

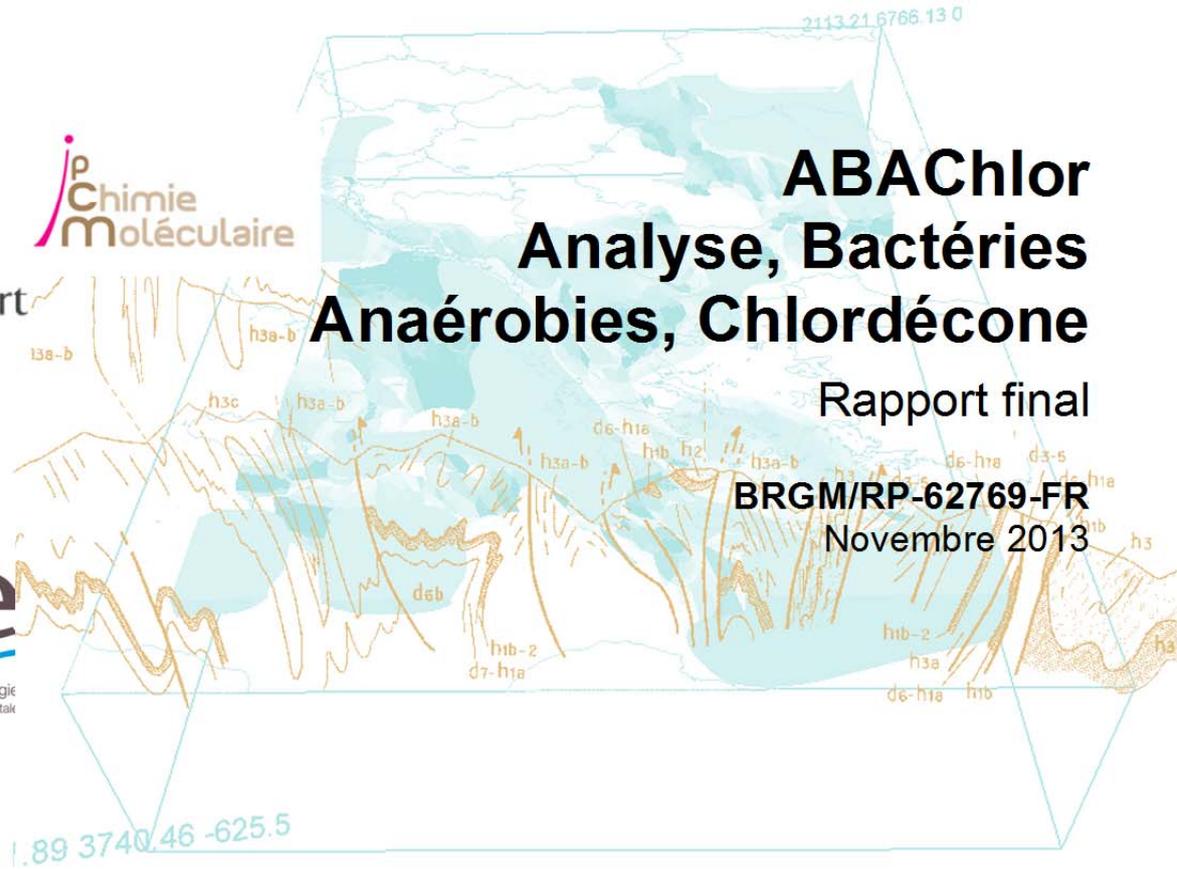
Document public



ABACHlor Analyse, Bactéries Anaérobies, Chlordécone

Rapport final

BRGM/RP-62769-FR
Novembre 2013



Document public



ABACHlor Analyse, Bactéries Anaérobies, Chlordécone

Rapport final



BRGM/RP-62769-FR
Novembre 2013



Étude réalisée dans le cadre des opérations
de Service public du BRGM

C. Mouvet
Avec la collaboration de
**S. Bristeau, L. Amalric, H. Dossman, B. Maunit, H. Belghit,
B. Ollivier, A. Archelas et H. Macarie**



Vérificateur :
Nom : F. GARRIDO
Date :
Signature :

Approbateur :
Nom :
Date :
Signature :



Le système de management de la qualité et de l'environnement
est certifié par AFNOR selon les normes ISO 9001 et ISO 14001.



Mots-clés : ABACHlor, Analyse, Bactéries, Anaérobies, Chlordécone.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Mouvet C., avec la collaboration de **Bristeau S., Amalric L., Dossman H., Maunit B., Belghit H., Ollivier B., Archelas A. et Macarie H.** (2013) – ABACHlor : Analyse, Bactéries, Anaérobies, Chlordécone. Rapport final. BRGM/RP-62769-FR, 153 p., 6 ann.

Synthèse

En juillet 2010, dans le cadre du Plan National d'Action Chlordécone (CLD), l'INRA a lancé l'appel à projets « Études exploratoires de la dégradation microbienne de la chlordécone », acronyme DEMICHLORD, soutenu par une Action Incitative Programmée.

Un consortium piloté par le BRGM a fédéré au travers du projet intitulé ABACHlor (Analyse, Bactéries Anaérobies, Chlordécone) les efforts de cinq équipes de recherche nationales et deux experts internationaux :

- BRGM/EPI : Dr C. Mouvet (coordinateur) ;
- BRGM/MMA : Dr L. Amalric ;
- Université P. et M. Curie, UMR 7201, CNRS : Prof. Jean-Claude Tabet ;
- IRD, UMR 180 MICROBIOTECH : Dr Bernard Ollivier ;
- IRD, UMR 193 IMEP : Dr Hervé Macarie (associé à Jan Dolfing, School of Civil Engineering and Geosciences, Newcastle University, et Igor Novak, Charles Sturt University, Australie) ;
- CNRS, UMR 6263 ISM2 : Dr Alain Archelas.

Certains noms d'équipes (BRGM/MMA et BRGM/EPI) et responsables (J.C. Tabet) ont changé durant le projet, les informations ci-dessus sont celles ayant permis la signature de la convention avec l'INRA. En cours de projet, une collaboration supplémentaire a été nouée par le BRGM avec l'Institut de Chimie Organique Analytique de l'Université d'Orléans, Prof. B. Maunit.

Le projet ABACHlor a permis une série d'avancées scientifiques notoires en lien direct avec la problématique de remédiation des environnements contaminés par la CLD.

La validation complète d'une méthode d'analyse de la CLD dans les trois principaux types de sols antillais offre une assise fiable pour des suivis environnementaux de ces milieux, quels que soient les procédés de remédiation mis en œuvre. Le fait que cette méthode se soit révélée appropriée pour les produits de transformation de la CLD résultant du procédé de remédiation d'*In Situ* Chemical Reduction (ISCR), le seul à ce jour ayant fait preuve d'efficacité pour diminuer la concentration en CLD dans les sols, permettra de renforcer la valeur des résultats futurs obtenus par ce procédé.

L'identification de la structure de tous les produits possibles de déchloration de la CLD fournit un référentiel univoque indiscutable auquel pourront se référer tous les travaux futurs de l'ensemble de la communauté travaillant sur la transformation de la CLD. Les valeurs d'énergie libre de Gibbs rendues disponibles seront utiles pour expliquer les voies éventuelles de métabolisation de la CLD.

Les résultats de terrain et de laboratoire montrent un potentiel des communautés naturelles méthanogènes à dégrader la CLD. Ces résultats sont certes très peu nombreux et demandent confirmation, mais ils sont plus prometteurs que ceux obtenus avec des souches pures de bactéries et archées méthanogènes.

Il reste beaucoup de chemin à parcourir avant d'envisager d'éventuelles applications *in situ* de procédés basés sur la seule dégradation microbiologique dont l'efficacité (p. ex. au moins 50 % d'abattement) reste à démontrer, même pour des simples milieux de culture. Les travaux menés

en milieu liquide avec des champignons isolés de sols contaminés en CLD dans le projet BIODECHLORD (lui-aussi soutenu par l'AIP DEMICHLORD) montrent au maximum 1,2 % de minéralisation de la CLD et quasi pas d'autres transformations de la CLD (Merlin *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une approche physico-chimique a montré en laboratoire sa capacité à diminuer de 71 % la concentration en CLD de nitisols et ferralsols antillais avec la formation de produits déchlorés (Dictor *et al.*, 2011 ; Mouvet *et al.*, 2012). Une voie d'avenir repose donc probablement sur la combinaison des deux approches : physico-chimique d'abord pour déchlorer la CLD et en faciliter l'attaque microbienne, puis microbiologique pour éventuellement poursuivre la déchloration mais surtout attaquer le squelette carboné et entamer la minéralisation de la CLD.

Sommaire

1. Développements analytiques et calculs thermodynamiques	7
1.1. BRGM (annexe 1).....	7
1.2. UMR 7201 (annexe 2)	7
1.3. ICOA ET BRGM (annexe 3)	7
1.4. CNRS, UMR 6263 ISM2, ET IRD, UMR 193 IMEP (annexe 4 et 1 ^{re} partie de l'annexe 5)	8
2. Étude du potentiel de dégradation de la chlordécone par la culture pure de bactéries et archées méthanogènes	9
2.1. IRD, UMR 180 MICROBIOTECH (annexe 6)	9
3. Étude du potentiel de dégradation de la chlordécone par des sources naturelles de Methanoarchaea	11
3.1. IRD, UMR 193 IMEP (2 ^e partie de l'annexe 5).....	11
4. Perspectives et valorisations des résultats.....	13
4.1. PERSPECTIVES	13
4.2. VALORISATION DES RÉSULTATS ET FORMATION À LA RECHERCHE	14
5. Bibliographie	17

Liste des annexes

Annexe 1 - Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content	19
Annexe 2 - Contribution de l'équipe CSOB-UPMC	41
Annexe 3 - Contribution des équipes ICOA – BRGM	61
Annexe 4 - CNRS – ISM2 – AMU	99
Annexe 5 - Travail réalisé sur le projet Abachlor par IRD-IMBE-AMU-CAEC et ses partenaires.....	109
Annexe 6 - IRD UMR 180 MICROBIOTECH.....	143

1. Développements analytiques et calculs thermodynamiques

1.1. BRGM (annexe 1)

Une méthode analytique a été développée et validée (Bristeau *et al.*, 2013) pour l'analyse de la chlordécone (CLD) dans les trois principaux types de sols Antillais (ferralsol, andosol et nitosol) sans et avec ajout de matières organiques mises en œuvre dans certains procédés de remédiation. La méthode consiste en une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CLD-¹³C comme étalon interne) couplée à la spectrométrie de masse (triple quadripôle) après une extraction par fluide pressurisé (ASE) avec l'ajout d'un traceur d'extraction (transnonachlore). Les paramètres clés de la méthode ont été validés en s'appuyant sur la norme NF EN T90210. La limite de quantification est de 0,03 mg.kg⁻¹ pour la CLD. L'incertitude élargie (k = 2) est de 40 % pour des teneurs en CLD inférieures ou égales à 1 mg.kg⁻¹, et de 30 % pour des valeurs supérieures à 1 mg.kg⁻¹.

1.2. UMR 7201 (annexe 2)

Des analyses d'étalons de chlordécone (CLD) et chlordécone-5b-hydro (CLD-5b), ainsi que d'extraits de sols traités par In Situ Chemical Reduction (ISCR), ont été réalisées en infusion directe par électrospray (ESI) en mode négatif sur un triple quadripôle (basse résolution) et un FT-ICR (haute résolution). Les spectres obtenus à très haute résolution montrent la formation de différents ions adduits chlorés dont l'activation par collision conduit à un ou plusieurs types de fragments. La méthode d'activation de la CLD par attachement d'anions a été testée pour Cl⁻, F⁻, I⁻, CH₃COO⁻ et CN⁻; les résultats sont très encourageants pour cette voie d'analyse, l'ion CN⁻ formant un adduit [C₁₀Cl₁₀O,CN]⁻. Parmi 24 autres anions inorganiques et organiques testés, seuls CH₂CHCOO⁻, CH₂CHCH₂COO⁻, HCCCOO⁻ et BH₄⁻ forment un adduit de type [C₁₀Cl₁₀O,A]⁻ (A =anion). Ces résultats présentent un intérêt certain de recherche fondamentale et mériteront d'être approfondis dans d'autres projets.

1.3. ICOA ET BRGM (annexe 3)

La capacité de la méthode validée pour la CLD (extraction ASE avec mélange acétone/hexane, cf. annexe 1) à extraire aussi bien que d'autres méthodes des produits de transformation potentiellement formés par le procédé de remédiation ISCR a été vérifiée. Un andosol traité pendant six mois par ISCR a été extrait par deux méthodes différentes, ASE et Soxtec, avec dans chaque cas cinq mélanges binaires de solvants : acétone/hexane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane/acide trifluoroacétique (TFA) (50/50) (v/v) avec 0,1 % TFA, acétone/acétonitrile (50/50) et acétone/acétonitrile/TFA (50/50) (v/v) avec 0,1 % TFA. Sur base des résultats obtenus en GC/MS full scan et en LC/MS, aucune des 10 combinaisons solvant/méthode d'extraction ne se différencie quant à sa capacité à extraire le produit de transformation majoritaire de la CLD résultant du traitement ISCR (une mono-hydroCLD autre que la 5b) ou d'autres produits de transformation de la CLD. Une analyse des extraits en mode GC/MS Selected Reaction Monitoring, plus sensible que le full scan, devra toutefois être faite pour valider complètement cette conclusion et l'étendre éventuellement à des produits de transformation autres que ceux détectables en full scan.

1.4. CNRS, UMR 6263 ISM2, ET IRD, UMR 193 IMEP (annexe 4 et 1^{re} partie de l'annexe 5)

En parallèle aux développements analytiques, une approche théorique de chimie structurale (annexe 4) a permis de déterminer la structure et d'attribuer le nom de nomenclature International Union of Pure and Analytical Chemistry (IUPAC) et Chemical Abstracts Service (CAS) à tous les composés (485 congénères en plus de la molécule mère, dont 289 avec une énergie libre de Gibbs de formation - ΔG_f° - différente) pouvant être théoriquement générés par déchloration de la chlordécone.

Des calculs thermodynamiques ont par ailleurs permis d'estimer le ΔG_f° de 62 des 485 congénères identifiés (des contraintes financières ont empêché de faire ces calculs pour plus de congénères) ainsi que les variations d'énergie libre de Gibbs associées aux réactions théoriques de : i) déchloration successive de la chlordécone (arrachage d'1, 2, 3... à 10 chlores), ii) minéralisation ultime de cette molécule dans différentes conditions rédox (aérobiose, réduction du fer ferrique, dénitrification, sulfato-réduction, méthanogénèse), iii) réduction (formation de chlordécol) ou oxydation (formation de chlordécone lactone) de sa fonction cétone, et iv) de fermentation (1^e partie de l'annexe 5 ; Dolfing *et al.*, 2012). Toutes les réactions envisagées sont thermodynamiquement favorables tant dans les conditions standards que *in situ*. La déchloration d'un seul chlore, ainsi que les réactions de réduction et oxydation de la fonction cétone, libèrent suffisamment d'énergie pour permettre la synthèse d'ATP et donc la croissance microbienne. Les dérivés dont la production libère le plus d'énergie ont pu être identifiés. Ces composés devraient donc être formés préférentiellement lors d'attaque microbienne. Il faut toutefois garder à l'esprit les limites de cette approche thermodynamique qui ne prend en compte ni la cinétique des réactions ni l'énergie d'activation par lesquelles ces dernières doivent passer.

Les potentiels d'oxydo-réduction calculés pour la CLD et ses produits déchlorés suggèrent que l'absence apparente de dégradation de la CLD dans les sols et les eaux souterraines des Antilles soit due à la relative abondance dans ces milieux d'accepteurs d'électrons très forts, tels que O_2 et Fe^{3+} . La déchloration réductive de la CLD pourrait par contre avoir lieu dans des sédiments d'environnements submergés de façon intermittente (mangroves, marécages d'eau douce comme la forêt à *Pterocarpus officinalis*) ou de façon permanente (sédiments marins, lacustres), mais aussi dans des écosystèmes créés par l'homme tels que les digesteurs anaérobies de vinasses de distillerie ou la fraction organique des ordures ménagères.

En plus des aspects thermodynamiques, des calculs suggèrent que la solubilité théorique dans l'eau des dérivés déchlorés de la CLD devrait augmenter à mesure que le nombre de chlores portés par la cage bishomocubane diminue : la decahydro-CLD serait 75 000 fois plus soluble dans l'eau (en mole/L) que la CLD.

Pour pallier le fait que tous les calculs ci-dessus sont basés sur des valeurs estimées de ΔG_f° , quelques mesures expérimentales par calorimétrie ont été effectuées (collaboration avec Dr. Aaron Rojas Aguilar et Luis Alfonso Torres Gómez du Département de Chimie du Cinvestav-IPN au Mexique), dans le but de déterminer l'enthalpie de formation de la CLD et du mirex et ainsi pouvoir vérifier la solidité de la méthode utilisée pour estimer les ΔG_f° .

2. Étude du potentiel de dégradation de la chlordécone par la culture pure de bactéries et archées méthanogènes

2.1. IRD, UMR 180 MICROBIOTECH (annexe 6)

Des expériences de dégradation de la CLD ont mis en œuvre deux bactéries (*Desulfitobacterium dehalogenans* et *Mesotoga* sp) et deux archées méthanogènes (*Methanobacterium bryantii* et *Methanosarcina barkeri*) dont les milieux de culture étaient enrichis en donneur d'électrons. Les résultats obtenus après neuf mois d'incubations à 37 °C ont montré une très grande variabilité dans les témoins biotiques ou abiotiques qui rend très délicate l'attribution aux microorganismes des baisses de concentration en CLD éventuellement observées dans les cultures non stérilisées. Seuls les résultats avec *Desulfitobacterium dehalogenans* et le lactate comme donneur d'électrons semblent suggérer une certaine biodégradation. Une seconde série d'expériences (trois mois et demi d'incubation) menée avec cette souche montre que les seuls traitements biotiques et abiotiques pour lesquels il existe une différence significative à la fois dans les concentrations en CLD, mais également en chlordécol, sont ceux qui mettent en jeu la bactérie en l'absence de lactate mais dans un milieu qui contient néanmoins 1 g/L d'extrait de levure. Des expériences complémentaires avec un protocole encore optimisé (mise en solution et ajouts de la CLD et du traceur d'extraction, choix du donneur d'électrons, durée des incubations...) restent nécessaires avant de pouvoir conclure à un rôle réel joué par *Desulfitobacterium dehalogenans* dans la dégradation de la CLD en milieu de culture liquide.

3. Étude du potentiel de dégradation de la chlordécone par des sources naturelles de Methanoarchaea

3.1. IRD, UMR 193 IMEP (2^e partie de l'annexe 5)

Des prélèvements réalisés à l'entrée et à la sortie de méthaniseurs traitant les vinasses de deux distilleries de rhum ainsi que dans les boues biologiques montrent que : i) 53 à 91 % de la chlordécone (CLD) détectée dans les vinasses en entrée des méthaniseurs n'est pas retrouvée en sortie, ii) la chlordécone-5b-hydro détectée en entrée ne l'est plus en sortie, iii) la concentration de CLD et CLD-5b-hydro dans les boues est très inférieure à celle qu'on devrait y retrouver si ces deux composés n'étaient éliminés que de façon physique dans les réacteurs par adsorption sur ces boues biologiques. Ces résultats suggèrent que les environnements méthanogènes sont propices à la dégradation de la CLD et de ses dérivés moins chlorés.

En laboratoire, l'installation d'un méthaniseur de 2 L a été réalisée de novo. Les résultats obtenus pour les paramètres classiques de performance sont très bons, avec un abattement de DCO moyen de $96,2 \pm 2,5$ % pour la DCO totale et de $97,7 \pm 0,5$ % pour la DCO soluble, abattement couplé à un rendement méthane (rapport entre la quantité de méthane produite et la quantité de DCO dégradée) moyen de $0,32 \pm 0,06$ L CH₄ /g DCO dégradée, très proche du rendement théorique de 0,35. Le potentiel rédox très négatif mesuré dans la boue du système (EAg/AgCl = - 345 mV ; pH 7,17) est également caractéristique de ceux observés les environnements méthanogéniques.

Le développement du volet « CLD » s'est par contre heurté à toute une série de problèmes liés au contexte local Martiniquais qui limite la disponibilité d'équipements analytiques adaptés. En effet, le seul équipement permettant l'analyse de la CLD (extraction des échantillons d'eau par SPME suivie d'une analyse par GC/MS) est sollicité par plusieurs projets et a souffert de pannes répétées avec des temps de remise en état beaucoup plus longs qu'en métropole. Pour se prémunir de ces problèmes, le choix a été fait de privilégier, comme indicateur de transformation de la CLD, la mesure des chlorures formés lors de la déchloration. Toutefois, cette approche s'est elle-même heurtée aux limites en matériel d'analyse disponible localement, seule la colorimétrie (spectrophotomètre Hach-Lange DR3900) pouvant être mise en œuvre. Les travaux menés ont montré de fortes interférences entre les mesures colorimétriques des chlorures d'une part, et d'autre part les sources de carbone (acétate) et soufre (cystéine) du milieu de culture, ainsi que les résidus de vinasse (chromophore brun – orange) associés à l'inoculum bactérien utilisé. Des essais menés en chromatographie ionique (CI) se sont eux-aussi révélés insatisfaisants pour le suivi des chlorures dans le milieu de culture. En effet, une concentration en acétate de 17 mg/L (alors qu'elle est de 1 g/L dans le milieu) interfère avec le pic de chlorures à 1 mg/L (concentration dans la gamme des valeurs attendues en cas de déchloration de la CLD). Le suivi des chlorures par CI semble par contre possible en sortie du réacteur.

Malgré tous ces problèmes, un résultat très prometteur a été obtenu. Pour une concentration en CLD de 2 mg/L en entrée de digesteur et un temps de rétention hydraulique de 5 jours, un abattement supérieur ou égal à 79 % de la concentration en CLD (mesurée par SPME – GC/MS) a été obtenu. Vu que cette valeur correspond à une seule mesure sans mise en évidence d'intermédiaires de dégradation, elle doit être prise avec très grande prudence.

4. Perspectives et valorisations des résultats

4.1. PERSPECTIVES

Le projet ABACHlor a permis d'identifier des perspectives prometteuses et de cerner les limites de certaines approches.

Du côté analytique, divers travaux seraient à mener dans le proche futur. Tout d'abord l'amélioration des capacités à détecter dans les sols des produits de transformation formés par les procédés de remédiation, quels qu'ils soient. Il serait notamment utile de disposer de procédures scrupuleusement validées pour purifier des extraits de sols sans perte des composés initialement présents. Les méthodes les plus sensibles (e.g. GC/MS en mode Selected Reaction Monitoring) devraient ensuite être appliquées à ces extraits. Par ailleurs, la technique d'ionisation chimique en GC/MS devrait également être testée sur des extraits de sols, et la microextraction en phase solide (Solid Phase Micro-Extraction) utilisée pour rechercher des produits de transformation dans les principaux types de sols sans extraction chimique préalable.

Une seconde perspective analytique consiste à obtenir des étalons de produits de transformation autres que les deux seuls disponibles actuellement, le chlordécol et la 5b-hydrochlordécone. Disposer de ces étalons est une absolue nécessité pour permettre la quantification des produits formés et en tester le comportement environnemental (solubilité dans l'eau, sorption, dégradation...) et en déterminer le profil (éco)toxicologique.

La troisième perspective analytique est probablement la plus complexe : déterminer de manière absolument univoque la structure des produits de transformation. Vu la multiplicité des congénères possibles pour un même degré de déchloration, il faut, pour caractériser entièrement la molécule formée, arriver à préciser les positions de ces déchloration sur le squelette carboné. Ces positions pourraient avoir un rôle dans le potentiel de micro-organismes à poursuivre la transformation de la chlordécone au-delà des premières déchloration.

Les travaux de chimie structurale et de calculs thermodynamiques ouvrent également des perspectives. Il s'agirait par exemple de poursuivre les calculs d'énergie libre de Gibbs pour les congénères non encore pris en compte. Ces données pourraient aider à la sélection des congénères devant faire l'objet de la plus grande attention, que ce soit pour les développements analytiques ou pour leur recherche dans les voies de transformation par déchloration, voire de minéralisation.

Les résultats obtenus sur le potentiel de biodégradation de la chlordécone par diverses souches de bactéries et d'archées sont contrastés. Si les résultats obtenus à partir de souches méthanogènes pures isolées ne sont pas encore très convaincants, le potentiel de consortia issus de méthaniseurs ouvre par contre des perspectives. Certes ces résultats restent à confirmer, mais ils pourraient ouvrir la voie assez rapidement à des applications en conditions naturelles.

Toutes ces perspectives doivent être examinées à la lumière du problème concerné. La contamination des écosystèmes antillais par la chlordécone est un problème socio-économique majeur, et la source première de ces problèmes est la présence de chlordécone dans les sols et sous-sols. Partant essentiellement de ces deux seuls compartiments, c'est la multiplicité des voies et mécanismes de transfert qui aboutit à la contamination des plantes et animaux terrestres, crustacés d'eau douce, poissons et crustacés marins, eaux superficielles,

souterraines, estuariennes, marines... La priorité doit donc être mise sur des travaux permettant de traiter le problème à la source. Si ces travaux doivent évidemment être basés sur des approches scientifiques rigoureuses, ils doivent toutefois éviter de prendre une orientation trop fondamentale, de manière à maximiser les chances de proposer des solutions réellement applicables à court (2 - 3 ans) ou moyen terme (3 - 5 ans). Dans cette optique, un procédé comme l'*In Situ* Chemical Reduction, potentiellement opérationnel à court terme, mérite une attention particulière. Une validation de l'ISCR est en cours sur une parcelle expérimentale en Martinique (convention MEDDTL/DGPR – Brgm) ; mener plus avant ces travaux, afin de mieux cerner les possibilités et les limites du procédé en conjonction éventuellement avec des méthodes purement microbiologiques, semble une des perspectives à privilégier. Couplés aux travaux menés sur les modifications de pratiques culturales (y compris la séquestration - temporaire ? - de la chlordécone par ajout de compost), de tels procédés, une fois validés en conditions naturelles, permettraient de proposer des voies de résolution du problème de la contamination des sols par la chlordécone. Une fois ce compartiment sol (et sous-sol) décontaminé (ou au moins sa contamination gérée de manière préventive durable), il faudra toutefois être patient pour voir les effets positifs sur les autres compartiments des écosystèmes, les temps de transfert entre compartiments se chiffrant en années ou décennies.

4.2. VALORISATION DES RÉSULTATS ET FORMATION À LA RECHERCHE

Plusieurs voies de valorisations des travaux menés au travers du projet ABACHlor ont été suivies.

Publications de rang A

Dolfing J., Novak I., Archelas A., Macarie H. (2012) - Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environmental Science & Technology*, 46, p. 8313-8139.

Bristeau S., Amalric L. and Mouvet C. (2013) - Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, DOI 10.1007/s00216-013-7160-2.

Articles dans des magazines de vulgarisation

Macarie H., Dolfing J. (2011) - La chlordécone (CLD) est-elle véritablement réfractaire à une dégradation microbienne ? *Les Cahiers du PRAM*, 9, 25-30, 91-95. (<http://www.pram-martinique.org/actualite/Cahiers-pram-9-10.pdf>).

Communications avec articles dans Actes de congrès

Macarie H., Devault D., Sastre Conde I., Rangon L., Soler A., Labrousse Y., Charpy-Roubaud C., Roussos S., Guiral D., Dolfing J., Novak I. Archelas A., Woignier T. (2012) - La chlordécone est-elle biodégradable et biodisponible ? Quelques considérations issues de la littérature et résultats expérimentaux préliminaires. In : **Actes du XXXIX^e congrès du Groupe Français des Pesticides** – 25-27 mai 2011, Orléans, France, Baran N. & Togola A. (Eds)., BRGM (ISBN 978-2-9530816-5-7, EAN : 9782953081657), 8 pages.

Communications invitées

Macarie H., Dolfing J., Igor N., Archelas A., Labrousse Y. (2012) - La chlordécone (CLD) est-elle véritablement réfractaire à toute dégradation microbienne ? Ce que nous dit la littérature,

une approche théorique et des résultats expérimentaux préliminaires. **Présentation effectuée aux Journées de la recherche chlordécone : Recherche agro-environnementale et états des milieux**, 24-25 octobre 2012, Schoelcher/Martinique, Gosier/Guadeloupe.

Poster avec article dans CD-ROM de congrès

Macarie H., Labrousse Y., Sastre-Conde I., Bristeau S., Mouvet C. (2013) - Further evidence of biodegradability of the POP chlordécone under methanogenic conditions. *In: CD ROM Proceedings 13th World Congress on Anaerobic Digestion: recovering (bio)resources for the world*, 25-28 June 2013, Santiago de Compostela, Spain, Lema J.M., Fdez-Polanco F., Carballa M., Rodriguez J., Suárez S. (Eds)., (ISBN 978-84-695-7756-1), 2 pages.

Articles dans la presse

Des pistes contre la chlordécone - Biodégrader une question d'environnement. « Sciences au Sud », le journal de l'IRD, n° 65 (31/07/2012), (<http://www.ird.fr/la-mediatheque/journal-sciences-au-sud/les-numeros-de-sciences-au-sud/n-65-juin-juillet-aout-2012/sciences-au-sud-n-65-recherches>).

Chlordécone : Les bactéries de l'espoir. Fey (Magazine Bimestriel Information Martinique) n° 13, (Janvier 2011) (<http://s3.e-monsite.com/2011/02/11/06/Fey-Magazine-n-13.pdf>).

Biodégradation de la chlordécone : une solution envisageable ? « En Action » n° 10 (octobre 2011) – News Letter du PNAC.

Émissions de radio et de télévision

Godard E., Macarie H., Mouvet C., Woignier T. (2012) - Interview à l'émission « Le tout info » de Radio Caraïbe Internationale sur « la remédiation des sols contaminés à la chlordécone » (http://www.rcimartinique.fm/podcasts/Letoutinfos_25-10-2012_18-41-44.mp3).

Macarie H. (2012) - Interview dans le cadre de l'émission télévisé An Tjè Péyi A" d'ATV, dédié à la dépollution des sols chlordéconés (<http://www.atv.mq/emissions/32>).

Par ailleurs, le projet a permis de former par la recherche trois stagiaires de master, un en Martinique sous la direction de H. Macarie (IRD/PRAM) et deux à Orléans sous la direction de L. Amalric (BRGM) et B. Maunit (ICOA).

5. Bibliographie

Bristeau S., Amalric L. and Mouvet C. (2013) - Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, DOI 10.1007/s00216-013-7160-2.

Dictor M.C., Mercier A., Lereau L., Amalric L., Bristeau S., Mouvet C., avec la collaboration de **Auger P., Béchu E., Breeze D., Touzelet S., Tris H. et Henry B.** (2011) - Décontamination de sols pollués par la chlordécone. Validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique pour la chlordécone dans les sols. Rapport final. BRGM/RP-59481-FR, 201 p., 70 fig., 42 tabl., 6 ann.

Dolfing J., Novak I., Archelas A., Macarie H. (2012) - Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environmental Science & Technology*, 46, p. 8313-8139.

Merlin C., Devers M., Crouzet O., Heraud C., Mougins C. & Martin-Laurent F. (2013) - Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, DOI 10.1007/s11356-013-1971-8.

Mouvet C., Dictor M.-C., Mercier A., Bristeau S., Amalric L., Mueller J. (2012) - *In Situ* Chemical Reduction (ISCR) for Removal of Kepone from Tropical Soils. A-087, in: T.C. Fox and H.V. Reckman (Chairs). Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds—2012. Eighth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds (Monterey, CA; May 2012). ISBN 978-0-9819730-5-0, ©2012 Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, www.battelle.org/chlorcon.

Annexe 1

Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content

Bristeau S., Amalric L. and Mouvet C., 2013. Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, DOI 10.1007/s00216-013-7160-2.

Abstract

An analytic method was developed and validated for the analysis of chlordecone (CLD) in the 3 main types of French West Indies soils: Ferralsol, Andosol and Nitisol with and without the addition of Daramend® and compost amendment used in a remediation process. The method consists in analysis by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry after Pressurized Liquid Extraction. The high natural content of organic matter in the soils coupled with the additional exogenous organic matter from the amendments tested lead to a complex extract. Trans-nonachlor was used as surrogate to correct the results for extraction efficiency, and ¹³C chlordecone was added as internal standard to mimic as closely as possible the behaviour of chlordecone and suppress possible side effects during its analysis. The key parameters of the method (linearity, repeatability, interday precision, specificity, extraction efficiency and limit of quantification) were validated in accordance with the NF T 90-210 standard method. The limit of quantification is 0.03 mg/kg. Uncertainty (k=2) was 40% for concentrations lower than or equal to 1 mg/kg, and 30% for concentrations greater than 1 mg/kg.

Keywords: Soil; Accuracy profile; Chlordecone; Pressurized Liquid Extraction; Gas chromatography; Mass spectrometry.

Introduction

An organochlorine insecticide ($C_{10}Cl_{10}O$) of the bishomocubane family, chlordane (CLD) was used in the French West Indies (FWI) between 1972 and 1993 to protect banana plantation against banana weevil. Over the last ten years, environmental monitoring networks have highlighted high and frequent contamination of waters, sediments and fish fauna [1]. The intrinsic characteristics of CLD (very high persistence and sorption on solids), the quantity of CLD employed (300 tonnes), the areas concerned (hundreds of km^2), the socio-economic impacts (limitation of consumption of locally produced food, bans on fishing) and health concerns [2,3] have resulted in chlordane in the FWI becoming a major environmental, social and economic issue.

The environmental problem posed by CLD in the FWI is worsened by the fact that the contaminated soils are of volcanic origin and may contain significant amounts of amorphous clay (allophane) which has particular exchange characteristics and complexes the organic matter [4].

Two processes for remediating the chlordane contaminated soils have been tested *in vitro* [5]. The first process requires the addition of compost, up to 30% by dry mass. The second process, *Daramend*®, requires the addition, up to 12%, of a mixture of zero valent iron and plant organic matter.

The difficulty for the quantification of chlordane in soils comes from the difficulty in obtaining efficient extraction and an analytical method sufficiently robust to not be unduly affected by the complex matrix.

Only two articles have been dedicated to the extraction and measurement of CLD in French West Indies soils. The first article describes a method based on extraction by Pressurized Liquid Extraction (PLE) followed by GC/MS analysis; the method was validated according to ISO criteria for a mixture of poorly characterized FWI soils [6]. The limit of quantification, 1 mg/kg, is however insufficient when compared to the threshold (0.25 mg/kg) considered as being likely to lead to the contamination of cultivated plants [7]. Studies that use infrared spectrometry have given some interesting results but the analysis is based on statistical interpretation of spectral lines that requires preliminary calibration, and the process revealed poor correlation for high concentrations of CLD (>12 mg/kg; [8]). The other

papers dedicated to the analysis of CLD generally concern developments made on calibration solutions [9, 10, 11].

The aim of the present study was to develop and validate an analytical method for the analysis of CLD in the 3 main types of FWI soils: Ferralsol (FRL), Andosol (AND) and Nitisol (NIT) [4]. The method takes into consideration the input of exogenous organic matter from the remediation processes [5]. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS/MS triple quadrupole) was used, following pressurized liquid extraction (PLE) with the use of ^{13}C chlordecone (CLD13) as internal standard with the objective of reducing the quantification limit.

Materials and methods

Chemicals

The standard chlordecone hydrate (CAS 143-50-0) is commercialised by CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France) in solid form. The internal standard CB53 (CAS 41464-41-9) and the surrogate trans-nonachlor (CAS 39765-80-5) are available from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). CB53 is obtained at 10 mg/L in isooctane and trans-nonachlor in a solid form. CLD13 at 100 mg/L in nonane is commercialised by LGC Standards (Molsheim, France). All of these standards have purity greater than 98%. Analytic grade organic solvents (acetone, cyclohexane and hexane) were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France).

Preparation of standard solutions

The individual standards were prepared from solid standards dissolved in acetone (200 mg/L) and stored at -18°C . A 1 mg/L mixture was then prepared by dilution with cyclohexane. The calibration solutions were then prepared by successive dilutions in cyclohexane in order to obtain a range of concentrations from 15 to 250 $\mu\text{g/L}$. At the end, final solvent of calibration solutions contained (v/v) 0.5% isooctane from the internal standard solution CB53, 0.2% nonane from the internal standard CLD13 and 0.02% (15 $\mu\text{g/L}$) to 0.25% (250 $\mu\text{g/L}$) acetone from CLD and trans-nonachlor solutions.

Instrumentation

The extraction procedure (PLE) was carried out using an ASE 350 system from Dionex S.A. Corporation (Voisins-le-Bretonneux, France) with 22 mL stainless steel vessels. GC/MSMS analysis was performed with a Bruker system (Marne la Vallée, France) composed of a GC450 gas chromatography apparatus equipped with an 1177 injector, a Combi Pal (CTC) autosampler and a 300MS triple quadrupole mass spectrometer.

The injector was equipped with a 4x6.3x78.5 mm liner with fibreglass and Sky™ deactivation. The compounds were separated on an Rxi-1MS (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm) column from Restek (Lisses, France).

Soil samples

The 3 main types of FWI soil, AND, NIT and FRL were collected from Guadeloupe and Martinique. The soil AND is characterised by a very high organic matter content, approximately 4 times greater than the other two soils, a pronounced acidic pH and a CEC that is 1.4 to 2.2 times that of the other two soils. The granulometric clay content of Andosol is markedly lower than that of FRL and NIT (Table 1).

For the study of the remediation processes, the mesocosms were subjected to i) In Situ Chemical Reduction (ISCR) with input of the *Daramend*® soil amendment (60-80% of plant organic matter and 20-40% of zero valent microscopic iron) up to 12% by dry weight of the soil to be treated [12], or ii) input of compost to 30% by weight (equivalent to 50% by volume).

Procedure

1.1.1. Sample preparation

Before analysis, the soil was dried at 38°C (± 1°C) for a period of 72 hours. After drying, the residual humidity of the soil varied between 3 and 8%, depending on the soil type. The sample was reduced by crushing followed by grinding to a particle size of less than 80 µm.

1.1.2.Extraction

Extraction was performed using PLE. This system enables extraction from 5 g of soil (spiked with 0.2 mL of a 10 mg/L solution of trans-nonachlor used as surrogate) by a 50/50 v/v mixture of acetone and hexane. Soils were mixed with Hydromatrix (to remove moisture) and introduced into a 22 mL cell with a piece of cellulose paper in the bottom. The temperature was 100°C, with 3 cycles per sample, a 60% flush volume, a static time of 5 minutes and a purge time of 120 seconds.

In this study, a surrogate was added before the extraction in order to evaluate the extraction process. Trans-nonachlor ($C_{10}H_5C_9$) was selected as it includes, as CLD, a carbon cycle and a high number of chlorine atoms, and was not present in the soils being studied. The trans-nonachlor recovery rate was used to correct CLD result. Previous studies have shown that it perfectly mimicked behaviour of CLD. Two internal standards were added before analysis. CB53 was used for the trans-nonachlor calibration and CLD13 for CLD calibration.

The extract was reduced to a volume of approximately 10 mL by means of a nitrogen stream. An aliquot of 1 mL was taken (fractionated to 1/10). The extract fractionated was reduced by nitrogen stream and completed with cyclohexane three times. The final extract was finalised with 1ml of cyclohexane. Before GC/MSMS analysis, an input of the internal standards was performed with 0.1 mL of a 2 mg/L solution of CLD13 and 0.5 mg/L CB53 in order to quantify CLD and trans-nonachlor, respectively.

The final extract was composed (v/v) of 0.5% isooctane and 0.2% nonane from individual standards CB53 and CLD13, respectively.

The equivalent amount of soil sample in these final extract is 0.5 g soil sample per mL.

1.1.3.Gas chromatography-mass spectrometry

The injection volume in the GC system was 1 μ L at 100 μ L/sec. The temperature of the injector was maintained at 280°C. The injector was operated in splitless mode at 1 mL/min in constant.

The syringe was rinsed before (3 times in 5 μL of cyclohexane) and after the injection of the extract and the standards (5 times in 5 μL of acetone and 2 times in 5 μL of cyclohexane). The column was heated to 50°C for 1.1 minutes then to 250°C with a gradient of 30°C/min and finally to 310°C at 10°C/min and isothermally for 1.5 minutes. The transfer line was at 310°C. The ionisation source, using positive electron impact, was at 250°C. The collision gas pressure (Argon in CID) was 1.5 mTorr. The resolutions of Q1 and Q3 were fixed at 1.5 and 1.2 respectively.

The most intense fragment for CLD and CLD13 corresponds to the cyclopentadiene $^{12}\text{C}_5\text{Cl}_6$ [13] and $^{13}\text{C}_5\text{Cl}_6$. CLD and CLD13 show up as ions with the same mass (m/z from 275 to 283). The most abundant mass of CLD13 with less than 0.1 % interference with the masses of CLD is the mass m/z 281. The transition for the quantification of the CLD13 is therefore 281>246.

The retention times and detection parameters are shown in Table 2.

1.1.4. Validation procedure

Validation was undertaken in accordance with the ISO 17025 [14] standard method and, since there is no equivalent standard for soils, by applying the requirements of the NF T 90-210 [15] standard relative to methods of water analysis. This validation includes the characterisation of the calibration curve, the efficiency of extraction, the study of the specificity, the characterisation of the limit of quantification, the determination of the repeatability and interday precision and the estimation of measurement uncertainties.

Results and discussion

Influence of the solvent in the preparation of standard stock solutions

Huckins et al. [16] have demonstrated the effects of solvent on CLD (reactions to form a hemiacetal, reduction or increase in the compound's signal depending on the solvents). We therefore studied the influence of varying the solvent used in the preparation of the stock solution. Three solvents (methanol, isooctane and acetone) of differing polarity were tested for the preparation of the stock solution (200 mg/L). Three calibrations (50 to 250 $\mu\text{g/L}$) were prepared from these solutions by

dilution in cyclohexane. The results showed that CLD response is 2.2 times and 1.8 times greater with methanol and acetone, respectively, relative to isooctane. Therefore, the higher the polarity of the solvent used for the preparation of the stock solution, the better the response in GC/MS of the CLD, with methanol giving thus the best response.

The influence of the quantity of polar solvent (methanol) in the injected standards was also tested. The addition of 0.2% of methanol in a standard containing only isooctane increased the signal of the CLD by a factor of 2.

This signal increase can be explained by the affinity of the compound with polar solvents despite its characteristic of being poorly soluble in water [17] (1-2 mg/l at 20 °C for acidic and neutral pH). CLD is likely to evolve into a more soluble form to form, the chlordecone-hydrate ($C_{10}H_2Cl_{10}(OH)_2$), resulting from a reaction of water with the ketone function of the CLD to form a "gem-diol" [18].

These tests showed the influence of the composition of the final solvent on the response of CLD during gas chromatography analysis and hence the influence of the preparation of the calibration solutions and the importance of the choice and nature of the solvent used in the stock solution. It is critical that the final solvents used for the samples and for the calibration solutions are identical in order to have coherent results.

Consequently, solvents used for the extraction were a hexane/acetone mixture; while cyclohexane was used as final solvent before injection into the GC/MS. Accordingly, acetone was used as the solvent for the stock solution and cyclohexane for the preparation of the calibration solutions.

Additional checks of the extraction method and mass spectrometry

As Andosol soil contains allophones which have particular exchange characteristics [19,20], the closure of the nanoporosity of this soil type by drying might result in a less efficient extraction of CLD. Although the drying used in the study was undertaken at only 38°C, when the influence of drying on nanoporosity is likely to be most pronounced at temperatures higher than 100°C (*T. Woignier, personal communication to C. Mouvet, April 2011*), the effect of the drying was

nevertheless verified. A sample of raw Andosol (with a humidity of 60%) was divided into 2 sub-samples for an extraction after drying/grinding (particle size less than 80 μm , see 2.5.1) and an extraction on the original, wet, not ground sample. This operation was performed in triplicate. The mean values in the wet soil, 14.5 mg/kg with a standard deviation of 0.2 mg/kg, is not significantly different from that of the dried soil, 12.5 mg/kg with a standard deviation of 0.3 mg/kg, as measurement uncertainty is 30% (§3.3.5). The extractions were therefore performed on soil dried at 38°C for AND and the 2 other soils.

Validation of results

1.1.5. Calibration

Calibration was performed using seven concentrations from 15 to 250 $\mu\text{g/L}$ (equivalent to 0.03 to 0.5 mg/kg in the soil, respectively). Each calibration was prepared 5 times from independent solutions adhering to conditions of intermediate precision (same person, different day).

Weighted linear regression in $1/x$ was chosen as the calibration model.

According to the NF EN T 90-210 requirement, bias (difference between the calculated concentration and theoretical value) was calculated for each standard. The maximum observed bias was 11% (observed for the lowest value) with a correlation coefficient greater than 0.996 (Figure 1).

1.1.6. Efficiency of extraction

The efficiency of the extraction was evaluated by spiking non-contaminated NIT and AND soils (< 0.03 mg/kg) and moderately contaminated FRL soil (0.23 mg/kg, no typical FRL free of CLD contamination was available). NIT and FRL were spiked at 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 10 mg/kg in duplicates. AND was spiked only at 1 and 10 mg/kg in duplicates, as lower levels are not found in the soils studied. The results are shown in Table 3.

All of the biases were lower than 40% for spiking levels between 0.1 and 0.5 mg/kg for the NIT and FRL soils, and within $\pm 22\%$ for spiking levels between 1 and 10 mg/kg for most of the NIT, FRL and

AND soils. These data will be taken into account in the determination of the uncertainty of the method with 40% for level between 0.03 mg/kg and 1 mg/kg.

1.1.7. Specificity

The high natural content of organic matter in the soils, in particular Andosol (up to 13 – 15%, table 1), and the addition of exogenous organic matter result in a complex matrix that could induce matrix effects or affect the extraction efficiency.

In order to evaluate if the matrix effects linked to the modification of the soil by the ISCR remediation process are correctly taken into account with the use of CLD13, the concentrations of CLD obtained through quantification of the extract by calibration in the solvent were compared with those obtained using the standard additions method. This was done for 3 levels of concentration added to the extract for the 3 soils and 4 different additions of exogenous organic matter (6%, 12% of *Daramend*® and 5%, 30% of compost) and 1 control (total of experimental conditions : 5 for each soil). All of the soils were prepared the same day. Dilution by the input of organic matter is taken into account in the results.

The results for the means of the 5 concentrations, measured in the soils by standard additions method and calibration curve with internal standard (Table 3), demonstrate that the use of CLD13 as internal standard is appropriate to take into account the matrix effects due to the addition of organic matter.

The results of CLD in 4 different additions of exogenous organic matter, obtained by calibration curve, were then compared to the control to verify the influence of the addition of organic matter (due to the remediation process) on the determination of CLD concentration in the 3 soils (Figure 2). All of the concentrations in the 3 soils with added organic matter were equivalent to the concentration of the original soil (without addition) when the uncertainty of the method (cf. §3.3.5) was taken into account. This specificity was also evaluated by comparing the results of the extraction efficiency of the 3 soils (cf. 3.3.2).

The method is thus applicable for all of the 3 soils with the input of organic matter coming from the Daramend® and compost.

1.1.8. Limit of quantification (LOQ)

The concentration of 0.03 mg/kg (equivalent to the first concentration level of the calibration) was tested as the limit of quantification by spiking the 3 natural soils (NIT, FRL and AND).

