

# Etude de la dégradation biologique et chimique d'un pesticide persistant : la chlordécone

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée au Genoscope (CEA) et à l'Université d'Evry Val  
d'Essonne

École doctorale n°577 Structure et Dynamique des Systèmes  
Vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé –  
Chimie analytique

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 17 novembre 2017, par

**Marion Chevallier**

## Composition du Jury :

Magalie Jannoyer-Lesueur Directrice de Recherches, CIRAD, Montpellier	Présidente
Hélène Budzinski Directrice de Recherches CNRS, Université de Bordeaux	Rapporteuse
Gwenaël Imfeld Chargé de Recherches, Université de Strasbourg	Rapporteur
William Buchmann Maître de Conférences, Université d'Evry Val d'Essonne	Examineur
Elizabeth Edwards Professeur, Université de Toronto	Examinatrice
Denis Le Paslier Directeur de Recherches, CNRS-Genoscope (UMR 8030)	Directeur de thèse
Pierre-Loïc Saaidi Maître de Conférences, Université d'Evry Val d'Essonne	Co-encadrant de thèse

Numéro National de Thèse (NNT) : 2017SACLE033

Thèse de doctorat



# Remerciements

J'ai mené avec plaisir ces trois années de cette thèse et pour cela, je tiens à remercier :

Pierre-Loïc, pour son investissement dans l'encadrement de ma thèse. La diversité de tout ce que j'ai pu apprendre tient à tes nombreuses idées et je suis heureuse d'avoir pu en profiter. Merci d'avoir cru en ma motivation pour travailler sur ce projet et de m'avoir apporté les connaissances pour le permettre. Je n'aurai pu demander mieux pour une formation dans le domaine de la chimie environnementale quand je suis arrivée au Genoscope.

Denis, pour ton accueil dans l'équipe, ta disponibilité et l'attention que tu as porté au déroulement de ma thèse. Merci pour la confiance qui tu m'as accordée, ton enthousiasme et ta sympathie.

Merci à Hélène Budzinski, Gwenaël Imfeld, William Buchmann, Elizabeth Edwards et Magalie Jannoyer-Lesueur pour leur investissement dans l'évaluation de ma thèse en tant que jury et les discussions au cours de la soutenance.

Sébastien, Agnès, Nuria, Delphine, Edgardo et Loïc, pour faire avancer le projet à mes côtés et pour la bonne humeur au sein de l'équipe.

Jean Weissenbach et Marcel Salanoubat, merci de m'avoir acceptée au Genoscope et de m'avoir soutenue dans ce projet.

Lorenz Adrian, Myriel Cooper, Steffen Kümmel, Hans Richnow, nos collaborateurs de Leipzig de m'avoir intégrée dans leur équipe et pour nos travaux de fractionnement isotopique. J'espère travailler à nouveau rapidement avec vous.

Olivier Loreau, David Buisson, Céline Chollet et Frédéric Taran qui m'ont initiée aux manipulations avec la chlordécone radioactive, et qui se sont montrés disponibles et attentifs à mes travaux.

Sophie Peulon, pour mes premiers pas en électrochimie. Merci aussi pour ton écoute et tes conseils.

Merci à Florian, Eddy, Grégoire et Tiphonie, stagiaires sur le projet chlordécone qui se sont investis et ont obtenu des résultats qui ont contribué à l'avancée de mes travaux de thèse.

Merci à tous mes collègues : Ombeline, Katia, Thomas Be., Pascal, Christine, Cécile, Nadia, Tiffany, Lucille, Tristan, Marion, Jean-Louis, Oriane, Chloé, Nathalie, Peggy, Emilie, Gabor, Anne Z., Carine, Volker, Madeleine, Anne B., Laurence, Thomas Br., Christophe, Sophia, Olexei, Sawsan, Ghani, Véronique, Andrew, Jacqueline, Isa, Magali... et tous ceux que j'oublie pour rendre la vie au Genoscope si agréable.

Enfin, merci à Myke, Elise, Marvin, Lucie, Minh, Odilon, mes parents, ma famille et mes amis, qui me soutiennent au quotidien et qui sont tous, c'est certain, passionnés par la chlordécone.



# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>31</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART : CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL DE LA POLLUTION A LA CHLORDECONE DANS LES ANTILLES FRANÇAISES</b>	<b>33</b>
<b>Introduction</b>	<b>34</b>
<b>I. Présentation de la molécule</b>	<b>35</b>
A. Propriétés chimiques	35
B. Equilibres impliquant la chlordécone	35
C. Détection et dosage	36
D. Voie de synthèse	37
<b>II. Historique de la chlordécone</b>	<b>38</b>
A. Utilisation de la chlordécone, du Mirex® et du Kelevan comme pesticides	38
B. L'incident d'Hopewell et l'interdiction de l'usage de la chlordécone aux Etats-Unis	39
C. Les dérogations pour l'utilisation de la chlordécone et la pollution des sols aux Antilles	39
D. Conséquences socio-économiques de la pollution à la chlordécone des Antilles françaises	39
<b>III. Contamination environnementale à la chlordécone</b>	<b>40</b>
A. Contamination des sols et de l'eau	40
B. Contamination de la chaîne alimentaire	42
<b>IV. Toxicité : dangers connus ou suspectés et mécanismes associés</b>	<b>44</b>
A. Métabolisme et toxicocinétique de la chlordécone	44

B.	Dangers connus et suspectés	45
<b>V.</b>	<b>Dégradation de la chlordécone dans l'environnement et métabolites associés</b>	<b>47</b>
A.	Dégradation microbiologique de la chlordécone	47
B.	Transformation chimique de la chlordécone	48
C.	Transformation thermique de la chlordécone	52
D.	Toxicité des produits de transformation	53
E.	Dégradation chimique du Mirex	54
<b>VI.</b>	<b>Perspectives pour la transformation chimique de la chlordécone</b>	<b>54</b>
A.	Présentation des complexes métalliques décrits dans les transformations chimiques de polluants organochlorés	55
B.	Implication de la vitamine B <sub>12</sub> pour l'étude du mécanisme de transformation de polluants organiques chlorés : travaux antérieurs	57
<b>VII.</b>	<b>Conclusions et objectifs de la thèse</b>	<b>58</b>

## **CHAPITRE 2 : TRANSFORMATION TOTALE DE LA CHLORDECONE PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE, ISOLEMENT DE CONSORTIA BACTERIENS ET DE SOUCHES DE *CITROBACTER* ET ANALYSE DES METABOLITES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 63**

	<b>Introduction</b>	<b>64</b>
<b>I.</b>	<b>Identification d'une transformation totale de la chlordécone en présence de bactéries</b>	<b>65</b>
A.	Recherche de bactéries dégradant la chlordécone	65
B.	Découverte de consortia bactériens à l'origine d'une transformation totale de la chlordécone	65
C.	Isolement de bactéries du genre <i>Citrobacter</i> transformant la chlordécone	66
D.	A la recherche d'enzyme liées à la transformation de la chlordécone	67
<b>II.</b>	<b>Définition des termes employés pour décrire la transformation observée au Genoscope</b>	<b>68</b>
<b>III.</b>	<b>Etude des métabolites par couplage chromatographie-spectrométrie de masse</b>	<b>69</b>
A.	Détermination des formules brutes par LC-Orbitrap-MS	71
B.	Structures des métabolites d'après leur fragmentation en GC-MS (familles A et B) et en LC-MS (famille C)	72
<b>IV.</b>	<b>Etude des métabolites par spectrophotométrie</b>	<b>84</b>
A.	Absorption des métabolites apolaires	84
B.	Absorption des métabolites polaires	86
	<b>Conclusion</b>	<b>88</b>

## **CHAPITRE 3 : TRANSFORMATIONS PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE DE LA CHLORDECONE : PURIFICATION DES PRINCIPAUX METABOLITES 89**

<b>Introduction</b>	<b>90</b>
<b>I. Etude de la libération d'ions chlorures dans le milieu réactionnel</b>	<b>91</b>
A. Etude de faisabilité de la détection d'ions chlorures supposés libérés au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone	91
B. Suivi de la concentration des ions chlorures dans le milieu au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone	93
<b>II. Purification des métabolites majoritaires détectés dans le milieu réactionnel</b>	<b>96</b>
A. Extraction des métabolites	96
B. Etude préliminaire de la séparation des métabolites par chromatographie sur couche mince	97
C. Séparation des métabolites apolaires des autres familles de métabolites	98
D. Deuxième étape de purification par chromatographie en phase inverse	99
E. Extrapolation des proportions des métabolites par comparant les signaux des chromatogrammes (LC-MS et GC-MS) en fin de transformation	105
<b>Conclusion</b>	<b>107</b>

## **CHAPITRE 4 : PRODUCTION PAR VOIE CHIMIQUE ET PURIFICATION DES PRODUITS DE TRANSFORMATION DE LA CHLORDECONE 109**

<b>Introduction</b>	<b>110</b>
<b>I. Synthèse chimique des différentes familles de métabolites : criblage des conditions de réaction</b>	<b>111</b>
A. Transformations par voie chimique de la chlordécone et d'autres pesticides chlorés précédemment décrites	111
B. Criblage des conditions réactionnelles	112
<b>II. Production et purifications des composés de la famille A</b>	<b>114</b>
A. Conditions favorisant la production du monohydrochlordécone A1	114
B. Conditions chimiques favorisant la production d'autres hydrochlordécones	117
C. Extraction des hydrochlordécones	126
D. Purification par phase normale	126
E. Purification par phase inverse	126
F. Purification finale	127

<b>III. Production et purification des composés de la famille B</b>	<b>128</b>
A. Conditions favorisant l'obtention des polychloroindènes	128
B. Montée en échelle pour la production sélective des polychloroindènes	129
C. Extraction des polychloroindènes	130
D. Séparation par HPLC préparative	131
E. Purification finale	133
<b>IV. Production et purification des composés de la famille C</b>	<b>133</b>
A. Conditions favorisant l'obtention des composés polaires	133
B. Conversion de la chlordécone en composés polaires à grande échelle	133
C. Extraction des composés polaires	135
D. Séparation des composés polaires	135
E. Purification finale	136
<b>Conclusion</b>	<b>137</b>

## **CHAPITRE 5 : ELUCIDATION STRUCTURALE DES COMPOSES OBSERVES AU COURS DES TRANSFORMATIONS MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DE LA CHLORDECONE**

<b>Introduction</b>	<b>140</b>
<b>I. Elucidation structurale complète des hydrochlordécones : attribuer la position des atomes d'hydrogène et de chlore sur la structure bishomocubane</b>	<b>141</b>
A. Elucidation structurale du métabolite A1	141
B. Confirmation de la structure 8-monohydrochlordécone pour le métabolite A2	144
C. Elucidation structurale du métabolite A3	147
D. Equivalence des spins dans les molécules qui présentent un élément de symétrie	148
<b>II. Elucidation structurale des polychloroindènes</b>	<b>149</b>
A. Etude par RMN des chloroindènes : placement des atomes de chlore et des protons du métabolite B1	149
B. Elucidation structurale du métabolite B2	157
C. Elucidation structurale du composé B3	160
<b>III. Elucidation structurale des composés de la famille C</b>	<b>165</b>
A. Elucidation structurale des métabolites C1 et C2	166
B. Elucidation structurale du métabolite C3 et C4	171
C. Elucidation structurale du métabolite C5 et C6	174
D. Elucidation structurale des métabolites C7 et C8	175

E. Position de la fonction acide carboxylique sur la structure indène pour les composés Ci avec i = 1 à 8	178
<b>Conclusion</b>	<b>181</b>
 <b>CHAPITRE 6 : ETUDE DES VOIES DE TRANSFORMATIONS MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DE LA CHLORDECONE</b>	 <b>183</b>
<b>Introduction</b>	<b>184</b>
 <b>I. Rôle des catalyseurs et des agents réducteurs au cours des transformations chimiques de la chlordécone</b>	 <b>185</b>
A. Catalyseurs chimiques	185
B. Etude du potentiel d'oxydoréduction des transformations chimiques de la chlordécone	189
 <b>II. Place des métabolites au cours des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone</b>	 <b>202</b>
A. Etude de la distribution isotopique des métabolites produits à partir de la chlordécone marquée au carbone <sup>13</sup> C	202
B. Transformation microbiologiques et chimiques des métabolites isolés	211
C. Discussion des voies de transformation de la chlordécone par voie microbiologique	217
<b>Conclusion</b>	<b>219</b>
 <b>CHAPITRE 7 : ETUDE DU FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE AU COURS DES TRANSFORMATIONS PAR VOIE MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DE LA CHLORDECONE</b>	 <b>221</b>
<b>Introduction</b>	<b>222</b>
<b>Résumé</b>	<b>224</b>
Approche des mécanismes par l'étude du fractionnement isotopique	224
Possibilité d'évaluer la dégradation dans les sols par l'étude du fractionnement isotopique	227
<b>Conclusion</b>	<b>229</b>
<b>Article soumis à Environmental Science and Technology</b>	<b>230</b>
 <b>CHAPITRE 8 : MATERIEL ET METHODES</b>	 <b>254</b>
<b>I. Protocoles généraux et équipements</b>	<b>255</b>

A. Généralités	255
B. Instruments et méthodes et instruments d'analyses	255
C. Protocole d'extraction pour les suivis	262
<b>II. Expériences microbiologiques et chimiques</b>	<b>263</b>
A. Expériences de transformation de la chlordécone et de ses métabolites à petite échelle (de 0,5 à 5 mg de chlordécone ou métabolite engagés)	263
B. Expériences à grande échelle (de 5,0 mg à 1 g de chlordécone ou de métabolites engagés)	270
<b>III. Purifications</b>	<b>272</b>
A. Purification du métabolite B1 depuis la culture microbiologique (consortium 86)	272
B. Purification des métabolites C1 et C2 depuis la culture microbiologique (consortium)	273
C. Purification du métabolite A1 depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le sulfure de sodium	274
D. Purification des métabolites A2 et A3 depuis la transformation par voie photochimique de la chlordécone	275
E. Purification des métabolites B1, B2 et B3 depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le citrate de titane (III)	276
F. Purification du métabolite <sup>13</sup> C-B1 issu de la transformation par voie chimique de la <sup>13</sup> C-chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le citrate de titane(III)	277
G. Purification des métabolites Ci (i = 1 à 4) et des composés Cj (j = 5 à 8) depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le fer zéro valent	278
<b>IV. Analyses structurales des métabolites et produits de transformation</b>	<b>279</b>
A. Expériences d'hydrodéhalogénéation du métabolite B1	279
B. Analyses structurales par résonance magnétique nucléaire	279
<b>VI. Montage électrochimique pour les suivis de potentiel</b>	<b>281</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>284</b>
I. Etude des métabolites issus des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone	284
II. Etude des voies de transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone	286
III. Dosage de la chlordécone, de ses métabolites et perspectives environnementales	288
<b>POUR VOUS FAIRE UN DESSIN...</b>	<b>292</b>

**BIBLIOGRAPHIE**

**294**

**ANNEXES**

**308**



# Liste des abréviations

APCIC : Acide PolyChloroIndène Carboxylique

BRGM : Bureau des Ressources Géologiques et Minières

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CID : Collision Induced Dissociation (Dissociation Induite par Collision)

CLD : Chlordécone

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DCM : DiChloroMéthane

DEDL : Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière

EI : Electronic Impact (Impact Electronique)

éq. : équivalent molaire

ESI : ElectroSpray Ionisation (Ionisation par ElectroSpray)

FID : Flame Ionization Detector (Détecteur à Ionisateur de Flamme)

FWHM : Full Width at Half Maximum (Largeur à Mi-Hauteur)

GC : Gas Chromatography (Chromatographie en Phase Gazeuse)

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression/Performance

IR : Infra Rouge

IRMS : Isotope Ratio Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique)

ISCR : In Situ Chemical Reduction (Réduction Chimique In Situ)

LC : Liquid Chromatography (Chromatographie en Phase Liquide)

MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation

MS : Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)

NIRS : Near Infra Red Spectroscopy (Spectroscopie de Réflectance dans le Proche Infra-Rouge)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCI : Polychloroindène

POP : Polluant Organique Persistant

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAU : Surface Agricole Utile

SIM : Selected Ion Monitoring (Détection d'Ion Sélectionné)

TOF : Time Of Flight (Temps de Vol)

UEVE : Université d'Evry Val d'Essonne

UMR : Unité Mixte de Recherche

USA : United States of America (Etats Unis d'Amérique)

UV : Ultra Violet

# Liste des figures

Figure 1 : Evènements marquants dans l'historique de la chlordécone .....	32
Figure 2 : Structure chimique de la chlordécone (C <sub>10</sub> Cl <sub>10</sub> O) anhydre .....	35
Figure 3 : Equilibre d'hydratation et d'acidité de la chlordécone.....	35
Figure 4 : Equilibre d'hémiacétalisation de la chlordécone en présence d'un alcool (R= Me, Et). .....	36
Figure 5 : Voie de synthèse simplifiée de la chlordécone (Epstein, 1978).....	37
Figure 6 : Charançon du bananier ( <i>Cosmopolites sordidus</i> ) (Photographie de D. Martire).....	38
Figure 7 : Structure du Mirex (a) et du Kelevan (b). .....	38
Figure 8 : Cartographie de la présence de chlordécone dans les sols de Guadeloupe (a) et de Martinique (Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2011). .....	41
Figure 9 : Modélisation de l'élimination naturelle de la chlordécone dans les sols par lessivage et percolation pour Basse-Terre, Guadeloupe (Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2011).....	42
Figure 10 : Classification des cultures selon leur sensibilité à la contamination par la chlordécone (Jannoyer- Lesueur, 2017).....	44
Figure 11 : Métabolisation de la chlordécone dans le foie humain. ....	45
Figure 12 : Métabolisation probable de la chlordécone dans le foie (Fariss <i>et al.</i> , 1980). ....	45
Figure 13: Réduction de (a) la chlordécone en chlordécol avec NaBH <sub>4</sub> (Fariss <i>et al.</i> , 1982) et (b) des dérivés mono- et dihydrochlordécone en (respectivement) mono- et dihydrochlordécol avec Zn(BH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (Fariss <i>et al.</i> , 1982). ....	49
Figure 14 : Mécanisme simplifié de la réduction thermique de Meerwein-Ponndorf-Verley (tiré et adapté de (Soine <i>et al.</i> , 1983)) .....	49
Figure 15 : Réduction et déchloration complète de la chlordécone (tiré et adapté de (Dilling <i>et al.</i> , 1967)) ...	50
Figure 16 : Réarrangement de Favorskii (tiré et adapté de (Scherer <i>et al.</i> , 1966)). ....	50
Figure 17 : Ouverture de la structure bishomocubane du Mirex (Dilling <i>et al.</i> , 1967).....	50
Figure 18 : Structures hydrochlordécone (a) et chloroindène (b).....	51
Figure 19 : Etapes proposées pour la formation des chloroindènes depuis la structure cage de la chlordécone (tiré et adapté de (Schrauzer & Katz, 1978)). ....	52
Figure 20 : Structure de l'octachloroindène. ....	52
Figure 21 : Structure chimique des noyaux (a) pyrrole, (b) 1-pyrroline, (c) corrine, présents dans les structures cobalamine comme la vitamine B <sub>12</sub> , (d) porphyrine, présent dans l'hématine et (e) chlorine, présent dans les chlorophylles. ....	55
Figure 22 : Ligands axiaux possibles du cobalt et dénomination de la cobalamine (vitamine B <sub>12</sub> ) en fonction du ligand.....	55
Figure 23 : Structure chimique des catalyseurs utilisés dans les réactions chimiques de transformation de la chlordécone (a) vitamine B <sub>12</sub> , (b) hématine et (c) chlorophylle a. R pouvant être chacun des groupements présentés en Figure 22. ....	56

Figure 24 : Différents mécanismes de réduction du tétrachlorure de carbone proposés en présence de citrate de titane(III) et de vitamine B <sub>12</sub> (tiré et adapté de (Lewis <i>et al.</i> , 1996)).	57
Figure 25 : Etudes abordées dans la thèse et chapitres associés.	61
Figure 26 : Suivi en GC-MS au cours du temps de la transformation de la chlordécone en anaérobiose en présence du consortium bactérien 86 (tiré et adapté de Chaussonnerie <i>et al.</i> , 2016).	66
Figure 27 : Suivi en LC-MS au cours du temps de la transformation de la chlordécone en anaérobiose en présence du consortium bactérien 86.	66
Figure 28 : Spectre de masse de la chlordécone obtenue en GC-MS par impact électronique (EI) (70 eV). L'ion moléculaire est indiqué en vert.	72
Figure 29 : Analyse du massif isotopique compris entre m/z 270 et 278.	73
Figure 30 : Profil d'ionisation et de fragmentation privilégiée de la chlordécone.	73
Figure 31 : Perte d'un radical chlore Cl <sup>•</sup> par un fragment.	74
Figure 32 : (a) Plan de symétrie transversal et (b) longitudinal de la chlordécone déshydratée.	74
Figure 33 : Structure des quatre monohydrochlordécones. L'atome de carbone portant l'atome d'hydrogène est numéroté selon la nomenclature IUPAC de la chlordécone (Figure 34). Le 8-monohydrochlordécone est une molécule chirale.	75
Figure 34 : Nomenclature IUPAC de la CLD.	75
Figure 35 : Fragmentation caractéristique des monohydrochlordécones.	75
Figure 36 : Spectre de masse du métabolite A1 (GC-EI-MS mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.	76
Figure 37 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A1.	76
Figure 38 : Spectre de masse du métabolite A2 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.	77
Figure 39 : Structure chimique du métabolite A2.	77
Figure 40 : Spectre de masse du métabolite A3 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.	78
Figure 41 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A3.	79
Figure 42 : Spectre de masse du métabolite A4 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.	79
Figure 43 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A4.	80
Figure 44 : Spectre de masse du métabolite A5 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.	80
Figure 45 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A5.	80
Figure 46 : Spectre de masse du métabolite B1 (GC-EI-MS en mode positif).	81
Figure 47 : Spectre de masse du métabolite B2 (GC-EI-MS en mode positif).	81
Figure 48 : Spectre de masse du métabolite B3 (GC-EI-MS en mode positif).	81
Figure 49 : Spectre de masse de l'indène (GC-EI-MS en mode positif).	82
Figure 50 : Spectre de masse du métabolite C1 par ionisation en électrospray (ESI).	83

Figure 51 : Spectre de masse du métabolite C2 par ionisation en électrospray (ESI). .....	83
Figure 52 : Spectre de masse du métabolite C3 par ionisation en électrospray (ESI). .....	83
Figure 53 : Spectre de masse du métabolite C4 par ionisation en électrospray (ESI). .....	83
Figure 54 : Profil chromatographique des composés C1, C2, C3 et C4 en LC-MS avec détail du profil chromatographique de chaque ion observé dans le spectre de masse du composé ([M-H] <sup>-</sup> , [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> et [M-H-CO <sub>2</sub> -HCl] <sup>-</sup> ) .....	84
Figure 55 : Spectres d'absorption dans l'UV des composés B1 (a), B2 (b) et B3 (c). Les spectres d'absorption sont présentés entre 200 et 320 nm car aucune absorbance n'est observée entre 320 et 600 nm. ....	85
Figure 56 : Structure indène. ....	86
Figure 57 : Structure pentachloroindène proposée pour le métabolite B1 (a) et tétrachloroindène proposée pour les métabolites B2 et B3 (b). ....	86
Figure 58 : Spectres d'absorption dans l'UV des composés C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d). ....	87
Figure 59 : (a) Structures acide tétrachloroindènedicarboxylique proposée pour les métabolites C1 et C2 et (b) acide trichloroindènedicarboxylique pour les métabolites C3 et C4. ....	87
Figure 60 : Bilan des atomes de chlore libérés pour chaque métabolite détecté au cours de la transformation de la chlordécone. ....	92
Figure 61 : Concentration en ions chlorures dans le milieu de culture au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone par le consortium bactérien 86. ....	93
Figure 62 : Concentration en ions chlorures dans le milieu de culture au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	94
Figure 63 : Nombre d'atomes de chlore moyen perdus par la chlordécone au cours de la transformation microbiologique avec le consortium bactérien 86 et la bactérie <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	94
Figure 64 : Chromatogramme GC-MS de l'extrait de culture. ....	96
Figure 65 : Elution des métabolites issus de la dégradation microbiologique de la chlordécone en chromatographie sur couche mince. Pour chaque condition d'élution, les dépôts contiennent tous les composés mais sont représentés décalés pour une meilleure lisibilité. (a) Elution avec le mélange pentane/acétone 4 :1 v/v sur silice, (b) élution par l'heptane pur sur silice et (c) élution par le mélange THF/méthanol/eau 3 :1 :1, v/v sur C18. ....	98
Figure 66 : Séparation des familles de métabolites sur colonne de gel de silice : gradient (traits pointillés noir) du pourcentage du solvant B (mélange chloroforme/acétone (1:1, v/v) en complément du solvant A (heptane) et plages de sortie des familles (rouge : composés apolaires, bleu : chlordécone et hydrochlordécones et violet : composés polaires). ....	99
Figure 67 : Chromatogramme de la séparation des métabolites B1 et B3 en HPLC analytique sur colonne C18 X-bridge (150 x 4,6 mm) (détection UV-visible par barrette de diodes). ....	100
Figure 68 : Suivi en UV (200 et 270 nm) de la purification par HPLC préparative de B1 et B3. ....	100
Figure 69 : Détection des hydrochlordécones et des métabolites polaires en LC-Orbitrap-MS. Gradient (traits pointillés rouge) du pourcentage d'acétonitrile en complément du tampon NH <sub>4</sub> OAc (10mM, pH 7). La	

chlordécone et les hydrochlordécones sont représentés en vert et bleu respectivement tandis que les métabolites polaires sont représentés en violet.....	101
Figure 70 : Purification par HPLC préparative des composés polaires des hydrochlordécones et par HPLC préparative suivi aux longueurs d'onde 230 et 270 nm. Pointillés bleus : % du solvant A (tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7)) et pointillés violet : % du solvant B (acétonitrile).....	101
Figure 71 : Purification par HPLC préparative des composé polaires C1 et C2 suivi aux longueurs d'ondes 230 et 270 nm avec un zoom sur les composés d'intérêt. Pointillés bleus : % du solvant A (tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7) et pointillés violet : % du solvant B (acétonitrile). ....	102
Figure 72: chromatogrammes LC-MS des fractions C1 et C2 obtenues lors de la purification en HPLC préparative : (a) premier pic nommé « C1 » sur le spectre UV supérieur en Figure 71, (b) deuxième pic, nommé « C2 » sur le spectre UV en Figure 71.....	102
Figure 73 : Schéma récapitulatif des étapes développées pour la purification des métabolites B1 et C1-C2, appliquées au milieu réactionnel microbiologique à l'issue de la transformation quasi- totale de la chlordécone par le consortium 86.....	104
Figure 74 : Comparaison des aires des métabolites B3 et B1 d'après un chromatogramme obtenu par analyse GC-MS suite à la transformation totale de la chlordécone.....	105
Figure 75 : Comparaison des aires des métabolites C3-C4 et C1-C2 d'après un chromatogramme LC-ESI-MS suite à la transformation totale de la chlordécone. ....	106
Figure 76 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de sulfure de sodium après extraction liquide-liquide (30 heures, totale).....	115
Figure 77 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de sulfure de sodium (30 heures, totale).....	115
Figure 78 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC- IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le sulfure de sodium (30 heures, totale).....	115
Figure 79 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de Na <sub>2</sub> S après extraction liquide-liquide (30 heures, totale). .....	116
Figure 80 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-FID au cours de la transformation de la chlordécone avec l'hématine et Na <sub>2</sub> S (30 heures, totale). ....	116
Figure 81 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de chlorophylle et de sulfure de sodium après extraction liquide-liquide (48 heures, partielle).....	117

Figure 82 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale).	118
Figure 83 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (3 jours, totale).	118
Figure 84 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A1 et A5) par GC-FID au cours de la transformation par voie photochimique de la chlordécone.	118
Figure 85 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (2 mois, totale).	119
Figure 86 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent (2 mois, totale).	119
Figure 87 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec le fer zéro valent (transformation suivie sur 5 semaines, partielle).	120
Figure 88 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (5 jours, totale).	121
Figure 89 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de fer zéro valent (5 jours, totale).	121
Figure 90 : Spectre de masse du métabolite C5 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.	121
Figure 91 : Spectre de masse du métabolite C6 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.	122
Figure 92 : Spectre de masse du métabolite C7 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.	122
Figure 93 : Spectre de masse du métabolite C8 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.	122
Figure 94 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (2 semaines, totale).	123
Figure 95 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> après extraction liquide-liquide (30 heures, partielle).	123

Figure 96 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A1 et A5) par GC-FID au cours de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> après extraction liquide-liquide (30 heures, partielle). .....	123
Figure 97 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de citrate de titane après extraction liquide-liquide (3 heures, totale). .....	124
Figure 98 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la photolyse de la chlordécone après extraction liquide-liquide (3 heures, totale). .....	125
Figure 99 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A2 et A3) par GC-IRMS au cours de la photolyse de la chlordécone. ....	125
Figure 100 : Chromatogrammes LC-Orbitrap-MS (TIC) de la séparation de la chlordécone et du composé A1 par (a) le gradient 1 (eau /acétonitrile), (b) l'isocratique à 63% d'acétonitrile et (c) l'isocratique à 59% d'acétonitrile.....	127
Figure 101 : Chromatogramme de la purification du composé A1 en HPLC préparative avec détection au DEDL. ....	127
Figure 102 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale).....	128
Figure 103 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de citrate de titane(III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale). ....	129
Figure 104 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec la vitamine B <sub>12</sub> et le citrate de titane(III) (2 heures, totale).....	129
Figure 105 : Profil de séparation des composés B1, B2 et B3 en LC-Orbitrap-MS sur colonne C18 à l'aide d'isocratiques eau/acétonitrile : (a) 25:75, (b) 30:70 et (c) 35:65. Le profil UV aux longueurs d'onde retenues pour le suivi en HPLC préparative est présenté à chaque fois. ....	132
Figure 106 : Purification par HPLC préparative des polychloroindènes sur colonne C18 (isocratique eau/acétonitrile 30 :70 ; débit de 25ml/min ; longueurs d'onde 225 et 268 nm). ....	132
Figure 107 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone (100 mg, 2,0 10 <sup>-4</sup> mol) en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de fer zéro valent (398 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.....	134
Figure 108 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la	

transformation de la chlordécone (100 mg, $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol) en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de fer zéro valent (796 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.....	134
Figure 109 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone (100 mg, $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol) en présence de vitamine B <sub>12</sub> et de fer zéro valent (1194 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.....	135
Figure 110 : Purification par HPLC préparative des composés polaires Ci (i=1 à 8) sur colonne C18 (gradient 3 ; longueurs d'onde 228 et 268 nm). * indique les composés non présents dans les transformations par voie microbiologique.....	136
Figure 111 : Schéma récapitulatif de la production et la purification optimisées des composés A1-3, B1-3 et C1-8. ....	138
Figure 112 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du métabolite A1 (acétone-d <sub>6</sub> , 300 MHz.) .....	141
Figure 113 : Plans de symétrie et atomes de carbone équivalents des 9- et 10-monohydrochlordécones. Les atomes de carbone auréolés d'une même couleur sont attendus équivalents en RMN <sup>13</sup> C.....	142
Figure 114 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du métabolite A1 (acétone-d <sub>6</sub> , 75 Hz).....	142
Figure 115 : Structure 10-monohydrochlordécone du métabolite A1. ....	143
Figure 116 : Analyse bidimensionnelle HSQC du métabolite A1 (acétone-d <sub>6</sub> ). ....	143
Figure 117 : Analyse bidimensionnelle HMBC du métabolite A1 (acétone-d <sub>6</sub> ). ....	143
Figure 118 : Structure 10-monohydrochlordécone du métabolite A1 et corrélations à courte distance (vert) et longue distance (rouge) entre atomes de carbone et protons.....	144
Figure 119 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé A2 (acétone-d <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	145
Figure 120 : Structure 8-monohydrochlordécone du composé A2. Les protons Hb et Hb' sont positionnés arbitrairement.....	145
Figure 121 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé A2 (acétone-d <sub>6</sub> , 150 MHz). ....	145
Figure 122 : Analyses bidimensionnelle HSQC (a) et HMBC (b) du métabolite A2 (acétone-d <sub>6</sub> ) ; couplages directs (verts) et couplages indirects (rouge).....	146
Figure 123 : Structure 8-monohydrochlordécone du métabolite A2 et corrélations à courte distance (vert) et longue distance (rouge) entre atomes de carbone et protons. Les protons Hb et Hb' ne sont pas distingués.....	146
Figure 124 : Nomenclatures de numérotation des atomes de carbone de la structure bishomocubane de la chlordécone. ....	147
Figure 125 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé A3 (acétone-d <sub>6</sub> , 150 MHz). ....	148
Figure 126 : Axe de symétrie C1 (rotation de 180°) du 2,8-dihydrochlordécone rendant les protons portés par les carbones 2 et 8 équivalents. ....	148
Figure 127 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé B1 (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz).....	150
Figure 128 : Expérience bidimensionnelle COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H du métabolite B1 (CDCl <sub>3</sub> ) .....	150
Figure 129 : Numérotation des carbones de la structure indène. ....	150

Figure 130 : Structures proposées pour le composé B1.....	151
Figure 131 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du composé B1 (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 75 MHz).....	151
Figure 132 : Expérience bidimensionnelle HSQC du composé B1 (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Bruker, 300 MHz).....	152
Figure 133 : Expérience <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H HMBC du composé B1 (CD <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ). .....	152
Figure 134 : Analyse GC-MS comparative de la réaction d'hydrodéphalogenation du composé B1 après extraction et comparaison avec les standards commerciaux correspondants. ....	153
Figure 135 : Structure du composé B1 proposée après interprétation du spectre COSY <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C acquis pendant 9h sur un spectromètre 150 MHz ( <sup>13</sup> C). ....	155
Figure 136 : Spectre COSY <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C du composé [ <sup>13</sup> C] <sub>7</sub> -B1 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 800 MHz ( <sup>1</sup> H)).....	155
Figure 137: (a) reconstruction du squelette carboné du composé B1 à l'aide des données RMN COSY <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C, (b) structure du composé B1.....	157
Figure 138 : Structure du composé B1 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H, (b) entre les protons et atomes de carbone à courte distance ( <sup>1</sup> J) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C à plus longues distances ( <sup>2</sup> J et <sup>3</sup> J) d'après l'analyse HMBC. ....	157
Figure 139 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé B2 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 600 MHz). ....	158
Figure 140 : Spectre RMN de l'analyse bidimensionnelle <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY du composé B2.....	158
Figure 141 : Spectre RMN <sup>13</sup> C du métabolite B2 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 150 MHz) .....	158
Figure 142 : Spectre RMN de l'analyse bidimensionnelle HSQC du composé B2 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , Bruker, 600 MHz)..	159
Figure 143 : Spectre HMBC du composé B2 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 600 MHz).....	159
Figure 144 : Structure du composé B2 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H, (b) entre les protons et atomes de carbone à courte distance ( <sup>1</sup> J) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C à plus longues distances ( <sup>2</sup> J et <sup>3</sup> J) d'après l'analyse HMBC. ....	160
Figure 145 : Spectre RMN <sup>1</sup> H des composés B3 et B4 (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 600 MHz).....	161
Figure 146 : Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H et attribution des signaux des protons aux composés B3 et B3' (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , Bruker, 600 MHz). ....	161
Figure 147 : Analyse bidimensionnelle HSQC (couplages directs) des composés B3 et B3' (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 600 MHz). ....	163
Figure 148 : Analyse bidimensionnelle HMBC (couplages indirects) des composés B3 et B3' (THF- <i>d</i> <sub>8</sub> , 600 MHz). Les couplages indirects sont annotés en rouge et les couplages directs, observable sous forme de double tache, en vert. ....	163
Figure 149 : Corrélations identifiées en RMN <sup>1</sup> H et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H' (a) et corrélations en <sup>1</sup> J en HSQC (b) pour le composé B3.....	164
Figure 150 : Corrélations identifiées en RMN <sup>1</sup> H et COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H' (a) et corrélations en <sup>1</sup> J en HSQC (b) pour le composé B3'.....	164
Figure 151 : démultiplication des signaux des protons Ha' et Hc' observée par modification de l'apodisation. ....	165
Figure 152 : Structures 2,4,6,7-tétrachloroindène (a) et 2,5,6,8-tétrachloroindène proposées pour le métabolite B3'.....	165

Figure 153 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 294,88817 du mélange C1/C2 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C2/C1. ....	166
Figure 154 : Spectre RMN <sup>1</sup> H des composés C1 et C2 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	167
Figure 155 : Spectre COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H des composé C1 et C2 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	167
Figure 156 : Expérience HSQC pour le mélange contenant les composés C1 et C2 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ...	168
Figure 157 : Spectre HMBC d'un mélange contenant les composés C1 et C2 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	169
Figure 158 : Structure partielle proposée pour le composé C1 et couplages observés (a) entre protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H, (b) entre les noyaux des atomes de <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C à courte distance d'après l'analyse HSQC et (c) à plus longues distances d'après l'analyse HMBC. ....	170
Figure 159: Structure proposée du composé C1 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H, (b) entre les protons et carbones à courte distance ( <sup>1</sup> J) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C à plus longues distances ( <sup>2</sup> J et <sup>3</sup> J) d'après l'analyse HMBC. ....	170
Figure 160 : Proposition de mécanisme d'isomérisation des APCIC en milieux aqueux neutre ou basique. ..	171
Figure 161 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 260,92714 du mélange C3/C4 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C3/C4. ....	171
Figure 162 : Spectre RMN <sup>1</sup> H des composés C3 et C4 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , Bruker, 600 MHz). ....	172
Figure 163 : Analyse COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H et attribution des signaux des protons aux composés C3 et C4 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , Bruker, 600 MHz). ....	173
Figure 164 : Structure partielle proposée des composés (a) C3 et (b) C4 et couplages observés entre les protons d'après les spectres RMN <sup>1</sup> H et COSY. ....	173
Figure 165 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 260,92714 du mélange C5/C6 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C6/C5. ....	174
Figure 166 : Spectre RMN <sup>1</sup> H d'un mélange contenant les composés C5 et C6 (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	175
Figure 167 : Structure proposée pour les composés C5 et C6 et couplages observés entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H. ....	175
Figure 168 : Chromatogrammes extrait pour l'ion m/z 226,96611 des deux mélanges C7/C8 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange 1 C7/C8 à 1,2 et du mélange 2 C8/C7 à 4,5. ....	176
Figure 169 : Spectre RMN <sup>1</sup> H des composés C8 (majoritaire) et C7 (minoritaire) (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	177
Figure 170 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du premier mélange contenant des composés C7 (majoritaire) et C8 (minoritaire) (acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz). ....	177
Figure 171 : Structure partielle proposée pour les composés C7 et C8 et couplages observés entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup> H. ....	178
Figure 172 : Structure acide 4-carboxyindane résultant de l'hydrodéhalogénéation des acides polychloro-7-carboxyindène et polychloro-4-carboxyindène. ....	180
Figure 173 : Orientation des produits de transformations par réactions chimiques de la chlordécone en fonction des agents réducteurs utilisés, et de l'utilisation éventuelle de vitamine B <sub>12</sub> . Ces résultats sont	

donnés pour une durée n'excédant pas 4 jours, ne permet pas d'observer la transformation totale de la chlordécone dans les conditions avec le fer zéro valent comme décrit au Chapitre 4. ....	187
Figure 174 : Colorations de la vitamine B <sub>12</sub> en fonction de l'agent réducteur ajouté au milieu réactionnel, de gauche à droite : citrate de titane (III), sulfure de sodium, fer zéro valent, dithionite de sodium et sans agent réducteur, sous atmosphère inerte d'argon. Les solutions en présence de citrate de titane (III) et de dithionite de sodium sont amenées à pH 12 (NaOH). En présence de sulfure de sodium le pH est imposé par l'agent réducteur en solution (pH =12,6). Le mélange avec le fer zéro valent est à pH 7. ....	188
Figure 175 : Voltampérométrie cyclique de la vitamine B <sub>12</sub> avec ou sans chlordécone à pH 12 à 10 mV/s avec une électrode au dioxyde d'étain. E <sub>ESM</sub> =+0.66 V (Lagarde <i>et al.</i> , 2015). ....	189
Figure 176 : Montage réalisé pour le suivi du potentiel d'oxydoréduction au cours des transformations chimiques de la chlordécone. ....	192
Figure 177 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux (E <sub>réf</sub> (Sulfate Mercurieux) = 0,66 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de dithionite de sodium. * artefact dû à un prélèvement. ....	193
Figure 178 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux (E <sub>réf</sub> (Sulfate Mercurieux) = 0,66 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de sulfure de sodium et de vitamine B <sub>12</sub> . ....	193
Figure 179 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux (E <sub>réf</sub> (Sulfate Mercurieux) = 0,66 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de fer zéro valent. * artefact dû à un prélèvement. ....	194
Figure 180 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux (E <sub>réf</sub> (Sulfate Mercurieux) = 0,66 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de fer zéro valent et de vitamine B <sub>12</sub> . ....	195
Figure 181 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction avec l'électrode au sulfate mercurieux comme électrode de référence (E <sub>ESM</sub> =0,656 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de citrate de titane. ....	196
Figure 182 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux (E <sub>réf</sub> (Sulfate Mercurieux) = 0,66 V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de citrate de titane et de vitamine B <sub>12</sub> . ....	196
Figure 183 : (a) Suivi du potentiel d'oxydoréduction lors de la transformation chimique de la chlordécone en présence de vitamine B <sub>12</sub> et ajouts successifs de citrate de titane. En rouge, les chiffres correspondent au n <sup>ième</sup> ajout de citrate de titane (III) et (b) apparition des différents produits en fonction des ajouts. ....	198
Figure 184 : Produits de transformations obtenus en fonction du potentiel d'oxydoréduction. ....	200
Figure 185 : Synthèse de la <sup>13</sup> C-chlordécone à partir d'hexachlorocyclopentadiène. ....	202
Figure 186 : Comparaison du massif isotopique obtenu par ESI-Orbitrap (haute résolution) de la chlordécone ([M-H] <sup>-</sup> ) marquée au <sup>13</sup> C avec une simulation. ....	203

Figure 187 : (a) Extrait du spectre RMN <sup>13</sup> C de la chlordécone marquée au <sup>13</sup> C commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone-d <sub>6</sub> à 75 MHz et (b) numérotation des atomes de carbone selon la nomenclature IUPAC pour correspondance avec les signaux du spectre. Les atomes de carbone chimiquement équivalents sont représentés d'une même couleur. Le chiffre retenu pour représenter les atomes de carbone équivalents est indiqué sur la structure inférieure. ....	203
Figure 188 : Extrait du spectre RMN <sup>13</sup> C quantitatif de la chlordécone marquée au <sup>13</sup> C commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone-d <sub>6</sub> à 75 MHz. ....	204
Figure 189 : Extrait du spectre RMN <sup>13</sup> C quantitative avec séquence optimisée de la chlordécone marquée au <sup>13</sup> C commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone-d <sub>6</sub> en présence de D <sub>2</sub> O, à 150 MHz. ....	205
Figure 190 : Distribution isotopique des atomes de carbone dans la chlordécone marquée au <sup>13</sup> C. ....	205
Figure 191 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique de la chlordécone par <i>Citrobacter</i> 86-1 après extraction.....	206
Figure 192 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique de la chlordécone par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	206
Figure 193 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique de la <sup>13</sup> C-chlordécone par <i>Citrobacter</i> 86-1 après extraction.....	207
Figure 194 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique de la <sup>13</sup> C-chlordécone par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	207
Figure 195 : Comparaison du massif isotopique moléculaire obtenu par ESI-Orbitrap-MS (haute résolution) du métabolite A1 ([M-H] <sup>-</sup> ) marquée au <sup>13</sup> C avec une simulation. ....	207
Figure 196 : Origine des différents massifs isotopiques observés pour le métabolite B1 depuis la transformation microbologique de la chlordécone marquée au <sup>13</sup> C. ....	208
Figure 197 : Comparaison du massif isotopique obtenu par GC-EI-MS (basse résolution) de l'ion moléculaire du métabolite B1 marqué au <sup>13</sup> C avec une simulation. ....	209
Figure 198 : Origine des différents massifs isotopiques dans la perte d'un atome de carbone suivie de l'incorporation d'un carbone exogène ( <sup>12</sup> C uniquement pour simplification). ....	210
Figure 199 : Comparaison du spectre de masse obtenu par ESI-Orbitrap (haute résolution) du métabolite C1 ([M-H] <sup>-</sup> ) marquée au <sup>13</sup> C avec simulation du massif dont les 10 atomes de carbone seraient issus de la chlordécone et simulation du massif issu de la perte d'un carbone <sup>12</sup> C ou <sup>13</sup> C suivi de l'incorporation d'un atome de carbone exogène ( <sup>12</sup> C). ....	210
Figure 200 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A1 par <i>Citrobacter</i> 86-1 après extraction.....	212
Figure 201 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A1 par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	212
Figure 202 : Chromatogramme (GC-MS) de la transformation chimique (vitamine B <sub>12</sub> et citrate de titane) du composé A1 après extraction.....	213
Figure 203 : Chromatogramme (LC-Orbitrap-MS) de la transformation chimique (vitamine B <sub>12</sub> et citrate de titane) du composé A1. ....	213

Figure 204 : Comparaison des produits de réaction à l'issue des transformations chimiques de la chlordécone et du métabolite A1.....	214
Figure 205 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A2 par <i>Citrobacter</i> 86-1 après extraction.....	215
Figure 206 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A2 par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	215
Figure 207 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A3 par <i>Citrobacter</i> 86-1 après extraction.....	216
Figure 208 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A3 par <i>Citrobacter</i> 86-1. ....	216
Figure 209 : Propositions de voie de transformation de la chlordécone. ....	218
Figure 210 : Applications possibles des mesures du fractionnement isotopiques. ....	223
Figure 211 : Schéma des différentes étapes conduisant à la mesure du rapport isotopique d'une molécule par GC-IRMS (tiré de (Elsner <i>et al.</i> , 2012)). ....	225
Figure 212 : Profil de fractionnement isotopique des réactions microbologiques (vert) et chimiques (bleu) de la chlordécone (Graphique réalisé d'après l'équation de Rayleigh). ....	226
Figure 213 : Etude des métabolites issus des transformations microbologiques et chimiques de la chlordécone et perspectives possibles. ....	286
Figure 214 : Proposition d'une voie de transformation de la chlordécone par voie microbologique et perspectives possibles. ....	288
Figure 215 : Proposition d'une voie de transformation de la chlordécone par voie microbologique et perspectives possibles. ....	290





# Liste des tableaux

Tableau 1 : Masses exactes expérimentales et théoriques de la chlordécone et de ses métabolites en mode négatif par LC-Orbitrap-MS (pic monoisotopique).....	71
Tableau 2 : Fragments attendus dans le spectre de masse de chaque monohydrochlordécone ; Les symboles + et – représentent respectivement la présence et l’absence de l’ion. ....	76
Tableau 3 : Fragments attendus dans le spectre de masse de chaque dihydrochlordécone ; Les symboles + et – représentent respectivement la présence et l’absence de l’ion.....	78
Tableau 4 : Relation entre le nombre d’atomes de chlore perdus en moyenne par l’ensemble des molécules de chlordécone et l’augmentation de la concentration des ions chlorures dans le milieu.....	92
Tableau 5 : Nombre d’atomes de chlore perdu pour chaque métabolite principal, par rapport à la chlordécone. ....	95
Tableau 6 : Produits de transformation de la chlordécone identifiés selon des différentes combinaisons d’agent réducteur et de complexe métallique étudiés. En vert, les conditions permettant une transformation complète de la chlordécone, en orange, les conditions permettant une transformation partielle de la chlordécone et en rouge les conditions ne permettant pas la transformation de la chlordécone. CLD : chlordécone ; Maj : produit supposé majoritaire ; Min : produit supposé minoritaire. ....	113
Tableau 7 : Equivalents de citrate de titane(III) nécessaire pour la transformation totale de la chlordécone en composés B1, B2 et B3.....	130
Tableau 8 : Comparaison des déplacements chimiques des atomes de carbone du métabolite A2 avec ceux décrits par Wilson <i>et al.</i> (Wilson & Zehr, 1979) sur le composé identifié comme le 8-monohydrochlordécone (5b-monohydrochlordécone). ....	147
Tableau 9 : Résumé des carbones directement liés d’après l’interprétation du spectre COSY <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C du composé B1 marqué au <sup>13</sup> C. (Grisé : signal sur la diagonale, x = signal hors diagonal fort, ~ = signal hors diagonal faible). ....	156
Tableau 10 : Résumé des informations obtenues des signaux observés. ....	162
Tableau 11 : Résumé des déplacements chimiques des protons et des atomes de carbones directement et indirectement liés aux protons des métabolites C1 et C2. ....	169
Tableau 12 : Récapitulatif des déplacements chimiques des protons des composés APCIC.....	179
Tableau 13 : Agents réducteurs utilisés dans les transformations chimiques de la chlordécone.....	190
Tableau 14 : Valeurs des potentiels apparents des couples d’oxydoréduction de la vitamine B <sub>12</sub> à pH 7 et pH 10 mesurés sur une électrode à goutte de mercure (Lexa & Savéant, 1983) et pH 12 sur une électrode d’oxyde d’étain (Lagarde <i>et al.</i> , 2015). ....	191
Tableau 15 : Nombre d’équivalents de citrate de titane introduit et potentiel d’oxydoréduction atteint pour déclencher la formation de chaque famille de composés. ....	198
Tableau 16 : Comparaison des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ des différents lots commerciaux de pesticides contenant la chlordécone comme substance active.....	227

Tableau 17 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par GC-MS avec la méthode longue.....	256
Tableau 18 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par GC-MS avec la méthode courte. ....	257
Tableau 19 : Temps de rétention du métabolite B1 et des produits issus de l'hydrodéhalogénéation.....	257
Tableau 19 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode LC1 associée à la colonne 1.....	258
Tableau 20 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode LC2 associée à la colonne 2.....	258
Tableau 21 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode associée à la colonne 1.....	259
Tableau 22 : Temps de rétention des composés de la famille C au cours de la séparation par la méthode 4 avec la colonne 4.....	261

# Introduction

La chlordécone (CLD) est un insecticide organochloré qui a été utilisé de façon intensive aux Antilles françaises de 1972 à 1993 pour lutter contre le charançon du bananier, dont les larves s'attaquent aux racines. Son usage est interdit en 1976 suite à un accident dans l'usine où elle est fabriquée (Hopewell, Virginie, Etats-Unis), qui révèle sa toxicité sur les ouvriers qui sont en contact quotidien. Cependant, en 1979 et en 1980, deux cyclones Allen et David provoquent aux Antilles une forte pression parasitaire conduisant à des dérogations pour l'utilisation du pesticide en Martinique et en Guadeloupe. Du début de son utilisation en 1972 jusqu'à son interdiction définitive aux Antilles en 1993, 300 tonnes de substance toxique sont appliquées sur les cultures de bananes à raison de 30 g de produit par pied, soit 3 kg/ha/an.

Sa persistance dans les sols, son transfert dans les plantes cultivées sur les sols contaminés ainsi que dans les poissons et crustacés des rivières et du littoral, font d'elle un problème environnemental et sanitaire majeur (Reich & Spong, 1983 ; Le Déaut & Procaccia, 2009). En effet, des bilans sanitaires révèlent tout d'abord pour cet insecticide une toxicité aiguë : maux de tête, tremblements, mais aussi dans le cas d'une exposition chronique : augmentation de la fréquence du cancer de la prostate, baisse de la fertilité masculine (Multigner *et al.*, 2010), retard du développement neurologique des nourrissons et les enfants via le lait maternel contaminé (Multigner *et al.*, 2016). La contamination des eaux a provoqué l'interdiction de la pêche en rivières ainsi que sur certaines parties du littoral. L'extension de la zone d'interdiction de la pêche à l'écrevisse et à la langouste en Martinique a notamment engendré un conflit à l'automne 2012 entre marins pêcheurs et autorités. La catastrophe ne se limite donc pas aux domaines environnementaux et sanitaires, elle est aussi à l'origine de conflits sociaux, économiques et politiques.

Pour ces raisons, le premier Plan National Chlordécone est lancé en 2008, regroupant un consortium d'équipes de recherche. En 2011 s'en suit un deuxième plan, les objectifs étant de cartographier les zones contaminées, d'évaluer l'état de contamination des aliments, de sensibiliser la population locale et d'effectuer des études complémentaires de toxicologie et les réponses à apporter (Figure 1). Différentes méthodes, notamment chimiques, ont été étudiées pour dégrader cet insecticide mais aucune appliquée pour l'heure à des parcelles cultivables ne permet la minéralisation de la chlordécone.

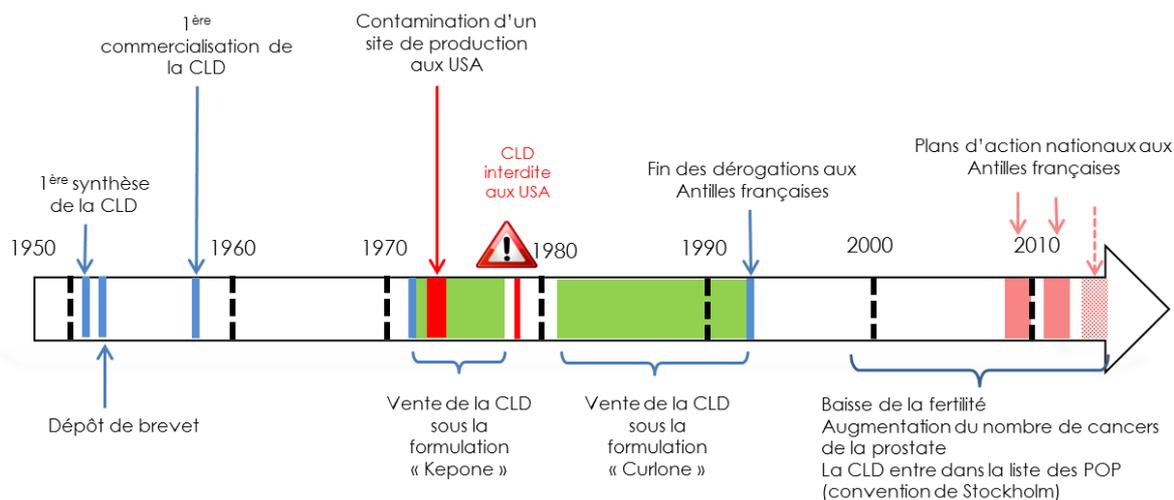


Figure 1 : Evènements marquants dans l'historique de la chlordécone

Une cartographie des Antilles a estimé à environ 20% la surface agricole utile (SAU) concernée par des risques élevés à très élevés dus à la contamination (Le Déaut & Procaccia, 2009). Des modélisations prenant uniquement en compte des processus de lessivage et de percolation montrent que plusieurs centaines d'années seront nécessaires avant l'élimination complète de la chlordécone sur certains sols antillais (Cabidoche *et al.*, 2009). Des équipes scientifiques cherchent un moyen de dégrader le « monstre des Antilles » mais jusque-là, aucune n'y est parvenue de manière efficace.

Au Genoscope, le Laboratoire de Métagénomique des Procaryotes (UMR 8030 CEA CNRS UEVE) a initié un projet de dégradation de la chlordécone par des bactéries en anaérobiose. Des cultures d'enrichissement ont été initiées dans l'équipe et en 2012, les premiers composés chlorés issus de la dégradation de la chlordécone ont été détectés. Plusieurs consortia bactériens ont été sélectionnés pour leur capacité à transformer quasiment toute la chlordécone en métabolites dont un majoritaire. Des bactéries présentant la même action sur la chlordécone ont ensuite pu être isolées à partir de ces consortia. Des formules brutes ont été proposées pour ces métabolites sur la base de données de spectrométrie de masse mais leur structure reste à établir.

Les objectifs de cette thèse concernent d'une part l'élucidation structurale des métabolites principaux issus de la dégradation de la chlordécone. Cela nécessite de les produire, les purifier et analyser leur structure. D'autre part, les mécanismes de dégradation sont étudiés au travers de différentes approches : le suivi de potentiel électrochimique au cours des transformations chimiques de la chlordécone, par des expériences de transformation de métabolites purifiés par voie chimique et biologique ainsi que par l'étude du fractionnement isotopique de la chlordécone.

**Chapitre 1 : Etat de l'art : contexte  
environnemental de la pollution à la chlordécone dans  
les Antilles françaises**

---

---

## **Introduction**

La chlordécone est un pesticide organochloré qui a été utilisé pour lutter contre les attaques parasitaires des larves du charançon du bananier notamment, de façon intensive des années 1970 à 1990. Bien que son usage soit aujourd'hui interdit, elle est encore présente dans les sols où elle a été appliquée mais aussi dans les eaux des nappes phréatiques, les rivières ainsi qu'une partie des eaux maritimes (dont les mangroves). Des études ont révélé sa toxicité chez l'Homme et les animaux. Ainsi, une toxicité aigüe a été observée chez les ouvriers de l'usine d'Hopewell (Virginie, Etats-Unis) produisant la chlordécone aux Etats-Unis, à la fin des années 1960. Une toxicité chronique a été détectée plus tard, au début des années 2000. Elle est à l'origine de diverses perturbations dont un risque plus élevé de cancer de la prostate. Par le phénomène de bioaccumulation, elle est présente dans l'ensemble de la chaîne alimentaire des végétaux aux animaux et contamine ainsi de nombreux produits de consommation courante dont des légumes, la viande, le lait, les œufs et les produits de la pêche. Sa détection dans ces derniers a conduit à une interdiction de la pêche dans certaines régions provoquant des problèmes sociaux et économiques.

Même si la toxicité de la chlordécone a été perçue dès 1963 (Huber, 1963), des dérogations ont permis son utilisation jusqu'en 1993 et l'épandage au total de 300 tonnes dans les sols Antillais, au pied des bananiers. Les différents acteurs ayant contribué à l'empoisonnement des deux îles se partagent la responsabilité, évoquant notamment un contexte particulier de terres particulièrement riches en matière organique, associées à une pression parasitaire exceptionnelle du fait des cyclones.

Des travaux de décontamination ont été envisagés, sur le terrain mais aussi via des tests en laboratoire. Cette partie présente l'état de l'art concernant la molécule chlordécone, le contexte de pollution environnementale dans lequel elle s'inscrit, ainsi que les travaux de recherche réalisés dans le but de tester sa dégradation théorique, biologique et chimique.

## I. Présentation de la molécule

### A. Propriétés chimiques

La chlordécone (1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-décachlorooctahydro-1,3,4-méthéno-2H-cyclobuta-[cd]pentalen-2-one ou Kepone®), représentée en Figure 2, a pour formule brute  $C_{10}Cl_{10}O$ . Elle possède un cycle particulier de type bishomocubane.

