuelle 2014-2021 : *Anguilla anguilla* et *Chelon ramada*

La Figure 20 représente les différentes concentrations en ETR obtenues sur deux années différentes : 2014 et 2021 chez *Anguilla anguilla* et *Chelon ramada*. Les tests statistiques ont montré qu'aucune différence significative était détectée entre les deux années chez *Anguilla anguilla* (p -value > 0,05).

Tandis que pour *Chelon ramada*, les résultats sont à prendre avec précaution et nécessite reconfirmation, car un seul individu a pu être analysé en 2014. Néanmoins, par lecture graphique, on remarque que les concentrations en ETR ont fortement augmenté : de 26 fois pour les LREE, 19 pour les MREE et les REE totales ainsi que 11 fois pour les HREE.

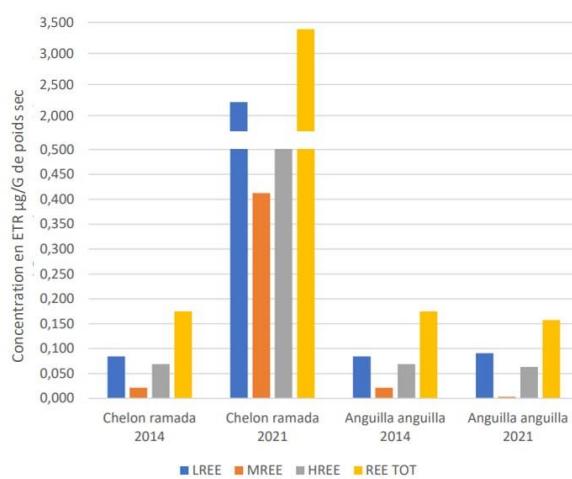


Figure 20 : Comparaison interannuelle des concentrations en ETR ($\mu\text{g/g PS}$) chez *Anguilla anguilla* et *Chelon ramada*

F) Discussion

1) La dilution au sein du réseau trophique

L'étude de la distribution des terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire est très importante, car ce sont des éléments de plus en plus fréquents dans la nature de par leurs usages anthropiques. Une des questions importantes de ce stage était de savoir si ces métaux se bioaccumulaient dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire. Les terres rares peuvent être potentiellement transférées aux humains à travers le réseau trophique et avoir de possibles répercussions sur leur santé.

Au sein des nombreuses analyses faites, on observe une forte distinction entre les poissons et les autres espèces, bivalves, crustacées et annélides. Grâce aux différents résultats déterminés, on remarque que c'est *Limecola balthica* qui présente la concentration de terres rares la plus élevée, Figure 17. *Limecola balthica* étant un bivalve se nourrissant de petits organismes ainsi que de matière organique planctonique. Il n'est donc pas à la tête du réseau trophique. De plus, *Anguilla anguilla* et *Chelon ramada*, les poissons étudiés lors de ce stage, eux, sont à la plus haute place du réseau trophique, Figure 12, et présentent des concentrations en terres rares beaucoup plus faibles que les autres espèces étudiées. *Limecola balthica* est 43 fois plus concentrée que *Anguilla anguilla* et 3 fois plus concentrée que *Chelon ramada*.

Avec ces différentes analyses, on peut dire que les terres rares ne se bioaccumulent pas dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire. C'est le phénomène de dilution, plus on monte dans le réseau trophique, plus les concentrations en éléments diminuent, à l'opposé du phénomène de bioamplification. Ce phénomène de dilution a été déjà observé dans le réseau trophique des lacs tempérés du Canada. Une forte concentration ETR était présente au sein des espèces vivant dans le benthos, au contact avec le sédiment, tandis que les poissons possédaient une concentration beaucoup plus faible, (Amyot et al. 2017).

Ce processus peut s'expliquer de nombreuses manières ; la dilution biologique, le fait que les espèces hautes placées dans le réseau trophique aient une masse et une taille plus importante. De plus, le système d'excrétion chez les poissons est peut-être plus performant que celui des autres espèces. Une étude sur la bioaccumulation des terres rares chez les juvéniles *Salvinus alpinus* a démontré que cette espèce possédait plusieurs mécanismes accélérant l'excrétion des terres rares,(Nørregaard et al. 2019).

En outre, une étude a démontré que la phase sédimentaire possédait des concentrations en ETR plus élevée que la phase dissoute, (LORTHOLARIE, 2021). Les espèces étudiées sont pour la plupart des organismes vivant dans le sédiment, excepté *Chelon ramada* . Cela peut expliquer le fait que cette espèce soit beaucoup moins concentrée que les autres.