The LOQ of 0.03 mg/kg was evaluated within conditions of repeatability by doubling the extraction (2 extractions from 2 samples of the same batch) for the 3 soils, and interday precision by performing this series of extractions on the 3 soils on 6 different dates.

The contents found after spiking at the limit of quantification are shown in Table 3.

The accuracy of the limit of quantification presupposed should be checked against the maximum tolerated range of 60% of the limit of quantification (a value obtained by convention from the NF T 90-210).

The NF T 90-210 standard specifies also the execution of a test indicating if the observed deviation between the mean of the results and the spiking value is significant. It is therefore required to calculate a standardised difference (E_N) [14] in the following manner:

$$E_N = \frac{LOQ - zLOQ}{\sqrt{\left(\frac{U_{interday}^2}{n} + U_{ref}^2\right)}}$$

Where

LOQ: the spiking value, zLOQ: the mean of the measured values, $U_{interday}$: the coefficient of interday variation, n: the number of values used to calculate the mean, U_{ref} : standard uncertainty associated with the reference value (estimated by calculation at 1%).

The 2 criteria (maximum tolerated range of 60% and $E_N < 2$) are fulfilled: i) the mean contents measured (+/- 2 times the standard deviation of the intermediate precision), in this case 0.018 to 0.027 mg/kg, has to be located in the range of +/- 60% of the spiking value (0.012 to 0.048 mg/kg), and ii) the value of E_N is less than 2.

The limit of quantification of 0.03 mg/kg is validated.

1.1.9. Repeatability, interday precision and uncertainty of the method

An experimental design, of the accuracy profile type, was used to validate the repeatability and interday precision. It consists in analysing the variance and calculating the intra and inter-series variations. The repeatability and interday precision was achieved by doubling the extraction for the 3 soils on 5 different dates. The analyses were performed independently for each of the 5 series of analysis.

The coefficients of interday variation were 8%, 6% and 9% for the 3 levels of concentration of CLD (1, 2 and 16 mg/kg) of the NIT, FRL and AND soils (Table 3) soils, respectively.

The uncertainty is calculated from the evaluation of the repeatability/interday precision of the 3 soils, from tests relative to the limit of quantification, and from study of the extraction efficiency.

By definition, the uncertainty (U) is a function of the intermediate precision ($U_{interday}$) and of the bias of the method (U_b) (ISO/DIS 11352 [21]).

$$U = \sqrt{U_{interday}^2 + U_b^2}$$

The component U_b is calculated from the Root Mean Square of the observed bias (RMS_b) when spiking was performed during the validation and the uncertainty on the concentration of spiking level (U_{add}).

$$U_b = \sqrt{RMS_b^2 + U_{add}^2}$$

$$RMS_b = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n}}$$

Where: b_i : the observed bias compared with a total recovery of 100%

n: the number of tests (where $n \geq 6$)

The values of the coefficients of interday variation (U_{interday}) were 10%, 8%, 6% and 9% for the soils at 0.03 mg/kg (NIT, FRL and AND), 1 mg/kg (NIT), 2 mg/kg (FRL) and 16 mg/kg (AND), respectively.

The uncertainty for the value of the spiking level at the LOQ (U_{add}) was 1%. It was calculated during the weighing operations performed during the preparation of the different solutions.

The mean bias (RMS_b), calculated from observed biases during the study of the extraction efficiency is 13%.

The uncertainty U is increased by the factor $k=2$ (expanded uncertainty at a confidence level of approximately 95%).

The measuring uncertainty associated with the CLD result is 40% for level between 0.03 mg/kg and 1 mg/kg, and 30% for a concentration greater than 1 mg/kg.

Conclusions

The method described is suitable for the analysis of chlordecone in the 3 main types of French West Indies soils taking account of the soils high content of organic carbon and supplementary inputs thereof due to remediation processes. The limit of quantification of the method is 0.03 mg/kg. The associated measuring uncertainty is 40% for a concentration between 0.03 and 1 mg/kg and 30% for a concentration above 1 mg/kg. This method ensures that the effects observed in remediation studies are only due to the remediation processes based on ISCR and addition of compost, not to analytical artefacts.

However, the accuracy could not be estimated since there is no reference material for CLD and inter laboratory tests have yet to be conducted.

Acknowledgements

The assistance given by Y.M. Cabidoche (INRA Guadeloupe) for the identification of the sites from where the contaminated soils were retrieved was much appreciated.

Samples of non-contaminated soils were collected in Martinique with the logistical and scientific help of the IRD/CNRS, L. Rangon, T. Woignier and H. Macarie; we thank them.

The INRA-11-AAP DEMICHLORD-02-01 convention enabled the finalisation of certain aspects of the work described herein.

We gratefully thank the French Ministry of Environment for its financial support through contracts SU 000 6693 MEEDDM/DGPR and DGPR N 181 SU 0007446 Grenelle Environnement.

References

- [1] Bertrand JA, Abarnou A, Bocquené G, Chiffolleau JF, Reynal L, Ifremer, Martinique (2009) <http://www.ifremer.fr/docelec/doc/2009/rapport-6896.pdf>
- [2] Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S (2010) *J Clin Oncol* 28:3457–62.
- [3] Boucher O, Simard MN, Muckle G, Rouget F, Kadhel P, Bataille H, Chajès V, Dallaire R, Monfort C, Thomé JP, Multigner L, Cordier S (2013) *NeuroToxicology* 35:162–168
- [4] Cabidoche YM, Achard R, Cattan P, Clermont-Dauphin C, Massat F, Sansoulet J (2009) *Environ Pollut* 157:1697–1705
- [5] M.C.Dictor, A.Mercier, L.Lereau, L.Amalric, S.Bristeau, C.Mouvet. Rapport final BRGM/RP-59481-FR (2011), 201. www.brgm.fr
- [6] Amalric A, Henry B, Berrehouc A (2004) *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86:15.
- [7] Achard R, Cabidoche YM, Caron A, Nelson R, Duféal D, Lafont A, Lesueur-Jannoyer M (2007) Contamination des racines et tubercules cultivés sur sol pollué par la chlordécone aux Antilles. *Les cahiers du Pram.* 7:45-50.
- [8] Brunet D, Woignier T, Lesueur-Jannoyer M, Achard R, Rangon L, Barthès BG (2009) *Environ Pollut* 157 :3120.
- [9] Cairns T, Siegmund EG, Doose GM (1982) *Anal Chem* 54:953.
- [10] Fariss MW, Smith JD, Blanke RV, Guzelian PS (1982) *J. Agric. Food Chem* 30:185.
- [11] Moriwaki H, Hasegawa A (2004) *Rapid Commun Mass Sp* 18:1243.
- [12] Mouvet C, Bristeau S, Amalric L, Dictor MC, Mercier A, Thannberger L, Mueller J, Seech A, Przepiora A (2011) In Situ Chemical Reduction (ISCR) for Removal of Persistent Pesticides; focus on kepone in tropical soils. International Symposium on Bioremediation and sustainable Environmental Technologies, Reno : United-States. <http://www.battelle.org/Conferences/bioremediation/symposiumpublications.aspx>
- [13] Harless RL, Harris DE, Sovocool GW, Zehr RD, Vyilson NK, Oswald EO (1978) *Biomed Mass Spectrom* 5:232

- [14] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories; <http://www.iso.org>
- [15] NF T90-210 (2009) Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire <http://www.afnor.org/>
- [16] Huckins JN, Stalling DL, Petty JD, Buckler DR, Johnson BT, J (1982) Agric Food Chem, 30:1020.
- [17] Dawson GW, Weimer WC, Shupe SJ (1979) AIChE 75:366-374.
- [18] Wilson NK, Zehr RD (1979) J Org Chem 44:1278-1282
- [19] Cea M, Seaman JC, Jara AA, Fuentes B, Mora ML, Diez MC (2007) Chemosphere 67: 1354-1360
- [20] Nishikiori H, Shindoh J, Takahashi N, Takagi T, Tanaka N, Fujii T (2009) Appl Clay Sci 43: 160–163
- [21] ISO/DIS 11352 (2012) Water quality -- Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data. www.iso.org/

Fig1: Observed bias (in %) and MTR allowed for the calibration range (15 to 250 µg/l)

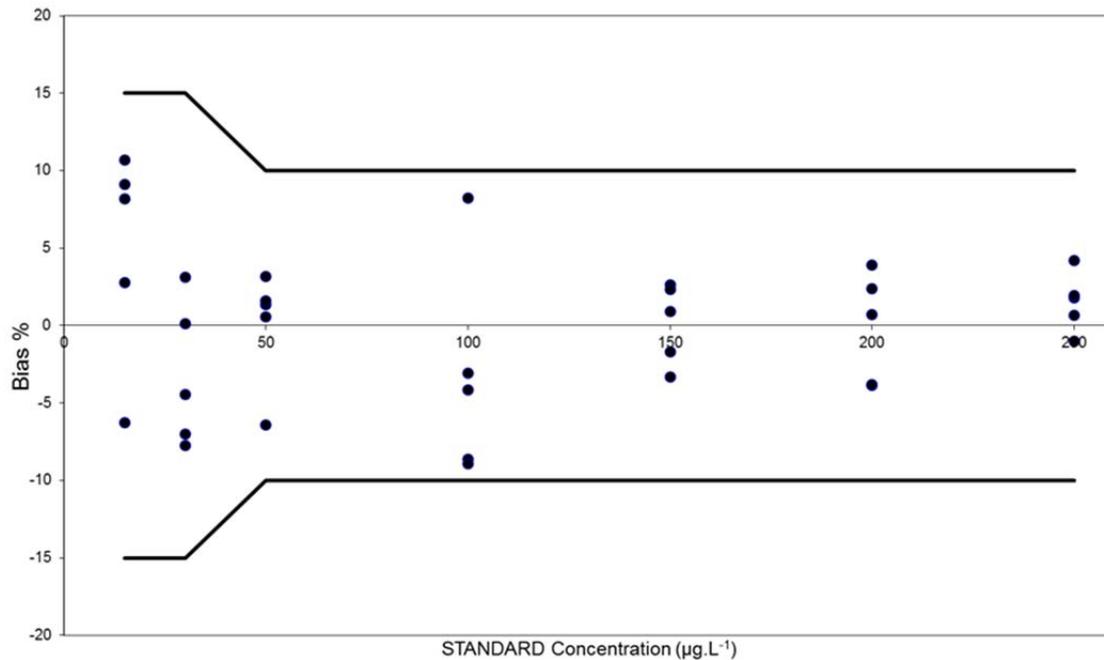


Fig2: Concentration of CLD measured by calibration curve (with expanded uncertainty) in a soil with and without an input of exogenous organic matter in the soils (Daramend®: mixture of Iron(0) and organic matter; compost).

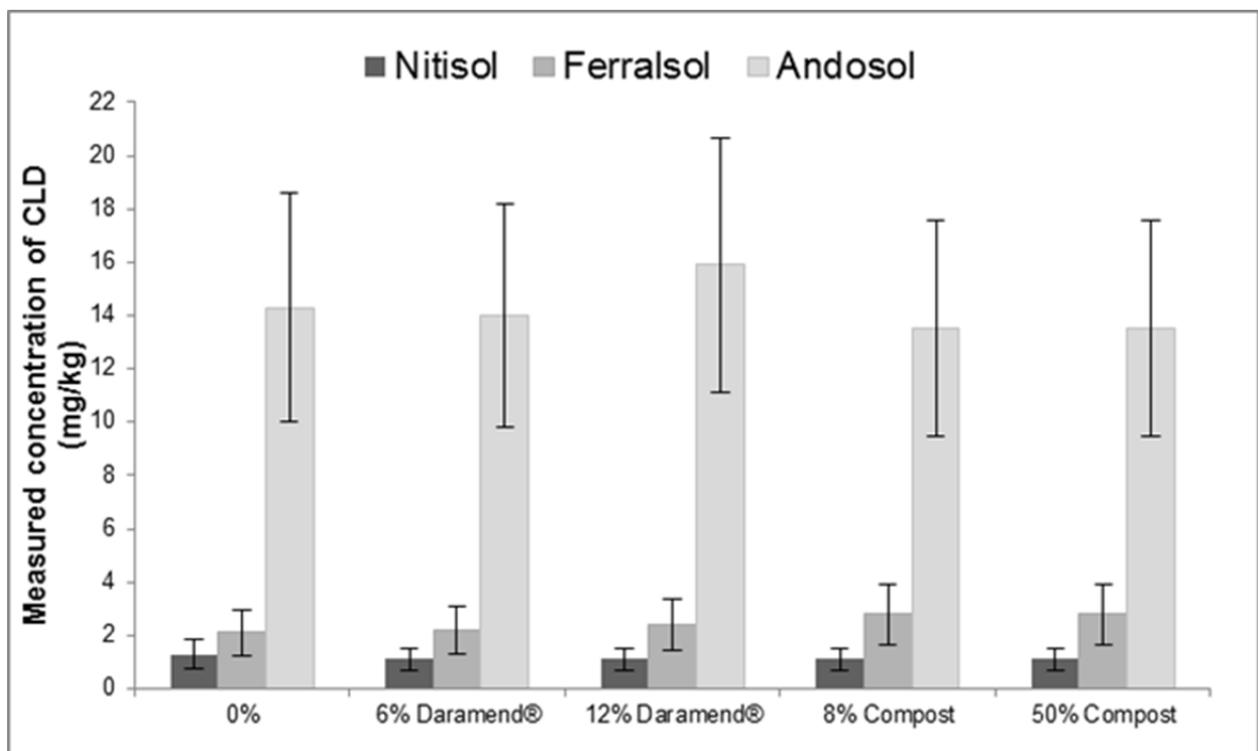


Table 1: Physico-chemical properties of the 3 Antilles soils contaminated by chlordecone.

Soil	Clay %	Silt %	Sand %	CaCO ₃ %	Organic matter %	CEC (meq./100g)	pH water	pH KCl
Andosol	23.6	46.7	16.2	0.2	13.4	37.5	5.3	4.8
Ferralsol	59.1	30.1	7.0	<0.1	3.9	17.2	5.6	4.9
Nitisol	37.8	42.3	16.2	0.2	3.7	27.0	6.1	5.2

Table 2: Detection parameters in GC/MSMS (electron impact)

Compound	RT (min)	MRM transitions	
		Quantification transition, m/z (% abundance, collision energy V)	Qualification transitions (% abundance, collision energy V)
chlordecone	9.6	272>237 (100, 15)	270>235 (60, 15); 272>235 (20, 15)
chlordecone C13	9.6	281>246 (33, 15)	279>244 (100, 15)
trans-nonachlor	8.9	409>300 (100, 25)	407>298 (64, 25); 411>302 (62, 25)
CB53	7.9	292>222 (100, 25)	292>257 (100, 10)

Table 3: Method validation data: method efficiency, specificity, limit of quantification and repeatability/interday precision

Parameter tested	Soil Type	Spiking of chlordecone (mg/kg)	Mean of concentrations measured (mg/kg)		Mean recovery (%)	Number of analyses	CV repeatability (%)	CV interday precision (%)	
			(nominal concentration)	(substracted)					
Efficiency of extraction	Nitisol	0.1	0.14		139%	2	1%		
		0.25	0.30		118%	2	21%		
	Ferralsol	0.5	0.66		133%	2	2%		
		1	1.21		121%	2	2%		
		10	10.4		104%	2	2%		
		0.1	0.11		109%	2	2%		
		0.25	0.24		96%	2	1%		
		0.5	0.68		135%	2	1%		
	Andosol	1	1.1		113%	2	13%		
		10	11.1		111%	2	1%		
Specificity (modified soil)	Nitisol *	1	0.92		92%	2	13%		
		10	9.3		93%	2	8%		
	Nitisol **	0	1.3			5	16%		
		0	1.1			5	14%		
		Ferralsol *	0	2.6			5	7%	
			0	2.4			5	5%	
		Andosol *	0	15.3			5	6%	
			0	14.2			5	10%	
	Limit of quantification	Nitisol	0.03	0.022		73%	4	4%	13%
		Ferralsol	0.03	0.023		75%	4	9%	11%
Andosol		0.03	0.024		81%	4	8%	8%	
Repeatability/Interday Precision	Nitisol	0	1.1			10	4%	8%	
	Ferralsol	0	2.0			10	4%	6%	
	Andosol	0	16.1			10	8%	9%	

Annexe 2

Contribution de l'équipe CSOB-UPMC

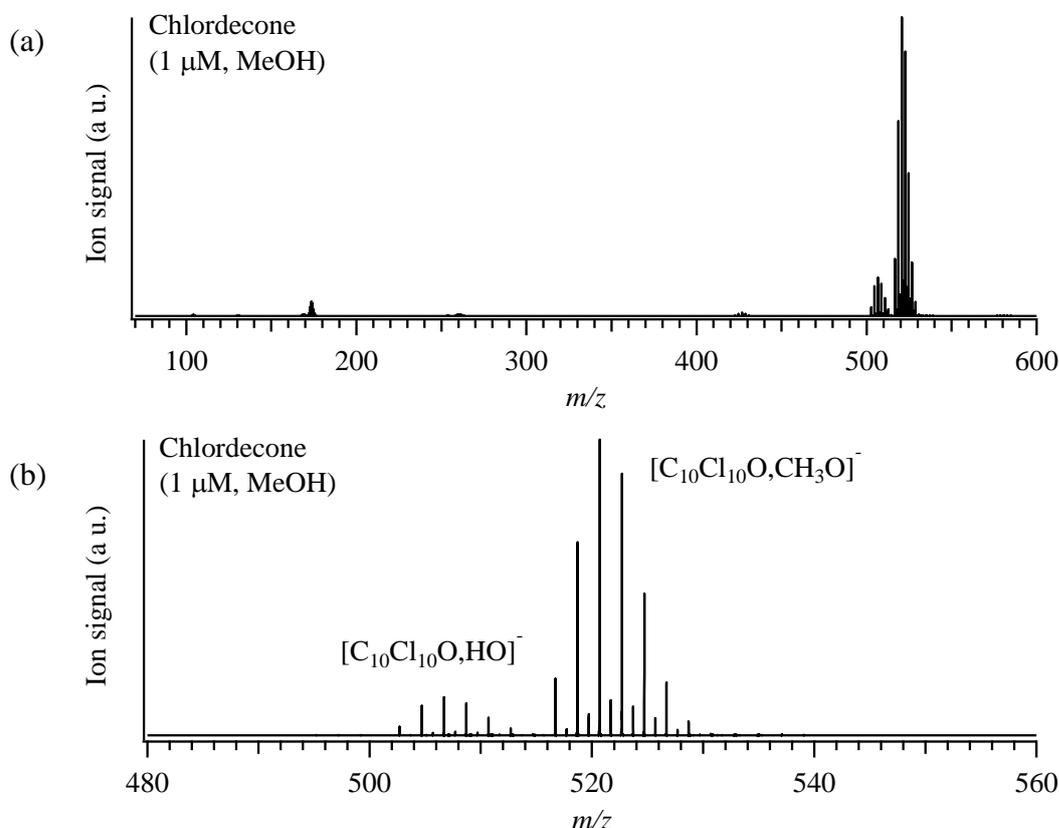
Contribution de l'équipe CSOB-UPMC Héloïse Dossmann

Notre participation au projet ABaCChlor a pour but d'aider à optimiser la détection de la molécule de chlordécone dans des milieux complexes.

I. Analyse d'échantillons standards

Le premier objectif de ce projet était l'obtention de spectres de masse à très haute résolution des échantillons standards de chlordécone et dérivés. Deux produits sont disponibles commercialement : la chlordécone (CLD) et la chlordécone-5b-hydro (CLD-5b). Les échantillons de CLD et de CLD-5b ont été analysés en infusion directe par électrospray (ESI) en mode négatif sur deux instruments, un triple quadrupole (basse résolution) et un FT-ICR (haute résolution).

CLD : Le spectre obtenu à très haute résolution est présenté Figure 1. On observe un très bon signal en mode négatif d'un ion adduit $[C_{10}Cl_{10}O + HO]^-$ ou $[C_{10}Cl_{10}O + CH_3O]^-$ (voir les massifs isotopiques de ces deux adduits donnés Figure 1(c) et(d)). L'activation de ces ions par collision conduit à un seul type de fragment, l'ion $C_9Cl_9^-$, formé par perte de $CO_2 + HCl$ ou $CO_2 + CH_3Cl$ (Figures 2 et 2A). Une sélection de cet ion ($C_9Cl_9^-$) suivie d'une activation par collision permet d'observer une perte de Cl_2 menant à l'ion $C_9Cl_7^-$ (Figure 3).



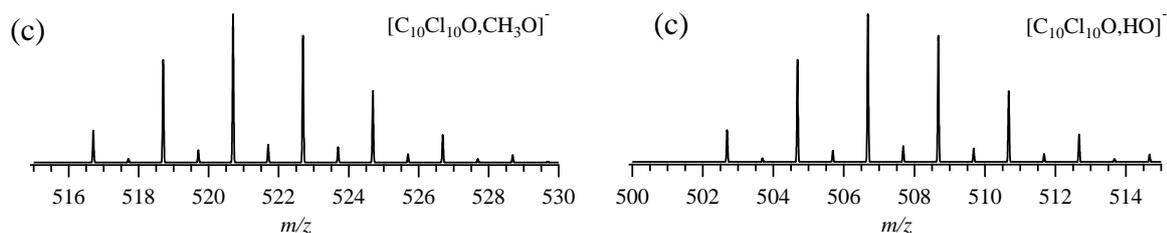


Figure 1 : Spectre de masse de la chlordécone obtenue par ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH. Le spectre est présenté (a) sur toute la gamme de masse enregistrée, (b) dans la région où les ions adduits apparaissent. Les spectres (c) et (d) présentent les massifs isotopiques des ions adduits $[C_{10}Cl_{10}O + HO]^-$ et $[C_{10}Cl_{10}O + CH_3O]^-$ respectivement.

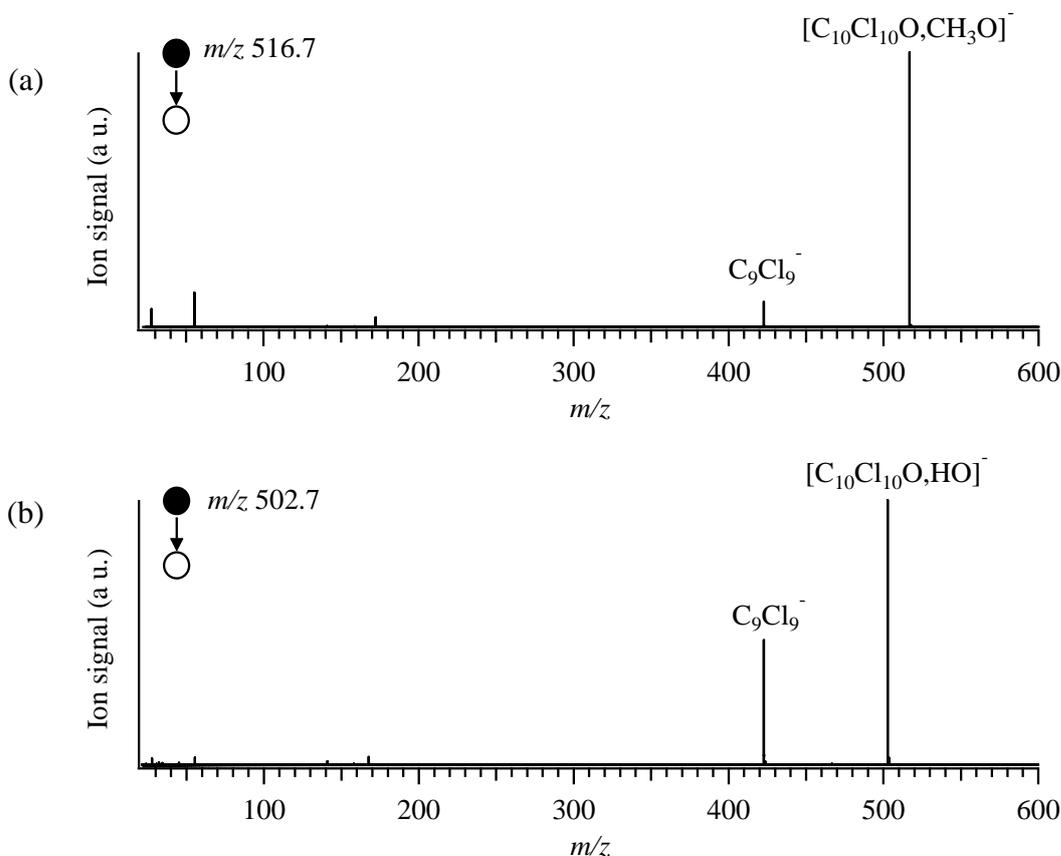


Figure 2 : Spectre CID (He, $E_{lab} = 10$ eV) de l'ion adduit (a) $[C_{10}Cl_{10}O + CH_3O]^-$ et (b) $[C_{10}Cl_{10}O + HO]^-$ (sélection de l'ion monoisotopique (a) m/z 516.7 et (b) m/z 502.7).

CLD-5b : Différents ions adduits chlorés sont observés pour ce produit, en particulier l'ion $[C_{10}Cl_9HO,CH_3OH,CH_3O]^-$ (Figure 4). Cet adduit est l'ion chloré principal observé. Son activation par collision (Figures 5) permet l'observation de différents fragments issus d'une perte d'eau, de méthanol, de « CH_5O_2 » (perte non identifiée structuralement) ainsi que la perte de HCl. Une analyse plus poussée est en cours pour cet échantillon afin de déterminer par des mesures de masse précises (à haute résolution) les formules brutes exactes des ions formés.

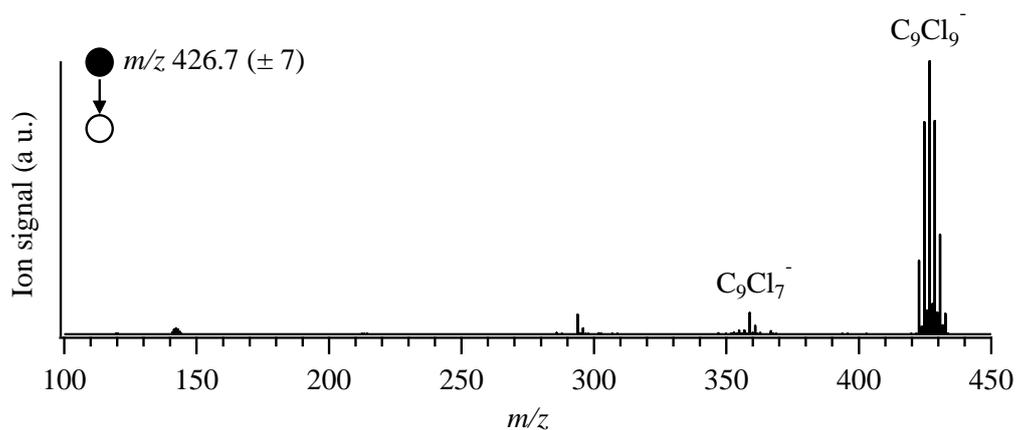


Figure 3 : Spectre CID (He, $E_{\text{lab}} = 10$ eV) de l'ion adduit C_9Cl_9^- (sélection de tout le massif isotopique).

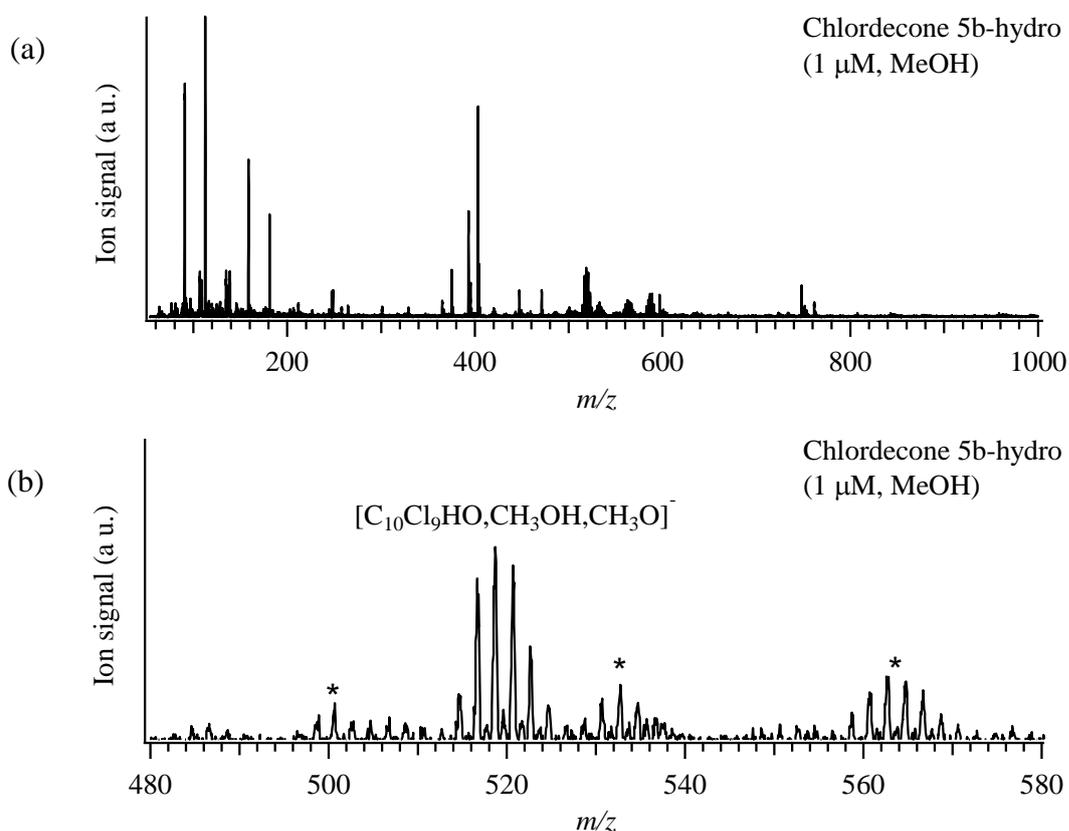


Figure 4 : Spectre de masse de la chlordécone-5b-hydro obtenue par ESI/TQ dans une solution de MeOH. Le spectre est présenté (a) sur toute la gamme de masse enregistrée et (b) dans la région où les ions adduits sont observés.

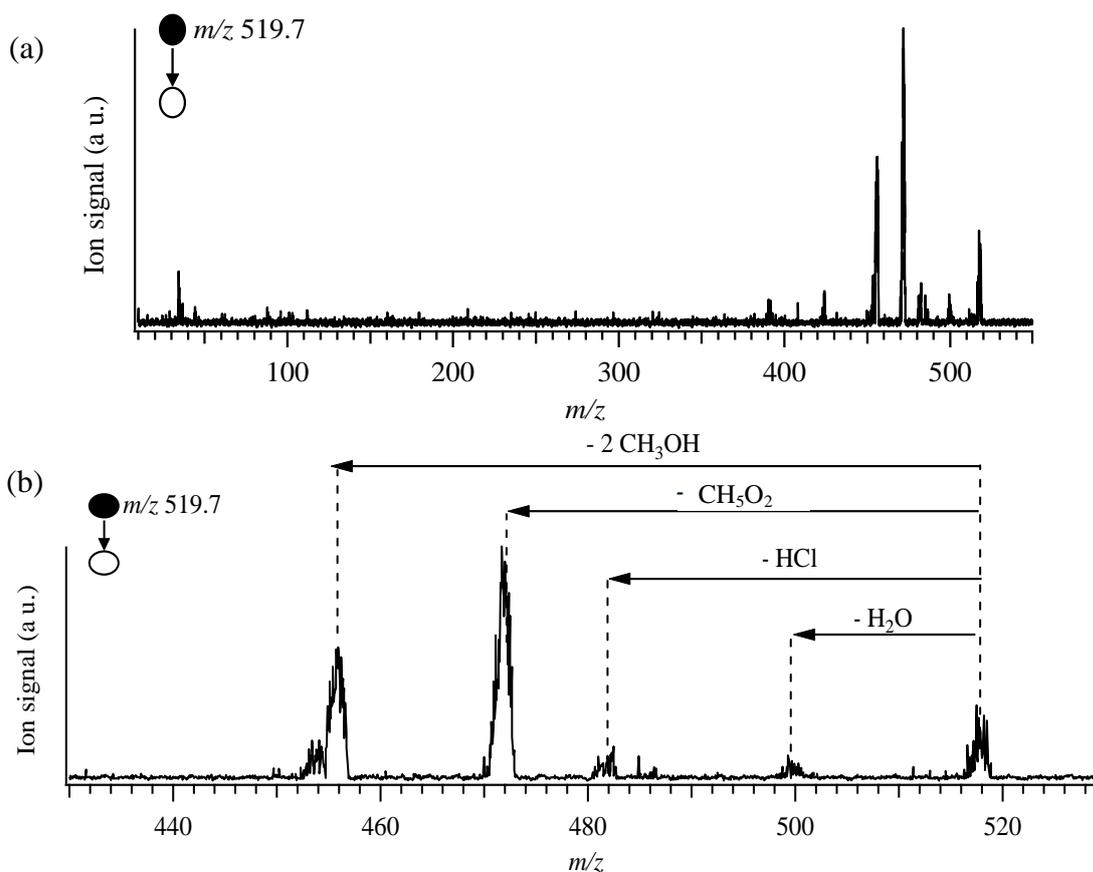


Figure 5 : Spectre CID (He, $E_{lab} = 10$ eV) de l'ion adduit $[C_{10}Cl_9HO, CH_3OH, CH_3O]^+$ (sélection de l'ion monoisotopique m/z 519.7). Le spectre est présenté (a) sur toute la gamme de masse enregistrée et (b) dans la région où les ions fragment sont observés.

II. Analyse d'un échantillon traité

Le BRGM nous a fourni un extrait correspondant à du sable de fontainebleau dopé à 40 mg/kg et ayant subi 2 cycles complets Daramend + une phase anaérobie. L'analyse ESI/MS de cet échantillon par infusion directe sous différentes conditions (solvants et dilution) montre plusieurs motifs chlorés à haute masse moléculaire. Ainsi, nous avons pu identifier des dimères de chlordécone dans la région m/z 990-1050. Ces dimères sont présents sous forme d'adduits avec des molécules de solvant (eau et méthanol, Figures 6). Nous n'avons pas été en mesure à l'heure actuelle d'identifier des dérivés dégradés de la chlordécone et travaillons sur les conditions expérimentales (ionisation et analyseur) afin de gagner en sensibilité et éventuellement d'observer ces produits.

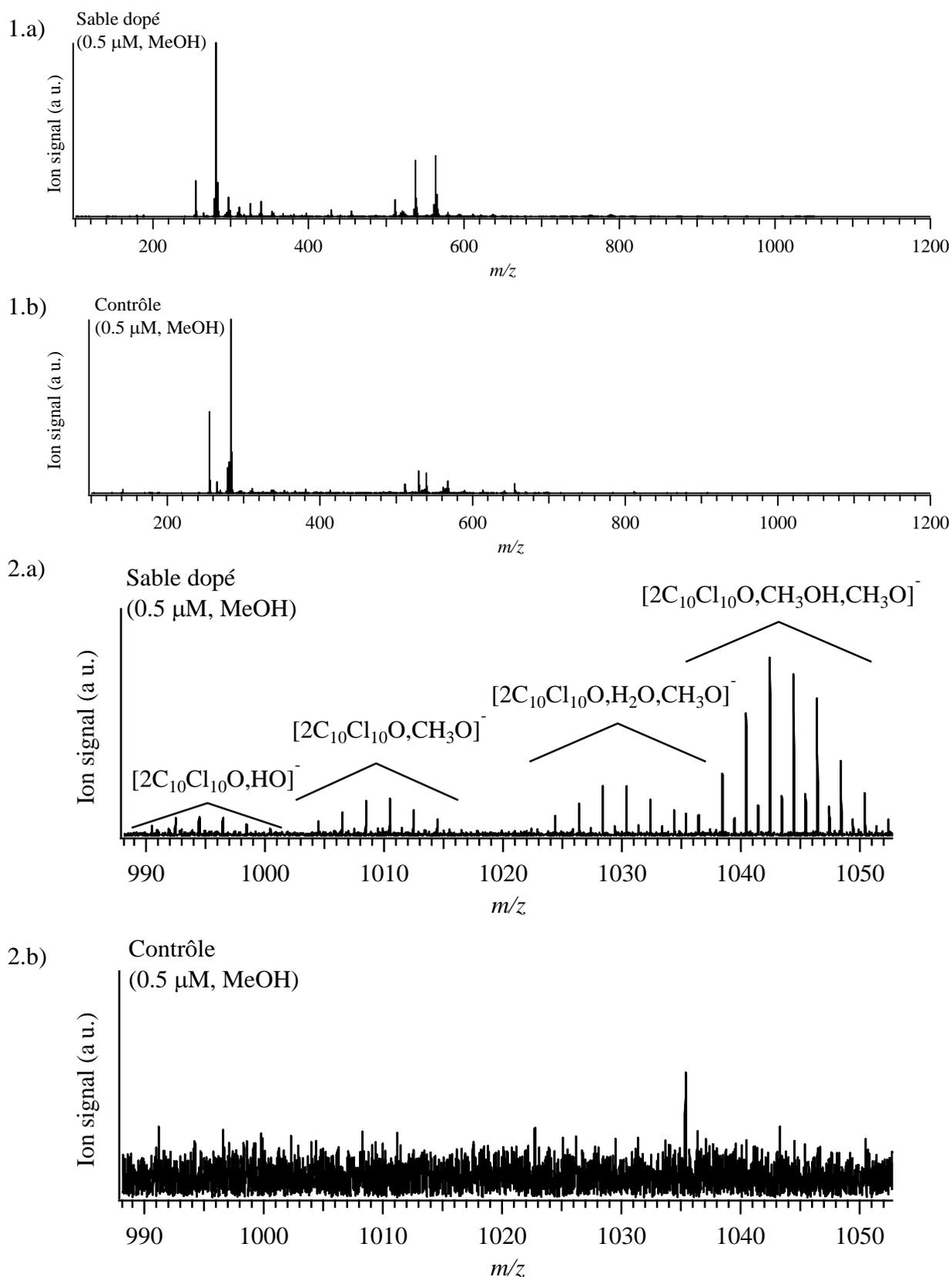


Figure 6 : Spectres de masse de l'échantillon a) de sable dopé (Chlordécone + Daramend) et b) de contrôle (Daramend) obtenus par ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH dans différentes régions de masse (1 : région entière, 2 : 990-1060)

III. Synthèse de produits de dégradation

Les produits de dégradation de la CLD n'étant pas disponibles commercialement, un de nos objectifs est de parvenir à en synthétiser certains afin de pouvoir obtenir leur spectre de masse de référence qui seront utiles à l'analyse d'échantillons complexes. Parmi les différentes méthodes de dégradation de la CLD citées dans la littérature, nous en avons considéré celle de Schrauzer et Katz (*Bioinorg. Chem.* 9 123 (1978)) faisant intervenir la vitamine B12.

La réaction que nous avons essayé de reproduire consiste en la réduction de chlordécone avec la vitamine B12 en présence de NaOH et de 2-hydroxybutanone. Après une quinzaine de jours de réaction, nous avons obtenu le spectre de masse présenté Figure 7. Ce spectre est composé de nombreux ions parmi lesquels nous observons quelques ions chlorés. L'étude des masses précises de ces ions est en cours et permettra d'identifier leur structure et ainsi de déterminer dans quelle mesure la chlordécone a pu être dégradée par cette méthode.

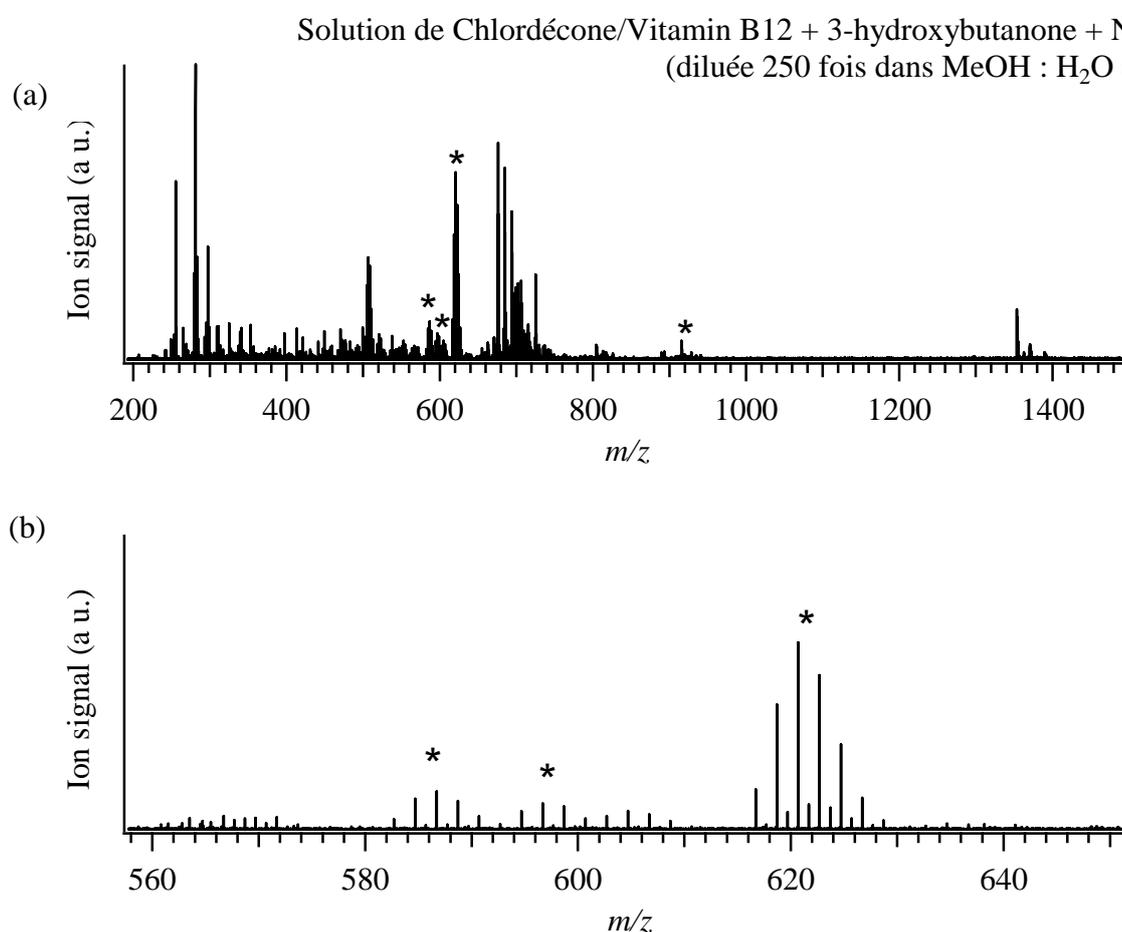


Figure 7: Spectre de masse de la solution de chlordécone/Vitamine B12 + 2-hydroxybutanone + NaOH préparée selon le protocole donnée par Schrauzer et Katz (ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH). Le spectre est présenté (a) sur toute la gamme de masse enregistrée et (b) dans la région où la plupart des ions chlorés sont observés. Les astérisques * indiquent des structures chlorées non identifiées structurellement.

IV. Activation de la CLD

Le dernier objectif de ce projet consistait à tester de nouvelles méthodes d'activation de la chlordécone afin de produire de nouveaux fragments ioniques et ainsi d'enregistrer leur spectre de référence.

Dans un premier temps, nous avons testé une méthode d'activation électronique de la chlordécone (EID, electron-induced detachment) qui ne nous a pas permis d'observer de fragments. Nous nous sommes alors tournés vers les méthodes d'activation par attachement d'anions qui montrent de bons résultats pour des molécules répondant peu aux méthodes classiques de spectrométrie de masse. Cette méthode consiste à introduire différents anions dans des solutions de chlordécone et à déterminer si ces anions forment de nouveaux adduits avec la molécule cible et si ces adduits se dissocient de façon originale. Parmi tous les anions testés (Cl^- , F^- , I^- , CH_3COO^- , CN^-), les résultats ont été très encourageants dans le cas de l'ion CN^- . En effet, nous observons tout d'abord la formation d'un adduit $[\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O}, \text{CN}]^-$ (Figure 8) ce qui n'est pas le cas avec les autres anions. Une activation collisionnelle classique de cet ion mène à une perte « CNCl » donnant lieu à la formation de l'ion $\text{C}_{10}\text{Cl}_9\text{O}^-$ qui lui-même peut perdre un groupement Cl_2 pour former l'ion C_9Cl_7^- (Figures 9).

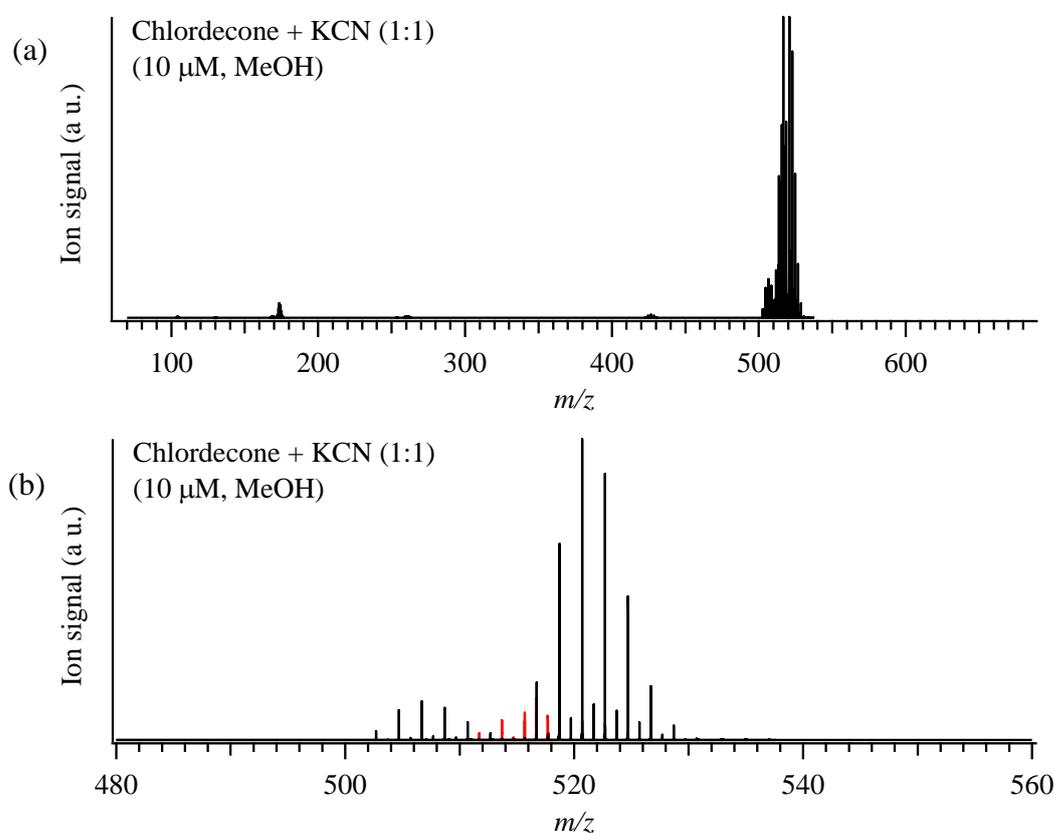


Figure 8 : Spectre de masse d'une solution de chlordécone + KCN (1 :1) obtenue par ESI/FT-ICR dans du méthanol. Le spectre est présenté (a) sur toute la gamme de masse enregistrée et (b) dans la région où l'ion adduit $[\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O}, \text{CN}]^-$ est observé (signal rouge).