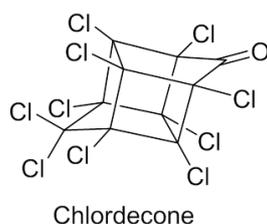


Figure 2 : Structure chimique de la chlordécone ( $C_{10}Cl_{10}O$ ) anhydre.

La chlordécone est très peu soluble dans l'eau à pH acide et neutre (1-2 mg/l) mais cette solubilité augmente à pH plus élevé (68,8 mg/l à pH 10) (Dawson *et al.*, 1979). Cette molécule présente une faible volatilité (pression de vapeur :  $2,25 \cdot 10^{-7}$  mm Hg) et ne subit pas d'oxydation rapide avant d'avoir atteint des températures supérieures à 450-500°C. Il en résulte une incinération difficile et coûteuse, spécifique pour les déchets dangereux requérant des températures supérieures à 1000°C (Bell & Whitmore, 1978; Harris *et al.*, 1980).

### B. Equilibres impliquant la chlordécone

La chlordécone est extrêmement hygroscopique et évolue vers une forme hydratée, appelée chlordécone-hydrate, possédant une fonction gem-diol (Figure 3). Son pKa, estimé entre 9 et 10, explique l'augmentation de la solubilité de la chlordécone en milieu aqueux basique.

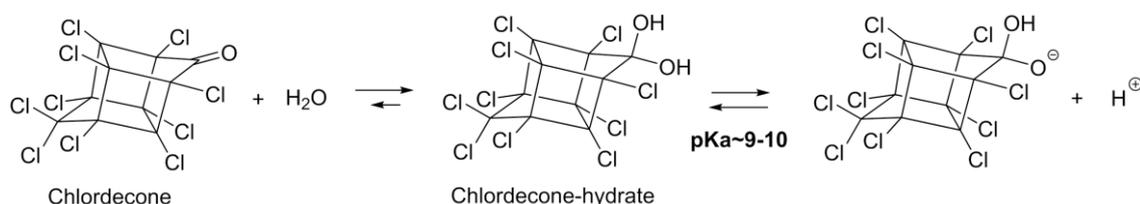


Figure 3 : Equilibre d'hydratation et d'acidité de la chlordécone.

Des analyses menées par le Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) ont permis de mettre en évidence la forme « gem-diol » à partir d'échantillons commerciaux solides en spectrométrie par infra-rouge (IR) sur pastille. En effet, le spectre IR de la chlordécone ne présente aucune bande d'absorption entre 1700 et 1800  $cm^{-1}$ , domaine caractéristique des fonctions carbonyles. Des bandes à 3000  $cm^{-1}$ , domaine caractéristique des vibrations d'élongation des

liaisons OH, sont en revanche visibles (Bristeau, 2012). Dans l'environnement, la forme réelle de la chlordécone est la forme gem-diol. Cette notation uniquement sera utilisée dans la suite du manuscrit.

Un autre équilibre en présence d'alcools (méthanol et éthanol) a été mis en évidence à la suite d'analyses en résonance magnétique nucléaire (RMN) (Bichon *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2004; Harless *et al.*, 1978) (Figure 4).

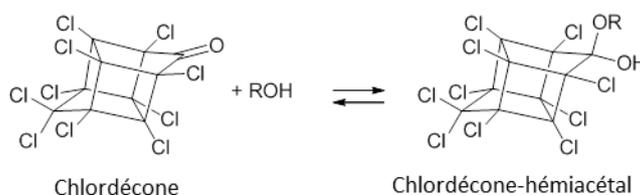


Figure 4 : Equilibre d'hémiacétalisation de la chlordécone en présence d'un alcool (R= Me, Et).

### C. Détection et dosage

Le dosage de la chlordécone est un enjeu important permettant d'évaluer avec fiabilité le comportement environnemental de la molécule et notamment le transfert du sol vers les plantes. De plus, pour la commercialisation de produits concernés par la contamination à la chlordécone, la limite de 20 µg/kg de produit frais doit pouvoir être évaluée de façon fiable (Le Déaut & Procaccia, 2009).

La chlordécone étant une molécule non UV-active, sa détection est généralement réalisée par spectrométrie de masse (MS), couplée à une technique séparative telle qu'une chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en chromatographie en phase liquide (LC). Les premiers dosages de la chlordécone dans les sols ont été réalisés par GC-MS, après extraction par des solvants tels que le benzène (Harris *et al.*, 1980; Moseman *et al.*, 1977), un mélange toluène-acétate d'éthyle (Harris *et al.*, 1980) ou diéthyl-éther-hexane (Saleh & Lee, 1978), et purification sur colonne de Florisil®.

Plusieurs variantes de ce protocole sont utilisées par les laboratoires départementaux d'analyse pour déterminer la teneur en chlordécone de divers échantillons (eaux, sols, aliments, végétaux, animaux). Ces améliorations concernent la détection par chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse en tandem (Moriwaki & Hasegawa, 2004). Récemment, Brunet *et al.* (Brunet *et al.*, 2009) ont étudié la détermination de la teneur en chlordécone d'andosols, de nitisols et de ferralsols en Martinique au moyen de la spectroscopie de réflectance dans le proche infra-rouge (NIRS). Cette méthode est considérée comme rapide et peu onéreuse mais est faiblement corrélée pour des teneurs en chlordécone élevées (>12 mg/kg de sol). Elle permet cependant de classer les sols agricoles concernés selon différents niveaux de contaminations.

Le dosage de la chlordécone en GC-MS simple quadripôle a été testé par Martin-Laurent *et al.* (Martin-Laurent *et al.*, 2014). La méthode implique l'utilisation de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone comme standard interne. L'extraction et le dosage ont été appliqués et validés pour quatre types de sols : andosol, nitisol, ferralsol et fluvisol, estimé représentatifs des terres Antillaises contaminées.

Les travaux de Lagarrigue *et al.* (Lagarrigue *et al.*, 2014) ont consisté à développer une méthode de dosage de la chlordécone via l'ionisation Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI), couplée à une détection Time Of Flight (TOF), des fragments ionisés, dans le but de quantifier et de localiser la chlordécone dans les organes d'animaux d'expérimentation, ici les souris. Le dosage inclut lui aussi l'utilisation d'un standard interne, la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone. Malgré une faible sensibilité (quelques  $\mu\text{g}$  de chlordécone par gramme de tissu analysé), cette technique permet de localiser la chlordécone dans des échantillons en 2D.

Malgré toutes ces études et une amélioration récente (ajout d'une quantité connue de  $^{13}\text{C}$ -chlordécone), une incertitude de l'ordre de 10 à 20% sur les mesures subsiste (Bristeau, 2012; Martin-Laurent *et al.*, 2014).

#### D. Voie de synthèse

La synthèse de la chlordécone est réalisée par réaction de l'hexachlorocyclopentadiène avec l'anhydride sulfurique, chauffés et sous pression en présence de pentachlorure d'antimoine comme catalyseur. Le produit de réaction est ensuite hydrolysé en milieu basique et neutralisé à l'acide (Figure 5). La chlordécone est récupérée par centrifugation ou filtrage puis séchage à l'air chaud (Epstein, 1978). L'hexachlorocyclopentadiène est le précurseur de nombreux autres pesticides chlorés.

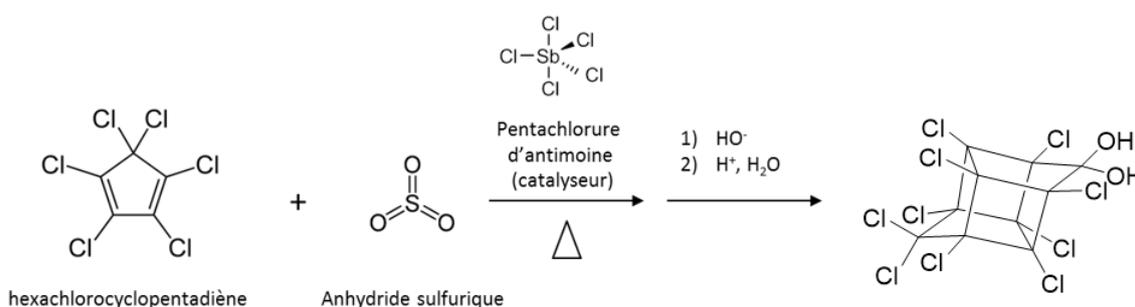


Figure 5 : Voie de synthèse simplifiée de la chlordécone (Epstein, 1978).

Produit pour la première fois en 1951, la chlordécone a été brevetée en 1952 (OMS, 1984) et introduite sur le marché américain en 1958 par Allied Chemical, sous les noms commerciaux de Kepone® et GC-1189 (Epstein, 1978; Huff & Gerstner, 1978).

## II. Historique de la chlordécone

### A. Utilisation de la chlordécone, du Mirex® et du Kelevan comme pesticides

La chlordécone est un insecticide et un fongicide de la famille des organochlorés utilisé à partir de 1958. Elle est considérée comme un insecticide efficace contre les insectes tel le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*, Figure 6), elle peut également servir de larvicide contre la mouche et de fongicide pour lutter contre le mildiou (Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2012).



Figure 6 : Charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) (Photographie de D. Martire).

Avec le Mirex (Figure 7-a) et le Kelevan (Figure 7-b), elle fait partie d'une famille particulière d'organochlorés. Ces derniers ont été aussi utilisés en agriculture en tant qu'insecticides.

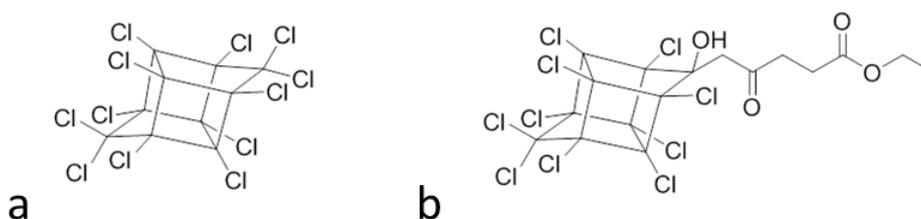


Figure 7 : Structure du Mirex (a) et du Kelevan (b).

Le Mirex a été utilisé en tant que substance active dans la formulation de pesticides pour lutter contre la fourmi de feu (*Solenopsis invicta*), ravageur originaire du Sud-Ouest du Brésil. Il est aussi utilisé comme un produit ignifuge. Tout comme la chlordécone, le Mirex fait partie de la liste des Polluants Organiques Persistants (POP). Il se dégrade lentement et la chlordécone fait partie des produits de dégradation (Suta, 1977). Le Kelevan a lui aussi été utilisé comme insecticide, notamment en Allemagne et en Europe de l'Est contre le doryphore de la pomme de terre. Il a été commercialisé sous le nom de Despirol (Figge & Rehm, 1977; Maier-Bode, 1976). En quelques semaines, il se dégrade naturellement en chlordécone.

## **B. L'incident d'Hopewell et l'interdiction de l'usage de la chlordécone aux Etats-Unis**

Des négligences survenues entre 1974 et 1975 dans l'usine de production à Hopewell (Etats-Unis) ont entraîné une pollution importante de l'environnement, en particulier de la rivière Saint-James (Chesapeake Bay) et l'intoxication de plus d'une centaine d'ouvriers. Ce scandale a conduit en 1976, les autorités américaines à interdire la commercialisation et la production de la chlordécone sur leur sol (Colombano *et al.*, 2009; Epstein, 1978).

## **C. Les dérogations pour l'utilisation de la chlordécone et la pollution des sols aux Antilles**

Suite à la pression parasitaire accrue par des événements cycloniques Allen en 1979 et David 1980, les Antilles ont bénéficié d'une autorisation provisoire, puis de dérogations successives, permettant l'emploi de la chlordécone jusqu'en 1993 dans les bananeraies uniquement. Ainsi, pendant près de 15 ans, environ 180 tonnes de substance toxique ont été appliquées sur les cultures de bananes à raison de 30 g de produit par pied, soit 3 kg/ha/an. Sa rémanence et sa persistance se traduisent aujourd'hui par une contamination des sols, des eaux et de l'ensemble de la chaîne alimentaire, suite à un processus de bioaccumulation. La contamination des produits de culture, d'élevage et de la pêche se retrouve dans l'alimentation et par conséquent chez l'Homme, où la chlordécone cause des problèmes sanitaires graves, détaillés en partie IV.

## **D. Conséquences socio-économiques de la pollution à la chlordécone des Antilles françaises**

L'existence avérée de cette contamination a de très graves conséquences tant d'un point de vue socio-économique que de santé publique. Les incidences économiques concernent certains fruits et légumes et la faune aquatique d'eau douce, en particulier les poissons et les crustacés (crevettes, ouassous). Leur contamination a atteint des records mondiaux : 10 000 µg/kg en moyenne dans la chair des poissons des rivières contaminées (Monti, 2006). La quasi-totalité des espèces d'eau douce antillaises sont migratrices, ce qui a conduit les services de l'état à interdire la pêche pour consommation et commercialisation sur tout leur linéaire de la majeure partie des rivières de Guadeloupe et de Martinique (Lesueur-Jannoyer *et al.*, 2012). Les langoustes constituent une ressource très exploitée aux Antilles (Bessière, 2010). Cette interdiction prive certains pêcheurs de 70% de leurs revenus (Buisson, 2013). Les problèmes de santé associés à ces contraintes socio-économiques

ont conduit en 2008 à la création d'un premier « Plan Action National Chlordécone en Martinique et en Guadeloupe » suivi d'un deuxième en 2011 et d'un troisième en 2015.

### **III. Contamination environnementale à la chlordécone**

Aux Etats-Unis, la pollution des sols et de la rivière à proximité de l'usine de Life Science Products Co. est due à la non-application des règles de sécurité comme la contamination de l'air qui dépassait  $3 \text{ mg/m}^3$  dans certaines zones de production, soit 3 000 fois au-delà du seuil fixé à  $1 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ .

En Martinique et en Guadeloupe, la chlordécone n'a pas été synthétisée mais appliquée à de fortes doses sur les sols des bananeraies. Cette application répétée pendant près de 30 ans a provoqué une pollution durable des terres et des autres compartiments écologiques comme les eaux souterraines, l'eau de mer, et l'ensemble de chaîne alimentaire.

#### **A. Contamination des sols et de l'eau**

La contamination concerne des superficies agricoles estimées à 5200 ha en Guadeloupe et 6200 ha en Martinique (Figure 8), soit respectivement 15% et 19% de la surface agricole utile (SAU) (Le Déaut & Procaccia, 2009). Dans un contexte climatique marqué par des précipitations importantes et accrues lors des événements cycloniques, les cultures réalisées sur des parcelles souvent très pentues ont accentué le lessivage des sols et donc le transfert des polluants vers les zones humides continentales et littorales. De même, l'analyse de produits agricoles cultivés sur d'anciennes bananeraies a montré des concentrations en chlordécone très importantes en relation directe avec les concentrations du sol (Le Déaut & Procaccia, 2009).

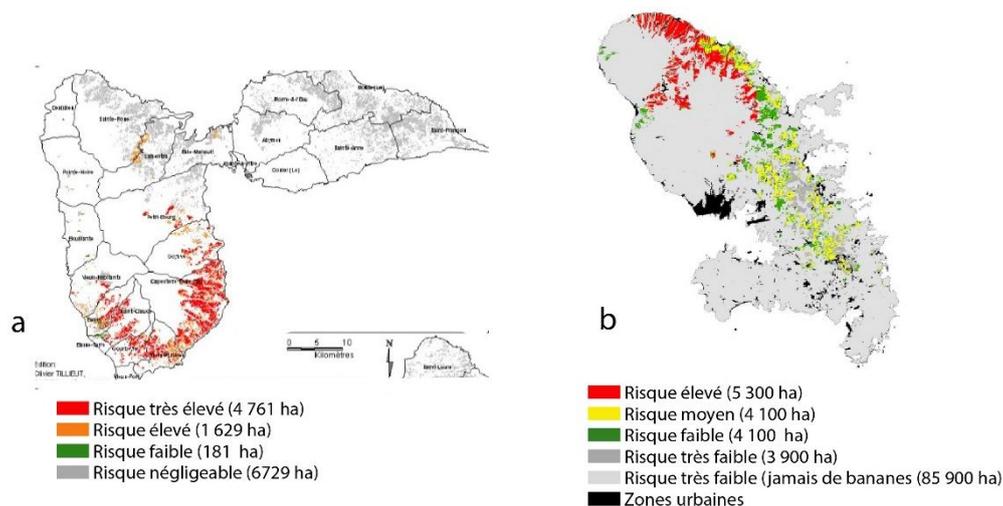


Figure 8 : Cartographie de la présence de chlordécone dans les sols de Guadeloupe (a) et de Martinique (Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2011).

Alors qu'elle est peu soluble dans l'eau, la chlordécone présente une forte affinité pour la matière organique des sols et sédiments, grâce à des liaisons de faible énergie de type Van der Waals. Ainsi, dans des systèmes sol-eau, la molécule s'associe préférentiellement avec la matière organique, ce qui se traduit par des teneurs observées  $10^4$  à  $10^5$  fois plus élevées que dans l'eau environnante. Les concentrations pouvaient atteindre 10 mg/kg dans les sédiments de la rivière Saint-James (passant à proximité de l'usine) alors que certaines pouvaient atteindre 1000 à 2000 mg/kg à 1km dans les sols bordant l'usine à Hopewell (Virginie) où elle fut synthétisée (Dawson *et al.*, 1979). Dans les sols Antillais, la chlordécone est particulièrement retenue. Ces sols volcaniques possèdent dans certaines zones une forte proportion de matière organique, ce qui amplifie le phénomène d'accumulation de la chlordécone. En effet, avec un coefficient de partage de la chlordécone entre la matière organique et l'eau  $K_{oc}$  compris entre 2 000 et 24 000 (Cabidoche *et al.*, 2009) la chlordécone s'adsorbe avec une très grande affinité à la matière organique, comme montré par Cabidoche *et al.* (Cabidoche *et al.*, 2009) pour les différents types de sols. En Martinique et en Guadeloupe, il s'agit principalement d'andosols, de nitisols et de ferralsols (Colmet-Daage & Lagache, 1965), composés de différents types d'argiles. Les andosols, contiennent des allophanes, des argiles qui définissent des agrégats tortueux de structure fractale qui favorisent l'emprisonnement de la chlordécone dans le « nano-labyrinthe » qu'elles forment (Woignier *et al.*, 2017). La rétention de la chlordécone est augmentée dans ces sols en comparaison avec d'autres sols argileux comme les nitisols qui contiennent une argile cristalline l'halloysite (Woignier *et al.*, 2017) et les ferralsols qui sont riches en kaolinite (Colmet-Daage & Lagache, 1965). Des modélisations prenant en compte les processus de lessivage et de percolation montrent que plusieurs centaines d'années seraient nécessaires avant l'élimination complète de la chlordécone sur certains sols antillais (Cabidoche *et al.*, 2009) (Figure 9).

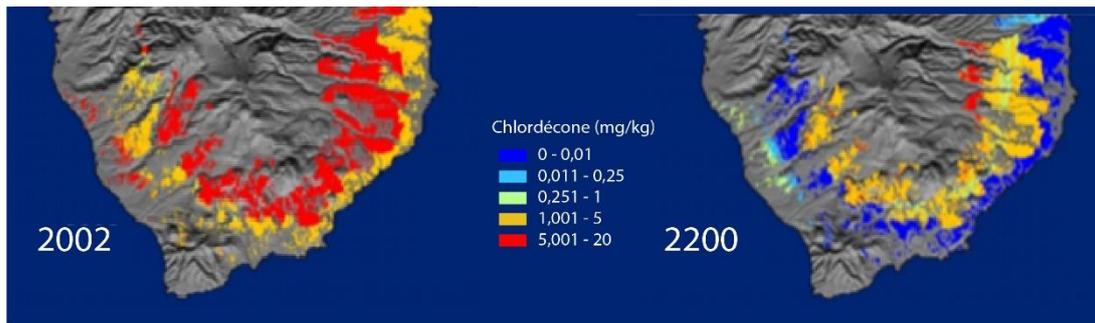


Figure 9 : Modélisation de l'élimination naturelle de la chlordécone dans les sols par lessivage et percolation pour Basse-Terre, Guadeloupe (Cabidoche & Lesueur-Jannoyer, 2011).

## B. Contamination de la chaîne alimentaire

La chlordécone a été retrouvée dans des légumes (racines, tubercules), lait, œufs, viandes, crustacés et poissons. Les jardins créoles, l'agriculture, l'élevage, nécessitent actuellement une autorisation. Selon les zones, la consommation de légumes du jardin est déconseillée au-delà de deux fois par semaine et la pêche est même interdite dans certaines zones maritimes, ainsi que dans la majorité des rivières des îles.

### 1. Comportement de la chlordécone dans les végétaux

Selon les espèces végétales, la contamination des différents organes varie (Clostre *et al.*, 2015). Plusieurs voies de contamination ont été observées. Un exemple concerne une étude utilisant de la chlordécone radioactive et le radis (Letondor *et al.*, 2015) : la plante entière peut être contaminée par le courant d'évapotranspiration et la diffusion des vaisseaux du xylème après absorption de la chlordécone par les racines. L'adsorption peut aussi se faire par contact avec le périoderme suivie de la diffusion du pesticide dans le parenchyme du tubercule (Letondor *et al.*, 2015). Les organes souterrains des végétaux sont beaucoup plus contaminés que les parties aériennes, puisque le contact à la chlordécone se fait dans le sol, via les racines. Un gradient de contamination s'observe aussi de l'extérieur vers l'intérieur de la plante (Letondor *et al.*, 2015). L'origine des tissus secondaires, selon qu'ils proviennent du cortex ou du parenchyme médullaire, influence aussi la propagation de la chlordécone dans la plante (Letondor *et al.*, 2015). La composition en lipides et en fibre de la peau et de la pulpe des plantes jouera aussi un rôle dans la contamination en conséquence du caractère lipophile de la chlordécone (Clostre *et al.*, 2014).

Le comportement de la chlordécone a été comparé, d'après des études statistiques menées sur une large base de données de plantes et de sols, à celui du 8-monohydrochlordécone, présent dans les lots de chlordécone mais dont la détection dans les sols résulterait d'une action de transformation, biotique ou abiotique (Devault *et al.*, 2016). Le 8-monohydrochlordécone aurait un meilleur transfert

des sols vers les plantes et serait plus facilement transporté vers les parties hautes des organes aériens via le flux de transpiration (Clostre *et al.*, 2015).

## 2. Processus de bioaccumulation

Dès la fin des années 1970, la contamination à la chlordécone de certaines espèces marines a été montrée (Epstein, 1978; Kermarrec & Maulon, 1974; Snegaroff, 1977). Peu d'études ont été réalisées sur l'écologie des espèces marines (Bodiguel *et al.*, 2011; Salvat *et al.*, 2012) pour expliquer leur niveau de contamination dans la chaîne alimentaire et identifier les niches de pollution. Une étude de la concentration de la chlordécone dans les espèces marines tenant compte de la région, du groupe taxonomique et de facteurs écologiques comme l'habitat a été réalisée. Il en ressort que les crustacés sont plus sensibles à la contamination que les poissons et les mollusques (Dromard *et al.*, 2016). Les poissons dont le régime est détritivore-omnivore présentent les plus hauts taux de chlordécone (Dromard *et al.*, 2016). La bioaccumulation de la chlordécone dans les poissons et les proies des espèces carnivores et piscivores explique leur contamination élevée (Coat *et al.*, 2006). Les propriétés lipophiles de la chlordécone pourraient aussi justifier ces observations (Dromard *et al.*, 2016).

Ces observations sont en lien avec l'interdiction de pêche aux Antilles dans des zones ciblées de certaines espèces marines dont la contamination à la chlordécone est très élevée (crustacés et poissons piscivores).

Malgré la persistance de la pollution des sols et la contamination de la chaîne alimentaire, des mesures préventives sont développées afin d'assurer une autosuffisance alimentaire des îles. Les plantes ne sont pas toutes contaminées de la même manière et une classification a été réalisée pour définir trois classes de sensibilité des espèces habituellement cultivées aux Antilles : productions sensibles, intermédiaires et peu sensibles (Clostre *et al.*, 2017). Selon le taux de contamination des sols, il est donc possible d'adapter les cultures afin de produire des produits commercialisables (Clostre *et al.*, 2017) (Figure 10). Aussi, toute nouvelle exploitation doit avoir une analyse « chlordécone » avant de pouvoir commercialiser ses produits.

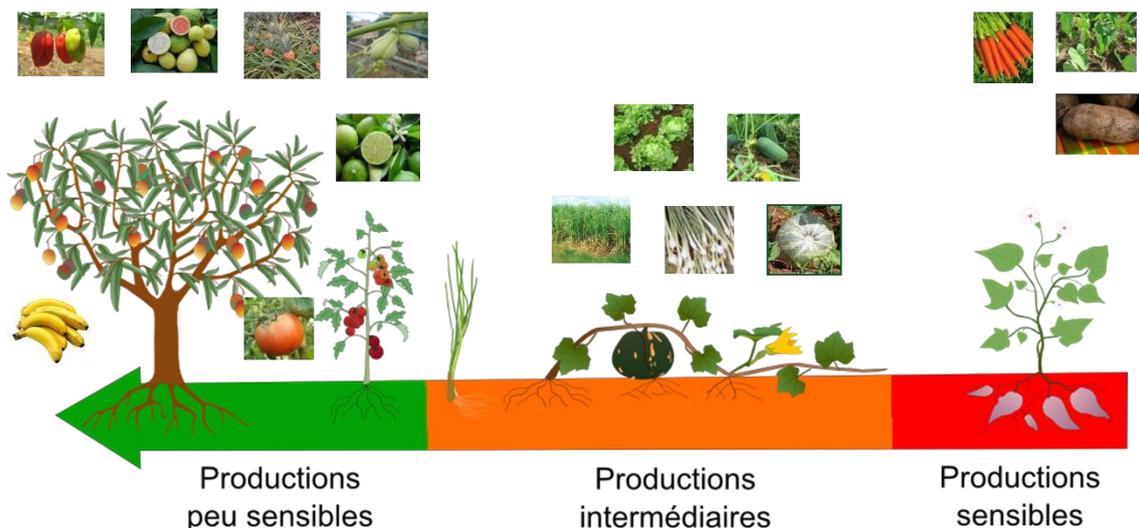


Figure 10 : Classification des cultures selon leur sensibilité à la chlordécone (Jannoyer-Lesueur, 2017).

Les élevages hors-sols sont aussi favorisés afin d'éviter l'ingestion de particules de sol contaminé (Jondreville *et al.*, 2014).

#### IV. Toxicité : dangers connus ou suspectés et mécanismes associés

Les principales données concernant la toxicité aiguë de la chlordécone ont été obtenues chez l'Homme suite à des examens pratiqués sur le personnel de l'usine la fabriquant à Hopewell (Etats-Unis) ainsi que chez les rongeurs et les bovidés (Epstein, 1978; Mahieu, 2014).

##### A. Métabolisme et toxicocinétique de la chlordécone

L'absorption de la chlordécone se fait principalement par ingestion d'aliments ou de terre contaminés, comme c'est le cas pour beaucoup d'autres composés phytosanitaires. L'absorption par inhalation est envisagée. Par voie cutanée, elle serait possible mais faible (Faroon *et al.*, 1995).

La structure globale de la molécule et les atomes de chlore confèrent un caractère hydrophobe et limitent sa réactivité chimique. En revanche la fonction cétone présente une réactivité et est à l'origine de sa métabolisation. Elle est en équilibre avec une forme plus soluble « gem-diol » nommée également chlordécone-hydrate dont les fonctions hydroxyles seraient susceptibles d'être glucuronidées. L'Homme possède une enzyme, la chlordécone réductase (aldo-céto-réductase) qui permet la réduction en chlordécone-alcool (Figure 11), qui serait ensuite glucuronidée ou sulfatée (Fariss *et al.*, 1980; Molowa, *et al.*, 1986) (Figure 12). Les métabolites hydrosolubles obtenus seraient ensuite excrétés dans la bile notamment au cours du cycle entéro-hépatique. Afin de réduire la réabsorption intestinale, un chélateur intestinal administré par voie orale a été employé efficacement

pour favoriser leur excrétion par les selles et ainsi réduire la demi-vie du pesticide chez les personnes contaminées, à Hopewell.



Figure 11 : Métabolisation de la chlordécone dans le foie humain.

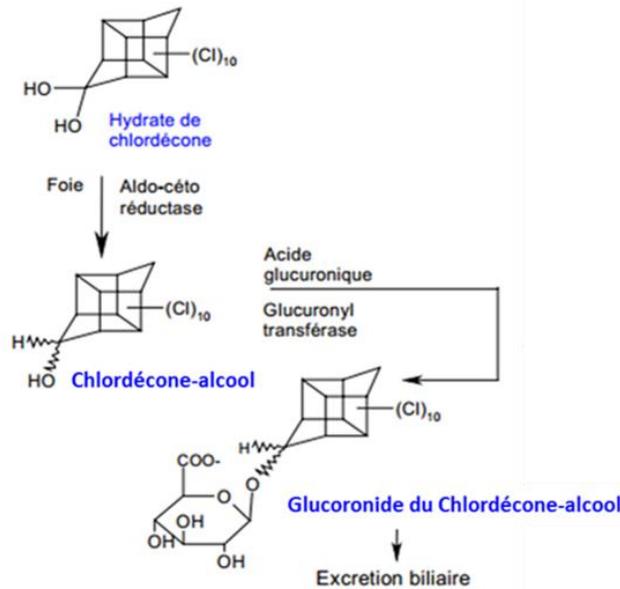


Figure 12 : Métabolisation probable de la chlordécone dans le foie (Fariss *et al.*, 1980).

## B. Dangers connus et suspectés

### 1. Cancer

Chez les rongeurs, la chlordécone serait à l'origine de tumeurs hépatiques (Epstein, 1978). Chez l'Homme, elle aurait un effet promoteur de cancérogénèse et non de cancérigène complet (Galloway *et al.*, 1987; Mortelmans *et al.*, 1986), notamment de par ses propriétés œstrogéno-mimétiques (Hammond *et al.*, 1979; Palmiter & Mulvihill, 1978). En effet, certains médicaments œstrogéno-mimétiques provoquent des adénomes hépatiques chez l'Homme et des adénocarcinomes chez le rongeur, ce qui pourrait expliquer les effets promoteurs. D'après Multigner *et al.* (Multigner *et al.*, 2016; Multigner *et al.*, 2010), elle contribue aussi à un taux anormalement élevé des cancers de la prostate aux Antilles.

## 2. Effets hépatiques non cancérogènes

La chlordécone pourrait être hépatotoxique lorsqu'elle est combinée à d'autres toxiques hépatiques comme le tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) (nécrose, fibrose). Les mécanismes de cette potentialisation peuvent être dus à l'induction par la chlordécone du métabolisme du tétrachlorométhane conduisant à la formation d'intermédiaires très toxiques, ou à l'inhibition de la réparation cellulaire (Dalu *et al.*, 1998; Soni & Mehendale, 1998).

## 3. Effets sur le système nerveux et perturbations endocrinienne

A dose élevée, les effets de la chlordécone sur le système nerveux central ont été rapportés chez l'Homme et chez les animaux. Dans la population d'Hopewell, des manifestations neurologiques physiques telles que tremblements, ataxie, troubles de la motricité oculaire, du langage et céphalées ont été observées (Taylor, 1982). L'ensemble de ces symptômes suppose l'atteinte du tronc cérébral et du cervelet.

Des travaux cherchant à expliquer les symptômes neurologiques présentent des résultats relativement contradictoires concernant les variations de neurotransmetteurs. La chlordécone semble diminuer la demi-vie des neurotransmetteurs comme la sérotonine ainsi que la quantité de récepteurs des neurotransmetteurs (Tilson *et al.*, 1982). Cette contradiction peut être liée à la perturbation endocrinienne provoquée par des comportements mimétiques d'œstrogène dans certains organes et antagonistes dans d'autres (Cravedi *et al.*, 2007). De plus, il existe au moins deux récepteurs nucléaires d'œstradiol, ER<sub>α</sub> et ER<sub>β</sub> qui n'ont ni la même distribution ni les mêmes effets physiologiques et des travaux indiquent que la chlordécone peut se lier aux deux récepteurs mais se comporte comme un agoniste vis-à-vis du récepteur ER<sub>α</sub> et comme un antagoniste vis-à-vis du récepteur ER<sub>β</sub>. Ceci expliquerait la contradiction des effets de la chlordécone concernant la perturbation endocrinienne (Delfosse *et al.*, 2014).

## 4. Système reproducteur et développement

Des effets endocriniens de type œstrogéniques avaient déjà été montrés (Eroschenko & Wilson, 1975) sur des animaux avant l'exposition professionnelle. Chez les rats mâles, le fonctionnement de l'épididyme est affecté mais cela n'en modifie pas la qualité et la concentration de la qualité finale du sperme (Linder *et al.*, 1983). Chez la souris femelle, la chlordécone altère le cycle œstral (Eroschenko, 1981) probablement à cause de ses propriétés ostrogéniques (Hammond *et al.*, 1979). Chez la femme allaitante, la chlordécone passe par le lait. D'après une étude menée en 2013

par Multigner *et al.*, la chlordécone est spermatotoxique et affecte le développement des nourrissons masculins uniquement (Multigner *et al.*, 2016).

## V. Dégradation de la chlordécone dans l'environnement et métabolites associés

### A. Dégradation microbiologique de la chlordécone

La pollution engendrée par la chlordécone affecte des milieux où les microorganismes sont naturellement présents. Malgré la stabilité de la molécule, sa dégradation par la microflore bactérienne et/ou les champignons des milieux pollués a été recherchée. Différentes études ont été menées sur des échantillons de sol ou avec des bactéries isolées ainsi que des espèces fongiques, en aérobiose ou anaérobiose pour connaître l'implication de ces derniers dans un mécanisme de dégradation de la chlordécone.

En 1988, George et Claxton (George & Claxton, 1988) ont identifié des bactéries du genre *Pseudomonas* qui dégraderaient partiellement la chlordécone. Les auteurs auraient identifié par HPLC-UV-visible deux métabolites pouvant être un mono- et un dihydrochlordécone. Malheureusement, aucune analyse chimique supplémentaire ni aucune publication ultérieure n'ont pu confirmer leur résultat. Les auteurs contactés ont essayé de retrouver les cahiers de laboratoire pouvant indiquer si la souche avait été stockée, mais sans succès.

Une espèce d'archées *Methanosarcina thermophila* serait capable de dégrader la chlordécone. D'après les auteurs, cette archée dégraderait le pesticide jusqu'à 85% en 10 jours, en plusieurs métabolites polaires et apolaires (Jablonski *et al.*, 1996). La CO déshydrogénase sous forme réduite, isolée des bactéries permettrait aussi de catalyser la transformation de la chlordécone en composés polaires et apolaires. Dans tous les cas, un réducteur chimique puissant, le citrate de titane (III) est employé pour maintenir l'anaérobiose. Un profil semblable de dégradation a été observé avec des cofacteurs corrinoïdes réduits, analogues de la vitamine B<sub>12</sub>, ainsi que des coenzymes F<sub>430</sub>, isolés des complexes méthyl coenzyme M méthylréductase des archées *M. thermophila*, suggérant un mécanisme réducteur pour la conversion de la chlordécone. A nouveau, aucune publication ultérieure n'a pu confirmer leurs résultats et les expériences menées au Genoscope avec une souche commerciale (DSMZ) n'a pas permis de les reproduire.

D'autres essais de dégradation ont été menés avec des microorganismes en condition aérobie. Les auteurs Orndorff et Colwell ont identifié des bactéries du genre *Pseudomonas* ainsi qu'une culture enrichie, transformant la chlordécone à hauteur de 30% en mono- et dihydrochlordécone, ainsi qu'en chlordécol, en 100 jours (Orndorff & Colwell, 1980). Sakakibara *et al.* ont étudié la dégradation aérobie

de différents pesticides organochlorés persistants à partir d'un mélange sol-charbon enrichi (Sakakibara *et al.*, 2011). *Pseudonocardia spp.* a été isolée puis identifiée par séquençage de son gène codant l'ARNr 16S. Dans ces conditions, la chlordécone serait dégradée à 87% en 100 jours. Là aussi, il n'y a pas de confirmation par des publications ultérieures et les auteurs n'ont jamais répondu à nos demandes de renseignements.

Plus récemment, Fernandez-Bayo *et al.* (Fernández-Bayo *et al.*, 2013) ont mis en évidence une faible minéralisation de la chlordécone (4,9 et 3,2%) sous forme de CO<sub>2</sub> dans deux horizons de sols de terres agricoles tropicales de type andosol, en conditions aérobies à l'aide de molécules marquée au <sup>14</sup>C. Une étude menée par Merlin *et al.* (Merlin *et al.*, 2014) a permis d'isoler 103 souches fongiques capables de pousser sur un milieu salin minéral contenant de la chlordécone. Pour certaines d'entre elles, une diminution jusqu'à 40% de chlordécone a été observée, sans détection de métabolites chlorés. L'hypothèse d'une bioaccumulation à l'intérieur de certains de ces champignons a été envisagée.

Bien que ces différentes études permettent d'envisager qu'un processus naturel puisse exister, aucune n'a permis de mettre en évidence de manière convaincante et reproductible la dégradation de la chlordécone, que ce soit en laboratoire ou dans les sols. La difficulté du dosage de la chlordécone couplée à sa forte affinité pour les matières organiques et plastiques laissent planer un doute sur plusieurs de ces résultats, d'autant plus que certains lots de chlordécone contiendraient un peu de monohydrochlordécone. Des études théoriques des propriétés thermodynamiques de la chlordécone ont été réalisées (Dolfing *et al.*, 2012). Ces calculs indiqueraient que si des processus biologiques de respiration ou de fermentation sur la chlordécone n'ont pas encore été identifiés, le bilan thermodynamique de telles réactions ne s'y oppose pas. On notera cependant que ces études, réalisées sur la forme cétone de la chlordécone pourraient différer des résultats sur la forme gem-diol, qui se forme en présence d'eau et donc probablement la forme présente dans l'environnement.

## **B. Transformation chimique de la chlordécone**

### **1. Transformation de la chlordécone par voies réductrices**

Fariss *et al.* ont converti la chlordécone en chlordécol avec du tétrahydruroborate de sodium (NaBH<sub>4</sub>) comme réducteur, avec un rendement de plus de 60 % (Figure 13-a) (Fariss *et al.*, 1982). La réduction de dérivés mono- et dihydrochlordécone, à l'époque commerciaux, a aussi été réalisée avec du tétrahydruroborate de zinc (Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) (Figure 13-b).

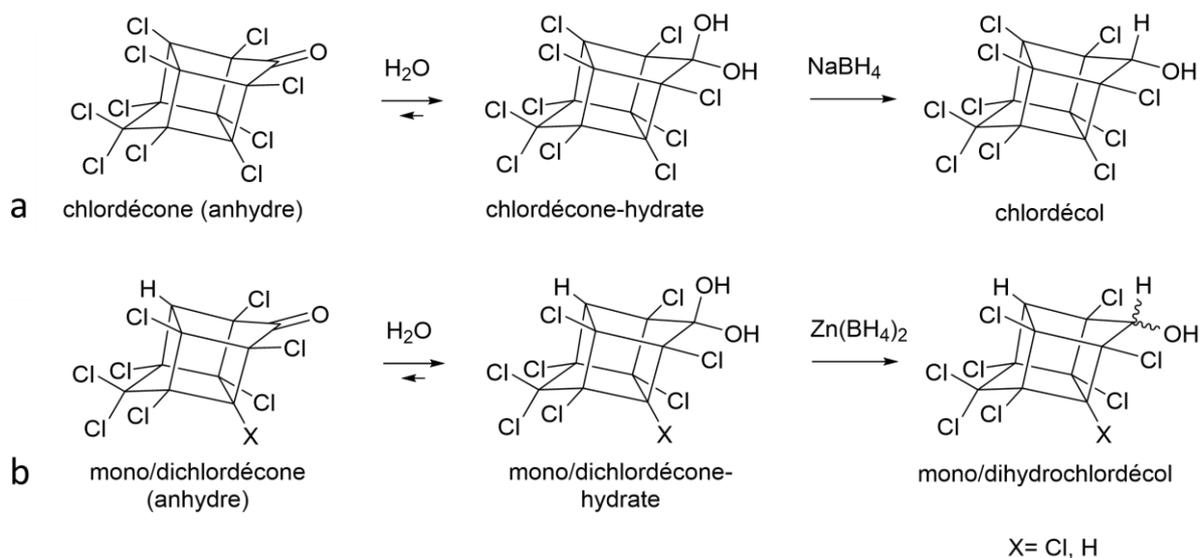


Figure 13: Réduction de (a) la chlordécone en chlordécol avec  $NaBH_4$  (Fariss *et al.*, 1982) et (b) des dérivés mono- et dihydrochlorodécone en (respectivement) mono- et dihydrochlorodécol avec  $Zn(BH_4)_2$  (Fariss *et al.*, 1982).

Des réactions de réduction de la chlordécone en chlordécol en présence d'alcool ont été réalisées par différents auteurs.

Dilling *et al.* (1967) ont réduit la chlordécone par une réaction menée à 200°C dans du diéthylglycol en présence d'hydroxyde de potassium (KOH). Soine *et al.* ont observé cette réduction lors de la dissolution de la chlordécone dans des alcools primaires et secondaires, catalysée par  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Al^{3+}$  (Soine *et al.*, 1983). D'après ces auteurs, la réaction se fait selon le mécanisme de réduction de Meerwein-Ponndorf-Verley (Figure 14), elle peut aussi avoir lieu au cours de l'injection à haute température (200°C) en GC-MS.

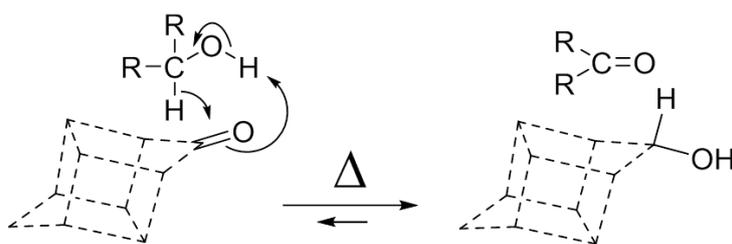


Figure 14 : Mécanisme simplifié de la réduction thermique de Meerwein-Ponndorf-Verley (tiré et adapté de (Soine *et al.*, 1983))

En 1967, Dilling *et al.* ont déchloré entièrement la chlordécone par une réduction de Wolff-Kishner suivie d'une réduction grâce au lithium en milieu basique (Figure 15) (Dilling *et al.*, 1967).

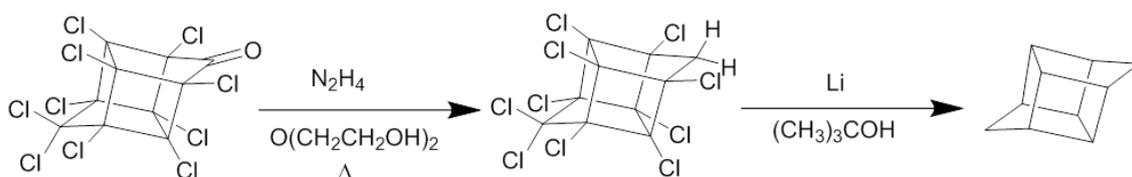


Figure 15 : Réduction et déchloration complète de la chlordécone (tiré et adapté de (Dilling *et al.*, 1967))

## 2. Ouverture de la cage bishomocubane

La structure bishomocubane peut subir un réarrangement de Favorskii, pour se transformer en structure homocubane (Figure 16) (Scherer *et al.*, 1966).

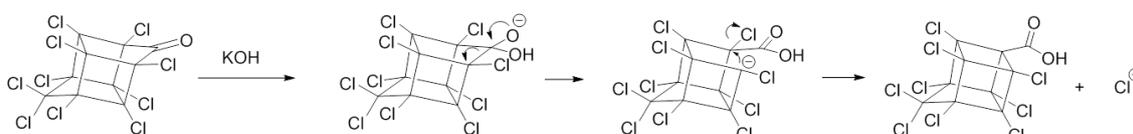


Figure 16 : Réarrangement de Favorskii (tiré et adapté de (Scherer *et al.*, 1966)).

L'ouverture de la cage bishomocubane a été également étudiée sur le Mirex, molécule de même structure que la chlordécone mais entièrement chlorée (Dilling *et al.*, 1967). Avec un traitement réducteur et basique, la structure cage a pu être ouverte (Figure 17).

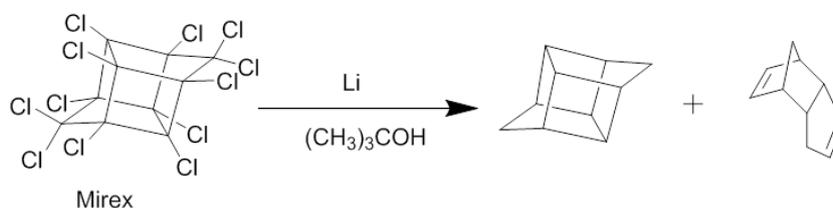


Figure 17 : Ouverture de la structure bishomocubane du Mirex (Dilling *et al.*, 1967).

## 3. Transformation de la chlordécone par *In Situ* Chemical Reduction (ISCR)

Le procédé Daramend® qui utilise un mélange de fer zéro valent (45%) et de matière végétale (55%), a permis d'observer une diminution significative de chlordécone allant jusqu'à 74% selon les sols (Mouvet *et al.*, 2016). Des dérivés hydrochlordécones de formule  $C_{10}Cl_{10-n}H_nO$  ( $n=1$  à 7), ont pu être détectés par analyses GC-MS mettant ainsi en évidence la possibilité d'une voie de déchloration réductive de la chlordécone. Cependant, ce traitement produit de nombreux métabolites. Il nécessite une concentration très élevée en fer et n'est pas adapté à la typologie des sols contaminés antillais. Une variante du procédé avec de la bagasse (déchet organique de la canne à sucre) et moins de fer a été testée mais le sol devient alors trop basique (Bristeau *et al.*, 2014). Au cours du processus, il n'y a pas de formation sélective d'un métabolite et la cage bishomocubane de la chlordécone n'est pas ouverte. Les composés qui en résultent ne sont a priori pas dénués de toxicité (cf. § V.D).

#### 4. Transformation photochimique de la chlordécone

La photodégradation du Mirex ( $C_{10}Cl_{12}$ ) par la lumière solaire ou les rayons UV est à l'origine de produits tels que la chlordécone et un dérivé monohydro du Mirex. D'autres métabolites produits ont une polarité beaucoup plus élevée que celle du Mirex ou que celle de son dérivé monohydro (Ivie *et al.*, 1974).

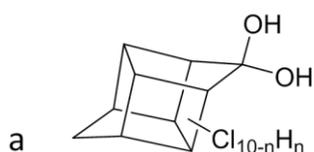
Dans l'eau et à des concentrations de l'ordre de quelques ppm (mg/l) ou moins, la chlordécone peut être déhalogénée par un procédé impliquant des rayons UV et du dihydrogène ( $H_2$ ) comme réducteur. Cette réaction dépend du pH et la dégradation de la chlordécone est d'autant plus efficace que le milieu contient 5% de soude (NaOH). Ainsi, 95 à 99% de la chlordécone est dégradée en 90 minutes et est à l'origine de produits tels que les mono- di- tri- tétra- et pentahydrochlordécones (Reimers *et al.*, 1989; Sittig, 1980).

L'analyse par spectrométrie de masse et par IR des produits issus de la photolyse du Mirex, du Kelevan et de la chlordécone-hydrate a été réalisée par Alley *et al.* (1974). Les produits identifiés sont des mono et dihydro dérivés des molécules étudiées.

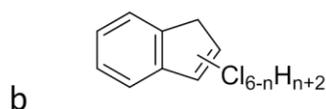
Les travaux de Wilson et Zehr (Wilson & Zehr, 1979) ont montré la transformation de 85% de chlordécone associée à la production du 8-monohydrochlordécone et du 2,8-dihydrochlordécone, en présence d'une lampe UV à 450 Watts. La purification des produits les a menés à des rendements de l'ordre du pourcent pour chacun des composés.

#### 5. Transformation radicalaire de la chlordécone

Schrauzer et Katz (Schrauzer & Katz, 1978) ont étudié la dégradation de la chlordécone en présence de la vitamine  $B_{12}$  et de différents réducteurs dont  $NaBH_4$ . Deux groupes de dérivés apparaissent : des composés à structure hydrochlordécone : mono-, di-, tri-, tétra- et pentahydrochlordécones (Figure 18-a) ainsi que des dérivés de formule  $C_9Cl_{6-n}H_{n+2}$  ( $n=1, 2, 3$ ) de structure postulée type indène (Figure 18-b).



hydrochlordécones ( $n= 1 \text{ à } 5$ )



polychloroindènes ( $n= 1 \text{ à } 3$ )

Figure 18 : Structures hydrochlordécone (a) et chloroindène (b).

Selon les auteurs de l'étude, la conversion de la chlordécone en indène halogéné peut être envisagée si la structure en cage s'ouvre, conduisant à l'intermédiaire 4,7-méthanoindèn-8-one (Figure 19). Les composés ayant ce type de structure sont connus pour subir facilement une décarbonylation (Mackenzie, 1960; Mcbee *et al.*, 1955).

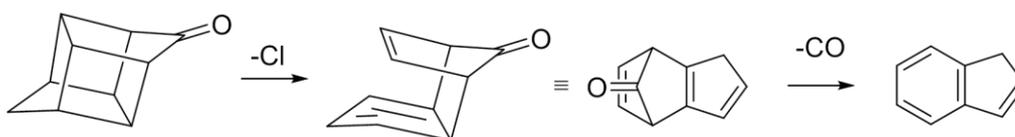


Figure 19 : Etapes proposées pour la formation des chloroindènes depuis la structure cage de la chlordécone (tiré et adapté de (Schrauzer & Katz, 1978)).

Inspirés de ces travaux, des essais de transformation plus récents ont été entrepris en impliquant la vitamine B<sub>12</sub> avec différents réducteurs : 1,4-dithiothreitol (DTT) et le zinc zéro valent (Ranguin *et al.*, 2017). La chlordécone a pu être transformée à 90% et un composé similaire à celui proposé par Schrauzer et Katz, de formule brute C<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>H<sub>3</sub> a été détecté dans le milieu réactionnel. Une structure affirmée mais non prouvée serait un pentachloroindène comme produit majoritaire issu des analyses en GC-MS (Ranguin *et al.*, 2017).

### C. Transformation thermique de la chlordécone

En 1960, les travaux de Eaton *et al.* (Eaton & Klaassen, 1979) ont permis l'ouverture de la cage par pyrolyse à 500°C. Le produit majoritaire est l'octachloroindène (Figure 20) à 80%.

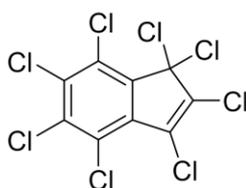


Figure 20 : Structure de l'octachloroindène.

En revanche, pour réaliser une combustion totale de la chlordécone (tous les carbones transformés en CO<sub>2</sub>), des températures plus élevées, de l'ordre de 1000°C sont nécessaires (Epstein, 1978). Duvall *et al.* notent la destruction totale de la chlordécone à 500°C, avec un temps de résidence de 1 seconde (Duvall & Rubey, 1976). Cependant, l'hexachlorocyclopentadiène (C<sub>5</sub>Cl<sub>6</sub>) et l'hexachlorobenzène (C<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>) sont présents dans les effluents d'incinération de 400°C à 600°C et de 500°C à 900°C respectivement.

Le traitement thermique par incinération nécessite l'excavation des sols, pour les brûler et les décontaminer par combustion du polluant. Des températures de 900°C à 1200°C sont nécessaires pour la combustion complète des composés organiques mais aussi pour éviter la formation de dioxines,

composés toxiques formés au cours de l'incinération des déchets, mais aussi de l'hexachlorobenzène, observé dans le cas de l'incinération de la chlordécone, dont des traces sont encore observables au-delà de 900°C (Duvall & Rubey, 1976). L'étude précédemment citée avait été conduite dans le but d'apporter des informations sur l'élimination thermique de la chlordécone, en vue de dépolluer les sols contaminés (Duvall & Rubey, 1976). Cette technique, coûteuse n'est pas envisageable à l'échelle des 20000 ha contaminés et remet aussi en question d'incinération des plantes éventuellement utilisées en phytoremédiation (Vergani *et al.*, 2017).

#### **D. Toxicité des produits de transformation**

Des tests de toxicité de la chlordécone et des produits de transformation. La chlordécone-alcool, le monohydrochlordécone et le dihydrochlordécone ont été réalisés sur les mitochondries de foie isolé de rats. Ces essais ont montré une toxicité croissante du dihydro- au monohydrochlordécone, puis la chlordécone et la chlordécone alcool (chlordécol).

Dans le cas de la réduction chimique *in situ* (ISCR), l'alternance de cycles réducteurs imposés par un mélange de fer zéro valent et de zinc zéro valent, et oxydant par aération du sol a conduit à l'abattement de 74 à 22% de la chlordécone selon le type de sol traité (Mouvet *et al.*, 2016). La transformation de la chlordécone n'est cependant pas totale. Elle est associée à la formation de 11 hydrochlordécones après 27 jours (Legeay *et al.*, 2017). Parmi eux, un monohydrochlordécone et un trihydrochlordécone sont majoritairement observés et la somme des aires relatives de ces pics cumulées représente 63% de la totalité des 11 hydrochlordécones observés. Des études de génotoxicité, mutagénicité et des propriétés proangiogéniques ont été réalisées sur la chlordécone et ainsi que sur le monohydrochlordécone et le trihydrochlordécone obtenus purs par synthèse chimique (Legeay *et al.*, 2017). L'étude conclut une absence de génotoxicité et de mutagénicité pour les deux produits de transformation, comme pour la chlordécone. Les propriétés proangiogéniques de la chlordécone sont évaluées plus importantes que pour le monohydrochlordécone, elles-mêmes plus importantes que pour le trihydrochlordécone. Ainsi, la diminution du nombre de chlores sur la structure se traduirait par une diminution des propriétés proangiogéniques (Legeay *et al.*, 2017).

Une étude classant la toxicité des pesticides et leurs produits de transformations d'après leurs propriétés chimiques en modélisation moléculaire via l'outil de traitement de données TyPol prévoit un comportement environnemental et une toxicité des mono, di et trihydrochlordécones semblable à ceux de la chlordécone (Benoit *et al.*, 2017). Cependant, des hydrochlordécones ayant perdu un plus grand nombre de chlores pourraient se comporter différemment et être moins toxiques (Benoit *et al.*, 2017).

## E. Dégradation chimique du Mirex

Schrauzer et Katz ont étudié la dégradation de la chlordécone et du Mirex en présence d'un catalyseur, la vitamine B<sub>12s</sub> (vitamine B<sub>12</sub> réduite) et de plusieurs réducteurs dont le tétrahydroborure de sodium (Schrauzer & Katz, 1978). Les produits principalement obtenus dans le cas du Mirex sont des dérivés hydromirex de formule C<sub>10</sub>Cl<sub>12-nHn</sub> (n=1 à 8).

Des travaux de déchloration du Mirex ayant pour but de mimer sa dégradation dans l'environnement ont été réalisés en utilisant l'hématine comme catalyseur et le dithionite de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) comme réducteur (Holmstead, 1976). Cette déchloration a permis d'observer des mono-, di-, tri- et tétrahydromirex ainsi que des composés plus polaires.

Des milieux réducteurs élaborés à partir de polyéthylène glycol ou de tétraéthylène glycol, de l'hydroxyde de potassium en association avec du borohydrure de sodium ou de l'alkoxyhydrure de bore, ont permis la dégradation du Mirex à partir de 70°C. Ce taux de réduction est accru dans le cadre de l'utilisation du système catalytique Bu<sub>3</sub>SnH/ALBN, pour lequel la disparition du Mirex est totale au bout d'une heure à 58°C (Tabaei *et al.*, 1991). Ces protocoles de déhalogénéation radicalaires pourraient probablement s'appliquer aussi à la chlordécone.

## VI. Perspectives pour la transformation chimique de la chlordécone

Des conditions de réactions chimiques ont été réalisées sur la chlordécone et ont conduit avec succès à sa conversion en différentes familles de produits (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978). D'autres conditions chimiques ont été décrites pour dégrader des polluants organochlorés différents de la chlordécone dont le lindane et le Mirex. Il s'agit souvent de combiner un agent réducteur avec un complexe métallique (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978 ; Lewis *et al.*, 1996 ; Chiu & Reinhard, 1995 ; Marks *et al.*, 1989). Les complexes organométalliques fréquemment impliqués et qui semblent jouer un rôle déterminant dans les transformations seront présentés.

La vitamine B<sub>12</sub> est impliquée dans de nombreuses conditions biotiques (Fetzner & Lingens, 1994) et abiotiques. Des études plus approfondies ont été menées pour comprendre son rôle dans la dégradation des organochlorés (Berry & Stotter, 1977; Kim & Carraway, 2002; Lewis *et al.*, 1996) notamment en fonction de l'agent réducteur auquel elle est associée. Une présentation non exhaustive de transformation d'organochlorés pour lesquelles le rôle de la vitamine B<sub>12</sub> est étudié sera présentée. Une présentation des conditions chimiques efficaces pour transformer les composés chlorés non testées sur la chlordécone est proposée.

## A. Présentation des complexes métalliques décrits dans les transformations chimiques de polluants organochlorés

La vitamine B<sub>12</sub> fait partie de la famille des cobalamines, des vitamines hydrosolubles indispensables au bon fonctionnement du cerveau et du système nerveux. Leurs rôles de cofacteurs d'enzymes impliquées dans diverses transformations a été démontré (Assaf-Anid *et al.*, 1994; Assaf-Anid *et al.*, 1992; Chiu & Reinhard, 1995; Clod *et al.*, 1997; Holliger *et al.*, 1992; Krone, *et al.*, 1991; Smith & Woods, 1994). Il existe différents types de cobalamines, aussi appelées vitamines B<sub>12</sub>. Elles ont toutes en commun un noyau corrine (Figure 21) chélatant un ion cobalt au centre. Sur les six sites de coordination du cobalt, quatre sont occupés par le noyau corrine. Un cinquième est lié à une base azotée comme la diméthylbenzimidazole et le sixième site peut être occupé par différents ligands, nommés ligands axiaux. Les quatre ligands principaux sont le groupe hydroxyle, méthyl, cyanide ou 5' deoxyadénosyl et donnent les noms respectifs d'hydroxocobalamine, méthylcobalamine, cyanocobalamine et adénosylcobalamine (Figure 22). En fonction de ces ligands, la cobalamine a différentes propriétés biologiques chez les organismes vivants.