Anguilla anguilla ne montre pas de différence significative de concentrations d'éléments terres rares entre les années 2014 et 2021. Cela peut être expliqué par le fait que l'anguille européenne est à la tête du réseau trophique ou bien que malgré l'augmentation des usages, les concentrations en ETR dans l'estuaire de la Loire n'ont pas augmenté. Il serait intéressant de comparer plusieurs espèces au

sein de différentes années, de cette manière la comparaison interannuelle aurait plus de valeur qu'avec une seule espèce.

Néanmoins, *Chelon ramada* possède des concentrations plus fortes en ETR en 2021 qu'en 2014. Cependant, pour 2014 n=1, donc aucun test statistique n'a pu être réalisé.

2) Prédominance des LREE

Toutes les terres rares sont naturellement présentes dans la nature. Cependant, certaines le sont plus que d'autres. Comme le montre la Figure 17, on observe que les terres rares légères, La, Ce, Pr et Nd, sont les plus conséquentes au sein de chaque espèce. Grâce à la normalisation des données, on observe qu'un pic en Cérium est présent pour *Limecola balthica*, *Chelon ramada*, *Scrobicularia plana* ainsi qu'*Heteromastus filiformis*. Cette anomalie positive présente parmi la plupart des espèces peut être dû au fait que le Cérium possède plusieurs degrés d'oxydation ; + III et + IV. A l'état naturel, il est retrouvé sous la forme +III, mais il doit subir des changements physico-chimiques tel qu'un changement des conditions redox. Cela pourrait alors fractionner le Cérium et donc mener à des mécanismes d'accumulation préférentielle. En outre, l'anomalie positive de Cérium pourrait être expliquer tout simplement par le fait de l'augmentation des concentrations dans le milieu suite aux usages anthropiques.

Cette abondance ,Figure 18, au sein des divers organismes peut être expliquée par le fait que le Lanthane et le Cérium sont les terres rares les plus présentes dans la croûte terrestre, (LORTHOLARIE,2021). Aussi, les terres rares légères sont utilisées dans de nombreux domaines comme la fabrication de batterie ainsi que la catalyse du pétrole, Figure 1. L'estuaire de la Loire accueillant sur son territoire des entreprises comme Airbus à Saint-Nazaire ainsi que les Chantiers de l'Atlantique pour la construction navale à Ancenis,(LORTHOLARIE,2021). Ces différents activités peuvent être à l'origine d'anomalie positive en terres rares légères.

De plus, on remarque des anomalies positives au gadolinium détectée chez *Limecola balthica*, *Scrobicularia plana*, *Chelon ramada* ainsi qu'*Anguilla anguilla*. Cette anomalie peut s'expliquer par l'utilisation du Gd comme agent de contraste pour les IRM. De nombreuses études ont montré des concentrations plus élevées que prévues dans des zones où sont rejetées les eaux usées d'hôpitaux des zones densement peuplées,(Bau et Dulski 1996). En 2019, la région Pays de la Loire comptait 39 IRM, (LORTHOLARIE, 2021).

En outre, l'estuaire de la Loire est soumis à une importante pression anthropique, car le pôle métropolitain nantais, incluant Saint-Nazaire, compte 888031 habitants. Ce qui va alors nécessiter de nombreuses STEP, 192, et la présence d'hôpitaux.

Une anomalie positive en Yttrium a aussi été remarqué chez les espèces étudiées. L'Yttrium est une terre rare utilisée dans le domaine de l'éolien, il sert dans l'alliage métallurgique, Figure 1. Or, dans l'estuaire de la Loire, Alstom, une compagnie spécialisée dans l'éolien, est présent à Montoir-de-Bretagne, (LORTHOLARIE, 2021). Les rejets de cette industrie pourraient donc éventuellement être à l'origine de cette anomalie positive en Yttrium, mais cette hypothèse reste à confirmer.

IV) Conclusion

Pour conclure ce rapport de stage sur l'évaluation de la distribution en éléments terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire, le principal point à souligner est le fait qu'une dilution trophique est montré par les différents résultats. Les organismes aquatiques positionnés au bas du réseau trophique ont des concentrations en terres rares totales de plus de 43 fois supérieures pour *Limecola balthica* comparé à *Anguilla anguilla*.

De plus, des anomalies positives en gadolinium ont été détectées parmi certaines espèces. Cela pouvant s'expliquer par le fait que le gadolinium est très utilisé dans le secteur du médical et que l'estuaire de la Loire est situé autour d'une zone densément peuplée.