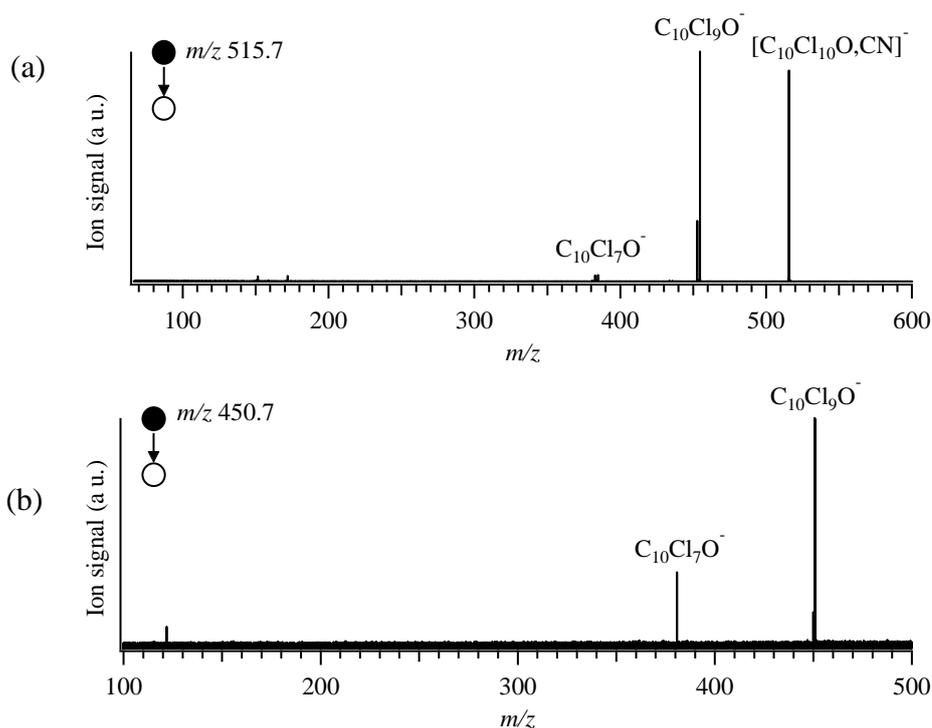


Figure 9 : Spectre CID (He, $E_{lab} = 10$ eV) de l'ion adduit (a) $[C_{10}Cl_{10}O, CN]^-$ (sélection de l'ion m/z 515.7) et (b) $C_{10}Cl_9O^-$ (sélection de l'ion m/z 450.7).

La formation de l'ion $C_{10}Cl_9O^-$ à partir de l'ion adduit $[C_{10}Cl_{10}O, CN]^-$ présenté un intérêt fondamental certain car cet ion n'est produit qu'en présence de CN^- . Afin de mieux comprendre les paramètres gouvernant la formation de cet adduit, une nouvelle série d'anions a été testée, chaque anion étant choisi en fonction d'un paramètre tel qu'affinité électronique, acidité en phase gazeuse, nucléophilie. Ce travail a été effectué lors d'un stage de licence effectué pendant 5 semaines en janvier-février 2013 par Amélie Karouia, étudiante à l'UPMC.

Tableau 1 : Série d'anions testés lors des expériences d'attachement à la chlordécone.

NH ₄ HSO ₄	C ₆ H ₅ COOH	Pyrrole
NH ₄ HCO ₃	C ₆ H ₅ CH ₂ COOH	Indole
NH ₄ ClO ₄	HCCOOH	Isopropylamine
NH ₄ I	CH ₂ CHCOOH	Pyridine
KNO ₂	CH ₂ CHCH ₂ COOH	Ethanethiol
NH ₄ NO ₃		Tétracyanoéthylène
NH ₄ CH ₃ COO	MgBr ₂	Cyanophénol
NaBH ₄	P(OCH ₃) ₃	
NaNH ₂		
KMnO ₄		

Le tableau 1 présente les anions ayant été testés. Les résultats ont montré qu'à l'exception de quelques anions, aucun adduit de type $[C_{10}Cl_{10}O, A]^-$ ($A =$ anion) n'a pu être observé. Les exceptions concernent les ions CH_2CHCOO^- , $CH_2CHCH_2COO^-$, $HCCOO^-$ et BH_4^- . Pour ces ions, un signal très faible correspondant à un adduit de type $[C_{10}Cl_{10}O, A]^-$ a pu être observé mais malgré différents essais de concentration, ce signal n'a pas pu être amélioré et aucune

expérience d'activation de ces ions n'a pu être effectuée à cause du manque de signal. Ces essais n'ont ainsi pas permis d'élucider les mécanismes et paramètres menant à la formation d'ions adduits.

V. Photoionisation de la CLD

En plus des expériences classiques de spectrométrie de masse menées au laboratoire, nous avons souhaité étendre ce projet à l'étude de la CLD par photoionisation au moyen du rayonnement synchrotron. Pour cela, nous avons déposé une demande de temps de faisceau au synchrotron SOLEIL et notre projet a été retenu il y a quelques semaines. Les expériences auront lieu en décembre 2013 sur la ligne de lumière DISCO. Notre objectif est d'étudier l'effet de la lumière VUV sur la CLD ainsi que sur ses adduits ($[C_{10}Cl_{10}O,CH_3O]^-$ et $[C_{10}Cl_{10}O,CN]^-$ notamment). Il s'agira ainsi de déterminer si des fragments de ces adduits sont formés en fonction de l'énergie de photons et le cas échéant, d'obtenir les spectres de masse correspondant à ces fragments. Le montage expérimental disponible sur la ligne de lumière DISCO consiste en effet en une source à pression atmosphérique modifiée couplée à un piège à ions quadripolaire. L'ionisation s'effectue dans la source au moyen du rayonnement synchrotron qui offre une grande accordabilité ainsi qu'un flux très intense de photons. Les ions formés sont ensuite directement transférés dans l'analyseur quadripolaire permettant ainsi l'enregistrement de leur spectre de masse.

Illustrations complémentaires de l'annexe 2

I. Analyse d'échantillons standards

Chlordécone

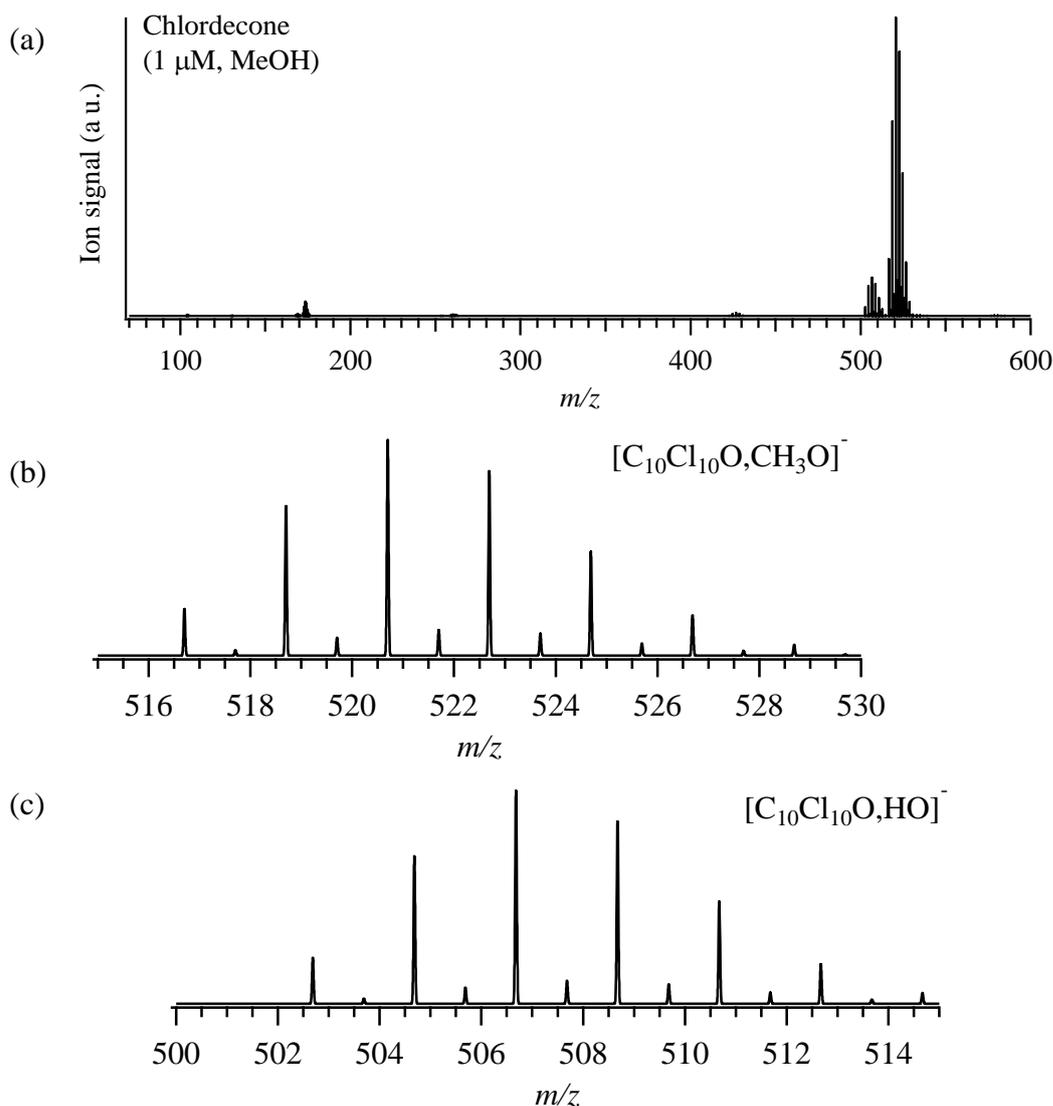


Figure 1A : Spectre de masse de la chlordécone obtenue par ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH (a) sur toute la gamme de masse enregistrée. Les spectres (b) et (c) montrent en détail les régions contenant les ions adduits $[\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O} + \text{HO}]^-$ et $[\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O} + \text{CH}_3\text{O}]^-$ respectivement.

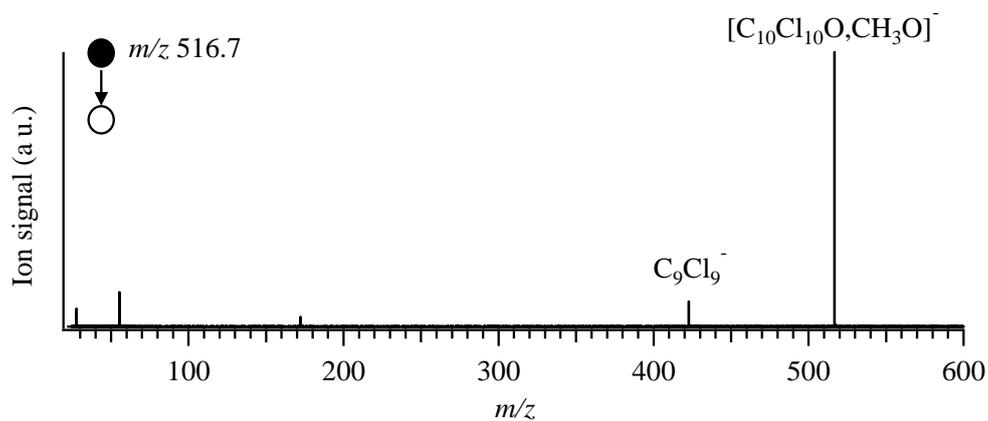


Figure 2A : Spectre CID (He, $E_{\text{lab}} = 10$ eV) de l'ion adduit $[\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O} + \text{CH}_3\text{O}]^-$ (sélection de l'ion monoisotopique m/z 516.7).

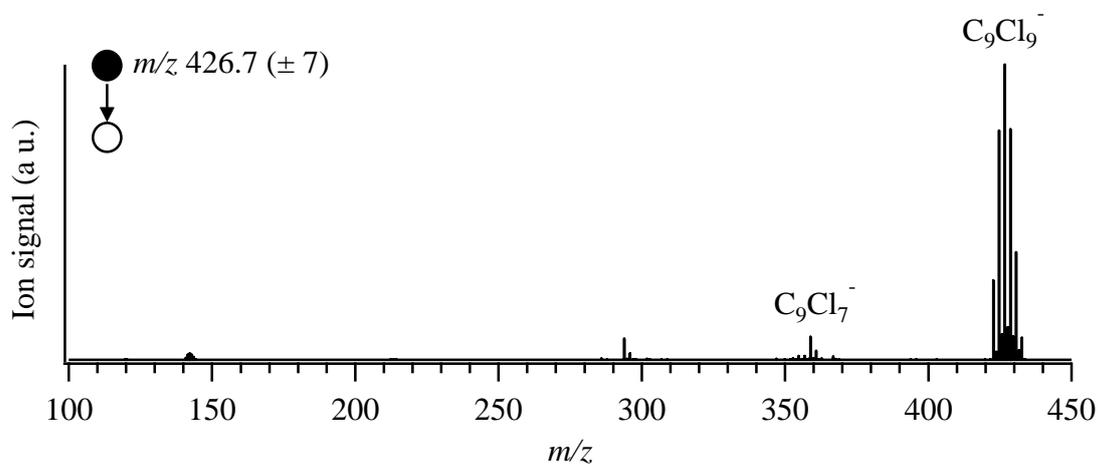


Figure 3A : Spectre CID (He, $E_{\text{lab}} = 10$ eV) de l'ion adduit C_9Cl_9^- (sélection de tout le massif isotopique).

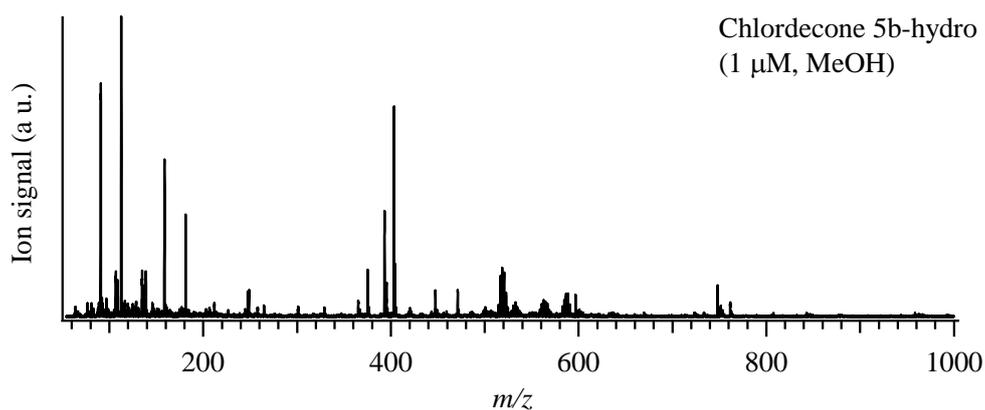


Figure 4A : Spectre de masse de la chlordécone-5b-hydro obtenue par ESI/TQ dans une solution de MeOH.

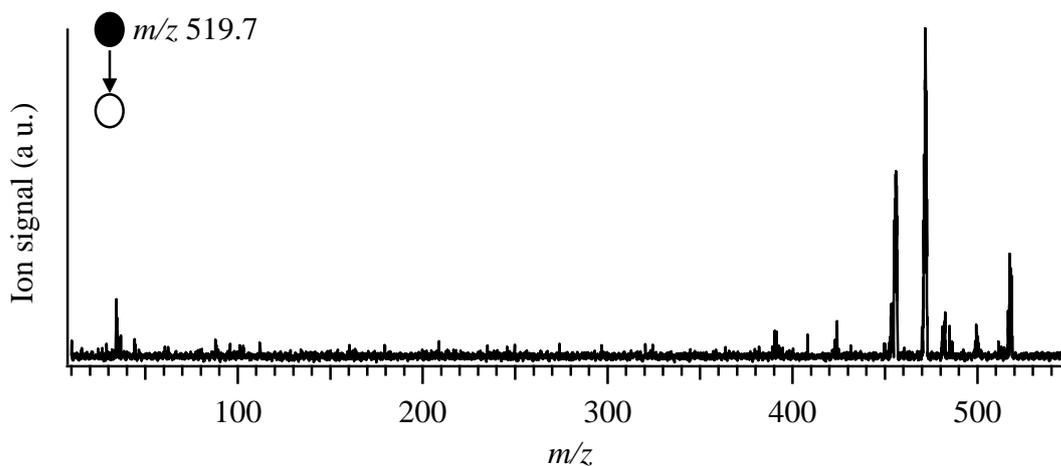
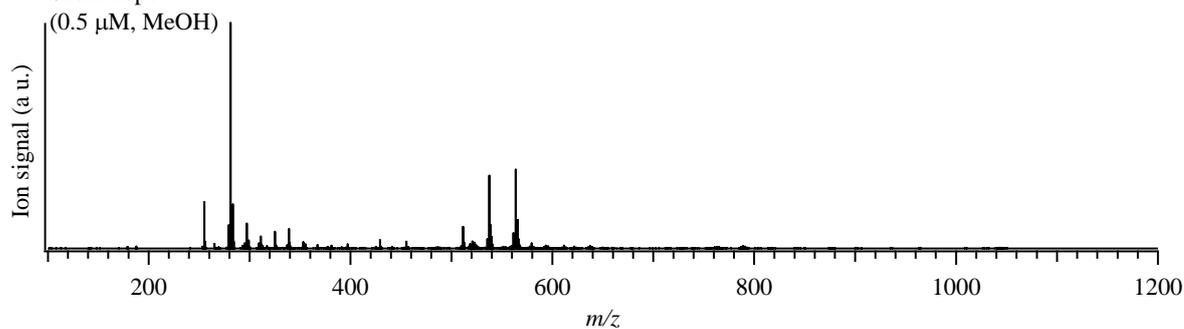


Figure 5A : Spectre CID (He, $E_{lab} = 10$ eV) de l'ion adduit $[C_{10}Cl_9HO, CH_3OH, CH_3O]^-$ (sélection de l'ion monoisotopique m/z 519.7).

II. Analyse d'un échantillon traité

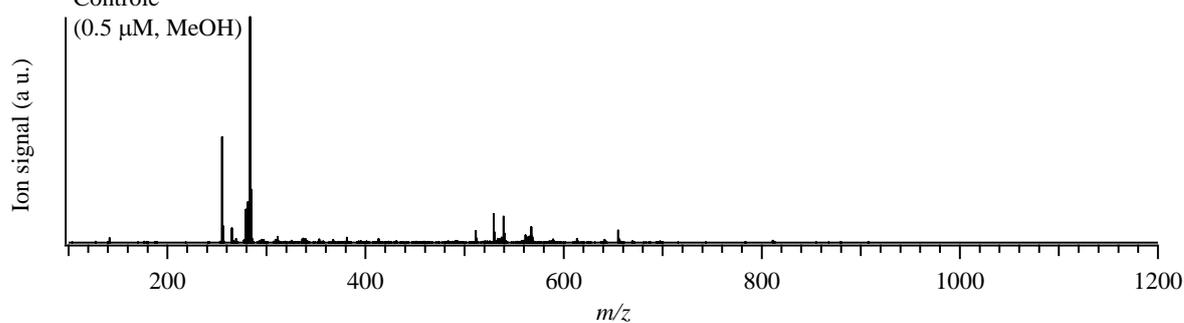
Sable dopé
(0.5 μ M, MeOH)

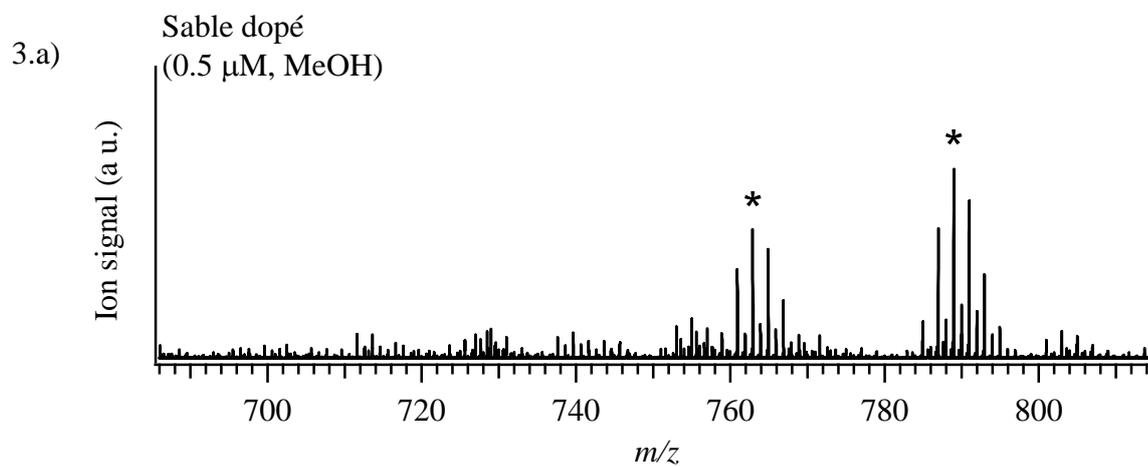
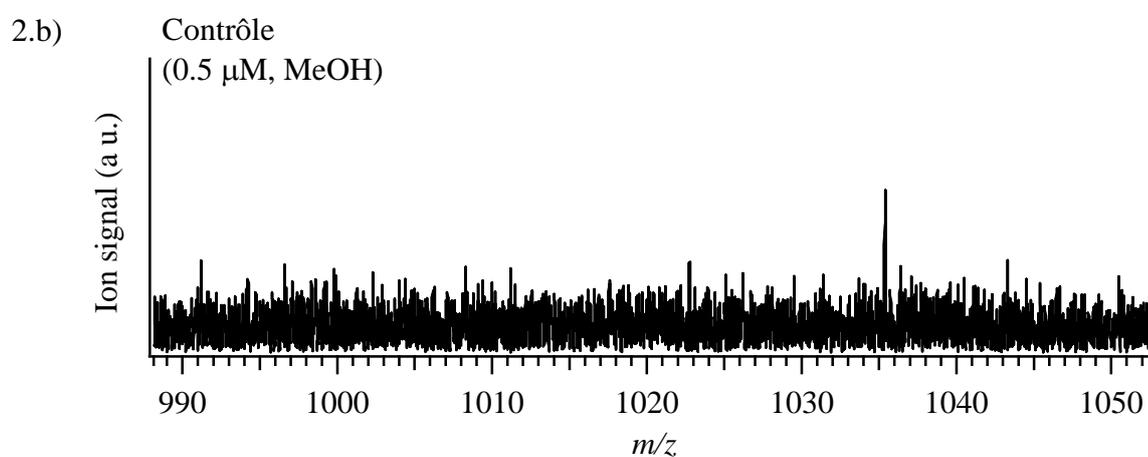
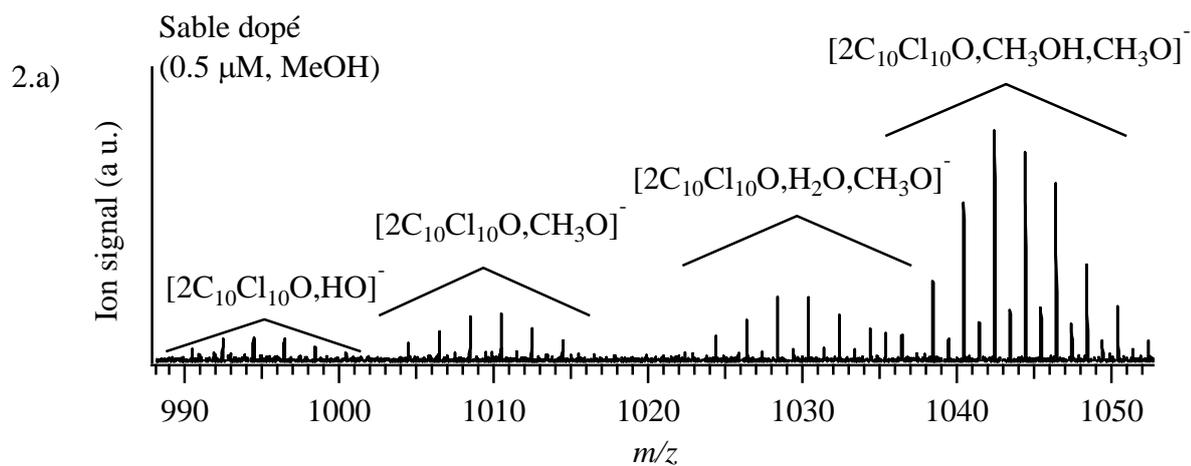
1.a)



Contrôle
(0.5 μ M, MeOH)

1.b)





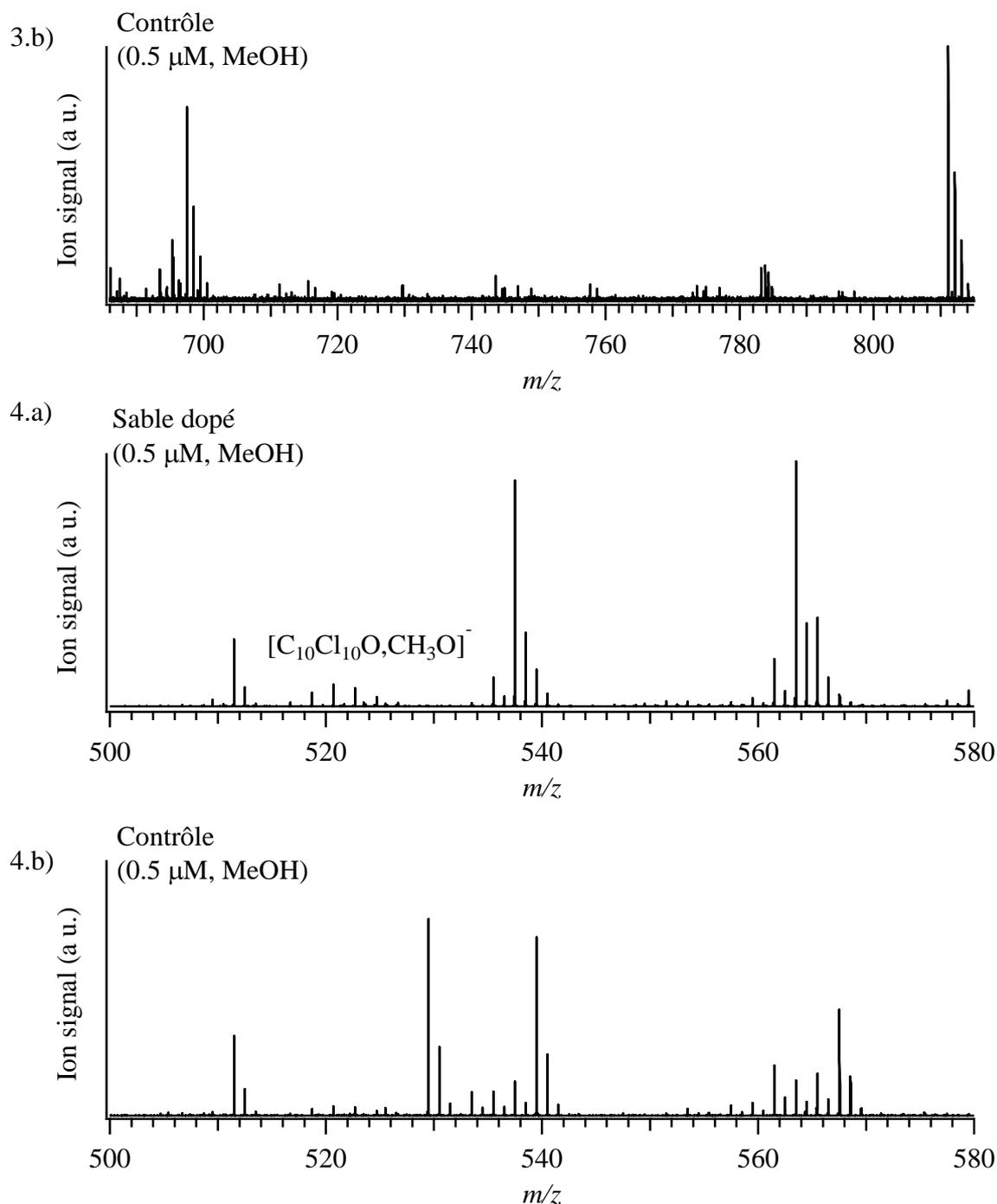


Figure 6A : Spectres de masse de l'échantillon a) de sable dopé (Chlordécone + Daramend) et b) de contrôle (Daramend) obtenus par ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH dans différentes régions de masse (1 : région entière, 2 : 990-1060, 3 : 690-815 et 4 : 500-580). Les astérisques * indiquent des structures chlorées non identifiées structurellement.

III. Synthèse de produits de dégradation

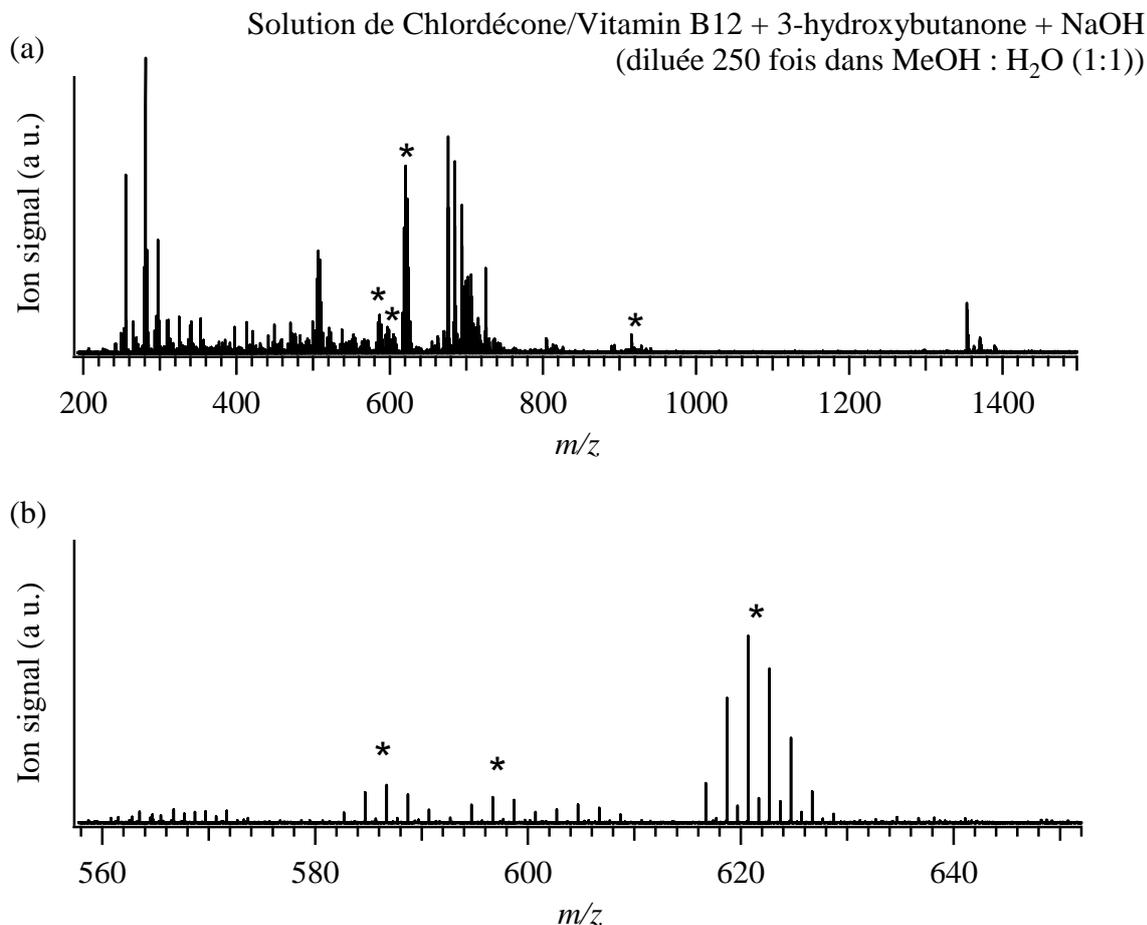


Figure 7A : Spectres de masse de la solution de chlordécone/Vitamine B12 + 2-hydroxybutanone + NaOH préparée selon le protocole donnée par Schrauzer et Katz. Les spectres ont été obtenus par ESI/FT-ICR dans une solution de MeOH ((a) : gamme de masse totale et (b) : région présentant plusieurs adduits chlorés). Les astérisques * indiquent des structures chlorées non identifiées structurellement.

IV. Activation de la CLD

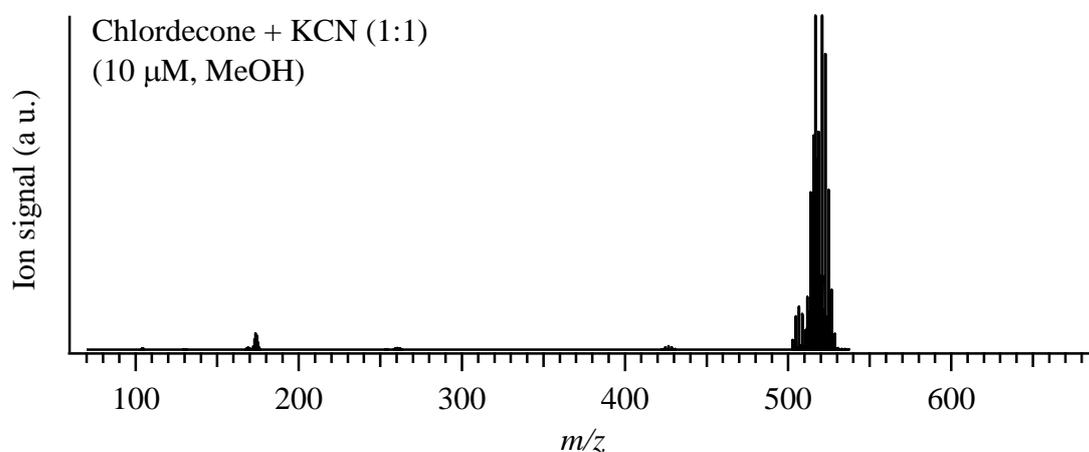


Figure 8A : Spectre de masse d'une solution de chlordécone + KCN (1 :1) obtenue par ESI/FT-ICR dans du méthanol.

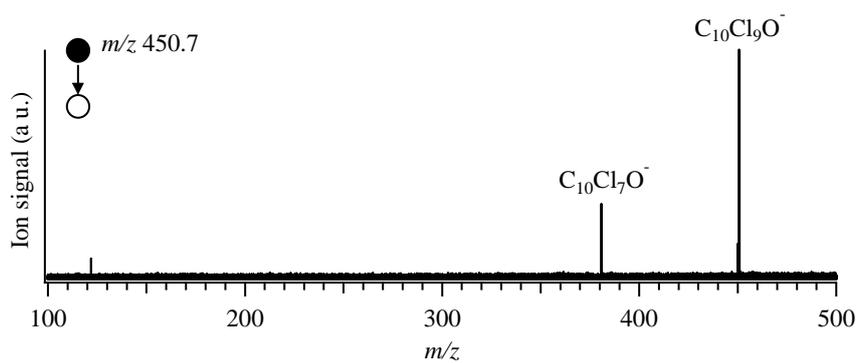


Figure 9A : Spectre CID (He, $E_{lab} = 10$ eV) de l'ion $C_{10}Cl_9O^-$ (sélection de l'ion m/z 450.7).

Annexe 3

Contribution des équipes ICOA – BRGM

Contribution des équipes ICOA - BRGM

*S. Elbaina, H. Belghit, A. Chartier, B. Maunit (ICOA)
S. Bristeau, L. Amalric, C. Mouvet (Brgm)*

RÉSUMÉ

Classée depuis 2007 parmi les Polluants Organiques Persistants par la convention de Stockholm, la chlordécone persiste dans les sols et les eaux antillais engendrant de nombreuses conséquences néfastes tant sur le plan humanitaire qu'environnemental. Le Plan National d'Action Chlordécone, mis en place depuis 2008, œuvre dans le but de proposer une solution à ce problème en mettant notamment en place des projets de recherche visant à dégrader la chlordécone.

Aucune étude n'existe sur la caractérisation de la chlordécone et de ses produits de dégradation dans les sols. La littérature fait état de 3 produits de transformation, la 8-monohydro-chlordécone, la 2,8 ou 3,8-dihydro-chlordécone et le chlordécol observés dans différentes matrices minérales et biologiques.

L'objectif de cette étude a été de mettre en évidence les produits de dégradation de la chlordécone dans un des sols antillais, Andosol, traité pendant une période de six mois par le processus chimique de réduction chimique in situ (ISCR-Daramend[®]). Pour cela, nous avons comparé deux méthodes d'extraction : extraction accélérée par solvant (ASE) et l'extraction Soxtec. Dans ce cadre, cinq mélanges binaires de solvants différents ont été choisis afin de voir si ces derniers jouaient un rôle sur l'efficacité d'extraction des produits de dégradation et donc de leur détection. Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par GC-MS, études complétées par des analyses en LC-qTOF-MS. Les résultats ont montré que la polarité des mélanges de solvant choisis n'influçait pas la nature des composés extraits. Quelle que soit la composition des mélanges d'extraction, deux composés issus de la déchloration de la chlordécone, la 5b-hydrochlordécone et une autre des formes isomères de la monohydrochlordécone (C₁₀Cl₉HO), ont été mis en évidence par GC-MS et LC-qTOF-MS.

L'ajout de l'acide trifluoroacétique (TFA) au mélange a montré en LC-qTOF-MS la présence de trois isomères relatifs à la dihydrochlordecone ($C_{10}Cl_8H_2O$).

SOMMAIRE

<u>I. INTRODUCTION</u>	5
<u>II. MATERIELS ET METHODES</u>	7
1. <u>Préparation des sols</u>	7
2. <u>Développement de la méthode par Extraction Accélérée par Solvant (Accelerated Solvent Extraction ASE) et de la méthode Soxtec</u>	8
3. <u>Mise en place de la technique d'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)</u>	10
4. <u>Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS)</u>	12
<u>III- RESULTATS ET DISCUSSION</u>	13
a) <u>Le traceur d'extraction</u>	13
b) <u>Influence de la polarité des solvants d'extraction</u>	14
c) <u>Influence de l'acidification du mélange de solvants d'extraction</u>	19
<u>III. Conclusion</u>	25
<u>Bibliographie</u>	27
<u>Annexes</u>	28

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la chlordécone avec la numérotation des carbones dans le système CAS.....	7
Figure 2 : Structure chimique de : a) la chlordécol, b) 5b-hydrochlordécone, c) dihydrochlordécone.....	9
Figure 3 : Effet de la température de l'injecteur sur la réponse du TNC (barre d'erreur correspond à l'écart-type des intensités des pics (n=3)).....	13
Figure 4 : Influence du courant d'émission sur la réponse du TNC en GC-MS (n=3).....	14
Figure 5 : Moyennes du taux de récupération du transnonachlore (%) dans l'andosol traité par ISCR selon le type de mélange de solvant d'extraction. (Ecart type sur n=3).....	16
Figure 6 : Chromatogrammes d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les conditions : a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.....	17
Figure 7 : Spectre de masse du composé à $t_r = 19.3$ min et structure du fragment correspondant.....	18
Figure 8 : Chromatogrammes LC-qTOF-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les mélanges d'extractants: a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.....	19
Figure 9 : Chromatogrammes d'extraits au soxtec de sol Andosol avec les mélanges de solvants extractants : a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.....	20
Figure 10 : Chromatogrammes en GC-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les mélanges de solvants extractants : a) acétone/dichlorométhane; b) acétone/dichlorométhane/TFA.....	22
Figure 11 : Chromatogrammes en GC-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les mélanges de solvants d'extraction : a) acétone/acétonitrile; b) acétone/acétonitrile/TFA.....	22
Figure 12 : (a) Superposition de trois chromatogrammes de curlone [®] extraits avec le mélange acétone/dichlorométhane/TFA. (b) spectre de masse de masse en SRM du composé à $t_r=17,4$ min.....	23
Figure 13 : Chromatogrammes d'extraits à l'ASE de sol Andosol en LC-qTOF avec les conditions: a) acétone/dichlorométhane/ TFA; b) acétone/acétonitrile/TFA.....	24

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres GC-MS optimisés.....	14
Tableau 2 : Synthèse des ions observés en GC/MS dans les différentes conditions de mélange d'extractants et des méthodes d'extraction.....	26

Liste des abréviations

ASE: Accelerated Solvent Extraction.

GC-MS: Gas Chromatography- Mass Spectrometry

ISCR: *In Situ* Chemical Reduction.

LC-HRMS: Liquid Chromatography-high Resolution Mass Spectrometry

LC-qTOF-MS: Liquid Chromatography-quadripôle Time Of Flight-Mass Spectrometry

POP: Polluants Organiques Persistants

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

TFA: acide Trifluoroacétique

TNC: Transnonachlore

I. INTRODUCTION

Synthétisée pour la première fois en 1952, la chlordécone (CLD) est un composé organochloré, de formule $C_{10}Cl_{10}O$ (masse molaire $M=490,64$ g/mol), qui se présente sous la forme d'un solide blanc inodore (Figure 1). C'est une molécule apolaire avec un $\log K_{ow}$ égal à 5,41 [1] et une température de sublimation de $350^{\circ}C$. Son utilisation a été interdite aux Etats Unis en 1976 lorsque l'usine de fabrication Hopewell (Virginie, Etats Unis) a fermé suite à une pollution autour de cette usine et à des effets toxiques sur les travailleurs. Aux Antilles elle a été utilisée entre 1972 et 1993 en tant que pesticide pour lutter contre le charançon du bananier. Depuis 2007, elle est considérée comme un polluant organique persistant (POP) par la Convention de Stockholm [2]. En effet, la chlordécone est suspectée d'être en relation avec le taux de cancer de la prostate aux Antilles [3]. Du fait de sa persistance dans les sols contaminés, un plan d'action a été mis en place en 2008 et le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie et du Développement a mandaté le Bureau de Recherches Géologique et Minières (BRGM) pour étudier la décontamination des sols antillais pollués par la chlordécone.

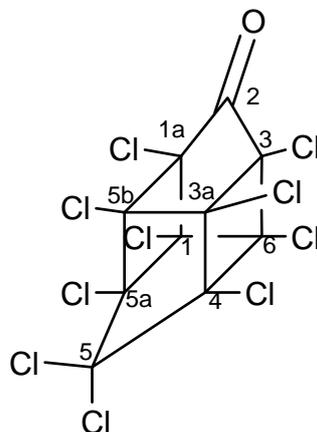


Figure 1: Structure chimique de la chlordécone avec la numérotation des carbones dans le système CAS

Un des procédés de dégradation testé au BRGM, la réduction chimique in situ Daramend® (In Situ Chemical Reduction, ISCR), consiste à mettre les milieux dans des conditions réductrices par un amendement commercialisé sous le nom de Daramend®, qui est composé

d'un mélange de 30% de Fer Zéro Valent (FZV) et de 70% de matière organique végétale. Ce procédé a été testé sur les trois sols antillais pollués par la chlordécone : l'Andosol, le Ferralsol et le Nitisol. Six mois de procédé ISCR-Daramend[®] ont permis de diminuer de 71% la teneur initiale en chlordecone dans le Nitisol et le Ferralsol et de 22% celle de l'Andosol [4]. Cependant, il s'avère que les structures chimiques de certains produits suspectés issus de la dégradation de la chlordécone restent encore inconnues. En effet, déterminer les pesticides et leurs produits de transformation dans les sols présente un vrai challenge analytique [5] pour les raisons suivantes:

(a) Les faibles concentrations des analytes dans le sol. Par conséquent il est nécessaire d'avoir des méthodes d'analyse sensibles et robustes pour de meilleures limites de détection et de quantification.

(b) La possibilité de dégrader le pesticide en des molécules de polarités différentes.

(c) Les fortes affinités des analytes avec le sol qui nécessitent une optimisation des techniques d'extraction.

En lien avec cette dernière raison, l'équipe d'Hubert [6] s'est intéressée à l'extraction des POPs dans des sols pollués. Les extractions sous fluide à chaud et sous pression (Accelerated Solvent Extraction, ASE) et au Soxhlet, qui est la méthode courante pour l'extraction des matrices solides, utilisant le toluène comme solvant d'extraction, ont montré l'efficacité de l'extraction à l'ASE par rapport au Soxhlet. Les rendements d'extraction des hexachlorocyclohexanes (HCHs) à l'ASE était jusqu'à dix fois plus élevés qu'avec le Soxhlet et jusqu'à dix-neuf fois plus élevés pour le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et ses produits de dégradation. Les pesticides pouvant se dégrader et donner des produits de transformation qui auraient une polarité différente de celle du produit initial un mélange de solvants (de polarité variable) est souvent utilisé pour leur extraction. Duffy et Wong [7] proposent l'utilisation d'un mélange n-hexane/2-propanol (3 :1, v/v) pour l'extraction de pesticides organochlorés et leurs métabolites, tels le DDT. L'efficacité d'une extraction dépend donc du choix de la méthode et du choix du solvant (ou mélange de solvants) d'extraction.

Dans le cas de la chlordécone, la littérature fait état de 3 produits de transformation, la 5b-hydrochlordécone, la dihydro-chlordécone et le chlordécol (figure 2) observés dans différentes matrices minérales et biologiques [8-10]. Carver et Griffith ont étudié, par

extraction liquide-liquide avec l'isopropanol et le benzène, les métabolites formés par la dégradation de la chlordécone dans des moules et crustacés.

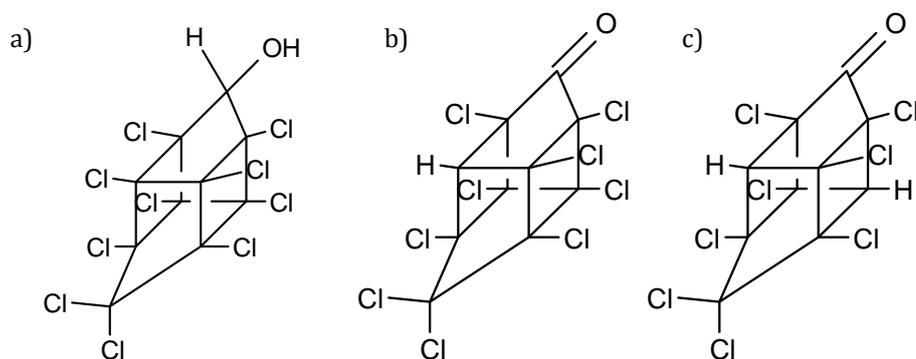


Figure 2: Structure chimique de : a) la chlordécol, b) 5b-hydrochlordécone, c) dihydro-chlordécone

Seulement un article est consacré à l'extraction et la quantification de la chlordécone dans les sols antillais. L'extraction se fait à l'ASE utilisant un mélange acétone/hexane (50/50) suivie d'une analyse en GC/MS [11]. Cette méthode a permis de mettre en évidence la présence de 14 produits de dégradation [12].

Il a également été montré que dans des conditions réductrices la chlordécone pouvait subir une déchloration successive avec une substitution du chlore par l'hydrogène [13]. Ce qui implique la formation des produits de transformation avec moins de chlores et donc plus polaires.

L'objectif de notre étude est de tester différents mélanges de solvants binaires, de polarité variable, pour s'assurer que l'on extrait bien tous les composés de dégradation et de mettre en évidence si l'utilisation de ces différents mélanges permettrait d'augmenter l'efficacité d'extraction des composés de dégradations. Afin d'arriver à cet objectif, deux méthodes d'extraction ont été mises en œuvre, l'ASE et le Soxtec suivie d'une analyse par GC-MS en mode *full scan* complétée par des analyses en LC-qTOF-MS.