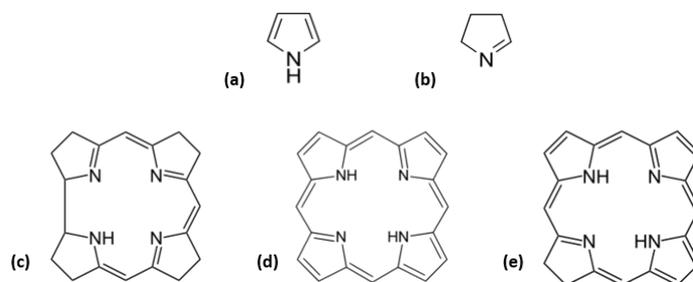
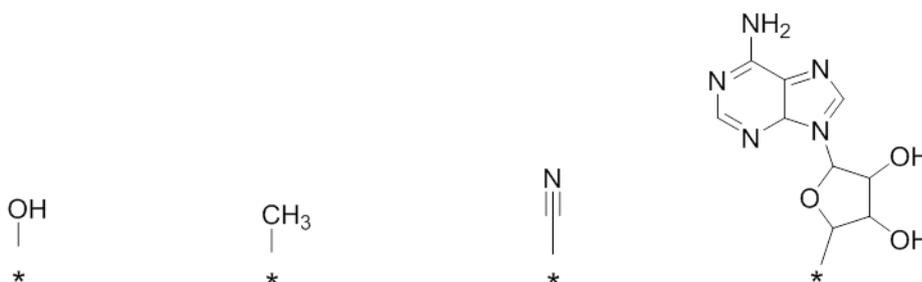


Figure 21 : Structure chimique des noyaux (a) pyrrole, (b) 1-pyrroline, (c) corrine, présents dans les structures cobalamine comme la vitamine B<sub>12</sub>, (d) porphyrine, présent dans l'hématine et (e) chlorine, présent dans les chlorophylles.



Hydroxocobalamine      Méthylcobalamine      Cyanocobalamine      Adénosylcobalamine

Figure 22 : Ligands axiaux possibles du cobalt et dénomination de la cobalamine (vitamine B<sub>12</sub>) en fonction du ligand.

Dans les cobalamines, le cobalt est trivalent et noté Co(III). Dans certaines conditions réductrices, le cobalt peut être réduit au degré d'oxydation II, noté Co(II) et la vitamine B<sub>12</sub> est alors qualifiée de vitamine B<sub>12r</sub>. Dans des conditions encore plus réductrices, le cobalt peut être au degré d'oxydation (I), noté Co(I) et la vitamine B<sub>12</sub> est qualifiée de vitamine B<sub>12s</sub> (Schrauzer, 1976).

La vitamine B<sub>12</sub> est le complexe métallique couramment utilisé pour la transformation des organochlorés. L'hématine et la chlorophylle possèdent aussi des systèmes conjugués et même aromatique dans ces derniers cas. Ils sont constitués de cycles pyrroles et/ou pyrroline (Figure 21-b et c) chélatant aussi un métal : le fer pour l'hématine et le magnésium pour la chlorophylle. De tels systèmes sont aussi impliqués dans la transformation d'organochlorés (Holmstead, 1976; Marks *et al.*, 1989).

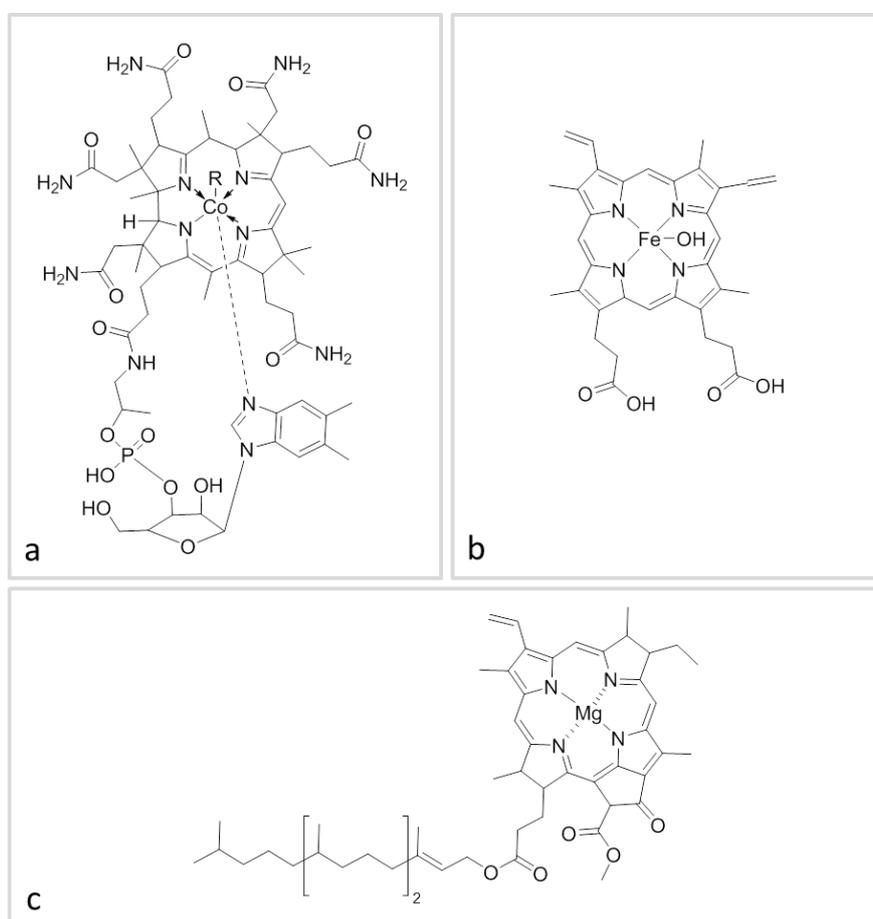


Figure 23 : Structure chimique des catalyseurs utilisés dans les réactions chimiques de transformation de la chlordécone (a) vitamine B<sub>12</sub>, (b) hématine et (c) chlorophylle a. R pouvant être chacun des groupements présentés en Figure 22.

L'hématine a aussi été utilisée pour la transformation de pesticides chlorés comme le Mirex et le Lindane (Holmstead, 1976; Marks *et al.*, 1989). Dans le cas de la chlorophylle, une faible activité catalytique a été observée sur le lindane (Marks *et al.*, 1989).

## B. Implication de la vitamine B<sub>12</sub> pour l'étude du mécanisme de transformation de polluants organiques chlorés : travaux antérieurs

La vitamine B<sub>12</sub>, employée comme catalyseur dans les transformations chimiques de la chlordécone (Schrauzer & Katz, 1978), a été utilisée pour la déhalogénéation réductive d'autres polluants organiques chlorés. Des propositions de mécanismes ont été émises, selon l'agent réducteur utilisé.

En 1977, Berry et Sotter (Berry & Stotter, 1977) parviennent à déchlorer le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) à l'aide de vitamine B<sub>12</sub>. Il apparaît que la vitamine B<sub>12</sub>, associée au monoxyde de carbone est nécessaire au bon déroulement de la réaction. Le cobalt serait actif une fois réduit au degré d'oxydation II.

En présence de vitamine B<sub>12</sub>, la déchloration réductive peut s'effectuer grâce à différents réducteurs. Lewis *et al.*, ont testé l'effet engendré sur la déchloration du tétrachlorure de carbone en utilisant un mélange de sulfure de sodium et de cystéine, du dithiothréitol, ainsi que du citrate de titane (III) (Lewis *et al.*, 1996). Le taux de déchloration est croissant avec la diminution du potentiel d'oxydoréduction du réducteur. Avec le citrate de titane (III), les chercheurs arrivent à obtenir une majorité de chlorométhane (72 %) et du méthane (13%). La force du réducteur est donc un paramètre influençant le taux de déchloration. Le citrate de titane (III) réduirait la vitamine B<sub>12</sub> au degré d'oxydation I et orienterait la réaction vers un mécanisme d'hydrogénolyse. Les autres réducteurs, moins forts, conduiraient au degré d'oxydation II et à un mécanisme d'hydrolyse réductive (Figure 24).

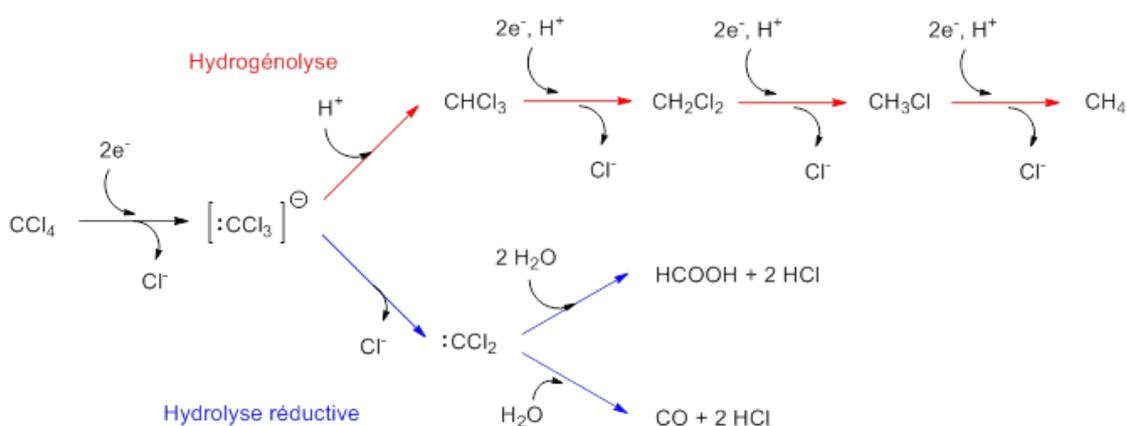


Figure 24 : Différents mécanismes de réduction du tétrachlorure de carbone proposés en présence de citrate de titane(III) et de vitamine B<sub>12</sub> (tiré et adapté de (Lewis *et al.*, 1996)).

D'autres réducteurs ont été utilisés pour réaliser la réaction de déchloration réductive en présence de vitamine B<sub>12</sub>. En 2002, Kim et Carraway (Kim & Carraway, 2002), ont montré la possibilité

de réduire le perchloroéthylène et le trichloroéthylène par des métaux zéro valent (zinc et fer). Avec le zinc les deux composés sont réduits, alors que le fer permet seulement une réduction du perchloroéthylène. Dans ce cas, le zinc conduirait à la réduction du cobalt de la vitamine B<sub>12</sub> au degré d'oxydation I, alors que le fer ne la réduirait qu'au degré d'oxydation II, d'après des analyses spectrophotométriques en UV-visible.

## VII. Conclusions et objectifs de la thèse

La pollution à la chlordécone cause de nombreux problèmes sanitaires, sociaux, économiques et environnementaux. La rémanence de la molécule est prévue pour persister quelques décennies voire des siècles dans certains sols et les eaux des îles de la Martinique et de la Guadeloupe. Quelques travaux visant à dégrader la chlordécone par voie microbiologique ont été menés (Fernández-Bayo *et al.*, 2013; George & Claxton, 1988; Jablonski *et al.*, 1996; Merlin *et al.*, 2014; Orndorff & Colwell;1980). Aucune ne permet une dégradation totale de la chlordécone et dans le cas où une transformation serait observée, les métabolites sont généralement des mono- et dihydrochlordécones. Bien que la toxicité de ces produits soit a priori réduite (Legeay *et al.*, 2017), elle reste élevée et non satisfaisant comme alternative à la chlordécone. Ces transformations ne permettent pas d'envisager de solution de bioremédiation dans l'immédiat. D'autres produits auraient été observés par Jablonski au cours d'une transformation de la chlordécone réalisée par des archées (Jablonski *et al.* 1996). Bien que de nature différente de la chlordécone et de ses dérivés hydro-, aucune caractérisation de ces métabolites. Leur toxicité ou comportement environnemental est inconnu. Le seul produit de transformation dont un standard est disponible et permet de développer des protocoles de dosage est le 8-monohydrochlordécone. La transformation chimique de la chlordécone a été réalisée dans différents cas en laboratoire (Alley *et al.*, 1974 ; Belghit *et al.*, 2015; Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978; Wilson & Zehr, 1979) mais aussi directement en sols (Mouvet *et al.*, 2016.). Les produits rencontrés sont aussi les hydrochlordécone (du mono- au pentahydrochlordécone) mais aussi des composés à neuf carbones qui auraient une structure polychloroindène (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978).

Une transformation par voie microbiologique de la chlordécone a été mise en place au Genoscope et permet la disparition totale de la chlordécone en présence de consortia bactériens isolés et de bactéries du genre *Citrobacter* isolées à partir de ces consortia. La disparition de la chlordécone est associée à la détection de nombreux composés chlorés dont des hydrochlordécones et des composés polaires à neuf carbones dont un de formule C<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>H<sub>3</sub>. Celui-ci semble s'accumuler dans les cultures. Le spectre de masse de ce composé est très proche de ceux décrits par voie de dégradation

chimique (Schrauzer & Katz, 1978). Pour la première fois, l'ouverture de la cage de la chlordécone est observée en conditions microbiologiques. Les travaux réalisés dans cette thèse viseront à mieux comprendre la transformation présentée ici.

Le premier chapitre a apporté des éléments indispensables à la compréhension du contexte dans lequel se déroulent ces travaux de thèse. La chlordécone est une molécule toxique et difficilement biodégradable mais des moyens de dépollution doivent être investigués.

Dans le chapitre 2, une description détaillée de la transformation par voie microbiologique sera présentée en évoquant les démarches menées pour isoler les bactéries responsables de la transformation. Les métabolites détectés seront décrits et une analyse structurale sera initiée à partir des analyses par spectrométrie de masse associée à de la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) et en phase liquide (LC-MS). A l'issue de cette étude, trois familles de métabolites : les hydrochlordécones, les polychloroindènes et les acides polychloroindène carboxyliques ont été identifiées. Cette dernière famille de composés polaires est décrite pour la première fois comme des produits de transformation de la chlordécone.

Afin de mieux caractériser les différents membres de ces familles, des premiers développements de purification ont permis d'isoler les métabolites majoritaires de la transformation (Chapitre 3).

Dans le but d'obtenir les métabolites en plus grande quantité, plus rapidement et de façon plus sélective, un criblage des transformations chimiques par approche biomimétique a été mené. Les conditions plus prometteuses seront présentées. Inspirées des travaux précédemment cités sur les transformations chimiques de la chlordécone mais aussi d'autres organochlorés, elles impliquent différents agents réducteurs et complexes métalliques. Un travail de développement de purification adapté à chaque métabolite a été réalisé, permettant l'obtention de nombreux métabolites purs. La séquence de purification sera décrite, associée aux conditions de productions optimisées pour chaque métabolite (Chapitre 4).

L'obtention de métabolites purs et à hauteur de quelques milligrammes a permis d'approfondir leur structure chimique. Des analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis l'élucidation de cinq métabolites des différentes familles et ont apportés de nombreux indices pour une dizaine d'autres (Chapitre 5).

La disponibilité de ces métabolites purifiés rend possible l'étude de leur dégradation et des mécanismes impliqués. Des liens entre les différentes familles ont pu être établis : la chlordécone

pourrait être partiellement déchlorée en mono- ou dihydrochlordécone avant d'être convertie soit en polychloroindènes soit en acides polychloroindène carboxyliques. Des suivis de potentiel d'oxydoréduction menés en fonction des agents réducteurs impliqués et des familles de métabolites ciblées apportent aussi des éléments précieux pour la compréhension du mécanisme (Chapitre 6).

Le chapitre 7 comporte une étude du fractionnement isotopique de la chlordécone au cours de sa transformation par voies chimique et biologique. Ces analyses ont été amorcées dans le but d'avoir des informations sur le mécanisme de transformation. Des travaux d'adaptation des méthodes classiquement utilisées ont été nécessaires pour utiliser cette approche sur une telle molécule. Les signatures isotopiques refléteraient des mécanismes différents selon les réactions chimiques. Les transformations microbiologiques étudiées (consortium bactérien ou bactérie isolée *Citrobacter*) auraient des mécanismes similaires. Des mesures isotopiques de différents lots commerciaux de Kepone et Curlone, pesticides dont la substance active est la chlordécone, ont été réalisées. Les valeurs similaires de ces lots faciliteraient une étude sur le terrain pour évaluer une éventuelle dégradation de la chlordécone dans les sols contaminés (Chapitre 7).

Le Chapitre 8 contient les détails des matériels et méthodes utilisés durant cette thèse.

Ce travail a permis d'apporter des informations précieuses sur la transformation microbiologique réalisée au Genoscope avec les consortia bactériens et les bactéries isolées *Citrobacter*, mais apporte aussi un nouveau regard sur des travaux plus anciens, comme ceux de Jablonski qui avaient identifié des métabolites polaires et apolaires au cours de leur transformation (Jablonski *et al.*, 1996). Les structures élucidées des métabolites pourront aussi être exploitées pour mieux comprendre les transformations dans d'autres conditions et approcher les voies mécanistiques associées. Les protocoles de production des métabolites et de leur purification permettent d'en faire des standards et d'investiguer leur présence dans les sols à la recherche d'indices d'une éventuelle dégradation. Ces développements analytiques devraient ouvrir des portes à l'évaluation d'éventuelles transformations et apporter des clés de compréhension des mécanismes de transformation de la chlordécone.

Un schéma général des travaux de cette thèse est présenté ci-dessous (Figure 25). Les chapitres où chaque étude est exposée sont indiqués.

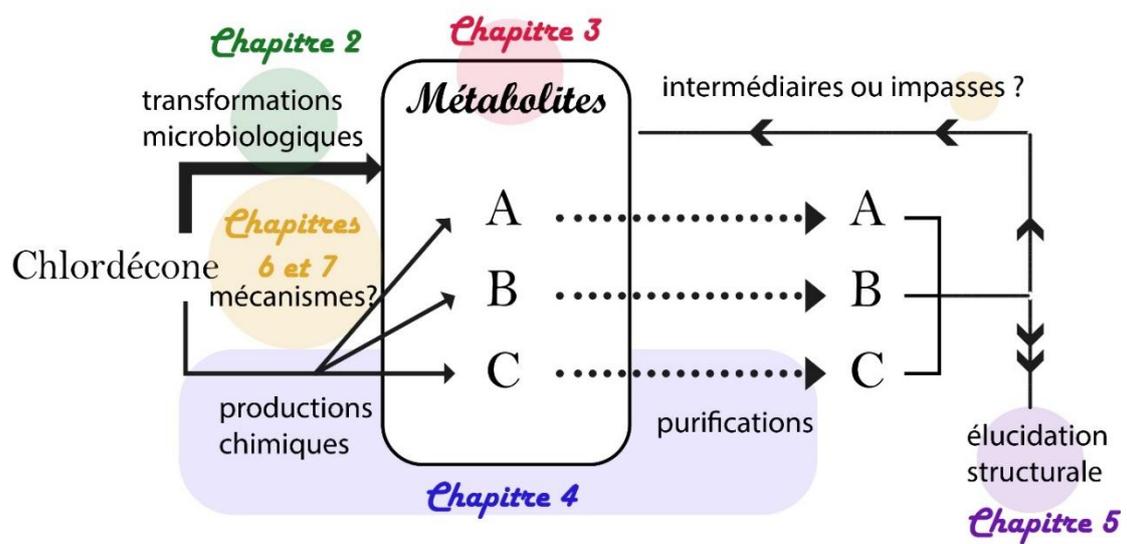


Figure 25 : Etudes abordées dans la thèse et chapitres associés.



**Chapitre 2 : Transformation totale de la  
chlordécone par voie microbiologique, isolement de  
consortia bactériens et de souches de *Citrobacter* et  
analyse des métabolites par spectrométrie de masse**

---

---

## Introduction

Comme évoqué au chapitre 1, peu d'études décrivent la transformation biotique de la chlordécone (Fernández-Bayo *et al.*, 2013; George & Claxton, 1988; Jablonski *et al.*, 1996; Merlin *et al.*, 2014; Orndorff & Colwell, 1980). Dans le cas où des métabolites ont été identifiés (mono- et dihydrochlordécones), seuls des taux de transformation faible de la chlordécone ont été observés. Dans le cas de la dégradation observée avec les archées (Jablonski *et al.*, 1996), une dégradation très significative (86%) a été obtenue. Dans ce cas, deux familles de métabolites non caractérisés ont été mises en évidence.

Au Genoscope, de nombreuses combinaisons de milieux de culture et de bactéries ont été réalisées en anaérobiose afin de tenter de dégrader la chlordécone. Dans certains cas, les suivis des milieux de culture par GC-MS ont permis de détecter des métabolites chlorés. Les consortia bactériens responsables des transformations ont été séquencés et deux *Citrobacter* spp., également capables de réaliser cette transformation, ont été isolés. En guise de prologue aux travaux réalisés dans cette thèse, nous présenterons la démarche menée au Genoscope pour trouver des bactéries capables de dégrader la chlordécone. La découverte de ces bactéries a fait l'objet d'une publication « Microbial Degradation of a Recalcitrant Pesticide : Chlordecone », dans *Frontiers in Microbiology* en décembre 2016 (Chaussonnerie *et al.*, 2016) et d'un dépôt de brevet (Demande française de brevet n° 16 54913).

Les analyses par GC-MS ont permis d'identifier des hydrochlordécones (famille A) et des composés apolaires (famille B) comme seuls métabolites de la transformation. Cependant, des analyses complémentaires par LC-MS réalisées pendant cette thèse ont révélé l'apparition et l'accumulation de nouveaux composés polaires et peu volatils (famille C) qui n'avaient jamais été détectés. Nous présenterons l'analyse par spectrométrie de masse de l'ensemble de ces métabolites.

## **I. Identification d'une transformation totale de la chlordécone en présence de bactéries**

### **A. Recherche de bactéries dégradant la chlordécone**

Les premières étapes de transformation des composés fortement chlorés prennent habituellement place en conditions anaérobies (Hug *et al.*, 2013). De plus, d'après sa structure chimique, la chlordécone serait utilisée comme accepteur d'électron (Dolfing *et al.*, 2012) pour conduire à des déchlorinations.

Afin de trouver des bactéries capables de dégrader la chlordécone, divers échantillons ont été collectés. Des sols contaminés par ce pesticide ont été prélevés en Guadeloupe (merci à Yves-Marie Cabidoche). Nous avons également utilisé des sols contaminés par diverses molécules chlorées (dichloropropane, dichloroisopropylether, perchloroethylene, trichloroethylene, trichloroethane, tetrachloromethane), des sédiments de l'estuaire de la Seine et des boues de la station d'épuration des eaux d'Evry. Trois approches ont été menées : des cultures directes ou des extraits de bactéries des échantillons contaminés, ainsi que des microcosmes de bactéries extraites des échantillons ont été mis en place. Des centaines de combinaisons de cultures ont été initiées en faisant varier plusieurs paramètres comme leur composition, l'atmosphère, la concentration en chlordécone, la masse et la nature des bactéries inoculées. Pendant un an, ces essais ont été suivis par microscopie et par GC-MS et des sous-cultures par dilution au dixième dans un milieu de culture frais ont été réalisées toutes les deux semaines. Cependant, avec la dose élevée de chlordécone utilisée (2 mg/ml en général) il n'y avait que rarement croissance bactérienne.

### **B. Découverte de consortia bactériens à l'origine d'une transformation totale de la chlordécone**

Des analyses en GC-MS ont permis d'identifier des traces de métabolites chlorés dans certains consortia. Ces derniers ont été étalés sur boîte et remis en culture. Parmi les vingt consortia, cinq sont à l'origine d'une forte accumulation d'un métabolite apolaire. Son spectre de masse rappelle les composés en  $C_9Cl_{5-n}H_{3+n}$  ( $n=0,1,2$ ) détectés par Schrauzer et Katz en 1978 (Schrauzer & Katz, 1978) dont les auteurs proposaient une structure indène sur la base des fragmentations en GC-MS et des spectres UV-visible. Ces composés avaient, à l'époque, été obtenu à l'issue d'essais de transformation abiotique de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub>. Deux consortia, les numéros 86 et 92, ont été suivis en particulier car leur capacité à transformer la chlordécone se démarquait des autres. La disparition de la chlordécone associée à l'apparition des métabolites, opérée par le consortium 86 a été suivie par GC-MS (Figure 26) et par LC-MS (Figure 27). Les suivis par GC-MS et LC-MS ont été réalisés

au cours de deux transformations différentes. Un profil similaire est obtenu pour le consortium 92 et ne sera pas illustré ici.

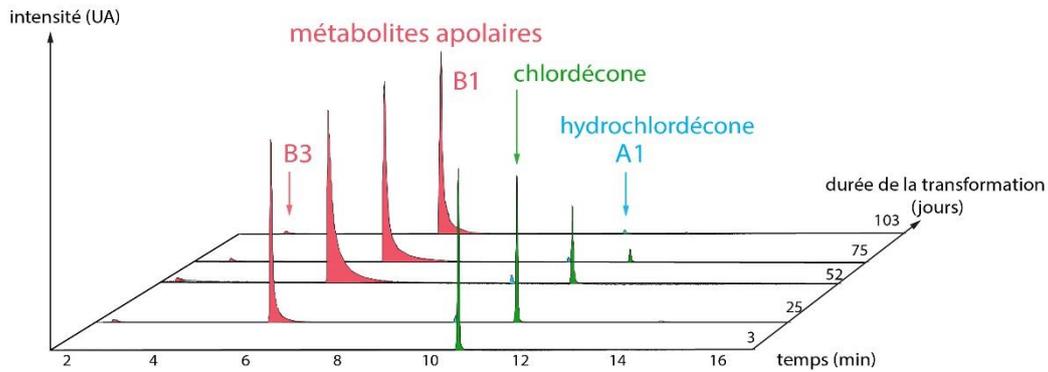


Figure 26 : Suivi en GC-MS au cours du temps de la transformation de la chlordécone en anaérobiose en présence du consortium bactérien 86 (tiré et adapté de Chaussonnerie *et al.*, 2016).

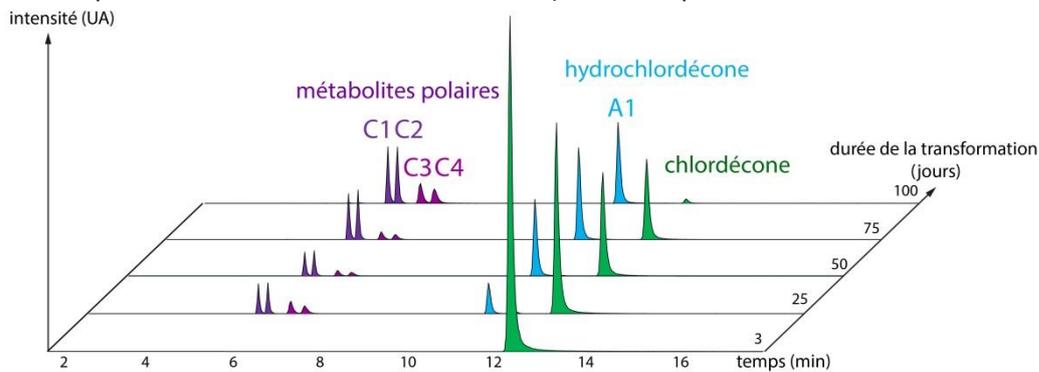


Figure 27 : Suivi en LC-MS au cours du temps de la transformation de la chlordécone en anaérobiose en présence du consortium bactérien 86.

Les ADN extraits des consortia bactériens 86 et 92 ont été séquencés (approche métagénomique) et les analyses révèlent la présence de douze génomes bactériens dont cinq communs aux deux consortia qui correspondent à des bactéries fermentatives (*Citrobacter* sp., *Dysgonomonas* sp.), sulfatoréductrices (*Desulfovibrio* sp.), acétogène (*Sporomusa* sp.) ainsi qu'une espèce de *Pleomorphomonas*. Aucune de ces espèces n'est connue pour respirer sur des organochlorés. D'après les analyses de séquences, une partie des bactéries du consortium 86 sont des bactéries anaérobies facultatives.

### C. Isolement de bactéries du genre *Citrobacter* transformant la chlordécone

Afin de tenter de simplifier les consortia ou mieux, d'isoler la ou les bactéries responsables de la transformation, des expériences de dilution successives ont été réalisées. Deux *Citrobacter* spp. nommés *Citrobacter* 86-1 et *Citrobacter* 92-1 montrant les mêmes capacités de transformation de la chlordécone ont ainsi été isolées depuis les consortia bactériens. La cartographie optique des génomes

et leur séquençage ont confirmé que les bactéries isolées sont très similaires entre elles. L'espèce bactérienne séquencée la plus proche est *Citrobacter amalonaticus* (Chaussonnerie *et al.*, 2016).

#### **D. A la recherche d'enzyme liées à la transformation de la chlordécone**

On notera que la détection des métabolites se fait généralement entre 7 et 20 jours après le lancement de la culture et traduirait une transformation de la chlordécone postérieure à la phase de croissance des bactéries et qui correspondrait plutôt à la phase de lyse des cellules. L'utilisation fortuite de la chlordécone pourrait avoir lieu, au travers du co-métabolisme. Un phénomène similaire (déchloration du  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane par *Citrobacter freundii*) a été décrit (Jagnow *et al.*, 1977) mais le mécanisme reste inconnu.

La caractérisation plus poussée des espèces de *Citrobacter* devrait conduire à un meilleur aperçu des voies mécanistiques impliquées dans la transformation de la chlordécone par ces bactéries. La vitamine B<sub>12</sub> est un élément important dans les processus de déhalogénéation. Elle peut être impliquée en tant que cofacteur d'enzymes comme les déhalogénases réductives (Payne *et al.*, 2015; Renpenning *et al.*, 2014), dans un contexte biologique (Fetzner & Lingens, 1994) ou chimique (Chiu & Reinhard, 1995; Lewis *et al.*, 1996; Schrauzer & Katz, 1978). Ainsi, des gènes éventuellement impliqués dans sa biosynthèse ont été recherchés. La voie complète de la biosynthèse anaérobie de la vitamine B<sub>12</sub> a été identifiée dans les génomes de *Citrobacter*, *Desulfovibrio*, *Sporomusa* et *Pleomorphomonas*. De plus, des gènes codant des enzymes dépendant de la vitamine B<sub>12</sub> ont été trouvés. Le génome de *Citrobacter* 86-1 comporte cinq enzymes dépendantes à la vitamine B<sub>12</sub> impliquées dans différentes voies du métabolisme. Comme aucun gène homologue à des gènes codant des déhalogénases réductives n'a pu être identifié, d'autres gènes codant des enzymes capables de réaliser des déchlorinations (linA et linB) ont été recherchés. En conclusion, aucune protéine impliquée dans la transformation de la chlordécone n'a été trouvée suite aux analyses de génome des consortia 86 et 92 ni de celles des bactéries pures 86-1 et 92-1.

En conclusion, deux consortia bactériens 86 et 92 ainsi que deux *Citrobacter* spp. 86-1 et 92-1 isolés depuis ces consortia sont capables de transformer la chlordécone en anaérobiose. La transformation quasi-totale est à l'origine de différents métabolites dont la structure indène proposée pour le métabolite majoritaire d'après les analyses par GC-MS révélerait l'ouverture de la cage bishomocubane de la chlordécone.

Ces bactéries seront utiles pour approfondir l'étude des voies possibles de l'élimination de cette molécule dangereuse et complexe. C'est pourquoi d'autres approches, qui font l'objet de cette thèse, seront étudiées pour investiguer la transformation.

## II. Définition des termes employés pour décrire la transformation observée au Genoscope

Comme évoqué dans le chapitre 1, les tentatives menées pour transformer la chlordécone ne sont pas toutes concluantes. Les essais par voies chimiques et physiques mènent en général à une transformation plus poussée (Belghit *et al.*, 2015; Schrauzer & Katz, 1978; Wilson & Zehr, 1979) que ceux impliquant des organismes vivants comme des bactéries, des archées et des champignons généralement moins reproductibles (Chaussonnerie *et al.*, 2016; Fernández-Bayo *et al.*, 2013; George & Claxton, 1988; Jablonski *et al.*, 1996; Merlin *et al.*, 2014; Orndorff & Colwell, 1980). Les termes employés varient en fonction du rôle de la chlordécone dans sa transformation. Dans le cas où elle participe à la croissance en servant de source de carbone et/ou source d'énergie (comme accepteur d'électron par exemple), elle fait partie du métabolisme. Si sa transformation est fortuite, par une enzyme promiscuitaire ou par un cofacteur présent et que l'organisme n'en tire pas d'intérêt, on parle de co-métabolisme.

On s'intéresse aussi à l'avancée de la transformation. Le terme « transformation » semble englober pour les pesticides, toutes les modifications qu'ils peuvent subir, allant d'un changement mineur dans la structure à la minéralisation. Le terme dégradation en revanche implique pour certains auteurs une modification dans la structure telle que le produit soit moins toxique que le pesticide parent (Wackett et Douglas Herschberger, 2001) ou bien, qu'au moins une partie soit convertie en petites molécules minérales (dioxide de carbone, nitrates, sulfates). Si l'emploi du terme « dégradation » n'est pas le même dans tous les ouvrages, il semblerait qu'il soit associé à une certaine efficacité dans la transformation au moins en termes de réduction de la toxicité. La minéralisation d'un constituant est employée dans le cas où les produits sont des petites molécules minérales. Elle peut être partielle ou totale. La dégradation peut être une minéralisation partielle (Huang *et al.*, 2008; Parales *et al.*, 2002, Bahlai *et al.*, 2010).

Enfin, se pose la question de l'utilisation du préfixe « bio » avant les termes « transformation » et « dégradation ». Dans le cas où l'implication d'une enzyme de l'organisme est avérée, la légitimité de l'emploi du préfixe ne se pose pas. En revanche, qu'en est-il dans le cas où la transformation du pesticide se fait en présence des bactéries, mais qu'aucune enzyme n'est identifiée pour agir sur le pesticide ? C'est le cas rencontré dans la transformation de la chlordécone réalisée au Genoscope, par les consortia mixtes bactériens et les souches de *Citrobacter* isolées. La transformation de la chlordécone est avérée, plusieurs produits de transformation sont détectés et malgré le séquençage et l'analyse des gènes, aucune enzyme n'a été identifiée pour catalyser la transformation. Pourtant, la présence des bactéries est bien nécessaire : dans le milieu de culture sans inoculum, la chlordécone

n'est pas transformée. Et si la transformation ne nécessitait pas l'activité d'une enzyme ? Si elle se faisait à l'extérieur de la bactérie, par l'activité de catalyseurs tels que les corrinoïdes, produits pas les bactéries ? La nature de la transformation observée n'est pas évidente à définir, d'autant plus que dans les travaux présentés par la suite, nous la comparerons à des transformations « purement » chimiques. N'ayant pas encore d'information sur la toxicité des produits de transformation, ni sur la production de molécules minérales, nous maintiendrons le terme de « transformation » pour qualifier les changements de structure opérés sur la chlordécone. Le préfixe « bio » ne sera pas utilisé ici. L'implication des bactéries dans la transformation sera toutefois précisée « par voie microbiologique » ou « microbiologique » en opposition aux transformations chimiques, biomimétiques ou abiotiques.

Cependant, l'absence de gènes homologues aux gènes de déhloagénases réductives connues, ne garantit pas l'absence d'enzymes susceptibles de catalyser la/les transformation(s) subie(s) par la chlordécone. Des analyses transcriptomiques (en cours de réalisation au Genoscope) pourraient apporter des informations précieuses à ce sujet. En l'absence d'arguments clairs pour prouver ou réfuter l'intervention d'un processus biologique dans la transformation observée, les composés produits seront qualifiés de métabolites, en opposition aux produits de transformation uniquement détectés par voies chimiques. Les composés issus des transformations par voie chimique qui ont la même structure qu'un métabolite (produit par voie microbiologique) seront nommés aussi « métabolites » dans cette étude.

### **III. Etude des métabolites par couplage chromatographie-spectrométrie de masse**

Les métabolites sont détectés au cours des suivis par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse utilisant une source électrospray (LC-ESI-MS) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse utilisant une source impact électronique (GC-EI-MS). Les spectres de masses obtenus par ces deux méthodes sont très différents du fait du mode d'ionisation des composés en sortie de la colonne.

En LC-MS, le mode d'ionisation par électrospray est un mode d'ionisation plutôt doux. Dans le cas des petites molécules, les ions généralement observés en spectrométrie de masse par électrospray (ESI MS, en sortie de chromatographie en phase liquide) en mode négatif représentent soit les molécules une fois déprotonées  $[M-H]^-$  (qui possèdent des groupements acides en phase gazeuse comme COOH, OH...), soit les adduits avec des anions  $[M+A]^-$ . En fonction des conditions de désolvatation plus ou moins douces, une fragmentation dans la source peut être observée. La fragmentation de l'analyte peut être étudiée en spectrométrie de masse en tandem (MS-MS ou MS<sup>2</sup>), au cours de laquelle un ion peut être sélectivement fragmenté. Les expériences par MS<sup>2</sup> de certains de nos composés ont été réalisées par dissociation induite par collision (CID).

Dans nos analyses par GC-MS, l'ionisation se fait par impact électronique en mode positif. Cette technique consiste à bombarder à l'aide d'électrons très énergétiques les analytes en phase vapeur. Un électron est éjecté de l'analyte, ce qui produit un radical cation. Ce dernier est nommé ion moléculaire. Dans notre cas d'analyse et assez communément, l'ionisation se fait à 70 eV. Le potentiel d'ionisation des molécules organiques est d'environ 15 eV et l'excédent d'énergie est transféré à l'ion moléculaire, qui le dissipe en partie par ruptures de liaisons covalentes dont l'énergie est comprise entre 3 et 10 eV (Silverstein *et al.*, 2015). Cela conduit à la formation de fragments chargés et neutres dont seuls ceux chargés (positivement dans notre méthode d'analyse) sont détectés. Des essais d'ionisation chimique ont été réalisés en GC-MS Cl-NH<sub>3</sub> en mode négatif mais un élargissement net des pics observés nous a détournés de cette technique.

Ces méthodes sont ainsi complémentaires. La détection Orbitrap d'une résolution de 30 000 FWHM (Full Width at Half Maximum) pour m/z 400 permettant de prédire avec assurance la formule brute des composés étudiés alors que les différents fragments observés suite à l'EI peuvent apporter des informations sur la structure. En LC-ESI-MS, la chlordécone n'a pas pu être détectée en mode positif, seulement en mode négatif. Seul l'ESI a pu être testée comme mode d'ionisation.

La chlordécone et ses métabolites contiennent plusieurs chlores et dont les massifs isotopiques obtenus par spectrométrie de masse sont caractéristiques du nombre d'atomes de chlore présents dans la structure. Le profil de ces massifs isotopiques apporte donc des informations sur la structure. Selon les expériences microbiologiques, différents composés de chaque famille de métabolites ont été observés. Parmi les hydrochlordécones, le métabolite A1 est le plus souvent rencontré mais d'autres hydrochlordécones, nommés A2, A3, A4 et A5 sont aussi produits par voie microbiologique et les informations obtenues sur leur structure d'après leur spectre de masse seront présentées. La famille des composés apolaires comprend trois métabolites : B1, B2 et B3 et dont B1 est le représentant majoritaire. Les métabolites des familles A et B sont détectés en GC-MS et leur structure sera étudiée dans un premier temps d'après leur spectre de masse obtenu EI. Les métabolites de la famille C sont nommés C1, C2, C3 et C4. Les métabolites C1 et C2 sont toujours détectés simultanément, de même que les métabolites C3 et C4. Les composés de cette famille ne sont détectés qu'en LC-MS. Les informations issues des spectres de masses obtenus par ESI ainsi que l'étude des voies de fragmentation par MS tandem seront exploitées pour mieux comprendre la structure de ces métabolites.

## A. Détermination des formules brutes par LC-Orbitrap-MS

En LC, nous détectons la chlordécone sous sa forme gem-diol et l'ionisation par électrospray permet de voir l'espèce chargée  $[M-H]^-$ . La précision de l'Orbitrap permet, à partir des valeurs de  $m/z$  du pic monoisotopique (contenant les isotopes  $^1H$ ,  $^{12}C$ ,  $^{16}O$  et  $^{35}Cl$ ) de l'espèce  $[M-H]^-$ , de proposer des formules brutes pour chaque métabolite des familles A, B et C (Tableau 1). Dans le cas de la famille B, les métabolites ne sont habituellement pas détectés par ESI mais une adaptation des paramètres d'ionisation a permis de détecter faiblement les métabolites B1, B2 et B3. Pour chaque formule brute proposée, l'écart entre la valeur  $m/z$  théorique et la valeur expérimentale calculé est bien conforme à la précision de l'Orbitrap. Une étude complémentaire des massifs isotopiques générés par la présence des atomes de chlore confirme bien toutes les formules brutes proposées.

Tableau 1 : Masses exactes expérimentales et théoriques de la chlordécone et de ses métabolites en mode négatif par LC-Orbitrap-MS (pic monoisotopique).

composé	rapport $m/z$ expérimental ( $m/z$ )	rapport $m/z$ théorique ( $m/z$ )	écart (ppm)	ion déterminé (mode négatif)	Formule brute proposée (pour neutre)
chlordécone	502,68595	502,68563	0,6	$[C_{10}Cl_{10}O_2H]^-$	$C_{10}Cl_{10}O_2H_2$
A1	468,72488	468,72461	0,6	$[C_{10}Cl_9O_2H_2]^-$	$C_{10}Cl_9O_2H_3$
A2	468,72513	468,72461	1,1	$[C_{10}Cl_9O_2H_2]^-$	$C_{10}Cl_9O_2H_3$
A3	434,76415	434,76358	1,2	$[C_{10}Cl_8O_2H_3]^-$	$C_{10}Cl_8O_2H_4$
A4	434,76280	434,76358	1,9	$[C_{10}Cl_8O_2H_3]^-$	$C_{10}Cl_8O_2H_4$
A5	434,76277	434,76358	1,9	$[C_{10}Cl_8O_2H_3]^-$	$C_{10}Cl_8O_2H_4$
B1	284,85995	284,85937	2,0	$[C_9Cl_5H_2]^-$	$C_9Cl_5H_3$
B2	250,89891	250,89834	2,3	$[C_9Cl_4H_3]^-$	$C_9Cl_4H_4$
B3	250,89895	250,89834	2,4	$[C_9Cl_4H_3]^-$	$C_9Cl_4H_4$
C1	294,88913	294,88817	3,2	$[C_{10}Cl_4O_2H_3]^-$	$C_{10}Cl_4O_2H_4$
C2	294,88913	294,88817	3,2	$[C_{10}Cl_4O_2H_3]^-$	$C_{10}Cl_4O_2H_4$
C3	260,92827	260,92714	4,3	$[C_{10}Cl_3O_2H_4]^-$	$C_{10}Cl_3O_2H_5$
C4	260,92823	260,92714	4,2	$[C_{10}Cl_3O_2H_4]^-$	$C_{10}Cl_3O_2H_5$

Ainsi, d'après leur masse exacte, les métabolites A1 et A2 ont pour formule brute  $C_{10}Cl_9O_2H_3$ , les métabolites A3 et A4 :  $C_{10}Cl_8O_2H_4$ , le métabolite B1 :  $C_9Cl_5H_3$ , les métabolites B2 et B3 :  $C_9Cl_4H_4$ , les métabolites C1 et C2 :  $C_{10}Cl_4O_2H_4$  et les métabolites C3 et C4 :  $C_{10}Cl_3O_2H_5$ .

## B. Structures des métabolites d'après leur fragmentation en GC-MS (familles A et B) et en LC-MS (famille C)

La fragmentation est généralement propre à chaque structure, cependant dans le cas des métabolites de la chlordécone, chacune des trois familles présente des spécificités de fragmentation qui facilitent l'étude et l'identification des métabolites.

### 1. Fragmentation en GC-MS de la chlordécone et des hydrochlordécones

#### La chlordécone

Le spectre de masse en mode positif de la chlordécone obtenu par ionisation en impact électronique (Figure 28) présente différents massifs isotopiques dont le profil est caractéristique des différents isotopes du chlore. En effet, l'élément chlore regroupe deux isotopes stables :  $^{35}\text{Cl}$ , dont l'abondance naturelle est de 75,77% et le  $^{37}\text{Cl}$  dont le noyau contient deux neutrons supplémentaires et est présent à 24,23% en abondance naturelle. Bien que la méthode d'ionisation conduise à un nombre important d'ions fragments, le massif isotopique contenant le pic moléculaire reste cependant détectable.

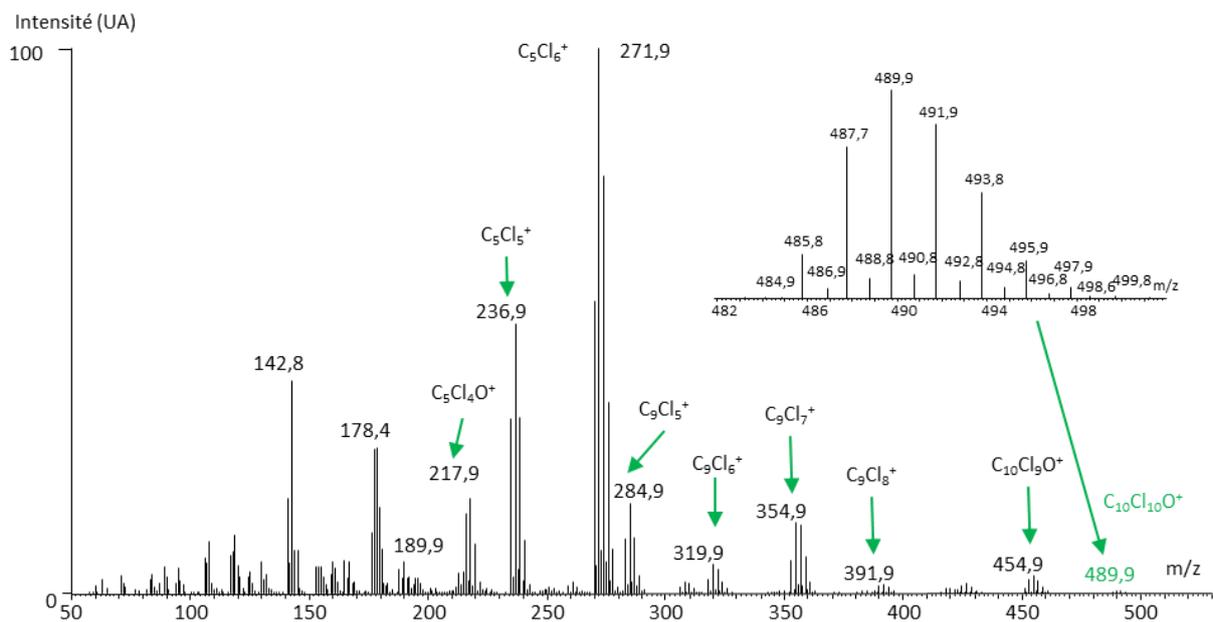
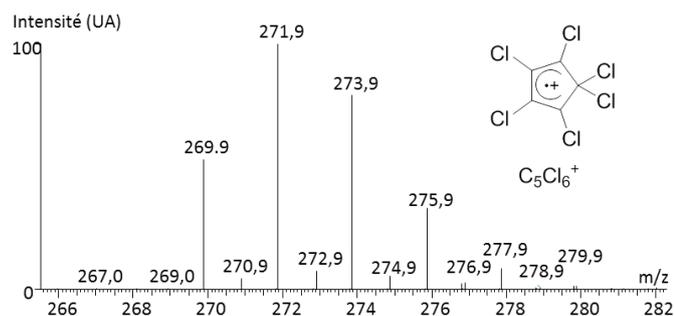


Figure 28 : Spectre de masse de la chlordécone obtenue en GC-MS par impact électronique (EI) (70 eV). L'ion moléculaire est indiqué en vert.

La comparaison des massifs isotopiques expérimentaux avec des simulations théoriques permet de déterminer le nombre d'atomes pour chaque fragment (Figure 29). C'est ce qui a été fait par Uk *et al.* (Uk, *et al.*, 1972) lors de l'interprétation du spectre de la chlordécone.

massif isotopique  
à m/z 270 et 278



Simulations :

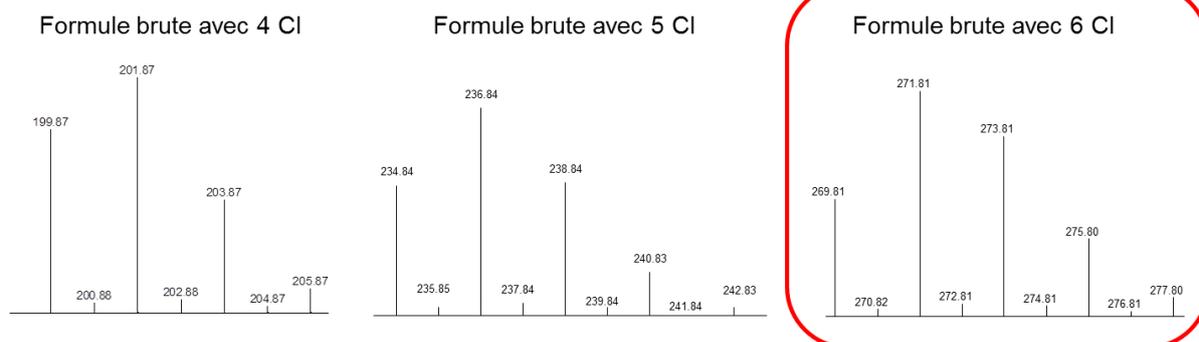


Figure 29 : Analyse du massif isotopique compris entre m/z 270 et 278.

L'ion moléculaire  $C_{10}Cl_{10}O^{+\bullet}$  a la particularité de pouvoir se scinder en deux (rétro-dimérisation), conduisant ainsi aux ions fils  $C_5Cl_4O^{+\bullet}$  et  $C_5Cl_6^{+\bullet}$  comme présenté ci-dessous (Figure 30).

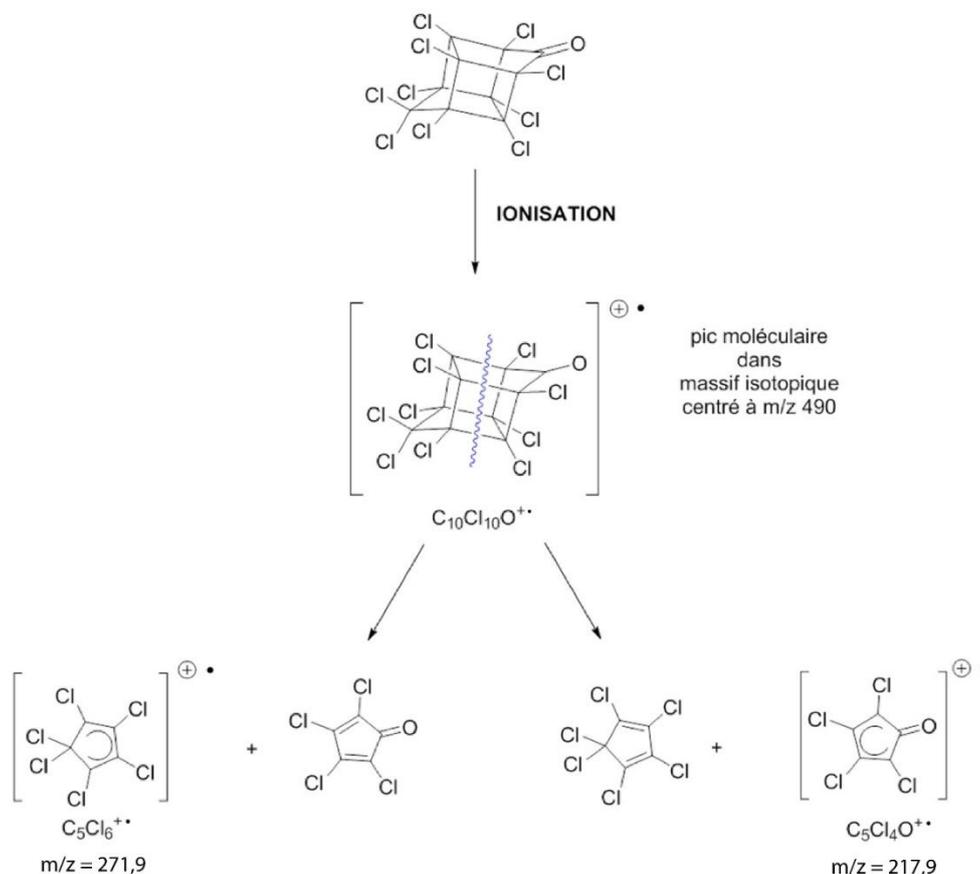


Figure 30 : Profil d'ionisation et de fragmentation privilégiée de la chlordécone.

Les massifs isotopiques les plus intenses sont ceux expliqués par la fragmentation de l'ion moléculaire. D'autres en  $C_9Cl_9^+$ ,  $C_9Cl_6^+$  et  $C_9Cl_5^+$  proviendraient de  $[C_{10}Cl_{10}O-CO-Cl]^+$ . Les ions observés  $C_{10}Cl_9O^{+}$ ,  $C_5Cl_6^{+}$ ,  $C_5Cl_4O^{+}$  et  $C_9Cl_9^{+}$  peuvent perdre un ou plusieurs radicaux de chlore  $Cl^\bullet$  successifs (Figure 31) et conduire à d'autres ions responsables des autres massifs observés. Les schémas de fragmentation présentés devraient être confirmés par spectrométrie de masse en tandem ( $MS^2$  ou  $MS-MS$ ).

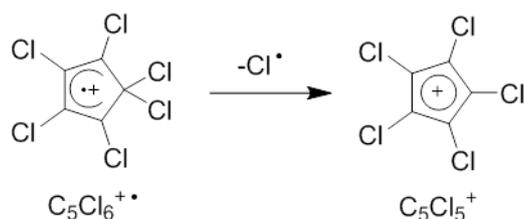


Figure 31 : Perte d'un radical chlore  $Cl^\bullet$  par un fragment.

Les mêmes types de fragmentations étant observées pour les hydrochlorodécones, l'analyse de leurs spectres de masse a permis d'avancer dans l'élucidation de leurs structures. Comme précisé plus haut, la fragmentation caractéristique de la structure cage de la chlordécone selon les deux axes conduit aux fragments à cinq atomes de carbone comportant ou non un atome d'oxygène.

### Monohydrochlorodécones A1 et A2

D'après les valeurs  $m/z$  obtenues en LC-Orbitrap-MS, les composés A1 et A2 ont pour formule brute  $C_{10}Cl_9O_2H_3$  et sont donc des monohydrochlorodécones. D'après les deux plans de symétrie de la chlordécone, un transversal et un longitudinal (Figure 32), la substitution de l'un des dix atomes de chlore par un atome d'hydrogène ne donne que quatre possibilités de monohydrochlorodécones (Figure 33). Pour simplifier la lecture des Figures 33 à 35, les structures (hydro)chlordécone sont représentées sous la forme cétone. La forme gem-diol est reprise par la suite.

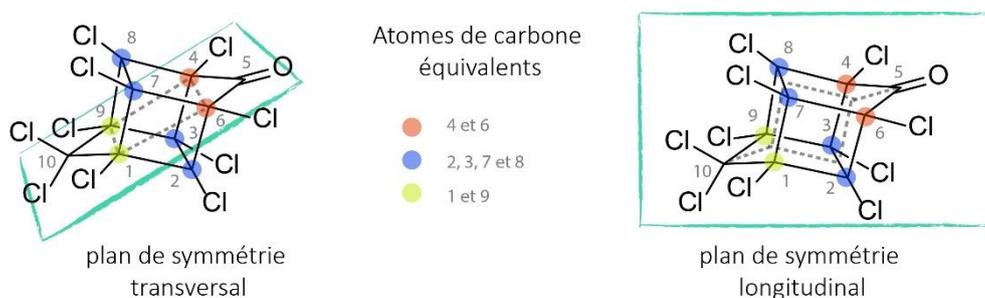
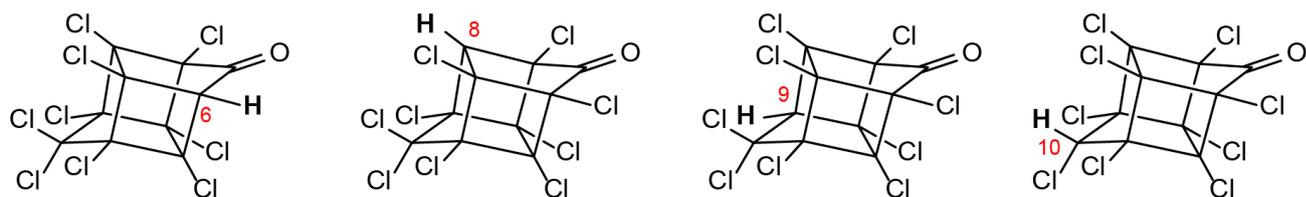


Figure 32 : (a) Plan de symétrie transversal et (b) longitudinal de la chlordécone déshydratée.



6-monohydrochlorodécone (+/-)-8-monohydrochlorodécone 9-monohydrochlorodécone 10-monohydrochlorodécone  
 Figure 33 : Structure des quatre monohydrochlorodécones. L'atome de carbone portant l'atome d'hydrogène est numéroté selon la nomenclature IUPAC de la chlordécone (Figure 34). Le 8-monohydrochlorodécone est une molécule chirale.

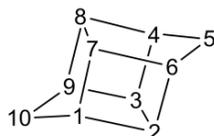


Figure 34 : Nomenclature IUPAC de la CLD.

De même que dans le cas de la chlordécone, la cage cubane peut se scinder verticalement ou horizontalement, selon les axes bleu et rouge respectivement, présentés en Figure 35.

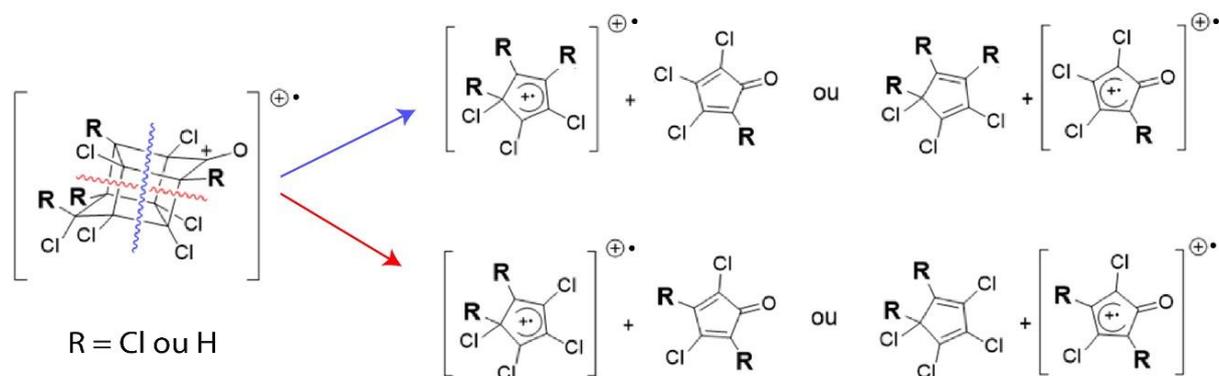


Figure 35 : Fragmentation caractéristique des monohydrochlorodécones.

Une étude théorique menée par Alley *et al.* (Alley *et al.*, 1974) de la fragmentation de l'ion moléculaire des monohydrochlorodécones (Figure 35) par EI permet d'envisager les différents fragments que présenterait le spectre de masse de chacun d'entre eux (Tableau 2).

Tableau 2 : Fragments attendus dans le spectre de masse de chaque monohydrochlorécone ; Les symboles + et – représentent respectivement la présence et l’absence de l’ion.