En outre, la distribution des terres rares met en évidence la dominance des terres rares légères au sein de chaque espèce étudiée. Le Cérium est la terre rare la plus abondante dans toutes les espèces. Cela pouvant être dû au fait que ce soit l'élément terre rare le plus présent dans la croûte terrestre ou bien au fait que le Cérium soit utilisé dans de nombreux domaines d'applications.

D'un point de vue personnel, ce stage m'a apporté énormément. Hésitant depuis le début de mes études à poursuivre dans la recherche, j'ai pu me faire une réelle idée de ce monde. Travailler avec une thésarde a été très bénéfique, car je pouvais voir son véritable quotidien de travail. Je suis encore en doute sur le fait de poursuivre dans cette voie, car je n'ai toujours pas eu d'expériences professionnelles dans un bureau d'étude. Néanmoins, ce stage m'a permis de me rendre compte qu'en travaillant dans la recherche, notre esprit scientifique est toujours stimulé.

Au début du stage, j'ai eu un peu de mal à m'adapter aux différents concepts nécessaires à la compréhension du sujet, car le sujet de stage étant principalement de l'écotoxicologie, je n'en avais jamais fait. Finalement, avec l'aide de ma maître de stage, de la thésarde et de ma collègue, j'ai rapidement su rebondir.

Les différentes démarches afin de répondre à la problématique ont été celles présentées dans les différents articles scientifiques. D'abord, une recherche bibliographique afin de se renseigner sur le sujet, puis la préparation des échantillons pour les analyser. Ensuite, le traitement des données, puis l'interprétation de celles-ci. Ce stage m'a aussi permis d'être plus à l'aise avec les manipulations effectuées. Le travail de laboratoire représentant au moins 50% du temps que j'ai passé ici.

Les résultats produits afin de caractériser la contamination en éléments terres rares de l'estuaire de la Loire sont pour la plupart des graphiques accompagnés de données statistiques. Pour ma part, je pense que les graphiques permettent de bien visualiser la répartition des terres rares, la différence de concentrations entre les différentes espèces.

Pour les propositions de piste de changement, ces différents résultats permettent de se rendre compte que ces polluants émergents commencent à être bel et bien présents dans l'hydrosphère et qu'il faudrait mettre en place diverses réglementations pour encadrer le rejet des terres rares en milieu naturel. De plus, cela aurait aussi été intéressant d'exposer différentes espèces à différentes concentrations de terres rares afin de voir si des effets nocifs seraient apparus.

Pour finir, je trouve que ce stage a été très complet, je suis partie d'un organisme aquatique entier et j'ai réalisé tout le processus afin de déterminer sa concentration en éléments terres rares. Cela a été très enrichissant autant sur le point de vue professionnel que personnel.

Bibliographie

- Agence de l'Eau et I.F.R.E.M.E.R. 1992. « Estuaires et deltas : des milieux menacés ? ». 25 juin 1992
- Amyot et al. 2017. « Fate and Trophic Transfer of Rare Earth Elements in Temperate Lake Food Webs ». *Environmental Science & Technology*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700198769> (9 juillet 2021).
- Bau, Michael et al. 2018. « The European Shale: An Improved Data Set for Normalisation of Rare Earth Element and Yttrium Concentrations in Environmental and Biological Samples from Europe ». *Applied Geochemistry* 90: 142-49.
- Bau, Michael, et Peter Dulski. 1996a. « Anthropogenic Origin of Positive Gadolinium Anomalies in River Waters ». *Earth and Planetary Science Letters* 143(1): 245-55.
- . 1996b. « Anthropogenic Origin of Positive Gadolinium Anomalies in River Waters ». *Earth and Planetary Science Letters* 143(1): 245-55.
- Chouvelon, T. et al. 2015. « Isotope and Fatty Acid Trends along Continental Shelf Depth Gradients: Inshore versus Offshore Hydrological Influences on Benthic Trophic Functioning ». *Progress in Oceanography* 138: 158-75.
- Christmann, Patrice. 2011. « Les nouvelles ressources en minerais stratégiques : l'exemple des terres rares ». *Geoeconomie* n° 59(4): 75-86.
- « Corophium volutator / arenarium | DORIS ». [https://doris.ffessm.fr/Especies/Corophium-volutator-arenarium-Corophie-tourneur-des-sables-5110/\(rOffset\)/0](https://doris.ffessm.fr/Especies/Corophium-volutator-arenarium-Corophie-tourneur-des-sables-5110/(rOffset)/0) (6 juillet 2021).
- Coynel, Alexandra et al. 2016. « Spatial Distribution of Trace Elements in the Surface Sediments of a Major European Estuary (Loire Estuary, France): Source Identification and Evaluation of Anthropogenic Contribution ». *Journal of Sea Research* 118: 77-91.
- « Effects of Rare Earth Metal Ions and Their EDTA Complexes on Antioxidant Enzymes of Fish Liver | SpringerLink ». <https://link.springer.com/article/10.1007/s0012800136> (21 avril 2021).
- Elliott, M., et A. K. Whitfield. 2011. « Challenging Paradigms in Estuarine Ecology and Management ». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 94(4): 306-14.
- « Hediste diversicolor | DORIS ». [https://doris.ffessm.fr/Especies/Hediste-diversicolor-Nereis-multicolore-715/\(rOffset\)/0](https://doris.ffessm.fr/Especies/Hediste-diversicolor-Nereis-multicolore-715/(rOffset)/0) (6 juillet 2021).
- « Heteromastus filiformis ». <https://www.sealifebase.ca/summary/Heteromastus-filiformis.html> (12 juillet 2021).
- « ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse : Dossier complet | Techniques de l'Ingénieur ». <https://www-techniques-ingenieur-fr.proxy.scd.univ-tours.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/methodes-nucleaires-d-analyse-42389210/icp-ms-couplage-plasma-induit-par-haute-frequence-spectrometrie-de-masse-p2720/> (3 mai 2021).