II. MATERIELS ET METHODES

Préparation des sols

L'Andosol, un des trois sols antillais avec le Nitisol et le Ferralsol, utilisé dans le cadre de nos recherches, a été traité, lors d'une étude antérieure, pendant six mois avec le procédé ISCR-Daramend®. Trente kilogrammes de sol traité, gardés à 63 % d'humidité, ont été stockés dans

un fût pendant un an et demi sous une température de 28°C. En parallèle, un sol Andosol non traité a été stocké dans les mêmes conditions ; il a servi de sol témoin pour nos études. Un kilogramme de chacun de ces sols à 63% d'humidité a été prélevé. Après homogénéisation et quartage [14], le tout est placé à l'étuve à 40°C pendant 72 heures. Après séchage, les sols sont broyés à une granulométrie inférieure à 80 µm, qui permet une meilleure efficacité d'extraction des composés du sol, puis quartés pour s'assurer de l'homogénéité de l'échantillon ainsi que celle des prises d'essai. A l'aide d'un quarter à rifles, la masse totale de sol introduite est divisée en deux portions égales et l'opération est répétée jusqu'à obtenir des échantillons de 5g pour les extractions à l'ASE et 10g pour les extractions au Soxtec.

Développement de la méthode par Extraction Accélérée par Solvant (Accelerated Solvent Extraction ASE) et de la méthode Soxtec

L'Andosol a été choisi pour étudier les produits de dégradation car c'est le sol qui a la plus forte teneur initiale en chlordécone, 13.3 ± 2.8 mg/kg, et donc potentiellement les plus fortes concentrations en produits de dégradation. Par ailleurs, c'est aussi le sol qui a la plus forte teneur en matière organique. Or la chlordécone a un très fort coefficient de partage carbone organique/eau ($K_{oc} = 20$ m³/kg ; référence 15) ; c'est donc également à partir de l'andosol que l'extraction risque d'être la plus problématique et les différences d'efficacité les plus visibles. Une optimisation de la méthode d'extraction permettant la mise en évidence de produits de dégradation dans ce cas le moins favorable permettrait alors une détection plus facile sur les deux autres types de sols à savoir le Ferralsol et le Nitisol.

La composition en solvants du mélange d'extraction a été choisie de manière à extraire le maximum de composés de dégradation quelle que soit leur polarité. Il a été préféré dans cette étude l'utilisation de mélange de solvant et non une utilisation d'un solvant unique d'extraction.

Concernant les solvants les plus polaires (Annexe I), l'eau n'a pas été retenue, la chlordécone étant une molécule apolaire ($\log K_{ow} = 5,41$) et très peu soluble dans l'eau ($s = 2,70$ mg/L). Des essais préliminaires ont tout de même été réalisés qui ont confirmé que la chlordécone n'est pas extraite par la méthode soxtec, même en utilisant l'eau en mélange avec 10% d'acétone (Annexe II). Sur l'échelle des polarités décroissantes, les solvants type alcool ont été écartés. En effet, l'équipe de Harless [10] a montré par des analyses en RMN que la chlordécone réagissait avec ce type de solvant en solution pour donner un hémiacétal

$C_{11}H_4Cl_{10}O_2$. Aussi, il a été montré que la présence des solvants type alcool (éthanol, méthanol, etc.) pouvait conduire à une réduction de la chlordécone en du chlordécol (figure 2a) par le mécanisme Meerwein-Ponndorf-Verley qui se produit par chauffage au niveau de l'injecteur [16]. Pour être sûr que les produits extraits proviennent uniquement de la dégradation due au procédé ISCR-Daramend[®] et non à une transformation en solution, ce type de solvant n'a pas été retenu.

Le choix s'est alors porté sur le dichlorométhane (DCM) et l'acétonitrile (ACN), en mélange avec l'acétone en proportion égale, volume à volume. Ces mélanges avec l'ajout d'acide trifluoroacétique (TFA, $pK_a = 0,3$) vont également être utilisés afin de voir l'influence de l'ajout de l'acide sur l'extraction. Le choix de l'acide s'est fait en suivant les instructions de la méthode US EPA 3545a sur les conditions d'extraction de pesticides organochlorés. Cette méthode préconise l'ajout d'acide trifluoroacétique, initialement en solution dans l'acétonitrile [17]. Afin de s'assurer que les composés de dégradation observés proviennent uniquement de la dégradation de la chlordécone dans le sol et non de l'extraction elle-même, deux méthodes techniques d'extraction ont été mises en œuvre :

a) **L'extraction ASE** : L'extraction est réalisée à l'aide d'un système Dionex 350. Cinq grammes de sol Andosol sont pesés et extraits en triplicat par cinq mélanges de solvants: acétone/hexane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane/acide trifluoroacétique (TFA) (50/50) (v/v) avec 0,1% TFA, acétone/acétonitrile (50/50) et acétone/acétonitrile/TFA (50/50) (v/v) avec 0,1% TFA. Les extractions sont faites en trois cycles de cinq minutes chacun, à 100°C, à une pression de 100 bars. Les composés sont alors récupérés dans 30mL de chacun des mélanges de solvants. Chaque extrait est ensuite évaporé sous flux d'azote jusqu'à 10 mL. Pour s'assurer du bon déroulement de l'extraction, les sols sont dopés avec 0,5 mL d'une solution à 20 mg/L de transnonachlore (TNC, $C_{10}Cl_9H_5$) dans l'acétone, qui sert de traceur d'extraction. Du sable de Fontainebleau est utilisé comme blanc d'extraction.

b) **L'extraction Soxtec** : L'extraction est réalisée à l'aide d'un système Soxtec 2050 (Foss, Danemark). Dix grammes de sol Andosol sont pesés et extraits en triplicat par cinq mélanges de solvants: acétone/hexane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane (50/50) (v/v), acétone/dichlorométhane/acide trifluoroacétique (TFA) (50/50) (v/v) avec 0,1% TFA, acétone/acétonitrile (50/50) et acétone/acétonitrile/TFA (50/50) (v/v) avec 0,1% TFA. Le mélange de solvants (90mL) est porté à 180°C. La cartouche en cellulose, contenant

l'échantillon de sol, est immergée dans le mélange de solvants pendant 1h30 puis elle est laissée en suspension sous vapeur de solvants pendant 45 minutes. Les composés sont alors récupérés dans environ 65mL de chacun des solvants (le fait de ne pas récupérer les 90 mL de départ est causé principalement par l'évaporation du mélange de solvant lors du temps d'extraction). Chaque extrait est ensuite évaporé sous flux d'azote jusqu'à 10mL. Comme pour les extractions à l'ASE, chaque échantillon, avant extraction, est dopé avec du TNC. Le sable de Fontainebleau est ici aussi utilisé comme blanc d'extraction.

Mise en place de la technique d'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses GC-MS ont été réalisées à l'aide d'un système Varian qui se compose d'un appareil de chromatographie gazeuse GC3800 équipé d'un injecteur 1177, un passeur d'échantillon Combi Pal (CTC) et un spectromètre de masse à piège à ions Saturn 2200. L'injecteur est équipé avec un liner désactivé avec laine de verre (8004-0152 Ultra Inert Liner, Agilent). L'injecteur est en mode splitless. La seringue est rincée avant (4 fois 5 μ L avec de l'acétone) et après l'injection des extraits. Les composés sont séparés sur une colonne Rxi-1ms (Restek) (L= 30m, di =0.25mm, épaisseur de film e 0,25 μ m). L'acquisition en spectrométrie de masse s'est faite en mode *fullscan* dans la gamme de masse *m/z* 50 -500. Tous les composés ont été ionisés par impact électronique à 70eV à une température de source de 250°C.

La mise en place de la méthode d'analyse a demandé une optimisation réalisée sur le transnonachlore (TNC, C₁₀Cl₉H₅), composé organochloré ajouté à chaque échantillon avant extraction, afin de pouvoir systématiquement vérifier l'efficacité du procédé d'extraction. Pour cela, une première étape a consisté à optimiser la réponse de ce traceur selon nos conditions expérimentales en GC-MS. S'agissant de la chromatographie en phase gazeuse, nous avons tout d'abord travaillé sur l'optimisation de la température de l'injecteur. Le graphe montré dans la figure 3 représente l'évolution de l'intensité du pic de transnonachlore en solution dans l'acétone à une concentration de 1 ppm en fonction de la température (°C) de l'injecteur. Seules les températures de 250°C et 280°C présentent des variations en intensité de pic faibles avec des coefficients de variation respectives de 0,8% et 1,2%. L'augmentation de la température de l'injecteur de 250°C à 260°C baisse l'intensité absolue du pic chromatographique de 675639,3 \pm 53833,6 à 341859,3 \pm 23714,0. Lorsque la température augmente à 270°C et 280°C l'intensité des pics est de 499376 \pm 39522,4 et de 492922,5

4315,5 soit 2 fois plus faible que l'intensité des pics à 250°C. La température de l'injecteur a donc été fixée à 250°C.

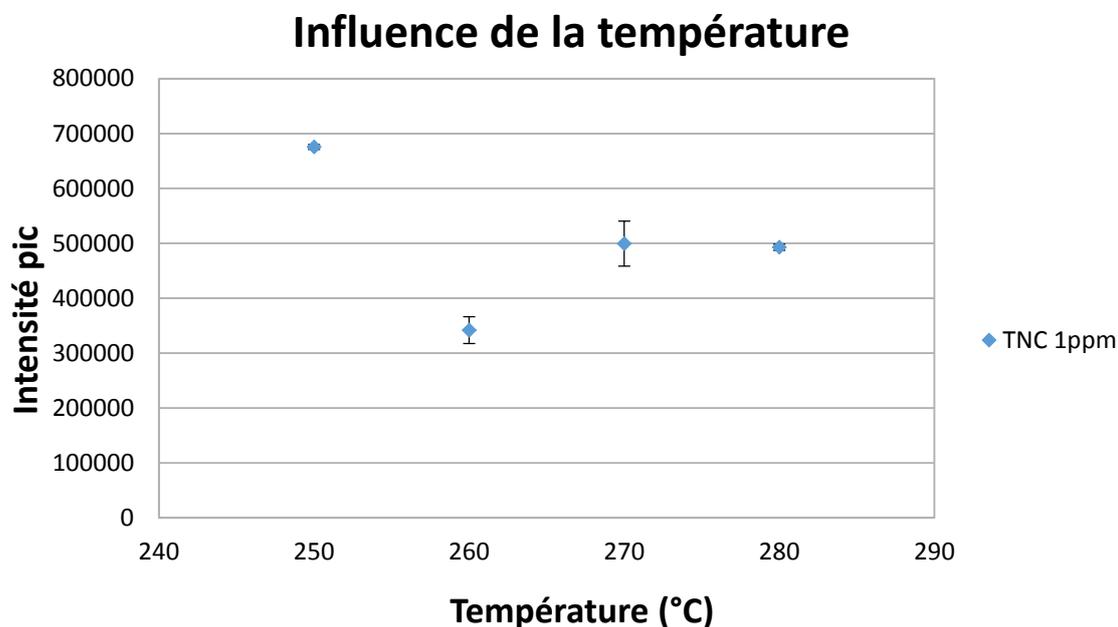


Figure 3 : Effet de la température de l'injecteur sur la réponse du TNC (barre d'erreur correspond à l'écart-type des intensités des pics (n=3)).

Dans un second temps, deux rampes de températures ont été testées. La première rampe commence à 50°C suivi d'un pas de 10°C/min jusqu'à 310°C. La seconde commence à 100°C pour finir à 310°C, en augmentant de 10°C/min. D'un point de vue séparation des composés et résolution des pics, aucune différence n'a été observée en fonction du gradient appliqué.

Concernant le spectromètre de masse type piège à ions, trois paramètres ont été optimisés. Tout d'abord, le courant d'émission, relatif au flux d'électrons disponibles lors du processus d'ionisation par impact électronique, a été testé pour deux valeurs extrêmes de 10µA et 30µA. Le graphique de la figure 4 présente les variations de l'aire de pic du transnonachlore en fonction de sa concentration, pour deux courants d'émission. L'aire de pic croît de façon linéaire avec la concentration ($R^2 > 0,99$). L'augmentation du courant d'émission de 10µA à 30µA permet d'augmenter 2 fois l'intensité des pics. Le courant d'émission choisi pour cette étude sera fixé à 30µA.

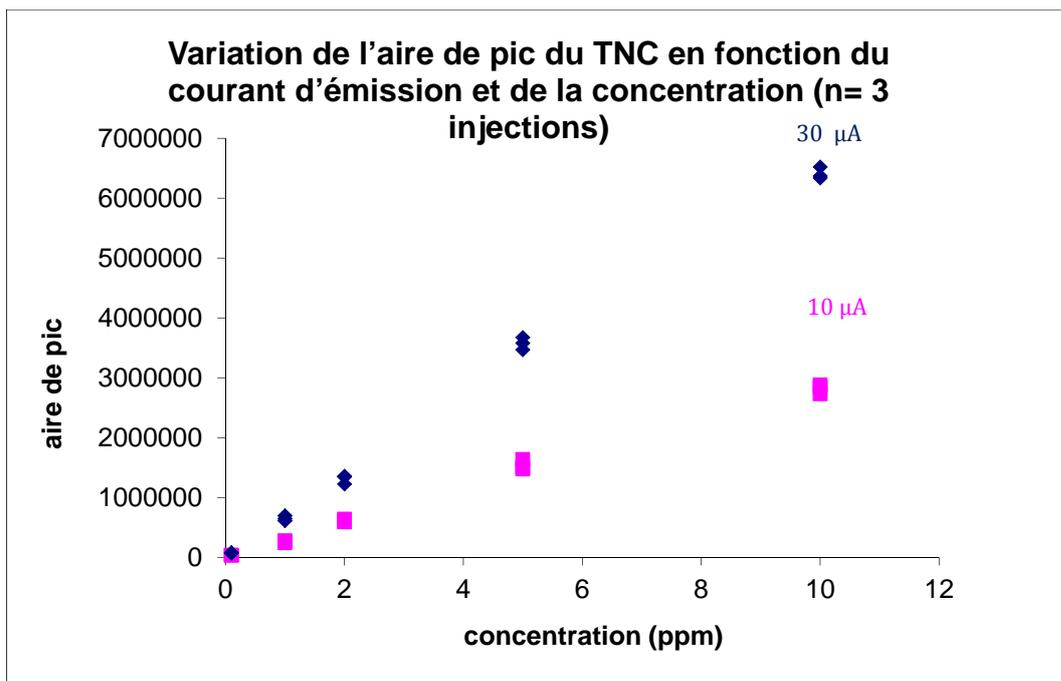


Figure 4: Influence du courant d'émission sur la réponse du TNC en GC-MS (n=3)

La dernière étape d'optimisation a consisté à augmenter la sensibilité de détection des composés chlorés chlordécone et transnonachlore en minimisant le bruit. Pour cela, un maximum de temps d'ionisation à 65000 µsec (valeur maximale) et une gamme de masse entre m/z 50 et m/z 500 ont été choisis.

Dans le tableau 1 sont résumés tous les paramètres optimisés de la méthode GC-MS.

Paramètre GC		Paramètre MS			
Température injecteur (°C)	Gradient	Courant d'émission	Préscan (µsec)	Scan (sec)	Gamme m/z
		(microampères)			
250	50°C ->310°C (pas 10°C)	30	100	0,55	50-500

Tableau 1: Paramètres GC-MS optimisés

4. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS)

Tous les extraits ont été filtrés à l'aide de filtre en nylon de 0.2µm avant injection en LC-HRMS. Les composés ont été séparés à l'aide de chromatographie liquide RSLC 3000 UltiMate équipé d'une pompe binaire, un passeur et un compartiment colonne thermostaté (Dionex, Germering, Allemagne). La colonne a été un Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 100

x 2,1 mm) (Waters, Manchester, Royaume-Uni) équipé d'un SecurityGuard Ultra C18 (2,1 mm) filtre protecteur (Phenomenex, Le Pecq, France). La phase mobile consistait dans l'eau (solvant) et de l'acétonitrile (solvant B). La composition est de 10% de B pendant 3 min, suivie d'un gradient linéaire de 100% de B en 30 min, le retour à des conditions initiales à 1 min et rééquilibrage pendant 3 min. La colonne est chauffée à 40° C. Le débit a été fixé à 350 µL /min. Le volume d'injection était de 1 µL.

Les expériences en spectrométrie de masse ont été effectuées sur UHR-Q-TOF maXis (Bruker, Brême, Allemagne) en mode d'ionisation *electrospray* négatif. La tension capillaire a été fixée à 4,5 kV. Les flux de nébulisation et de séchage du gaz (azote) ont été respectivement fixés à 1,2 bar et 12 L / min et gaz de séchage est chauffé à 200 ° C. Les spectres de masse ont été enregistrés à 1 Hz dans la plage de m/z 50 à 1700. L'étalonnage a été réalisé avec un *Lock mass* à m/z 666,0199 et 1265,9816.

III- RESULTATS ET DISCUSSION

a) Le traceur d'extraction

Pour s'assurer du bon déroulement de l'extraction, tous les sols ont été dopés en transnonachlore ($C_{10}Cl_9H_5$) à une teneur de 1 ppm. La figure 5 présente les taux de récupération du transnonachlore dans l'Andosol traité pendant six mois avec le procédé ISCR-Daramend[®] extrait à l'ASE et Soxtec avec les cinq mélanges de solvants d'extraction. Les taux de récupération ont été calculés selon le rapport de l'aire du transnonachlore dans l'extrait de sol sur l'aire du transnonachlore en solution à 1 ppm (représentant 100% de récupération)

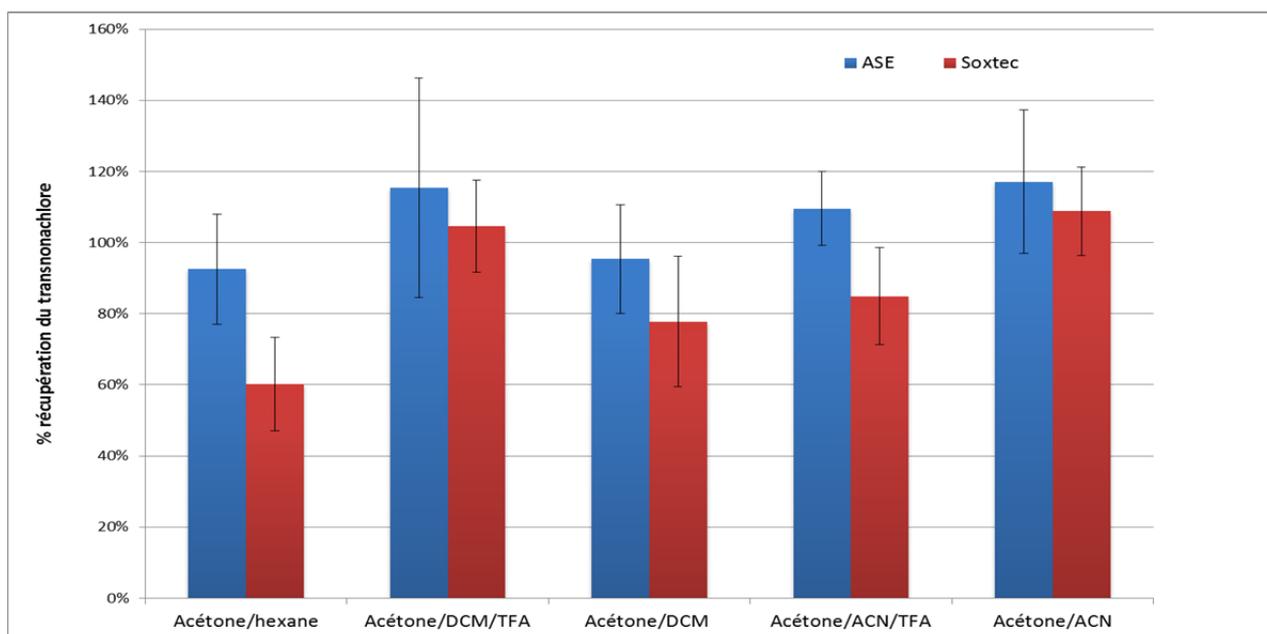


Figure 5: Moyennes du taux de récupération du transnonachlore (%) dans l'andosol traité par ISCR selon le type de mélange de solvant d'extraction. (Ecart type sur n=3).

Les deux méthodes d'extraction (Soxtec et ASE) avec les cinq mélanges de solvants extractants présentent des taux moyens de récupération du transnonachlore entre 78% - 117%. A noter l'exception de l'extraction au Soxtec par le mélange acétone/hexane qui donne un taux de récupération de $60 \pm 13\%$ pour l'extraction par Soxtec. Ce faible rendement d'extraction peut être expliqué par une sous-estimation de l'aire du pic dans les extraits due à un phénomène d'épaule causé par l'élution d'un composé au $t_r=18.6\text{min}$ dont l'aire est soustraite de celle du pic du traceur. Ces taux de récupération du transnonachlore supérieurs ou égaux à 60% permettent de confirmer l'efficacité des méthodes d'extraction mis en place par Soxtec et ASE avec les cinq mélanges de solvants extractants.

a) Influence de la polarité des solvants d'extraction

Dans un premier temps, l'influence de la polarité des solvants sur l'extraction des produits de dégradation suite au traitement ISCR-Daramend® a été déterminée par la méthode ASE. La figure 6 montre les chromatogrammes obtenus pour l'andosol traité ISCR-Daramend® durant six mois (taux d'abattement de la chlordécone = 22 %) extrait à l'ASE par les trois mélanges de solvants à polarité croissante qui sont l'acétone/hexane; acétone/dichlorométhane; et acétone/acétonitrile.

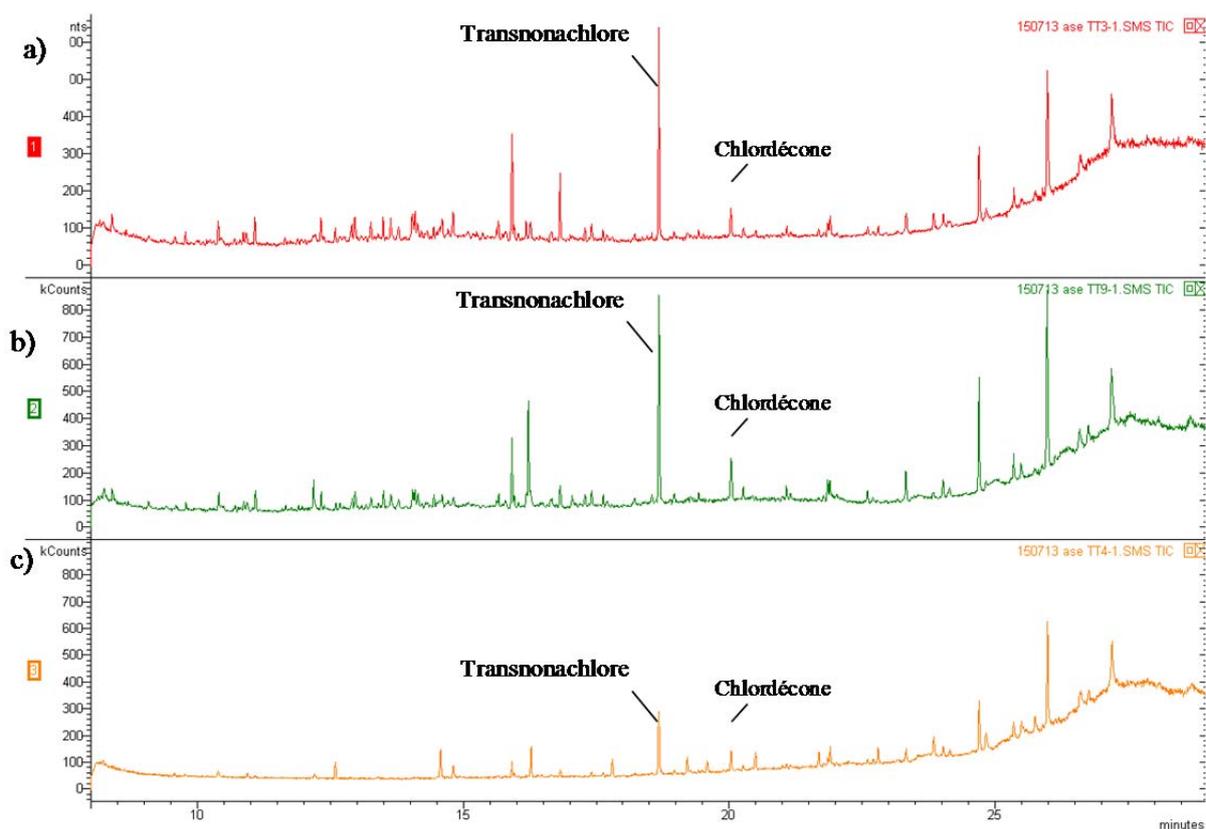


Figure 6: Chromatogrammes GC/MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les conditions : a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.

Les chromatogrammes (Figure 6) montrent que les mélanges de solvants les plus apolaires à savoir l'acétone/hexane (chromatogramme a) et l'acétone/dichlorométhane (chromatogramme b) extraient plus de composés entre les temps de rétention (t_r) de 8 à 18 min que la condition acétone/acétonitrile (chromatogramme c). La recherche des produits de dégradation de la chlordécone a été effectuée en comparant les chromatogrammes des sols témoins avec les chromatogrammes des sols traités ISCR-Daramend[®] pour chaque mélange de solvant (Annexe III). Cette comparaison a permis de montrer que les composés entre t_r 8 à 18 min sont déjà présents dans le sol avant le traitement ISCR-Daramend[®]. Cependant quelle que soit la condition d'extraction, trois pics sont détectés dans les extraits de sol traités ISCR-Daramend[®]. à $t_r=20,0$ min, $t_r=19,3$ min et $t_r=19,2$ min présentant des spectres de masses avec des distributions isotopiques caractéristiques de la présence d'atomes de chlore. Les composés à $t_r=20,0$ min et $t_r=19,2$ min, après une recherche sur la bibliothèque des spectres et injection d'étalons analytiques, correspondent respectivement à la chlordécone et la 5b-hydrochlordécone avec deux massifs isotopiques principaux centrés sur m/z 272 qui correspond à $[C_5Cl_6]^+$ (mécanisme rétro Diels Alder) et m/z 237 qui correspond au fragment

$[C_5Cl_5]^+$. Le spectre de masse du composé à $t_r=19,3\text{min}$ est présenté sur la figure 7. Ce composé présente un massif m/z 234/236/238/240, dont la distribution isotopique correspond au produit chloré, C_5HCl_5 . D'après Harless et al, ce fragment peut provenir de la fragmentation par impact électronique de la dihydro-chlordécone de formule brute $C_{10}Cl_8H_2O$, composé de dégradation de la chlordécone [10].

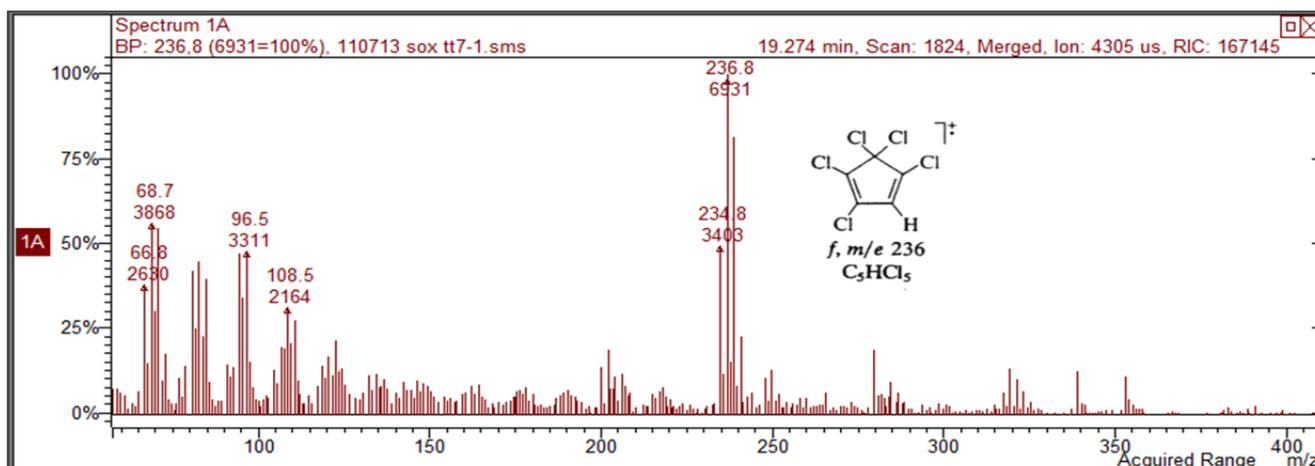


Figure 7 : Spectre de masse du composé à $t_r = 19.3$ min et structure du fragment correspondant.

Toutefois, le fait que l'Andosol soit une matrice complexe dont l'extrait est chargé, l'absence d'étalons analytiques et la présence de nombreux fragments ionisés issus de l'ionisation par impact électronique rendent difficiles la recherche et l'identification du produit de dégradation de la chlordécone élué au $t_r=19,3\text{min}$ de manière plus fondée que sur la seule base de la référence bibliographique de Harless [10].

Grâce à des travaux menés en parallèle (thèse de H. Belghit) par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS), deux composés de transformation de la chlordécone par le procédé d'ISCR ont pu être collectés, purifiés, et identifiés comme étant $C_{10}HCl_9O$ et $C_{10}H_2Cl_8O$. Ces composés isolés ont alors ensuite été utilisés en tant que composés standard et injectés en GC-MS. Cette démarche a permis d'identifier le composé élué à $t_r = 19,3$ min comme étant la monohydrochlordécone de formule brute $C_{10}Cl_9HO$, forme isomère à la 5b-hydrochlordécone (Figure 2b).

Afin de compléter les analyses effectuées par GC-MS sur le sol Andosol, les extraits ont été analysés en chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-qTOF-MS). La figure 8 présente les chromatogrammes en LC-qTOF-MS obtenus pour les

extraits par ASE (mélange de solvants extractants : acétone/hexane, acétone/dichlorométhane, acétone/acétonitrile) d'Andosol traité durant six mois par le ISCR-Daramend®.

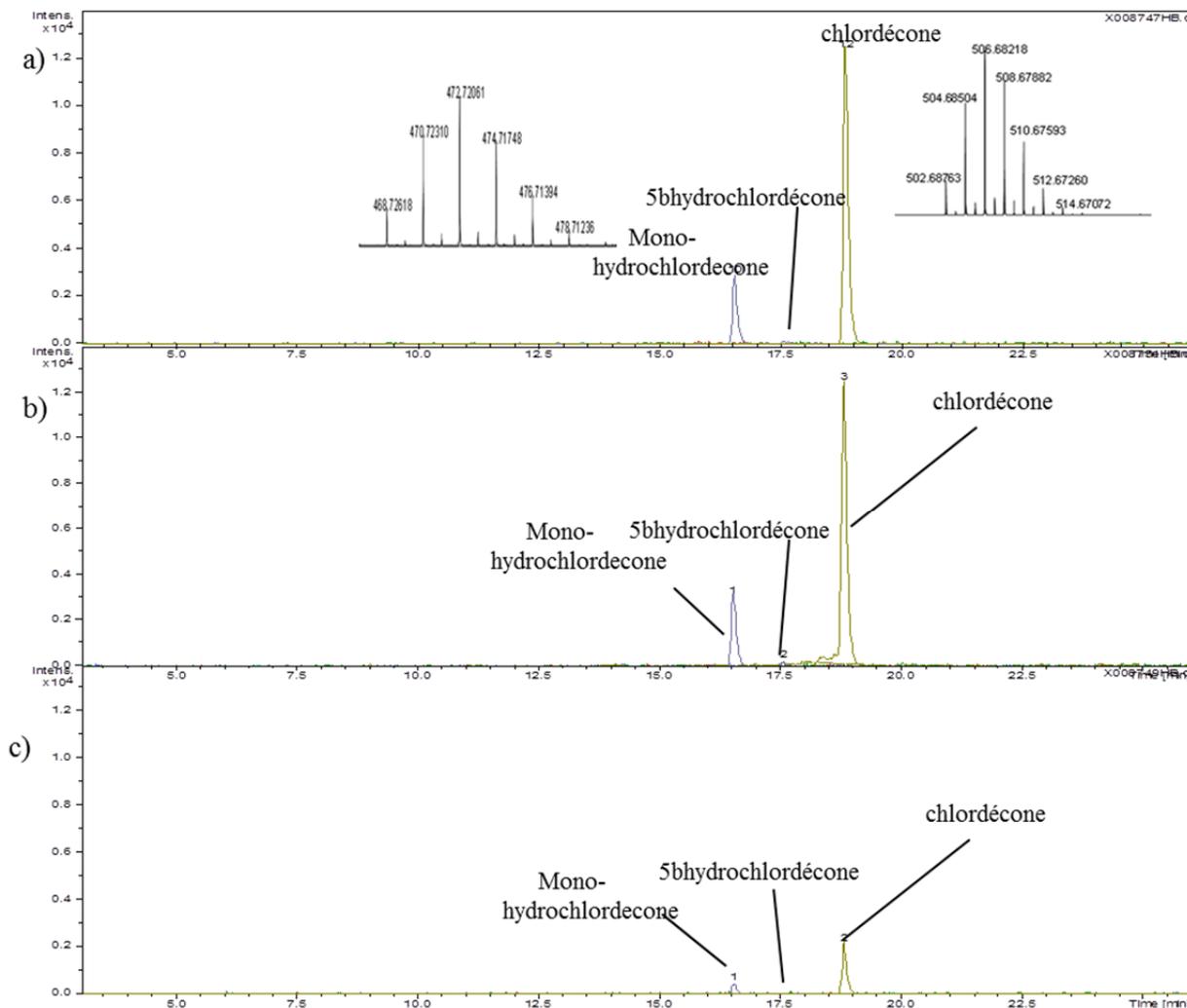


Figure 8 : Chromatogrammes LC-qTOF-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol avec les mélanges d'extractants : a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.

Les chromatogrammes confirment la présence des trois composés trouvés en GC-MS qui sont la chlordécone-hydrate à $t_r = 18,9$ min avec la présence de l'ion à m/z 502 correspondant à $[C_{10}HCl_{10}O_2]^-$, la 5b-hydro-chlordécone-hydrate, et la monohydrochlordécone-hydrate aux temps de rétention respectifs de 17,6 min et 16,6 min avec la présence d'un massif isotopique à m/z 468 correspondant à l'ion $[C_{10}H_2Cl_9O_2]^-$. Hormis ces trois composés, l'analyse des pics à $S/N \geq 3$ présents seulement dans le sol traité a montré qu'aucun d'entre eux ne correspond à un produit de dégradation issu de la chlordécone.

Les chromatogrammes en GC-MS et LC-qTOF-MS (Figures 6 et 8) présentent une très nette baisse d'aires des pics de la chlordécone, 5b-hydrochlordécone et la monohydrochlordécone

avec la condition d'extraction acétone/acétonitrile. La diminution des aires de pic des différents composés dans la condition acétone/acétonitrile, mélange faiblement apolaire, suggère que la variation de la polarité des mélanges de solvants extractant peut augmenter ou diminuer la capacité d'extraire quantitativement les produits de dégradation. Malgré ce fait, l'augmentation de la polarité des mélanges des solvants extractants ne semble pas influencer la nature des composés extraits issus de la dégradation de la chlordécone dans l'Andosol traité ISCR-Daramend®.

En parallèle, l'Andosol traité et témoin ont été extraits au soxtec en utilisant les trois mêmes mélanges de solvant à polarité croissante. L'objectif était d'évaluer et comparer la capacité de chacune des deux méthodes d'extraction à extraire les produits de dégradation de la chlordécone.

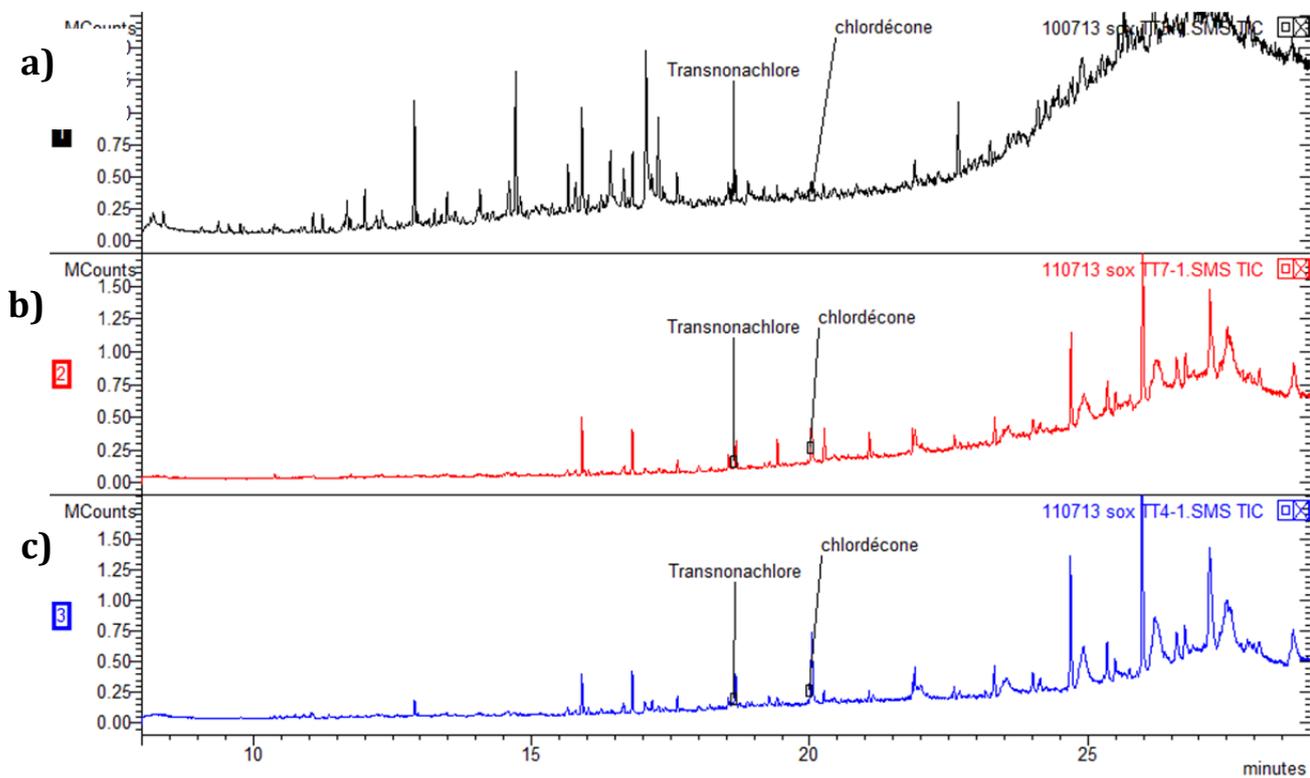


Figure 9: Chromatogrammes GC/MS d'extraits au soxtec de sol Andosol avec les mélanges de solvants extractants : a) acétone/hexane; b) acétone/dichlorométhane; c) acétone/acétonitrile.

L'extraction de l'andosol au Soxtec donne un chromatogramme riche en pics pour la condition acétone/hexane (Figure 9 a) notamment dans la zone $10 < t_R > 18$ min (la même observation a été faite en ASE, cf. fig. 6). Cependant une comparaison avec les sols témoins (Annexe IV) montrent que ce sont des composés propres au sol (matrice) et non issus de la

dégradation de la chlordécone suite au traitement ISCR-Daramend[®]. Les effets matrice dans la condition d'extraction « acétone/hexane » sont non négligeables, ce qui implique d'une part une baisse de rendement d'extraction du transnonachlore ($60 \pm 13\%$) (Figure 5) et d'autre part, une diminution d'intensité des pics avec un rapport signal sur bruit pour la chlordécone de 4, valeur proche de la limite de détection (LDD) avec un rapport signal sur bruit fixé à 3 et la présence de la monohydrochlordécone avec $S/N < 3$. Ces effets matrices n'ont pas été observés pour l'extraction au soxtec avec le mélange acétone/dichlorométhane et acétone/acétonitrile (Figure 9).

En conclusion, les chromatogrammes montrent que, en faisant abstraction des effets matrices du sol, il n'y a pas de différences significatives entre l'extraction effectuée par ASE ou par Soxtec en terme de présence des produits de dégradation suite au traitement ISCR-Daramend[®] en utilisant les trois mélanges de solvant à polarité croissante.

b) Influence de l'acidification du mélange de solvants d'extraction

Le choix de l'acide s'est fait en suivant les instructions de la méthode US EPA 3545a qui préconise l'ajout de 0,1% de TFA pour l'extraction de pesticides organochlorés [17]. Les figures 10 et 11 présentent les chromatogrammes obtenus pour l'extraction ASE par le mélange acétone/dichlorométhane et acétone/acétonitrile (50/50) (v/v) avec et sans 0,1% TFA.

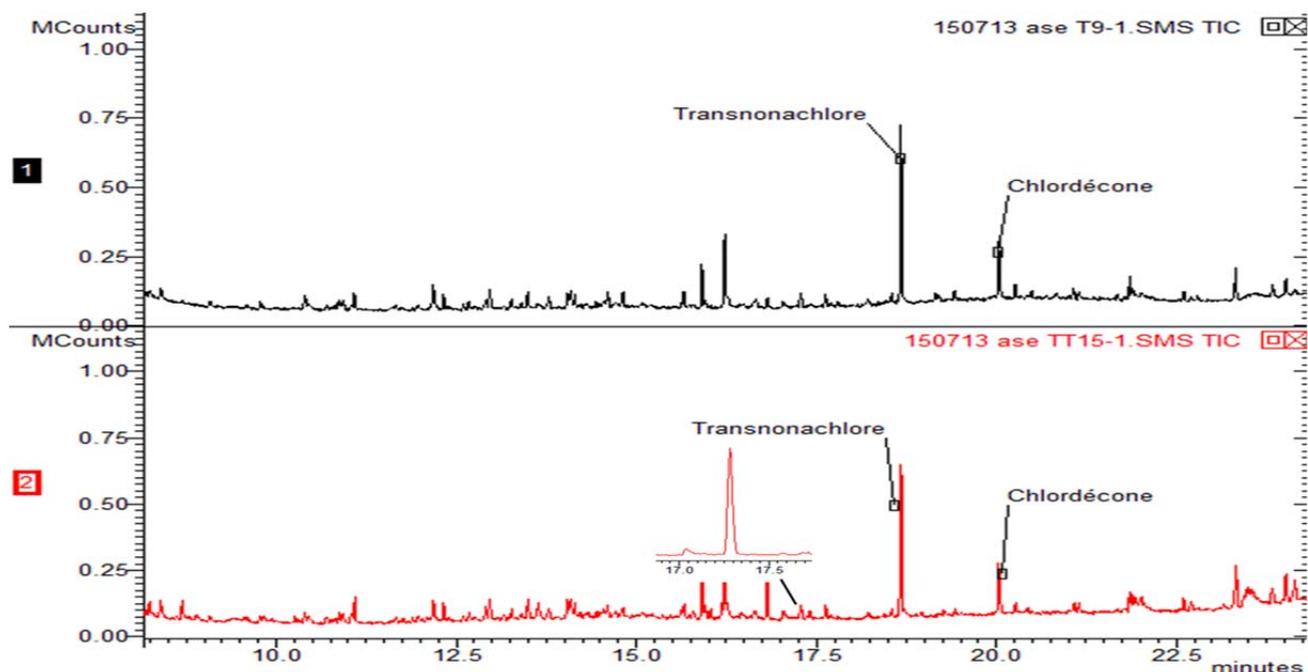


Figure 10 : Chromatogrammes en GC-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol traité ISCR avec les mélanges de solvants extractants : a) acétone/dichlorométhane; b) acétone/dichlorométhane/TFA.

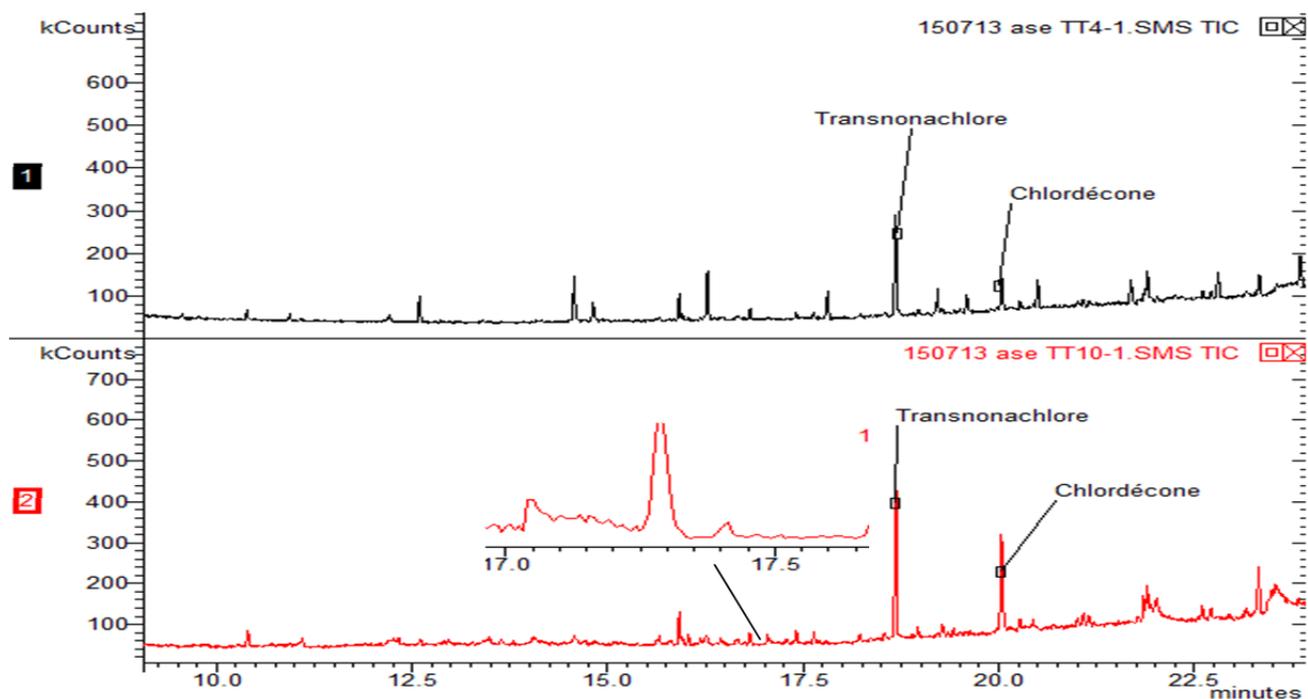


Figure 11 : Chromatogrammes en GC-MS d'extraits à l'ASE de sol Andosol traité ISCR avec les mélanges de solvants d'extraction : a) acétone/acétonitrile; b) acétone/acétonitrile/TFA.

Les chromatogrammes (Figure 10 et 11) montrent que l'addition du TFA entraîne l'apparition d'un nouveau pic à un rapport signal sur bruit (S/N) de 11 avec à $t_r=17,4$ min, présent dans les sols témoins. Le spectre de masse centré sur les ions m/z 251/253/255 (Figure 12 b) correspond à l'ion $C_9Cl_4H_3$. Partant du fait que ce composé est présent dans les sols témoins,

nous avons effectué une étude sur le curlone[®], pesticide contenant 5% de chlordécone commercialisé et épandu sur la période 1981-1993. Trois lots de curlone[®] ont été extraits avec un mélange acétone/dichlorométhane/TFA (figure 12a).