Position du H	C <sub>5</sub> Cl <sub>6</sub> <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub> H <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>4</sub> O <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> HO <sup>+</sup>	Métabolites
8	+	+	+	+	A2
6	+	-	-	+	
9 et 10	-	+	+	-	A1

Le spectre de masse du métabolite A1 (Figure 36) comporte les massifs isotopiques des ions C<sub>5</sub>Cl<sub>5</sub>H<sup>+</sup> et C<sub>5</sub>Cl<sub>4</sub>O<sup>+</sup> mais pas ceux des ions C<sub>5</sub>Cl<sub>6</sub><sup>+</sup> et C<sub>5</sub>Cl<sub>3</sub>HO<sup>+</sup>, ce qui nous permet d’éliminer le monohydrochlorécone avec l’hydrogène en position 6 et 8, et laisse encore les 9- et 10-monohydrochlorécone comme structures possibles pour le métabolite A1 (Figure 37).

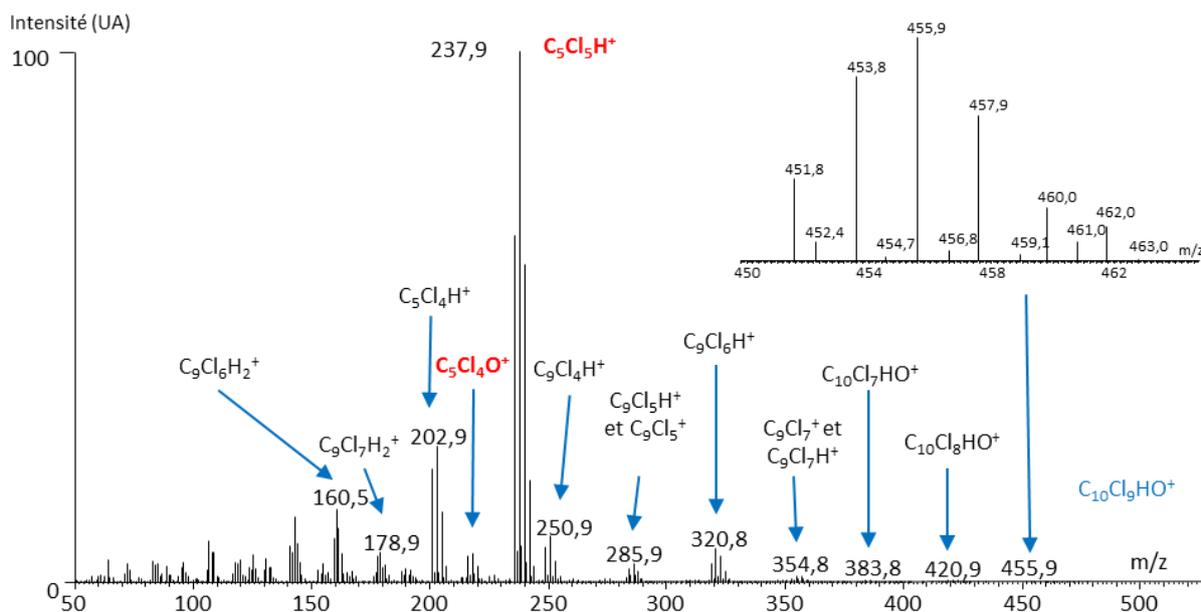


Figure 36 : Spectre de masse du métabolite A1 (GC-EI-MS mode positif). Les ions fragments utiles à l’élucidation structurale sont identifiés en rouge. L’ion moléculaire est indiqué en bleu.

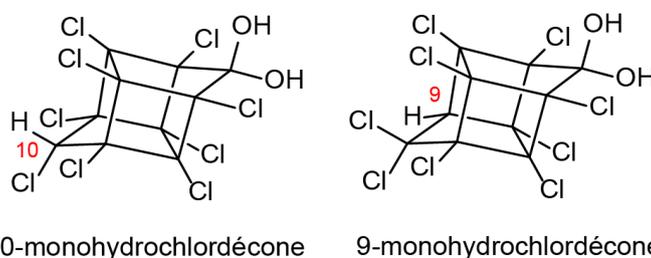


Figure 37 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A1.

Sur le spectre de masse du métabolite A2 (Figure 38), on distingue les quatre ions fragments possibles issus de l’étude théorique (Tableau 2).

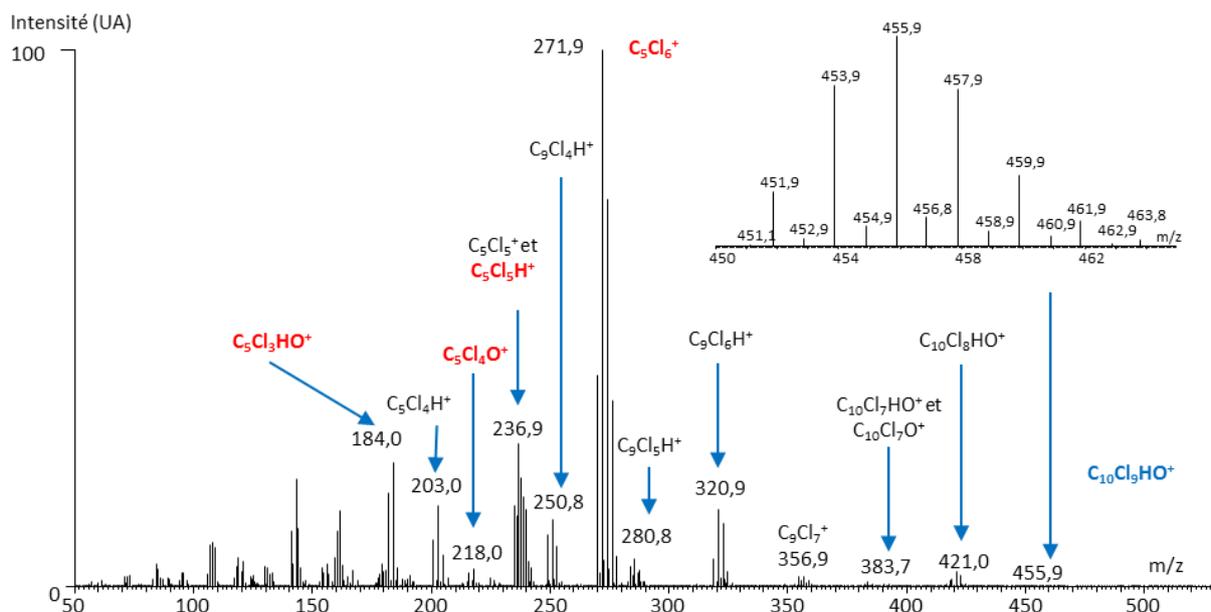
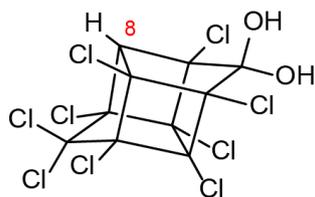


Figure 38 : Spectre de masse du métabolite A2 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.



8-monohydrochlordécone

Figure 39 : Structure chimique du métabolite A2.

Cette signature nous permet d'associer le métabolite A2 à la structure 8-monohydrochlordécone (Figure 39) ce qui a été confirmé par co-injection à l'aide du standard commercial disponible (Dr Ehrenstorfer).

### Dihydrochlordécones A3 et A4

De par les plans de symétrie de la chlordecone, la substitution de deux atomes de chlore par des atomes d'hydrogène conduit à seulement quinze structures possibles de dihydrochlordécones en ne distinguant pas les positions de chacun des atomes de chlore porté par l'atome de carbone en position 10 (10a et 10b) (Dolfing *et al.*, 2012). Il est possible de prévoir les ions fragments résultant de la fragmentation selon les axes présentés en Figure 35, de l'ion moléculaire des dihydrochlordécones. Cette étude, aussi menée par Alley *et al.* (Alley *et al.*, 1974) est présentée ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Fragments attendus dans le spectre de masse de chaque dihydrochlorodécone ; Les symboles + et – représentent respectivement la présence et l’absence de l’ion.

Position des H	C <sub>5</sub> Cl <sub>6</sub> <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>5</sub> H <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>4</sub> O <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> HO <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	métabolites
(4,6)	+	-	-	-	-	+	
(10,10), (9,10), (1,9)	-	-	+	+	-	-	A5
(6,10), (6,9), (4,9) (2,8)	-	+	-	-	+	-	A3
(3,8)							
(6,8), (4,8)	+	+	-	-	+	+	
(7,8)	+	-	+	+	-	+	
(8,10), (8,9), (7,9)	-	+	+	+	+	-	A4

Sur le spectre de masse du métabolite A3, on distingue les massifs isotopiques dus aux ions fragments C<sub>5</sub>Cl<sub>5</sub>H<sup>+</sup> et C<sub>5</sub>Cl<sub>3</sub>HO<sup>+</sup>, mais pas les quatre autres décrits dans l’étude théorique (Tableau 3). La structure du métabolite A3 peut donc avoir les protons en positions (6,10), (6,9), (4,9), (2,8) ou (3,8) (Figure 41).

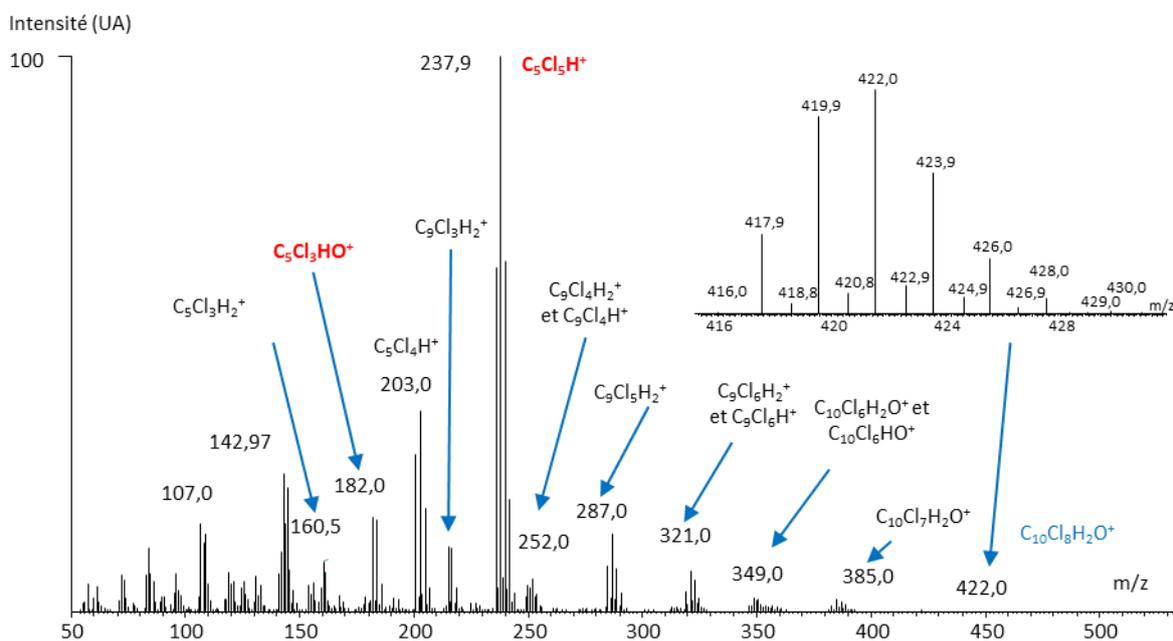


Figure 40 : Spectre de masse du métabolite A3 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l’élucidation structurale sont identifiés en rouge. L’ion moléculaire est indiqué en bleu.

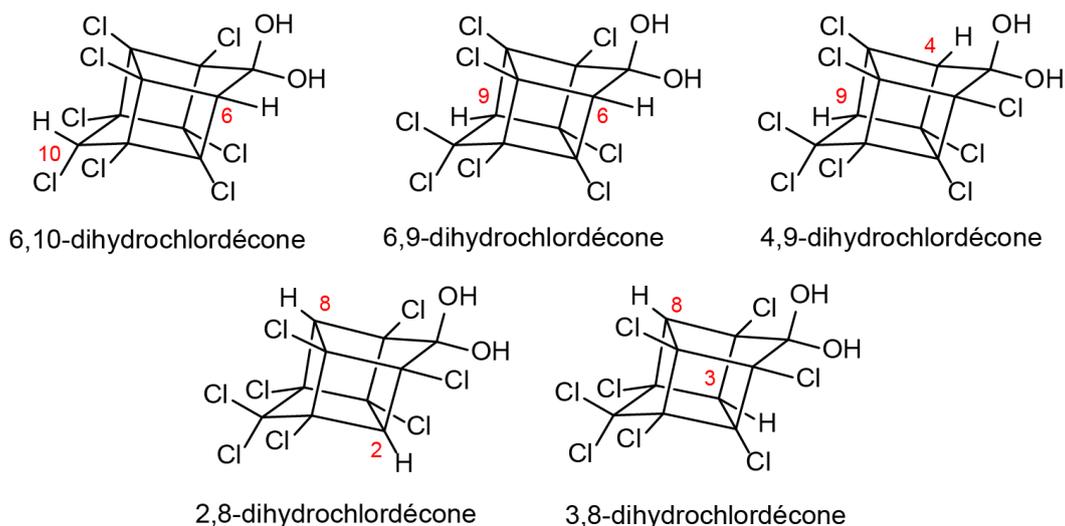


Figure 41 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A3.

Le spectre de masse du métabolite A4 (Figure 42) comporte les fragments  $C_5Cl_5H^+$ ,  $C_5Cl_4H_2^+$ ,  $C_5Cl_3HO^+$  et des traces du fragment  $C_5Cl_4O^+$ .

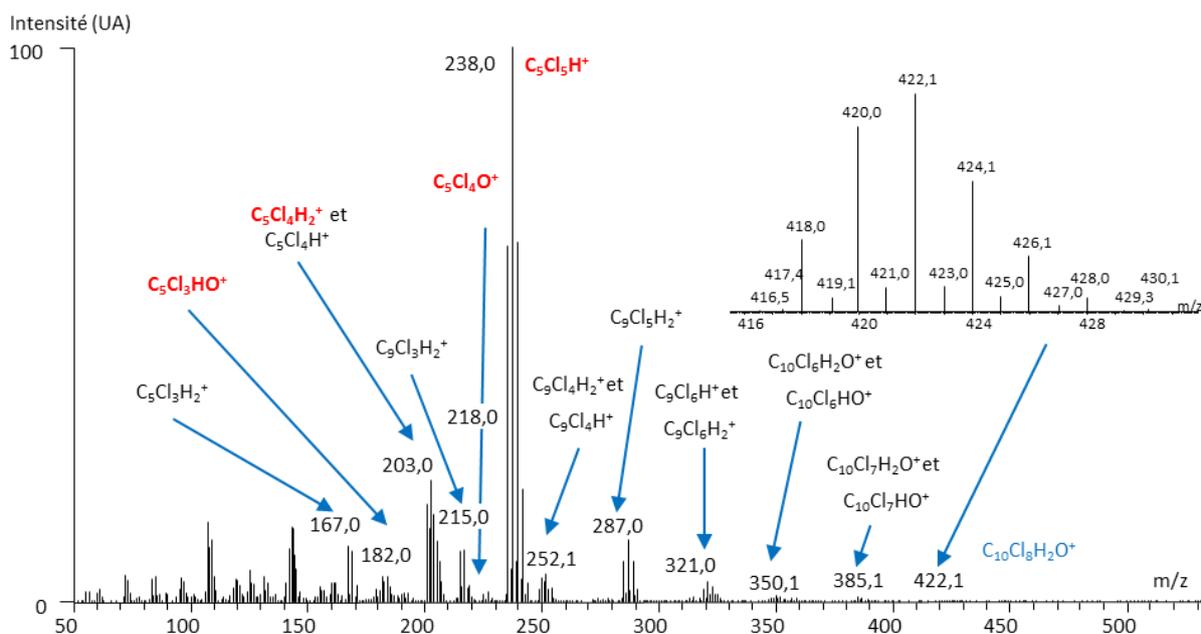


Figure 42 : Spectre de masse du métabolite A4 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.

Les structures possibles pour ce composé sont le 8,10-, le 8,9- ou le 7,9-dihydrochlorodécone (Figure 43).

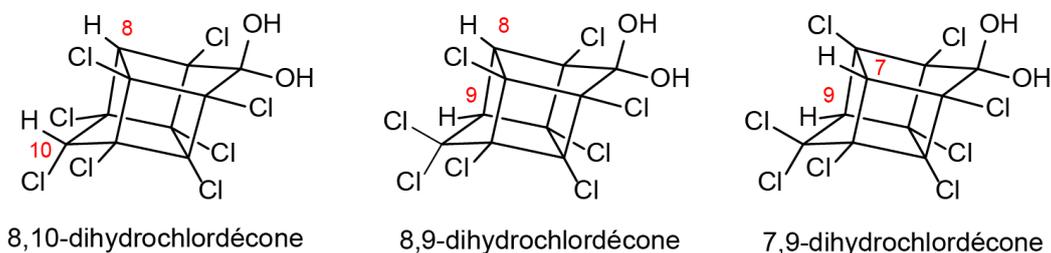


Figure 43 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A4.

Sur le spectre de masse obtenu pour le métabolite A5 (Figure 44), l'ion fragment  $C_5Cl_4H_2^+$  est très clairement distinguable. Les ions  $C_5Cl_5H^+$  et  $C_5Cl_6^+$  ne sont pas visibles. Parmi les fragments chlorocyclopentanone recherchés, seules des traces de  $C_5Cl_4O^+$  sont observables. Dans ces conditions, le métabolite A5 peut être le (10,10)-, (9,10)- ou le (1,9)-dihydrochlorodécone (Figure 45).

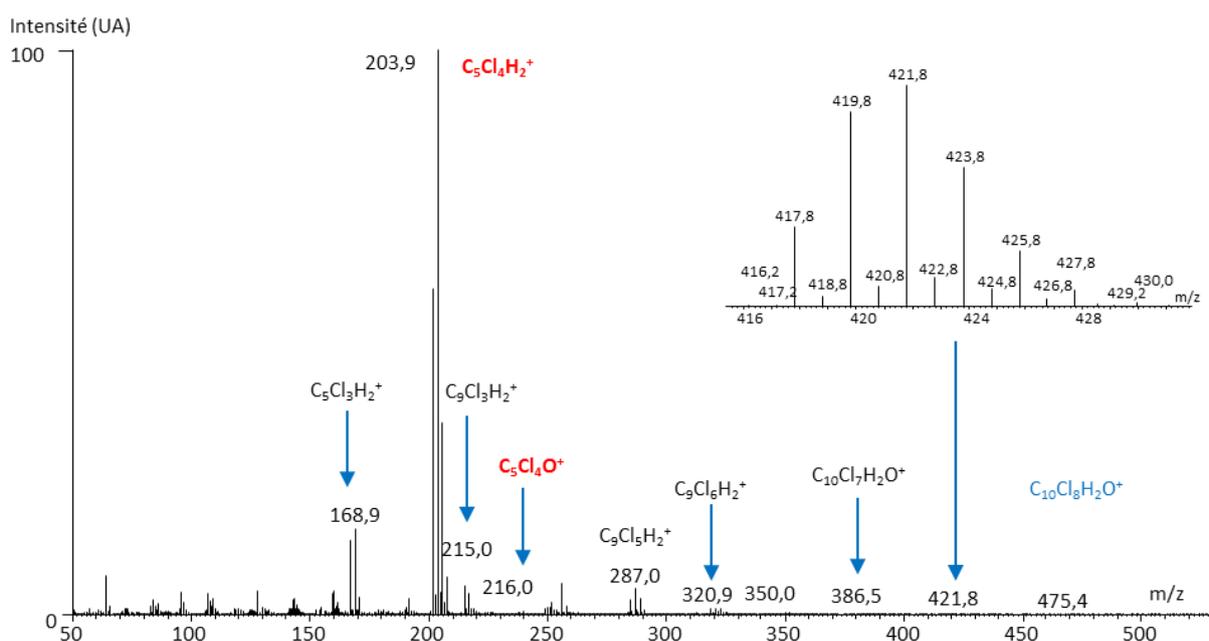


Figure 44 : Spectre de masse du métabolite A5 (GC-EI-MS en mode positif). Les ions fragments utiles à l'élucidation structurale sont identifiés en rouge. L'ion moléculaire est indiqué en bleu.

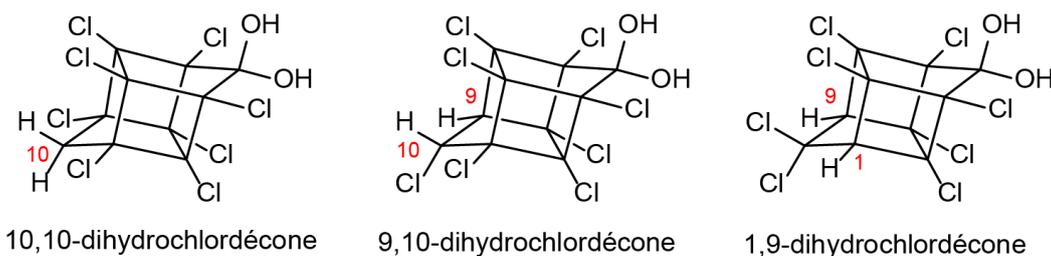


Figure 45 : Structures chimiques possibles pour le métabolite A5.

## 2. Fragmentation par GC-MS des composés apolaires

La fragmentation par EI des composés de la famille B est différente de celle de la chlordécone et de ses dérivés hydrochlordécones. D'après leur formule brute  $C_9Cl_{5-n}H_{3+n}$  ( $n = 1,2$ ) ils ne possèdent pas d'atome d'oxygène. On s'attend à ce qu'ils soient moins polaires que la chlordécone et ses dérivés. Cette hypothèse est validée d'après leur temps de rétention très tardifs par LC-MS avec une colonne en phase inverse (C18). Ils sont donc qualifiés de composés apolaires. Sur les spectres de masse des composés B1 (Figure 46), B2 (Figure 47) et B3 (Figure 48), on observe des écarts qui peuvent correspondre à des pertes successives de radicaux  $Cl^*$  entre les différents massifs isotopiques ainsi qu'une probable perte de HCl à partir du massif isotopique le plus intense ( $C_9Cl_4H_3^+$  pour B1 et  $C_9Cl_3H_4^+$  pour B2 et B3).

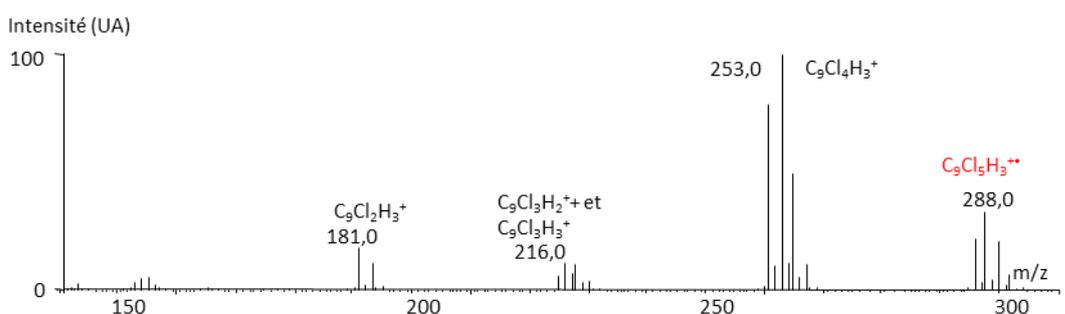


Figure 46 : Spectre de masse du métabolite B1 (GC-EI-MS en mode positif).

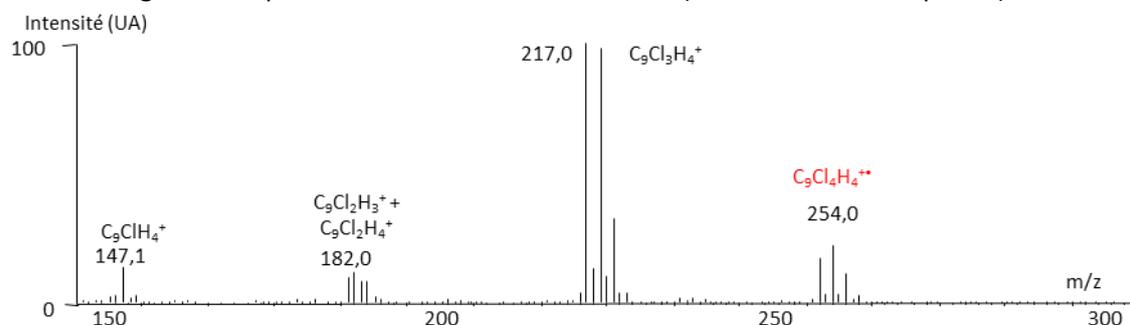


Figure 47 : Spectre de masse du métabolite B2 (GC-EI-MS en mode positif).

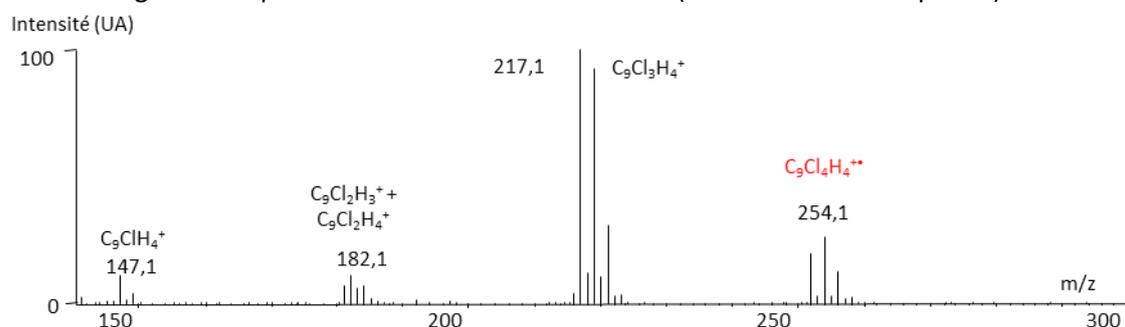


Figure 48 : Spectre de masse du métabolite B3 (GC-EI-MS en mode positif).

Cette analyse doit être confirmée par MS<sup>2</sup>. Aucune différence significative n'a été identifiée entre les spectres de masse par EI des métabolites B2 et B3. Ces molécules présentent les mêmes spectres de masse que celles décrites par d'autres travaux (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978), qui avaient proposé une structure de type polychloroindène sans élément tangible supplémentaire. A ce stade, nous avons étudié le spectre de masse de l'indène commercial pour rechercher d'éventuels fragments caractéristiques de ce noyau bicyclique. Dans les mêmes conditions d'ionisation que précédemment, le cation moléculaire radicalaire C<sub>9</sub>H<sub>8</sub><sup>•+</sup> (m/z 116,0) de l'indène est nettement visible. La perte d'un radical hydrogène conduit au fragment m/z 115,0 correspondant au cation indenyl C<sub>9</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>. Un autre fragment à m/z 89,0 issu d'une perte de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> est visible (Figure 49). Malgré une analyse fine, aucune perte analogue n'est décelable sur les spectres de masse de B1, B2 et B3. La seule similitude concerne la perte du radical hydrogène sur l'indène qui pourrait intervenir entre les fragments C<sub>9</sub>Cl<sub>3-n</sub>H<sub>3+n</sub><sup>+</sup> et C<sub>9</sub>Cl<sub>3-n</sub>H<sub>2+n</sub><sup>+</sup> (n=0 pour B1, n=1 pour B2 et B3). Ranguin *et al.* (Ranguin *et al.*, 2017) ont réalisé une étude en GC-MS-MS mais n'ont pas étudié ce point particulier. A ce stade, les seules données spectrométriques collectées sont insuffisantes pour affirmer la présence d'un noyau indène sur la structure des métabolites B1, B2 et B3.

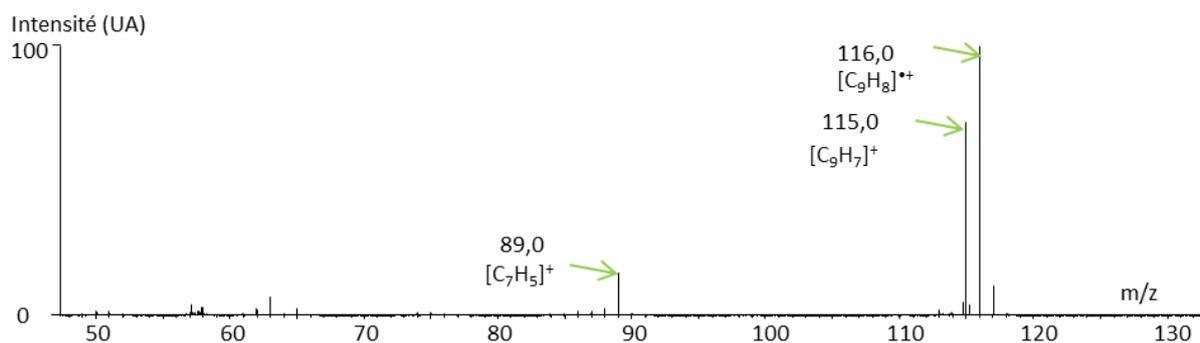


Figure 49 : Spectre de masse de l'indène (GC-EI-MS en mode positif).

### 3. Fragmentation dans la source des composés polaires par les expériences en LC-MS.

D'après les valeurs m/z obtenus par LC-Orbitrap-MS, les composés C1, C2 et C3, C4 ont pour formules brutes C<sub>10</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>2</sub>H<sub>4</sub> et C<sub>10</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>H<sub>5</sub> respectivement. Le spectre d'ions source électrospray (ESI) de l'analyse LC-MS de ces composés présente systématiquement un massif isotopique contenant l'ion d'intérêt (analyte déprotoné [M-H]<sup>-</sup>) ainsi que deux autres massifs isotopiques correspondant à la perte de CO<sub>2</sub> et de [CO<sub>2</sub>+HCl] (Figure 50, Figure 51, Figure 52 et Figure 53) avec les mêmes profils chromatographiques (Figure 54). Cette observation peut être une indication sur la fragmentation de l'ion d'intérêt dans la source. Des expériences de fragmentation par dissociation induite par collision (CID, MS<sup>2</sup> et MS<sup>3</sup>) des ions par spectrométrie de masse en tandem (MS<sup>2</sup>) au cours de la séparation par chromatographie liquide ont permis de confirmer l'origine des fragments observés. Le premier fragment obtenu à partir de l'analyte déprotoné est l'ion [C<sub>9</sub>Cl<sub>5-n</sub>H<sub>3+n</sub>]<sup>-</sup> (n=0,1) suite à une perte de CO<sub>2</sub>.

Cette perte laisse penser que la structure comporte une fonction acide carboxylique. Le deuxième fragment obtenu est l'ion  $[C_9Cl_{4-n}H_{2+n}]^-$  ( $n=0,1$ ) suite à une perte de HCl du premier fragment.

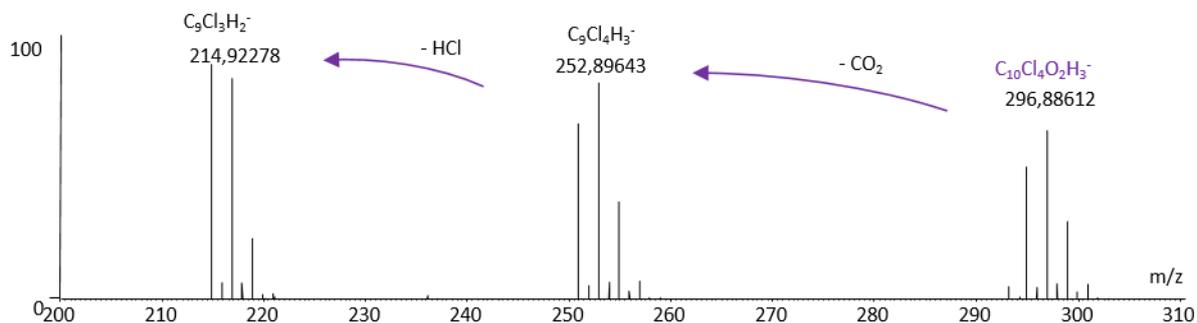


Figure 50 : Spectre de masse du métabolite C1 par ionisation en électrospray (ESI).

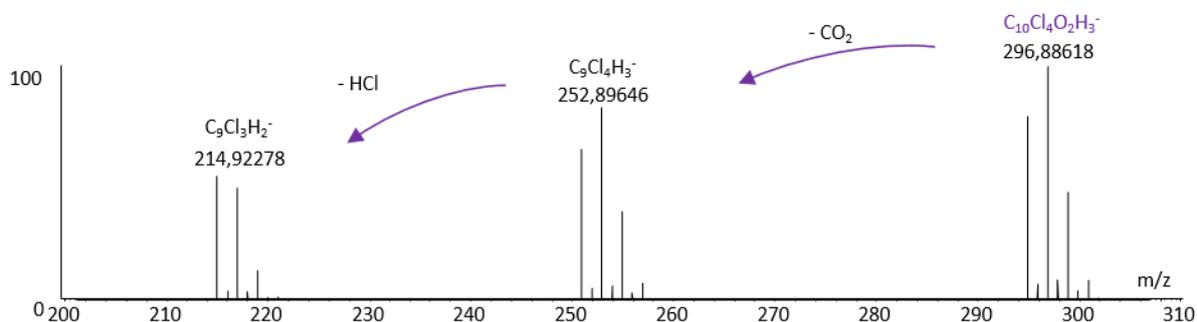


Figure 51 : Spectre de masse du métabolite C2 par ionisation en électrospray (ESI).

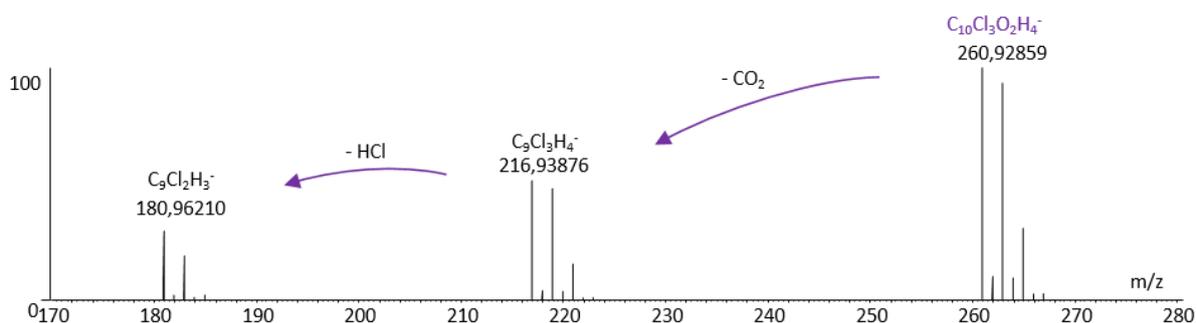


Figure 52 : Spectre de masse du métabolite C3 par ionisation en électrospray (ESI).

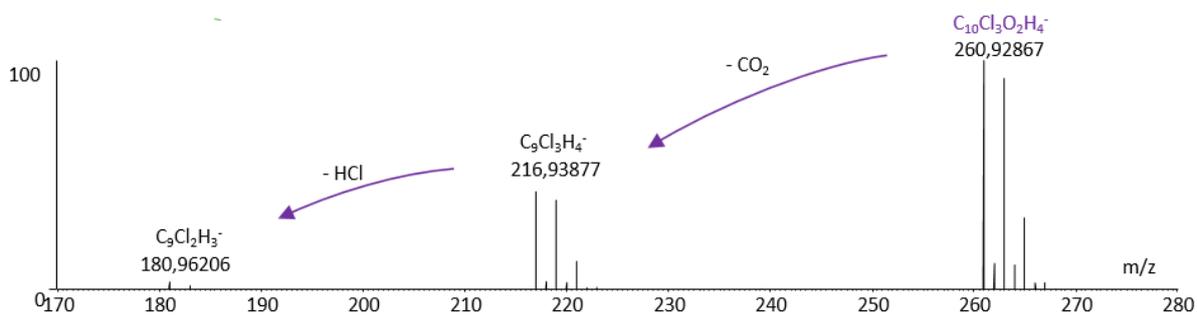


Figure 53 : Spectre de masse du métabolite C4 par ionisation en électrospray (ESI).

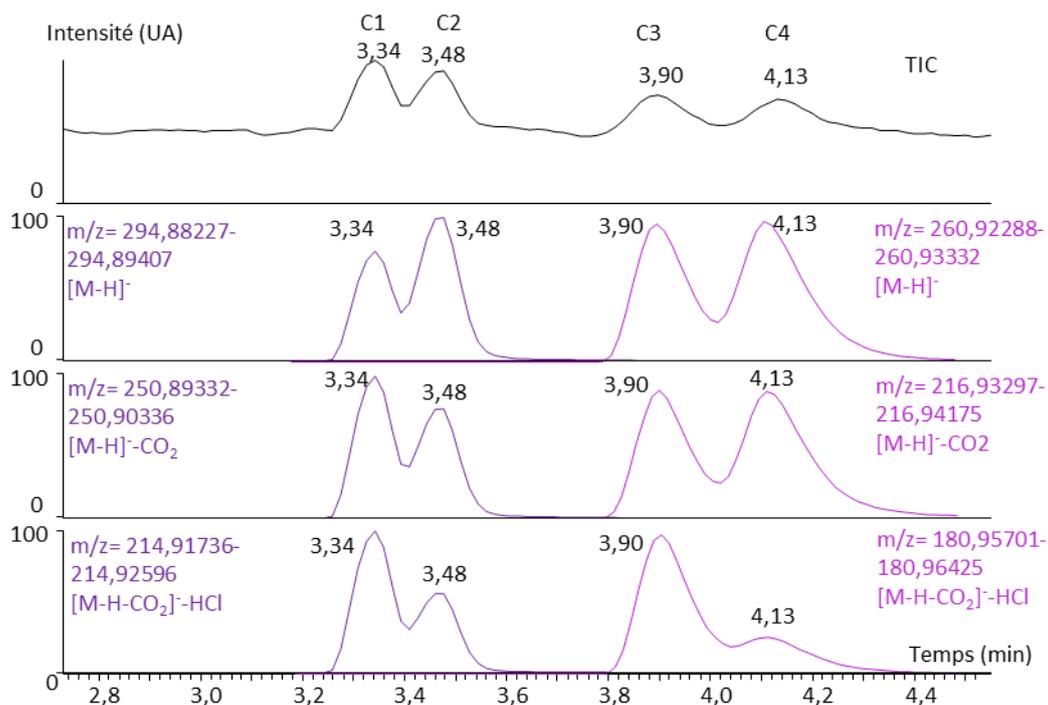


Figure 54 : Profil chromatographique des composés C1, C2, C3 et C4 en LC-MS avec détail du profil chromatographique de chaque ion observé dans le spectre de masse du composé ( $[M-H]^-$ ,  $[M-H-CO_2]^-$  et  $[M-H-CO_2-HCl]^-$ ).

#### IV. Étude des métabolites par spectrophotométrie

##### A. Absorption des métabolites apolaires

Lors des analyses en LC-Orbitrap-MS, une analyse spectrophotométrique est également réalisée sur une largeur spectrale de 200 à 600 nm permettant ainsi d'étudier l'absorption des composés élués (s'ils absorbent suffisamment). Les spectres UV-visible du métabolite B1 présente un premier pic d'absorption  $\lambda=231$  nm et un deuxième pic à  $\lambda=276$  nm (Figure 55). Un profil similaire est observé pour les composés B2 et B3 avec des absorbances maximales à  $\lambda=225$  nm et  $\lambda=264$  nm pour le métabolite B2 (Figure 55-b) et à  $\lambda=227$  nm et  $\lambda=270$  nm pour le métabolite B3 (Figure 55-c).

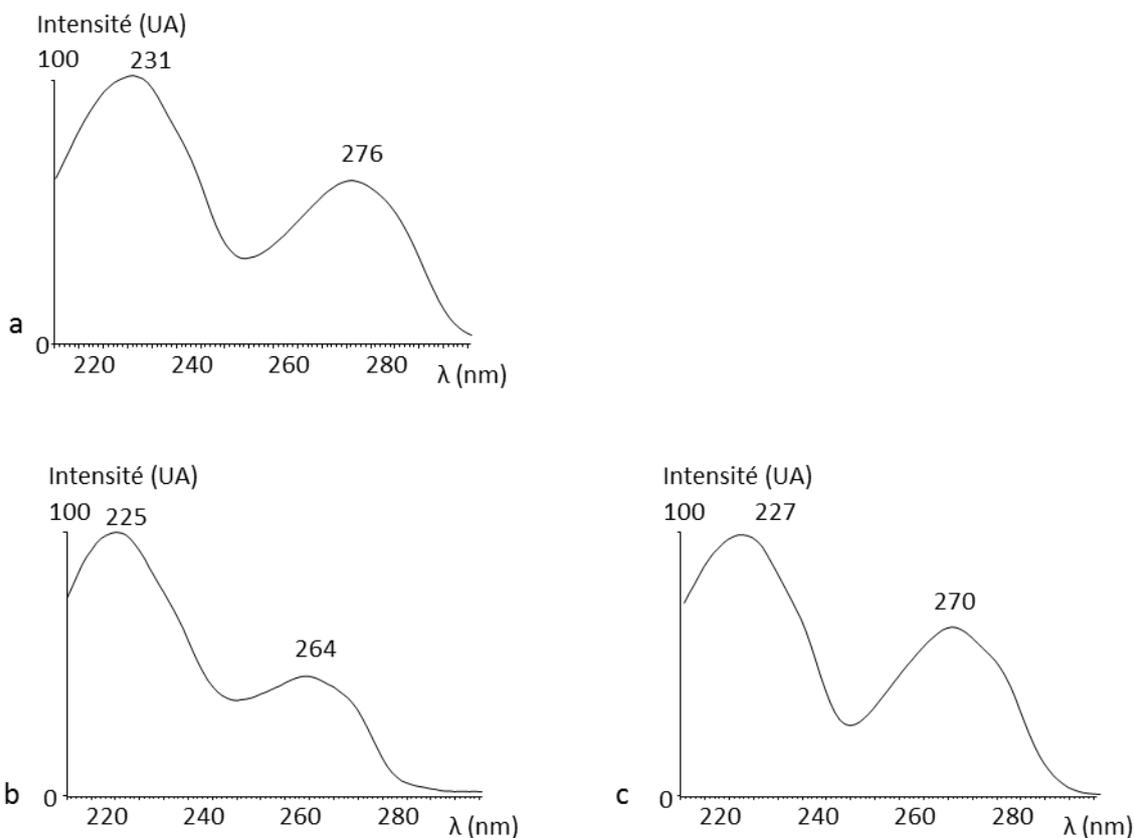


Figure 55 : Spectres d'absorption dans l'UV des composés B1 (a), B2 (b) et B3 (c). Les spectres d'absorption sont présentés entre 200 et 320 nm car aucune absorbance n'est observée entre 320 et 600 nm.

Ces valeurs sont très proches de celles décrites pour des structures tétrachloroindène (Mackenzie, 1960) et supposée polychloroindène (Schrauzer & Katz, 1978). Cependant, les spectres d'absorption issus des analyses par LC-MS sont beaucoup moins précis en termes de résolution spectrale, de sensibilité et de linéarité de réponse que ceux réalisées avec un spectrophotomètre. On ne peut donc à ce stade, pas pousser plus loin la comparaison des données.

D'après le profil d'absorption des métabolites, leur structure chimique semble comporter un noyau aromatique. Nous avons calculé pour chaque métabolite le nombre d'insaturations que présente sa structure chimique. Pour les formules brutes  $C_9Cl_5H_3$  (B1) et  $C_9Cl_4H_4$  (B2 et B3), le nombre d'insaturations est de six. Associée à la présence probable d'un noyau aromatique, nous proposons pour les métabolites B1, B2 et B3, une structure indène (Figure 56) comme cela avait été déjà évoqué par Schrauzer et Katz (Schrauzer & Katz, 1978) puis repris par Jablonski *et al.* (Jablonski *et al.*, 1996) et Ranguin *et al.* (Ranguin *et al.*, 2017).

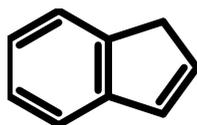


Figure 56 : Structure indène.

En conclusion des indices apportés par la spectrométrie de masse et la spectrophotométrie, nous proposons pour les métabolites apolaires une structure pentachloroindène pour le métabolite B1 (Figure 57-a) et tétrachloroindène pour les métabolites B2 et B3 (Figure 57-b). D'après les données spectrales similaires obtenues par Schrauzer et Katz (Schrauzer & Katz, 1978) et Ranguin *et al.* (Ranguin *et al.*, 2017), il est hautement probable qu'il s'agisse des mêmes composés. Toutes ces structures nécessitent cependant d'être confirmées et la place des atomes de chlore à déterminer de façon indubitable. L'attribution de la structure 3,4,5,6,7-pentachloroindène par Ranguin *et al.* (Ranguin *et al.*, 2017) au composé majoritaire obtenu par dégradation chimique de la chlordécone à l'aide de vitamine B<sub>12</sub> et de Zn(0) sans analyse complémentaire pourrait être remise en question.



Figure 57 : Structure pentachloroindène proposée pour le métabolite B1 (a) et tétrachloroindène proposée pour les métabolites B2 et B3 (b).

## B. Absorption des métabolites polaires

De même que pour les métabolites apolaires, le spectre d'absorption dans l'UV-visible a pu être obtenu à partir des analyses en LC-Orbitrap-MS. Les profils d'absorption montrent aussi deux pics d'absorption maximale de longueurs d'onde  $\lambda=234$  nm et  $\lambda=273$  nm pour le métabolite C1 (Figure 58-a),  $\lambda=234$  nm et  $\lambda=274$  nm pour le métabolite C2 (Figure 58-b),  $\lambda=231$  nm et  $\lambda=273$  nm pour le métabolite C3 (Figure 58-c) et  $\lambda=233$  nm et  $\lambda=268$  nm pour le métabolite C4 (Figure 58-d). Le profil d'absorption entre 200 et 300 nm très proche de celui pour les composés apolaires, indiquerait que ces métabolites contiennent aussi un noyau aromatique dans leur structure.

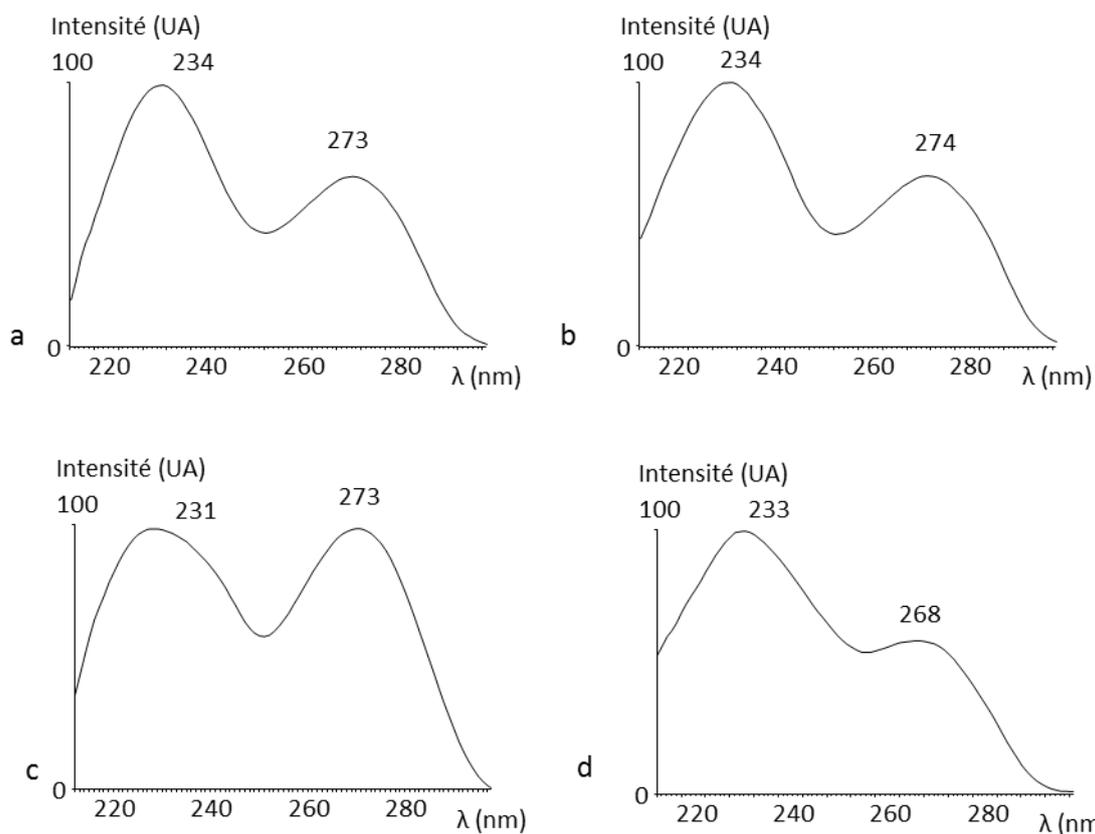


Figure 58 : Spectres d'absorption dans l'UV des composés C1 (a), C2 (b), C3 (c) et C4 (d).

Le nombre d'insaturations des formules brutes  $C_{10}Cl_4O_2H_4$  pour les métabolites C1 et C2 et  $C_{10}Cl_3O_2H_5$  pour les métabolites C3 et C4 est de sept. En tenant compte de l'insaturation de la fonction acide carboxylique, il en résulte qu'une structure acide indèncarboxylique pourrait expliquer l'ensemble des données analytiques collectées pour cette famille de métabolites. Ainsi pour les métabolites C1 et C2, nous proposons une structure acide tétrachloroindèncarboxylique (Figure 59-a) tandis que les métabolites C3 et C4 auraient une structure acide trichloroindèncarboxylique (Figure 59-b).

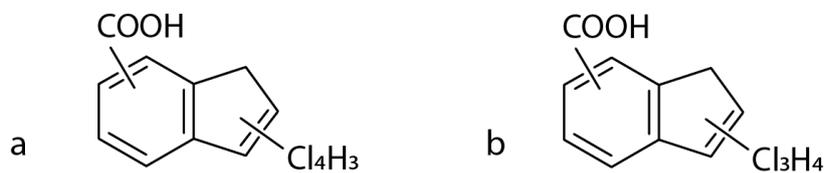


Figure 59 : (a) Structures acide tétrachloroindèncarboxylique proposée pour les métabolites C1 et C2 et (b) acide trichloroindèncarboxylique pour les métabolites C3 et C4.

## Conclusion

Les consortia bactériens 92 et 86 et les bactéries isolées *Citrobacter* 86-1 et 92-1 transforment la chlordécone en trois familles de métabolites détectés en GC-MS et en LC-MS. La première famille de métabolites détectés est celle des hydrochlordécones pour lesquels un ou deux atomes de chlore ont été retirés de la structure bishomocubane. La deuxième famille constituée par les métabolites apolaires présenterait une structure de type polychloroindène traduisant l'ouverture de la cage. Leur structure indique une perte de cinq à sept atomes de chlore par rapport à la chlordécone, ce qui est démontré pour la première fois en conditions biologiques. Les composés polaires appartenant à la troisième famille, sont détectés en LC-MS uniquement et posséderaient une structure acide polychloroindène carboxylique. Le nombre réduit d'atomes de chlore présents (trois ou quatre) et l'ouverture de la cage manifestent donc une transformation plus prononcée de la chlordécone.

Ces différentes familles de métabolites pourraient refléter différentes étapes d'une même voie de transformation de la chlordécone ou bien plusieurs voies en compétition. Afin de confirmer les structures proposées et élucider la position exacte de chaque atome de chlore, les métabolites doivent être étudiés de manière plus approfondie, par résonance magnétique nucléaire notamment. Pour cela, il sera nécessaire de les purifier. La quantité de produit requise dépendra des techniques d'analyses et de leur seuil de sensibilité. De plus, une fois leur structure connue, les métabolites purifiés seront des outils précieux pour redessiner la/les voie(s) de transformation de la chlordécone. Sont-ils des intermédiaires ou des produits finaux qui s'accumulent dans le milieu ? Des réponses pourront être apportées en mettant en présence chacun de ces métabolites avec les consortia et bactéries isolées.

Dans les prochains chapitres (Chapitres 3 et 4) nous nous intéresserons à la production et la purification des métabolites qui semblent majoritaires. L'obtention de ces métabolites est essentielle également pour fournir des standards, pour des études de toxicité et pour tenter de trouver des microorganismes capables de les transformer.

**Chapitre 3 : Transformations par voie  
microbiologique de la chlordécone : purification des  
principaux métabolites**

---

---

## **Introduction**

Comme présenté dans le Chapitre 2, la transformation de la chlordécone par les consortia bactériens 86 et 92 et par les bactéries isolées *Citrobacter* 86-1 et 92-1 est à l'origine de trois familles principales de métabolites observés en GC-MS et/ou en LC-MS. Afin de confirmer la conversion significative du pesticide en métabolites, nous avons cherché une méthode de suivi quantitative et indépendante des outils analytiques utilisés (GC-MS et LC-MS), relativement imprécis dans le cas de la chlordécone. Le suivi des ions chlorures libérés dans le milieu de culture au cours du temps attesterait de la transformation de la chlordécone, nous avons donc retenu cette approche complémentaire.

Afin de mieux caractériser les métabolites issus de cette transformation, nous avons entrepris la purification de ceux qui paraissent être majoritaires selon les deux techniques analytiques employées : en GC-MS, le métabolite B1 semble prédominer (Figure 26), en LC-MS, ce sont les composés C1 et C2 (Figure 27) qui sembleraient être majoritaires. La proportion du métabolite A1 par rapport aux autres composés est difficilement estimable puisque les données GC-MS (où il serait très minoritaire) contredisent les résultats de LC-MS. En conséquence, sa purification n'a pas été entreprise à partir de cultures microbiennes mais plutôt à partir de réactions chimiques optimisées (Chapitre 4).

L'absence de standards pour l'ensemble de ces métabolites ne nous permet pas de les quantifier facilement et la proportion précise de chacun reste inconnue à ce stade. Nous verrons au travers des travaux réalisés les efforts entrepris pour estimer les ratios des différentes familles de métabolites produits au cours des transformations microbiologiques et chimiques (Chapitre 4).

## **I. Etude de la libération d'ions chlorures dans le milieu réactionnel**

La détection de différents composés chlorés associée à la disparition quasi-totale de la chlordécone d'après les suivis analytiques en GC-MS et LC-MS laisse penser que la chlordécone se transforme principalement en trois familles de métabolites. Afin de s'assurer de la transformation de la chlordécone, le dosage de cette dernière au cours du temps serait la méthode la plus appropriée. Cependant, la quantification de la chlordécone est difficile, du fait de la nature de la molécule (Belghit *et al.*, 2015; Martin-Laurent *et al.*, 2014). De plus, dans les cultures microbiologiques, la concentration apparente de 50 mg/L est supérieure à son seuil de solubilité. Des essais de dosage menés avec le Laboratoire de la Drôme (LDA 26) (Coat *et al.*, 2011), reconnue pour le dosage de la chlordécone dans différentes matrices environnementales ont été menées sans succès. La chlordécone pourrait être adsorbée par les bactéries sans qu'il n'y ait dégradation, comme décrit en présence de souches fongiques (Merlin *et al.*, 2014). Dans notre cas, l'utilisation d'une autre technique analytique est donc nécessaire. Des travaux antérieurs sur la dégradation chimique de la chlordécone ont montré la possibilité d'étudier la réaction en dosant les ions chlorures libérés (Mouvet, 2013). Sous réserve d'adaptions de protocole, cette technique semblerait appropriée dans notre cas pour confirmer l'ampleur de la conversion de la chlordécone en métabolites moins chlorés.

### **A. Etude de faisabilité de la détection d'ions chlorures supposés libérés au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone**

Au cours de sa transformation en conditions anaérobies, la chlordécone produit des métabolites moins chlorés (Figure 60). Dans ces conditions réductrices, les atomes de chlore perdus seraient a priori libérés dans le milieu sous forme d'ions chlorures. Différentes méthodes existent pour doser les ions chlorures dans un milieu aqueux. La quantification des ions chlorures a été réalisée avec succès par chromatographie ionique couplée à un détecteur conductimétrique sur des suivi de transformation de la chlordécone par ISCR (Mouvet, 2013). En revanche, dans les rares cas de transformations microbiologiques avérées de la chlordécone, la libération d'ions chlorures n'a jamais été réalisée, peut-être dû à la trop faible quantité attendue. Dans notre cas, il est donc nécessaire de s'assurer que l'augmentation d'ions chlorures dans le milieu sera détectable et suffisamment significative pour l'outil d'analyse choisi.

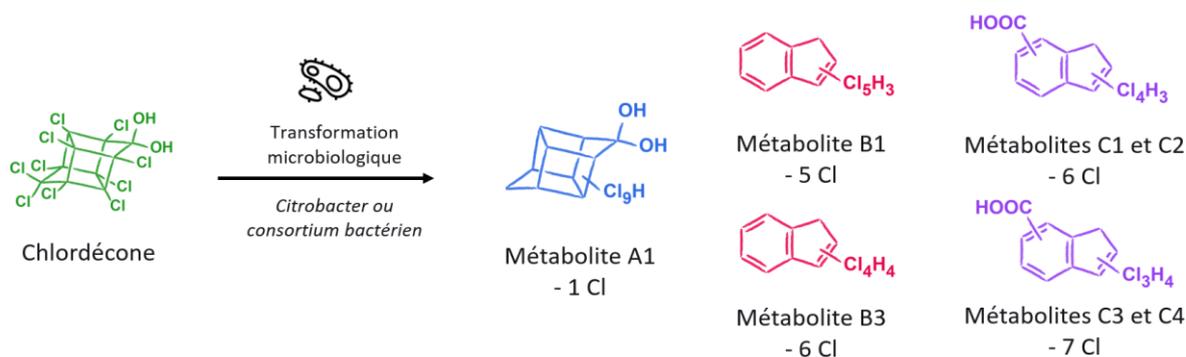


Figure 60 : Bilan des atomes de chlore libérés pour chaque métabolite détecté au cours de la transformation de la chlordécone.

Lors des transformations microbiologiques de la chlordécone, le pesticide est introduit à la concentration massique de 50 mg/L, soit 9,8  $\mu\text{mol/L}$ . Dans le cas où chaque molécule de chlordécone perdrait un atome de chlore, la concentration d'ions chlorures dans le milieu augmenterait de 9,8  $\mu\text{mol/L}$ , ce qui correspondrait à une augmentation de 3,4 mg/L d'ions chlorures. Le Tableau 4 résume pour chaque atome supplémentaire de chlore perdu en moyenne par l'ensemble des molécules de chlordécone, l'augmentation de la concentration massique d'ions chlorures dans le milieu de culture.

Tableau 4 : Relation entre le nombre d'atomes de chlore perdus en moyenne par l'ensemble des molécules de chlordécone et l'augmentation de la concentration des ions chlorures dans le milieu.