Kulaksız, Serkan, et Michael Bau. 2011. « Anthropogenic Gadolinium as a Microcontaminant in Tap Water Used as Drinking Water in Urban Areas and Megacities ». *Applied Geochemistry* 26(11): 1877-85.

« Limecola balthica | DORIS ». <https://doris.ffessm.fr/Especies/Limecola-balthica-Telline-de-la-Baltique-2611> (6 juillet 2021).

Lorhtolarie Marjorie. 2021. « Les Terres Rares : Exposition et bioaccumulation de deux espèces clés de l'écosystème estuaire ligérien ».

« Nephtys spp. | DORIS ». <https://doris.ffessm.fr/Especies/Nephtys-spp.-Gravette-blanche-ou-rose-3786> (6 juillet 2021).

Nørregaard, Rasmus Dyrmose et al. 2019. « Bioaccumulation of Rare Earth Elements in Juvenile Arctic Char (*Salvelinus Alpinus*) under Field Experimental Conditions ». *Science of The Total Environment* 688: 529-35.

Robert, Philippe et al. 2018. « One-Year Retention of Gadolinium in the Brain: Comparison of Gadodiamide and Gadoterate Meglumine in a Rodent Model ». *Radiology* 288(2): 424-33.

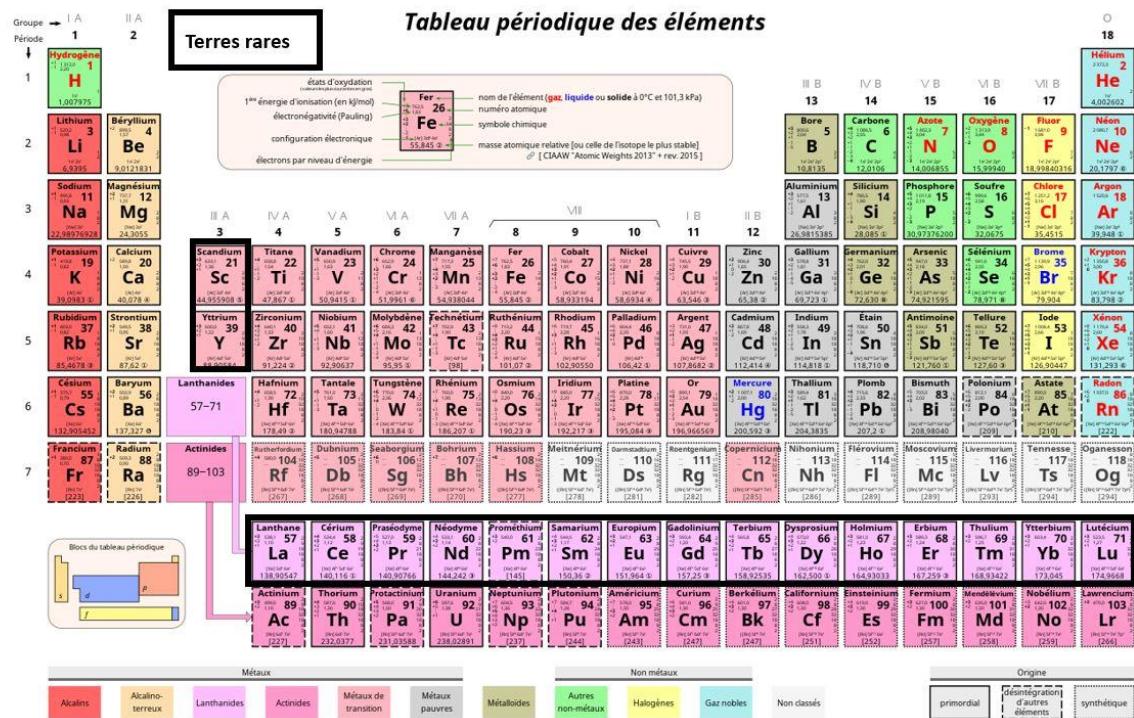
« Scrobicularia plana | DORIS ». [https://doris.ffessm.fr/Especies/Scrobicularia-plana-Scrobiculaire-2060/\(rOffset\)/0](https://doris.ffessm.fr/Especies/Scrobicularia-plana-Scrobiculaire-2060/(rOffset)/0) (6 juillet 2021).