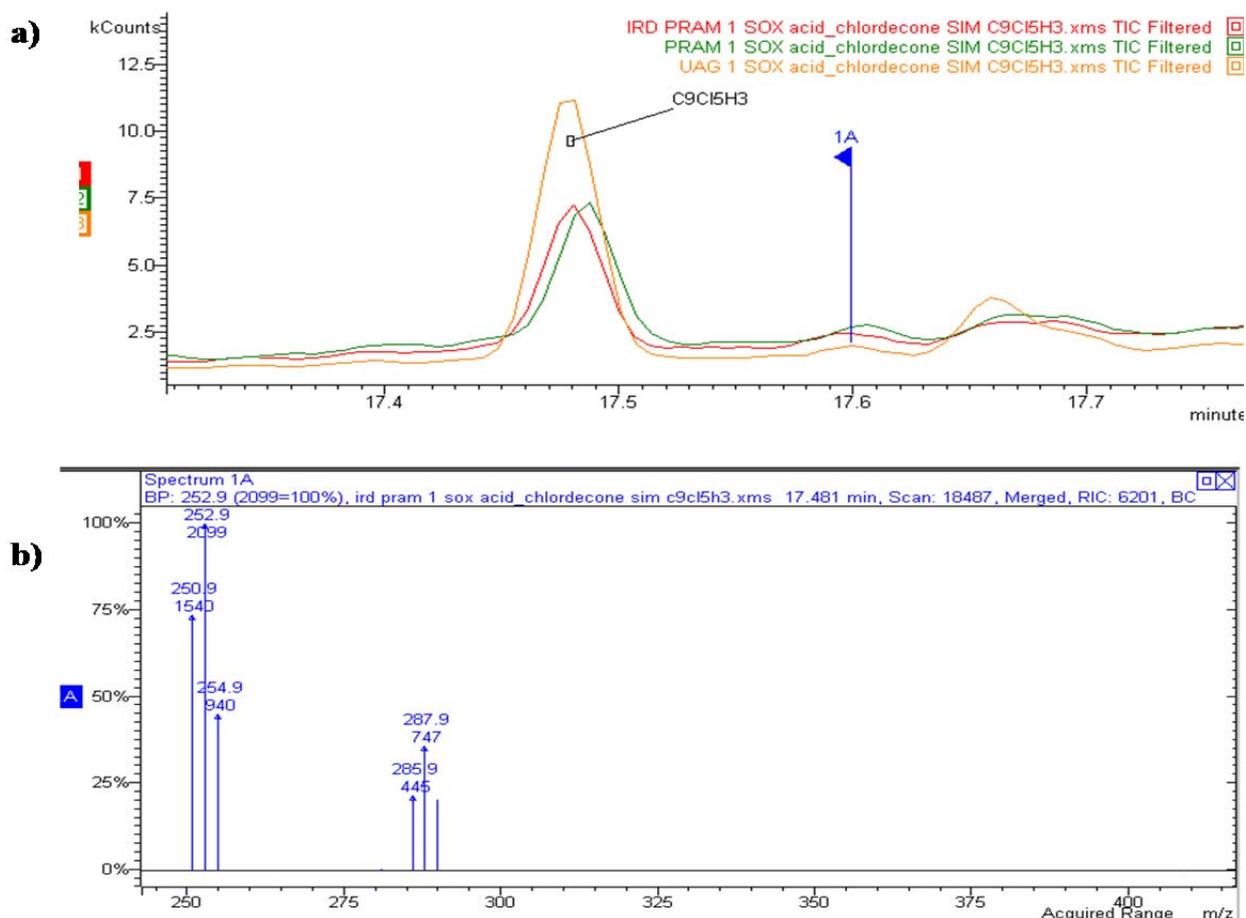


Figure 12: (a) Superposition de trois chromatogrammes de curlone[®] extraits avec le mélange acétone/dichlorométhane/TFA. (b) spectre de masse en SRM du composé à $t_r=17,4$ min.

Il s'avère que le composé $C_9Cl_4H_3$ avec un temps de rétention de 17,4 min provient bien de la Curlone[®].

Toujours dans le but de rechercher les produits de dégradation par une méthode analytique complémentaire à la GC-MS, les extraits de sol témoin et traité ISCR dans la condition acétone/dichlorométhane et acétone/acétonitrile avec l'ajout du TFA ont été analysés en LC-qTOF-MS.

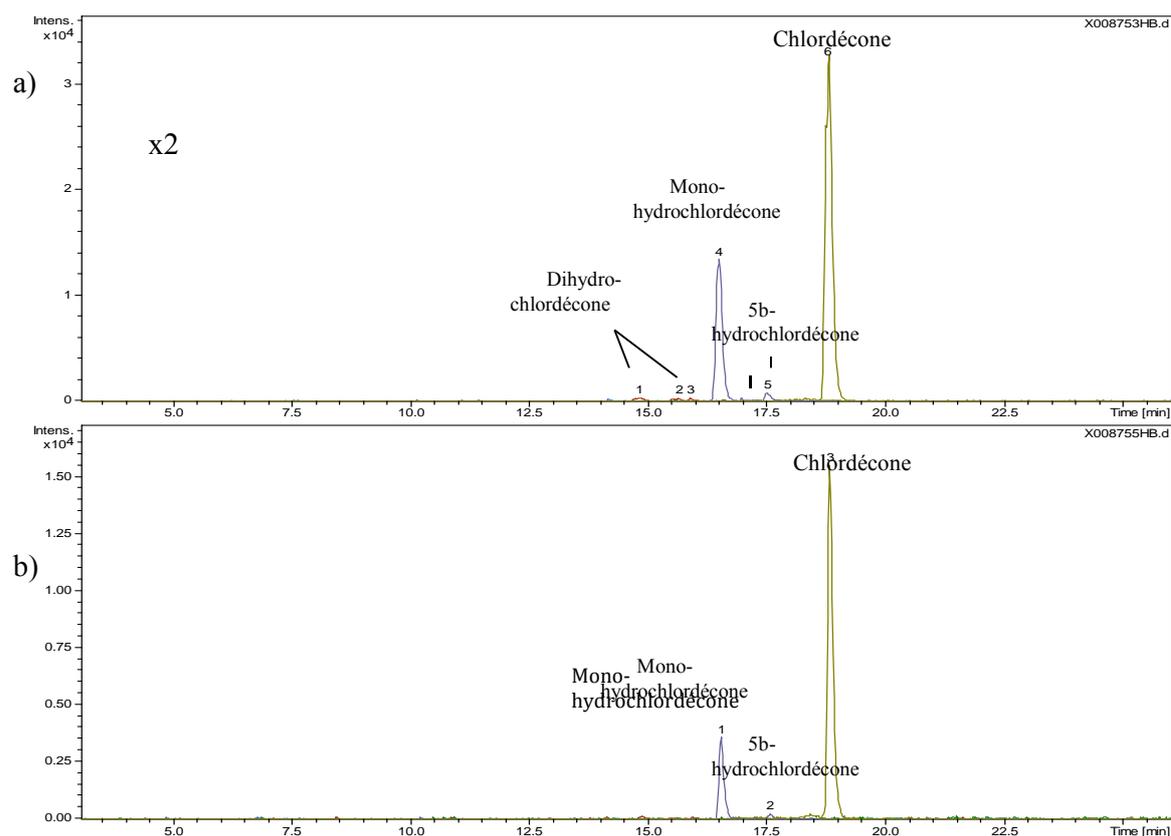


Figure 13 : Chromatogrammes d'extraits à l'ASE de sol Andosol traité ISCR en LC-qTOF avec les conditions : a) acétone/dichlorométhane/ TFA; b) acétone/acétonitrile/TFA.

Le chromatogramme LC-qTOF-MS du sol traité ISCR-Daramend® extrait avec le mélange de solvant acétone/dichlorométhane 0,1% de TFA présente, uniquement dans ces conditions d'extraction, trois nouveaux pics aux temps de rétention de 14,8 ; 15,6 et 15,9 min (Figure 13) de faible intensité (rapport S/N = 4,2 ; 3,8 ; 4,7) dont les spectres de masse présentent une distribution isotopique à m/z 434 correspondant à $[C_{10}H_3Cl_8O_2]^-$ qui correspond à trois isomères dihydrochlordécone composés qui n'ont pas été décelés lors de l'étude par GC-MS en mode *full scan*.

Le tableau 2 résume tous les composés observés en GC-MS par les différents mélanges de solvant suite à une extraction au soxtec et à l'ASE. Les conditions acétone/ dichlorométhane avec ou sans TFA et acétone/acétonitrile sans TFA présentent un pic à $t_r=21.9$ min dont le spectre de masse est centré sur les ions m/z 217/219/221 correspondant au chlordécol (Figure 2 a). La présence du chlordécol dans le sol témoin dans les mêmes conditions d'extraction montre que cette molécule n'est pas un composé de transformation de la chlordécone suite au traitement ISCR-Daramend®. La présence de chlordécol peut résulter d'une réduction de la chlordécone suite au temps de chauffage [16] que nécessite la méthode soxtec (2h15 à

180°C). En absence d'étalons analytiques, le composé à $t_r=17,4$ min, $C_9Cl_4H_3$, dont le spectre de masse est centré sur les ions m/z 251/253/255 n'a pas pu être confirmé et identifié.

L'optimisation des méthodes d'extraction en ASE et Soxtec avec les différents mélanges d'extractants a permis d'identifier 5 produits de déchloration de la chlordécone ; deux isomères monohydrochlordécone (dont un isomère correspondant à la 5b-hydrochlordécone) par GC-MS et LC-qTOF-MS et trois isomères dihydrochlordécone présents uniquement dans la condition acétone/dichlorométhane/TFA par LC-qTOF-MS. La non-détection en GC et LC de produits de dégradation à nombre de chlore inférieur à huit peut être due à des concentrations inférieures aux limites de détections atteintes par les méthodes analytiques utilisées. Afin de vérifier cette hypothèse, les extraits devront être concentrés avant analyse. Nos essais dans ce sens ont montré que le fait de concentrer les extraits d'un facteur 30 et 100 provoque une forte augmentation des effets matrices qui elle-même apporte une suppression d'ion au niveau des sources d'ionisation GC-MS et LC-qTOF-MS. Pour réduire ces effets matrices, une optimisation d'une méthode de purification/pré-concentration devra être effectuée. Cette absence de produits dégradations à nombre de chlore inférieur à huit peut être dû également au traitement ISCR-Daramend[®] qui, en six mois, a permis de former préférentiellement ces 5 composés de dégradation. On peut penser qu'une plus longue durée de traitement aurait pu conduire à des composés à plus faibles teneurs en chlore. Une dernière hypothèse réside dans le relatif manque de sensibilité du mode de détection utilisé, le mode SRM (Selected Reaction Monitoring), plus sensible, n'ayant pas pu être mis en œuvre dans ce travail [18].

t _r (min)	ion m/z	Attribution	Réplicat	acétone/ hexane		acétone/dichlorométhane		acétone/dichlorométhane/TFA		acétone/ acétonitrile		acétone/acétonitrile/TFA	
				ASE	Soxtec	ASE	Soxtec	ASE	Soxtec	ASE	Soxtec	ASE	Soxtec
21,9*	217/219/221	chlorodécol	1			X			X		X		
			2			X			X		X		
			3			X			X		X		
20,0*	217/219/223	chlorodécone	1	X	X	X		X	X		X		X
			2	X	X	X		X	X		X		X
			3	X	X	X		X	X		X		X
19,2*	217/219/224	5b-hydrochlorodécone	1	X	X	X		X	X		X		X
			2	X	X	X		X	X		X		X
			3	X	X	X		X	X		X		X
19,3	217/219/225	monohydrochlorodécone	1	X	<LDD***	X		X	X		X		X
			2	X	<LDD***	X		X	X		X		X
			3	X	<LDD***	X		X	X		X		X
18,8*	217/219/226	transnonachlore (traceur)	1	X	X	X		X	X		X		X
			2	X	X	X		X	X		X		X
			3	X	X	X		X	X		X		X
17,4**	217/219/227	non attribué	1								X		X
			2								X		X
			3								X		X

*présent également dans l'extrait de sol témoin

**présent initialement dans l'extrait de Curlone

*** rapport signal/bruit inférieur à la limite de détection= 3

Tableau 2 : Synthèse des ions observés en GC/MS dans les différentes conditions de mélange d'extractants et de méthodes d'extraction appliqués à l'andosol après 6 mois de traitement ISCR.

III. CONCLUSION

Afin d'identifier les produits de dégradation de la chlordécone dans l'Andosol suite au traitement ISCR-Daramend[®], deux méthodes d'extraction (ASE et Soxtec) utilisant trois mélanges de solvants à polarité croissante acétone/ hexane, acétone/dichlorométhane et acétone/acétonitrile ont été mises en place, suivies d'une analyse en GC-MS par impact électronique en mode full scan.

Les deux méthodes d'extraction ASE et Soxtec pour les trois mélanges montrent la présence de la chlordécone, la 5b-hydrochlordécone et une autre monohydrochlordécone (isomère de la 5b-hydrochlordécone), ces deux derniers composés étant issus du traitement ISCR-Daramend[®]. Les chromatogrammes montrent, en faisant abstraction des pics chromatographiques déjà présents dans le sol non traité (effets matrices du sol), qu'il n'y a pas de différences en terme de nombre de composés de dégradation de la chlordécone détectés par l'une ou l'autre méthode d'extraction (ASE ou Soxtec) et ce pour les trois mélanges de solvants extractants.

La méthode d'extraction ASE sera privilégiée avec le couple acétone/ hexane comme mélange de solvants d'extraction car elle a l'avantage d'être une technique rapide (15 min) et de nécessiter 3 à 4 fois moins de solvant par rapport à l'extraction au soxtec (2h15).

Il est à noter que l'ajout de l'acide trifluoroacétique (TFA) au mélange acétone/dichlorométhane a montré en LC-HRMS uniquement dans le sol traité par ISCR la présence de trois pics chromatographiques de faible intensité correspondant à trois isomères relatifs à la dihydrochlordécone (C₁₀Cl₈H₂O).

Les chromatogrammes obtenus par GC-MS montrent la présence de nombreux pics « parasites » venant de la matrice sol qui peuvent en mode *full scan* (détection non sélective et non spécifique) conduire à la suppression d'ions et réduire la sensibilité requise pour la détection de composés de dégradation de la chlordécone à l'état de traces. Afin de pallier à cette difficulté, il est envisagé de mettre en place une méthode de purification des extraits par SPE (Solid Phase Extraction) qui permettrait de concentrer les produits de dégradation de la

chlordécone et d'augmenter ainsi la sensibilité de détection. Toutefois, cette technique de purification demande une optimisation préalable avec des étalons analytiques afin de comprendre le comportement des composés d'intérêt et de choisir la phase stationnaire et les éluants qui leur sont spécifiques, sans oublier le comportement des traceurs d'extraction. Aussi afin d'augmenter la sensibilité de la détection des produits de dégradation en GC-MS, les extraits de sols devront être analysés par d'autres modes de détection différents du mode *full scan* comme le mode SRM (Selected Reaction Monitoring) qui permet de quantifier une ou plusieurs molécules cibles dans l'échantillon.

La SPME (Solid Phase Micro-Extraction) est une autre technique alternative qui peut être envisagée. En fonction de la tension de vapeur des composés recherchés, l'adsorption sur la fibre SPME peut être conduite soit en mode espace de tête (head space), soit en mode immersion. En mode head space, la fibre adsorbe les analytes d'intérêts dans la phase gazeuse située au-dessus de la matrice liquide ou solide. En mode immersion, la fibre est plongée dans la matrice liquide à analyser. La SPME a pour intérêt d'être une technique de concentration sélective ne nécessitant pas de solvant, et de ne nécessiter aucune étape de préparation d'échantillon. Cette technique permettrait de s'assurer qu'il n'y a pas de composés de dégradation qui, parce que volatils ou semi-volatils ou thermosensibles, sont absents des extraits obtenus et donc ne peuvent être détectés suite à l'extraction du sol par ASE ou Soxtec.

En dernier lieu, les analyses par GC-MS devront être conduites en mode d'ionisation chimique. L'utilisation de l'ionisation chimique permet de visualiser un pic correspondant à la masse moléculaire du composé détecté, et évite la fragmentation de ce même composé, fragmentation que l'on obtient en impact électronique. L'ionisation chimique est employée en complément de l'ionisation électronique. L'ionisation chimique est plus sélective et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes. Ce mode d'ionisation nécessite une optimisation notamment sur le choix des gaz/solvant réactant. Une fois la méthode optimisée, l'observation de l'ion pseudo-moléculaire permettra par des études de type MS^2 et MS^n de caractériser les produits de dégradation.

Bibliographie

- [1] « *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants* », Hansch C. et al., ACS Professional Reference Book. Washington DC: American Chemical Society; p65.
- [2] Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, <http://chm.pops.int> (visité le 18/02/2013).
- [3] « *Chlordecone exposure and risk of prostate cancer* », L. Multigner et al., J Clin Oncol, 28 (21), 3457-3462, 2010.
- [4] « *Décontamination des sols pollués par la chlordécone – validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique pour la chlordécone dans les sols* », M.C. Dictor et al. BRGM/ RP-59481-FR, 2011.
- [5] « *Determination of pesticides and their degradation products in soil : critical review and comparison of methods* », Y. Pico, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 23 (10-11), 772–789, 2004.
- [6] « *High extraction efficiency for POPs in real contaminated soil samples using Accelerated Solvent Extraction* », A. Hubert et al., Anal. Chem., 72, 1294-1300, 2000.
- [7] « *Residues of organochlorine insecticides and their metabolites in soils in the Atlantic Province of Canada* », J.R Duffy et N.Wong, J. Agr. Food Chem, 15 (3) 457-464, 1967.
- [8] « *Structures of Some Kepone Photoproducts and Related Chlorinated Pentacyclodecanes by Carbon-13 and Proton Nuclear Magnetic Resonance* », N.K. Wilson et R.D. Zehr, J. Org. Chem., 44 (8), 1278-1282, 1979.
- [9] « *Determination of Kepone dechlorination products in finfish, oysters, and crustaceans* », R.A. Carver et F.D Griffith Jr, J. Agric. Food Chem., 27 (5), 1035-1037, 1979.
- [10] « *Mass Spectrometry analysis and characterization of Kepone in environmental and human samples* », R.L. Harless et al., Biomedic Mass Spec, 5 (3), 232-237, 1978.
- [11] « *Determination of chlordecone in soils by GC/MS* », L. Amalric et al., Intern. J. Environ. Anal. Chem. 86 (1-2), 15-24, 2006.
- [12] « *Analyse de la chlordécone dans les sols par GC/MSMS- Application à des procédés de décontamination des sols pollués et recherche de produits de dégradation* », S. Bristeau et al., 42^e congrès du Groupe Français des Pesticides, 2012.
- [13] « *Gibbs Free Energy of Formation of Chlordecone and Potential Degradation Products: Implications for Remediation Strategies and Environmental Fate* », J. Dolfing et al., Environmental Science & Technology, 46, 813, 2012.
- [14] « *Sampling of heterogeneous and dynamic material systems, theories of heterogeneity, sampling and homogenizing* », P.M. Gy, Elsevier, Amsterdam, 653p., 1992.
- [15] « *Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies : a simple leaching model accounts for current residue* », Y.M. Cabidoche et al., Environ Poll, 157, 1697-1705, 2009.
- [16] « *Thermal reduction of chlordecone in the presence of alcohol* », W.H. Soine et al., J. of Chromatography, 281, 95-99, 1983.
- [17] EPA method, 3545a, Pressurized Fluid Extraction, in Fed Reg., Revision 1, February, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2007.
- [18] « *Décontamination de sols pollués par la chlordécone : métabolites et écotoxicité générés par le procédé d'In Situ Chemical Reduction-Daramend[®]* », C. Mouvet et S. Bristeau. BRGM/RP-61414-FR, 2012.

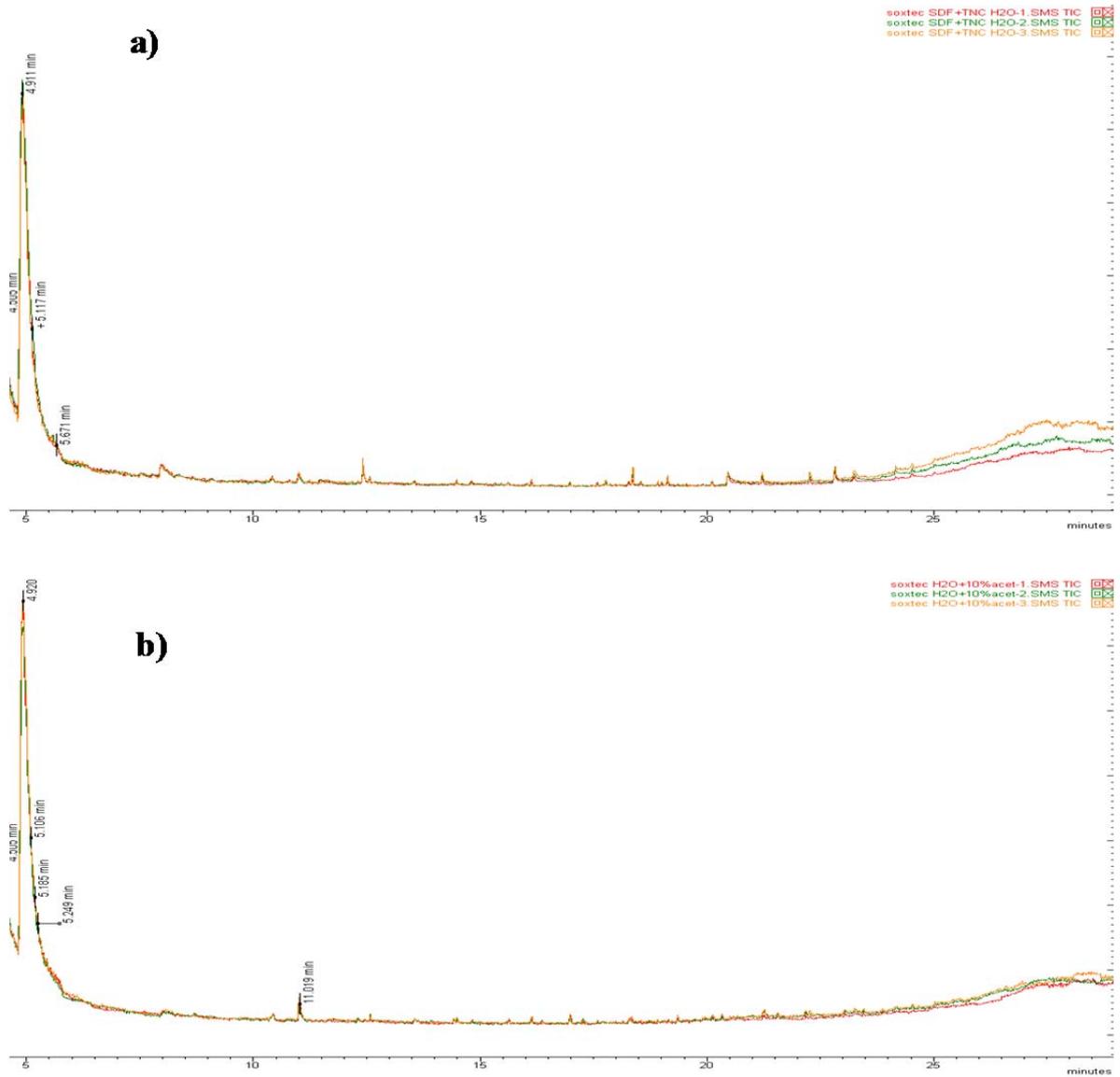
Annexes

Annexe I : Tableau résumant les différentes propriétés physico-chimiques des solvants.

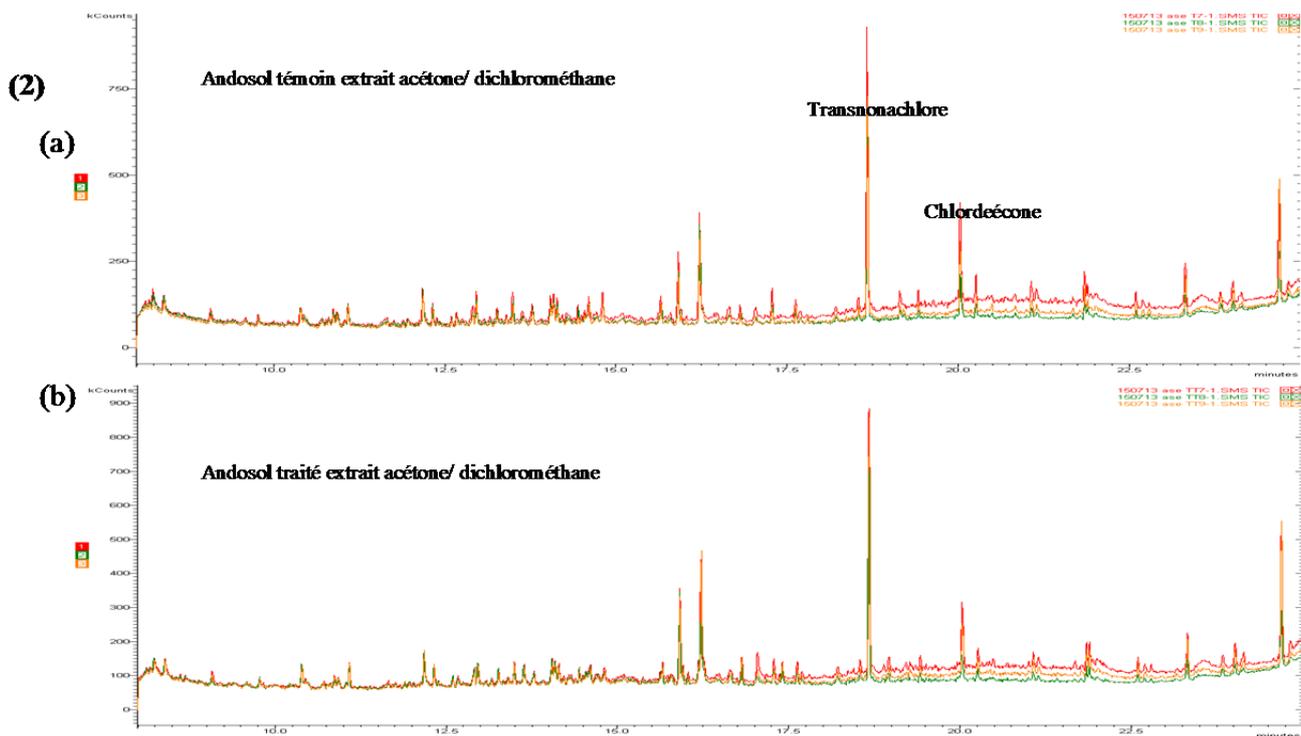
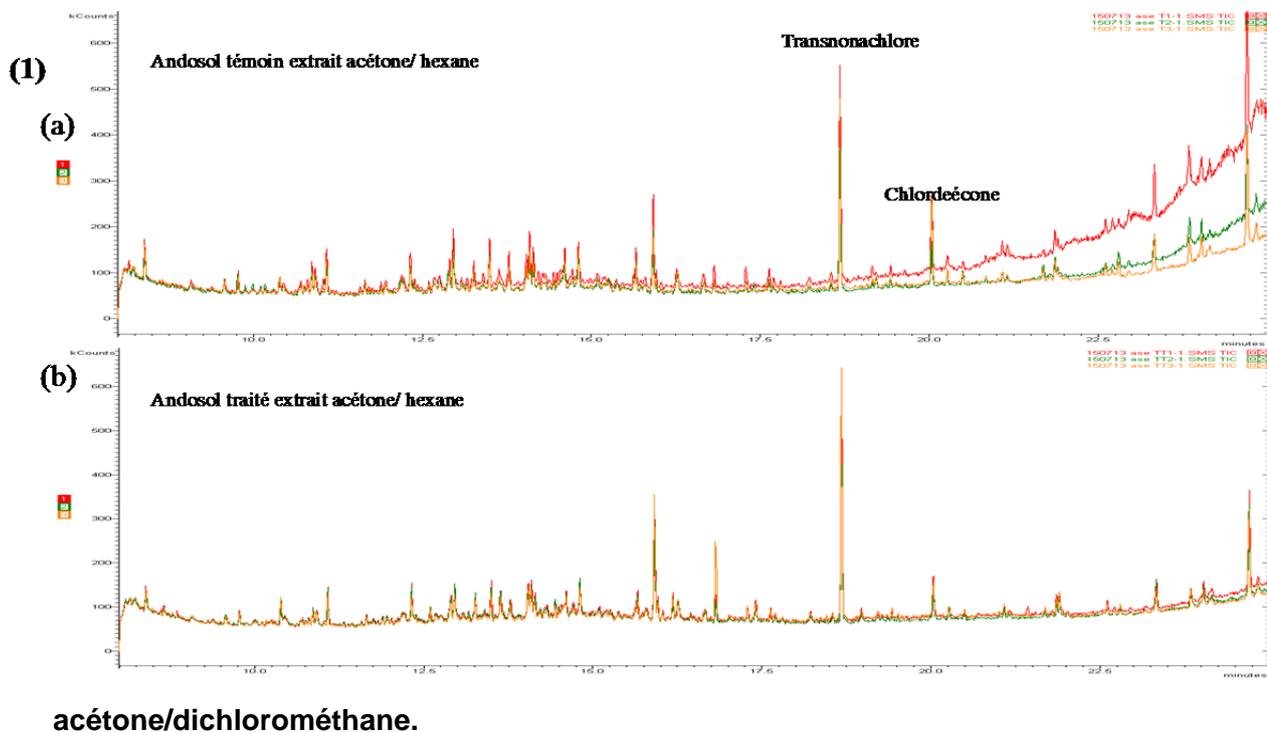
Solvant	Formule chimique	Température d'ébullition (°C)	Température de fusion (°C)	Densité (g/mL)	Solubilité dans H ₂ O ¹ (g/100g)	Polarité relative ²	Force éluante ³	Valeur d'exposition ⁴ (ppm)	Pression de vapeur à 20°C (hPa)
hexane	C ₆ H ₁₄	69	-95	0,655	0,0014	0,009	0,01	50	160
pentane	C ₅ H ₁₂	36,1	-129,7	0,626	0,004	0,009	0	600	573
heptane	C ₇ H ₁₆	98	-90,6	0,684	0,0003	0,012		400	48
toluene	C ₇ H ₈	110,6	-93	0,867	0,05	0,099	0,29	50	29
benzene	C ₆ H ₆	80,1	5,5	0,879	0,18	0,111	0,32	0,5	101
ether	C ₄ H ₁₀ O	34,6	-116,3	0,713	7,5	0,117	0,38	400	587
acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	77	-83,6	0,894	8,7	0,228	0,58	400	97
chloroform	CHCl ₃	61,2	-63,5	1,498	0,8	0,259		10	210
dichloromethane	CH ₂ Cl ₂	39,8	-96,7	1,326	1,32	0,309	0,42	50	475
acetone	C ₃ H ₆ O	56,2	-94,3	0,786	M	0,355	0,56	500	240
diméthylformamide (DMF)	C ₃ H ₇ NO	153	-61	0,944	M	0,386		10	3,5
t-butyl alcohol	C ₄ H ₁₀ O	82,2	25,5	0,786	M	0,389		100	41
diméthylsulfoxyde (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	189	18,4	1,092	M	0,444	0,75		
acetonitrile	C ₂ H ₃ N	81,6	-46	0,786	M	0,46	0,65	20	97
2-propanol	C ₃ H ₈ O	82,4	-88,5	0,785	M	0,546	0,82	400	44
1-heptanol	C ₇ H ₁₆ O	176,4	-35	0,819	0,17	0,549			
1-hexanol	C ₆ H ₁₄ O	158	-46,7	0,814	0,59	0,559			
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	117,6	-89,5	0,81	7,7	0,586		20	6,3
1-propanol	C ₃ H ₈ O	97	-126	0,803	M	0,617	0,82		
ethanol	C ₂ H ₆ O	78,5	-114,1	0,789	M	0,654	0,88	100	59
methanol	CH ₄ O	64,6	-98	0,791	M	0,762	0,95	200	128
water	H ₂ O	100	0	0,998	M	1	>>1		

¹M = miscible. ²Valeurs extraites du livre de Christian Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Wiley-VCH Publishers, 3rd ed., 2003. ³Snyder's empirical eluant strength parameter for alumina. Extrait de Reichardt, page 495. ⁴Valeurs limites d'exposition. Extrait de Reichardt, pages 501-502.

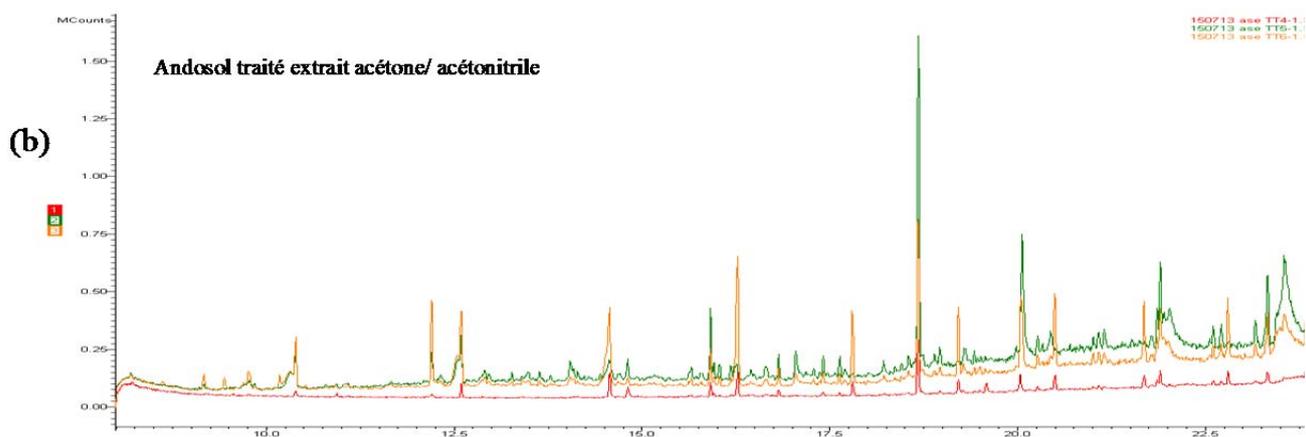
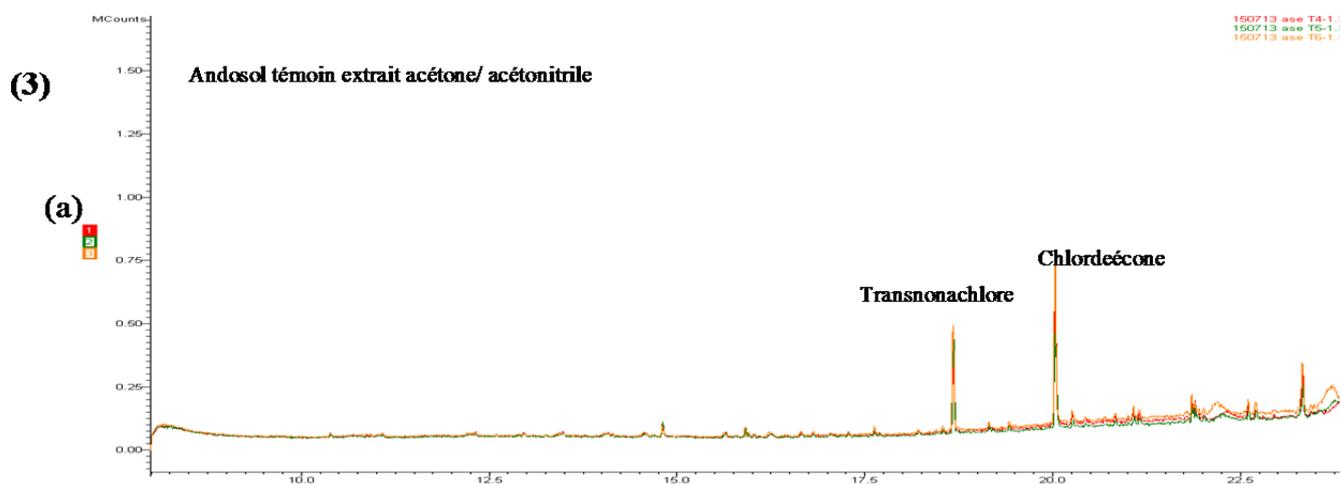
Annexe II: Chromatogrammes en GC-MS pour la condition d'extraction Soxtec avec un mélange eau/ acétone (90/10) (v/v) obtenus en triplicat pour : (a) Sable de Fontainebleau dopé en transnonachlore (b) Andosol traité ISCR dopé en transnonachlore.



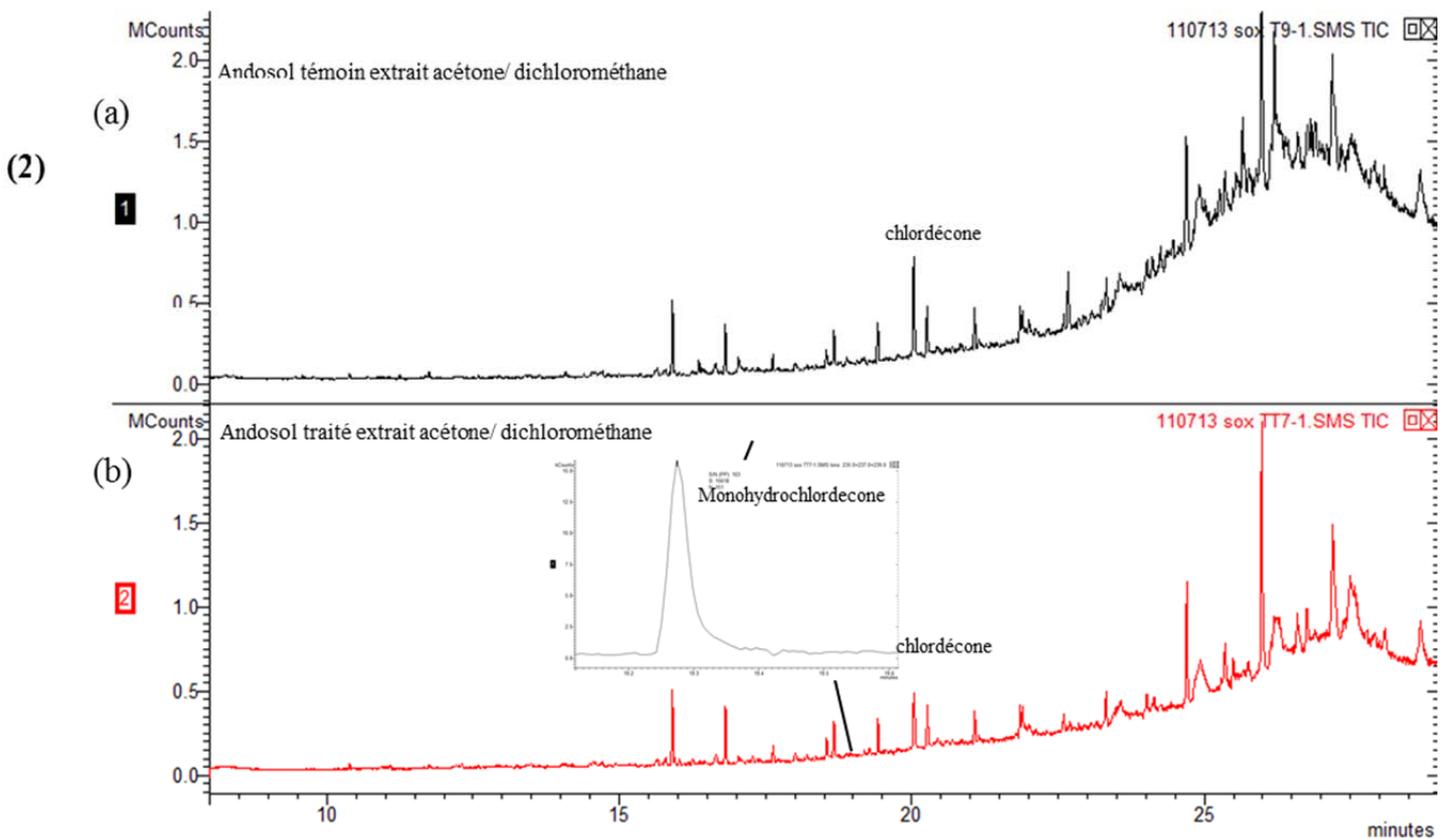
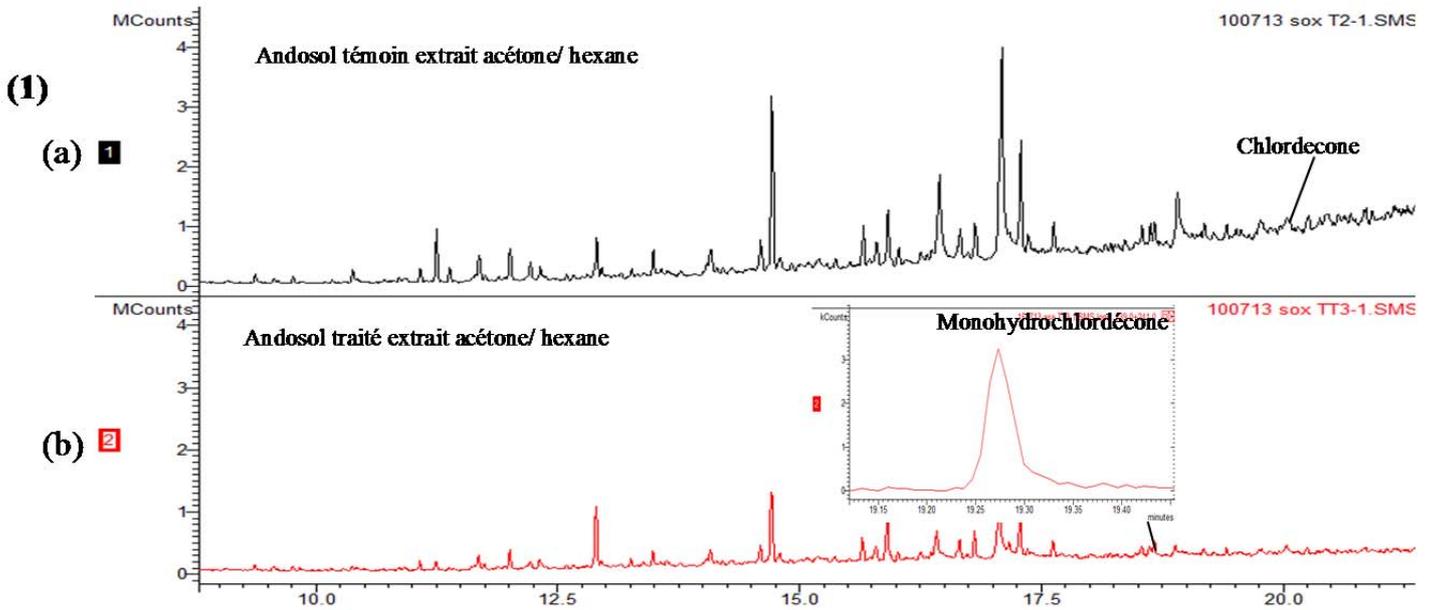
Annexe III: Chromatogrammes en GC-MS pour l'andosol extrait en triplicat à l'ASE pour (a) le témoin et (b) traité ISCR avec le mélange de solvant (1) acétone/hexane (2)



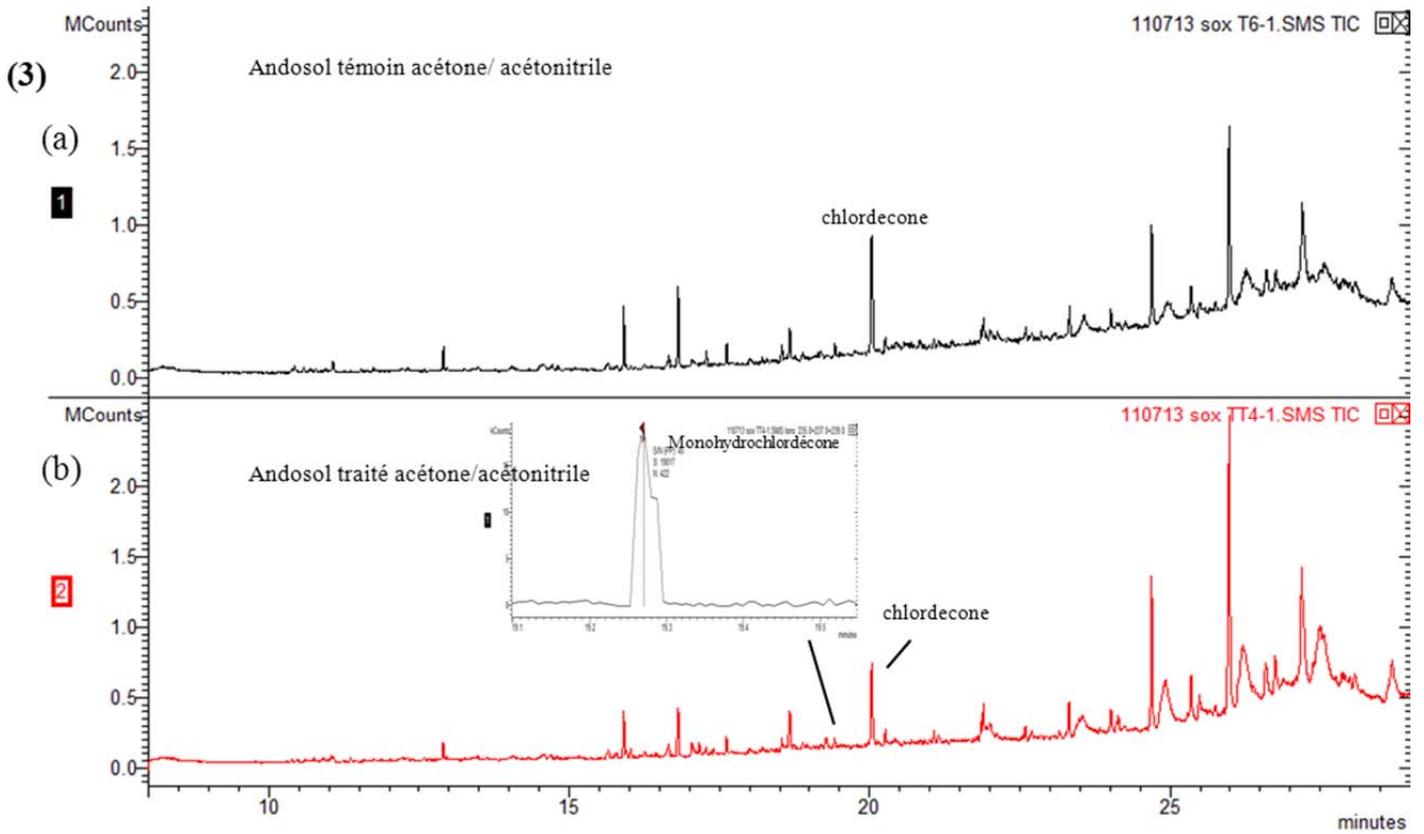
Annexe III : Chromatogrammes en GC-MS pour l'andosol extrait en triplicat à l'ASE pour (a) le témoin et (b) traité ISCR avec le mélange de solvant (3) acétone/ acétonitrile.



Annexe IV: Chromatogrammes en GC-MS pour l'andosol extrait au Soxtec pour (a) le témoin et (b) traité ISCR avec le mélange de solvant (1) acétone/hexane (2) acétone/dichlorométhane.