Nombre de chlore perdus en moyenne par l'ensemble des molécules de chlordécone									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Augmentation de la concentration attendue [Cl <sup>-</sup> ] (mg/L)									
3,4	6,7	10,1	13,5	16,9	20,2	23,6	27,0	30,3	33,7

Cette augmentation théorique de 3,4 mg/L de la concentration d'ions chlorures pour chaque atome de chlore perdu en moyenne par l'ensemble des molécules de chlordécone présentes dans le milieu serait a priori détectable par chromatographie ionique couplée à un détecteur conductimétrique, à condition que la concentration en ions chlorures initiale permette de détecter une telle variation (erreur relative de l'ordre de 5%). Pour répondre à ce critère, un milieu de culture adapté à cette expérience a été développé afin de limiter la présence d'ions chlorures déjà présents. Les sels NaCl et CaCl<sub>2</sub> habituellement présents dans les milieux de cultures utilisés pour la transformation microbiologique ont été retirés pour le suivi des ions chlorures (pour plus de précisions, se référer au Chapitre 8 : matériel et méthodes). De cette manière, la concentration dans le milieu après modifications est de 10 mg/L. Dans ce milieu, les bactéries réalisent la transformation de la chlordécone de manière similaire à la transformation observée dans le milieu précédent.

## B. Suivi de la concentration des ions chlorures dans le milieu au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone

La transformation de la chlordécone a été investiguée pour le consortium mixte bactérien 86 (Figure 61) et la bactérie isolée *Citrobacter* 86-1 (Figure 62) en triplicats de cultures dans chaque cas. Des duplicats de témoins négatifs de milieux de culture avec chlordécone mais sans bactérie ont permis d'attester qu'aucune libération d'ions chlorures n'avait lieu dans ce cas (une légère augmentation de la concentration pour le temps 250 jours provient probablement de l'évaporation lente de l'eau). Les mesures de la concentration des ions chlorures ont été réalisées par le Laboratoire Départemental de la Drôme (LDA 26), certifié pour les analyses environnementales, suite à des envois de milieu de cultures sur plusieurs mois.

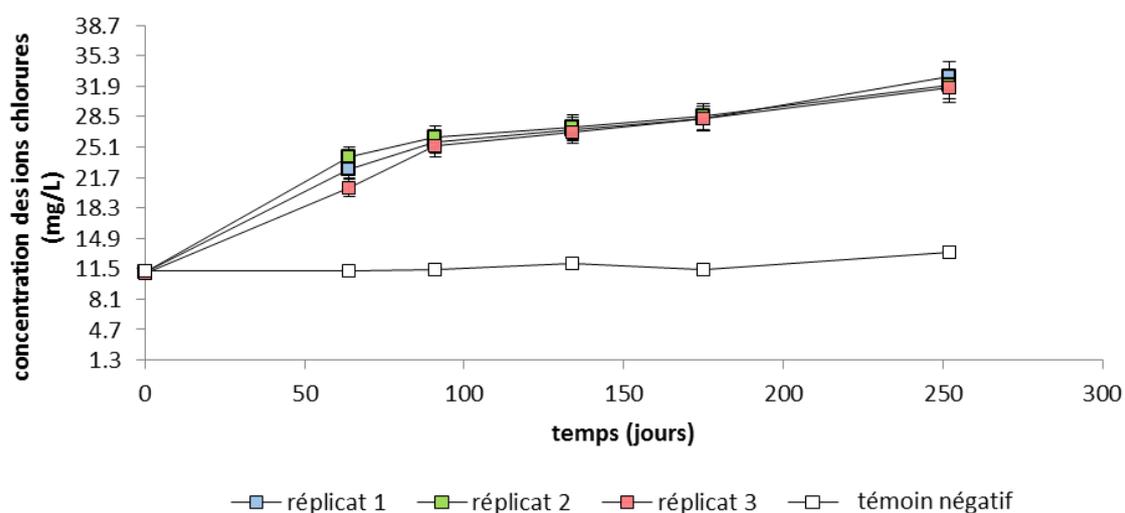


Figure 61 : Concentration en ions chlorures dans le milieu de culture au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone par le consortium bactérien 86.

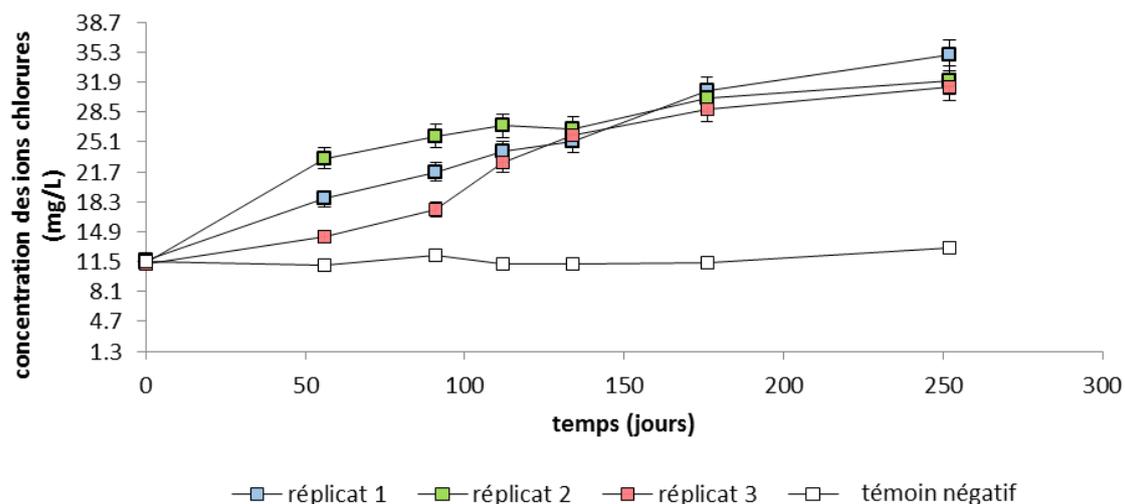


Figure 62 : Concentration en ions chlorures dans le milieu de culture au cours de la transformation microbologique de la chlordécone par *Citrobacter* 86-1.

Le suivi des expériences microbiologiques par GC-MS et LC-MS a permis de confirmer la transformation totale de la chlordécone en une centaine de jours et l'apparition des métabolites classiquement observés, à savoir les familles A, B et C. Associée à la production de ces métabolites, la concentration des ions chlorures a augmenté continuellement au cours des 100 jours pour les quatre cultures microbiologiques. Le profil de libération des ions chlorures est similaire passant en moyenne de 11,7 mg/L à t = 0 jour à 28,3 mg/L à t = 105 jours. En soustrayant les valeurs moyennes des concentrations d'ions chlorures des témoins négatifs aux valeurs obtenues au cours du temps au cours des transformations, nous pouvons approcher la concentration des ions chlorures uniquement liée à la perte d'atomes de chlores par la chlordécone (Figure 63). Cette concentration peut être rapportée au nombre d'atomes de chlore moyen perdu par la chlordécone (Tableau 4).

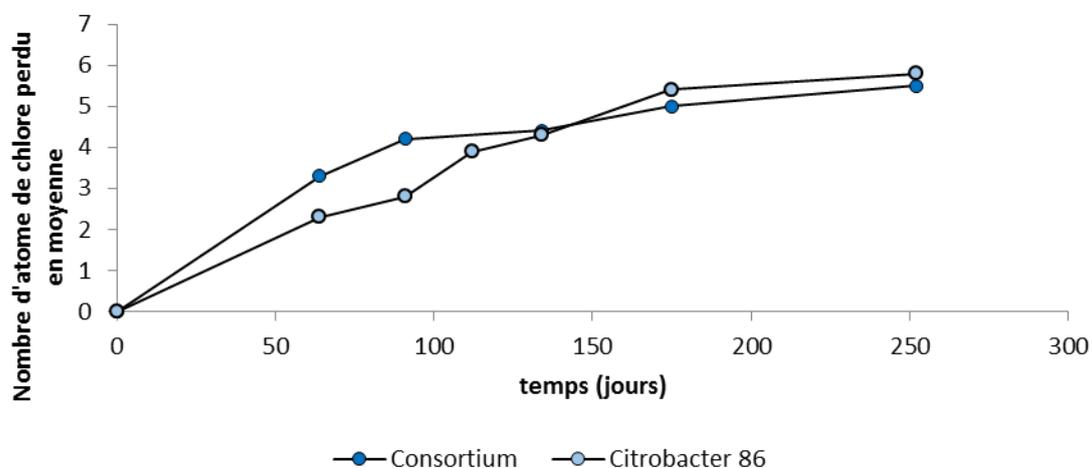


Figure 63 : Nombre d'atomes de chlore moyen perdus par la chlordécone au cours de la transformation microbologique avec le consortium bactérien 86 et la bactérie *Citrobacter* 86-1.

L'augmentation de la concentration des ions chlorures correspond en moyenne à cinq atomes de chlore perdus par molécule de chlordécone au cours de la transformation. Le Tableau 5 contient pour chaque métabolite, le nombre d'atomes de chlore perdu par rapport à la chlordécone.

Tableau 5 : Nombre d'atomes de chlore perdu pour chaque métabolite principal, par rapport à la chlordécone.

Métabolite : nom et formule brute ( <b>gras</b> : majoritaires)				
<b>A1</b> C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	<b>B1</b> C <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	<b>B3</b> C <sub>9</sub> Cl <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	<b>C1 et C2</b> C <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	<b>C3 et C4</b> C <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Nombre d'atomes de chlore perdus par rapport à la chlordécone (C <sub>10</sub> Cl <sub>10</sub> O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )				
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

Les métabolites principaux issus de la dégradation de la chlordécone proviennent d'une déchloration de la chlordécone comprise entre un et sept atomes de chlore. Expérimentalement, la libération dans le milieu de cinq atomes de chlore équivalents par molécule de chlordécone rend de nombreuses combinaisons et proportions de métabolites possibles. De plus, d'autres métabolites gazeux ou difficilement détectables car fixés à des composés biologiques comme précédemment évoqués dans plusieurs études (Jablonski *et al.*, 1996; Merlin *et al.*, 2016; Schrauzer & Katz, 1978) n'ont pas été recherchés ce qui peut fausser les conclusions.

## II. Purification des métabolites majoritaires détectés dans le milieu réactionnel

Afin de mieux caractériser les métabolites produits au cours de cette transformation, nous avons cherché à isoler les composés qui semblaient majoritaires. D'après les analyses GC-MS et LC-MS, le métabolite B1 et les métabolites C1 et C2 respectivement ont été retenus pour notre étude. Par ailleurs, un protocole de production par voie chimique à grande échelle (centaines de milligramme) du composé A1 a été développé très tôt au cours de la thèse (Chapitre 4).

### A. Extraction des métabolites

Les réactions de transformation par voie microbiologique de la chlordécone sont réalisées dans des milieux aqueux pour lesquels une obtention à sec des composés à purifier (par lyophilisation par exemple) provoquerait la perte de certains composés volatils. La chlordécone est connue pour être partiellement sublimée lors de la lyophilisation d'un échantillon aqueux (communication personnelle Hervé Macarie). L'extraction du milieu de culture est réalisée après acidification à pH 3, afin de favoriser le passage en phase organique des métabolites de la famille C, supposés comporter une fonction acide carboxylique. Le milieu de culture microbiologique est très riche et son extraction par des solvants organiques comme le mélange dichlorométhane/chloroforme (1 :1 v/v) provoque une émulsion dense nécessitant une agitation manuelle de longue durée pour qu'une partie des phases soit séparée. Des essais de centrifugation et de filtration à l'aide de verre fritté ont été pratiqués mais aucune de ces stratégies alternatives n'a été retenue. Cependant, une dilution de la phase aqueuse avec de l'eau et une succession d'extractions de la phase émulsionnée seule par le dichlorométhane, ont permis une extraction efficace à partir de la phase aqueuse. La séquence d'extractions successives des composés est suivie par GC-MS et LC-MS. Cette phase d'extractions est considérée comme totale lorsque la dernière extraction réalisée conduit pour les métabolites cibles à une intensité inférieure à 0,1% de l'intensité détectée lors de la première extraction. L'extraction liquide/liquide du milieu réactionnel par le DCM a permis l'obtention d'un mélange contenant les métabolites de la chlordécone (Figure 64).

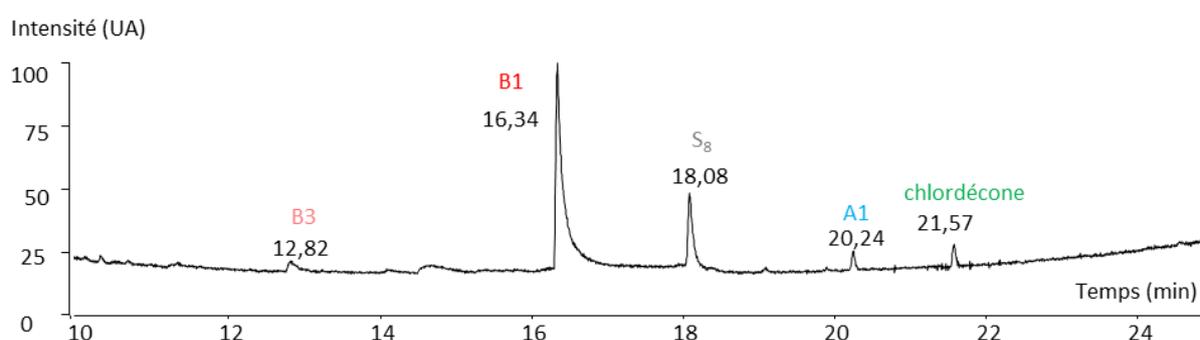
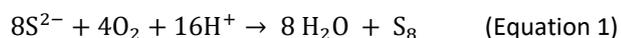


Figure 64 : Chromatogramme GC-MS de l'extrait de culture.

Le soufre colloïdal ( $S_8$ ) est un contaminant produit lors de l'aération du milieu à la fin de la réaction par oxydation du sulfure de sodium utilisé pour initialement réduire le milieu (voir équation 1 comme réaction possible).



## **B. Etude préliminaire de la séparation des métabolites par chromatographie sur couche mince**

La première étape de purification a pour objectif de séparer les différentes familles de métabolites entre elles. L'extraction du milieu de culture après transformation de la chlordécone en présence du consortium 86 conduit à un résidu extrait contenant les trois familles de métabolites ainsi qu'une multitude d'autres composés de polarité variée. Des tests préliminaires réalisés à partir d'échantillons de cultures microbiologiques contenant différentes proportions des trois familles de métabolites ont permis de mettre au point des conditions de séparation des familles de métabolites à partir de leur polarité en chromatographie sur couche mince analytique (CCM).

Dans un mélange pentane/acétone (4 :1 v/v) et sur silice, la chlordécone et le métabolite A1 migrent à 0,37 et 0,32 respectivement. Dans les mêmes conditions, les composés apolaires (famille B) éluent avec le front d'élution. Les composés polaires (famille C) présentent des différences nettes au sein même de cette famille puisque les métabolites de formule brute  $C_{10}Cl_4O_2H_4$  (C1 et C2) migrent peu et ont leur rapport frontal compris entre 0 et 0,2 alors que les métabolites de formule brute  $C_{10}Cl_3O_2H_5$  (C3 et C4) migrent entre 0,35 et 0,45 (Figure 65-a). La migration de ces composés polaires rappelle les expériences réalisées par Jablonski *et al.* (Jablonski *et al.*, 1996), au cours desquelles la transformation de la chlordécone en présence de *Methanosarcina thermophila*, d'enzymes isolées ou de cofacteurs isolés associés au citrate de titane (III) dans les deux derniers cas, avait été observée. Parmi les produits de transformation, des composés polaires avec un rapport frontal compris entre 0 et 0,1, après élution dans un mélange hexane/acétone 3 :1, avaient été identifiés et pourraient correspondre à nos composés acides polychloroindène-carboxyliques dans des conditions proches. Des composés apolaires avec un rapport frontal de 0,91 étaient aussi détectés au cours de ces transformations (Jablonski *et al.*, 1996). Une tache large à un rapport frontal de 0,30 (Jablonski *et al.*, 1996) qui dans certains cas ressemble plutôt à deux taches accolées, correspondrait en fait probablement à la chlordécone et au moins un hydrochlordécone.

Avec l'heptane pur comme éluant, les métabolites B1 et B3, très peu polaires, migrent à un rapport frontal de 0,74 et 0,75 respectivement (Figure 65-b). Des essais sur plaque CCM C18 avec un mélange THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (3 :1 :1, v/v) a permis de les obtenir à un rapport frontal de 0,35 ; ce qui permet

d'envisager une autre stratégie de séparation à l'échelle préparative (Figure 65-c). Par CCM, le soufre colloïdal élué dans la zone des composés apolaires (Figure 65-b et c).

La révélation des hydrochlordécones se fait à l'aide d'une solution aqueuse de permanganate de potassium, celle des composés apolaires se fait sous irradiation UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) et celle des composés polaires sous irradiation UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  et  $365 \text{ nm}$ ).

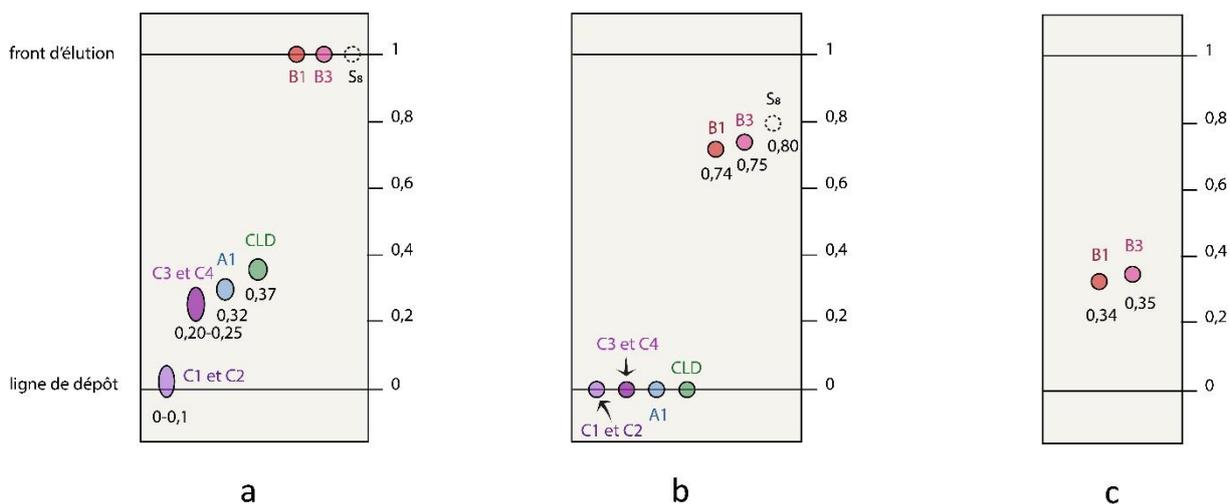


Figure 65 : Elution des métabolites issus de la dégradation microbologique de la chlordécone en chromatographie sur couche mince. Pour chaque condition d'élution, les dépôts contiennent tous les composés mais sont représentés décalés pour une meilleure lisibilité. (a) Elution avec le mélange pentane/acétone 4 :1 v/v sur silice, (b) élution par l'heptane pur sur silice et (c) élution par le mélange THF/méthanol/eau 3 :1 :1, v/v sur C18.

### C. Séparation des métabolites apolaires des autres familles de métabolites

Ces premiers résultats ont permis de mettre au point la séparation à grande échelle sur colonne de gel de silice des composés apolaires par rapport aux deux autres familles (composés polaires et (hydro)chlordécones), avec l'heptane pur (solvant A) et un mélange acétone/chloroforme 1 :1 v/v (solvant B), en utilisant le gradient présenté en Figure 66.

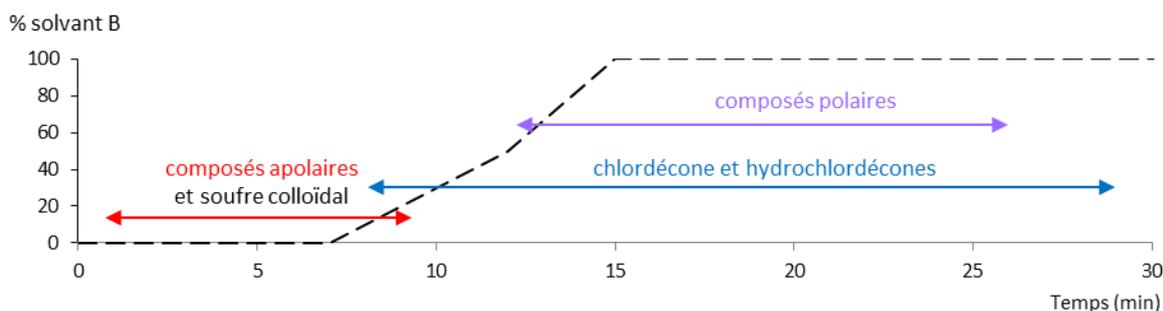


Figure 66 : Séparation des familles de métabolites sur colonne de gel de silice : gradient (traits pointillés noir) du pourcentage du solvant B (mélange chloroforme/acétone (1:1, v/v) en complément du solvant A (heptane) et plages de sortie des familles (rouge : composés apolaires, bleu : chlordécone et hydrochlordécones et violet : composés polaires).

Comme présenté sur la Figure 66, les (hydro)chlordécones et les composés polaires ont des plages de temps de rétention qui se superposent et leur séparation n'est pas effective à ce stade. Cependant, elle est maintenue afin d'éliminer d'autres impuretés et séparer la famille B des familles A et C.

#### D. Deuxième étape de purification par chromatographie en phase inverse

##### 1. 1. Purification du métabolite B1

Afin de purifier le métabolite B1 depuis une culture microbiologique, une culture de 1,25 L a été extraite selon le protocole décrit plus haut. La séparation par colonne de gel de silice (Combiflash®) a été appliquée, permettant d'obtenir une fraction enrichie en polychloroindènes (B1 et B3) contenant également des impuretés dont le soufre colloïdal précédemment évoqué.

Les conditions d'élution en CCM, tétrahydrofurane/méthanol/eau 3 : 1 : 1 v/v, conduisant à des rapports frontaux de 0,34 et 0,35 pour les métabolites B1 et B3 respectivement constituent le point de départ de l'optimisation des conditions de séparation des deux composés apolaires et du soufre colloïdal en colonne C18. Une contrainte supplémentaire est apportée par la faible solubilité des composés apolaires dans les mélanges contenant de l'eau. Leur solubilisation a été nettement améliorée par ajout de tétrahydrofurane (THF). La séparation nette des métabolites B1 et B3 à l'aide d'un mélange méthanol/tétrahydrofurane/eau (60 : 30 : 12) en condition isocratique est obtenue (Figure 67).

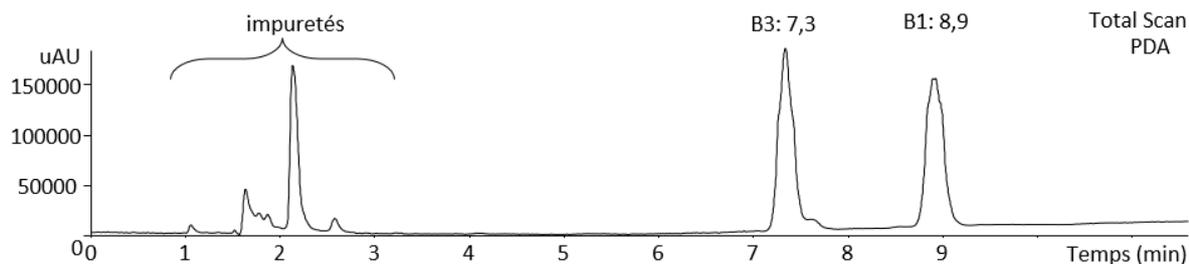


Figure 67 : Chromatogramme de la séparation des métabolites B1 et B3 en HPLC analytique sur colonne C18 X-bridge (150 x 4,6 mm) (détection UV-visible par barrette de diodes).

Ces conditions ont été appliquées à l'échelle préparative en adaptant la méthode isocratique aux proportions méthanol/tétrahydrofurane/eau 51 :26 :23, permettant une meilleure séparation des métabolites. Une évolution synchrone des absorbances aux longueurs d'onde 220 et 270nm est caractéristique des métabolites B1 et B3. Au cours de cette étape, le métabolite B1 est séparé du métabolite B3 et du soufre colloïdal qui élue en même temps (Figure 68).

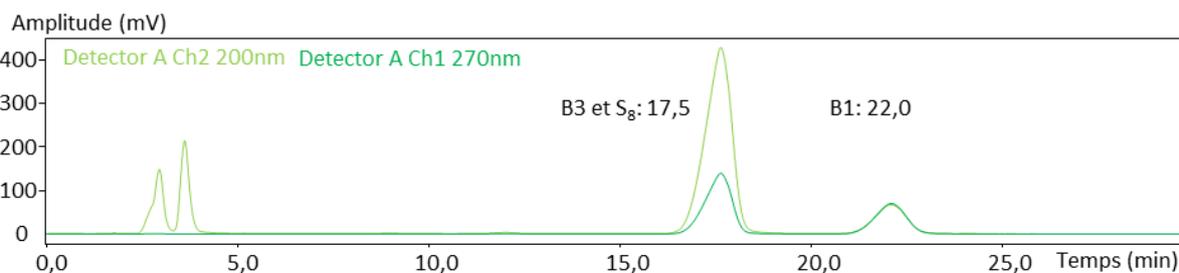


Figure 68 : Suivi en UV (200 et 270 nm) de la purification par HPLC préparative de B1 et B3.

A l'issue de la purification par HPLC préparative, les fractions contenant le métabolite B1 sont évaporées et la phase aqueuse restante est acidifiée, extraite au dichlorométhane (DCM), lui-même évaporé. Le chromatogramme obtenu par analyse GC-MS du métabolite B1 obtenu n'indique la présence d'aucun autre composé mais en RMN  $^1\text{H}$  des impuretés semblent encore être présentes (données non présentées). Une dernière étape par chromatographie en phase normale (gel de silice) dans les mêmes conditions de séparations que la première étape de purification permet de les éliminer. Après évaporation, 3,8 mg du métabolite B1 ( $1,3 \cdot 10^{-2}$  mmol) sous forme d'un solide blanc sont obtenus, soit un rendement de 11% à partir d'une culture microbiologique de 1,25 L à 50 mg/L de chlordécone ( $62,5$  mg,  $1,2 \cdot 10^{-4}$  mol), placée en conditions anaérobie pendant 2 ans. Le métabolite B3, produit minoritaire de la transformation, n'a pas pu être isolé par cette voie.

## 2. 2. Purification partielle des métabolites C1 et C2

A l'issue de l'extraction et de la purification sur colonne de gel de silice, les métabolites polaires (famille C) subissent deux étapes de purification successives sur colonne C18 en HPLC préparative. La

première étape a pour but de séparer les composés polaires des hydrochlordécones et de la chlordécone encore présente alors que la deuxième vise à séparer les différents membres de la famille C.

### Séparation des composés polaires des (hydro)chlordécones

La première séparation en HPLC préparative a été développée à partir des conditions en LC-MS analytique qui permettaient d'observer la famille des composés polaires et les hydrochlordécones à des temps de rétention distincts (Figure 69). Ces conditions impliquent un gradient de tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7) et d'acétonitrile sur colonne C18, en phase inverse (gradient 1).

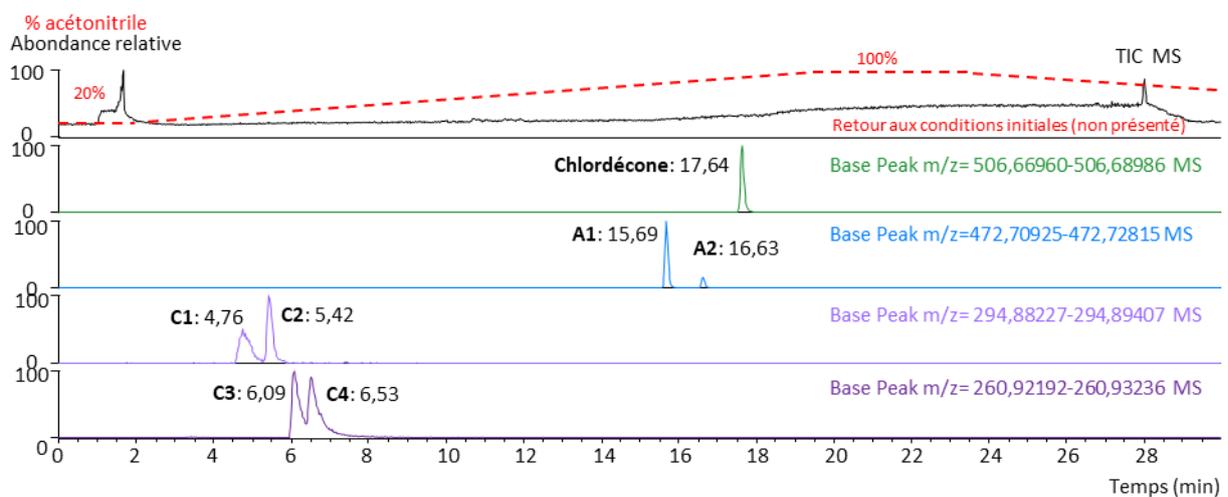


Figure 69 : Détection des hydrochlordécones et des métabolites polaires en LC-Orbitrap-MS. Gradient (traits pointillés rouge) du pourcentage d'acétonitrile en complément du tampon  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (10mM, pH 7). La chlordécone et les hydrochlordécones sont représentés en vert et bleu respectivement tandis que les métabolites polaires sont représentés en violet.

La séparation à l'échelle analytique a été transposée en HPLC préparative sur colonne C18 (150 mm x 30 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) avec les mêmes solvants (Figure 70).

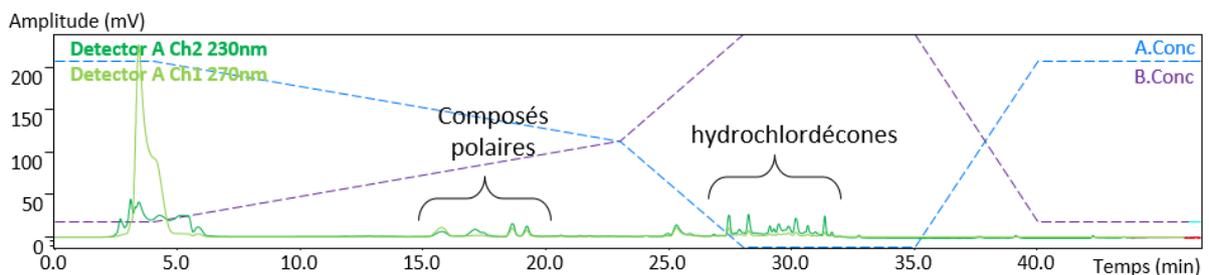


Figure 70 : Purification par HPLC préparative des composés polaires des hydrochlordécones et par HPLC préparative suivi aux longueurs d'onde 230 et 270 nm. Pointillés bleus : % du solvant A (tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7)) et pointillés violets : % du solvant B (acétonitrile).

## Tentative de séparation des composés polaires

Une modification du gradient intégrant une pente à 0,13%/min de la voie B entre 15 et 30 minutes a permis la séparation des deux isomères C1 et C2 (Figure 71). Cependant, l'analyse en LC-Orbitrap-MS a révélé que les fractions récoltées ne contenaient pas chaque composé pur mais un mélange semblable dans chaque fraction. Ceci peut être dû à la collecte manuelle pour laquelle un décalage entre le signal et la sortie des composés est possible. Une autre hypothèse serait une isomérisation chimique lente, catalysée par la lumière ou par les conditions aqueuses utilisées (tampon acétate d'ammonium), les fractions ayant été conservées sans précaution particulières à température ambiante sur la pailasse pendant plusieurs jours avant analyse par LC-MS. (Figure 72).

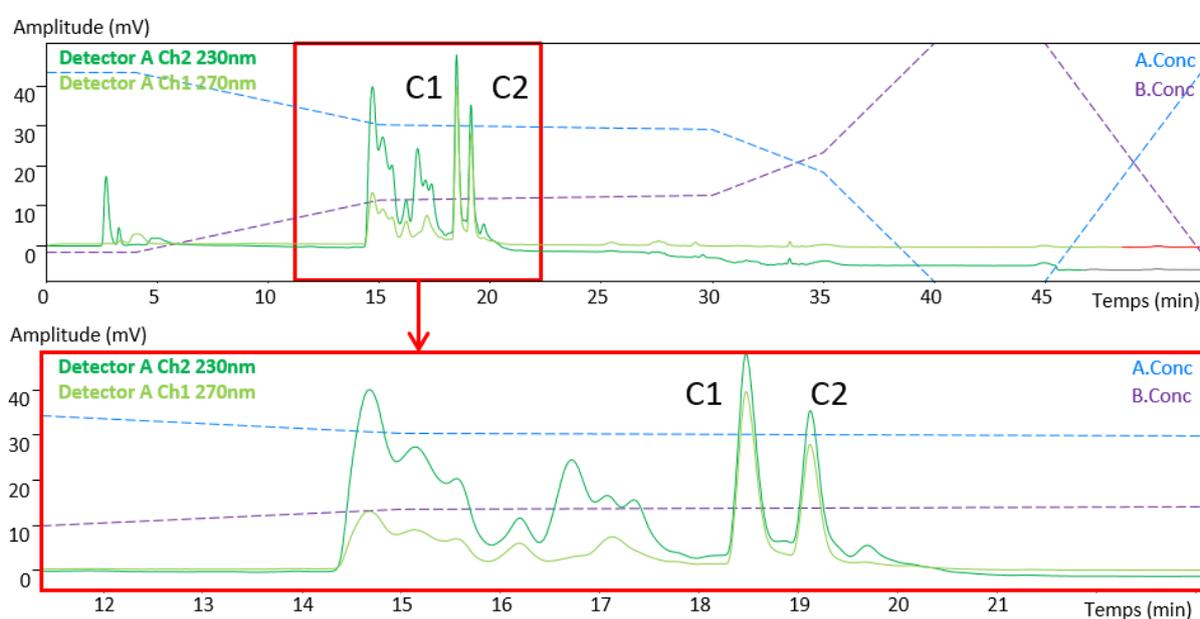


Figure 71 : Purification par HPLC préparative des composé polaires C1 et C2 suivi aux longueurs d'ondes 230 et 270 nm avec un zoom sur les composés d'intérêt. Pointillés bleus : % du solvant A (tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 7) et pointillés violet : % du solvant B (acétonitrile).

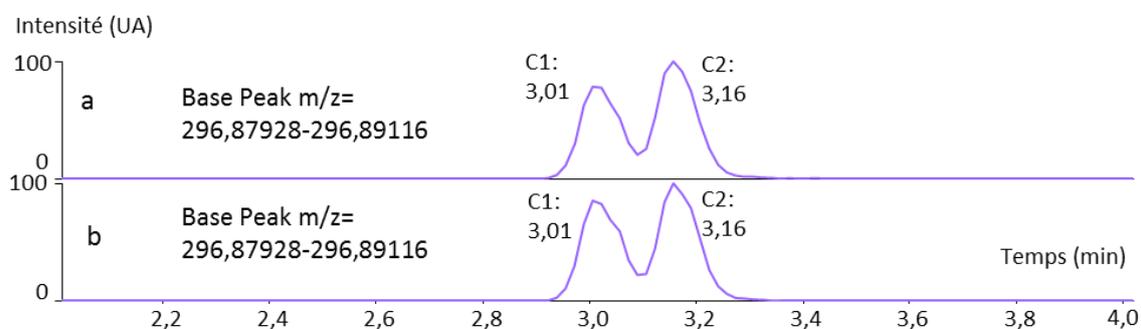


Figure 72: chromatogrammes LC-MS des fractions C1 et C2 obtenues lors de la purification en HPLC préparative : (a) premier pic nommé « C1 » sur le spectre UV supérieur en Figure 71, (b) deuxième pic, nommé « C2 » sur le spectre UV en Figure 71.

Après regroupement des fractions contenant les composés C1 et C2, l'acétonitrile est évaporé, la phase aqueuse restante est acidifiée à pH 1, extraite au dichlorométhane et évaporée. Après pesée de l'extrait sec, 4,0 mg du mélange C1-C2 est obtenu. Cependant, des impuretés sont encore présentes d'après des analyses en résonance magnétique nucléaire.

Les étapes de purification menées pour isoler les composés B1 d'une part, et C1 et C2 d'autre part sont résumées en Figure 73.

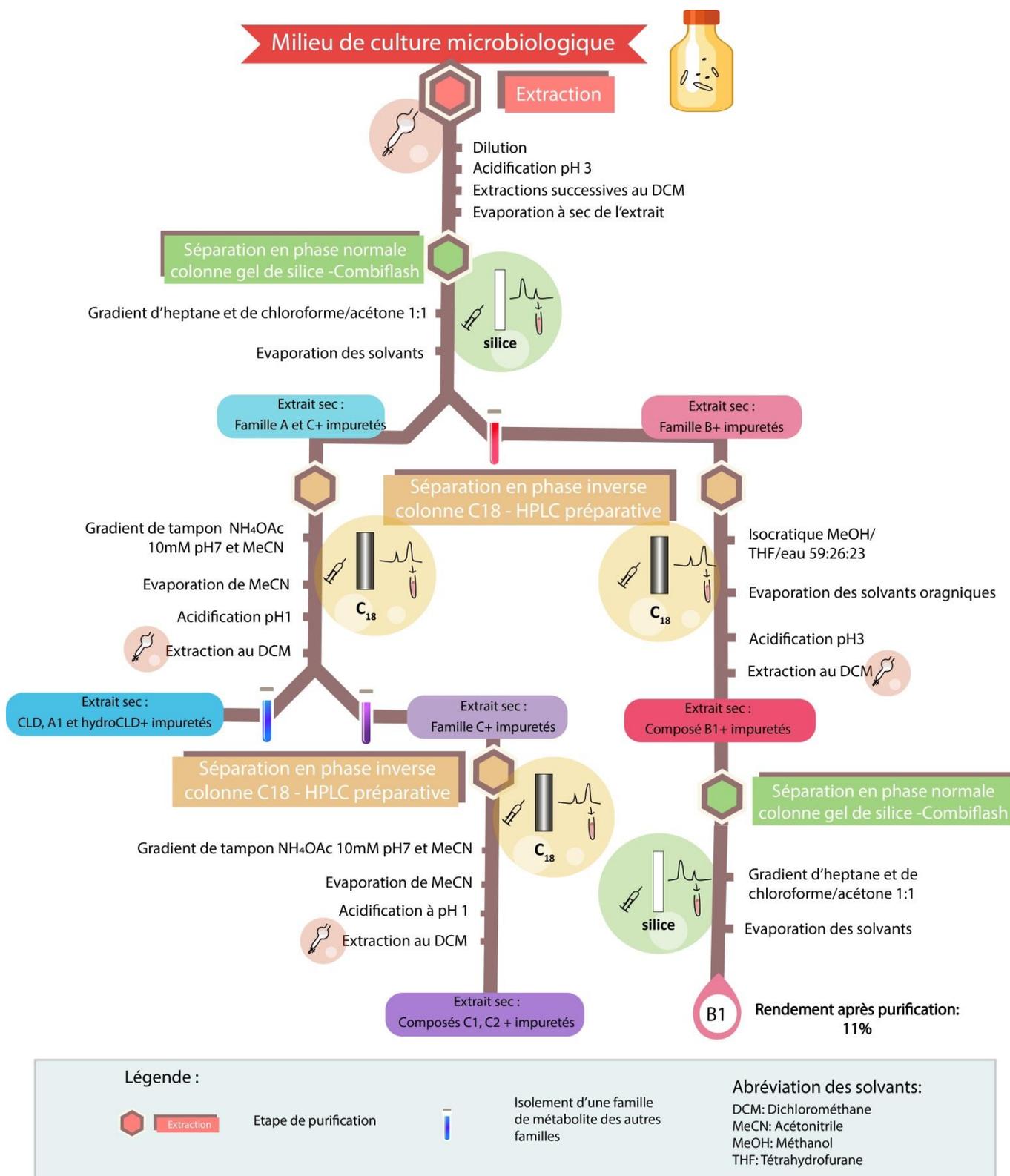


Figure 73 : Schéma récapitulatif des étapes développées pour la purification des métabolites B1 et C1-C2, appliquées au milieu réactionnel microbiologique à l'issue de la transformation quasi- totale de la chlordécone par le consortium 86.

### E. Extrapolation des proportions des métabolites par comparant les signaux des chromatogrammes (LC-MS et GC-MS) en fin de transformation

Au sein d'une même famille de métabolites, les composés partagent une structure proche. En estimant que la réponse en GC-MS des métabolites B1 et B3 est similaire, nous extrapolons la proportion du métabolite B3 en comparant son signal à celui du métabolite B1, en fin de transformation microbiologique de la chlordécone. De même, nous extrapolons les proportions des composés C3 et C4 en comparaison aux composés C1 et C2.

Les spectres de masse des métabolites B1 et B3 présentent la même fragmentation par rapport à l'ion moléculaire (Chapitre 2) et nous considérons que leurs signaux peuvent être comparés. L'observation des chromatogrammes obtenus par analyses GC-MS permet d'évaluer un rapport d'un dixième en comparaison d'aires entre les métabolites B3 et B1 (Figure 74). La faible quantité de métabolite B1 obtenu à l'issue de la purification ne permet pas d'envisager une purification du métabolite B3 par cette voie.

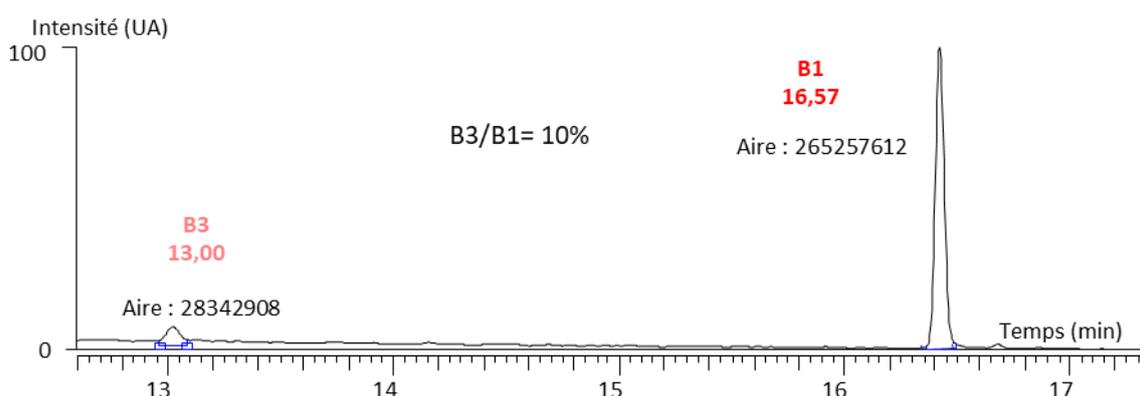


Figure 74 : Comparaison des aires des métabolites B3 et B1 d'après un chromatogramme obtenu par analyse GC-MS suite à la transformation totale de la chlordécone.

En LC-MS, les signaux des métabolites polaires sont comparés d'après les chromatogrammes obtenus en mode de détection d'ions sélectionnés (Selected Ion Monitoring, SIM). La détection par suivi de l'absorption aux UV conduirait à une réponse similaire pour ces signaux entre tous les composés de cette famille, cependant, elle n'est pas applicable dans notre cas car le signal n'est pas assez intense ni caractéristique. D'après le signal obtenu par spectrométrie de masse, on observe que les aires des pics des métabolites C1 et C2 sont très proches, de même que les aires des métabolites C3 et C4 respectivement. En comparaison de ces deux groupes d'isomères, les métabolites C3 et C4 ont un rapport d'aire 4 fois inférieur à celui des composés C1 et C2 (Figure 75). La purification de ces métabolites C3 et C4 conduirait à de trop faibles quantités.

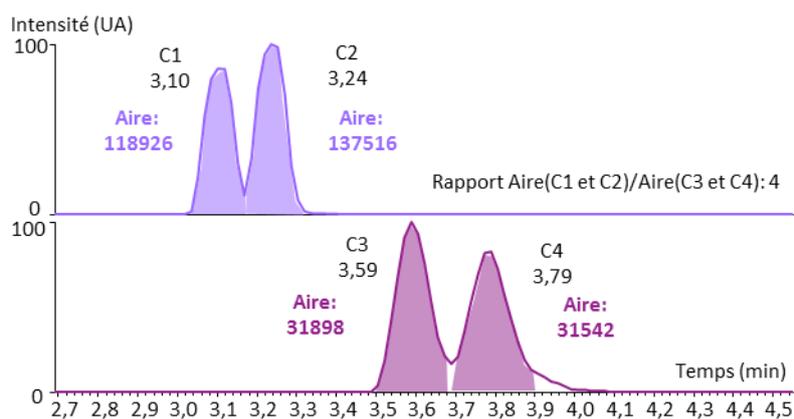


Figure 75 : Comparaison des aires des métabolites C3-C4 et C1-C2 d'après un chromatogramme LC-ESI-MS suite à la transformation totale de la chlordécone.

Le suivi de la libération des ions chlorures dans le milieu de transformation a permis d'évaluer une perte moyenne de cinq atomes de chlore par molécule de chlordécone. La purification des métabolites B1, C1 et C2 a conduit à de faibles quantités qui pourraient suggérer que ces métabolites ne sont pas nécessairement majoritaires au cours de la transformation. Il est cependant à noter que les étapes de purification conduisent à la perte de matériel. De plus, les métabolites polychloroindènes et acides polychloroindènedicarboxyliques sont assez volatils et les nombreuses étapes d'évaporation entre les séquences de purification participent à une perte substantielle. Des suivis directs par dosage des métabolites dans les milieux de culture, à l'aide de standards seraient plus adaptés pour estimer leur représentativité au cours de la transformation.

## Conclusion

Au cours de la transformation microbiologique de la chlordécone, trois familles de métabolites ont été détectées. La quantification des ions chlorures libérés dans le milieu de culture indique que la chlordécone perd en moyenne cinq atomes de chlore au stade de sa quasi-disparition dans le milieu. Ce résultat est cohérent avec l'observation de métabolites ayant entre un et sept atomes de chlore de moins que la chlordécone. La purification du métabolite B1 a été réalisée avec succès à partir d'une culture bactérienne. Celle des composés C1 et C2 a permis de les isoler ensemble mais leur purification reste à optimiser. Les métabolites A1, B3, C3 et C4 présents en plus faible quantité dans les cultures microbiennes n'ont pas été purifiés à ce stade, des voies d'accès chimiques sont développées ultérieurement (voir chapitre 4). La comparaison des aires des pics en suivi GC-MS indiquerait que la proportion relative de B3 serait de 10% par rapport à B1. De même, le suivi en LC-MS des métabolites de la famille C montrerait que les métabolites C3 et C4 représenteraient environ 25% de la quantité des métabolites C1 et C2 présents en quantité quasi-équivalente. Ces ratios entre les acides tétrachloroindène carboxyliques (C1 et C2) et les acides trichloroindènegarboxyliques (C3 et C4) est stable tout au long des transformations microbiologiques. Ainsi, les faibles quantités des produits B1, C1 et C2 apparemment majoritaires nous ont dissuadé de tenter une purification des métabolites « minoritaires » B3, C3 et C4. Les faibles rendements bruts obtenus ne rendent pas forcément compte de la réalité de la transformation : au cours des différentes étapes, une partie non négligeable de matériel a été perdue du fait de la volatilité des familles ciblées. Le développement de méthodes de dosage des métabolites offrira une vision plus directe des proportions occupées par chaque famille dans la transformation. De plus, bien que les métabolites B1, C1 et C2 paraissent majoritaires, il est possible que d'autres familles de composés (gazeux ou très polaires) soient produites mais non détectées. Le développement de suivis à partir de chlordécone radioactive devrait nous permettre d'avoir un meilleur recul sur l'ensemble des métabolites produits et pouvoir ainsi réaliser le bilan carbone (Conclusions et perspectives).

L'obtention des métabolites purs est précieuse pour divers usages, comme l'élucidation de leur structure, l'étude de leur toxicité ou l'étude des mécanismes de transformation. Leur biodégradation pourrait aussi être investiguée dans le but de les biominéraliser. Nous avons validé des protocoles pour obtenir certains métabolites purs. Cependant, les cultures microbiologiques ne permettent pas d'engager de grandes quantités de chlordécone. Dans le prochain Chapitre, nous nous intéresserons à la production à plus grande échelle des métabolites et nous présenterons les séquences de purification ayant permis de les isoler.



## **Chapitre 4 : Production par voie chimique et purification des produits de transformation de la chlordécone**

---

---

## **Introduction**

A l'issue de la purification des cultures microbiologiques, nous avons isolé quelques milligrammes du métabolite B1 pur et avons initié une méthode de séparation pour les composés polaires. Les cultures microbiologiques sont longues puisqu'elles nécessitent plusieurs mois, voire années et ne permettent pas d'engager de grandes quantités de chlordécone. En effet, plus la quantité de chlordécone à transformer est élevée (supérieure ou égale à 50 mg/L) et les volumes de cultures sont grands (supérieure à 100 ml), plus la dégradation de la chlordécone est lente. Pour ces raisons, nous avons investigué des alternatives par voie chimique pour produire rapidement les différentes familles de métabolites de manière sélective à plus grande échelle.

Dans ce chapitre, nous présenterons l'optimisation des conditions chimiques de transformation de la chlordécone permettant d'obtenir les métabolites d'intérêt rapidement et en quantités satisfaisantes. La démarche initiale consiste à transformer la chlordécone dans des conditions chimiques qui se rapprochent au mieux des conditions biologiques concernant l'agent réducteur employé et la présence de complexes métalliques comme la vitamine B<sub>12</sub>. Cette approche biomimétique a pour but de cibler au mieux les produits des transformations microbiologiques et pourrait donner des indices indirects des voies mécanistiques lors de la transformation microbiologique. Des déclinaisons d'autres conditions ont été mises en place, en conservant le système agent réducteur associé ou non à un complexe métallique. La production chimique plus sélective des composés pourrait aussi dans certains cas faciliter la séquence de purification développée au Chapitre 3 (par exemple problème de co-élution du métabolite B3 avec le soufre colloïdal).

## **I. Synthèse chimique des différentes familles de métabolites : criblage des conditions de réaction**

### **A. Transformations par voie chimique de la chlordécone et d'autres pesticides chlorés précédemment décrites**

Des travaux de transformation chimique de la chlordécone en condition anaérobie décrit précédemment ont mis en évidence différentes familles de métabolites. Les recherches de Schrauzer et Katz en 1978 (Schrauzer & Katz, 1978) ont conduit à l'identification d'hydrochlordécones allant du mono- au tétrahydrochlordécone ainsi que de composés penta- et tétrachlorés qui posséderaient une structure indène (Schrauzer & Katz, 1978). En variant les agents réducteurs (acétoïne, tétrahydruroborate de sodium, dimercaptopropanol et thioglycérol) en présence d'un catalyseur, la vitamine B<sub>12</sub> dans différents mélanges eau/solvant (dioxane, propylène glycol, méthanol et éthanol) et en diverses conditions basiques les auteurs ont réussi à favoriser partiellement la formation de certains dérivés. Aucun rendement n'est communiqué et seul un protocole de purification évasif est mentionné. D'autres réactions chimiques en milieu aqueux réalisées sur la chlordécone (fer zéro valent (FZV) comme agent réducteur (Belghit *et al.*, 2015) et conditions de déchloration photolytiques (Wilson & Zehr, 1979)) ont servi pour l'optimisation de la production des métabolites. Dans la littérature, le citrate de titane (III) permet pour d'autres composés chlorés de pousser plus loin la déchloration en comparaison d'autres réducteurs (Chiu & Reinhard, 1995; Lewis *et al.*, 1996). Il a par exemple permis en association avec la vitamine B<sub>12</sub> des transformations efficaces du tétrachlorométhane (Chiu & Reinhard, 1995; Lewis *et al.*, 1996) et du lindane (Rodríguez-Garrido *et al.*, 2004). Le couple citrate de titane (III) – vitamine B<sub>12</sub> a donc aussi été étudié en vue de produire sélectivement certains des métabolites observés en conditions microbiologiques.

Une déchloration partielle du Mirex a été observée en présence de dithionite de sodium et d'hématine, formant des monohydro- et dihydro-mirex. Ces conditions seront testées sur la chlordécone afin de favoriser la production des hydrochlordécones (Holmstead, 1976).

Récemment, la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de zinc comme agent réducteur a conduit à la production d'un composé de formule brute C<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>H<sub>3</sub> pour lequel une structure chloroindène a été proposée (Ranguin *et al.*, 2017). Ces conditions n'ont pas pu être testées en raison de la publication postérieure de ces résultats par rapport à la chronologie du criblage réalisé.

## B. Criblage des conditions réactionnelles

Différentes réactions chimiques ont été testées à partir de 5 mg ( $9,8 \cdot 10^{-6}$  mol) de chlordécone et ont permis une transformation totale, partielle ou nulle. Les détails des quantités et conditions d'utilisation de chaque réactif sont précisés au Chapitre 8. Le nombre d'équivalent des réactifs (éq.) seront précisés en comparaison à la chlordécone. Les analyses complémentaires par GC-MS et LC-MS ont permis d'identifier les métabolites principaux (ceux supposés majoritaires marqués en gras) dans le Tableau 6 où figure également l'association catalyseur/agent réducteur employés. Des détails sur les réactions ainsi que les conditions optimales retenues pour la production des composés seront précisés dans les parties suivantes, en fonction du produit de transformation ciblé.

Les transformations chimiques présentées dans le Tableau 6 produisent des composés issus des trois familles de métabolites : famille A (hydrochlordécones), famille B (polychloroindènes) et famille C (acides polychloroindèncarboxyliques). Le dosage des différentes familles n'étant pas mis au point, seules les comparaisons de composés de la même famille, répondant de façon similaire aux modes d'ionisation et de détection peuvent être envisagées. De plus, des outils d'analyses différents sont utilisés pour l'analyse des différentes familles. Les composés polaires sont détectés en LC-MS et leur faible volatilité et/ou instabilité à haute température ne permet pas de les détecter en GC-MS. Des essais préliminaires d'estérification ont été réalisés en vue d'une détection en GC-MS mais la dérivatisation de ces acides polychloroindèncarboxyliques s'est avérée incomplète et nécessiterait de plus longs développements pour être opérationnelle. Les composés apolaires B1, B2 et B3 sont détectés en GC-MS mais sont difficilement détectables en LC-MS à cause de leur trop faible ionisation en électrospray (seul mode d'ionisation à disposition). Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les réactions en les classant selon le ou les produits majoritaires formés d'après les analyses par GC-MS. Nous distinguerons celles retenues pour une production à grande échelle. Les composés polaires sont toujours produits en présence d'autres composés observés par GC-MS. Les conditions favorisant leur formation auront déjà été décrites dans les parties précédentes, en fonction des composés hydrochlordécones ou polychloroindènes détectés.

Tableau 6 : Produits de transformation de la chlordécone identifiés selon des différentes combinaisons d'agent réducteur et de complexe métallique étudiés. En vert, les conditions permettant une transformation complète de la chlordécone, en orange, les conditions permettant une transformation partielle de la chlordécone et en rouge les conditions ne permettant pas la transformation de la chlordécone. CLD : chlordécone ; Maj : produit supposé majoritaire ; Min : produit supposé minoritaire.

		Complexe métallique			
		Vitamine B <sub>12</sub>	Hématine	Chlorophylle a	Sans
Agent réducteur	Dithionite de sodium (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	Maj : CLD Min : A1, B1	Maj : CLD Min : A1, A5	Non testé	-
	Durée	7 jours	30 heures	-	-
	Sulfure de sodium (Na <sub>2</sub> S)	Maj : A1 Min : B1, Ci (i = 1 à 4)	Maj : A1 min : B1, Ci (i = 1 à 4)	Maj : CLD Min : A1	-
	Durée	10 à 30 heures	30 heures	48 heures	
	Fer zéro valent (Fe <sup>0</sup> )	Maj : A1, Ci (i = 1 à 8) Min : A4, B1, B2, B3	Maj : A1 Min : A4, A5, B1	Non testé	Maj : A1 hydroCLD Min : Ci (i = 1 à 4), B1
	Durée	5 jours	2 semaines		5 semaines
	Citrate de titane (III)	Maj : B1, C1, C2, C5, C6 Min : B2 et B3 Ci (i = 7 à 10)	Maj : A1, A5 Min : A4, hydroCLD et PCI	Non testé	Maj : A1 Min : hydroCLD
	Durée	2 heures	3 heures		3 heures
	Sans	-	-	-	-

Les séquences de purification développées ou adaptées de la purification des métabolites obtenus par voies microbiologiques seront aussi présentées afin d'établir la séquence complète développée pour obtenir les composés purs et en grandes quantités. Des rendements issus de l'ensemble de la séquence production et purification seront donnés pour chaque composé obtenu.

## II. Production et purifications des composés de la famille A

### A. Conditions favorisant la production du monohydrochlordécone A1

Le métabolite A1 est un monohydrochlordécone d'après ses spectres de masse obtenus en GC-MS et en LC-MS. Plusieurs conditions chimiques de transformation de la chlordécone ont permis de favoriser la production du métabolite A1 parfois en présence d'autres hydrochlordécones, de composés polaires C ou apolaires B. Pour chacune de ces transformations, un profil de disparition de la chlordécone et apparition des produits sont présentés. Ces profils ont été obtenus en GC-FID et GC-IRMS, pour lesquelles la linéarité de la réponse de l'instrument pour la chlordécone est satisfaisante. N'ayant pas à ce stade les standards des produits hydrochlordécones purs, ces résultats ne constituent cependant pas des profils de dosage et sont simplement utilisés afin de guider notre choix de conditions optimales. Les profils sont obtenus en comparant l'aire du pic de chaque composé à un instant  $t$  ( $\text{Aire}(\text{composé})_t$ ), à l'aire du pic de la chlordécone dans les conditions initiales ( $\text{Aire}(\text{chlordécone})_0$ ) (Figure 78 et Figure 80).

#### 1. Transformation chimique de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et Na<sub>2</sub>S

En s'inspirant des conditions opératoires précédemment développées (Schrauzer & Katz, 1978), nous avons pu dégrader la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.) et d'un réducteur, le sulfure de sodium (287 éq.), réducteur également utilisé dans les expériences microbiologiques. C'est dans le but d'approcher la transformation microbiologique au plus près, que le sulfure de sodium est utilisé aussi dans l'expérience de dégradation chimique de la chlordécone. La transformation de la chlordécone se fait dans l'eau, à pH 12,6, imposé par le sulfure de sodium et à température ambiante. Elle est totale en 30 heures et le métabolite A1 est formé majoritairement (Figure 76). D'autres composés chlorés très minoritaires ont été observés à l'état de traces. Il s'agit du métabolite B1 et des composés polaires C1, C2, C3 et C4 (Figure 77). D'après le suivi par GC-IRMS (Figure 78), la conversion de la chlordécone en métabolite A1 approcherait 50%.