« Terres rares : Dossier complet | Techniques de l'Ingénieur ». <https://www-techniques-ingenieur-fr.proxy.scd.univ-tours.fr/base-documentaire/42319210-fabrication-des-grands-produits-industriels-en-chimie-et-petrochimie/download/j6630/terres-rares.html> (27 avril 2021).

Thibault de Chanvalon, A. et al. 2016. « Particles Transformation in Estuaries: Fe, Mn and REE Signatures through the Loire Estuary ». *Journal of Sea Research* 118: 103-12.

Annexes

Annexe 1 : Les terres rares dans le tableau périodique



Résumé

Les terres rares regroupent un ensemble de 17 métaux aux diverses propriétés physico-chimiques très intéressantes ; magnétique, optique ou encore électronique. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines tels que l'éolien, le médical, la fabrication de batterie, d'aimants permanents... Leur utilisation croissante amène alors à de nombreux rejets anthropiques dans l'hydrosphère et en fait des polluants émergents. Ce rapport a pour but d'évaluer la distribution en éléments terres rares dans le réseau trophique de l'estuaire de la Loire de la macrofaune benthique aux poissons. Ici, 8 espèces seront étudiées : *Nephthys hombergii*, *Nereis diversicolor*, *Heteromastus filiformis*, *Corophium volutator*, *Limecola balthica*, *Scrobicularia plana*, *Chelon ramada* et *Anguilla anguilla*. Leurs concentrations en terres rares ont été déterminé à l'aide de l'ICP-MS, : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif. Il a été observé au sein des différentes espèces une dilution trophique, les poissons étudiés, positionnés à la tête du réseau trophique, contenaient de 3 à 43 fois moins d'éléments terres rares que le bivalve *Limecola balthica*, situé en bas du réseau trophique. En outre, la prédominance du Cérium ainsi que des terres rares légères à travers tous les organismes aquatiques étudiés a été trouvé. La part en terres rares légères étant d'en moyenne 72,4% chez les organismes. La normalisation des terres rares a montré des anomalies positives en Cérium et en Gadolinium chez certaines espèces. Cela peut s'expliquer par le fait que le Cérium a des conditions redox particulières, des mécanismes d'accumulation préférentiels ou tout simplement à l'augmentation des concentrations dans le milieu suite aux usages anthropiques et que le Gadolinium est très utilisé dans le secteur du médical.

Abstract

Rare Earth Elements are a group of metallics elements with various interesting physico-chemical properties such as magnetic, electronic and optical. They are use in many fields such as wind power, medical, battery manufacturing, permanent magnets... Their increasing use leads to numerous anthropogenic discharges into the hydrosphere and make them emerging pollutants. The purpose of this report is to assess the distribution of rare earth elements in the food web of the Loire estuary from benthic macrofauna to fishes. Here, 8 species will be study; *Nephthys hombergii*, *Nereis diversicolor*, *Heteromastus filiformis*, *Corophium volutator*, *Limecola balthica*, *Scrobicularia plana*, *Chelon ramada* et *Anguilla anguilla*. There concentrations in Rare Earth Elements have been determinate thanks to the ICP-MS, Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry. It has been observed in different species of the food web a trophic dilution, the fishes, at the highest rank of the food web, studied contained 3 to 43 times less Rare Earth Elements than the bivalve *Limecola balthica*, positioned at the bottom of the food web. In addition, the predominance of Cerium and Light Rare Earth Elements across all the aquatic organisms studied was found. The average share of Light Rare Earth Elements is 72.4% in the organisms. The normalization of Rare Earth Elements has shown positives abnormalities in Cerium and Gadolinium in some species. Which may be explained by the fact that Cerium has special redox conditions, preferential accumulation mechanisms or simply increased concentrations in the environment as a result of anthropogenic uses and that Gadolinium is widely used in the medical industry.