Annexe IV : Chromatogrammes en GC-MS pour l'andosol extrait au Soxtec pour (a) le témoin et (b) traité ISCR avec le mélange de solvant (3) acétone/ acétonitrile



Annexe 4

CNRS – ISM2 – AMU

CNRS-ISM2-AMU

Alain Archelas

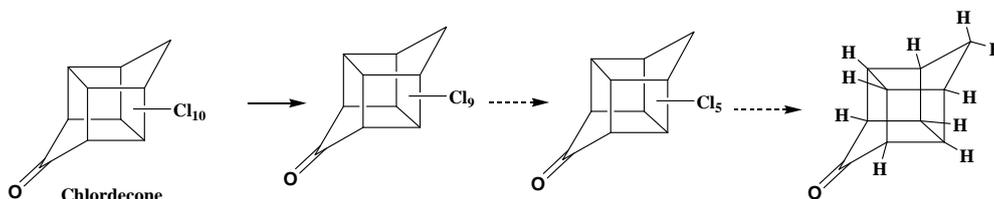
OBJECTIFS INITIAUX

1 - Trouver la structure de tous les composés pouvant être théoriquement générés par déchloration successive de la chlordecone pour les niveaux -1 à -4 Chlores.

2 - Attribuer un nom à chacun de ces composés selon la nomenclature IUPAC

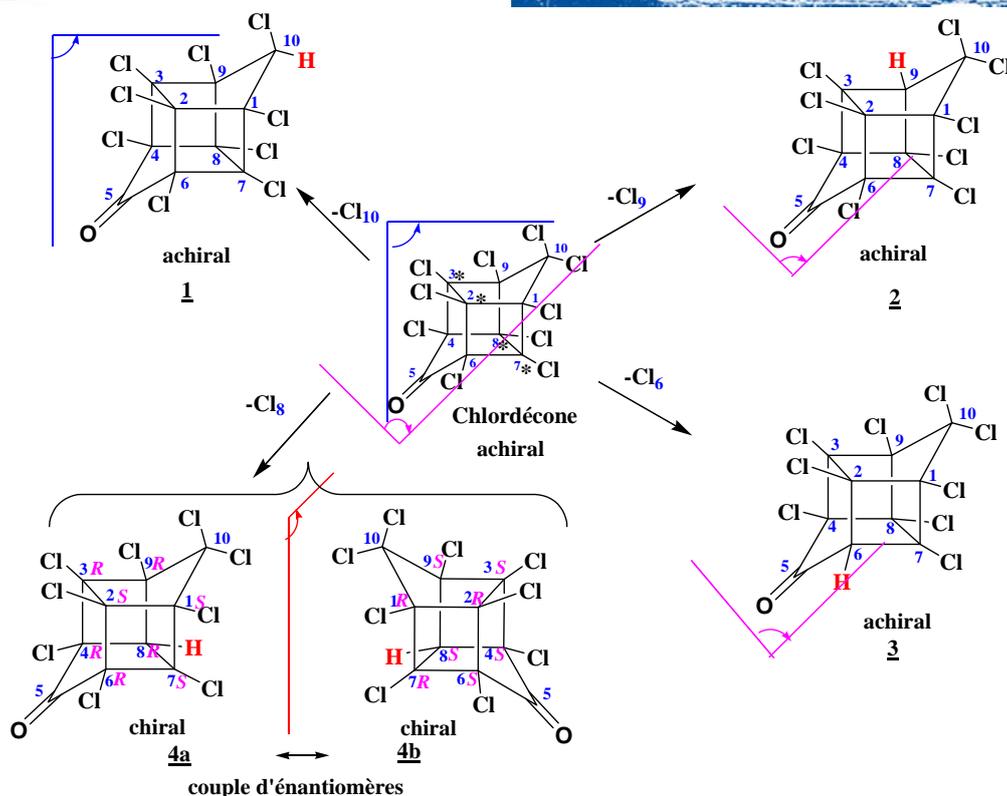
L'objectif de cette étude était de déterminer les structures des composés susceptibles d'être obtenus par déchloration microbiologique de la CLD. Dans un premier temps il était prévu de se limiter aux produits de déchloration de la CLD jusqu'à -4 atomes de Cl, degré de déchloration observé dans les analyses effectuées par le Brgm sur des extraits de "sols" traités par le procédé Daramend. Cependant, dans le cadre d'une publication en collaboration avec Hervé Macarié, Jan Dolfing et Igor Novak les structures jusqu'à déchloration totale de la CLD (-10Cl) ont été déterminées afin d'étudier d'un point de vue thermodynamique la stabilité de ces composés et la faisabilité de la déchloration microbiologique de la CLD (aérobie et anaérobie). D'autre part, la nomenclature CAS étant également très utilisé dans la littérature, il nous a semblé judicieux de construire une table contenant l'ensemble des structures des produits obtenus par déchloration successive avec le nom selon la nomenclature IUPAC mais également avec la nomenclature CAS en parallèle.

1 - DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE DES COMPOSÉS SUSCEPTIBLES D'ÊTRE OBTENUS PAR DÉCHLORATION SUCCESSIVE DE LA CLD (-1CL À -10CL).



La détermination de la structure des composés issus de la déchloration de la CLD (composés que l'on appellera congénères dans la suite du rapport) nécessite une analyse approfondie des éléments de symétrie pour chaque congénère. En effet, en fonction de la présence de centre et/ou de plan de symétrie les molécules pourront exister sous une forme achirale (composés méso) ou sous forme chirale impliquant l'existence de deux énantiomères.

Par exemple, la chlordécone bien que possédant quatre centres stéréogéniques (atomes marqués par une étoile dans le schéma ci-après) est achirale par la présence de deux plans de symétrie. Le remplacement d'un atome de chlore par un atome d'hydrogène sur la CLD peut ainsi conduire à **5 congénères** différents dont trois (**1**, **2**, **3**) sont achiraux (composés méso) et un composé chirale **4** qui existe sous la forme de deux énantiomères (**4a** et **4b**). Le remplacement d'un chlore par un H sur les autres positions conduit à un des produits déjà cités (axe de symétrie).



La même étude a été réalisée à partir des 5 congénères obtenus jusqu'à la déchloration complète de la CLD. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-après:

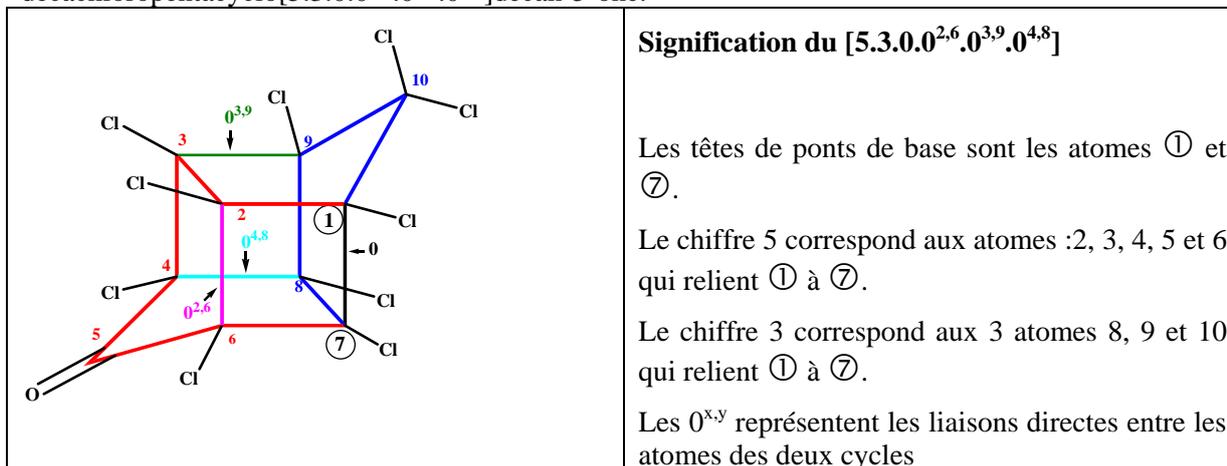
Déchloration	-0 Cl	-1 Cl	-2 Cl	-3 Cl	-4 Cl	-5 Cl	-6 Cl	-7 Cl	-8 Cl	-9 Cl	-10 Cl	Σ
Composé méso	1	3	7	12	15	18	15	12	7	3	1	94
Composé chiral (x2)	0	1 (2)	9 (18)	24 (48)	38 (76)	52 (104)	38 (76)	24 (48)	9 (18)	1 (2)	0	196 (392)
Composé méso & chiral	1	4	16	36	53	70	53	36	16	4	1	290
Composés méso & chiral x 2	1	5	25	60	91	122	91	60	25	5	1	486

Il apparaît donc que la déchloration séquentielle de la CLD serait susceptible de conduire à la formation de 485 congénères différents, dont 94 sont achiraux (méso, optiquement inactif) et 196 sont chiraux conduisant donc à $196 \times 2 = 392$ congénères optiquement actifs. D'un point de vue thermodynamique il est à noter que deux énantiomères ont des énergies de formation identiques.

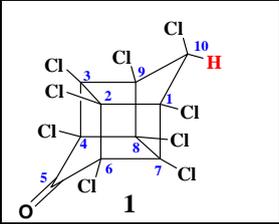
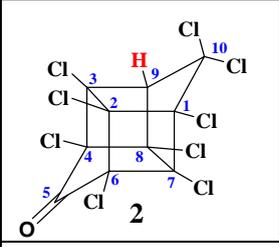
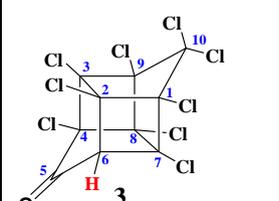
2 - APPLICATION DES NOMENCLATURES IUPAC ET CAS AUX COMPOSÉS ISSUS DE LA DÉCHLORATION DE LA CLD

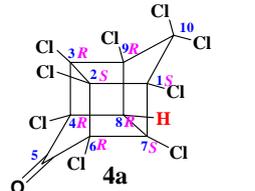
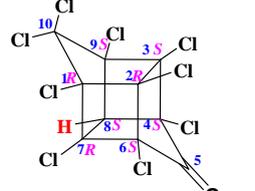
a) Nomenclature IUPAC

L'application de la nomenclature IUPAC à la CLD (voir Figure ci-après) conduit au décachloropentacyclo[5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]décan-5-one.



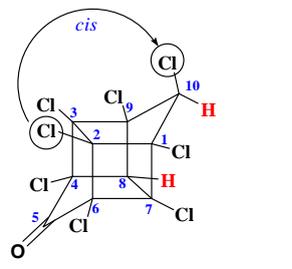
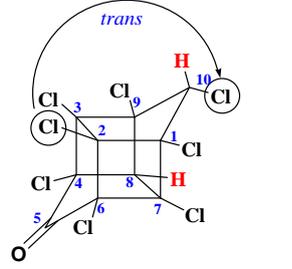
L'application de cette nomenclature aux congénères issus de la mono-déchloration de la CLD conduit aux noms suivants:

	<p>1,2,3,4,6,7,8,9,10-nonachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]decan-5-one</p>
	<p>1,2,3,4,6,7,8,10,10-nonachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]decan-5-one</p>
	<p>1,2,3,4,7,8,9,10,10-nonachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]decan-5-one</p>

 <p>4a</p>	<p>(1S,2S,3R,4R,6R,7S,8R,9R)-1,2,3,4,6,7,9,10,10-nonachloropentacyclo[5.3.0.02,6.03,9.04,8]decan-5-one</p>
 <p>4b</p>	<p>(1R,2R,3S,4S,6S,7R,8S,9S)-1,2,3,4,6,7,9,10,10-nonachloropentacyclo[5.3.0.02,6.03,9.04,8]decan-5-one</p>

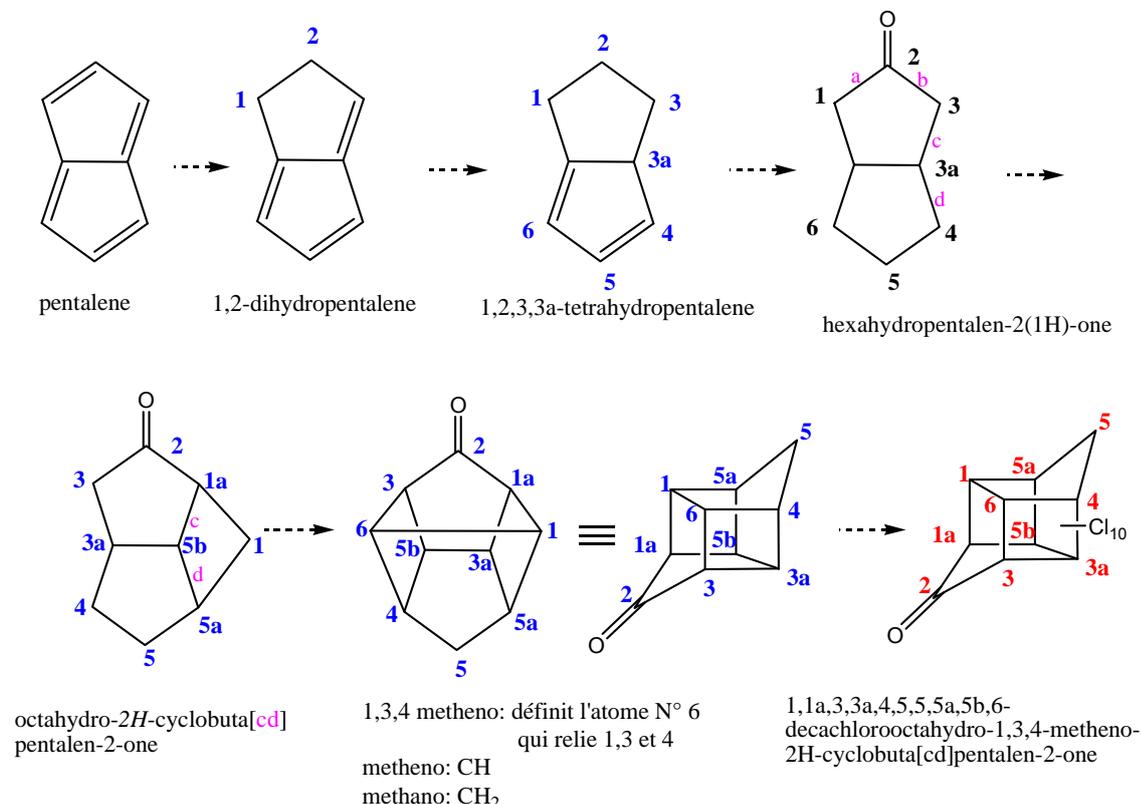
Le choix des positions 6, 8, 9 et 10, pour le remplacement d'un Chlore par un atome d'Hydrogène, est imposé par le système de numérotation (IUPAC ou CAS) qui doit conduire au nombre le plus faible après avoir enlevé les virgules entre les chiffres des substituants résiduels (*exemple: bien que le remplacement des atomes en position 1 et 9 conduise à la même molécule, rotation de 180° autour de l'axe de symétrie passant par C5 et C10, c'est la position 9 qui est privilégiée pour la déchloration car 12346781010 < 23467891010*)

Un problème de stéréochimie apparaît pour certains composés lorsqu'un des deux atomes de chlore, portés par l'atome de carbone 10, est remplacé par un hydrogène. Pour résoudre ce problème on utilise les stéréodescripteurs *cis* (*c*) et *trans* (*t*) en prenant pour référence (*r*) l'atome de chlore porté par le carbone 2 du cycle comme dans les exemples ci-après:

	<p>1,<i>r</i>-2,3,4,6,7,9,<i>c</i>-10-octachloropentacyclo [5.3.0.02,6.03,9.04,8]decan-5-one</p> <p><i>r</i>-2: l'atome de chlore 2 est pris comme référence</p> <p><i>c</i>-10: l'atome de chlore 10 est en <i>cis</i> (du même côté dans l'espace par rapport à l'atome de chlore 2)</p>
	<p>1,<i>r</i>-2,3,4,6,7,9,<i>t</i>-10-octachloropentacyclo [5.3.0.02,6.03,9.04,8]decan-5-one</p> <p><i>r</i>-2 : l'atome de chlore 2 est pris comme référence</p> <p><i>t</i>-10 : l'atome de chlore 10 est en <i>trans</i> (du côté opposé dans l'espace par rapport à l'atome de chlore 2)</p>

b) Nomenclature CAS

Cette nomenclature prend comme base le pentalène à partir duquel on construit la structure bishomocubane de la CLD. Une illustration de cette construction est représentée dans la figure ci-après, avec la numérotation spécifique de cette nomenclature.



L'application de la nomenclature IUPAC et CAS aux congénères obtenus par déchloration successive et totale de la CLD a conduit à la construction de la table ci-jointe (Table Chlordécone-Congénères.pdf) avec un numéro d'entrée, un dessin, et les noms IUPAC et CAS pour chaque congénère.

PUBLICATION

Jan Dolfing, Igor Novak, Alain Archelas, Hervé Macarie, Gibbs Free Energy of formation of chlordecone and potential degradation products: Implications for remediation strategies and environmental fate, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, sous presse.

Structure des composés par déchloration successive de la chlorédone et leur numéro selon les nomenclatures IUPAC et CAS ; extrait de l'article « Gibbs Free Energy of Formation of Chlordecone and Potential Degradation Products: Implications for Remediation Strategies and Environmental Fate » *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46, 8131–8139.

Structure des composés obtenables par déchloration successive de la chlurdécone et leur nom selon les nomenclatures IUPAC et CAS

Numérotation IUPAC		Numérotation CAS			
<p>Chlurdécone</p>		<p>Chlurdécone</p>			
Entry	- nCl	Structure ^a	IUPAC - Name	CAS - Name	Chirality
1	0		decachloropentacyclo[5.3.0.0 ^{2,5} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}]decan-5-one	1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6,6a,6b,7,7a,8,8a,9,9a,10,10a,11,11a,12,12a,13,13a,14,14a,15,15a,16,16a-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one	<i>meso</i>
2	1		1,2,3,4,6,7,8,9,10-nachloropentacyclo[5.3.0.0 ^{2,5} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}]decan-5-one	1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-nachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one	<i>meso</i>
3	1		1,2,3,4,7,8,10,10-nachloropentacyclo[5.3.0.0 ^{2,5} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}]decan-5-one	1,1a,3,3a,4,5,5b,6-nachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one	<i>meso</i>
4	1		1,2,3,4,7,8,9,10,10-nachloropentacyclo[5.3.0.0 ^{2,5} .0 ^{3,9} .0 ^{4,8}]decan-5-one	1,1a,3a,4,5,5a,5b,6-nachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one	<i>meso</i>

Annexe 5

Travail réalisé sur le projet Abachlor par IRD-IMBE-AMU-CAEC et ses partenaires

Travail réalisé sur le projet Abachlor
par IRD-IMBE-AMU-CAEC¹ et ses partenaires
NCU², CSU³, Cinvestav-IPN⁴ et Cirad-CAEC⁵

H. Macarie¹,
Y. Labrousse¹,
A. Amic¹



Jan Dolfing²



I. Novak³



A. Rojas⁴,
M. Campos⁴,
L.A. Torres⁴



Alain Soler⁵



¹ IRD : Institut de Recherche pour le Développement, IMBE : Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale ; AMU : Aix-Marseille Université ; CAEC : Campus Agro-environnemental Caraïbe (ex-PRAM)

² Newcastle University (Royaume-Uni)

³ Charles Sturt University (Australie)

⁴ Cinvestav-IPN : Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Mexique)

⁵ Cirad : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

Sommaire

I. Etude thermodynamique : Aspects théoriques et expérimentaux	Page 3
II. Biodégradation expérimentale de la chlordécone	Page 9
II.1. Suivi de digesteurs industriels	Page 9
II.2. Suivi d'un digesteur de laboratoire	Page 11
II.2.1. Matériel et méthodes.	Page 12
II.2.1.1. Description du dispositif expérimental.	Page 12
II.2.1.2. Inoculation du réacteur.	Page 13
II.2.1.3. Composition du milieu de culture.	Page 14
II.2.1.4. Conditions d'opération du réacteur.	Page 15
II.2.1.5. Paramètres suivis et méthodes analytiques.	Page 15
II.2.1.6. Sources des réactifs chimiques	Page 17.
II.2.2. Résultats et Discussion.	Page 17
II.2.2.1. Optimisation de la composition du milieu de culture et interférences avec la mesure colorimétrique des chlorures.	Page 17
II.2.2.1.1. Concentration en CLD	Page 17
II.2.2.1.2. Sources de carbone et de soufre et interférences avec la mesure colorimétrique des chlorures.	Page 18
II.2.2.2. Performance épuratoire du dispositif avant et après ajout de CLD.	Page 22
II.2.2.3. Abattement de CLD par le dispositif	Page 24
II.2.2.4. Production de chlorures par le dispositif.	Page 26
III. Bilan Publications et encadrement de stagiaires	Page 27
Annexe	Page 30

Remerciements : Les partenaires du projet Abachlor remercient l'INRA pour l'apport financier octroyé dans le cadre du programme Demichloré mis en place sur fonds PNAC. Les producteurs de Rhum dont les méthaniseurs ont été échantillonnés sont aussi remerciés pour avoir permis l'accès à leurs installations de traitement de vinasses et avoir fourni l'inoculum du réacteur de laboratoire. Nous sommes reconnaissant à Didier Siri, Professeur de chimie théorique à Aix-Marseille Université, de nous avoir facilité l'accès aux capacités de calcul du crmm pour l'étude théorique de thermodynamique.

I. Etude thermodynamique : Aspects théoriques et expérimentaux

Le détail des méthodes de calcul utilisées ainsi que la totalité des résultats de la phase théorique de l'étude thermodynamique sont disponibles dans l'article joint en annexe publié en 2012 dans la revue « Environmental Science and Technology »⁶. Seul les points forts de l'étude et de la discussion seront donc présentés dans le présent rapport.

Jusqu'à présent la molécule de chlordécone (CLD) est considérée par la communauté scientifique française comme étant réfractaire à toute biodégradation microbienne. Cette affirmation est basée sur sa structure chimique particulière en forme de cage et son fort encombrement stérique dû aux 10 atomes de chlore qui lui confère des propriétés physicochimiques particulières (faible solubilité, forte hydrophobicité) la rendant moins disponible aux microorganismes et ne facilitant pas l'accès de leurs enzymes à la chaîne carbonée. Avant toute chose, nous avons cherché à savoir si l'absence apparente de biodégradation de cette molécule dans les environnements antillais n'était pas le résultat d'un blocage thermodynamique lié à cette structure. Si c'était le cas, cela voudrait dire en effet que des microorganismes susceptibles de l'attaquer ne pourraient exister puisque les réactions de transformation de cette molécule ne seraient pas possibles et qu'il serait donc vain d'essayer de les isoler pour faire de la bioaugmentation ou d'essayer de stimuler leur activité dans les environnements contaminés où ils auraient pu être naturellement présents.

Pour répondre à cette question, nous avons donc calculé la variation d'énergie libre de Gibbs des réactions théoriques de déchloration partielle et totale (arrachage d'1, 2, 3... à 10 chlores) de la chlordécone, de sa minéralisation ultime dans différentes conditions rédox (aérobiose, réduction du fer ferrique, dénitrification, sulfato-réduction, méthanogénèse) ainsi que de la réduction (formation de chlordécol) ou oxydation (formation de chlordécone lactone) de sa fonction cétone (Figure 1) sans oublier de possibles voies de transformation par fermentation⁷. Pour arriver à cela il nous a fallu :

- Trouver la structure de tous les isomères pouvant être générés lors de la déchloration de la CLD (tableau word maintenant disponible avec la structure et les noms IUPAC et CAS des 484 dérivés possibles dont 196 couples d'énantiomères. Les 2 molécules de chaque couple d'énantiomères correspondent à l'image non superposable de l'autre dans un miroir et ont la même énergie libre de Gibbs de formation ou ΔG_f°) (**travail d'Alain Archelas CNRS-ISM2-AMU voir rapport correspondant**)
- Estimer les ΔG_f° de la chlordécone et de ses dérivés à l'état gazeux et aqueux qui n'étaient pas disponibles dans la littérature au moyen de calculs *ab initio* de chimie théorique en utilisant la méthode G3(MP2)/B3LYP implémentée dans le programme Gaussian® (calcul fait pour la chlordécone, 62 dérivés déchlorés ainsi que pour le chlordécol et la chlordécone lactone) (**travail d'Igor Novak**)

Les calculs qui ont pu être réalisés avec ces valeurs (**travail de Jan Dolfin et Hervé Macarie**) ont montré que (Tableaux 1 et 2) :

- Toutes les réactions envisagées (déchloration, réduction ou oxydation de la fonction cétone, minéralisation ultime, fermentation) sont thermodynamiquement favorables ($\Delta G_{\text{réaction}}^\circ$ largement négatifs) tant dans les conditions standards ([réactifs et

⁶ Dolfin, J.; Novak, I.; Archelas, A.; Macarie, H. Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 8131-8139.

⁷ par exemple : $2 \text{ CLD} + 24 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 7 \text{ acétate} + 27 \text{ H}^+ + 20 \text{ Cl}^-$

produits] = 1 M et Pression des gaz = 1 atm) que *in situ* (concentrations et pression environnementales des produits et réactifs).

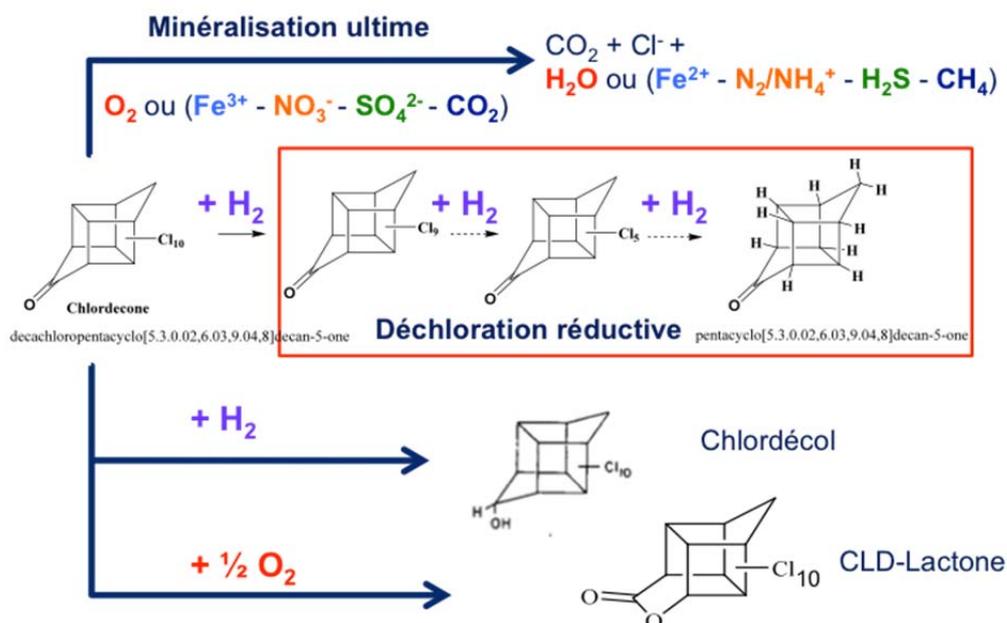


Figure 1. Différentes réactions de transformation de la CLD envisageables.

Tableau 1. ΔG° des réactions de transformation de la CLD et de certains de ses produits de dégradation.

Réaction	ΔG° kJ/réaction
$CLD + H_2 \rightarrow monohydro-CLD + H^+ + Cl^-$	[-158.4 ; -155.5]
$monohydro-CLD + H_2 \rightarrow dihydro-CLD + H^+ + Cl^-$	[-165.3 ; -142.1]
$CLD + 10 H_2 \rightarrow decahydro-CLD + 10 H^+ + 10 Cl^-$	-1448.1
$CLD + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow CLD-lactone$	-147.6
$CLD + H_2 \rightarrow Chlordécol$	-70.1
$C_{10}Cl_{10}O + 5 H_2O + 7 O_2 \rightarrow 10 CO_2 + 10 H^+ + 10 Cl^-$	-4377
$C_{10}Cl_{10}O + 19 H_2O + 28 Fe^{3+} \rightarrow 10 CO_2 + 38 H^+ + 10 Cl^- + 28 Fe^{2+}$	-4252
$C_{10}Cl_{10}O + 5 H_2O + 14 NO_3^- \rightarrow 10 CO_2 + 10 H^+ + 10 Cl^- + 14 NO_2^-$	-3339
$5 C_{10}Cl_{10}O + 11 H_2O + 28 NO_3^- \rightarrow 50 CO_2 + 22 H^+ + 50 Cl^- + 14 N_2$	-4195
$2 C_{10}Cl_{10}O + 7 SO_4^{2-} + 10 H_2O \rightarrow 20 CO_2 + 13 H^+ + 20 Cl^- + 7 HS^-$	-1589
$2 C_{10}Cl_{10}O + 24 H_2O \rightarrow 13 CO_2 + 20 H^+ + 20 Cl^- + 7 CH_4$	-1514

- La déchloration même d'un seul chlore ainsi que les réactions de réduction et d'oxydation de la fonction cétone libèrent déjà suffisamment d'énergie pour permettre la synthèse d'ATP et donc la croissance microbienne.

- La CLD et ses dérivés moins chlorés sont des accepteurs d'électrons comparables aux autres organochlorés (chlorophénols, chloroéthylène, etc)⁸ et aussi fort que les nitrates puisque leur potentiel redox (E_o') sont du même ordre de grandeur : E_o' de +336 à +413 mV pour les couples redox CLD/monohydro-CLD et CLD/decahydro-CLD contre +360 mV pour le couple $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ et +421 mV pour $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$.

Tableau 2. Comparaison du potentiel (E_o')* des couples $\text{C}_{10}\text{Cl}_n\text{H}_{(10-n)}\text{O} / \text{C}_{10}\text{Cl}_{(n-1)}\text{H}_{(11-n)}\text{O}$ avec ceux des principaux accepteurs d'électron de l'environnement.

Demi réaction redox	E_o' mV
$\frac{1}{2} \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \Rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+816
$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$	+771
$\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \Rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+421
$\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O} + 2 \text{e}^- + 1 \text{H}^+ \Rightarrow \text{C}_{10}\text{Cl}_9\text{HO} + \text{Cl}^-$	+392 à +413
$\text{NO}_3^- + 10 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \Rightarrow \text{NH}_4^+ + 3 \text{H}_2\text{O}$	+340
$\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O} + 20\text{e}^- + 10\text{H}^+ \Rightarrow \text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O} + 10 \text{Cl}^-$	+336
$\text{SO}_4^{2-} + 10 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \Rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{H}_2\text{O}^+$	-210
$\text{CO}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-240
$2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \Rightarrow \text{H}_2$	-414
$\text{Fe}^{2+} + 2 \text{e}^- \Rightarrow \text{Fe}^{0-}$	-440

*pH 7, 25°C

- La déchloration de la CLD est thermodynamiquement plus favorable que la réduction de la fonction cétone. Cela veut dire que dans les environnements naturels où les équivalents réducteurs (H_2) nécessaires à ces deux réactions sont en quantité limitée, elles seront en concurrence pour ces derniers et que la déchloration devrait avoir lieu préférentiellement à la formation du chlordécol. Il est possible toutefois afin de maximiser la récupération d'énergie que des microorganismes soient à la fois capables de déchlorer la CLD et de réduire sa fonction cétone. Ceci est supporté par les intermédiaires rapportés dans la littérature⁹ lors d'essais de déchloration avec la vitamine $\text{B}_{12\text{s}}$ bien que dans ce cas, la formation des alcools comme artefacts analytiques¹⁰ ne puissent être complètement exclue. Il est possible également d'envisager que dans certains écosystèmes les microorganismes présents n'aient que la capacité de transformer la chlordécone en alcool.

Les dérivés ayant perdu 1 ou 2 chlores dont la production libère le plus d'énergie ont pu être identifiés (Tableau 3). Ces composés devraient donc être formés préférentiellement lors d'attaque microbienne et devraient correspondre aux molécules qu'il faudrait essayer de synthétiser en priorité pour arriver à les détecter et les doser dans l'environnement. Ces conclusions doivent toutefois être relativisées étant donné que les différences de ΔG° réaction

⁸ Dolfing, J. Thermodynamic considerations for dehalogenation. In *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*; Häggblom M. M., Bossert, I. D., Eds.; Kluwer: Boston, MA, 2003; pp. 89-114.

⁹ Schrauzer, G. N.; Katz, R. N. Reductive dechlorination and degradation of Mirex and Kepone with vitamin $\text{B}_{12\text{s}}$. *Bioinorg. Chem.* 1978, 9 (2), 123-143.

¹⁰ Soine, W. H.; Forrest, T. T.; Smith, J. D.; Thermal reduction of chlordecone in the presence of alcohol. *J. Chromatogr.* 1983, 281, 95-99.

observée pour les différents isomères (de 0,4 à 7,3 kJ/réaction) sont souvent plus faibles que l'incertitude sur les valeurs estimées de ΔG_f° (4-8 kJ/mole). Malgré cela, c'est bien la 8-monohydro-CLD, seule monohydro-CLD à avoir été détectée dans l'environnement et à être apparemment formée par photolyse ou attaque microbienne aérobie de la CLD, qui sur les 4 monohydro-CLD possibles est apparue comme étant celle dont la formation par déchloration de la CLD est thermodynamiquement la plus favorable. Les dihydro-CLD obtenues par photoréaction ou par réaction avec la vitamine B_{12S} n'arrivent par contre qu'en 3^{ème} et 5^{ème} position des dihydro-CLD dont la formation par déchloration de la 8-monohydro-CLD serait thermodynamiquement la plus favorable. Cela montre les limites d'une telle approche thermodynamique qui ne prend en compte ni la cinétique des réactions ni l'énergie d'activation par lesquelles ces dernières doivent passer. A états énergétiques initiaux et finaux identiques (même $\Delta G^\circ_{\text{réactions}}$), c'est en effet la réaction dont l'énergie d'activation sera la plus faible qui aura le plus de chance d'avoir lieu. Le calcul des énergies d'activation est théoriquement possible pour chaque isomère, mais il suppose de connaître les mécanismes réactionnels mis en œuvre au cours des réactions.

Tableau 3. ΔG° des différentes réactions de déchloration de la CLD jusqu'à l'arrachage de 2 chlores (Les composés en rouge sont ceux dont les réactions de formation sont thermodynamiquement les plus favorables, Les composés en jaune sont ceux qui ont été détectés par Schrauzer & Katz (1978)⁸ par réaction avec la vitamine B_{12S})*.

Original compound	monohydro-CLD	ΔG° kJ/mol	dihydro-CLD	ΔG° kJ/mol
Chlordecone	8-monohydro-CLD*	-159.7	6,7-dihydro-CLD*	-161.1
			6,8-dihydro-CLD*	-160.4
			3,7-dihydro-CLD*	-159.5
			8,9-dihydro-CLD*	-158.6
			cis-8,10-dihydro-CLD*	-157.6
			trans-8,10-dihydro-CLD*	-156.8
			7,9-dihydro-CLD*	-155.3
			7,8-dihydro-CLD	-153.7
			3,8-dihydro-CLD	-142.1
			9-monohydro-CLD	-159.3
			4,9-dihydro-CLD	-159.3
			8,9-dihydro-CLD*	-159.0
			9,10-dihydro-CLD*	-156.3
			7,9-dihydro-CLD*	-155.7
			1,9-dihydro-CLD	-155.4
	10-monohydro-CLD	-158.4	6,10-dihydro-CLD*	-161.1
			cis-8,10-dihydro-CLD*	-158.9
			trans-8,10-dihydro-CLD*	-158.1
			9,10-dihydro-CLD*	-157.2
			10,10-dihydro-CLD	-150.1
	6-monohydro-CLD	-155.5	6,7-dihydro-CLD*	-165.3
			6,8-dihydro-CLD*	-164.6
			6,10-dihydro-CLD*	-164.0
			6,9-dihydro-CLD	-164.0
			4,6-dihydro-CLD	-163.9
			4,9-dihydro-CLD	-163.1

*Les ΔG° ont été calculés pour les réactions $C_{10}Cl_nH_{(10-n)}O + H_2 \Rightarrow C_{10}Cl_{(n-1)}H_{(11-n)}O + Cl^- + H^+$

Les limites de l'approche thermodynamique apparaissent également en ce qui concerne la formation de la CLD-lactone. Bien que comme mentionné ci-dessus, la formation de cette

dernière soit thermodynamiquement favorable et que l'oxydation de la fonction cétone de la décone (CLD complètement déchlorée) en lactone ait été obtenu par voie chimique¹¹ ou encore que l'oxydation en lactone de fonctions cétones portées par des carbones impliqués dans d'autres type de structures cycliques énergétiquement aussi contraintes que les cubanes ait été observé par voie biologique¹², ce n'est par contre pas le cas pour des cétones dont les carbones adjacents portent des chlores. Cela suggère par conséquent que la formation d'une lactone à partir de la CLD ne pourra avoir lieu qu'à la condition qu'au moins l'un des chlores portés par les carbones 4 et 6 (numération IUPAC) et qui doivent gêner l'action des monooxygénases de type Baeyer-Villiger responsables de telles réactions n'ait été éliminé.

Les potentiels d'oxydo-réduction calculés pour la CLD et ses produits déchlorés permettent de suggérer une explication à l'absence apparente de dégradation de la CLD dans les sols et les eaux souterraines des Antilles. Bien que tous ces composés apparaissent en effet comme des accepteurs d'électrons aussi fort que les nitrates, ils sont par contre bien plus faibles qu' O_2 ($E_o' O_2/H_2O = +816$ mV) ou Fe^{3+} ($E_o' Fe^{3+}/Fe^{2+} = +771$ mV) (Tableau 2). Cela implique que la déchloration réductive de la CLD devrait être rare sinon impossible en aérobiose ainsi que dans des environnements où l'accepteur d'électron dominant est le fer ferrique, deux conditions qui correspondent à celles de la plupart des sols antillais où la CLD a été épanchée. Ces sols qui sont pour la plupart du type andosol, nitisol ou ferralsol ont en effet la particularité d'être riches en fer ferrique mais surtout d'être très drainant, une caractéristique indispensable à la culture de la banane et qui les rends bien aérés. Le même constat peut être fait pour les eaux souterraines qui contiennent en moyenne $2,7 \pm 0,9$ mg O_2 dissous/l¹³. A cela s'ajoute dans leur cas un contenu moyen en carbone organique d'à peine $1,4 \pm 0,6$ mg/l, quantité trop faible pour pouvoir jouer le rôle de donneur d'électrons indispensable à l'arrachage des chlores. La déchloration réductive de la CLD devrait par contre pouvoir avoir lieu dans des écosystèmes antillais dominés par des accepteurs d'électrons moins fort que cette dernière comme sont les sulfates ($E_o' SO_4^{2-}/H_2S = -210$ mV) ou le CO_2 ($E_o' CO_2/CH_4 = -240$ mV ; conditions méthanogéniques). De tels écosystèmes correspondent aux sédiments d'environnements qui sont submergés de façon intermittente (mangroves, marécages d'eau douce comme la forêt à *Pterocarpus officinalis*¹⁴) ou de façon permanente (sédiments marins, lacustres) mais aussi à des écosystèmes créés par l'homme tels que les digesteurs anaérobies de vinasses de distillerie ou de la fraction organique des ordures ménagères.

En parallèle aux aspects thermodynamiques, nous avons également estimée l'évolution de la solubilité des dérivés déchlorés de la CLD au moyen du modèle SPARC développé par l'US EPA¹⁵ qui était gratuit et facile d'utilisation à travers une interface en ligne au moment de la réalisation des calculs¹⁶ mais surtout reconnu comme donnant de bonnes estimations¹⁴. Le calcul de la solubilité des composés organiques par ce modèle nécessite normalement de connaître leur température de fusion. Il existe toutefois une option qui permet de ne pas en tenir compte, mais elle est normalement réservée aux composés qui

¹¹ Metha, G. ; Pandey, P.N. ; Ho, T.-L. Regiospecific Baeyer-Villiger oxidation of polycyclic ketones with ceric ion. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41 (6), 953-956.

¹² Selifonov, S. A. Microbial oxidation of adamantanone by *Pseudomonas putida* carrying the camphor catabolic plasmid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, 186 (3), 1429-1436.

¹³ Gourcy, L.; Baran, N.; Vittecoq, B. Improving the knowledge of pesticide and nitrate transfer processes using age-dating tools (CFC, SF₆, ³H) in a volcanic island (Martinique, French West Indies). *J. Contam. Hydrol.* **2009**, 108, 107-117.

¹⁴ Imbert, D.; Delbé, L. Ecology of fire-influenced *Cladium jamaicense* marshes in Guadeloupe, lesser Antilles. *Wetlands*, **2006**, 26, 289-297.

¹⁵ Hilal, S. H.; Karckhoff, S. W.; Carreira, L. A. Prediction of the solubility, activity coefficient and liquid/liquid partition coefficient of organic compounds. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, 23, 709-720

¹⁶ <http://archemcalc.com/sparc/test/login.cfm?CFID=257742&CFTOKEN=90531612>

ne sont pas solides à 25°C ce qui n'est pas le cas de la CLD et probablement de la plupart de ses dérivés. Dans la mesure où tous les calculs sont effectués avec cette option, on peut toutefois considérer que les résultats obtenus donneront au moins la tendance de l'évolution de la solubilité relative des composés entre eux. Comme il fallait s'y attendre au vu de ce qui se passe avec les autres organochlorés, les résultats obtenus montrent que la solubilité des produits de déchloration de la CLD devrait augmenter à mesure que le nombre de chlores portés par la cage bishomocubane diminue. La decahydro-CLD serait en effet 75000 fois plus soluble dans l'eau (calcul basé sur la solubilité en mole/l) que la CLD. Cette solubilité accrue suggère que les produits de déchloration de la CLD seront plus mobiles dans l'environnement qu'elle-même. Cela explique probablement par exemple pourquoi le rapport [8-monohydro-CLD]/[CLD] est toujours plus élevé dans les plantes que dans les sols où elles sont cultivées. Si la 8-monohydro-CLD est en effet plus soluble que la CLD, il est logique qu'elle soit véhiculée plus facilement que cette dernière à l'intérieur des végétaux par la sève. Le problème est qu'une augmentation de la mobilité pourrait être dangereuse étant donné que les intermédiaires de déchloration peuvent parfois se révéler plus toxiques que les molécules de départ. C'est le cas par exemple du chlorure de vinyle beaucoup plus toxique que le tétra- et le trichloréthylène dont il est issu. Les deux articles disponibles dans la littérature dans lesquels la toxicité de quelques produits de transformation de la chlordécone¹⁷ a pu être testé montrent toutefois que cette dernière évolue dans l'ordre « toxicité du chlordécol ≥ chlordécone > 8-monohydro-CLD >> 3,7-dihydro-CLD »^{18,19}, ce qui suggère que la toxicité des dérivés devrait diminuer et non augmenter avec le nombre de chlore.

La plupart des résultats et conclusions présentées ci-dessus sont basés sur des valeurs estimées de ΔG_f° . La validation de la méthode de calcul utilisée pour estimer ces valeurs se fait généralement par comparaison entre les enthalpies de formation (ΔH_f°) calculées en même temps que les ΔG_f° et les ΔH_f° de quelques molécules de la même famille mesurées expérimentalement par calorimétrie. Aucun ΔH_f° expérimental n'étant disponible dans la littérature pour les bishomocubanes, notre méthode de calcul n'a donc pu être validée que par comparaison avec les ΔH_f° expérimentaux du cubane et du diméthyl 1,4-cubanedicarboxylate. Afin de donner plus de forces à nos résultats et aux conclusions que nous en avons tirés, l'idéal serait toutefois de disposer de la valeur expérimentale du ΔH_f° de la CLD et si possible au moins d'un autre bishomocubane comme le mirex. Au cours de l'année 2011 après avoir contacté plusieurs équipes dans le monde, une collaboration a finalement pu être établie avec le groupe des Dr. Aaron Rojas Aguilar et Luis Alfonso Torres Gómez du Département de Chimie du Cinvestav-IPN au Mexique²⁰ qui sont spécialistes de ce genre de détermination. L'obtention des ΔH_f° de la CLD et du mirex à l'état gazeux et aqueux se fait de façon indirecte par la mesure de l'enthalpie de combustion des composés à l'état solide ainsi que de leurs enthalpies de sublimation et de solvation comme expliqué ci-dessous pour la chlordécone :



$$\Delta H_f^\circ \text{ CLD}_{\text{solide}} = 10 \Delta H_f^\circ \text{ CO}_2 + 10 \Delta H_f^\circ \text{ HCl} - 7 \Delta H_f^\circ \text{ O}_2 - 5 \Delta H_f^\circ \text{ H}_2\text{O} - \Delta H^\circ_{\text{combustion}}$$

¹⁷ Produits de déchloration synthétisés par photolyse de la CLD par l'US EPA dans les années 1970 et qui ne sont plus disponibles aujourd'hui.

¹⁸ Carver, R. A.; Griffith, F. D. Determination of Kepone dechlorination products in finfish, oysters and crustaceans. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27 (5), 1035-1037.

¹⁹ Soileau, S. D.; Moreland, D. F. Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1983**, 67, 89-99.

²⁰ <http://www.quimica.cinvestav.mx/Líneasdeinvestigación/Fisicoquímica.aspx>

$$\Delta H_f^\circ \text{ CLD}_{\text{gaz}} = \Delta H^\circ_{\text{sublimation}} + \Delta H_f^\circ \text{ CLD}_{\text{solide}}$$

$$\Delta H_f^\circ \text{ CLD}_{\text{aqueux}} = \Delta H^\circ_{\text{solvation}} + \Delta H_f^\circ \text{ CLD}_{\text{solide}}$$

Les travaux réalisés jusqu'à présent sur cette partie expérimentale ont consisté tout d'abord à caractériser thermiquement au moyen de la calorimétrie différentielle à balayage la pureté des standards de chlordécone et de mirex disponibles commercialement. Les résultats obtenus ont montré que la pureté du mirex (99,88% en masse) était suffisante pour une détermination directe des enthalpies de combustion, de sublimation et de solvation mais pas celle de la chlordécone (pureté de 96,8% en masse) qui a donc dû être repurifiée avant d'aller plus loin. A ce jour, seules les enthalpies de fusion et de sublimation des deux composés ont pu être déterminées (Tableau 4). Elles restent toutefois à convertir à 25°C.

Tableau 4. Valeurs expérimentales de la température de fusion, de la pureté et des enthalpies de fusion et de sublimation de la CLD et du mirex.

Paramètre	Méthode	Mirex	CLD
Température de fusion (°C)	CDB*	123	Pas de température de fusion, sublime
Pureté produit commercial (% p/p)	CDB	99,9	96,8
ΔH_{fusion} (kJ/mole)	CDB	5.5-6.2	Impossible à déterminer car l'échantillon sublime
$\Delta H_{\text{sublimation}}$ (kJ/mole)	Thermogravimétrie	98.7±2 (à 433.15 K)	112.5±3 (à 408.15 K)

*Calorimétrie différentielle à Balayage ; p : poids

II. Biodégradation expérimentale de la chlordécone

II.1. Suivi de digesteurs industriels

Parmi tous les agents microbiens susceptibles d'attaquer la chlordécone, la littérature suggère que les *Archaea* méthanogènes pourraient être de bons candidats^{21,22}. Plusieurs distilleries de rhum dans les Antilles françaises traitent leur vinasse par méthanisation. Ces distilleries peuvent être amenées à utiliser des cannes cultivées sur des sols contaminées et donc à recevoir une certaine charge de chlordécone qui pourrait se retrouver dans leur vinasse. Des prélèvements ont donc été réalisés lors des campagnes 2010 et 2011 à l'entrée et à la sortie de méthaniseurs traitant les vinasses de deux distilleries ainsi que dans les boues biologiques (populations de procaryotes réalisant la dégradation de la matière organique polluante jusqu'au méthane) qu'ils contiennent. Les résultats obtenus (analyses faites en parallèle au LDA26²³ et au BRGM²⁴) montrent (Tableau 5 et Fig. 2) que malgré des différences énormes de concentration mesurée d'un laboratoire à l'autre :

²¹Jablonski, P. E.; Pheasant, D. J.; Ferry, J. G. Conversion of Kepone by *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *139* (2-3), 169-173.