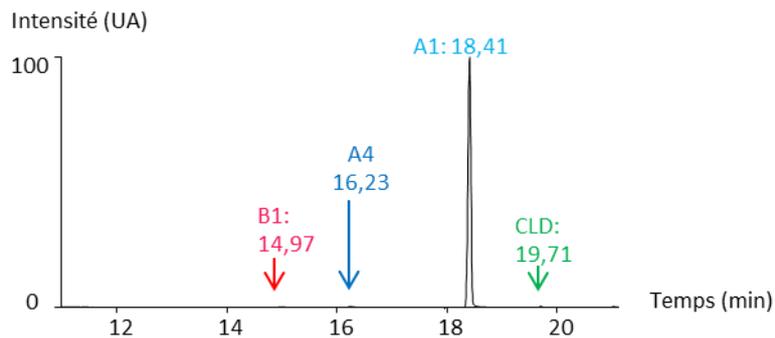


Figure 76 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de sulfure de sodium après extraction liquide-liquide (30 heures, totale).

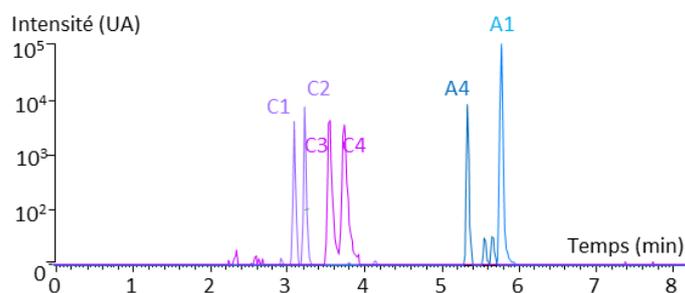


Figure 77 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de sulfure de sodium (30 heures, totale).

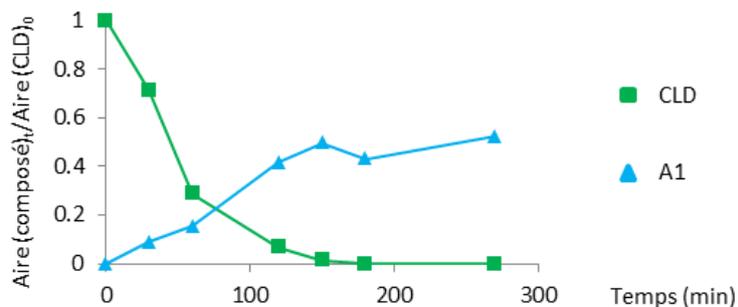


Figure 78 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le sulfure de sodium (30 heures, totale).

## 2. Transformation chimique de la chlordécone avec l'hématine et Na<sub>2</sub>S

En s'inspirant de l'utilisation de l'hématine (5,0 éq.) comme catalyseur (Holmstead, 1976), nous avons réalisé la transformation de la chlordécone en l'associant au le sulfure de sodium comme agent réducteur (284 éq.) dans l'eau à pH 12,6 (imposé par le sulfure de sodium), à 37°C. La réaction a conduit à la formation du composé A1 (Figure 79). Aucun autre métabolite

des familles connues n'a été détecté en GC-MS, ni en LC-MS. Le taux de conversion de la chlordécone en métabolite A1 dans ces conditions avoisinerait 10% (Figure 80) alors que la totalité de la chlordécone est consommée au bout de 25 heures.

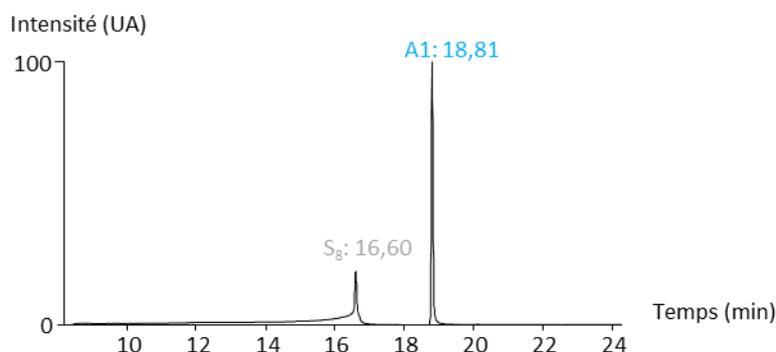


Figure 79 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de  $\text{Na}_2\text{S}$  après extraction liquide-liquide (30 heures, totale).

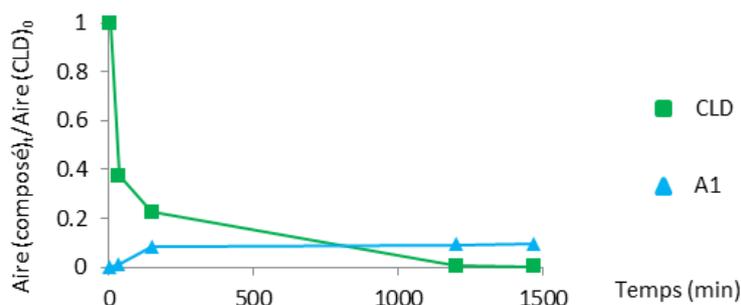


Figure 80 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-FID au cours de la transformation de la chlordécone avec l'hématine et  $\text{Na}_2\text{S}$  (30 heures, totale).

Le reste de la chlordécone pourrait se fixer en partie à l'hématine en excès ou être à l'origine d'autres composés non détectés à ce stade. Une analyse en GC-MS de la phase gazeuse pourrait permettre de détecter la présence éventuelle de produits chlorés volatiles générés. Un protocole de détection de l'hématine en LC-MS pourrait être également appliqué afin de vérifier si un fragment de chlordécone se greffe dessus.

### 3. Transformation chimique de la chlordécone avec la chlorophylle a et $\text{Na}_2\text{S}$

La chlorophylle a (3,8 éq.) a été testée comme complexe métallique en comparaison avec la vitamine B<sub>12</sub> et l'hématine, en présence de sulfure de sodium (287 éq.), à pH 12,6. La transformation de la chlordécone n'est que partielle dans ces conditions et le métabolite A1 est identifié comme seul produit de transformation (Figure 81).

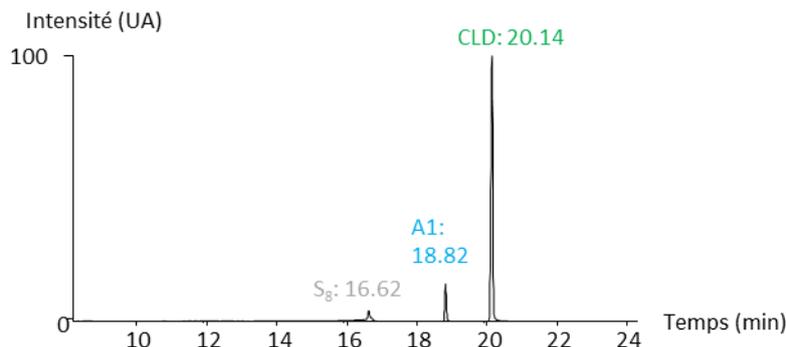


Figure 81 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de chlorophylle et de sulfure de sodium après extraction liquide-liquide (48 heures, partielle).

#### 4. Conditions retenues pour la synthèse du monohydrochlordécone A1

La réaction chimique permettant de transformer la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le sulfure de sodium a été retenue pour la production du composé A1. La conversion d'environ 50% en composé A1 en 30 heures est la plus satisfaisante des conditions testées, sur la durée de réaction et la sélectivité apparente de la transformation.

Les conditions de transformation retenues ont été appliquées à différentes quantités de chlordécone : 200 µg, 1, 5, 50, 100 et 200 mg. Les mêmes proportions d'eau, de vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.) et de sulfure de sodium (287 éq.) ont pu être utilisées à toutes les échelles. La robustesse de la réaction sur la gamme 200 µg – 200 mg est un atout. Si l'intérêt de la production à grande échelle est évoqué à plusieurs reprises, la production fiable à petite échelle est aussi très utile pour convertir des petites quantités de chlordécone marquée (<sup>13</sup>C ou <sup>14</sup>C).

### B. Conditions chimiques favorisant la production d'autres hydrochlordécones

#### 1. Transformation de la chlordécone avec citrate de titane(III)

La chlordécone mise en présence de citrate de titane(III) seul (8,4 éq.) basifié à pH 12,7 pour un pH final de 12,0 dans le milieu réactionnel, conduit à la formation de plusieurs hydrochlordécones allant du monohydrochlordécone A1 à des trihydrochlordécones. La transformation de la chlordécone est totale dans ces conditions, pour des durées allant de quelques heures (Figure 82) à quelques jours (Figure 83). Le composé A1 est majoritaire mais de

nombreux hydrochlorodécones sont formés dans ces conditions (voir en particulier Figure 83). Le grand nombre d'hydrochlorodécones produits ne nous permet pas de cibler ceux produits par voie microbiologique. La variabilité forte de la cinétique de la réaction est un autre inconvénient de cette voie d'accès aux hydrochlorodécones. Ces conditions ne sont donc pas retenues pour la production d'autres hydrochlorodécones.

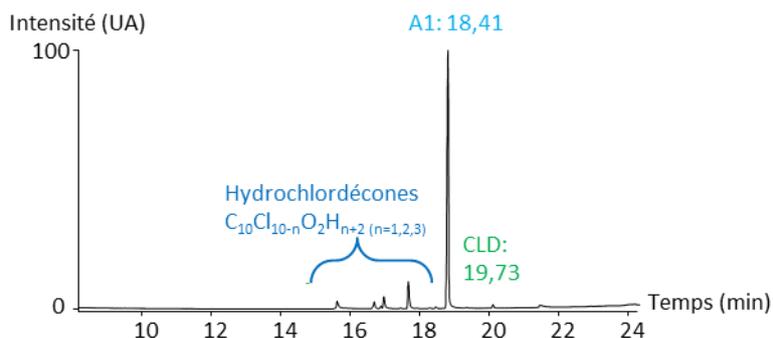


Figure 82 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale).

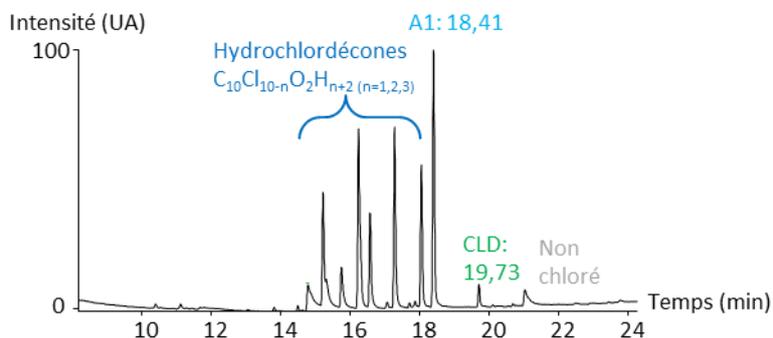


Figure 83 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (3 jours, totale).

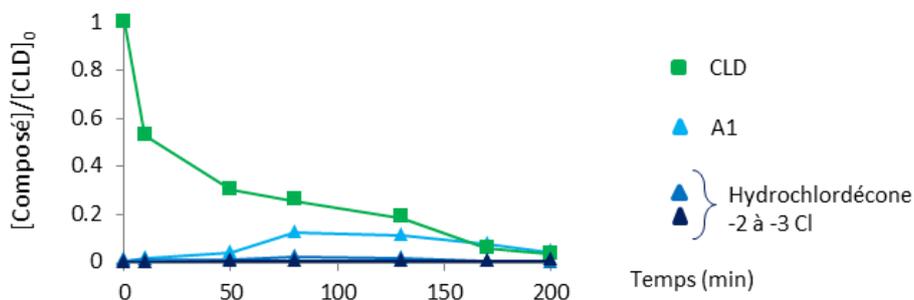


Figure 84 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A1 et A5) par GC-FID au cours de la transformation par voie photochimique de la chlordécone.

## 2. Transformation de la chlordécone avec fer(0)

La transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent dans un mélange eau/acétone 3 :1 a été décrit par Belghit *et al.* (Belghit *et al.*, 2015) : la transformation totale de la chlordécone en hydrochlordécones a ainsi été réalisée en utilisant du fer zéro valent comme réducteur (400 éq.), dans un milieu eau/acétone 3 :1 (v/v). Ces conditions ont été reprises et ont permis l'obtention du composé A1 majoritaire (conversion estimée à 50% au bout de cinq semaines, Figure 87) ainsi que d'autres hydrochlordécones en deux mois (Figure 85). Des traces de composés polaires C1, C2, C3 et C4 ont également été détectés en LC-MS en fin de réaction (Figure 86).

3.

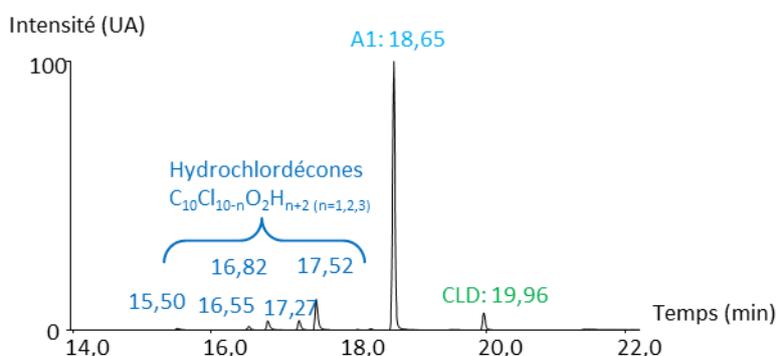


Figure 85 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (2 mois, totale).

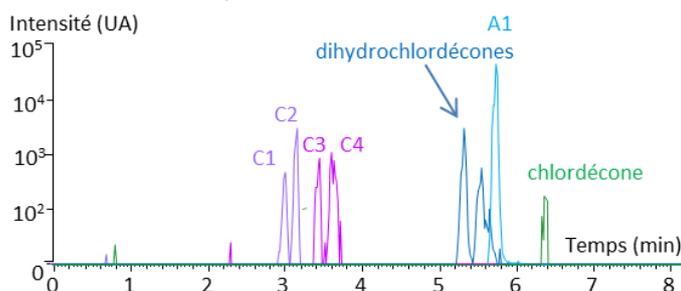


Figure 86 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent (2 mois, totale).

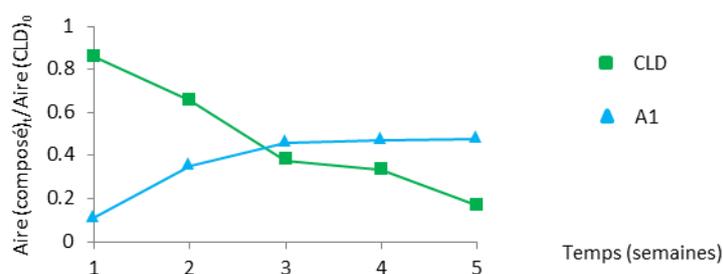


Figure 87 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec le fer zéro valent (transformation suivie sur 5 semaines, partielle).

### 3. Transformation de la chlordécone avec vitamine B<sub>12</sub> et fer(0)

Après ces essais de transformation de la chlordécone avec le fer zéro valent, nous nous sommes demandé si la présence de vitamine B<sub>12</sub> pouvait affecter la transformation et conduire à des produits autres que les hydrochlordécones. La transformation de la chlordécone a été réalisée avec de la vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.) et du fer zéro valent (400 éq.) dans un mélange eau/acétone 3 :1 (v/v). La transformation est totale en cinq jours et conduit à la production du métabolite A1, d'hydrochlordécones dont A4 (Figure 88 et Figure 89) ainsi qu'à la formation à l'état de traces des métabolites apolaires B1, B2 et B3. Les métabolites C1, C2, C3 et C4 sont aussi détectés lors des analyses par LC-MS (Figure 89). De nouveaux composés polaires de formule brute C<sub>10</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>H<sub>5</sub> et C<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ont été identifiés au cours de cette transformation. Leurs spectres de masse (fragmentation dans la source ESI) présentent les mêmes pertes : [M-H]<sup>-</sup>, [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> et [M-H-CO<sub>2</sub>-HCl]<sup>-</sup> pour les composés C5 (Figure 90) et C6 (Figure 91). Dans le cas des composés C7 (Figure 92) et C8 (Figure 93), les fragments [M-H]<sup>-</sup> et [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> sont observés mais l'intensité de l'ion [M-H-CO<sub>2</sub>-HCl]<sup>-</sup> est très faible.

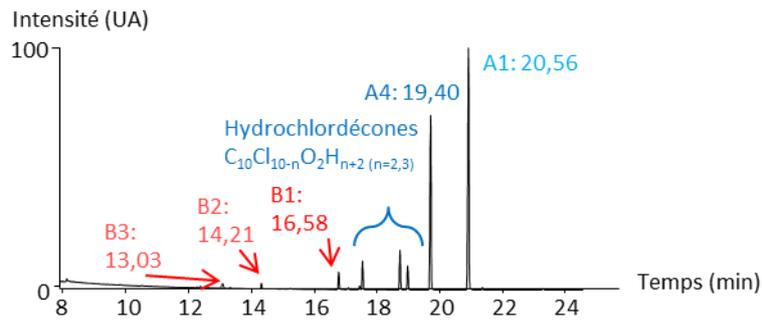


Figure 88 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (5 jours, totale).

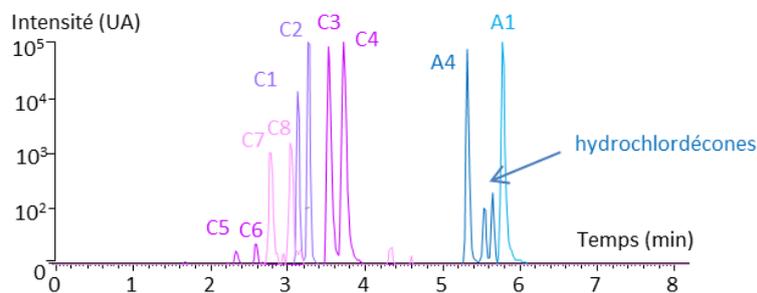


Figure 89 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de fer zéro valent (5 jours, totale).

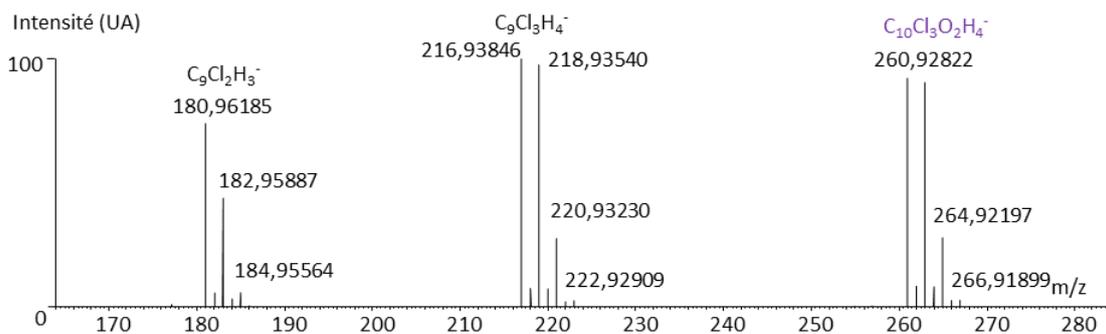


Figure 90 : Spectre de masse du métabolite C5 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.

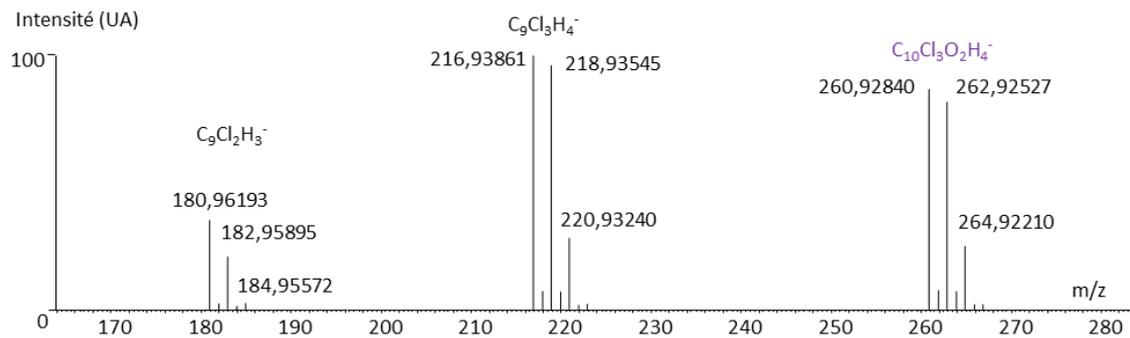


Figure 91 : Spectre de masse du métabolite C6 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.

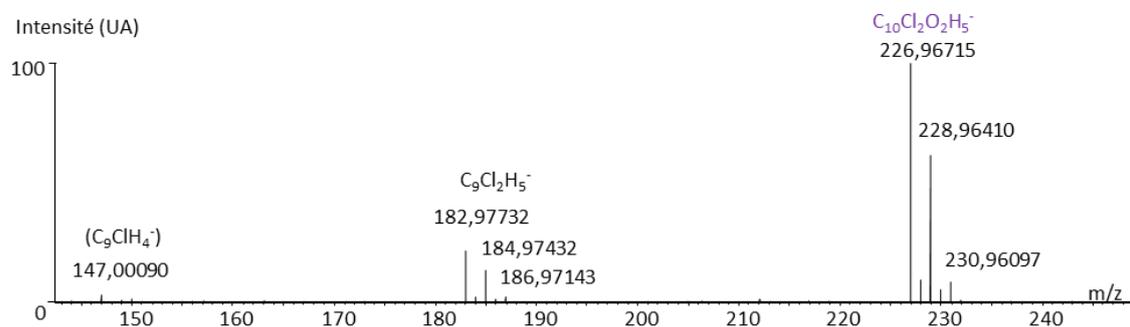


Figure 92 : Spectre de masse du métabolite C7 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.

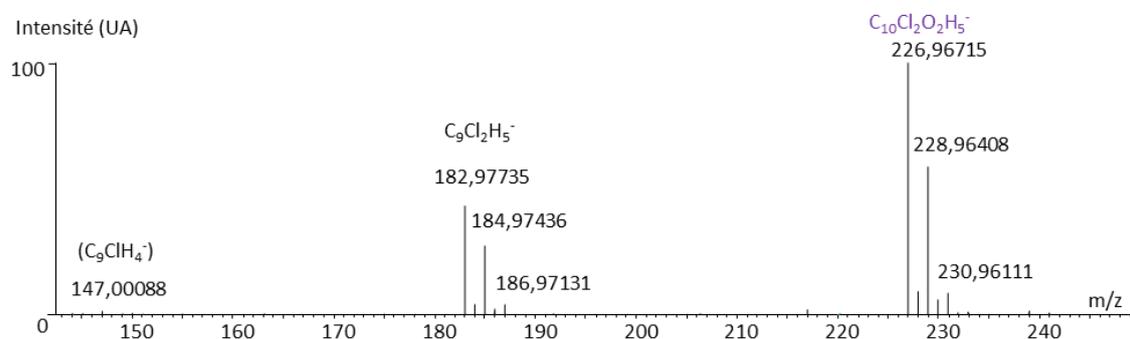


Figure 93 : Spectre de masse du métabolite C8 avec fragmentation dans la source ESI au cours de l'analyse LC-Orbitrap-MS.

#### 4. Transformation de la chlordécone avec hématine et fer(0)

La transformation de la chlordécone a été testée en présence d'hématine (5,0 éq.) et du fer zéro valent (400 éq.) dans l'eau, à température ambiante. La transformation est totale en deux semaines et conduit à la formation majoritaire du métabolite A1 (Figure 94). Les métabolites B1, A4 et A5 (métabolite rarement observé lors des transformations par voie microbiologique) sont détectés comme produits minoritaires.

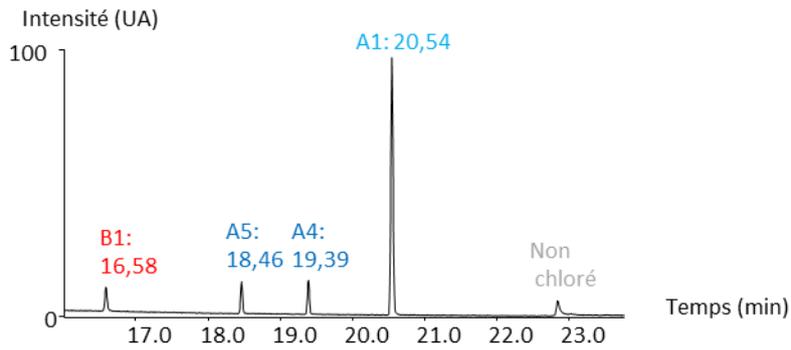


Figure 94 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de fer zéro valent après extraction liquide-liquide (2 semaines, totale).

### 5. Transformation de la chlordécone avec hématine et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

La transformation de la chlordécone à partir d'hématine (5,0 éq.) et de dithionite de sodium (128 éq.) dans l'eau (pH 7) conduit à sa transformation partielle et à la production des métabolites A1 et A5. La réaction n'évolue plus après 30 h de réaction (Figure 95 et Figure 96).

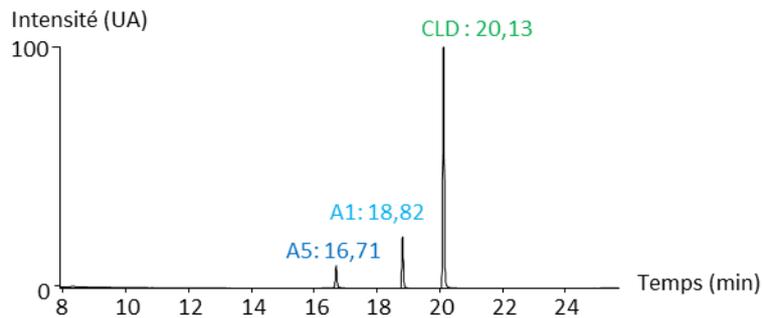


Figure 95 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  après extraction liquide-liquide (30 heures, partielle).

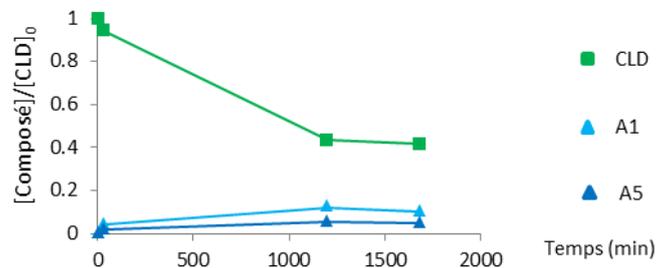


Figure 96 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A1 et A5) par GC-FID au cours de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  après extraction liquide-liquide (30 heures, partielle).

## 6. Transformation de la chlordécone avec hématine et citrate de titane(III)

La transformation de la chlordécone en présence d'hématine (5,0 éq.) et de citrate de titane (8,4 éq.) dans l'eau à pH 12 a conduit en trois heures à de nombreux composés dont les métabolites A1 et A5 majoritaires et d'autres hydrochlordécones minoritaires dont le métabolite A4 (Figure 97). Des composés apolaires dont les spectres de masse sont proches de ceux des métabolites B1, B2 et B3 ont également été observés.

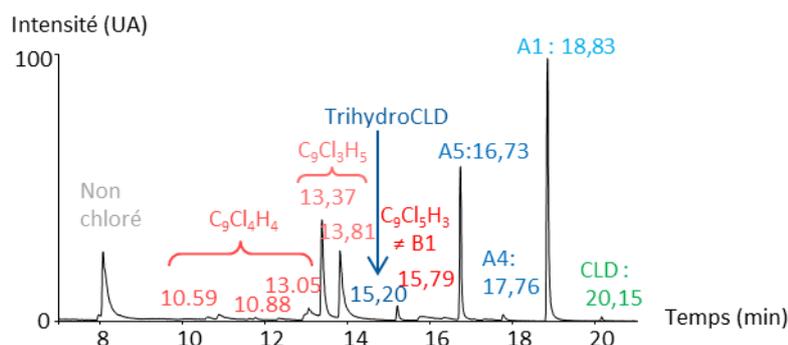


Figure 97 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence d'hématine et de citrate de titane après extraction liquide-liquide (3 heures, totale).

## 7. Transformation photochimique de la chlordécone

La transformation de la chlordécone par voie photochimique a aussi été explorée, en testant un protocole inspiré par les résultats de Wilson et Zehr (Wilson & Zehr, 1979) qui avaient obtenu une transformation de 85% de la chlordécone. Les produits majoritaires de ces travaux ont été identifiés comme le 8-monohydrochlordécone et le 2,8-dihydrochlordécone, avec un rendement après purification de 1,6% pour chaque composé.

Des conditions photolytiques proches de celles précédemment décrites (Wilson & Zehr, 1979) ont été appliquées à la chlordécone (CEA Saclay, Eric Doris et Olivier Loreau). Afin d'améliorer l'efficacité de la déchloration photoinduite, un donneur de proton, l'isopropanol dans le toluène est utilisé lors de l'irradiation par une lampe UV-visible à moyenne pression (150 W). On observe une transformation totale de la chlordécone, associée à l'apparition de deux produits majoritaires : un monohydrochlordécone et un dihydrochlordécone (Figure 98). Le devenir du reste de la chlordécone n'est pas connu. Le suivi par GC-IRMS des deux produits laissent supposer un taux de conversion de 10% pour chacun (Figure 99), ce qui serait nettement

supérieur aux rendements obtenus par Wilson et Zehr (Wilson & Zehr, 1979) (1,6%) à l'issue de leur purification.

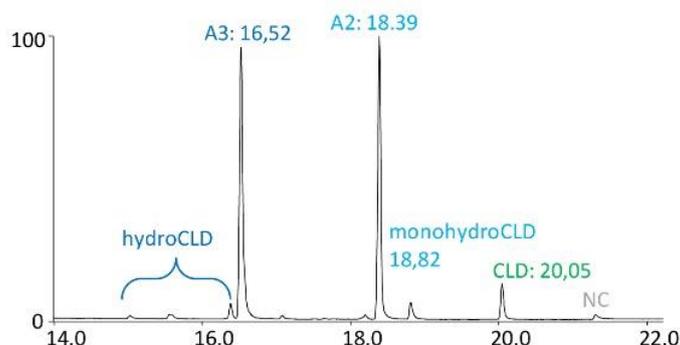


Figure 98 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la photolyse de la chlordécone après extraction liquide-liquide (3 heures, totale).

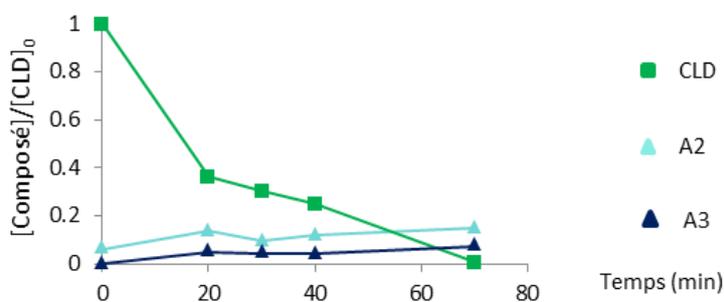


Figure 99 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif de ses produits de transformation (A2 et A3) par GC-IRMS au cours de la photolyse de la chlordécone.

Le monohydrochlordécone produit au cours de cette transformation est identifié comme le 8-monohydrochlordécone d'après son spectre de masse par GC-EI-MS. Le dihydrochlordécone a un spectre de masse similaire à celui du composé A3 obtenu par voie microbiologique et à celui reporté par Wilson et Zehr pour le 2,8-dihydrochlordécone (Wilson & Zehr, 1979). Cinq structures sont possibles d'après son spectre de masse (Chapitre 2). Des analyses bidimensionnelles en RMN ( $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ ) pourraient permettre de confirmer la position des atomes d'hydrogène.

## 8. Intérêt et conditions retenues pour la production d'hydrochlordécones

Afin d'obtenir d'autres hydrochlordécones que le monohydrochlordécone A1, les conditions photochimiques de transformation de la chlordécone ont été retenues. Elles permettent une production sélective de deux hydrochlordécones observés en conditions microbiologiques. Cette réaction est rapide (transformation totale comprise entre une et trois heures) et une conversion correcte (de l'ordre de 10% pour chaque hydrochlordécone d'après

les signaux en GC-IRMS, en comparaison avec ceux de la chlordécone), contrairement aux autres conversions.

### **C. Extraction des hydrochlordécones**

#### **1. Extraction du métabolite A1**

La transformation de 200 mg de chlordécone ( $3,9 \cdot 10^{-4}$  mol) avec la vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.) et le sulfure de sodium (287 éq.) dans un volume de 300 ml d'eau a été réalisée en 30 heures, à température ambiante. Le métabolite A1 est majoritairement formé au cours de cette réaction. Il est extrait du milieu réactionnel après acidification de la phase aqueuse à pH 3 et cinq extractions liquide/liquide successives en ampoule à décanter avec du dichlorométhane (DCM).

#### **2. Extraction des composés A2 et A3 depuis le milieu réactionnel de la transformation photochimique**

La photolyse de la chlordécone (35 mg ;  $6,9 \cdot 10^{-5}$  mol) a été réalisée dans 600 ml de toluène avec ajout d'isopropanol (1% v/v) comme donneur de protons. La réaction sous lampe UV-visible à moyenne pression (150 W) est totale en trois heures. Les hydrochlordécones sont extraits de la phase toluène par une phase aqueuse basique à pH 14 (NaOH) ensuite acidifiée à pH 3 (HCl) et extraite au dichlorométhane (DCM).

### **D. Purification par phase normale**

Seul le métabolite A1 nécessite une purification par phase normale (gel de silice) du fait de la présence des dérivés soufrés (soufre colloïdal) et de dérivés de la vitamine B<sub>12</sub>. Les conditions appliquées sont celles précédemment développées (Chapitre §II. C., p98).

### **E. Purification par phase inverse**

La séparation en LC-MS des hydrochlordécones est permise à l'aide d'une colonne C18 par un gradient (gradient 1, voir Chapitre 8 : matériel et méthodes) d'eau et d'acétonitrile. Deux conditions isocratiques à 63% et 59% d'acétonitrile ont été testées afin d'améliorer la séparation de la chlordécone et du composé A1 (Figure 100).

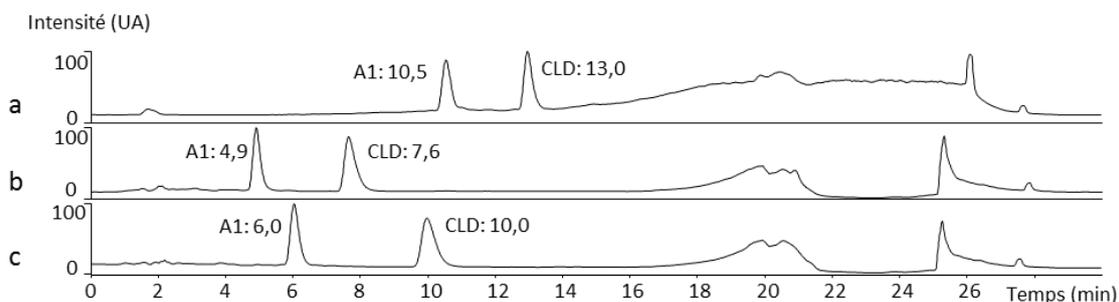


Figure 100 : Chromatogrammes LC-Orbitrap-MS (TIC) de la séparation de la chlordécone et du composé A1 par (a) le gradient 1 (eau /acétonitrile), (b) l'isocratique à 63% d'acétonitrile et (c) l'isocratique à 59% d'acétonitrile.

La méthode isocratique à 59% d'acétonitrile est retenue. L'eau est remplacée par un tampon acétate d'ammonium 10 mM à pH 9,5 et l'acétonitrile est remplacé par un mélange acétonitrile/tétrahydrofurane 1 :1, v/v, ce qui permet une meilleure solubilisation des hydrochlordécones et une plus grande reproductibilité des temps de rétention. Cette condition a été transférée à l'échelle préparative sur une colonne C<sub>18</sub> (150mm, 30mm, 5µm). La détection des (hydro)chlordécones par le détecteur simple/double longueur d'onde de l'instrument n'étant pas assez sensible, un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) a été utilisé afin de suivre l'élution des composés (Figure 101 : A1 à 9,0 min ; CLD à 13,0 min). Pour récupérer le composé A1 à partir des fractions récoltées le contenant, la lyophilisation ne peut être appliquée du fait de la volatilité du composé. Les fractions sont d'abord évaporées sous pression réduite afin d'éliminer l'acétonitrile puis la phase aqueuse restante est acidifiée et extraite au DCM. De même que pour le monohydrochlordécone A1, les produits de la réaction photochimique, A2 et A3, sont purifiés en HPLC préparative selon la même méthode.

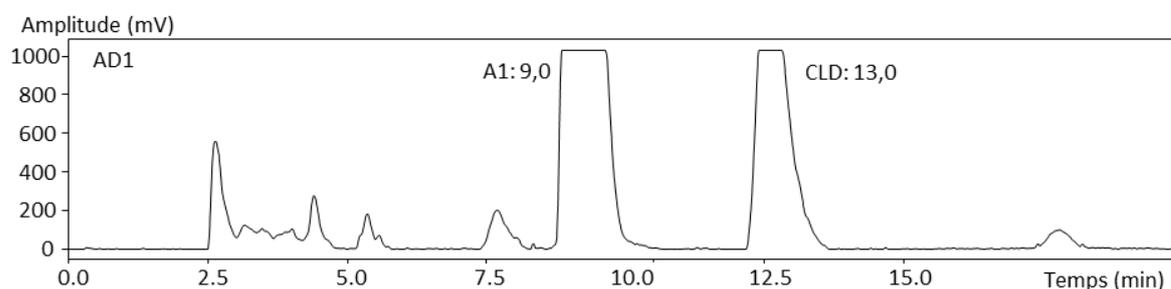


Figure 101 : Chromatogramme de la purification du composé A1 en HPLC préparative avec détection au DEDL.

## F. Purification finale

Après la purification par HPLC préparative, l'analyse en GC-MS des trois hydrochlordécones (A1, A2 et A3) démontre une bonne pureté. Le composé A3 est retrouvé à environ 1% dans la fraction

de A2 purifiée et réciproquement. La chlordécone est aussi présente dans les deux fractions à environ 1% du signal en LC-MS. Cependant, l'analyse RMN indique la présence d'autres impuretés. Une étape supplémentaire de purification est donc requise. Pour cela, on exploite la présence de la fonction gem-diol de tous ces composés, fonction déprotonable en milieu basique. Les composés sont solubilisés en phase aqueuse basique (pH 14) et les impuretés sont extraites par un mélange hexane/acétate d'éthyle (95 :5, v/v). La phase aqueuse est ensuite acidifiée à pH 3 ce qui provoque la précipitation des hydrochlordécones qui sont finalement extraits par le même mélange organique hexane/acétate d'éthyle. Suite à ces étapes, le monohydrochlordécone A1 est obtenu avec un rendement de 50% (46,4 mg ; 98,3  $\mu$ mol à partir de 100 mg ; 196,8  $\mu$ mol de chlordécone) et les composés A2 et A3 issus de la même transformation sont obtenus avec des rendements de 10 et 12% respectivement (3,2 mg ; 56,8  $\mu$ mol de A2 et 3,5 mg ; 8,0  $\mu$ mol de A3 à partir de 35 mg ; 69,9  $\mu$ mol de chlordécone). A ce stade, les impuretés ne sont plus visibles en RMN. Toutes les données analytiques sont présentées et interprétées pour les trois hydrochlordécones au chapitre 5.

### III. Production et purification des composés de la famille B

#### A. Conditions favorisant l'obtention des polychloroindènes

Parmi toutes les transformations du criblage, celle impliquant le citrate de titane(III) (32,6  $\mu$ mol) et la vitamine B<sub>12</sub> (0,3  $\mu$ mol) est la seule pour laquelle les métabolites B1, B2 et B3 sont sélectivement formés d'après la GC-MS (Tableau 6). Parmi eux, le métabolite B1 apparaît largement majoritaire (Figure 102 et Figure 104). Cette transformation est totale en l'espace de quelques heures. Cependant, de nombreux métabolites C sont aussi détectés en LC-MS (Figure 103).

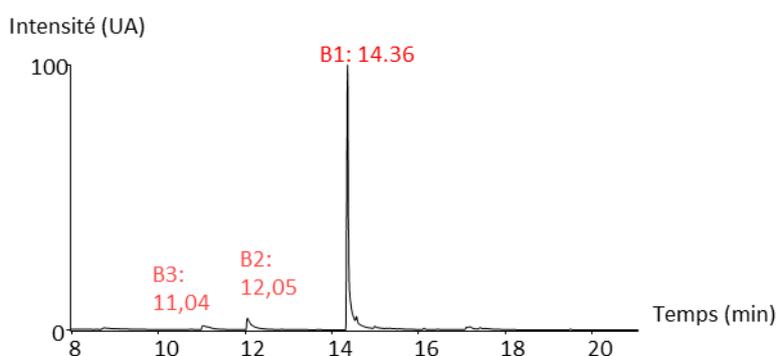


Figure 102 : Chromatogramme GC-MS (méthode longue) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de citrate de titane (III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale).

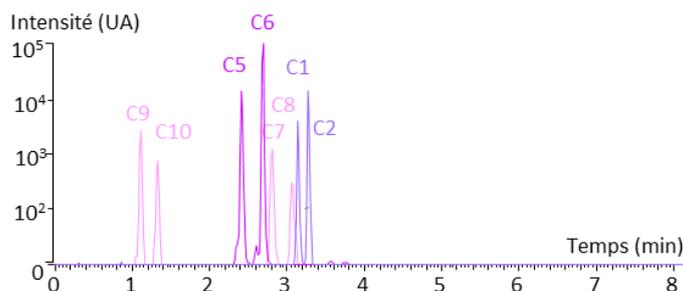


Figure 103 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de citrate de titane(III) après extraction liquide-liquide (2 heures, totale).

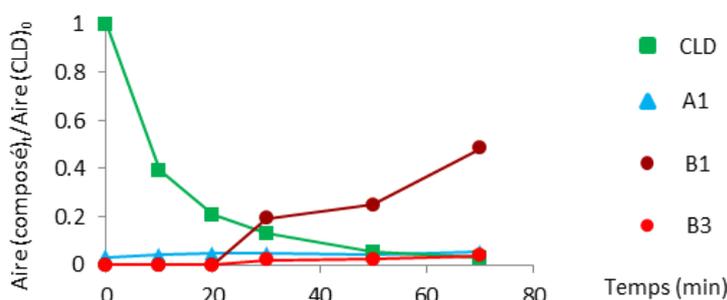


Figure 104 : Suivi quantitatif de la chlordécone et semi-quantitatif du produit de transformation A1 par GC-IRMS au cours de la transformation de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le citrate de titane(III) (2 heures, totale).

## B. Montée en échelle pour la production sélective des polychloroindènes

La transformation de la chlordécone à petite échelle (de 1 à 20 mg de chlordécone) nécessite 0,3 équivalents de vitamine B<sub>12</sub> et 8,4 équivalents de citrate de titane pour permettre une transformation totale de la chlordécone, en moins de deux heures de réaction, avec le métabolite B1 comme produit majoritaire. Des tests à plus grande échelle ont été réalisés sur 100, 200, 400 et 1000 mg de chlordécone. Cependant, avec les mêmes ratios de citrate de titane(III) et de vitamine B<sub>12</sub>, les réactions ne sont plus totales et une nouvelle optimisation est nécessaire.

La vitamine B<sub>12</sub> est supposée jouer un rôle important dans l'orientation de la réaction en favorisant les familles B et C. Comme les profils des produits obtenus apparaissent similaires à toute échelle, le nombre d'équivalents de vitamine B<sub>12</sub> par rapport à la chlordécone n'a pas été modifié. L'optimisation s'est focalisée sur le nombre d'équivalents de citrate de titane(III) à introduire pour atteindre la complétude de la réaction. Des expériences avec ajouts successifs de réducteur jusqu'à consommation totale de chlordécone ont permis de déterminer la quantité

requis de citrate de titane(III) pour chaque échelle. Les transformations ont ensuite été répétées avec la quantité de citrate de titane(III) optimisée mais introduite en une fois au démarrage de la réaction afin de valider les nouvelles conditions opératoires. Pour une même quantité de chlordécone à transformer, une modification du milieu réactionnel par ajout de méthanol (rapport final du mélange eau/méthanol 3 :1 v/v) a permis de diminuer de moitié la quantité de citrate de titane(III) nécessaire à la transformation totale de la chlordécone et d'améliorer la robustesse de la réaction. Le Tableau 7 présente pour chaque quantité de chlordécone à transformer, les conditions nécessaires avec et sans méthanol pour obtenir une transformation totale, rapide (durée inférieure à deux heures) couplée à la production majoritaire des composés B1, B2 et B3. Des conditions impliquant des quantités supérieures de citrate de titane (III) (32,6 éq.) ont été réalisées pour une masse de chlordécone comprise entre 1 et 20 mg et permettent aussi la transformation totale de la chlordécone avec un profil de métabolites produits similaires, en 1 à 2 heures. Le tableau présenté ici présente le nombre d'équivalents minimum à introduire pour obtenir une transformation totale et rapide de la chlordécone pour produire les métabolites B1, B2 et B3 majoritairement.

Tableau 7 : Equivalents de citrate de titane(III) nécessaire pour la transformation totale de la chlordécone en composés B1, B2 et B3.

	chlordécone à transformer		
masse (mg)	1-20	200	400-1000
quantité (mmol)	0,002-0,04	0,4	0,8-2
	Equivalents de citrate de titane nécessaires		
dans l'eau (pH 12)	8,4	16,3	-
dans eau (pH 12)/méthanol 3 :1	8,4	8,4	32,6

### C. Extraction des polychloroindènes

La purification des trois composés a été développée à partir de celle opérée sur le milieu de culture microbiologique (Chapitre 3). Le mélange issu du milieu de culture contenait du soufre colloïdal résultant de l'oxydation du sulfure de sodium présent comme réducteur, qui éluait avec le métabolite B3 et n'avait pas permis la purification de ce dernier. L'utilisation du citrate de titane(III) et de la vitamine B<sub>12</sub> rend le milieu réactionnel exempt du soufre colloïdal et

écarter le problème de co-élution avec le composé B3. Le protocole précédemment employé pour les hydrochlorodécones (acidification puis extractions multiples à l'aide de DCM) conduit à une phase organique complexe contenant les chloroindènes ciblés mais aussi la famille C de composés polaires et des traces de chlordécone, d'hydrochlorodécones et d'autres impuretés non chlorées. Une alternative est l'utilisation de pentane comme solvant d'extraction, beaucoup moins polaire que le DCM, sans étape préliminaire d'acidification. Elle permet d'obtenir une phase organique contenant les composés cibles avec beaucoup moins d'autres espèces chimiques permettant ainsi d'éviter l'étape de séparation des différentes familles de métabolites chlorés par chromatographie en phase normale sur gel de silice.

#### **D. Séparation par HPLC préparative**

Une nouvelle optimisation des conditions de séparation par chromatographie HPLC préparative a été développée afin de faciliter l'extraction finale des composés. Le mélange eau/acétonitrile a été testé car il permet d'extraire les composés au pentane qui n'y est pas miscible. L'extraction directe permet de s'affranchir de l'étape d'évaporation du mélange méthanol/tétrahydrofurane décrite au Chapitre 3 susceptible de volatiliser une part significative des composés, en particulier B2 et B3.

Afin d'optimiser la séparation des polychloroindènes B1, B2 et B3, l'influence du pourcentage d'acétonitrile dans le cadre d'une méthode isocratique eau/acétonitrile est étudiée en LC-Orbitrap-MS. Des méthodes contenant 65%, 70% et 75% d'acétonitrile sont testées et l'effet sur l'élution des trois composés est présenté en Figure 105. La détection est réalisée en masse (Orbitrap) ainsi qu'à l'aide d'un détecteur UV-visible permettant de déterminer les longueurs maximales d'absorption caractérisant cette famille de composés et ainsi d'optimiser la détection des composés en HPLC préparative. Avec 70% d'acétonitrile, tous les composés sont au moins séparés de deux minutes avec un retour à la ligne de base, ce qui permet d'envisager une séparation correcte à l'échelle préparative. Un pourcentage d'acétonitrile moins élevé, de 65%, permet une meilleure séparation des deux tétrachloroindènes B2 et B3 (Figure 105-c) mais le temps total d'élution se voit très significativement augmenté puisque le temps de sortie du composé B1 dépasse les 35 minutes ce qui est pénalisant en terme de consommation de solvant à l'échelle préparative. La méthode isocratique eau/acétonitrile 30/70 est un compromis satisfaisant pour le passage à grande échelle.

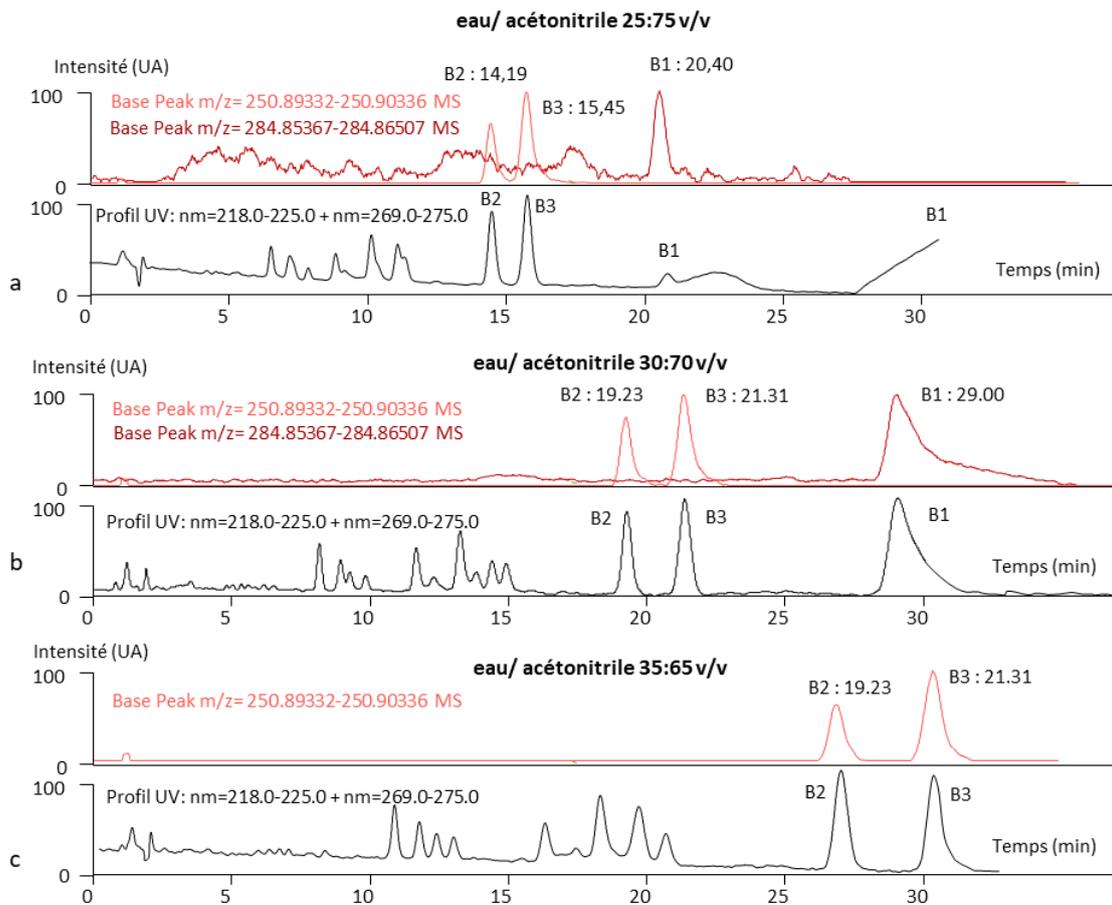


Figure 105 : Profil de séparation des composés B1, B2 et B3 en LC-Orbitrap-MS sur colonne C18 à l'aide d'isocratiques eau/acétonitrile : (a) 25:75, (b) 30:70 et (c) 35:65. Le profil UV aux longueurs d'onde retenues pour le suivi en HPLC préparative est présenté à chaque fois.

Ces conditions ont été appliquées à l'échelle préparative, sur une colonne de type C<sub>18</sub> de 15 cm avec le même isocratique eau/acétonitrile 30:70, à un débit de 25 ml/min. La détection se fait aux UV à  $\lambda=268\text{nm}$  et  $\lambda=225\text{nm}$ . Les composés B1, B2 et B3 produits par voie chimique ont ainsi pu être isolés (Figure 106).

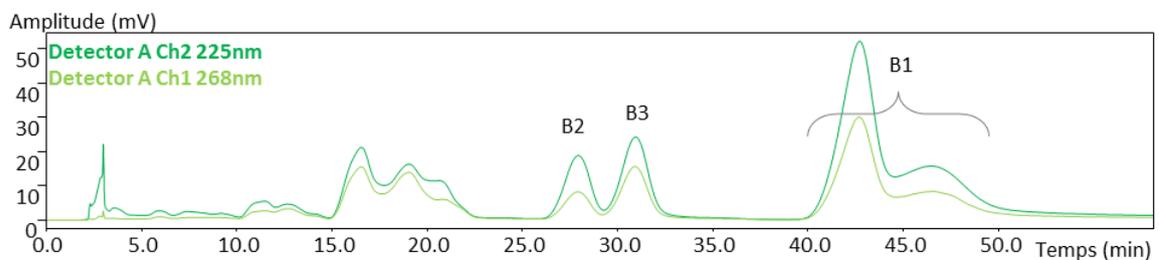


Figure 106 : Purification par HPLC préparative des polychloroindènes sur colonne C18 (isocratique eau/acétonitrile 30 :70 ; débit de 25ml/min ; longueurs d'onde 225 et 268 nm).

## E. Purification finale

De même que pour la purification du métabolite B1 produit par voie microbiologique, une dernière étape de purification par chromatographie en phase normale (gel de silice) est nécessaire pour éliminer les dernières impuretés. A l'issue de la séquence complète de purification, 32,6 mg du composé B1 ( $1,2 \cdot 10^{-4}$  mol) ont été obtenus, à partir de 200 mg de chlordécone ( $4,0 \cdot 10^{-4}$  mol) engagés conduisant à un rendement de 30%. Le composé B2 (3,0 mg ;  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol) et le composé B3 (4,1 mg ;  $1,6 \cdot 10^{-5}$  mol) sont obtenus avec des rendements respectifs de l'ordre de 3% et 4%. Ces valeurs sont tout à fait conformes aux données semi-quantitatives obtenues lors des suivis de réaction (Figure 104).

## IV. Production et purification des composés de la famille C

### A. Conditions favorisant l'obtention des composés polaires

Parmi les transformations chimiques précédemment présentées, les systèmes {vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.), fer zéro valent (398 éq.)} dans eau/acétone 3 :1 et {vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.), citrate de titane(III) (8,4 éq.)} dans l'eau permettent la formation significative des composés polaires. La production sélective et reproductible des métabolites C1 à C4 a été observée avec l'association vitamine B<sub>12</sub> - fer zéro valent. Dans le cas du couple vitamine B<sub>12</sub> - citrate de titane(III), les composés Ci (i = 1 à 6) peuvent être produits mais le profil de produits n'est pas reproductible d'un essai à l'autre et des problèmes de montée en échelle sont anticipés. Afin de cibler au mieux la production des métabolites C1, C2, C3 et C4, nous avons sélectionné la transformation associant la vitamine B<sub>12</sub> avec le fer zéro valent.

### B. Conversion de la chlordécone en composés polaires à grande échelle

La transformation testée sur 5 mg de chlordécone ( $9,8 \cdot 10^{-6}$  mol) a notamment conduit à la formation des composés C1, C2, C3 et C4 en cinq jours. Afin d'obtenir ces composés en plus grandes quantités et de les purifier, nous avons mené des essais à l'échelle de 100 mg de chlordécone. L'influence de la quantité de fer(0) (398, 796 et 1194 éq.) a été testée sur la durée de la transformation et sur les proportions relatives des produits. Les réactions sont lancées sur des volumes de 300 ml dans un mélange eau/acétone 3:1. La vitamine B<sub>12</sub> est maintenue à un ratio de 0,3 équivalents par rapport à la chlordécone. A l'issue de 10 jours de réaction, le profil de produits à grande échelle est le même qu'à petite échelle (Figure 107, Figure 108 et Figure

109). Cependant, les réactions sont plus longues et la transformation de la chlordécone n'est toujours pas complète au bout de dix jours.

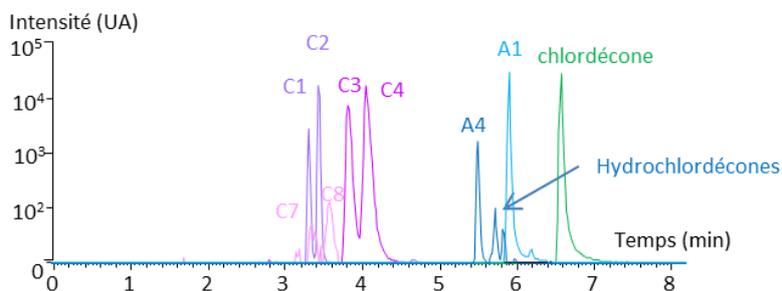


Figure 107 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion  $m/z$  502,68595 vert, ion  $m/z$  468,72488 bleu, ion  $m/z$  434,76280 bleu turquoise, ion  $m/z$  294,88913 violet, ion  $m/z$  260,92827 rose, ion  $m/z$  226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone (100 mg,  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol) en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de fer zéro valent (398 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.

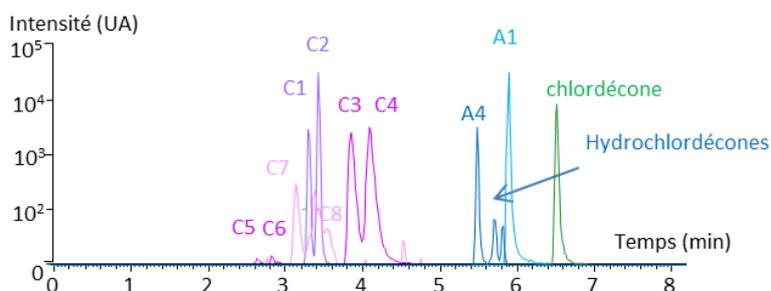


Figure 108 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion  $m/z$  502,68595 vert, ion  $m/z$  468,72488 bleu, ion  $m/z$  434,76280 bleu turquoise, ion  $m/z$  294,88913 violet, ion  $m/z$  260,92827 rose, ion  $m/z$  226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone (100 mg,  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol) en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de fer zéro valent (796 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.