²²Andrade ; P. S. L. ; Wheeler, W. B. ; Carlson, D. A. Identification of a mirex metabolite. *Bulletin Environ. Cont. Toxicol.*, **1975**, *14*, 473-479

²³Laboratoire Départemental d'Analyse de la Drôme. Mesures effectuées sur les MES récupérés par filtration et la phase liquide filtrée. La CLD des MES a été extraite à l'ASE et celle de la phase liquide par extraction liquide/liquide. L'identification et la quantification de la CLD ont été réalisés par LC/MS.

²⁴Extraction liquide/liquide des échantillons et identification et quantification de la CLD par GC/MSMS

- 53 à 91% de la chlordécone détectée dans les vinasses en entrée des méthaniseurs n'est pas retrouvée en sortie
- La chlordécone-5b-hydro²⁵ détectée en entrée ne l'est plus en sortie
- Les concentrations de CLD et CLD-5b-hydro détectées dans les boues sont très inférieures à celles qu'on devrait y retrouver si ces deux composés n'étaient éliminés que de façon physique dans les réacteurs par adsorption sur les boues biologiques.

Tableau 5. Conditions d'opération des méthaniseurs et bilan de matière de CLD et CLD-5b-hydro sur ces systèmes

Paramètre	Méthaniseur	
	FAFD*	UASB*
Conditions d'opération et performances épuratoires des réacteurs		
[DCO*] des vinasses traitées (g/L)	20	29
Temps de rétention hydraulique (jours)	5,7	2,4-3,2
Charge volumique (kg DCO/m ³ réacteur.jour)	3,5	9-12
DCO _{éliminée} (%)	92,5	78
Devenir de la CLD et de la CLD-5b-hydro dans les réacteurs		
[CLD] entrée (µg/l)	0,77 - 7,5	0,29 - 0,99
[CLD] sortie (µg/l)	0,28 - 0,77	0,04 - 0,29
Elimination CLD (%)	62 - 89,8	53,6 - 91,4
[CLD] boue mesurée (µg/kg MES*)	48 - 362	< 10 - 158
[CLD] boue théorique si absence dégradation (µg/kg MES)	103 - 1640	86 - 1287
[CLD-5b-hydro] entrée (µg/l)	0,07 - 0,34	0,018 - <0.225
[CLD-5b-hydro] sortie (µg/l)	< LQ*	< LQ
Elimination CLD-5b-hydro (%)	≥ 61,6 - 86,7	≥ 23,2
[CLD-5b-hydro] boue mesurée (µg/kg MES)	< LQ	< LQ
[CLD-5b-hydro] boue théorique si absence dégradation (µg/kg MES)	12 - 73	≤ 11 - 416

*FAFD : Filtre Anaérobie à Flux descendant, UASB : Upflow Anaerobic Sludge Blanket, DCO : Demande Chimique en Oxygène, MES : Matières En Suspension, LQ : Limite de Quantification

Ces mesures correspondent à un élément de plus suggérant que les environnements méthanogènes semblent propices à la dégradation de la CLD et de ses dérivés moins chlorés. Aucun des intermédiaires formés au cours du procédé de remédiation ISCR-DARAMEND testé par le BRGM sur les sols antillais n'a par contre pu être détecté par GC-MS dans les échantillons d'entrée et de sortie des méthaniseurs. Cela pourrait indiquer qu'ils ne sont pas produits mais pourrait tout aussi bien être du au fait qu'ils le sont mais en concentration trop faibles pour être détectée dans une matrice ayant une composition organique et inorganique aussi complexe que celles des vinasses (par exemple concentration en DCO²⁶ supérieure ou égale à 20 g/L) et ne simplifiant donc pas les aspects analytiques. Les vinasses échantillonnées ont aussi été analysées au CAEC par

²⁵Nom commercial basé sur la nomenclature CAS de la 8-monohydro-CLD et seul produit de transformation de la CLD en plus du chlordécol pour lequel un standard analytique est disponible.

²⁶ DCO : Demande Chimique en Oxygène

SPME-GC/MS²⁷, mais les résultats obtenus n'ont pas été exploitables. Ces résultats ont été présentés au 13^{ème} congrès mondial de Digestion anaérobie en Espagne en juin 2013.

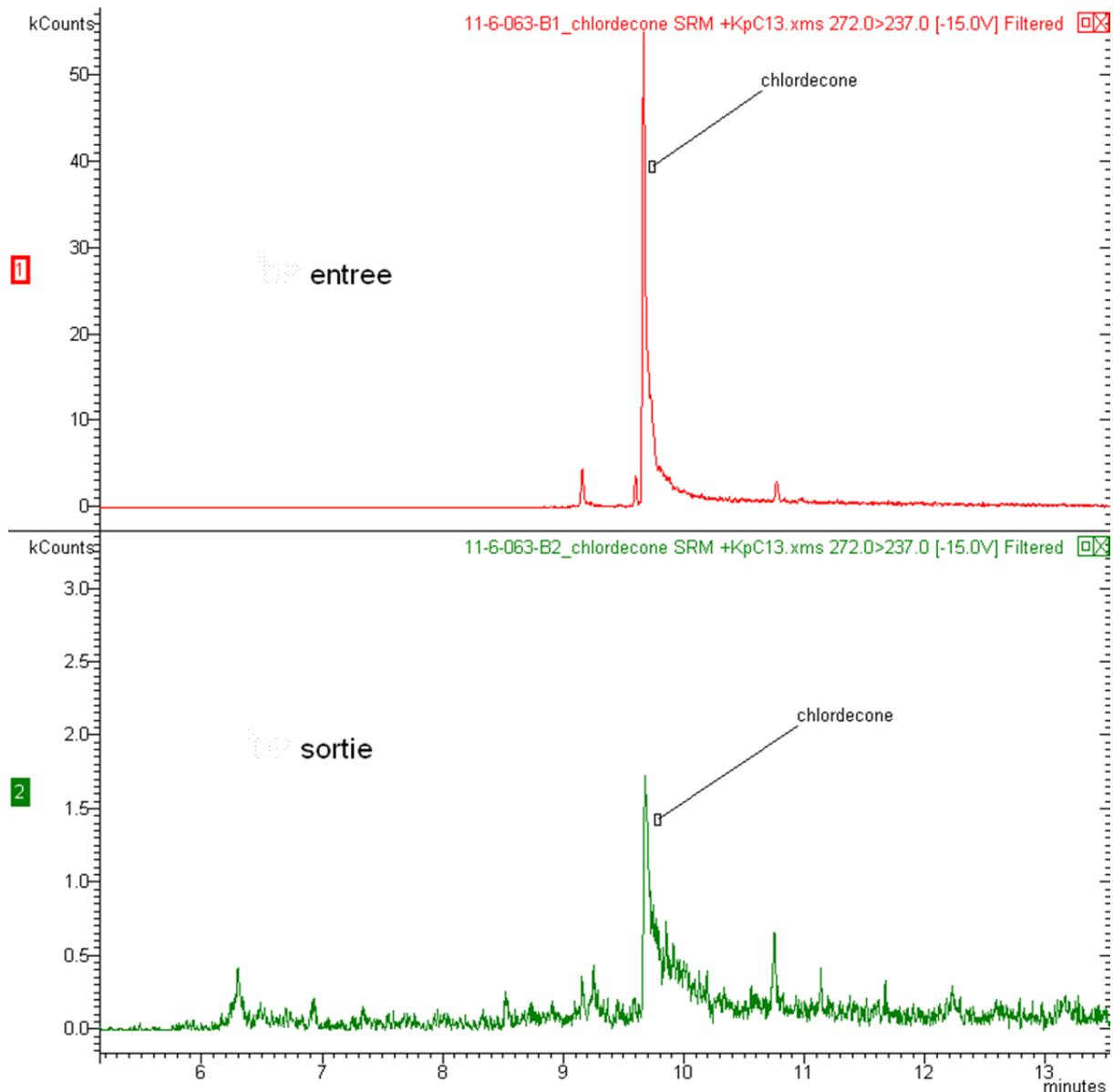


Figure 2. Chromatogrammes GC/MSMS de la CLD (transition 272>237) à l'entrée et sortie du méthaniseur FAFD (temps de rétention de la chlordécone : 9.7 et chlordécone-5b-hydro à 9.1 min) (analyses effectuées au BRGM par Sébastien Bristeau)

II.2. Suivi d'un digesteur de laboratoire

La dernière partie du travail réalisée dans le cadre du projet Abachlor a consisté à mettre en place à l'échelle du laboratoire un petit méthaniseur dont les conditions d'opération pouvaient être contrôlées en terme de temps de rétention hydraulique et de charge organique et à l'alimenter avec une eau usée synthétique de composition connue et dénuée

²⁷ SPME = Solide Phase Micro Extraction

de chlorures c'est à dire avec une matrice analytique simplifiée par rapport aux vinasses de façon à pouvoir:

- Faire un bilan de matière précis sur la CLD à l'entrée, sortie et boue du système
- Mettre en évidence l'éventuelle formation de produits de dégradation, particulièrement les chlorures

et par conséquent être en mesure de tirer des conclusions définitives quant à la dégradation de la CLD dans des conditions méthanogéniques. En cas de réponse positive les principaux groupes trophiques microbiens (*Archaea* ou *Bacteria*) impliqués dans cette dégradation devaient également pouvoir être identifiés grâce à la mise en place de quelques tests supplémentaires. L'idée était de travailler également avec de la CLD sous forme complètement dissoute en milieu aqueux de façon à éviter qu'un résultat de biodégradation négatif ne puisse être le résultat d'un simple problème de disponibilité de la molécule pour les microorganismes comme cela peut être le cas dans les sols par exemple où la CLD est très certainement adsorbée sur le complexe argilo-organique et non libre dans la solution du sol.

II.2.1. Matériel et méthodes.

II.2.1.1. Description du dispositif expérimental.

Le dispositif se compose (Figure 3) :

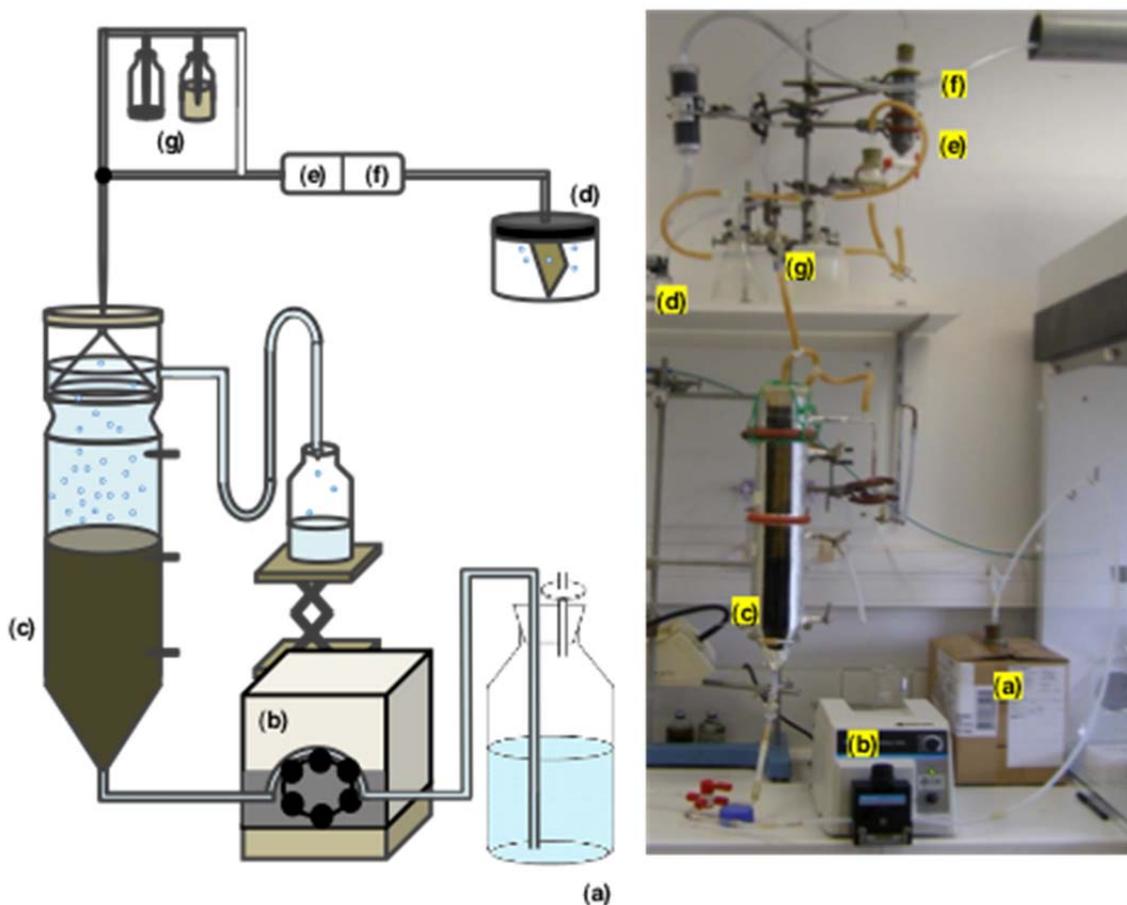


Figure 3. Schéma et photo du dispositif expérimental.

- d'un digesteur en verre de forme cylindrique (et conique en bas) de type UASB de 85 mm de diamètre sur 520 mm de long, avec un volume total de 2.248 L et un volume utile de 1.975 L ainsi qu'une cloche en verre à la partie supérieure pour jouer le rôle de séparateur Gaz-Liquide-Solide (c) et d'un tube en verre en forme de U à la sortie du système faisant office de joint hydraulique pour éviter toute perte de biogaz par cette voie.
- d'une pompe péristaltique (b) équipée d'une tête spéciale pour tube téflon permettant d'alimenter par le bas et à faible débit le digesteur en milieu de culture stocké dans une bouteille en verre de 2 litres (a) isolée de la lumière (pompe Masterflex® avec tête Modèle 73390-00).
- d'une tuyauterie en verre et en téflon pour les parties en contact avec les liquides de façon à éviter l'adsorption de CLD qui viendrait perturber les bilans de matières.
- et d'un débitmètre de gaz (MGC-1.PMMA de la société Ritter distribué en France par Serv'instrumentation) (d) relié au digesteur par un circuit permettant d'éliminer du biogaz son contenu en CO₂, H₂S et vapeur d'eau par lavage au moyen d'une solution de soude à 200 g/L (g), de limaille de fer (e) et de silicagel (f) et ainsi d'obtenir directement le débit en méthane.

La partie digesteur du dispositif a été entièrement recouverte de papier aluminium afin d'éviter d'éventuelles réactions de transformation de la CLD par action directe de la lumière.

II.2.1.2. Inoculation du réacteur.

La biomasse microbienne, utilisées comme inoculum pour les expériences provient du réacteur UASB industriel étudié au II.1 (Fig. 4A). Ce réacteur traite un mélange de vinasses obtenues après fermentation de jus de canne (rhum agricole) mais aussi de mélasse (rhum industriel).

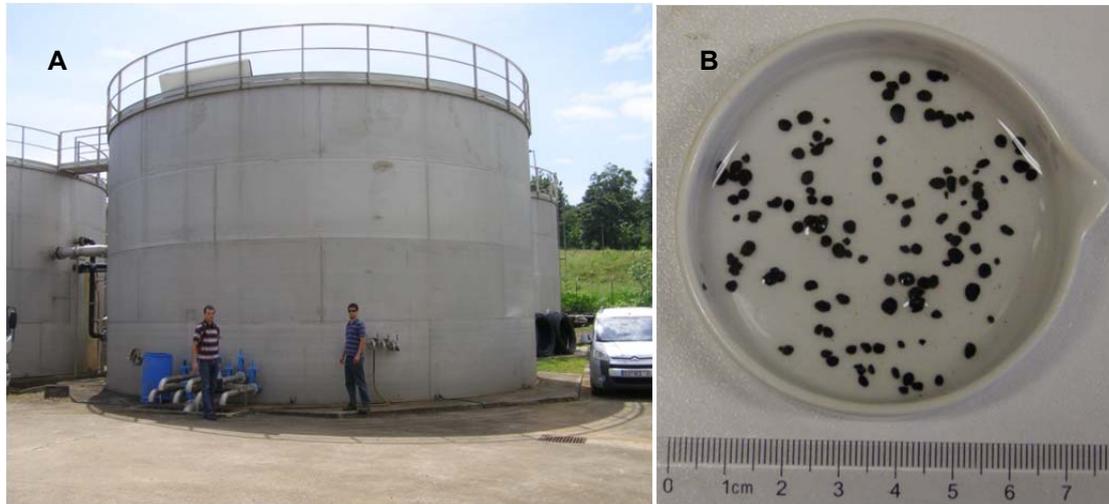


Figure 4. Méthaniseur industriel (A) source de la biomasse granulaire utilisée pour inoculer le réacteur UASB de laboratoire et aspect de cette biomasse (B).

Cette boue qui est granulaire (Fig. 4B) est parfaitement adaptée à ce type de réacteur car l'association des microorganismes sous la forme de granules pouvant atteindre plusieurs millimètres de diamètre est la clé de leur rétention par sédimentation dans ces systèmes opérés en flux ascendant. Les boues prélevées le 02/05/2013 ont été conservées au réfrigérateur jusqu'à l'inoculation du réacteur de laboratoire un mois plus tard. Environ 500 g de boues fraîches soit 102,5 g de boues sèches ont été introduits dans le digesteur. L'alimentation de ce dernier a été initiée immédiatement après l'inoculation au temps de rétention hydraulique nominal.

II.2.1.3. Composition du milieu de culture.

Le milieu de culture initialement prévu avait la composition indiquée dans le tableau 6 contenant tous les éléments nécessaires au développement d'une culture mixte méthanogène.

Tableau 6. Composition du milieu de culture utilisé pour alimenter le réacteur de laboratoire

Composé ou paramètre	Concentration (mg/L ou ml éthanol ou SMT/l)	
	Initiale	Finale
Ethanol	0,645	0,645
Saccharose	606	101
Acétate de sodium trihydraté	0	2108,4
CLD	0,5 - 5	2
Urée	38	43
Cystéine	3	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	4
K ₂ HPO ₄	25	29,23
Ca ²⁺	40	40
Solution métaux traces (SMT)	2	2
Cl ⁻	≤ 0,057	≤ 0,039
Demande Chimique en Oxygène (DCO)	1864	2290
Rapport DCO/N/P/S	100 / 0,9 / 0,0045 / 0,0015	

Le saccharose et l'éthanol avaient été sélectionnés comme source de carbone et d'énergie de façon à assurer une biodiversité maximale étant donné que leur transformation en méthane nécessite l'intervention de plusieurs groupes trophiques microbiens (bactéries fermentaires dites acidogènes, bactéries syntrophes dites acétogènes et *Archaea* méthanogènes) pouvant chacun contenir des espèces susceptibles d'agir sur la CLD. En plus de son rôle de source de carbone et d'énergie, l'éthanol a également été utilisé comme solvant pour dissoudre la CLD qui y est soluble jusqu'à au moins 20 g/L et pouvoir ainsi rajouter au milieu une concentration définie de l'organochloré. Les concentrations de saccharose et d'éthanol avaient été choisies pour donner une concentration de DCO inférieure à 2 g/L de façon à faciliter le suivi de ce paramètre avec le matériel disponible.

L'urée, et la cystéine avaient été sélectionnées respectivement comme source d'azote et de soufre préférentiellement par exemple à du sulfate d'ammonium de façon à minimiser au maximum le développement de sulfato-réducteurs et faire en sorte que la plus grande partie des électrons arrachés à la matière organique aille vers le méthane.

Les méthanogènes ayant des besoins particuliers en oligoéléments (Fe, Ni, Co, Mo, Cu, Se, W, Al, Mg, Mn, B, Zn), ces derniers ont été rajoutés au milieu de culture sous la forme d'une solution concentrée de métaux traces. Cette dernière est en général préparée à base de sels de chlorures sélectionnés pour leur grande solubilité. L'apport de chlorure par une telle solution au milieu de culture pouvant s'élever à plusieurs mg/L et les autres sels solubles à base de nitrate, sulfate, ou bromure se traduisant par l'apport d'éléments susceptibles de gêner la méthanogénèse (NO₃⁻, SO₄⁻) ou d'interférer (Br⁻) avec l'analyse des chlorures primordiale pour suivre la déchloration de la CLD, le choix s'est porté vers des sels organiques de ces différents métaux pour préparer la solution.

Le calcium jouant un rôle fondamental dans la granulation de la biomasse méthanogénique, une solution d'un sel de calcium a également été rajoutée au milieu pour maintenir une concentration finale de 40 mg Ca^{2+} /L et assurer ainsi l'intégrité de la biomasse granulaire utilisée comme inoculum.

Le milieu de culture sans calcium et sans métaux traces a été autoclavé 15 min à 110°C. La solution de métaux traces, stérilisée par filtration et celle de calcium, stérilisée à la chaleur ont été rajoutées par la suite aseptiquement au milieu de culture. Cela permet d'éviter tout phénomène de précipitation.

Malgré, les précautions prises pour éviter l'apport de chlorures au milieu de culture, ce dernier est inévitable sous la forme des impuretés présentes dans les différents réactifs utilisés pour sa préparation. Les certificats d'analyse de tous les réactifs employés, montrent toutefois que cet apport par les impuretés ne devrait pas dépasser 57 $\mu\text{g Cl}^-/\text{L}$ (Tab. 6), ce qui est largement en dessous des limites de détection des techniques disponibles pour leur analyse.

II.2.1.4. Conditions d'opération du réacteur.

Le but de l'expérience étant de tester la biodégradabilité de la CLD et non la charge maximale applicable au système, et afin de ne pas avoir à préparer inutilement de grandes quantités de milieux de culture, il était initialement prévu d'alimenter le réacteur de façon continue à un temps de rétention hydraulique (TRH) constant de 5 jours. Ces conditions d'opération devaient également permettre de libérer du temps pour des opérations plus importantes que la préparation de milieux, comme par exemple, la recherche d'intermédiaires de dégradation de la CLD. Il est à noter que la seule voie d'entrée d'oxygène dans le dispositif correspond à l'oxygène dissous apporté par le milieu de culture. Aucune précaution comme par exemple le barbotage de N_2 n'a été prise pour rendre ce dernier anoxique. Cela n'est en effet pas nécessaire étant donné que la quantité d'oxygène dissous qu'il peut contenir dans nos conditions expérimentales représente au maximum 0,45% de la quantité d'oxygène qui serait nécessaire à l'oxydation complète des 2 g DCO/L qu'exercent ses composants organiques. L'oxygène dissous apporté au méthaniseur ne peut par conséquent qu'être immédiatement consommé par les microorganismes aérobies stricts ou facultatifs que l'on rencontre toujours dans de tels écosystèmes et qui permettent entre autre de les rendre anoxiques bien que très légèrement aérés. En ce qui concerne la température, le dispositif a été opéré à température ambiante ($25,1 \pm 1.9$ °C)

II.2.1.5. Paramètres suivis et méthodes analytiques.

Deux types de paramètres ont été suivis lors de l'opération du réacteur

- Ceux permettant de contrôler les conditions d'opération du système et de vérifier qu'il fonctionne bien dans des conditions méthanogéniques (débit d'alimentation en milieu, pH en entrée et sortie du réacteur, températures de l'eau et du gaz, abattement de DCO, débit de méthane produit pour calculer le rendement méthane, potentiel redox des boues).
- Ceux permettant d'évaluer la dégradation de la CLD (concentration de CLD, CLD-5b-hydro, chlordécol et chlorures en entrée et sortie du système, ainsi que dans ses boues, recherche qualitative d'éventuels autres intermédiaires de dégradation et tentative d'identification de leur structure).

Le débit d'alimentation du réacteur a été déterminé par pesée. Le pH et la température des liquides au moyen d'un pH mètre portable. Le même appareil a servi à suivre le potentiel redox avec une électrode de platine couplée à une électrode de référence Ag/AgCl. La température de l'air identique à celle du méthane a été suivie à l'aide d'une station météo de la marque Orium Season. Pour le suivi du débit de méthane, voir II.2.1.1.

La DCO et les chlorures ont été déterminés au moyen de réactifs prêt à l'emploi commercialisés par la société Hach-Lange. Il s'agit dans les deux cas de réactions colorimétriques, la lecture de l'absorbance étant réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre DR3900 de la même marque spécialement acheté pour le projet. Dans les deux cas, les déterminations ont été réalisées en suivant les instructions du fabricant.

La technique Hach-Lange de DCO (kit LCI 400, 0-1000 mg/L) est une adaptation de la méthode standard à reflux fermé réalisée en tubes contenant déjà la solution de dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), nécessaire à l'oxydation de la matière organique et auxquels il suffit de rajouter 2 mL d'échantillon ou d'eau déionisée (blanc) puis de les chauffer pendant 2h à 148°C. Une fois refroidit, l'absorbance des tubes est mesurée à 605 nm (maximum d'absorbance du Cr(III) formé au cours de la réaction). La courbe standard permettant de convertir la densité optique (DO) en concentration de DCO étant préenregistrée par le fournisseur dans le spectrophotomètre, les résultats sont obtenus directement en mg DCO/L. Cette méthode est annoncée avec une erreur de 10%.

La technique Hach-Lange utilisée pour la mesure des chlorures (méthode 8113) est basée sur le principe de la méthode colorimétrique au thiocyanate mercurique qui met en jeu 2 réactifs : le thiocyanate de mercure(II) et le Fer(III). En présence de chlorures le thiocyanate de mercure(II) réagit pour former l'ion chloromercurate(II). Cette réaction libère dans le milieu des ions thiocyanates qui à leur tour interagissent avec le Fer(III) pour donner une couleur orangée qui absorbe à 455 nm (Florence et Farrar, 1971²⁸). Cette méthode a été sélectionnée car elle a une limite de détection affichée de 0.1 mg/L qui est inférieure à celle de la plupart des électrodes spécifiques et qui est compatible avec les concentrations en chlorures attendues (≤ 0.21 à 2,14 mg Cl-/L) par déchloration de la CLD à son maximum de solubilité (3 mg/L). De plus, cette méthode pouvait être mise en place avec le même spectrophotomètre que la DCO sans impliquer par conséquent l'achat et la maintenance d'équipements supplémentaires comme l'auraient été la chromatographie ionique ou l'électrophorèse capillaire, deux techniques qui en théorie présentent également des limites de détection de 0.1 mg/L. Quelques analyses de chlorure ont également été commandées au LDA972²⁹ où celles-ci ont été réalisées par chromatographie ionique avec une limite de quantification (LQ) affichée de 0,5 mg/l en suivant la norme NF EN ISO 10304-1.

La CLD, la CLD-5b-hydro et le chlordécol ont été suivis par la méthode d'analyse couplant la SPME à la GC-MS³⁰ mise au point par Alain Soler du Cirad au CAEC³¹. La SPME pour ses initiales en anglais (Solid Phase Micro Extraction) est un mode d'extraction qui permet d'éviter l'utilisation de solvants. Avec cette méthode, l'extraction est en effet réalisée au moyen d'une fibre (Supelco® 65 μm PDMS/DVB) ayant la forme d'une aiguille plongée pendant 10 min dans les échantillons liquides portés à une température de 80°C de façon à ce qu'elle se charge par adsorption des divers composés organiques présents. La fibre est ensuite placée dans un injecteur spécifique monté sur un chromatographe en phase gazeuse ici le modèle 450 de la marque Varian qui opère à une température de 270°C de façon à désorber les composés organiques et les faire passer sous forme gazeuse. Ces derniers sont ensuite séparés dans une colonne capillaire apolaire de 15 m (Restek®, Rxi®-1ms 100% diméthyl polysiloxane de 0,25 mm de diamètre interne), où le gradient de température suivant est appliqué : 5 min à 100°C, augmentation jusqu'à 160°C pendant 2 min, puis jusqu'à 250°C pendant 11,25 min et enfin augmentation jusqu'à 300°C pendant les 2,67 min restantes. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1 mL/min. Les molécules qui éluent à des temps de rétention spécifiques de la colonne

²⁸Florence ; T.M. ; Farrar ; Y.J. Spectrophotometric determination of chloride at the parts-per-billion level by the mercury(II)thiocyanate method. *Anal. Chim. Acta*, **1971**, 54, 371-377.

²⁹Laboratoire Départemental d'Analyse de la Martinique

³⁰Gas Chromatography - Mass spectrometry

³¹Soler ; A. ; Lebrun ; M. ; Woignier ; T. Solid-Phase microextraction and gas chromatography - mass spectrometry for quantitative determination of chlordecone in environmental micro-samples. submitted

passent ensuite dans un spectromètre de masse à trappe ionique (varian® 240-MS) opéré en mode IE (impact électronique). L'analyse des 3 composés pour lesquels des standards analytiques existent a été réalisé en mode MSMS, tandis que la recherche d'éventuels intermédiaires de dégradation a été réalisée en mode MS puis extraction ionique.

II.2.1.6. Sources des réactifs chimiques.

La CLD et la CLD-5b-hydro utilisées pour l'étude correspondent à des standards de pureté analytique fournis par « CIL Cluzeau » le représentant français de la société allemande « Dr. Ehrenstorfer ». Dans le cas de la CLD, il s'agit d'une poudre où la CLD qui est très hygroscopique est associée à un peu plus de 2 molécules d'eau d'où le nom de « CLD hydrate » sous lequel le standard est commercialisé. Le produit est affiché comme ayant une pureté massique de 97 à 97,5% en base sèche vérifié par GC-ECD ou GC-MS et un contenu en eau allant de 8 à 8,7% en fonction des lots, ce qui donne une pureté massique de 88,5 à 89,6 % en base humide (= pureté du standard véritablement pesée pour préparer les solutions). La CLD-5b-hydro est commercialisée sous la forme d'une solution dans le cyclohexane à la concentration de 10 ng/μL (= 10 mg/L). Le chlordécol sous forme d'une poudre de pureté ≥ 97% a été fourni par la société française Alpha Chimica (<http://www.alphachimica.com/documents/chlordecone%20data.pdf>). Tous les autres produits des marques Prolabo ou Merck ont été commandés à la société VWR et correspondent aux produits de la plus haute pureté disponible.

II.2.2. Résultats et Discussion.

II.2.2.1. Optimisation de la composition du milieu de culture et interférences avec la mesure colorimétrique des chlorures.

II.2.2.1.1. Concentration en CLD

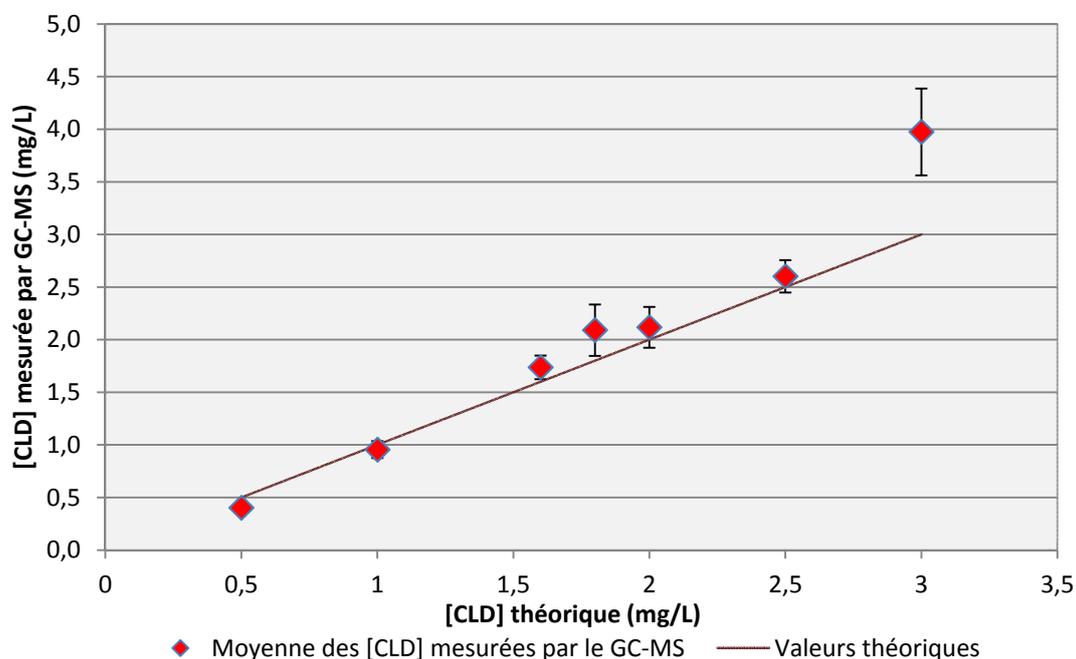


Figure 5. Comparaison entre concentrations théoriques et expérimentales lors des tests de solubilité de la CLD dans le milieu de culture préparé comme indiqué au II.2.1.3 et Tab 6 (les points correspondent à la moyenne des quintuplés et les barres d'erreur à leur écart type)

Afin de pouvoir suivre la concentration en chlorure, mais aussi augmenter la probabilité de détecter des intermédiaires de dégradation, la concentration la plus élevée pour laquelle il était possible de maintenir la CLD sous forme dissoute dans le milieu de culture initialement envisagé (Tableau 6), c'est-à-dire sous une forme directement accessible aux microorganismes, a été recherchée. Les tests ont consisté à comparer la concentration de CLD rajoutée à celle mesurée par SPME-GC/MSMS. Pour chaque concentration testée, Les essais ont été réalisés en quintuplé. Le prélèvement de 3 des 5 échantillons a été réalisé à la surface, au milieu et au fond des récipients utilisés pour les essais et maintenu en position statique afin de mettre en évidence la présence d'une éventuelle hétérogénéité dans les solutions. Les deux derniers échantillons ont par contre été prélevés après agitation de façon à homogénéiser le contenu des récipients. Les tests ont été réalisés jusqu'à une concentration de 5 mg CLD/L qui est clairement supérieure à la limite de solubilité de 3 mg/L rapportée dans la littérature. Seuls les résultats obtenus jusqu'à 3 mg/L sont toutefois présentés sur la Figure 5.

Comme on peut le voir sur cette figure, la concentration en CLD retrouvée en solution reste raisonnablement cohérente avec la concentration attendue jusqu'à 2,5 mg CLD/L. Aucune explication logique n'a pu être trouvée au fait que la concentration mesurée pour 3 mg CLD/L ait été supérieure et non inférieure à la valeur théorique. Afin de garder une marge de sécurité par rapport à la limite de solubilité supposée de la CLD donnée par la littérature mais aussi avoir une concentration en CLD suffisamment élevée pour obtenir une concentration de chlorure mesurable en cas de dégradation, il a finalement été décidé de préparer le milieu de culture avec 2 mg CLD/L. A cette concentration de CLD, l'arrachage d'un seul chlore sur 7 de 10 molécules devrait en effet rester détectable ($[Cl^-] = 0.1 \text{ mg/L}$).

II.2.2.1.2. Sources de carbone et de soufre et interférences avec la mesure colorimétrique des chlorures.

Il est rapidement apparu que certains éléments perturbaient la mesure des chlorures par la méthode colorimétrique au thiocyanate mercurique tant en entrée qu'en sortie du réacteur.

Tableau 7. Absorbance du milieu de culture et de ses différents composants pris séparément dans de l'eau déionisée lorsque soumis au test colorimétrique au thiocyanate mercurique pour la quantification des chlorures.

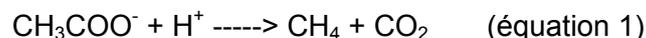
Echantillons	Absorbance à 455 nm*	[Cl ⁻] apparente (mg/L)
10 mL du milieu de culture complet avec cystéine	0,179	1,75
10 mL du milieu de culture avec cystéine et sans SMT	0,246	2,8
10 mL d' H ₂ O à 101 mg/L de Saccharose	0,016	< LQ
10 mL d' H ₂ O à 45 mg urée/L	0,017	< LQ
10 mL d' H ₂ O à 30 mg/L de K ₂ HPO ₄	0,005	< LQ
10 mL d' H₂O à 3 mg/L de Cystéine	0,251	2,9
10 mL d' H ₂ O avec 6,4 µL d'éthanol	0,009	< LQ
10 mL d' H ₂ O avec 40 mg/L de Ca ²⁺	0,026	< LQ
10 mL d' H ₂ O avec 20 µL de SMT	-0,004	< LQ
10 mL d' H₂O avec 4 mg/L de SO₄(NH₄)₂	0,002	< LQ
10 mL du milieu de culture complet (avec SO ₄ (NH ₄) ₂)*	0,116	1
10 mL d'H ₂ O à 2100 mg/L d'Acétate de sodium. 3 H ₂ O	0,074	0,5

*Courbes étalons allant de 0.2 à 1,8 mg Cl⁻/L (DO de 0,043 à 0,187) et de 2 à 4 mg Cl⁻/L (DO de 0.203 à 0.317) ; LQ : Limite de quantification = 0.2 mg Cl⁻/L.

En entrée du réacteur, la DO_{455nm} obtenue correspondait en effet à une concentration apparente en chlorure de 1,75 mg/L (Tab. 7) alors que le milieu de culture ne peut en contenir plus de 57 $\mu\text{g/L}$ (Tab. 6). Afin d'identifier le facteur responsable de ce faux positif, chaque composant du milieu de culture a été dissous de façon indépendante dans de l'eau déionisée et chaque solution a ensuite été testée par la méthode au thiocyanate mercurique. Comme on peut le voir sur le Tableau 7, il s'est avéré que pratiquement la totalité de l'absorbance parasite du milieu de culture était dû à la cystéine alors qu'aucun des autres éléments du milieu ne causait d'absorption (voir valeurs mises en rouge dans le tableau). Dans ces conditions et malgré l'objectif de départ d'éviter l'ajout de sulfate au milieu, il a été décidé d'utiliser du sulfate d'ammonium comme source de soufre à la place de la cystéine étant donné qu'il ne donne pas de faux positif lors de l'analyse colorimétrique des chlorures (Tab. 7, valeur en rouge).

En plus de la réaction parasite due à la cystéine, le milieu de culture initialement transparent s'est également avéré prendre une teinte « brune orangée » en sortie du réacteur après fermentation méthanique, absorbant de façon intense à 455 nm (jusqu'à une DO de 0,82), c'est à dire la longueur d'onde utilisée pour le dosage colorimétrique des chlorures (Fig. 6).

Cette couleur étant proche de celle des vinasses traitées par le réacteur industriel d'où provient l'inoculum (Fig. 6A), nous avons pensé quelle pouvait être due à des résidus de vinasse entourant les granules. Afin de les éliminer, le réacteur a été vidé et les boues récupérées de façon à les laver abondamment à l'eau du robinet. Après réinoculation, le débit d'alimentation en milieu a également été augmenté de façon à poursuivre le lavage de la boue. Suite à cette opération et à l'élimination de la cystéine dans le milieu de culture, le réacteur s'est acidifié jusqu'à un pH de 5,5 avec l'apparition d'une forte odeur d'acide butyrique en sortie du système. Pendant cette période, la teinte de certains des granules composant la boue est également passée de noire à blanche confirmant un développement anormalement élevé de bactéries acidogènes. Au vu de ces résultats, il a été décidé de réinoculer le réacteur avec une boue fraîche préalablement lavée avec de l'eau déionisée contenant 2 g NaHCO_3/L . Afin d'éviter tout nouveau problème d'acidification, (1) la concentration en saccharose du milieu de culture a été diminuée de 606 à 101 mg/L mais pas complètement éliminée de façon à continuer à favoriser la présence d'une grande biodiversité microbienne et (2) de l'acétate a été rajouté comme nouvelle source de carbone et d'énergie sous la forme d'acétate de sodium trihydraté à raison de 1 g $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}$ (Tab. 6). L'acide acétique étant le véritable substrat des méthanogènes acétoclastes et non son sel, la transformation de ce dernier en CH_4 et CO_2 , se traduit en effet par une consommation de proton (voir équation 1) et donc par une alcalinisation du milieu qui permet de compenser l'acidification causée par les acides résultants de la fermentation des autres sources de carbone (saccharose et éthanol).



Suite aux modifications apportées au milieu de culture (remplacement de la cystéine par le sulfate d'ammonium, diminution de la concentration en saccharose, ajout d'acétate de sodium), les concentrations en urée et en K_2HPO_4 ont été également ajustées de façon à maintenir le même rapport DCO/N/P/S (Tab. 6) L'azote déjà apporté par le sulfate d'ammonium a été pris en compte pour déterminer la concentration d'urée nécessaire.

Bien que la composition modifiée du milieu de culture ait permis de diminuer de façon significative l'absorbance obtenu lors du test des chlorures, cette dernière continuait toutefois à donner une concentration « apparente » de chlorure de 1 mg/L, en grande partie lié à l'ajout d'acétate (Tab. 7) qui très certainement comme la cystéine doit interférer avec la réaction colorimétrique utilisée pour leur suivi.

La nouvelle composition du milieu de culture (Tab. 6) n'a pas non plus permis d'éliminer la couleur perturbant l'analyse colorimétrique des chlorures en sortie du réacteur. Cette

couleur ressemblant à celles résultant de réactions de Maillard et ces dernières correspondant à des réactions entre les fonctions carbonyles ($R_2-C=O$) des sucres réducteurs et les fonctions amines ($R-NH_2$) des acides aminés, nous avons pensé que la couleur observée pouvait résulter d'une réaction entre les sucres réducteurs (glucose, fructose) issus de l'hydrolyse du saccharose qui lui n'en est pas un et les fonctions amines de l'urée ($H_2N-(C=O)-NH_2$). La littérature laisse entendre que de telles réactions catalysées ou pas de façon biologique seraient possibles³². Afin de tester cette hypothèse, le réacteur a été alimenté pendant plusieurs jours avec un milieu de culture dans lequel l'urée et le saccharose avaient été retirés sans observer aucune disparition de la couleur. Dans la même optique l'éthanol et la solution de métaux traces ont aussi été retirés du milieu de culture sans plus de succès indiquant qu'aucun des composés pressentis n'était en cause. Pour tous ces tests, le sulfate d'ammonium a été utilisé en remplacement de l'urée comme source d'azote.

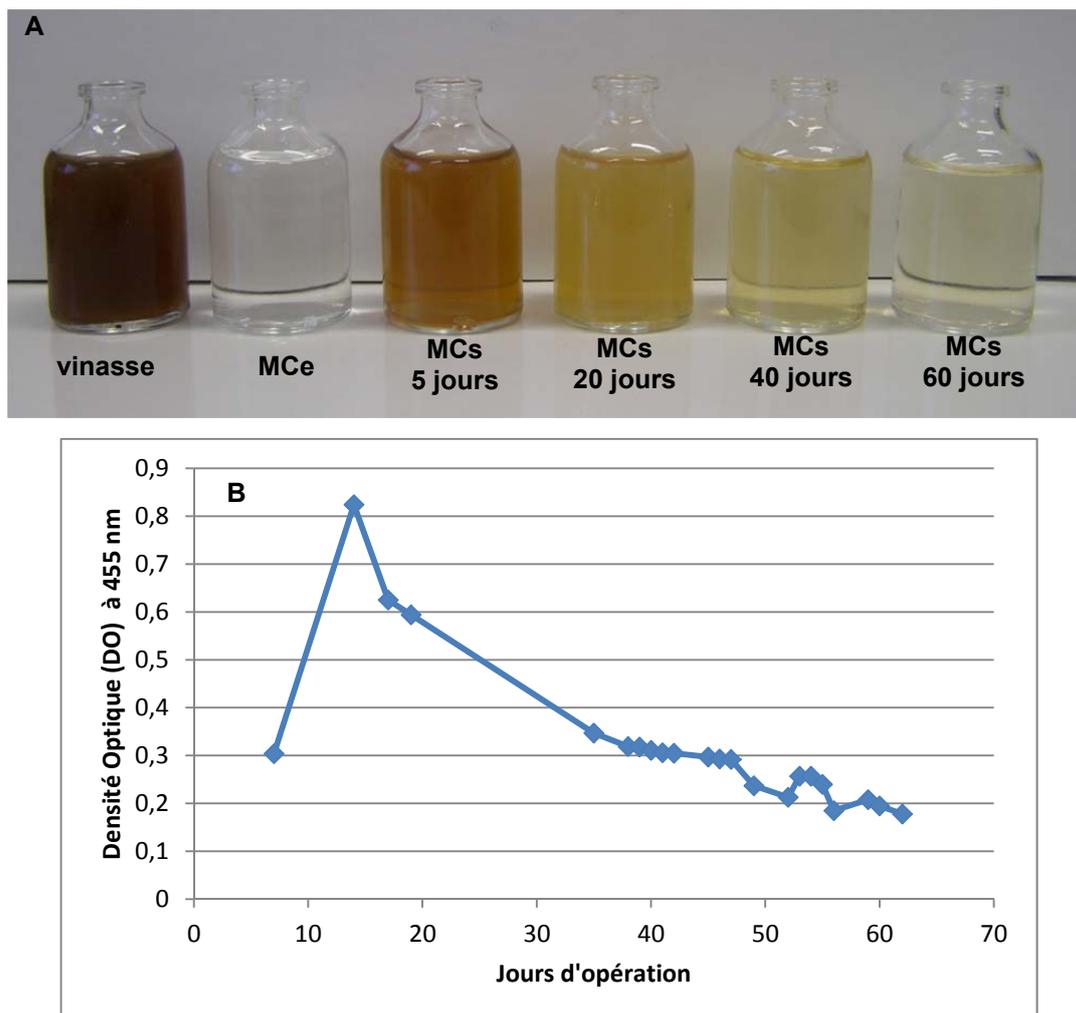


Figure 6. Comparaison de la couleur des vinasses à celle du milieu de culture en entrée (MCE) et sortie (MCs) du réacteur à différents temps expérimentaux (A)³³ et évolution de l'absorbance à 455 nm du milieu méthanisé en sortie du réacteur (B) (mesure directe par rapport à l'air).

³²Kostyukovsky ; V. ; Marounek ; M. Maillard reaction products as a substrate in in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Sci. Technol.*, **1995**, 55, 201-201

³³Le suivi journalier du réacteur n'a commencé qu'au jour 34 sur la Figure 6B après la réinoculation du réacteur et le changement de composition du milieu de culture, d'où la différence d'échelle avec les figures 9 et 10.

De façon à déterminer si l'obtention de couleur était liée à la nature des boues utilisées pour inoculer le réacteur, un test réalisé en parallèle aux précédents a consisté à mettre en contact dans 2 bouteilles sérologiques de 100 mL, le milieu de culture (composition finale, Tab. 6) avec l'inoculum mais aussi la boue méthanogène provenant du Filtre anaérobie industriel étudiée au II.1. Comme le montre la Figure 7, après quelques jours d'incubation à température ambiante alors que le surnageant de la bouteille contenant la boue du filtre anaérobie est resté transparent, celui contenant l'inoculum a pris la même teinte brune orangée que celle observée en sortie du réacteur de laboratoire (Fig. 6A).