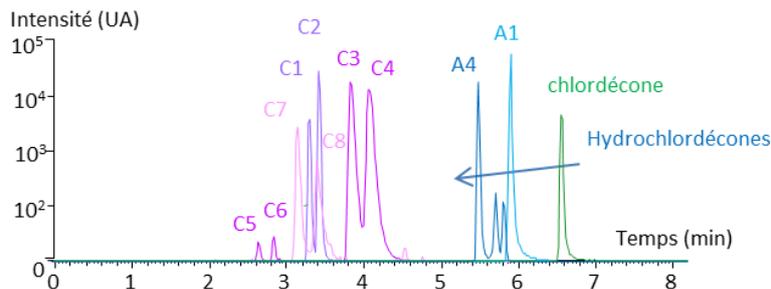


Figure 109 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS (sélection d'ions extraits en mode positif ; code couleur : ion m/z 502,68595 vert, ion m/z 468,72488 bleu, ion m/z 434,76280 bleu turquoise, ion m/z 294,88913 violet, ion m/z 260,92827 rose, ion m/z 226,96715 mauve) du mélange réactionnel issu de la transformation de la chlordécone (100 mg,  $2,0 \cdot 10^{-4}$  mol) en présence de vitamine B<sub>12</sub> et de fer zéro valent (1194 éq.) après extraction liquide-liquide au bout de 10 jours.

Une optimisation plus poussée en variant par exemple les proportions de solvant ou celles de vitamine B<sub>12</sub> pourrait permettre de produire les métabolites polaires à grande échelle en impliquant plusieurs dizaines de milligrammes de chlordécone. Dans un souci d'efficacité, afin d'obtenir les métabolites rapidement et en grande quantité, six transformations de 5 mg de chlordécone ( $9,8 \cdot 10^{-6}$  mol) ont été initiées en parallèle avec 398 équivalents de fer zéro valent et 0,3 équivalents de vitamine B<sub>12</sub>. Comme présenté plus haut, la transformation est totale en cinq jours et les métabolites C1, C2, C3 et C4 sont observés.

### C. Extraction des composés polaires

La production optimale des composés polaires C1, C2, C3 et C4 consiste en la transformation de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> (0,3 éq.) dans un milieu eau/acétone (3 :1, v/v) réduit par le fer zéro valent (398 éq.). La miscibilité de l'eau et l'acétone ainsi que l'acétone avec le DCM ne permettent pas une extraction liquide/liquide optimale du milieu réactionnel. L'évaporation de l'acétone du milieu suivie de l'acidification à pH 1 (HCl) de la phase aqueuse restante permet son extraction par du DCM.

### D. Séparation des composés polaires

A l'issue de l'extraction du milieu réactionnel, l'étape de séparation des familles sur gel de silice n'est pas nécessaire. L'extrait est directement repris dans le mélange initial de purification et les impuretés solides comme le fer zéro valent sont séparées par un filtre à 0,45 nm. Un gradient proche (gradient 3, Chapitre 8 : matériels et méthodes) de celui utilisé pour séparer les métabolites C1 et C2 issus de la production microbologique est appliqué et

permet la séparation des quatre composés polaires majoritaires, observés dans les cultures microbiologiques C1, C2, C3 et C4. D'autres composés polaires C5 et C6, régioisomères de C3 et C4 de formule brute  $C_{10}Cl_3O_2H_5$  ainsi que les composés C7 et C8 encore plus déchlorés ( $C_{10}Cl_2O_2H_6$ ) sont détectés et sortent à des temps de rétention inférieurs aux composés C1 et C2 (Figure 110). Ces isomères ne sont pas observés dans les cultures microbiologiques.

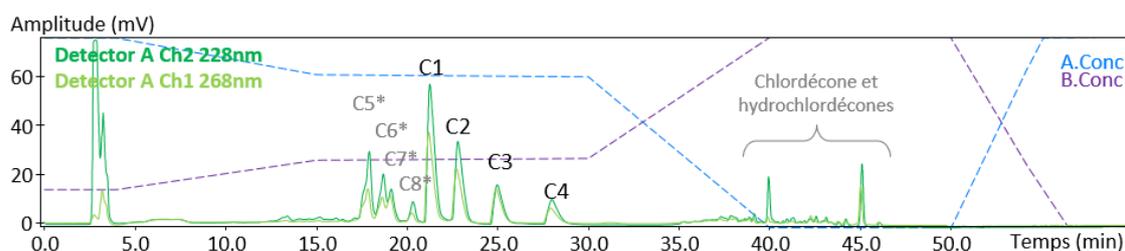


Figure 110 : Purification par HPLC préparative des composés polaires  $C_i$  ( $i=1$  à 8) sur colonne C18 (gradient 3 ; longueurs d'onde 228 et 268 nm). \* indique les composés non présents dans les transformations par voie microbiologique.

L'ensemble des composés majoritaires  $C_i$  ( $i = 1$  à 8) n'ont pu être que partiellement séparés : de même que lors de la séparation des métabolites C1 et C2 (Chapitre 3), chacune des fractions contient en fait des paires de composés (C1 et C2, C3 et C4, C5 et C6, C7 et C8) en proportions non corrélées avec les composés ciblés. Les analyses réalisées sur chaque fraction ainsi que l'hypothèse d'isomérisation proposée seront développées au Chapitre 5. Pour chaque couple de composés, les fractions les contenant sont réunies et l'acétonitrile est évaporé. La phase aqueuse tamponnée restante est acidifiée à pH 1 et les composés sont extraits au DCM.

### E. Purification finale

Des analyses par RMN ont montré la présence d'impuretés résiduelles. Les composés sont solubilisés dans un tampon carbonate de potassium à pH 10. Un lavage est réalisé au pentane puis la phase aqueuse est acidifiée à pH 2 (HCl) et extraite au pentane. Pour chaque fraction récoltée, une masse comprise entre 1 et 2 mg a été obtenue. Les analyses ultérieures par RMN montrent encore la présence d'impuretés. Une étape supplémentaire de séparation devra être développée pour permettre l'obtention des composés polaires exempts de toute impureté.

## Conclusion

En conclusion, la vitamine B<sub>12</sub> associée au sulfure de sodium, au citrate de titane et au fer zéro valent a permis de favoriser la production de métabolites des familles A, B et C respectivement. Pour la synthèse des composés A2 et A3, la voie photochimique a été retenue. De même que la vitamine B<sub>12</sub>, l'hématine associée à ces catalyseurs a aussi permis la transformation totale de la chlordécone, avec des durées de réaction similaires. Cependant, les produits de transformations détectés ne sont pas semblables à ceux observés en transformation microbiologiques. Cette meilleure correspondance de la vitamine B<sub>12</sub> en conditions biomimétiques peut s'expliquer par la présence, dans le génome de *Citrobacter*, de la voie de synthèse complète de la vitamine B<sub>12</sub> ainsi que de la présence d'enzymes dépendantes à la vitamine B<sub>12</sub> (Chaussonnerie *et al.*, 2016). Les conditions impliquant l'hématine n'ont donc pas été retenues pour cette étude. Cependant, d'autres composés proches comme des hydrochlordécones, des tétra- et tri-chloroindènes ont été détectés. La production à grande échelle de ces composés, suivie de leur purification pourrait permettre de constituer une bibliothèque de standards. Cela pourrait faciliter l'étude structurale des métabolites en tant que références en RMN, pour les polychloroindènes très peu évoqués dans la littérature (Chiba *et al.*, 2009) et l'exploration des voies mécanistiques en investiguant l'implication des molécules de référence comme intermédiaire ou non en vue de former les métabolites observés lors des transformations microbiologiques.

Des protocoles opérationnels de purification des différents composés ont été développés. Impliquant plusieurs étapes ils ont permis d'obtenir les composés A1, A2, A3, B1, B2 et B3 purs. Le cas particulier du composé B3 sera développé plus en détails au chapitre 5. Des fractions très enrichies en paires de composés polaires C<sub>i</sub> (i = 1 à 8) ont été obtenues mais une étape de purification supplémentaire est encore nécessaire.

Les conditions de formation retenues pour chaque composé, ainsi que l'ensemble des étapes de purification nécessaires sont résumées en Figure 111.

Transformation chimique

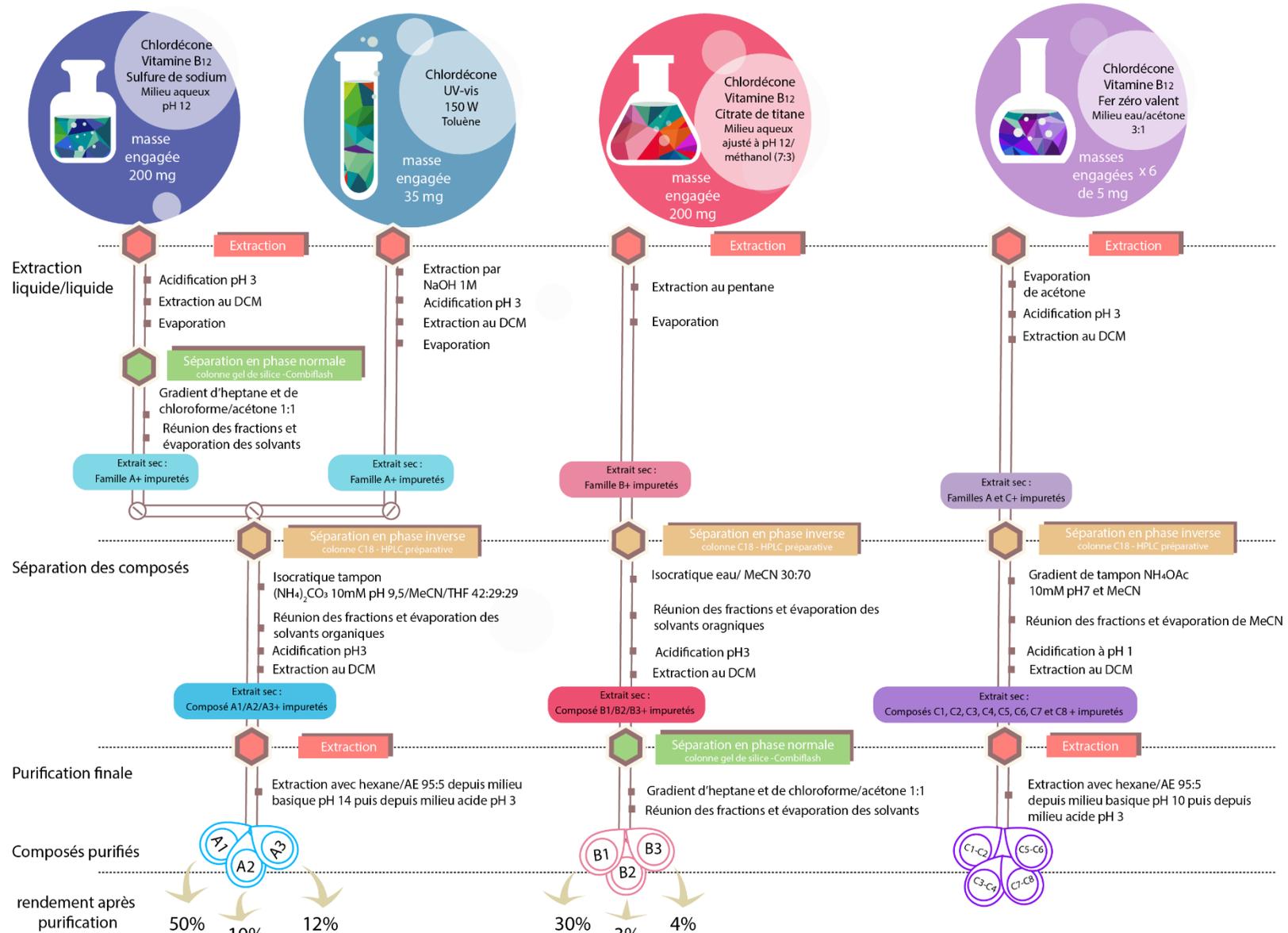


Figure 111 : Schéma récapitulatif de la production et la purification optimisées des composés A1-3, B1-3 et C1-8.

## **Chapitre 5 : Elucidation structurale des composés observés au cours des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone**

---

---

## **Introduction**

L'élucidation structurale des métabolites détectés suite à la transformation bactérienne de la chlordécone consiste à établir la structure chimique exacte de ces métabolites identifiés et caractérisés préalablement par leur formule brute et leur fragmentation en spectrométrie de masse. Que ce soit par de futures études de modélisation moléculaire (collaboration avec Gilles Frison, Ecole Polytechnique et Eddy Elisée, Institut de Chimie des Substances Naturelles) ou par des expériences de reconstruction de voies métaboliques à l'aide des métabolites purifiés (Chapitre 6), la structure exacte des composés doit être connue pour envisager les différentes étapes des mécanismes impliqués. La transformation de la chlordécone par les consortia bactériens 86 et 92 ainsi que les bactéries isolées *Citrobacter* 86-1 et 92-1 n'a pour l'instant pas de vocation d'outils de bioremédiation. La disparition totale de la chlordécone en présence de bactéries est cependant observée pour la première fois et comprendre ces mécanismes de transformation pourra permettre de favoriser la transformation de la chlordécone dans des conditions adaptées au terrain via les différentes stratégies de bioremédiation connues (bioaugmentation ou biostimulation) (Clermont *et al.*, 2015).

Disposer de la structure chimique des molécules étudiées est aussi un outil précieux pour réinvestiguer les travaux antérieurs du domaine (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978).

## I. Elucidation structurale complète des hydrochlorodécones : attribuer la position des atomes d'hydrogène et de chlore sur la structure bishomocubane

Dans les solvants organiques, la chlordécone et ses dérivés hydro- apparaissent sous la forme gem-diol qui présente deux protons, ce qui facilitera leur étude par RMN.

### A. Elucidation structurale du métabolite A1

Comme présenté au chapitre 2, le métabolite A1 est un monohydrochlorodécone dont le proton serait porté par les atomes de carbone 9 ou 10 de la structure bishomocubane de la chlordécone. Le composé a été obtenu pur (46,4 mg ;  $9,8 \cdot 10^{-5}$  mol) depuis la production par voie chimique (Chapitre 4).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du métabolite A1 présente deux signaux caractéristiques (Figure 112). Le singulet à 3,7 ppm qui intègre pour deux protons correspond au signal des protons  $\text{H}_b$  des fonctions hydroxyle de la chlordécone sous forme gem-diol. Le singulet à 4,5 ppm qui intègre pour un proton correspond au proton dont on recherche la position (9 ou 10).

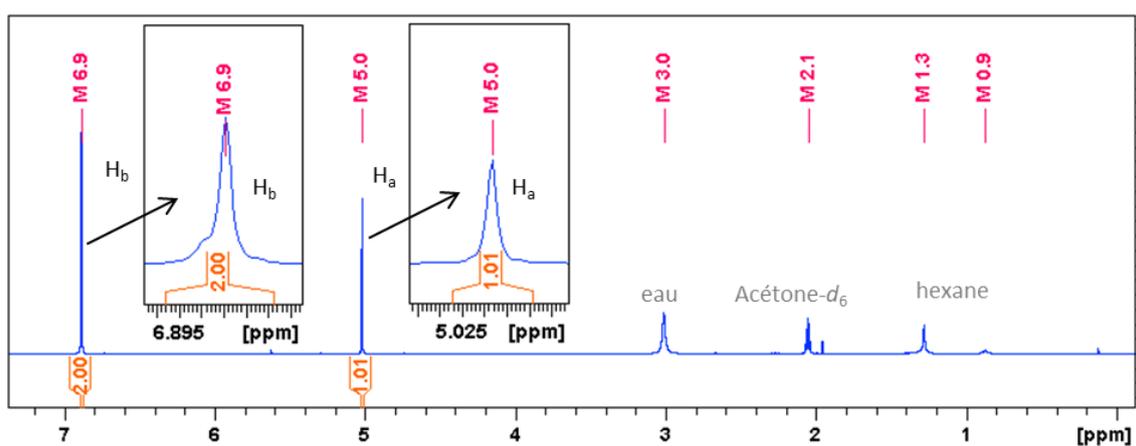


Figure 112 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du métabolite A1 (acétone- $d_6$ , 300 MHz.)

A ce stade, le spectre du proton ne peut cependant pas nous permettre de trancher entre le 9- ou le 10-monohydrochlorodécone.

Une étude approfondie des éléments de symétrie de ces deux monohydrochlorodécone a été réalisée afin d'interpréter au mieux les données de RMN  $^{13}\text{C}$  recueillies.

Le 9-monohydrochlorodécone a un plan de symétrie transverse qui rend les atomes de carbone 2 et 7, et 3 et 8 respectivement équivalents. On attend donc théoriquement huit signaux en RMN  $^{13}\text{C}$ . Le même raisonnement est appliqué au 10-monohydrochlorodécone. Son plan de symétrie longitudinal

rend les atomes de carbone 1 et 9, 2 et 3, 4 et 6, et 7 et 8 respectivement équivalents (Figure 113). On attend théoriquement 6 signaux en RMN  $^{13}\text{C}$ .

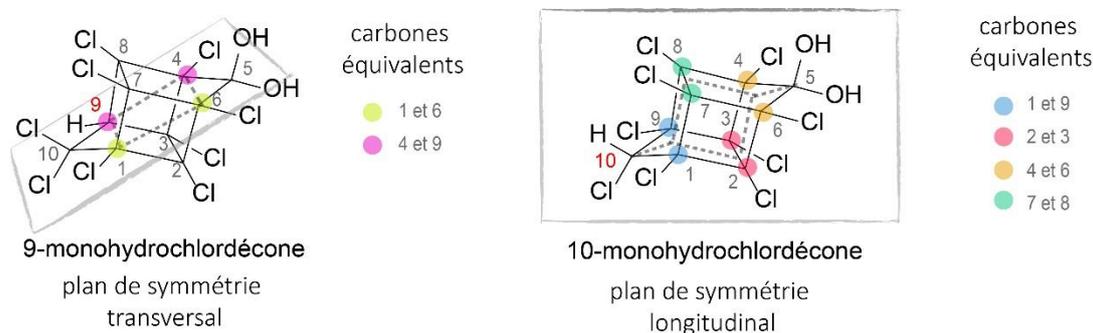


Figure 113 : Plans de symétrie et atomes de carbone équivalents des 9- et 10-monohydrochlorodécones. Les atomes de carbone auréolés d'une même couleur sont attendus équivalents en RMN  $^{13}\text{C}$ .

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du métabolite A1 est réalisé dans l'acétone- $d_6$ . On observe six signaux caractéristiques pour le métabolite A1, en plus des signaux dus au solvant (Figure 114).

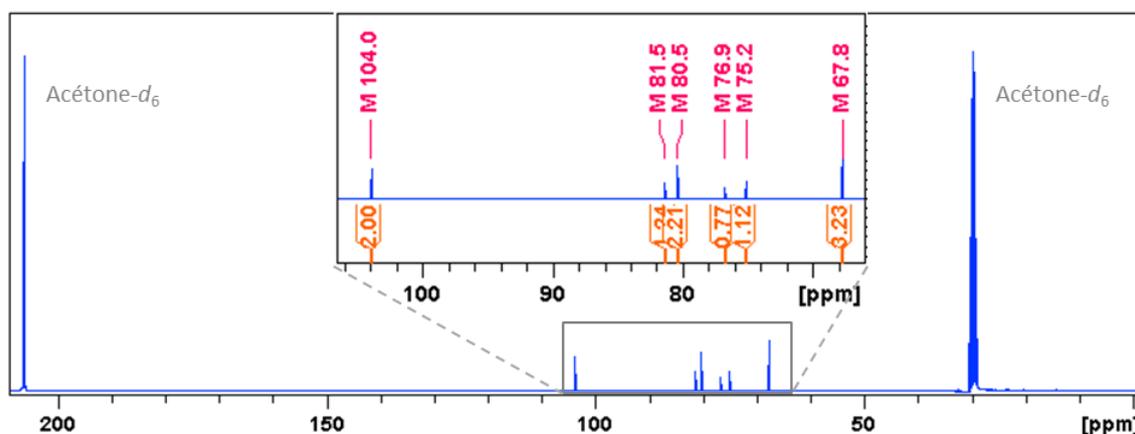


Figure 114 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du métabolite A1 (acétone- $d_6$ , 75 Hz).

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  indique clairement que le métabolite A1 est le 10-monohydrochlorodécone (Figure 115). Des expériences RMN bidimensionnelles permettant de voir les corrélations entre protons à courte distance ( $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ ), avec l'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) nous permet d'identifier l'atome de carbone portant le proton en position 10 au déplacement chimique 67,8 ppm (Figure 116).

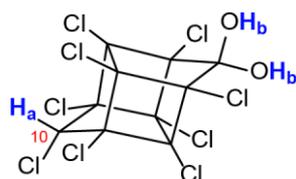


Figure 115 : Structure 10-monohydrochlorodécane du métabolite A1.

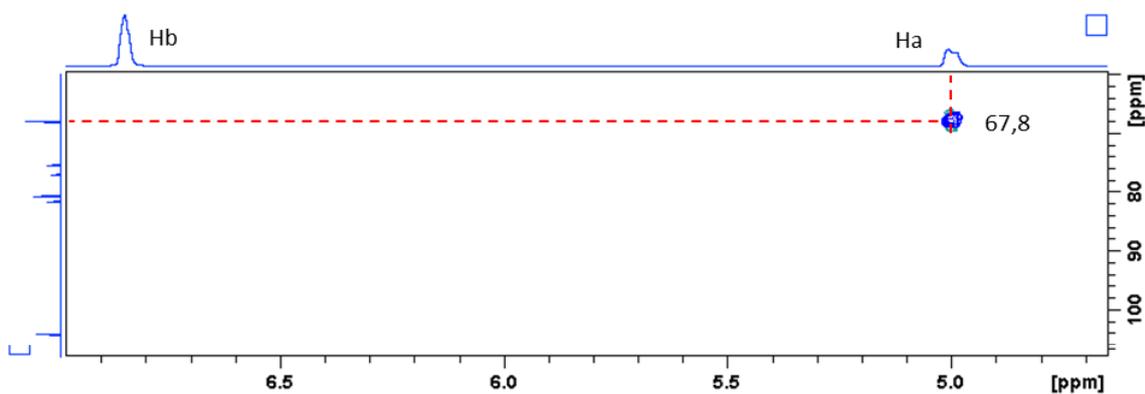


Figure 116 : Analyse bidimensionnelle HSQC du métabolite A1 (acétone- $d_6$ ).

L'analyse bidimensionnelle HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet d'identifier les corrélations entre protons et les noyaux des atomes de carbone à plus longues distances ( $^2J_{C-H}$  et  $^3J_{C-H}$ ) (Figure 117).

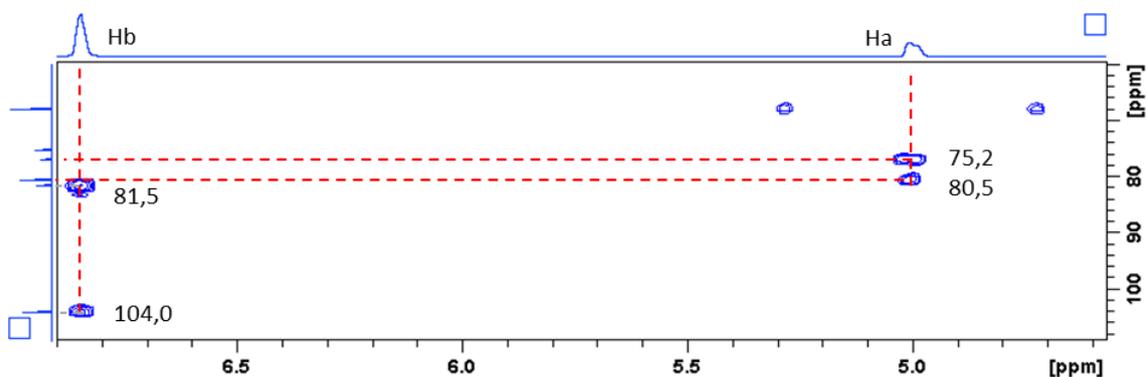


Figure 117 : Analyse bidimensionnelle HMBC du métabolite A1 (acétone- $d_6$ ).

Les corrélations entre les protons Hb de la fonction gem-diol et les atomes de carbone les plus proches permis d'identifier les atomes de carbone C5 au déplacement chimique de 104,0 ppm et les atomes de carbone C4 et C6 à 81,5 ppm. Le proton Ha est couplé ( $^1J_{C-H}$ ) avec l'atome de carbone C10 à 67,8 ppm. L'attribution des déplacements chimiques aux autres atomes de carbone de la structure a été réalisée par l'analyse des rapports d'intégration du spectre  $^{13}C$  du composé A1. Les atomes de carbone des pointes de la structure (positions 5 et 10) portent une fonction gem-diol et un proton respectivement, ce qui explique leur plus grande intégration. En revanche, les intégrations des signaux

des quatre paires des atomes de carbone aux positions 1 et 9, 2 et 3, 4 et 6, 7 et 8 devraient être équivalentes. On remarque que le signal à 80,5 ppm a une valeur d'intégration environ deux fois supérieures à celle des trois autres signaux. Cette observation indiquerait un couplage  $^2J_{C-H}$  entre le proton  $H_a$  et les atomes de carbone en position 9 et 10. En effet, le couplage avec le proton  $H_a$  diminuerait le temps de relaxation et augmenterait ainsi l'intensité du pic. Un deuxième couplage est observé entre le proton  $H_a$  et une paire d'atomes de carbone de la structure. D'après la structure de la molécule, seule un couple  $^3J_{C-H}$  est possible. Une structure en « W » serait favorable à ce couplage et justifierait l'attribution des signaux présentée en Figure 118. De plus, les déplacements chimiques attribués aux atomes de carbone de la chlordécone par Wilson et Zehr (Wilson & Zehr, 1979), les quatre atomes de carbone équivalents (positions 2, 3, 7 et 8) sont moins déblindés que les atomes de carbone aux positions 1, 4, 6 et 9.

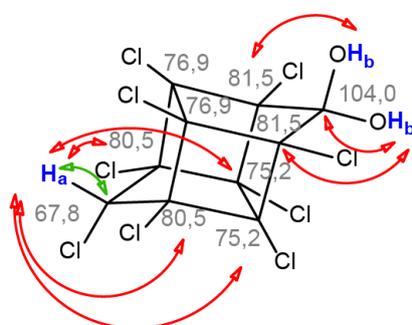


Figure 118 : Structure 10-monohydrochlordécone du métabolite A1 et corrélations à courte distance (vert) et longue distance (rouge) entre atomes de carbone et protons.

## B. Confirmation de la structure 8-monohydrochlordécone pour le métabolite A2

D'après les analyses en LC-Orbitrap-MS, et GC-MS, le métabolite A2 est le 8-monohydrochlordécone. Des données RMN ont été publiées (Wilson & Zehr, 1979) sur cette même molécule, ce qui nous permet de confronter nos données à ces travaux. Les protons de la fonction gem-diol ne perçoivent pas l'environnement de la même façon et donnent chacun un singulet  $H_b$  et  $H_b'$ .

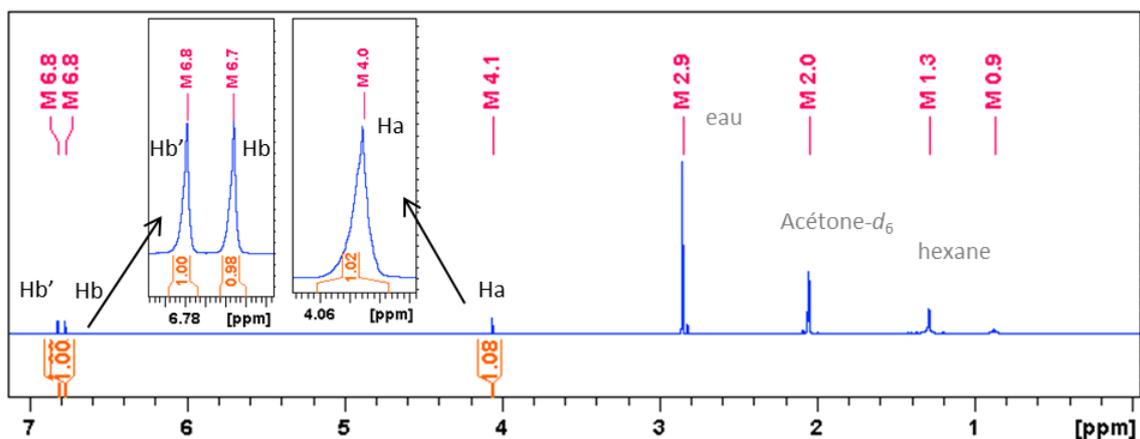


Figure 119 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé A2 (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

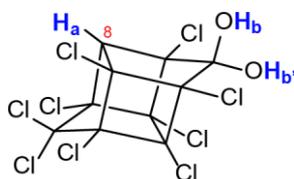


Figure 120 : Structure 8-monohydrochlorodécone du composé A2. Les protons Hb et Hb' sont positionnés arbitrairement.

L'expérience RMN  $^{13}\text{C}$  a permis de distinguer les 10 pics correspondant aux atomes de carbone du métabolite A2 (Figure 121). Les déplacements chimiques observés sont cohérents avec ceux décrits antérieurement (Wilson & Zehr, 1979). Le déplacement chimique caractéristique de l'atome de carbone qui porte la fonction gem-diol permet de l'identifier à 104,0 ppm. On remarque que les signaux ont des intensités différentes : le pic à 60,4 ppm est le plus intense et porterait le proton Ha. Les trois pics à 69,5 ppm, 74,5 ppm et 78,7 ppm sont plus intenses que les cinq pics à 76,3 ppm, 78,8 ppm, 81,2 ppm, 84,9 ppm et 93,6 ppm.

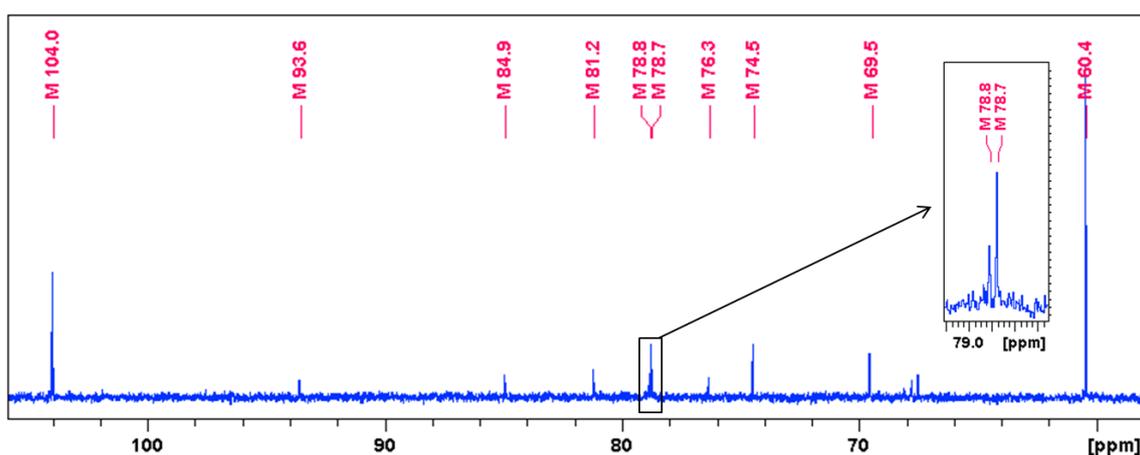


Figure 121 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A2 (acétone- $d_6$ , 150 MHz).

Des analyses complémentaires bidimensionnelles en HMBC et HSQC permettent de confirmer que l'atome de carbone dont le déplacement chimique est de 60,4 ppm est celui qui porte le proton Ha d'après la tache de corrélation observée sur le spectre de l'analyse HSQC (Figure 122-a). Les corrélations  $J_{C-H}$  à plus longue distance sont observées sur le spectre de l'analyse HMBC entre le proton Ha et les atomes de carbone aux déplacements chimiques 69,5 ppm, 74,5 ppm et 78,7 ppm ainsi qu'entre les protons Hb et Hb' et les atomes de carbone aux déplacements chimiques 74,5 ppm, 81,2 ppm et 104,0 ppm (Figure 122-b).

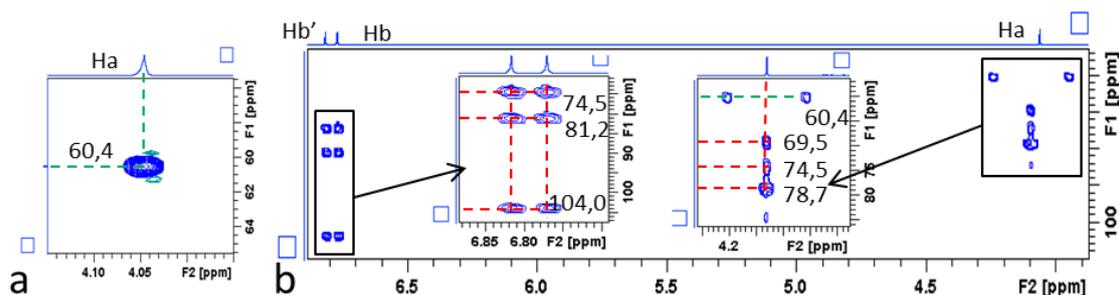


Figure 122 : Analyses bidimensionnelle HSQC (a) et HMBC (b) du métabolite A2 (acétone- $d_6$ ) ; couplages directs (verts) et couplages indirects (rouge).

Le noyau de l'atome de carbone à 74,5 ppm est couplé avec les protons Ha, Hb et Hb' et la position 4 de la structure (nomenclature IUPAC) permettrait ces corrélations. L'atome de carbone à la pointe portant deux atomes de chlores a un déplacement chimique particulier et correspond au signal à 93,6 ppm. Les déplacements chimiques des autres atomes de carbone de la structure ont été attribués d'après les valeurs de déplacements chimiques des atomes de carbone de la chlordécone (Wilson & Zehr, 1979) pour lesquels les atomes de carbones aux positions 2, 3, 7 et 8 sont moins déblindés que ceux aux positions 1, 4, 6 et 9. Ainsi, les informations précédemment détaillées sont résumées sur la Figure 123.

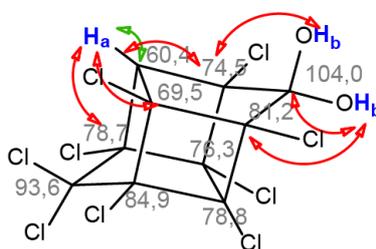


Figure 123 : Structure 8-monohydrochlordecone du métabolite A2 et corrélations à courte distance (vert) et longue distance (rouge) entre atomes de carbone et protons. Les protons Hb et Hb' ne sont pas distingués.

Les attributions des déplacements chimiques des atomes de carbone du métabolite A2 (8-monohydrochlorodécone) ne sont pas toutes en concordance avec l'attribution proposée par Wilson et Zehr (Wilson & Zehr, 1979). Le tableau suivant (Tableau 8) résume la comparaison réalisée entre les attributions réalisées antérieurement (Wilson & Zehr, 1979) et nos données.

Tableau 8 : Comparaison des déplacements chimiques des atomes de carbone du métabolite A2 avec ceux décrits par Wilson *et al.* (Wilson & Zehr, 1979) sur le composé identifié comme le 8-monohydrochlorodécone (5b-monohydrochlorodécone).

Wilson (ppm) – 8-monohydrochlorodécone (dans le benzène- <i>d</i> <sub>6</sub> )									
68,9	75,9	102,4	73,1	78,4	80,0	93,0	84,5	78,2	59,8
Métabolite A2 (dans l'acétone- <i>d</i> <sub>6</sub> )									
69,5	76,3	104,0	74,5	78,8	81,2	93,6	84,9	78,7	60,4
Position de l'atome de carbone									
Nomenclature CAS (Wilson) (Wilson & Zehr, 1979)									
1	1a	2	3	3a	4	5	5a	5b	6
Nomenclature IUPAC correspondante									
3	4	5	6	7	1	10	9	8	2
Nomenclature IUPAC correspondante à l'attribution pour le métabolite A2									
7	3	5	4	2	6	10	1	9	8

L'attribution des déplacements chimiques des travaux antérieurs (Wilson & Zehr, 1979) se fait selon la correspondance entre les nomenclatures de numérotation des atomes de carbone IUPAC et CAS (Figure 124).

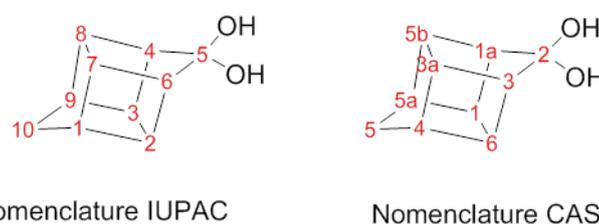


Figure 124 : Nomenclatures de numérotation des atomes de carbone de la structure bishomocubane de la chlordécone.

### C. Elucidation structurale du métabolite A3

Le spectre RMN <sup>1</sup>H du métabolite A3 (Figure 125) présente deux signaux pour les quatre protons portés par la structure. Les protons sont donc équivalents deux à deux ce qui signifie que la molécule possède un élément de symétrie. Parmi les cinq structures de dihydrochlorodécones possibles sur la base des données de fragmentation en spectrométrie de masse proposées au chapitre 2 (i.e. avec les protons en positions (4,10), (4,9), (6,9), (3,8) et (2,8)), seule une peut avoir un élément de symétrie. Il s'agit du 2,8-dihydrochlorodécone dont la structure a un axe de rotation (C1) passant par les

atomes de carbone 2 et 8 (Figure 126). Les déplacements chimiques des protons  $H_a$  des composés A2 (4,0 ppm) et A3 (3,9 ppm) sont très proches. Le déplacement chimique du proton  $H_a$  du composé A1 est plus éloigné (5,0 ppm).

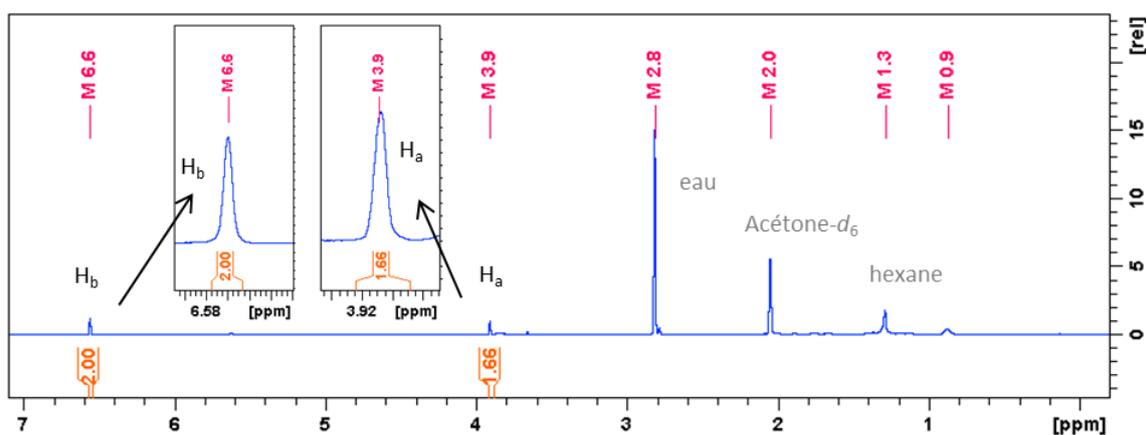


Figure 125 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé A3 (acétone- $d_6$ , 150 MHz).

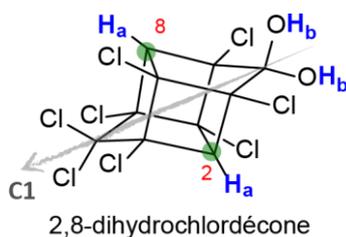


Figure 126 : Axe de symétrie  $C_1$  (rotation de  $180^\circ$ ) du 2,8-dihydrochlorodécone rendant les protons portés par les carbones 2 et 8 équivalents.

#### D. Equivalence des spins dans les molécules qui présentent un élément de symétrie

La symétrie d'une molécule se traduit par une équivalence des spins nucléaires en résonance magnétique nucléaire (RMN). Parmi les noyaux chimiquement équivalents, deux types de spins peuvent être distingués : les spins énantiotopiques lorsqu'ils ne s'échangent que par une opération de symétrie et deviennent homotopiques s'ils possèdent en plus une opération d'axe. Ces équivalences existent pour les spins de protons et des noyaux des atomes de carbones  $^{13}\text{C}$ . Dans le cas du métabolite A1, les spins géométriques équivalents des différents carbones symétriques par rapport au plan de symétrie longitudinal sont énantiotopiques. L'axe de symétrie  $C_1$  du métabolite A3 rend les spins des atomes de carbones en position 2 et 8 géométriques équivalents homotopiques. Les spins des protons qu'ils portent ont aussi des spins géométriques équivalents homotopiques, ce qui explique qu'un seul pic ne soit observé sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ .

## II. Elucidation structurale des polychloroindènes

D'après des analyses collectées en LC-Orbitrap-MS, en GC-MS et en spectrophotométrie UV-visible ainsi que le calcul d'insaturations des molécules, les structures ont pu être proposées pour les métabolites B1, B2 et B3. Le métabolite B1 serait un pentachloroindène et les métabolites B2 et B3, des tétrachloroindènes.

Dans la littérature, la structure générique indène a aussi été proposée pour des composés polychlorés issus de transformations chimiques et biologiques de la chlordécone (Jablonski *et al.*, 1996; Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978) présentant des spectres de masse similaires aux métabolites Bi, i = 1, 2, 3. Afin de valider cette structure très différente de celle de la molécule mère non aromatique, il nous a semblé important de réaliser des expériences supplémentaires.

### A. Etude par RMN des chloroindènes : placement des atomes de chlore et des protons du métabolite B1

#### 1. Etude de la structure du métabolite B1 par RMN de routine (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC, HSQC)

La purification du composé B1 issu de la production par voie microbiologique a permis d'en obtenir 3,8 mg ( $1,3 \cdot 10^{-5}$  mol) qui ont pu être étudiés en RMN. Le spectre du proton du composé B1 dans le chloroforme-*d* présente deux signaux caractéristiques (Figure 127). Le spectre <sup>1</sup>H du composé B1 fait apparaître deux types de signaux : un doublet intégrant pour deux protons dans la zone de déplacement chimique des protons allyliques, et un triplet intégrant pour un proton dans la zone de déplacement chimique des protons aromatiques. D'après l'expérience bidimensionnelle COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Figure 128), ces signaux sont couplés. La constante de couplage, mesurée depuis le spectre <sup>1</sup>H est de 1,5 Hz.

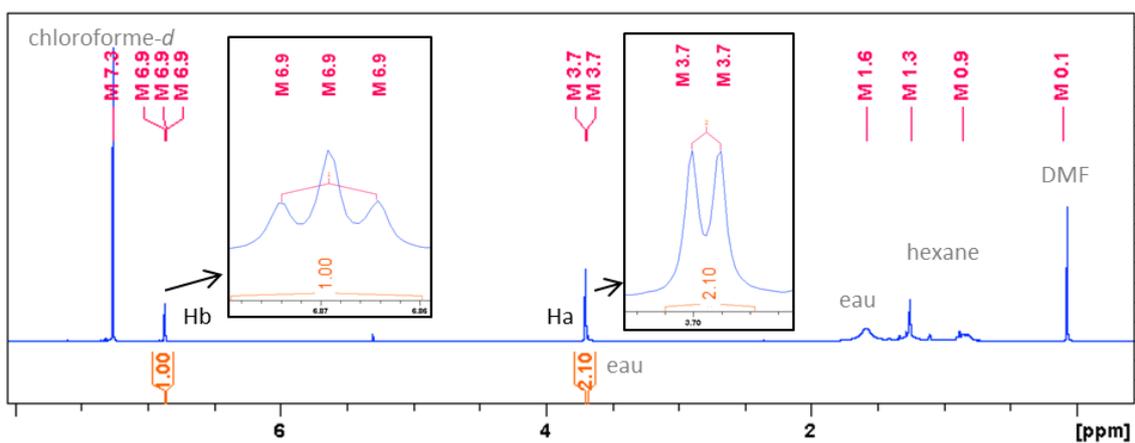


Figure 127 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé B1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz).

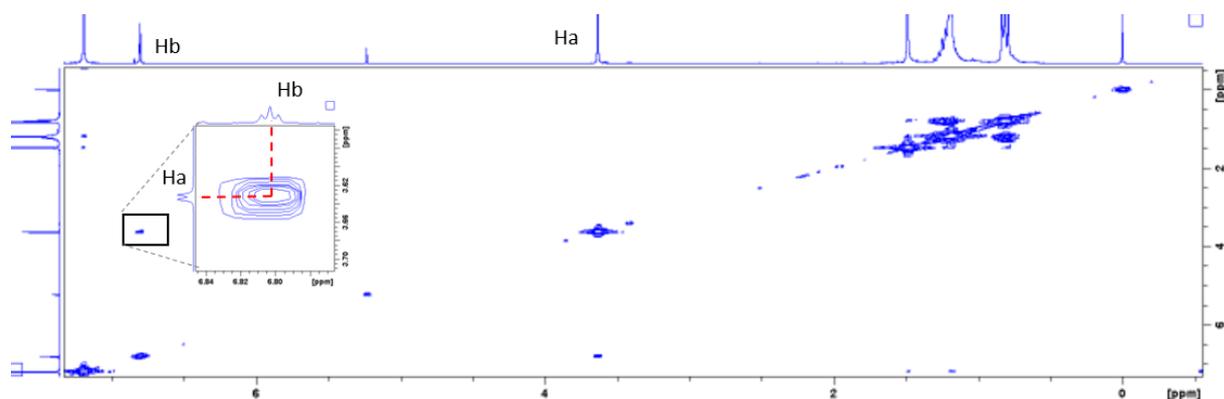


Figure 128 : Expérience bidimensionnelle COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du métabolite B1 ( $\text{CDCl}_3$ )

Le doublet qui intègre pour deux protons ne peut correspondre qu'à deux protons allyliques portés par le carbone 1 de la structure indène (Figure 129).

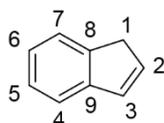


Figure 129 : Numérotation des carbones de la structure indène.

La multiplicité des signaux observés et la valeur de la constante de couplage à 1,5 Hz indiquent une corrélation de type  $^3\text{J}$  ou  $^4\text{J}$  (soit les atomes séparés par respectivement 3 ou 4 liaisons). Trois structures sont alors possibles et présentées en Figure 130.

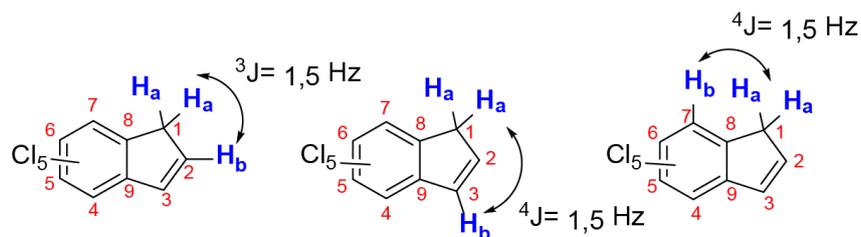


Figure 130 : Structures proposées pour le composé B1.

Afin d'établir la nature de la corrélation ( $^3J$  ou  $^4J$ ), nous avons comparé la valeur de la constante de couplage obtenue à celle des constantes de couplages de l'indène commercial. L'attribution des pics du spectre  $^1H$  a notamment été réalisée avec l'appui de l'interprétation disponible sur la base de données SDBS (SDBSweb). Cependant, les constantes de couplage  $^3J$  et  $^4J$  entre les protons correspondants sont respectivement de 1,9 et 2,0 Hz (Annexe 4) soit du même ordre de grandeur. L'absence de couplage entre les protons portés par le carbone 1 et le proton porté par le carbone 7 nous permet d'éliminer cette structure comme possibilité pour le métabolite B1.

La RMN du carbone présente les 9 pics correspondant aux carbones de la molécule (Figure 131).

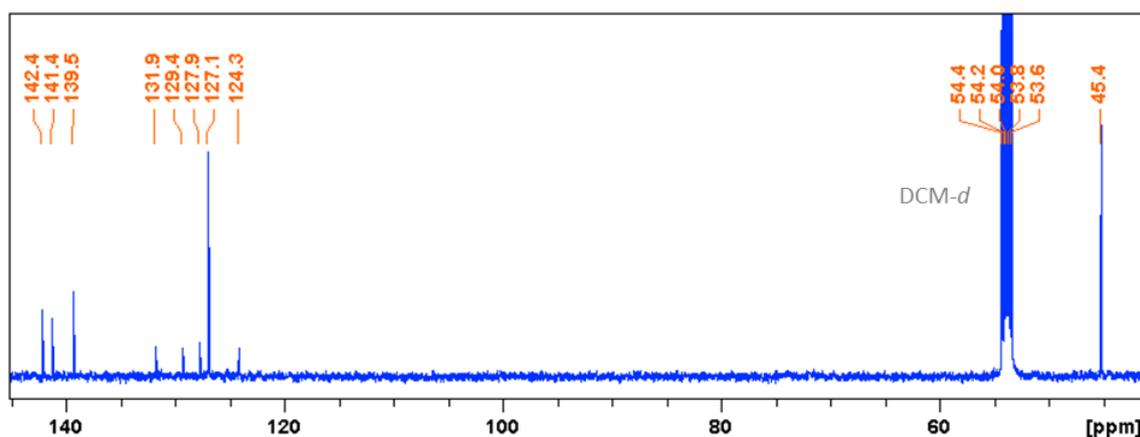


Figure 131 : Spectre RMN  $^{13}C$  du composé B1 ( $CD_2Cl_2$ , 75 MHz)

Une expérience bidimensionnelle HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) permet d'établir les liens directs entre carbones et protons ( $^1J_{H-C}$ ). Le signal à 45 ppm correspond à l'atome de carbone qui porte les deux protons Ha et celui à 127 ppm correspond à l'atome de carbone relié au proton Hb (Figure 132).

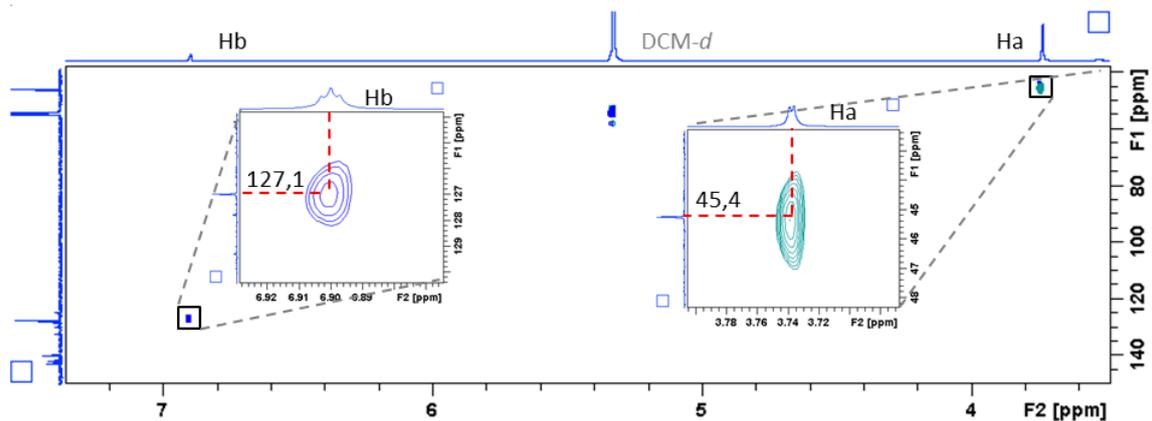


Figure 132 : Expérience bidimensionnelle HSQC du composé B1 (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Bruker, 300 MHz).

L'expérience bidimensionnelle HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy) permet de mettre en évidence les liens entre atomes de carbone et protons à plus longues distances ( $^2J_{C-H}$  et  $^3J_{C-H}$ ) (Figure 133).

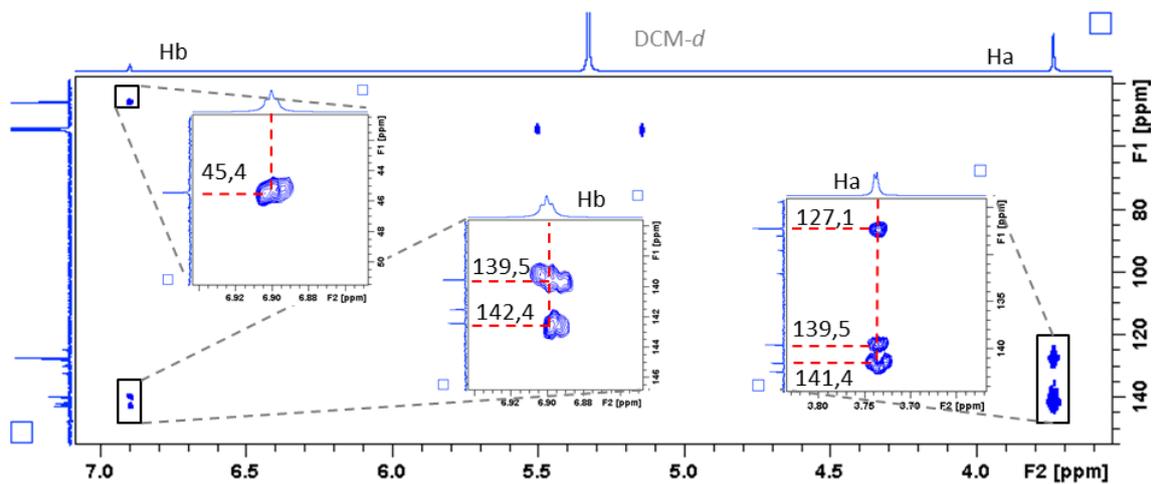


Figure 133 : Expérience  $^{13}C$ - $^1H$  HMBC du composé B1 (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Les informations obtenues sont compatibles avec chacune des deux structures. Des simulations de spectre RMN  $^{13}C$  ont également été réalisées à l'aide de ChemDraw Ultra 13.0®, elles ne permettent cependant pas de lever l'indétermination entre les deux formes (Annexe 5).

A ce stade, nous arrivons à la conclusion que l'ensemble des expériences classiques de RMN obtenues ne permet pas d'élucider complètement la structure du composé B1. Nous nous sommes alors penchés vers des expériences supplémentaires spécifiques du squelette carboné de la molécule afin de déterminer la structure exacte.

## 2. Déchloration du métabolite B1 : validation de la structure indène

Un protocole d'hydrodéphalogénéation a été proposé par Wee et Cunningham (Wee & Cunningham, 2008) impliquant du palladium sur charbon en présence de dihydrogène sur des polychlorobenzènes. Les conditions inspirées de ce protocole ont permis de déchlorer totalement le composé B1 dans un mélange adapté éthanol/THF/eau (35 :15 :2), en produisant un mélange de composés dont l'indane et le *cis*-perhydroindène qui ont été identifiés à l'aide de standards commerciaux en GC-MS (Figure 134, Annexe 1, Annexe 2 et Annexe 3). La détection de l'indène, l'indane et le perhydroindène comme éventuels produits de l'hydrodéphalogénéation a nécessité le développement d'une méthode de séparation analytique en GC-MS et dont les détails sont donnés au chapitre 8.

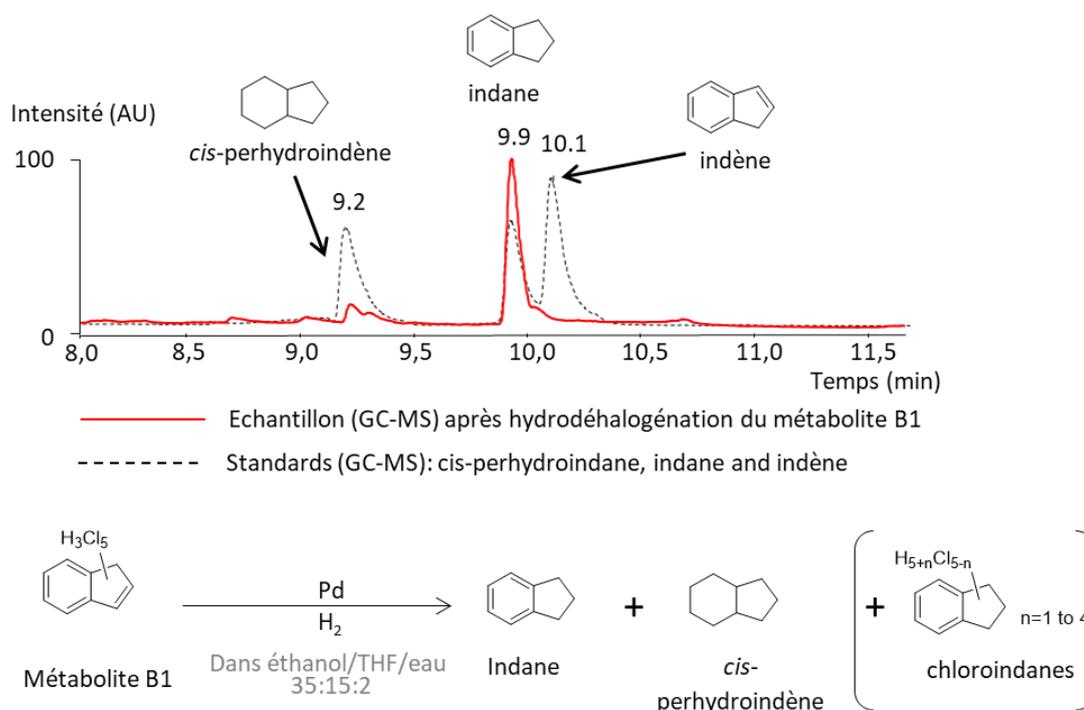


Figure 134 : Analyse GC-MS comparative de la réaction d'hydrodéphalogénéation du composé B1 après extraction et comparaison avec les standards commerciaux correspondants.

Cette expérience nous permet de valider la structure indène du métabolite B1, au cours de transformations par voies chimiques de la chlordécone, supposée aussi par d'autres auteurs dans le cas de transformations chimiques (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978). Pour connaître la structure exacte du composé B1, nous allons chercher à connaître la position des atomes de chlore et

d'hydrogène sur la structure indène. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) s'avère être l'outil de choix.

### 3. Etude de la structure du métabolite B1 par RMN particulières

#### Expérience INADEQUATE

L'expérience bidimensionnelle  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment) permet d'établir les liens entre atomes de carbone directement liés sans ambiguïté. Cependant, pour obtenir une corrélation entre atomes de carbone voisins, il faut que les deux atomes de carbone soient des isotopes  $^{13}\text{C}$ , ce qui représente une probabilité très faible de 0,012%, en tenant compte de l'abondance naturelle faible de l'isotope  $^{13}\text{C}$  (1,1%). En abondance naturelle, une quantité de l'ordre de 100 mg serait nécessaire pour réaliser l'expérience, or en cumulant plusieurs purifications, seuls quelques dizaines de milligramme du métabolite B1 pur pourraient être obtenues. Afin de permettre une détection du métabolite B1, nous l'avons produit à partir de chlordécone uniformément marquée au  $^{13}\text{C}$  sur huit des dix atomes de carbone, d'après les conditions optimales de production décrites dans le chapitre 4. Finalement, 2,7 mg de composé B1 marqué uniformément au  $^{13}\text{C}$  sur environ sept atomes des neuf atomes de carbone ont pu être obtenus après purification par voie chimique.