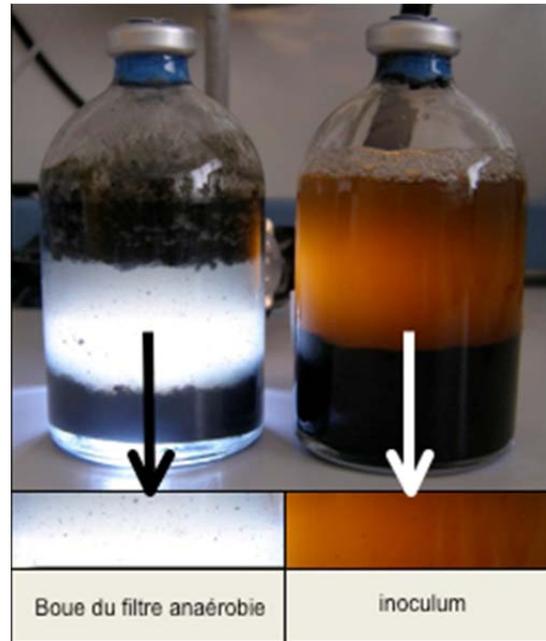


Figure 7. Couleur générée par l'inoculum du réacteur UASB de laboratoire et la boue d'un filtre anaérobie industriel après le même temps d'incubation à température ambiante en présence du milieu de culture modifié

Cela renforce les résultats précédents montrant que la coloration visible en sortie du réacteur n'est apparemment pas liée à la transformation de certains composants du milieu de culture et suggère plutôt qu'elle serait apportée par l'inoculum. Les deux boues testées, se distinguent en effet par le type de vinasse traitée. Le filtre anaérobie traite des vinasses de rhum agricole obtenu par fermentation directe de jus de canne qui sont très peu colorées alors que comme nous l'avons déjà fait remarqué, le réacteur UASB d'où provient l'inoculum traite non seulement des vinasses de rhum agricole, mais aussi des vinasses obtenues par fermentation de mélasses de canne, un résidu très coloré dû à la formation de réactifs de Maillard, dont la teinte rappelle celle des effluents du réacteur de laboratoire (Fig. 6A). Dans ces conditions, il est très plausible que le chromophore responsable de la coloration des vinasses se soit adsorbé sur l'inoculum pendant son séjour dans le réacteur UASB industriel et qu'il soit en cours de désorption lente dans le réacteur de laboratoire. Cette hypothèse se trouve confortée par le fait qu'après 62 jours d'alimentation du réacteur de laboratoire, la couleur du milieu fermenté s'estompe peu à peu, comme l'indique sa DO à 455 nm qui est progressivement passée de 0,820 à 0,178 (Fig. 6B), ce que l'on peut apprécier visuellement sur la Figure 6A.

Etant impossible de se défaire de l'apparition de couleur en sortie du réacteur en jouant sur la composition du milieu de culture, nous avons cherché à savoir s'il était possible de l'éliminer au moyen de charbon actif (CA) en poudre. L'ajout de 5 g CA/L s'est avéré très efficace pour cela (Fig. 8). Après décoloration au CA, le milieu de culture méthanisé sans CLD présentait toutefois encore une absorbance non négligeable par la méthode au

thiocyanate mercurique (DO_{455nm} entre 0.28 et 0.32 équivalente à une concentration de Cl^- entre 3.4 et 3.96 mg/L) suggérant que le CA libère probablement des éléments qui affectent eux aussi l'analyse des chlorures par cette méthode en créant de faux positifs.

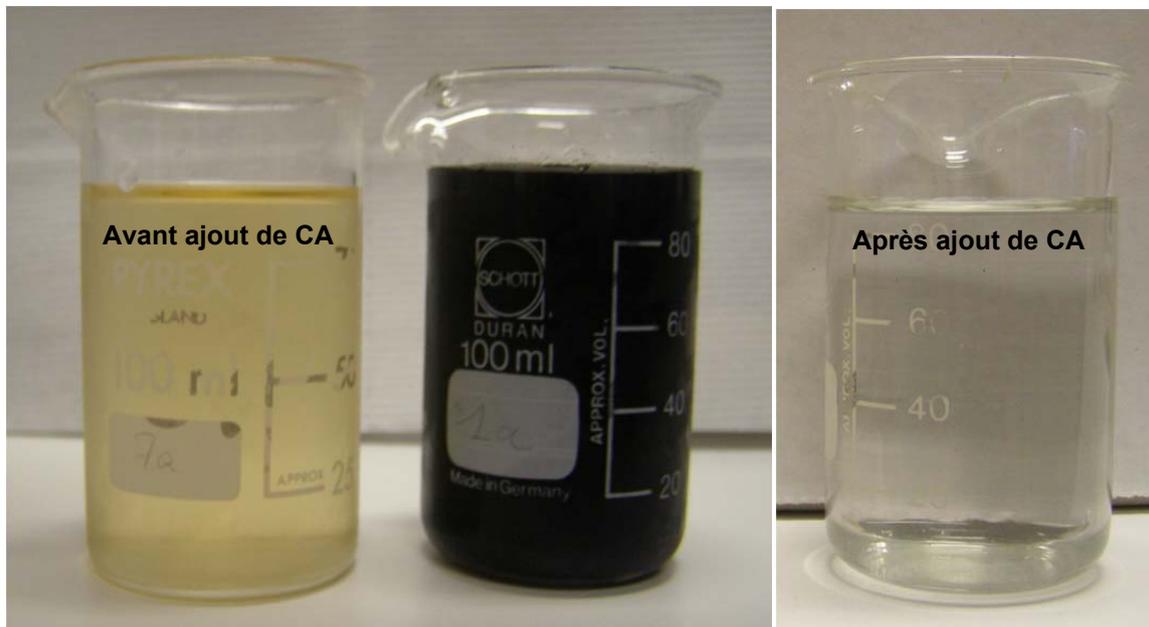


Figure 8. Elimination de la couleur du milieu de culture fermentée en sortie du réacteur par traitement au charbon actif (5 g/L)

Suite à ces derniers tests, il est apparu qu'il serait impossible d'utiliser la méthode colorimétrique au thiocyanate mercurique pour le suivi de la concentration des chlorures et qu'il fallait utiliser une autre méthode permettant si possible l'identification non ambiguë de l'anion recherché. La chromatographie ionique s'est imposée comme alternative mais impliquait de faire appel à un laboratoire d'analyse extérieur.

Pour la suite des expériences, le milieu utilisé pour alimenter les réacteurs était celui présenté dans la colonne de droite du tableau 6.

II.2.2.2. Performance épuratoire du dispositif avant et après ajout de CLD.

A cause des problèmes décrits au II.2.2.1, un suivi précis et journalier du réacteur n'a pu être lancé qu'à partir du 1/08/2013 alors que la première inoculation avait eu lieu le 03/06/2013. Pendant la période située entre ces 2 dates, le réacteur a toujours été alimenté sans CLD qui n'a été rajoutée au milieu de culture qu'à partir du 9/08/2013.

Les conditions d'opération et les performances du système sont présentées respectivement dans les figures 9 et 10.

Comme on peut le constater sur la figure 9, la charge volumique, c'est à dire la quantité de DCO apportée par litre de réacteur et par jour n'a pu être maintenue aussi stable que souhaitée (valeur moyenne de $0,56 \pm 0,19$ g DCO/ $L_{\text{réacteur}} \cdot \text{jour}$) bien que la concentration de DCO en entrée du système le soit (valeur moyenne expérimentale de $2,25 \pm 0,19$ g DCO/L à comparer avec la valeur théorique de 2,29 g/L, Tab. 6). Cela est dû au fait que bien que la pompe péristaltique servant à alimenter le réacteur ait été sélectionnée pour donner le débit adéquat (395 mL/jour ou 0,274 mL/min) afin de maintenir le TRH objectif de 5 jours, il s'est en fait avéré impossible dans la pratique de l'opérer à un débit aussi faible. Le réglage du

débit se faisant manuellement sur la pompe il n'a pas non plus été possible de le réguler de façon identique autour de la valeur cible à chaque changement de « batch » de milieu de culture.

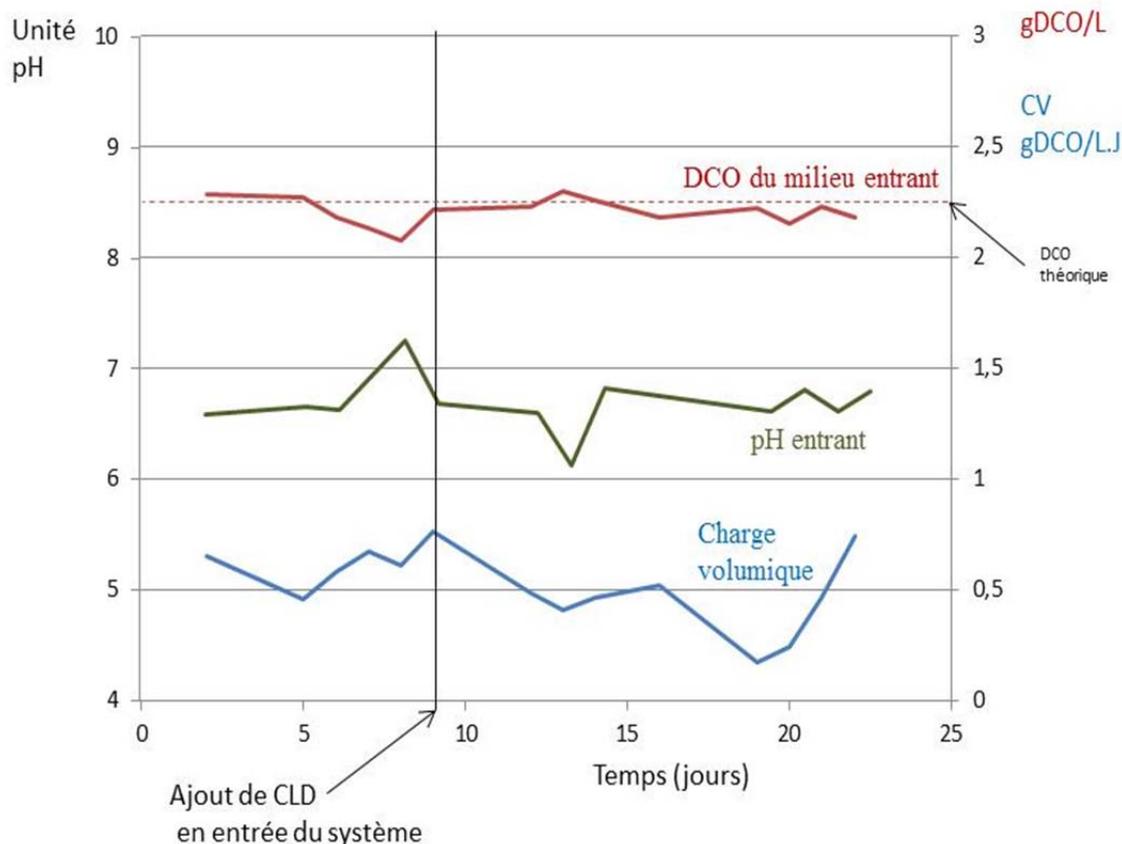


Figure 9. Conditions d'opération du réacteur.

Ces limitations expérimentales mises à part, l'aspect important est que le système a présenté un abattement de DCO moyen de $96,2 \pm 2,5\%$ pour la DCO totale et de $97,7 \pm 0,5\%$ pour la DCO soluble (Fig. 10) couplé à un rendement méthane (rapport entre la quantité de méthane produite et la quantité de DCO dégradée) moyen de $0,32 \pm 0,06$ LCH₄ TPN³⁴/g DCO_{dégradée} très proche du rendement théorique de $0,35$ LCH₄ TPN/g DCO_{dégradée}. Cela signifie qu'à la charge appliquée, les composés organiques présents dans le milieu de culture sont transformés pratiquement dans leur totalité en méthane et que le système fonctionne donc bien dans des conditions méthanogéniques. Le potentiel rédox très négatif mesuré dans la boue du système ($E_{Ag/AgCl} = -345$ mV ; pH 7,17) est également caractéristique de ceux observés dans ce type d'environnements. Il est à noter que la concentration de matière volatile en suspension (MVES) estimée par différence entre la DCO totale et la DCO soluble à la sortie du réacteur n'était en moyenne que de $7,5 \pm 5,9$ mg MVES/L ce qui indique une très faible perte de biomasse par le système.

Un point remarquable est que les performances du réacteur sont restées stables après l'ajout de 2 mg CLD/L au milieu de culture (Fig. 10). Cela indique l'absence de toxicité de la CLD pour tous les partenaires microbiens nécessaires à la conversion des substrats carbonés (saccharose, éthanol, acétate) en CH₄ (bactéries acidogènes, acétogènes et *Archaea* méthanogènes). Pour les méthanogènes, cela est en accord avec les travaux de

³⁴TPN : Température et Pression Normale, c'est-à-dire 0°C et 1 atm.

Jablonski et al. (1996)* sur la transformation de la CLD par *Methanosarcina thermophila* qui ont été effectués à une concentration de 790 mg CLD/L n'ayant pas empêché la transformation de l'organochloré. L'acidification limitée (le pH reste au dessus de 7,5) apparue en sortie du réacteur après le 20^{ème} jour de suivi journalier (Fig. 10) ne doit pas être interprétée comme le résultat d'une toxicité retard de la CLD correspondant à un effet cumulatif même si elle semble associée à une chute du rendement méthane. En fait, elle est certainement liée à une modification du mode de prélèvement du milieu sortant sur lequel est faite la mesure de pH associée à une augmentation de la charge volumique. Avant cette date la mesure de ce paramètre se faisait en effet sur un échantillon ayant séjourné plusieurs dizaines de minutes dans un béccher présentant une surface d'échange importante avec l'atmosphère favorisant les phénomènes de dégazage, notamment de CO₂ dissous pouvant entraîner une alcalinisation du milieu, alors que pour les derniers jours de suivi présentés dans le rapport, la mesure a été réalisée sur un échantillon prélevé directement en sortie du réacteur dans un flacon de petit volume et à l'ouverture étroite réduisant par là même les échanges gazeux et les changements de pH pouvant en résulter.

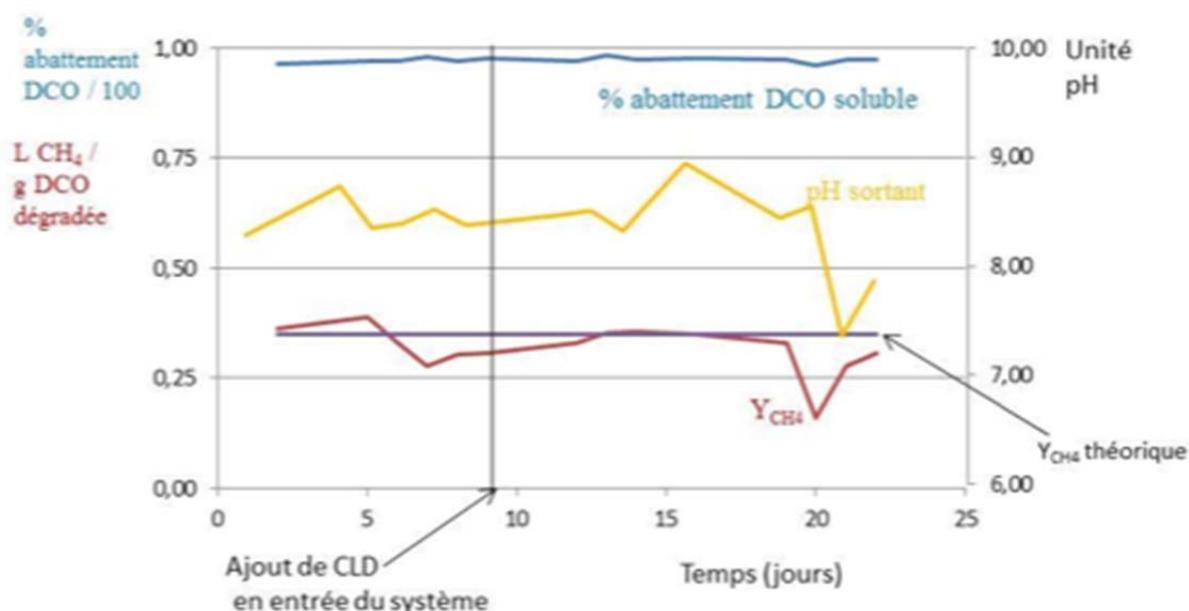


Figure 10. Performances épuratoires du réacteur.

II.2.2.3. Abattement de CLD par le dispositif

La SPME-GC/MS du CAEC ayant montré de nombreuses défaillances parmi lesquelles une perte de sensibilité inexplicée de mai à septembre 2013, une seule mesure de CLD a pu être effectuée pendant cette période au cours d'une très courte fenêtre de meilleur fonctionnement de la machine. Cette mesure a permis de mettre en évidence que plus de 78,6% de la CLD détectée en entrée du système n'était pas retrouvée en sortie (Fig. 11). Il est possible toutefois que l'abattement de CLD soit beaucoup plus élevé que cela car le taux de dilution (1850 fois) utilisée pour se retrouver dans la gamme étalon (0,288 – 7,2 µg CLD/L) pour l'échantillon d'entrée a aussi été utilisé pour l'échantillon de sortie et que dans ces conditions la concentration en sortie du réacteur s'est retrouvée en dessous de la gamme de mesure et n'a donc pu être quantifiée même si la CLD est restée détectable. Cette première mesure ayant été réalisée en mode MSMS, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence d'intermédiaire de dégradation. Des échantillons ont été prélevés et stockés au réfrigérateur tout au long de l'opération du réacteur de façon à pouvoir suivre

* Voir la note 20 à la page 9 pour la référence complète

la concentration en CLD lorsque la GC/MS aura été réparée. Afin d'augmenter la précision de la quantification de la CLD, les échantillons d'entrée ne seront dilués que 400 fois de façon à être au milieu de la gamme étalon ($[\text{CLD}_{\text{entrée}} \text{ théorique}]/400 = 5 \mu\text{g/L}$). La dilution la plus adéquate pour le suivi de la CLD en sortie du réacteur sera recherchée en commençant par une dilution au 100^{ème}, l'idéal étant de minimiser au maximum ce niveau de dilution de façon à augmenter la possibilité de détection d'éventuels intermédiaires de dégradation.

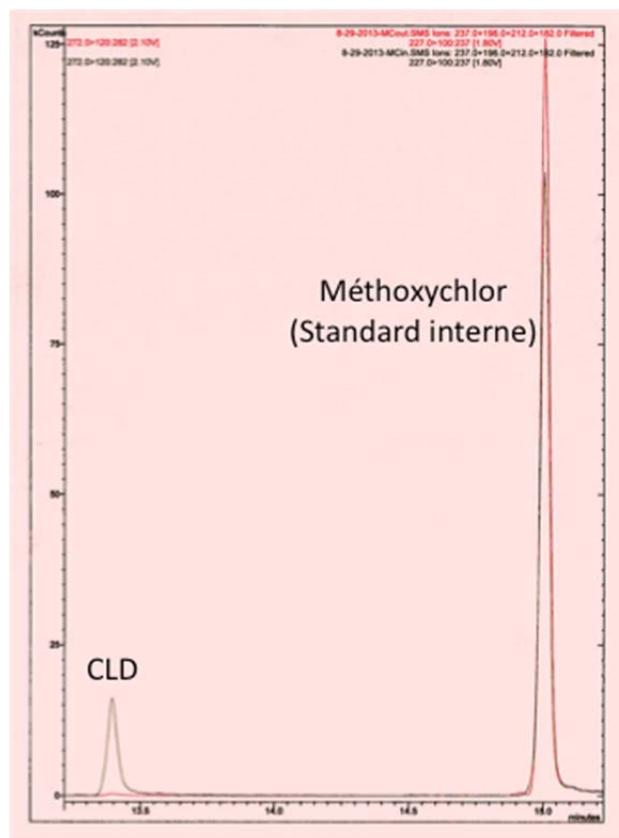


Figure 11. Chromatogrammes d'échantillons prélevés à l'entrée (courbe verte) et à la sortie du réacteur (courbe rouge) le 22^{ème} jour d'opération obtenu par SPME-GC/MSMS (niveau de dilution des échantillons = 1850).

Au stade actuel, avec cette seule mesure, en l'absence de mise en évidence d'intermédiaires de dégradation il est impossible de conclure si l'abattement observé est due à une dégradation où à une simple adsorption de la CLD sur les conduites d'alimentation du réacteur, ses parois ou encore sur la biomasse méthanogène granulaire. En ce qui concerne l'adsorption sur les conduites d'alimentation et les parois du réacteur, un test d'alimentation du réacteur vide avant inoculation a été effectuée de façon à pouvoir répondre à cette question. Là encore les échantillons prélevés au cours de ce test sont stockés jusqu'à ce que leur analyse soit possible. Il est à noter que la solubilité de la CLD augmente avec le pH³⁵. Il est logique de penser dans ces conditions que l'augmentation de pH observée entre l'entrée et la sortie du réacteur (le pH passe de $6,7 \pm 0,23$ à $8,17 \pm 0,52$) devrait compenser en partie en tout cas une éventuelle adsorption de la CLD sur la biomasse.

II.2.2.4. Production de chlorures par le dispositif.

³⁵ Dawson ; G.W ; Weimer ; W.C ; Shupe S.J. Kepone – a case of a peristent material. *AIChE symposium series*, 1979, 75, 366-374.

Comme longuement développé au II.2.2.1.2., la mesure des chlorures par la méthode colorimétrique au thiocyanate mercurique s'étant révélée impossible sur notre matrice nous avons testé si la chromatographie ionique serait par contre applicable.

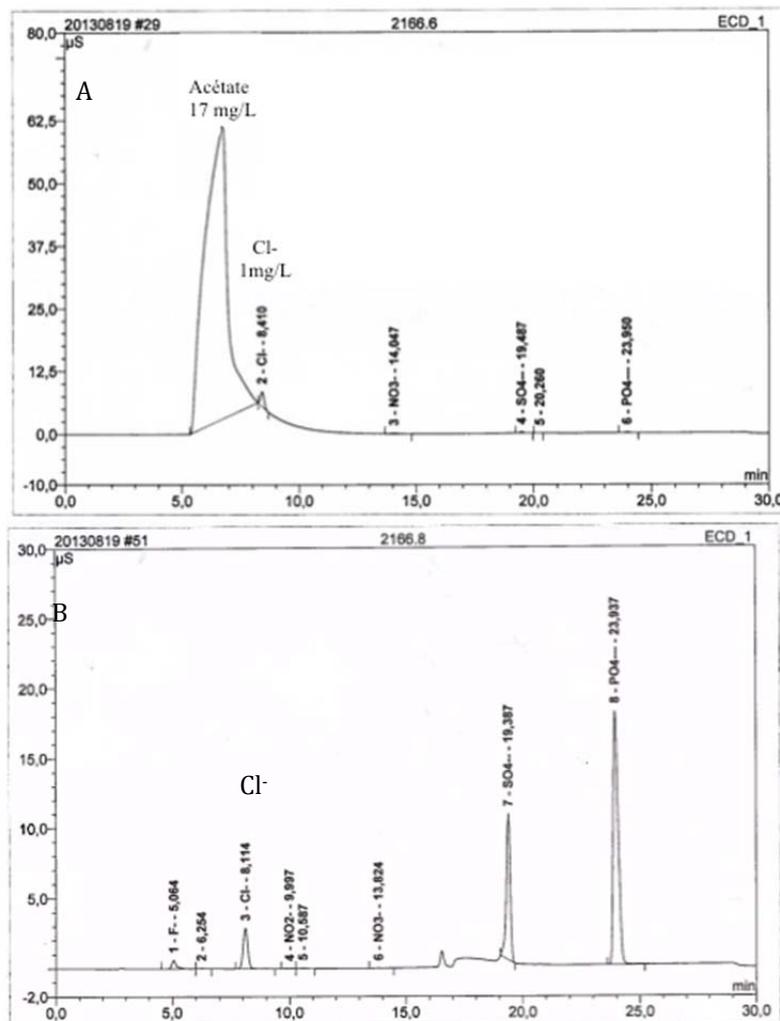


Figure 12. Chromatogrammes obtenus par analyse en chromatographie ionique d'une solution d'eau déionisée contenant 17 mg acétate/L et 1 mg Cl⁻/L (A) et de l'effluent du réacteur avant ajout de CLD dopé à 1 mg Cl⁻/L (B).

Cette mesure peut toutefois être gênée par la présence d'acétate (CH₃COO⁻) et de bicarbonate (HCO₃²⁻) qui en tant qu'anions devraient être détectés lors de l'analyse. Pour l'acétate, le problème pourrait se poser en entrée du réacteur car il est présent à 1 g/L dans le milieu de culture. La concentration résiduelle en DCO soluble en sortie du réacteur (49,5±11 mg/L) indique par contre que sa concentration ne devrait pas y dépasser 47 mg/L (DCO théorique acétate = 1,066 g O₂/g acétate). Le bicarbonate de son côté pourrait poser un problème en sortie du réacteur étant donné qu'avec le méthane, il s'agit de l'un des 2 produits finaux de la méthanisation des composés organiques. En première estimation, la méthanisation des sources de carbone présentes dans le milieu de culture serait susceptible de se traduire par une concentration de bicarbonate pouvant atteindre 1,5 g/L.

Afin de tester, la faisabilité de la mesure des chlorures dans ces conditions 2 échantillons ont été envoyés au LDA972 pour être analysés par chromatographie ionique. Le premier de ces échantillons correspond à une solution d'eau distillée contenant une concentration d'acétate de 17 mg/L et 1 mg Cl⁻/L. Le deuxième échantillon, correspond à l'effluent du

réacteur avant l'ajout de CLD. Ce dernier échantillon étant supposé ne pas contenir de chlorure il a été dopé avec 1 mg Cl⁻/L de façon à être au dessus de la LQ de 0,5 mg/L annoncée par le LDA972 et parce que cette concentration est dans la gamme des valeurs attendues en cas de déchloration de la CLD. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 12.

Ces résultats montrent que l'acétate élue juste avant les chlorures et qu'une concentration aussi faible que 17 mg/L perturbe énormément leur mesure. Dans ces conditions, il ne sera pas possible d'analyser l'entrée du réacteur au moyen de cette méthode à moins d'une forte dilution inenvisageable car le but de cette mesure serait seulement de confirmer l'absence d'une quantité mesurable de chlorure dans cette matrice qui est supposé n'en contenir que des traces (39 µg/L, Tab. 6). La Figure 12B montre par contre que la présence de bicarbonate n'affecte absolument pas la détection et la quantification des chlorures une fois que le milieu de culture a été méthanisé et qu'on n'y observe plus trace d'acétate. La concentration de chlorure donnée par cette méthode pour l'effluent du réacteur dopé avec 1 mg Cl⁻/L était de 1,356 mg Cl⁻/L. En première analyse, on pourrait en conclure que l'effluent contenait 0,356 mg Cl⁻/L avant dopage. En fait, en l'absence de CLD en entrée du système, la concentration en Cl⁻ attendue à la sortie du réacteur ne peut en principe être supérieure à celle amenée par les impuretés des réactifs utilisés pour la préparation du milieu de culture. La valeur de 0,356 mg Cl⁻/L est sans aucune mesure avec cette dernière (voir ci-dessus) et ne peut donc être considérée comme fiable. Cette valeur est en fait à mettre en perspective avec l'incertitude de 30% affichée pour la méthode pour un niveau de concentration de l'ordre de 1 mg/L. La LQ et l'incertitude élevées de l'analyse des chlorures par chromatographie ionique correspondent à un autre problème auquel nous sommes confrontés pour pouvoir appliquer cette méthode à notre cas où la production de Cl⁻ attendue en cas de déchloration de la CLD se situe dans un intervalle allant de 0 à 1,43 mg Cl⁻/L. Afin de résoudre ce problème, nous sommes en train d'étudier la possibilité de concentrer nos échantillons par exemple par évaporation à la chaleur ou à température ambiante sous vide. En ce qui concerne le contenu en chlorure du milieu de culture, nous envisageons de bruler à 600°C, les différents réactifs nécessaires à la production de plusieurs litres de milieu, à récupérer les cendres et à les resuspendre dans un petit volume d'eau déionisée qui sera par la suite analysée par chromatographie ionique. De cette façon, l'acétate qui gêne la mesure aura été éliminé.

Comme pour l'analyse de la CLD et de ses intermédiaires de dégradation, des échantillons prélevés au cours de l'opération du réacteur ont été stockés en attendant que les tests mentionnés ci-dessus soient effectués de façon à déterminer la façon optimale de procéder pour leur analyse par chromatographie ionique.

III. Bilan Publications et encadrement de stagiaires

Articles dans des revues internationales

Dolfing J., Novak I., Archelas A., Macarie H. (2012). Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environmental Science & Technology*, 46, 8313-8139

Articles dans des magazines de vulgarisation

Macarie H., Dolfing J. (2011). La chlordécone (CLD) est elle véritablement réfractaire à une dégradation microbienne ? *Les Cahiers du PRAM*, 9, 25-30, 91-95.
(<http://www.pram-martinique.org/actualite/Cahiers-pram-9-10.pdf>)

Communications avec articles dans Actes de congrès

Macarie H., Devault D., Sastre Conde I., Rangon L., Soler A., Labrousse Y., Charpy-Roubaud C., Roussos S., Guiral D., Dolfing J., Novak I. Archelas A., Woignier T. (2012). La chlordécone est elle biodégradable et biodisponible? Quelques considérations issues de la littérature et résultats expérimentaux préliminaires. In : **Actes du XXXI^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides** – 25-27 mai 2011, Orléans, France, Baran N. & Togola A. (Eds.), BRGM (ISBN 978-2-9530816-5-7, EAN : 9782953081657), 8 pages.

Communications invitées.

Macarie H., Dolfing J., Igor N., Archelas A., Labrousse Y. (2012). La chlordécone (CLD) est elle véritablement réfractaire à toute dégradation microbienne ? Ce que nous dit la littérature, une approche théorique et des résultats expérimentaux préliminaires. **Présentation effectuée aux Journées de la recherche chlordécone : Recherche agro-environnementale et états des milieux**, 24-25 octobre 2012, Schoelcher/Martinique, Gosier/Guadeloupe.

Poster avec article dans CD-ROM de congrès

Macarie H., Labrousse Y., Sastre-Conde I., Bristeau S., Mouvet C. (2013). Further evidence of biodegradability of the POP chlordecone under methanogenic conditions. In: **CD ROM Proceedings 13th World Congress on Anaerobic Digestion: recovering (bio)resources for the world**, 25-28 June 2013, Santiago de Compostela, Spain, Lema J.M., Fdez-Polanco F., Carballa M., Rodriguez J., Suárez S. (Eds.), (ISBN 978-84-695-7756-1), 2 pages.

Articles dans la presse

Des pistes contre la chlordécone - Biodégrader une question d'environnement. "Sciences au Sud", le journal de l'IRD, n°65 (31/07/2012), (<http://www.ird.fr/la-mediathèque/journal-sciences-au-sud/les-numeros-de-sciences-au-sud/n-65-juin-juillet-aout-2012/sciences-au-sud-n-65-recherches>)

Chlordécone : Les bactéries de l'espoir. Fey (Magazine Bimestriel Information Martinique) n°13, (Janvier 2011), (<http://s3.e-monsite.com/2011/02/11/06/Fey-Magazine-n-13.pdf>)

Biodégradation de la chlordécone : une solution envisageable ? « En Action » N° 10 (octobre 2011) – News Letter du PNAC

Emissions de radio et de télévision.

Godard E, Macarie H, Mouvet C, Woignier T. 2012. Interview à l'émission "Le tout info" de Radio Caraïbe Internationale sur "la remédiation des sols contaminés à la chlordécone" (http://www.rcimartinique.fm/podcasts/Letoutinfos_25-10-2012_18-41-44.mp3)

Macarie H. 2012. Interview dans le cadre de l'émission télévisé An Tjè Péyi A" d'ATV, dédié à la dépollution des sols chlordéconés (<http://www.atv.mq/emissions/32>)

Stagiaires encadrés

Aurélié Amic, Stage de 6 mois. Master SET 2^{ème} année, Spécialité Sciences de la Biodiversité et Ecologie, parcours professionnel « valorisation de la Biodiversité et des Bio-ressources » préparé à Aix-Marseille Université, année 2012-2013. Sujet de stage : « Etude de la biodégradation de la chlordécone, insecticide organochloré, en conditions méthanogéniques au moyen d'un réacteur de laboratoire : optimisation de la composition du

milieu de culture et mise au points des méthodes d'analyse permettant de suivre la dégradation ».

Pierre Feuardant, Stage d'1 mois. 2^{ème} Année Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques (ENSIACET), Toulouse. Sujet de stage : Suivi d'un réacteur de laboratoire alimenté avec de la chlordécone.

Annexe

Version publiée de l'approche théorique sur la biodégradation de la chlordécone et son devenir dans l'environnement

Dolfing, J.; Novak, I.; Archelas, A.; Macarie, H. Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 8131-8139.

Annexe 6

IRD UMR 180 MICROBIOTECH



IRD UMR 180 MICROBIOTECH

Bernard Ollivier

I. Expériences préliminaires

Dans un premier temps, 2 bactéries (*Desulfitobacterium dehalogenans* et *Mesotoga* sp) et deux archées méthanogènes (*Methanobacterium bryantii* et *Methanosarcina barkeri*) avaient été sélectionnées pour réaliser nos premières expériences sur la dégradation de la chloredécone (CLD). Les raisons de cette sélection en sont les suivantes : (i) *D. halogenans* est capable d'utiliser les organochlorés (chlorophénols) comme accepteur final d'électrons et peuvent donc potentiellement procéder à une déchloration réductive de ces composés (Utkin et al., 1994), (ii) *Mesotoga* sp. a été isolée pour la première fois dans notre laboratoire (Ben Hania et al., 2011) ; des clones environnementaux phylogénétiquement proches de *Mesotoga* avaient été repérés à plusieurs reprises dans des enrichissements anaérobies contenant des organochlorés (Nesbo et al., 2006 ; Nesbo et al., 2010), leur intervention dans ce processus de déchloration réductive n'étant pas connue à ce jour (iii) Les archées méthanogènes (e.g. *Methanosarcina thermophila*) se montreraient capables d'intervenir dans la dégradation de la CLD grâce probablement à la vitamine B12 qu'elles synthétisent au cours de la méthanogénèse (Jablonski et al., 1996 ; Dolfing et al. 2012). Concernant ces 4 microorganismes, des témoins d'expériences abiotiques et biotiques ont été mis en place pour chacun d'entre eux pour attester ou non de la dégradation de la CLD. La formation d'un doctorant de l'IRD (Wajgdi Ben-Hania) aux manipulations physico-chimiques impliquant la CLD, et toutes les analyses de CLD ont été réalisées au BRGM, sous la responsabilité de Sébastien Bristeau et Christophe Mouvet. Nous avons fait en sorte (appuis financiers d'autres contrats) tout au long de ce projet AIP/INRA de maintenir en place à Marseille Wajdi Ben Hania (aujourd'hui postdoctorant ; voir ci-dessus) pour que nous soyons assurés d'une certaine compétence dans la préparation des solutions mères et l'extraction de la chloredécone en sa présence. En effet, il aurait été difficile d'envoyer en formation à ces techniques délicates une personne par an au BRGM. C'est donc la même personne qui a réalisé toutes ces opérations au cours de ce contrat.



II. Résumé des résultats des expériences préliminaires

(a) L'ajout de la chloredécone

La meilleure façon que nous ayons trouvée pour ne pas nous heurter à des problèmes d'adsorption de CLD était de l'ajouter finalement en la diluant dans l'acétone, à raison de 2.5 mg dans 10 mL. Cette solution a été par la suite introduite dans les flacons à raison de 0.4 mL pour 100 mL de milieu de culture correspondant au final dans nos récipients à 1 mg/L de CLD. Dans ces conditions les résultats obtenus étaient satisfaisants (voir rapport précédent).

(b) L'extraction de la chloredécone

Nous nous sommes assurés au cours des expériences précédentes à ce que la chloredécone ne se fixe pas sur (i) quelques parties que ce soient des récipients, mais également (ii) directement sur les cellules bactériennes pour éviter de conclure trop rapidement quant à la dégradation de la CLD par les microorganismes testés. Une méthode d'extraction liquide-liquide modifiée a donc été aménagée et nous avons pris soin au mieux de nos possibilités à ce que la part de CLD contenue dans la phase dissoute et celle éventuellement retenue par la biomasse soient les plus parfaitement dosées (voir résultats précédents). Nous avons également vérifié que le dosage de la chloredécone n'était pas affecté par les processus d'autoclavage et que les microorganismes restaient viables malgré la présence d'acétone dans leur milieu de culture (voir résultats dans rapport précédent). Toutes ces expériences ont été réalisées sur de courtes périodes de temps, de l'ordre de 3 semaines.

(c) Réponses abiotiques et biotiques à l'ajout de chloredécone après 9 mois d'incubation à 37 °C

- *Mesotoga* sp. (donneur d'électrons : fructose)

Que ce soient pour les témoins biotiques ou abiotiques, on note une très forte diminution de la concentration en CLD. En présence de culture non stérilisée, il semblerait que les concentrations finales soient les plus basses. Cependant la forte ampleur des phénomènes abiotiques, ne nous a pas permis de conclure favorablement en ce qui concerne ce microorganisme.

- *Methanosarcina barkeri* (donneur d'électrons : méthanol + acetate)



Pour ce traitement, nous avons remarqué que ni les phénomènes abiotiques, ni les phénomènes biotiques intervenaient de manière significative dans la dégradation de la chloredécone. La concentration de cette molécule dans les différents milieux de culture après incubation de 9 mois reste d'ailleurs assez proche des valeurs rencontrées à T0 (début de l'expérience).

- *Methanobacterium bryantii* (donneur d'électrons : hydrogène)

Comme pour *Methanosarcina barkeri*, la composition physico-chimique du milieu de culture affecte peu/modérément la concentration en CLD après 9 mois d'incubation. Nous avons cependant remarqué un impact de l'hydrogène sur la disparition de la CLD pour deux traitements en présence de l'archée stérilisée et non stérilisée (les concentrations en CLD sont quasiment identiques dans les deux cas de figure). Nous n'avons pas pu conclure à une intervention biotique concernant ce microorganisme.

- *Desulfitobacterium dehalogenans* (donneur d'électrons : lactate)

Comme pour *Mesotoga* sp., la composition du milieu de culture (phénomène abiotique) a fortement impacté la disparition de la CLD. Nous avons noté néanmoins que c'était lorsque nous avons procédé à une inoculation (phénomène biotique) que les teneurs en CLD étaient les plus faibles. Ces dernières l'étaient d'autant plus après 9 mois d'incubation lorsque le lactate était apporté au milieu de culture.

Tenant compte des résultats obtenus ci-dessus, nous avons décidé de retester *Desulfitobacterium dehalogenans* dans les mêmes conditions expérimentales.

III. Le milieu de culture utilisé pour *Desulfitobacterium dehalogenans*

(par litre d'eau distillée): 1g NH₄Cl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 0.1g KCl, 0.2 g MgCl₂·6H₂O, 0.1g CaCl₂·2H₂O, 1g NaCl, 1g extrait de levure, 0.5g cysteine-HCl, 4.0g sodium sulfate, 0.16 g sodium acétate, sodium thiosulfate 20 mM, 1ml solution oligoéléments de Widdel [Widdel and Pfennig, 1982]. pH ajusté à 7, milieu préparé en anaérobiose sous N₂/CO₂. Le substrat/donneur d'électrons est le lactate (20mM). Les traitements réalisés sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Expériences conduites avec *Desulfitobacterium dehalogenans*

Code	Désignation
TA1	Témoin abiotique1
TA2	Témoin abiotique2
TA3	Témoin abiotique3
TALac 1	Témoin abiotique + lactate 1
TALac 2	Témoin abiotique + lactate 2
TALac 3	Témoin abiotique + lactate 3
CDesuS1	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée1
CDesuS2	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée2
CDesuS3	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée3
CDesuSLac1	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée+ lactate1
CDesuSLac2	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée+ lactate 2
CDesuSLac3	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée+ lactate 3
CDesu1	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 1
CDesu2	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 2
CDesu3	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 3
CDesuLac1	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + lactate 1
CDesuLac2	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + lactate 2
CDesuLac3	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + lactate 3

IV. Résultats et conclusion

Les expériences conduites une nouvelle fois avec *Desulfitobacterium dehalogenans* montrent après 3 mois et demi d'incubation que les conditions physico-chimiques du milieu de culture (phénomènes abiotiques) conduisent toujours à une disparition de la CLD (Tableau 2), mais de manière moins prononcée que lors d'une incubation plus longue (9 mois, voir rapport précédent). Le temps d'incubation impacterait donc la disparition de la CLD *via* des



processus abiotiques dans nos conditions de culture. Lorsque nous analysons les résultats rapportés dans le Tableau 2 (voir ci-dessous), les seuls traitements biotiques et abiotiques pour lesquels il existe une différence significative à la fois dans les concentrations en CLD, mais également en chlodécol (molécule correspondant à la déchloration de la CLD) sont ceux qui mettent en jeu la bactérie en l'absence de lactate mais dans un milieu qui contient néanmoins 1g/L d'extrait de levure (comparaison des échantillons 61, 62 et 63, Culture *Desulfitobacterium* stérilisée, avec les échantillons 67, 68 et 69, Culture *Desulfitobacterium*). Ces résultats ne sont cependant pas confirmés par l'ajout de lactate contrairement aux résultats obtenus précédemment. Cela pourrait être dû à une période d'incubation plus courte cette fois ci (3,5 mois au lieu de 9 mois la fois précédente). Il nous reste cependant à réfléchir sur les résultats obtenus en absence de lactate qui indiqueraient une possible implication de la bactérie dans la dégradation de la CLD. Si tel était le cas, on est en droit d'émettre l'hypothèse (à confirmer) que l'extrait de levure pourrait être une meilleure source de carbone et d'énergie que le lactate pour conduire à la réduction de la CLD. On pourrait également s'attendre à ce que des incubations plus longues (voir résultats précédents) conduisent à des résultats identiques à ceux obtenus en présence de lactate lors des expériences précédentes, en l'occurrence une disparition quasi-totale de la CLD. De l'ensemble de ces nouvelles données et des données précédentes, nous pouvons conclure que la composition du milieu et le temps d'incubation sont des facteurs importants dont on doit tenir compte dans l'interprétation des résultats qu'ils soient obtenus dans des conditions abiotiques ou biotiques. Par ailleurs, la disparition de la CLD en présence de *Desulfitobacterium dehalogenans* dans certains traitements, mérite très certainement d'être expliquée : fixation de la CLD au niveau des parois cellulaires, utilisation de la CLD dans le cadre de l'anabolisme et/ou du catabolisme, autres raisons ? sont autant de questions qui nous interpellent. Indépendamment de ces réflexions particulièrement liés à *Desulfitobacterium dehalogenans*, il est important de retenir que lors d'expériences précédentes, nous avons également remarqué que l'apport d'hydrogène pour les traitements où était impliquée *Methanobacterium bryantii* (culture de *M. bryantii* stérilisée et non stérilisée) conduisait aux concentrations en CLD les plus faibles et que dans ce cas de figure, il n'y avait aucune explication d'ordre biotique à relever.

V. Perspectives



L'ensemble des travaux que nous avons conduits avec 2 bactéries et 2 archées que nous avons présélectionnées, tentent à prouver que s'il existe une piste biologique plausible à la dégradation de la CLD dans notre cas de figure, c'est celle de *Desulfitobacterium dehalogenans* qui doit être retenue. Nous avons observé que non seulement les temps d'incubation courts (inférieurs à trois mois), mais également longs (supérieurs à trois mois) étaient à prendre en considération de manière plus précise lors nos expérimentations. En effet, ce ne sera qu'en ayant plus de données entre 0 et 9 mois (sur le court mais également le long terme) que l'on sera en mesure de comparer les vitesses de disparition de la CLD en condition abiotique à celles obtenues en condition biotique et conclure ou non sur le rôle réel joué par cette bactérie dans la dégradation de la CLD.

Tableau 2 : Nouvelle série d'expériences conduites avec *Desulfitobacterium dehalogenans* (analyse des composés chlorés réalisés par l'équipe du BRGM).

N° échantillon	Code		Désignation	Concentration THEORIQUE en CLD dans les 100ml du milieu de culture en mg/l *	Concentration RETROUVEE en CLD dans les 100ml du milieu de culture en mg/l **	Concentration RETROUVEE en chlordécone-5b-hydro dans les 100ml du milieu de culture en mg/l **	Concentration RETROUVEE en chlordécol dans les 100ml du milieu de culture en mg/l **
55	TA1	1	Témoins abiotique1	1,58	0,282	<LQ	0,012
56	TA2	2	Témoins abiotique2	1,50	0,470	<LQ	0,009
57	TA3	3	Témoins abiotique3	1,58	0,346	<LQ	0,007
58	TALac 1	4	Témoins abiotique + Lactate 1	1,61	0,379	<LQ	0,007
59	TALac 2	5	Témoins abiotique + Lactate 2	1,66	0,176	<LQ	0,003
60	TALac 3	6	Témoins abiotique + Lactate 3	1,72	0,391	<LQ	0,007
61	CDesuS1	7	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée1	1,66	0,427	<LQ	0,008
62	CDesuS2	8	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée2	1,61	0,251	<LQ	0,005
63	CDesuS3	9	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisée3	1,48	0,293	<LQ	0,007
64	CDesuSLac1	10	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisé+Lactate 1	1,65	0,189	<LQ	0,004
65	CDesuSLac2	11	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisé+ Lactate 2	1,52	0,214	<LQ	0,005
66	CDesuSLac3	12	Culture <i>Desulfitobacterium</i> stérilisé+ Lactate 3	1,55	0,175	<LQ	0,004
67	CDesu1	13	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 1	1,79	0,138	<LQ	0,003
68	CDesu2	14	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 2	1,42	0,159	<LQ	0,002
69	CDesu3	15	Culture <i>Desulfitobacterium</i> 3	1,62	0,120	<LQ	0,002
70	CDesuLac1	16	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + Lactate 1	1,83	0,289	<LQ	0,005
71	CDesuLac2	17	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + Lactate 2	1,56	0,167	<LQ	0,003
72	CDesuLac3	18	Culture <i>Desulfitobacterium</i> + Lactate 3	1,63	0,255	<LQ	0,004

IV. Références

- Ben Hania, W., Ghodbane, R., Postec, A., Brochier-Armanet, C., Hamdi, M., Fardeau, M.L., & Ollivier, B. (2011).** Cultivation of the first mesophilic representative ("mesotoga") within the order *Thermotogales*. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 581-585.
- Dolfing J., Novak I., Archelas A. & Macarie H. (2012)** Gibbs free energy of formation of chlordecone and potential degradation products: implications for remediation strategies and environmental fate. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 8131-8139.
- Jablonski P.E., Pheasant D.J. & Ferry J.G. (1996)** Conversion of Kepone by *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 169-173.
- Nesbo, C.L., Dlutek, M., Zhaxybayeva, O., & Doolittle, W.F. (2006).** Evidence for existence of "mesotogas," members of the order *Thermotogales* adapted to low-temperature environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5061-5068.
- Nesbo, C.L., Kumaraswamy, R., Dlutek, M., Doolittle, W.F., & Foght, J. (2010).** Searching for mesophilic *Thermotogales* bacteria: "mesotogas" in the wild. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 4896-4900.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1982).** Studies on dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol.* **131**: 360-365.



Centre scientifique et technique
Direction Eau, Environnement et Écotechnologies
3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34
www.brgm.fr