Les essais, réalisés en collaboration avec Jean-François Gallard (Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), Gif-sur-Yvette) sur un spectromètre RMN 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) se sont avérées fructueuses sur la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$ , pour laquelle 25 mg de produit ont été engagées (voir Annexe 6). Dans le cas du composé B1, la faible quantité de produit s'est avérée un facteur limitant pour la détection fine des signaux. De plus, dans le cas d'un composé enrichi en  $^{13}\text{C}$  tel que  $^{13}\text{C}_7$ -B1, on observe sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  les couplages  $^2J_{\text{C-C}}$  et  $^3J_{\text{C-C}}$  qui se cumulent et conduisent à des signaux compliquant grandement la lecture. Dans ce cas, l'interprétation n'est possible que si le spectre a une très bonne résolution (équipement de très haut champ couplé à un temps d'acquisition long). La trop faible quantité de  $^{13}\text{C}_7$ -B1 n'a pas permis d'obtenir de données INADEQUATE exploitables.

#### Expérience COSY $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$

Une alternative à la séquence INADEQUATE est l'expérience bidimensionnelle COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Appliquée à l'échantillon  $^{13}\text{C}_7$ -B1 sur un spectromètre à 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) durant 9 heures, l'expérience a conduit des signaux faibles, souvent à la limite du rapport signal sur bruit. Leur interprétation directe

a conduit à la structure présentée en Figure 135 (détails en Annexe 7) qui ne correspond pas à la structure indène prouvée par hydrodéphalogenation du composé B1 (Figure 135).

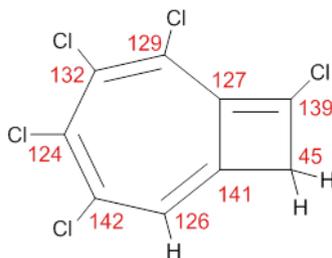


Figure 135 : Structure du composé B1 proposée après interprétation du spectre COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  acquis pendant 9h sur un spectromètre 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Ce résultat erroné illustre la nécessité d'une sensibilité et d'une résolution suffisante pour établir sans ambiguïté la structure d'un composé de ce type.

L'accès à un spectromètre RMN 800 MHz ( $^1\text{H}$ ) a pu être obtenu. Afin d'optimiser l'acquisition, l'analyse a été réalisée en utilisant un mode d'acquisition non uniforme (NUS), qui permet de réduire le nombre de points nécessaires dans la dimension indirecte de l'expérience (F1) (Billeter, 2017). L'approche NUS a permis de réduire le temps d'acquisition sur l'échantillon, initialement prévu de 48 h à 12 h afin de réaliser l'analyse COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  sur le spectromètre 800 MHz (Figure 136).

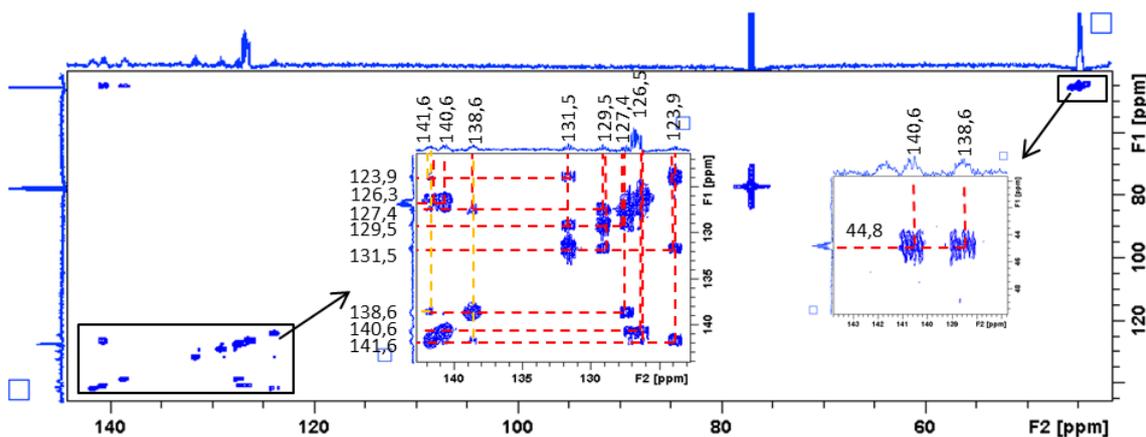


Figure 136 : Spectre COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  du composé  $[^{13}\text{C}]_7$ -B1 (THF- $d_8$ , 800 MHz ( $^1\text{H}$ )).

Le spectre COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  du composé B1 marqué au  $^{13}\text{C}$  présente différentes taches de corrélation sur et hors diagonale comme pour une expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  classique. Pour une lecture plus claire, un tableau récapitulatif des interactions entre atomes de carbone est présenté ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9 : Résumé des carbones directement liés d'après l'interprétation du spectre COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  du composé B1 marqué au  $^{13}\text{C}$ . (Grisé : signal sur la diagonale, x = signal hors diagonale fort, ~ = signal hors diagonale faible).

Déplacement chimique des atomes de carbone (ppm)	141,6	140,6	138,6	131,5	129,5	127,4	126,5	123,9	44,8
44,8		X	X						
123,9	~			X					
126,5	X	X							
127,4			X		X				
129,5				X		X			
131,5					X			X	
138,6	~					X			X
140,6							X		X
141,6			~				X	X	

Les cases grisées correspondent aux signaux sur la diagonale qui traduisent une interaction de chaque atome de carbone. Les croix correspondent aux taches hors diagonale fortes qui traduisent une corrélation  $^1J_{\text{C-C}}$  entre deux atomes de carbone. Les tildes correspondent à des taches hors diagonales faibles qui traduisent cependant aussi des corrélations  $^1J_{\text{C-C}}$  entre atomes de carbone.

Cette expérience a permis d'établir la position relative de chaque atome de carbone et ainsi de tracer le squelette carboné du composé B1 (Figure 137-a). Croisées avec les informations obtenues d'après l'expérience bidimensionnelle HSQC concernant les liens directs entre protons et atomes de carbone, la structure exacte du composé B1 a ainsi été élucidée (Figure 137-b).

D'après la numérotation recommandée pour le noyau indène (Figure 129) le composé B1 a pour dénomination 2,4,5,6,7-pentachloroindène.



Figure 137: (a) reconstruction du squelette carboné du composé B1 à l'aide des données RMN COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ , (b) structure du composé B1.

Finalement, on peut replacer les couplages observés sur les spectres  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC sur la structure élucidée du 2,4,5,6,7-pentachloroindène (Figure 138).

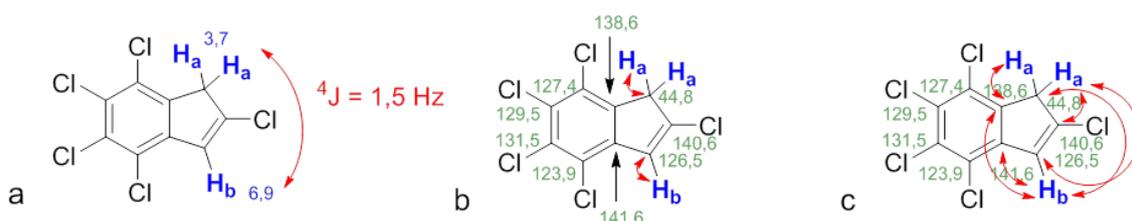


Figure 138 : Structure du composé B1 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , (b) entre les protons et atomes de carbone à courte distance ( $^1\text{J}$ ) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à plus longues distances ( $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$ ) d'après l'analyse HMBC.

## B. Elucidation structurale du métabolite B2

Le métabolite B2 ( $\text{C}_9\text{Cl}_4\text{H}_4$ ) a pu être étudié en RMN après sa purification depuis la transformation chimique de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le citrate de titane (III). 3,0 mg de produit sec ( $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol) ont été utilisés pour les analyses en RMN. D'après les analyses par GC-MS, le métabolite B2 possède les mêmes voies de fragmentation que le métabolite B1. De même, son spectre d'absorption dans l'UV-visible et sa polarité sont très proches du métabolite B1. On part donc du principe qu'il possède le même noyau indène.

Le spectre  $^1\text{H}$  dans le THF- $d_8$  permet d'identifier trois signaux caractéristiques pour B2 : un triplet dans la zone allylique à 3,6 ppm qui intègre pour deux protons (Ha) et deux doublets de triplets intégrant chacun pour un proton, Hb et Hc, dans la zone aromatique à 6,9 ppm et 7,0 ppm respectivement (Figure 139). L'expérience bidimensionnelle COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet d'observer une corrélation entre les deux doublets de triplets des (Hb et Hc) ainsi qu'entre chaque doublet de triplets et le triplet allylique (Ha) (Figure 140). D'après la RMN  $^1\text{H}$ , la constante de couplage entre les protons aromatiques Hb et Hc est de 5,6 Hz et chaque proton Hb et Hc couple avec le proton Hc avec une constante de 1,8 Hz.

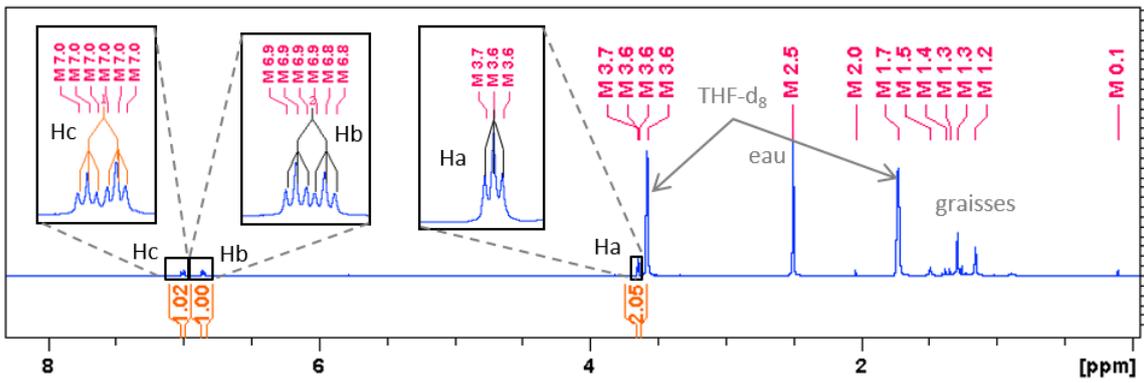


Figure 139 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé B2 (THF- $d_8$ , 600 MHz).

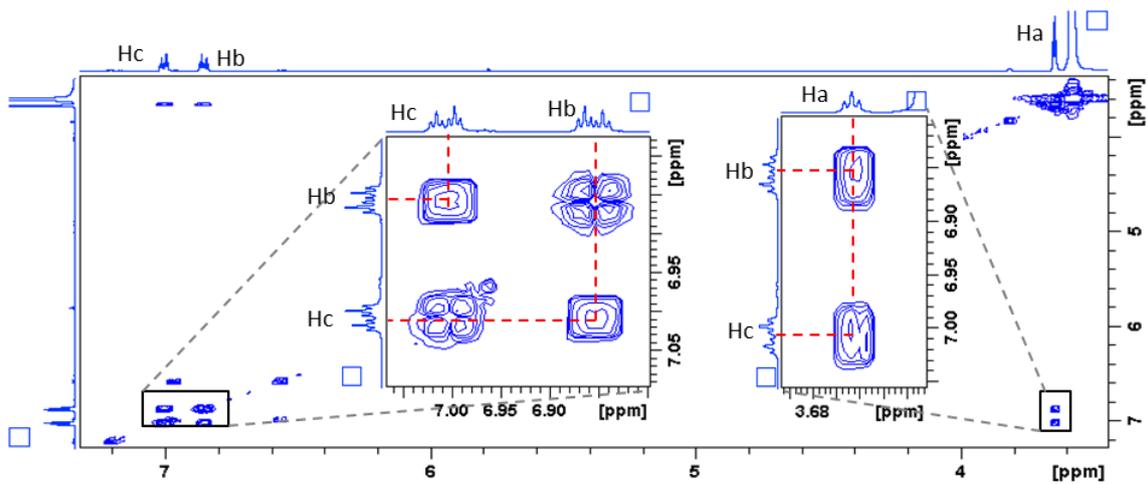


Figure 140 : Spectre RMN de l'analyse bidimensionnelle  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé B2.

Le grand nombre de multiplets et les valeurs de constantes de couplage de 5,6 Hz e 1,8 Hz laissent penser que les protons sont proches et seraient dans ce cas tous disposés du même côté de la molécule, sur le cycle à 5 carbones.

La faible quantité de produit n'a pas permis d'observer tous les signaux des atomes de carbone du métabolite B2 (Figure 141).

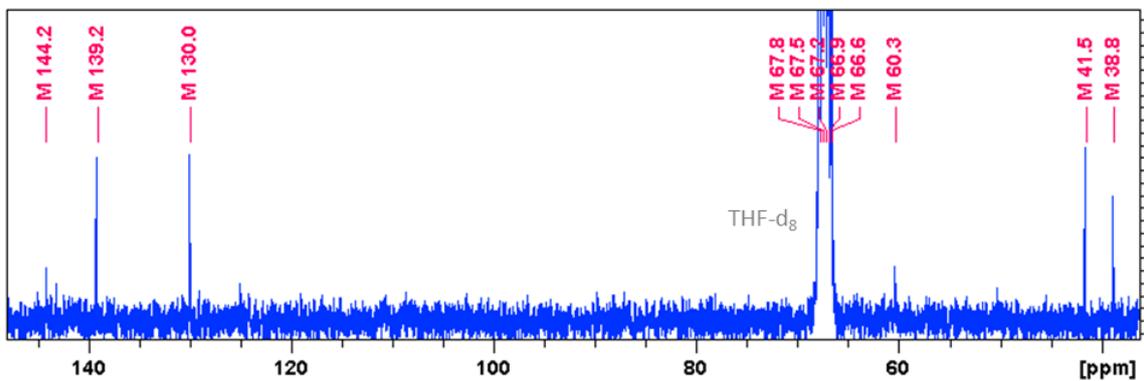


Figure 141 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du métabolite B2 (THF- $d_8$ , 150 MHz)

Les analyses HSQC et HMBC ont été réalisées (Figure 142 et Figure 143). La lecture du spectre HSQC permet d'établir une liaison directe entre le proton Ha et l'atome de carbone à 41,5 ppm, entre le proton Hb et l'atome de carbone à 139,2 ppm, et entre le proton Hc et l'atome de carbone à 130,0 ppm (Figure 142).

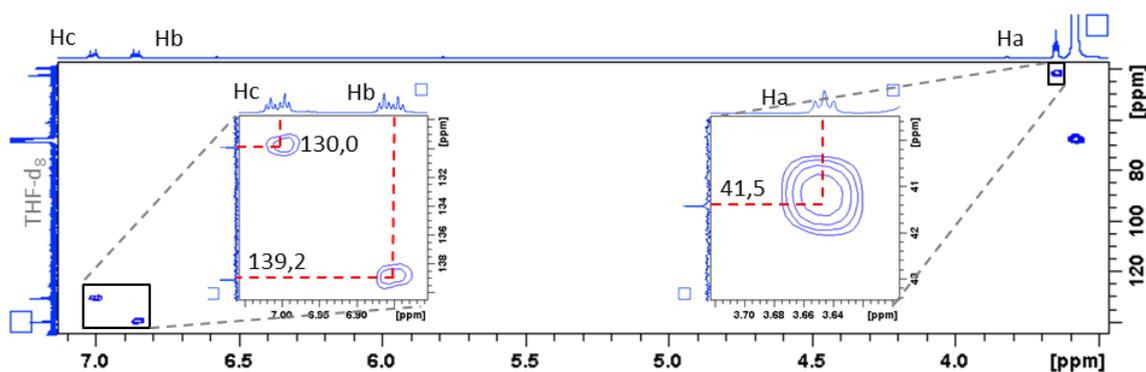


Figure 142 : Spectre RMN de l'analyse bidimensionnelle HSQC du composé B2 (THF- $d_8$ , Bruker, 600 MHz).

L'expérience HMBC sur le composé B2 permet de détecter des liens longue distance ( $^2J$  et  $^3J$ ) entre le groupe de protons allyliques  $H_a$  et les atomes de carbone aux déplacements 130,0 ppm, 139,2 ppm et 142,4 ppm (Figure 143).

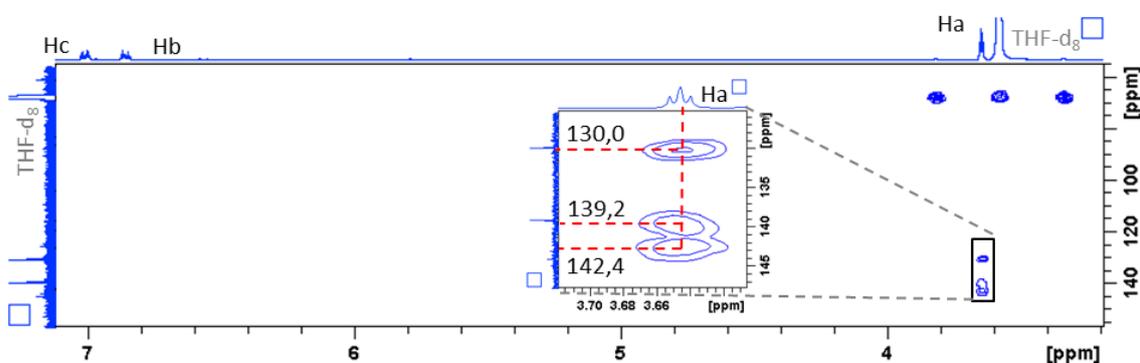


Figure 143 : Spectre HMBC du composé B2 (THF- $d_8$ , 600 MHz).

D'après les informations obtenues avec les différentes analyses par RMN, le composé B2 serait donc le 4,5,6,7-tétrachloroindène et les informations relatives à sa structure sont résumées en Figure 144.

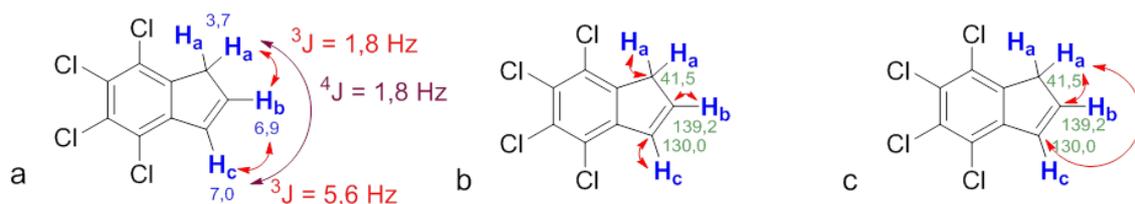


Figure 144 : Structure du composé B2 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , (b) entre les protons et atomes de carbone à courte distance ( $^1\text{J}$ ) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à plus longues distances ( $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$ ) d'après l'analyse HMBC.

Dans le but de confirmer la structure proposée pour le métabolite B2, nous avons comparé son spectre RMN  $^1\text{H}$  à celui de l'indène commercial (Annexe 4). Les signaux des protons portés par les atomes de carbone 2 et 3 de l'indène commercial sont des doublets de triplets à 6,4 et 6,8 ppm. Le signal des protons allylique (portés par l'atome de carbone en position 1) se traduit par un triplet large à 3,3 ppm. Ces données sont tout à fait cohérentes avec notre proposition de structure. Les déplacements chimiques de 6,9 et 7,0 ppm pour les protons Hb et Hc respectivement, du métabolite B2 sont légèrement plus élevés que ceux de l'indène. Ce déblindage s'explique par l'effet inductif attracteur des atomes de chlore.

### C. Elucidation structurale du composé B3

Les fortes similitudes rencontrées entre le pentachloroindène B1 et le composé B3 en GC-MS, LC-MS-UV-vis et CCM (Chapitre 2) permettent d'affirmer que B1 possède une structure de type tétrachloroindène. Afin de positionner les protons et les atomes de chlore sur la structure indène, des analyses complémentaires ont été réalisées en RMN. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  comporte plusieurs multiplets et on retrouve les signaux du métabolite B2 de façon minoritaire. Dans la zone de déplacement chimique allylique, on observe un doublet à 3,8 ppm et un doublet large à 3,9 ppm intégrant pour 2,0 et 1,9 protons respectivement. Dans la zone de déplacement chimique aromatique on observe deux triplets dans la zone de déplacements aromatiques à 6,95 ppm 7,00 ppm intégrant respectivement pour 0,9 et 1,2 proton. A 7,5 ppm et 7,6 ppm, deux singulets intègrent chacun pour 1 proton et on remarque que le singulet à 7,6 ppm est large. On observe aussi les signaux du métabolite B2 de façon minoritaire et dont le triplet allylique à 3,6 ppm intègre pour 0,7 proton. L'analyse bidimensionnelle COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet d'identifier les interactions entre les protons (Figure 146) et ainsi de distinguer deux familles de protons : Ha (3,8 ppm), Hb (7,0 ppm) et Hc (7,6 ppm) d'une part et Ha' (3,9 ppm), Hb' (6,9 ppm) et Hc' (7,5 ppm) d'autre part (Figure 145).

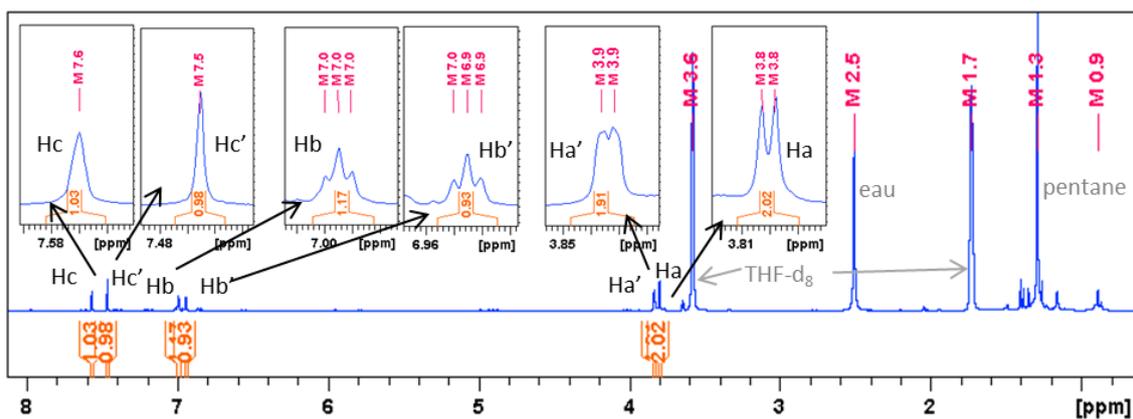


Figure 145 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés B3 et B4 ( $\text{THF-d}_8$ , 600 MHz).

Il apparaît ainsi que les protons Ha et Hb sont couplés et d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , la valeur de la constante de couplage est de 1,5 Hz. Par ailleurs, les protons Ha' et Hb' sont aussi couplés avec une constante de couplage de 1,5 Hz. Sur le spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  on observe une corrélation entre les signaux Ha' et Hc, que l'on n'observe pas entre les protons Ha et Hc (Figure 146).

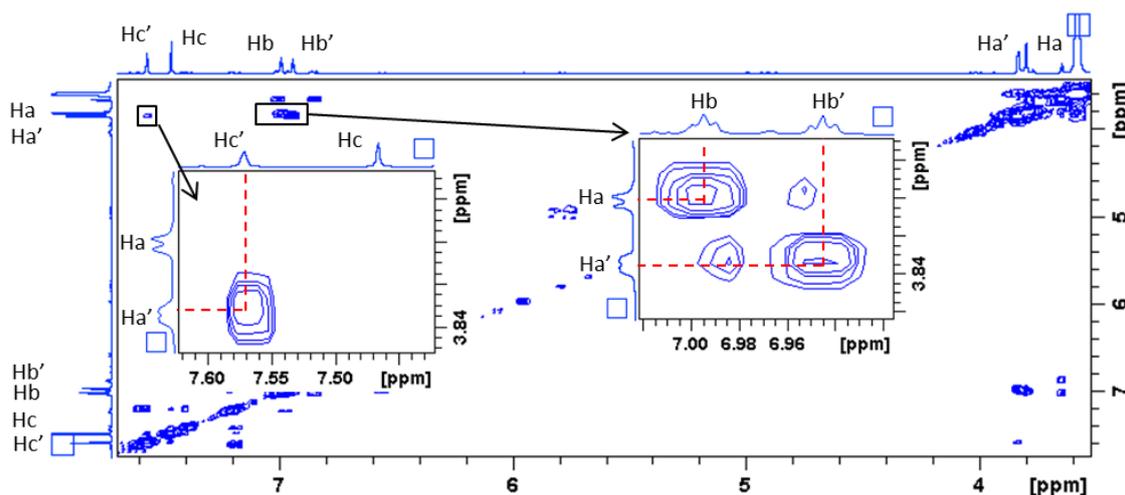


Figure 146 : Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et attribution des signaux des protons aux composés B3 et B3' ( $\text{THF-d}_8$ , Bruker, 600 MHz).

Le Tableau 10 rassemble les informations obtenues d'après l'analyse des signaux observés sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

Tableau 10 : Résumé des informations obtenues des signaux observés.

Nom	Ha	Hb	Hc	Ha'	Hb'	Hc'
Déplacement chimique (ppm)	3,8	7,0	7,5	3,9	6,9	7,6
Multiplicité	doublet	triplet	singulet	doublet large	triplet	singulet large
Valeur d'intégration	2,0	1,2	1,0	1,9	0,9	1,0
Couplage	couplage (1,5 Hz)			couplage (1,5 Hz)		
				couplage entre Ha' et Hc' observé en COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$		

A ce stade, il est difficile d'attribuer la position des protons du métabolite B3. Les multiplets observés pourraient correspondre à un dédoublement de signaux. Cependant, le motif doublet allylique/triplet aromatique a été rencontré dans le cas du métabolite B1 et laisse penser que deux molécules distinctes seraient responsables des signaux observés.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du métabolite B3 comporte de nombreux signaux dans la zone aromatique et allylique et sa complexité ne permet pas de l'interpréter (Annexe 8).

La présence des deux composés dans l'échantillon est confirmée par le couplage direct  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observé sur le spectre HSQC (Figure 147), entre chaque proton allylique Ha et Ha' avec un atome de carbone au déplacement chimique distinct : Ha couple avec un atome de carbone à 44,4 ppm alors que Ha' est couplé avec un atome de carbone distinct à 45,1 ppm. Les protons Hb et Hc couplent avec des atomes de carbone à 127,1 et 126,4 ppm respectivement. Les protons Hb' et Hc' du deuxième métabolite que nous nommerons B3' sont couplés avec les noyaux des atomes de carbone à 126,2 et 129,6 ppm respectivement.

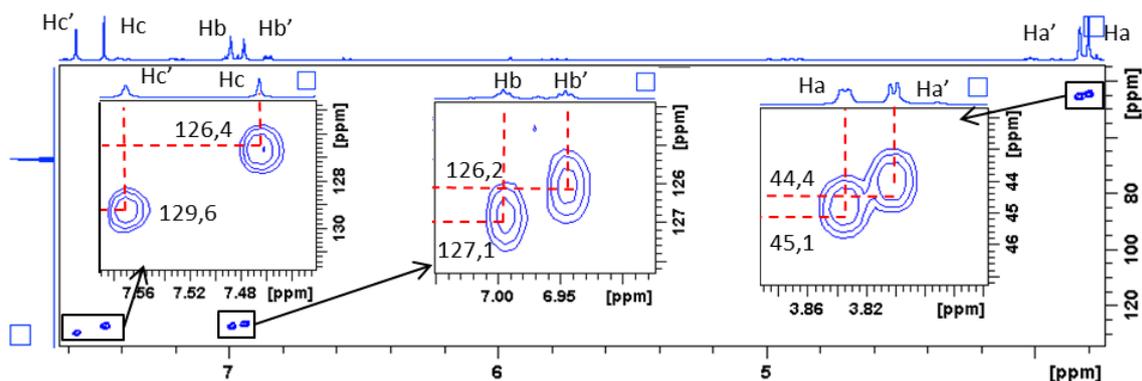


Figure 147 : Analyse bidimensionnelle HSQC (couplages directs) des composés B3 et B3' (THF- $d_8$ , 600 MHz).

Enfin, l'analyse HMBC qui atteste des relations à plus longues distances a permis d'identifier une corrélation entre les protons allyliques de chaque molécule avec le carbone portant le proton sur le cycle à 5 carbones, dans les deux cas (Figure 148). Dans ces conditions le proton Ha couple avec le carbone à 127,1 ppm et le proton Ha' avec le carbone à 126,2 ppm.

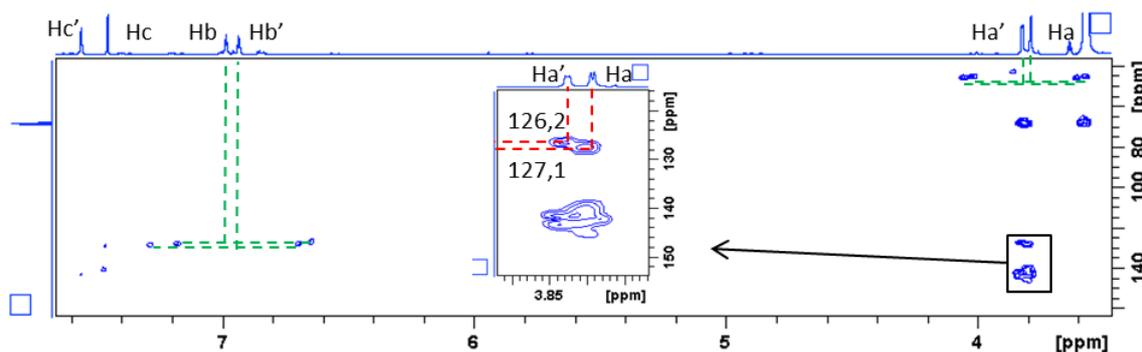


Figure 148 : Analyse bidimensionnelle HMBC (couplages indirects) des composés B3 et B3' (THF- $d_8$ , 600 MHz). Les couplages indirects sont annotés en rouge et les couplages directs, observable sous forme de double tache, en vert.

D'autres corrélations longues distances peuvent être observées entre les protons allyliques et les noyaux des atomes de carbone au déplacement chimique entre 141 et 142 ppm. Cette information nous indique que l'atome de carbone portant un chlore, et avec lequel le proton allylique couple, a un déplacement chimique de 141 ou 142 ppm. Par analogie avec le déplacement chimique du carbone portant le proton aromatique du composé B1, à 126,5 ppm, et du déplacement chimique de l'atome de carbone en position 2 de la structure indène à 140,6 ppm, nous proposons pour la position des protons Hb et Hb' des composés B3 et B3' respectivement et portés par les atomes de carbone aux déplacements chimiques 127,1 ppm (B3) et 126,2 ppm (B3'), l'atome de carbone en position 3 de la structure indène.

Ainsi, il apparaît que le pic unique détecté en GC-MS et en LC-MS pour le composé B3 rassemblerait en fait deux composés isomères et à la structure très proche, traduits chacun par un doublet allylique, un triplet aromatique et un singulet aromatique avec un rapport de 0,9 entre les deux. en RMN  $^1\text{H}$  (Figure 145). Chaque singulet correspond d'après l'intégration à un proton et traduit une absence de couplage avec les autres protons de la structure. Nous en déduisons alors qu'il doit être disposé sur le cycle à six membres de la structure indène.

L'ensemble des corrélations identifiées d'après les spectres RMN du métabolite B3 et B3' sont présentées en Figure 149 et Figure 150. Des analyses plus poussées par RMN sur de plus grandes quantités de produits permettraient d'aller plus loin dans l'élucidation de leurs structures. Des essais de séparation pourront être tentés à présent que l'existence du métabolite B3' est révélée.

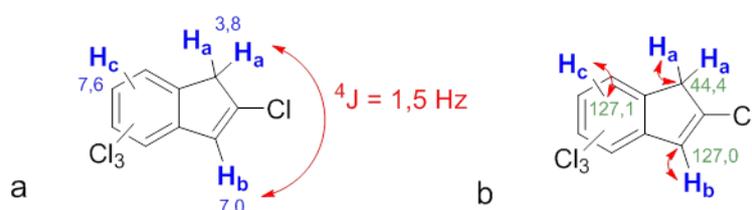


Figure 149 : Corrélations identifiées en RMN  $^1\text{H}$  et COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}'$  (a) et corrélations en  $^1\text{J}$  en HSQC (b) pour le composé B3.

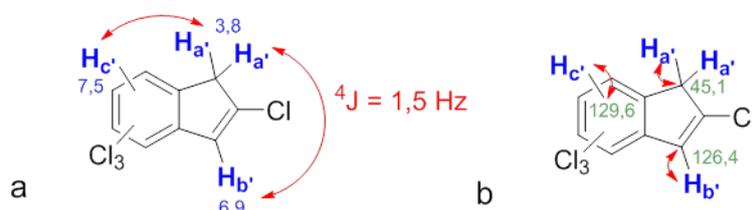


Figure 150 : Corrélations identifiées en RMN  $^1\text{H}$  et COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}'$  (a) et corrélations en  $^1\text{J}$  en HSQC (b) pour le composé B3'.

Les composés B3 et B3' ont donc des structures très proches, que seule la position du proton sur le cycle à six membres permet de distinguer. Ces sont donc des régioisomères. Malgré les nombreuses expériences RMN réalisées, nous ne pouvons pas, à ce stade affirmer de structure pour les composés B3 et B4. Les structures 2,4,5,6- ; 2,4,5,7- ; 2,4,6,7- ou 2,5,6,7-tétrachloroindène sont toutes des possibilités pour les composés B3 et B3'.

L'indice supplémentaire du couplage entre les signaux Ha' et Hc' du métabolite B3' a été étudié de plus près. En faisant varier la valeur de l'apodisation, on peut distinguer un dédoublement du doublet Ha' (Figure 151) et un léger détriplement du singulet Hc', attestant du couplage observé par RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Sans pouvoir apporter une précision suffisante, la valeur de la constante de ce couplage serait d'environ 0,5 Hz.

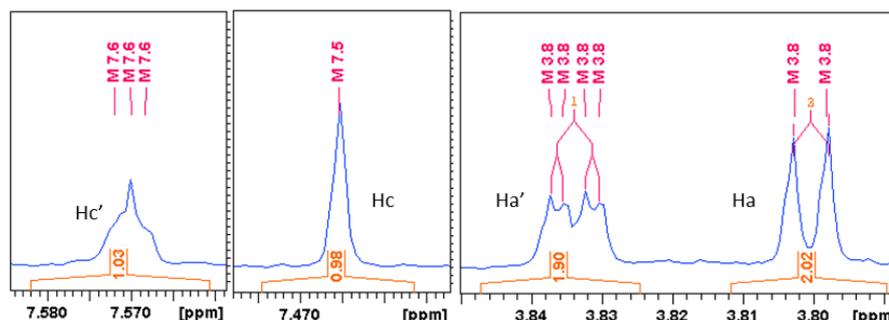


Figure 151 : démultiplication des signaux des protons Ha' et Hc' observée par modification de l'apodisation.

En raison du faible couplage observé entre les protons Ha' et Hc' pour le métabolite B3', nous proposons les structures 2,4,5,7-tétrachloroindène et 2,4,6,7-tétrachloroindène pour le métabolite B3.



Figure 152 : Structures 2,4,6,7-tétrachloroindène (a) et 2,5,6,8-tétrachloroindène proposées pour le métabolite B3'.

### III. Elucidation structurale des composés de la famille C

Afin d'identifier la structure exacte des différents composés polaires identifiés comme étant probablement des acides polychloroindènegarboxyliques (APCIC, de formule brute  $\text{C}_{10}\text{Cl}_{4-n}\text{O}_2\text{H}_{3+n}$ ,  $n=1,2,3$ ) par les analyses LC-MS-UV-visible (Chapitre 2), nous avons réalisé des expériences en RMN sur les fractions de mélange issues de la purification par HPLC préparative. Les métabolites C1, C2, C3 et C4 sont observés lors des transformations par voie microbologique de la chlordécone. Les composés C5, C6, C7 et C8 en revanche n'ont jamais été observés au cours des transformations microbiologiques mais ont été détectés au cours de différentes transformations chimiques.

## A. Elucidation structurale des métabolites C1 et C2

Une fraction contenant les métabolites C1 et C2 été obtenue après purification. Les proportions de chaque métabolite ont été estimées au préalable à partir du chromatogramme obtenu en LC-Orbitrap-MS et représente un ratio C1/C2 = 1,3 (Figure 153). L'analyse comparative des données RMN a permis de distinguer les signaux appartenant à chacun des deux métabolites.

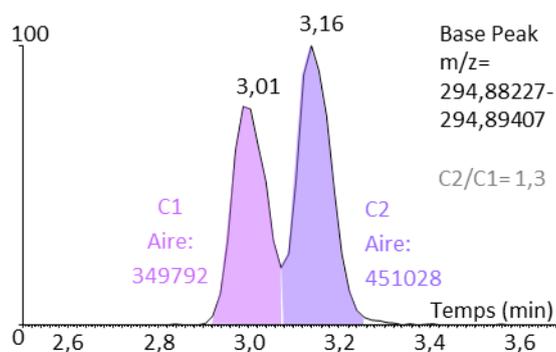


Figure 153 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 294,88817 du mélange C1/C2 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C2/C1.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un mélange contenant les composés C1 et C2 comporte différents signaux en plus des signaux attribués aux solvants et à des impuretés (Figure 154). L'expérience COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  a permis d'observer les corrélations entre les noyaux responsables du doublet à 3,9 ppm et d'un des triplets à 7,01 ppm (nommés respectivement Ha et Hb) et entre les noyaux responsables du doublet à 4,0 ppm et de l'autre triplet à 7,02 ppm (nommés respectivement Ha' et Hb') (Figure 155). Nous précisons dans ce cas un deuxième chiffre significatif afin de distinguer leur déplacement chimique. D'après la RMN  $^1\text{H}$ , la valeur de ces deux constantes de couplage est de 1,5 Hz.

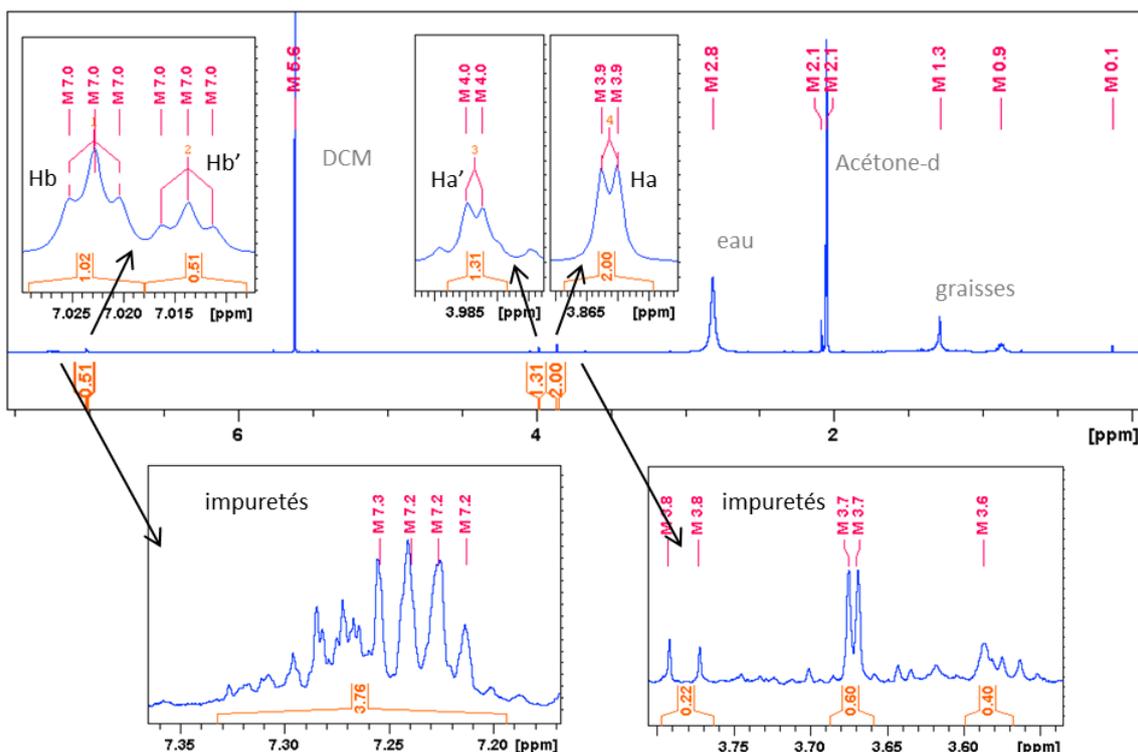


Figure 154 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés C1 et C2 (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

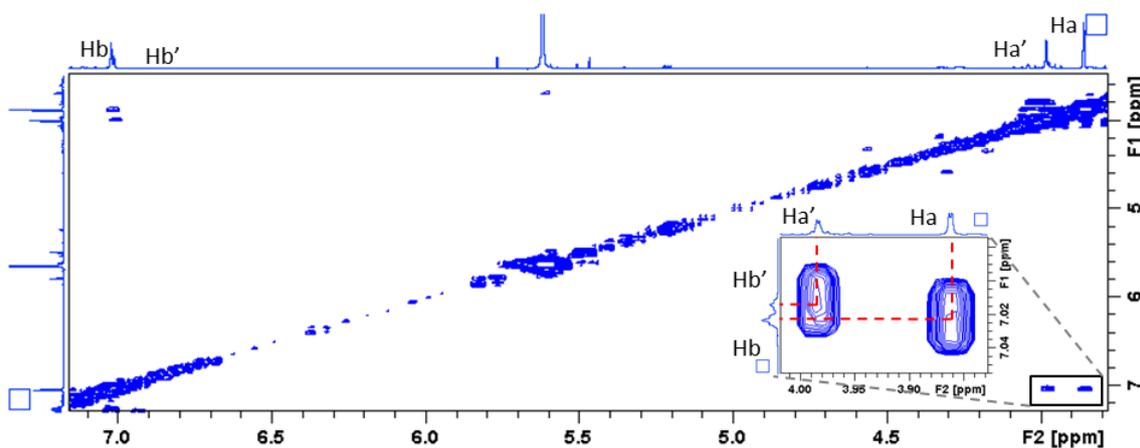


Figure 155 : Spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  des composé C1 et C2 (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

L'intégration des deux doublets Ha et Ha' dans la zone de déplacements allyliques correspond à 2 et 1,3 protons respectivement et celle des deux triplets Hb et Hb' dans la zone de déplacement aromatique correspond à 1 et 0,5 proton respectivement. Ces ratios Ha/Ha' de 1,5 et Hb/Hb' de 2 ne sont pas exactement les mêmes mais peuvent s'expliquer par l'intégration des pics affectée par la présence d'impuretés dans la zone allylique, et la superposition partielle des triplets Hb et Hb' dans la zone aromatique. Ces ratios ne correspondent pas non plus exactement à celui observé en analyse LC-MS (C2/C1 de 1,3). Cependant, la précision de la mesure d'intensité du signal réalisée sur le mélange

par LC-Orbitrap-MS n'est pas optimale et un retour à la ligne de base serait nécessaire pour estimer les proportions de chaque composé du mélange de façon fiable.

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du mélange des composés C1 et C2, le doublet dans la zone allylique et le triplet dans la zone aromatique avec un rapport 2 :1 d'intégration rappellent le motif de multiplets observés pour le composé B1. Les rapports entre les signaux permettent d'attribuer au composé C1 les groupes de proton Ha et Hb, et au composé C2 les groupes de proton Ha' et Hb', dont la constante de couplage est de 1,5 Hz. En revanche, le proton de la fonction acide carboxylique n'est pas observé. Les protons des fonctions acides carboxyliques s'échangent rapidement et peuvent apparaître sous forme de singulets très larges ou même être absents aux faibles concentrations (Silverstein *et al.*, 2015). Ils résonnent en général sur une plage de déplacement chimique large, entre 10 et 14,5 ppm. Dans notre cas, le signal n'a pas pu être détecté.

Comme évoqué précédemment, l'analyse bidimensionnelle COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  du mélange des composés C1-C2 a permis de confirmer l'attribution des groupes de protons Ha' et Hb' pour le composé C1 et Ha et Hb pour le composé C2, d'après leurs taches de corrélation (Figure 155).

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des composés C1 et C2 n'a pas donné de résultats exploitables, du fait de la faible quantité de matière (<2,0 mg) contenant une proportion importante d'impuretés. Cependant, les expériences bidimensionnelles HSQC et HMBC ont permis d'apporter des informations additionnelles. On a ainsi réussi à repérer, comme dans le cas des polychloroindènes B1, B2 et B3, les atomes de carbone liés aux protons allyliques et aromatiques de C1 et de C2. (Figure 156 et Tableau 11).

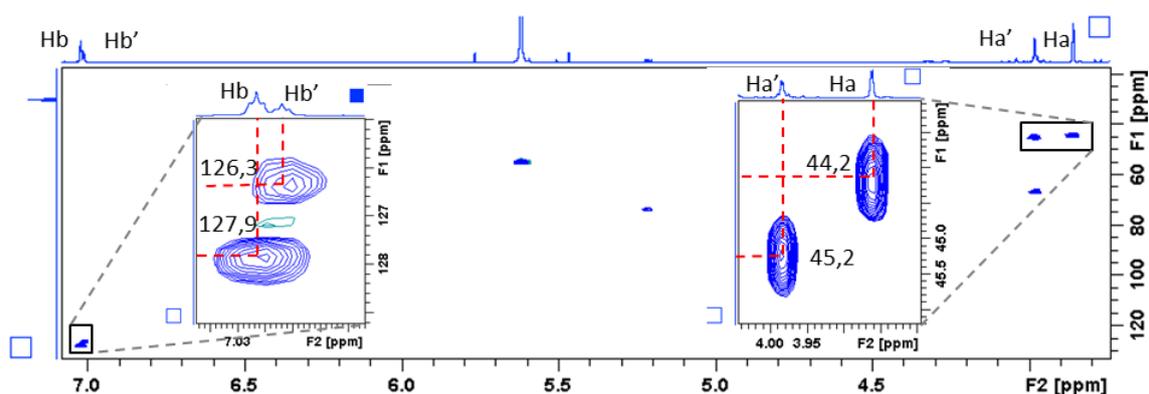


Figure 156 : Expérience HSQC pour le mélange contenant les composés C1 et C2 (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

Seules les corrélations entre les protons allyliques et les atomes de carbone voisins peuvent être clairement identifiées. Dans le cas des protons aromatiques des composés C1 et C2, leurs déplacements chimiques étant très proches (7,01 ppm et 7,02 ppm), la résolution spectrale utilisée permet pas de repérer avec une totale confiance les atomes de carbone avec qui ils corrélient. On peut cependant supposer qu'il s'agit des mêmes atomes de carbone que ceux interagissant avec les protons allyliques (Figure 157 et Tableau 11).

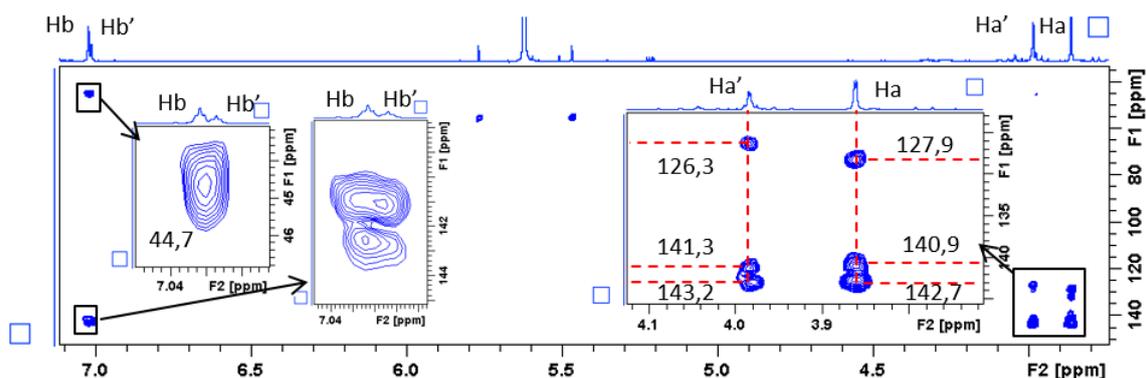


Figure 157 : Spectre HMBC d'un mélange contenant les composés C1 et C2 (acétone- $d_6$ ).

Tableau 11 : Résumé des déplacements chimiques des protons et des atomes de carbones directement et indirectement liés aux protons des métabolites C1 et C2.

Métabolite C1		Métabolite C2	
Ha'	Hb'	Ha	Hb
déplacement chimique du proton (ppm)			
4,0	7,0	3,9	7,0
déplacement chimique de l'atome de carbone directement corrélé (ppm)			
45,2	126,3	44,2	127,9
déplacements chimiques des atomes de carbone indirectement corrélés (ppm)			
126,3	(taches mal définies)	127,9	(taches mal définies)
141,3	44,7	140,9	44,7
143,2	141,6	142,7	141,6
	142,5		142,5

Comme dans le cas des PCI (polychloroindènes), la présence d'un signal intégrant pour deux protons dans la zone de déplacement chimique allylique indique que deux protons sont situés sur l'atome de carbone 1 de la structure indène. Afin d'identifier la position du troisième proton porté par le noyau indène, nous avons comparé les données obtenues pour les métabolites C1 et C2, à celles du métabolite B1 dont la structure exacte est élucidée. La constante de couplage de 1,5 Hz entre les

protons, ce qui suppose que le proton (Hb ou Hb') est lié à l'atome de carbone en position 2, 3 ou 7 du noyau indène. Le déplacement chimique des atomes de carbone qui porte les protons aromatiques nous donne une indication forte : les valeurs de 127,9 et 126,3 ppm sont très proches de celle de l'atome de carbone en position 1 de la structure indène dans le cas du métabolite B1 avec un déplacement chimique de 126,5 ppm. Les autres atomes de carbone du cycle à 5 atomes de carbone ont un déplacement chimique proche de 140 ppm dans le cas du métabolite B1. C'est aussi le cas des atomes de carbones indirectement corrélés aux protons Ha et Ha' des métabolites C2 et C1 respectivement. Ainsi, nous supposons que les protons Ha et Ha' d'une part, et Hb et Hb' d'autre part sont situés en position 1 et 3 respectivement, d'après la numérotation des carbones de la structure indène (Figure 129).

L'ensemble des données spectrales nous conduisent à proposer une structure partiellement élucidée pour les composés C1 (Figure 158) et C2 (Figure 159).

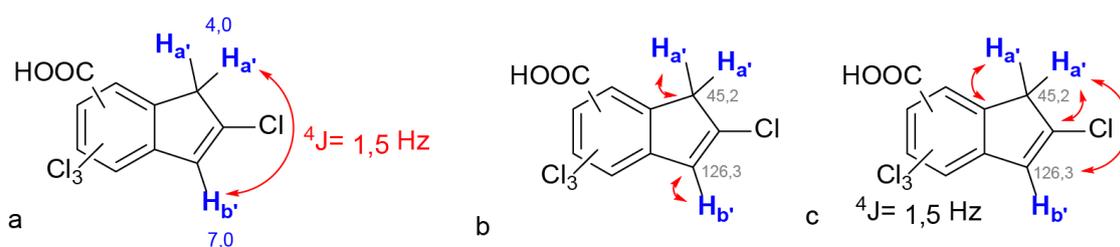


Figure 158 : Structure partielle proposée pour le composé C1 et couplages observés (a) entre protons d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , (b) entre les noyaux des atomes de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à courte distance d'après l'analyse HSQC et (c) à plus longues distances d'après l'analyse HMBC.

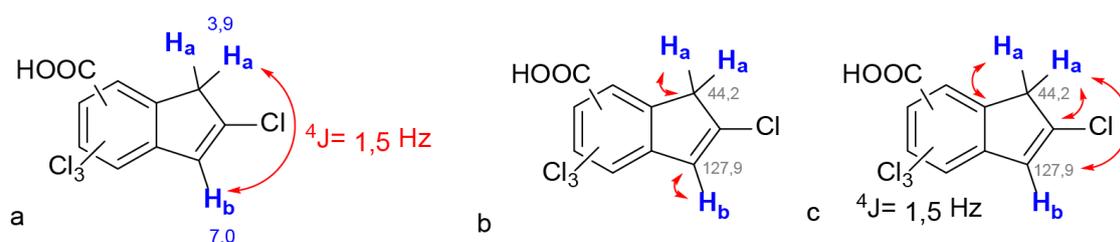


Figure 159: Structure proposée du composé C1 et couplages observés (a) entre les protons d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ , (b) entre les protons et carbones à courte distance ( $^1\text{J}$ ) d'après l'analyse HSQC et (c) entre les noyaux des atomes de  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  à plus longues distances ( $^2\text{J}$  et  $^3\text{J}$ ) d'après l'analyse HMBC.

Au vu des similitudes de toutes les données spectrales, C1 et C2 présentent la même structure partielle. La différence entre ces composés se situe au niveau de la position de la fonction acide carboxylique sur le cycle à six membres. Nous n'avons cependant pas obtenu d'informations sur la

position de la fonction acide carboxylique de chaque molécule. D'autres expériences par RMN pourraient être menées en complément, sur une quantité d'échantillon plus importante et plus pur des métabolites C1 et C2. La séparation des métabolites entre eux doit aussi être optimisée. Cependant, toutes les séparations réalisées sur les composés polaires ont conduit à des mélanges associant deux isomères (C1 et C2, C3 et C4, C5 et C6, C7 et C8). L'échec de la séparation par HPLC préparative peut être dû à la structure même des composés qui pourraient s'isomériser progressivement en solution, comme présenté en Figure 160. Le pKa de 17-18 est estimé à partir des données issues d'études de pKa d'indènes substitués (Bordwell & Drucker, 1980). Cette hypothèse pourrait être mise en évidence par des expériences NOESY ou ROESY ou encore des études de température sur les métabolites.

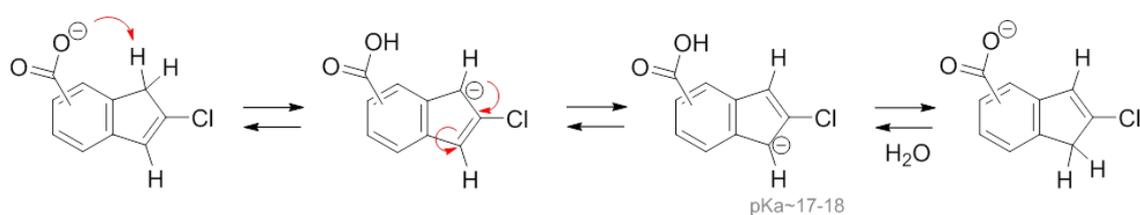


Figure 160 : Proposition de mécanisme d'isomérisation des APCIC en milieux aqueux neutre ou basique.

## B. Elucidation structurale du métabolite C3 et C4

De même que pour les composés C1 et C2, la purification a conduit à un mélange contenant les composés C3 et C4. Le rapport C3/C4 évalué d'après l'analyse par LC-Orbitrap-MS est de 1,4 (Figure 161).

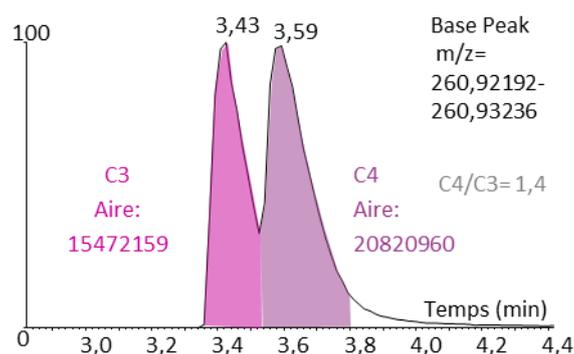


Figure 161 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 260,92714 du mélange C3/C4 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C3/C4.

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , on observe, en plus des signaux des solvants et de quelques impuretés, deux doublets dans la zone de déplacement allylique, deux triplets ainsi que deux singulets dans la zone de déplacement aromatique (Figure 162). Par RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , on observe des taches de corrélation entre ces signaux, ce qui nous permet d'établir deux familles de signaux qui sont couplés : Ha, Hb et Hc d'une part et Ha', Hb' et Hc' d'autre part (Figure 163). Le proton Ha est couplé avec le proton Hb avec une constante de couplage de 1,5 Hz mais aussi avec le proton Hc d'après la tache de corrélation observée en COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Les protons Ha' et Hb' sont couplés avec une constante de couplage de 1,5 Hz. Les intégrations relatives des signaux nous permettent d'attribuer les protons Ha, Hb et Hc au métabolite C3 et les protons Ha', Hb' et Hc' au métabolite C4. Ce motif est similaire à celui du spectre  $^1\text{H}$  du mélange des métabolites B3 et B3'.

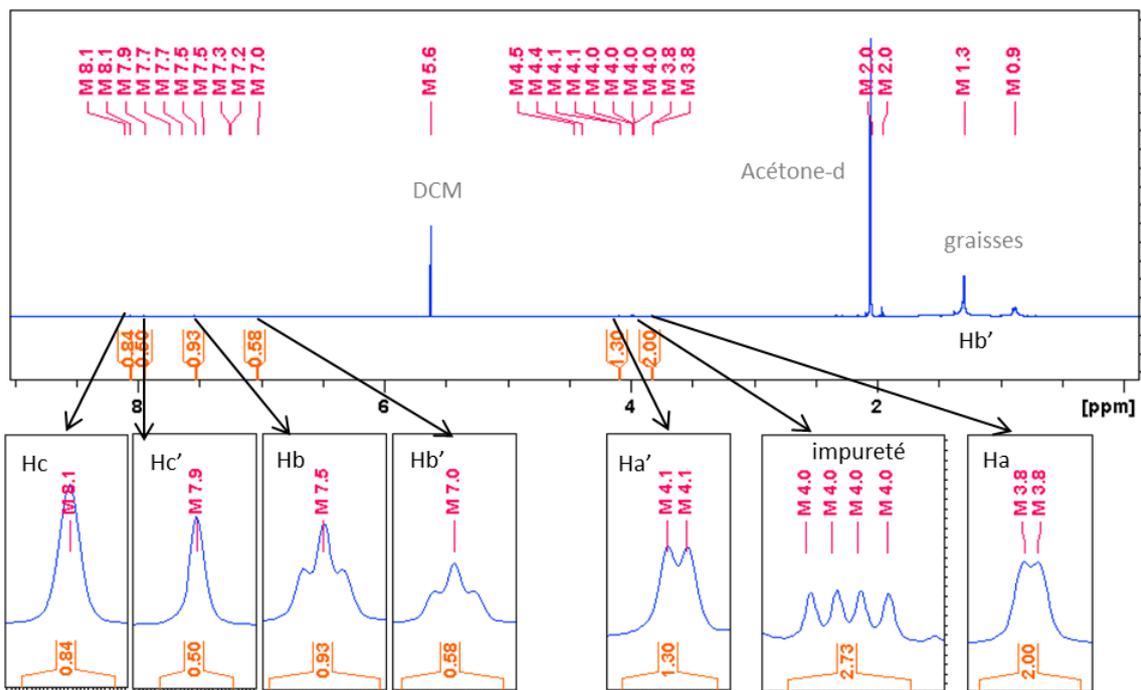


Figure 162 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés C3 et C4 (acétone- $d_6$ , Bruker, 600 MHz).

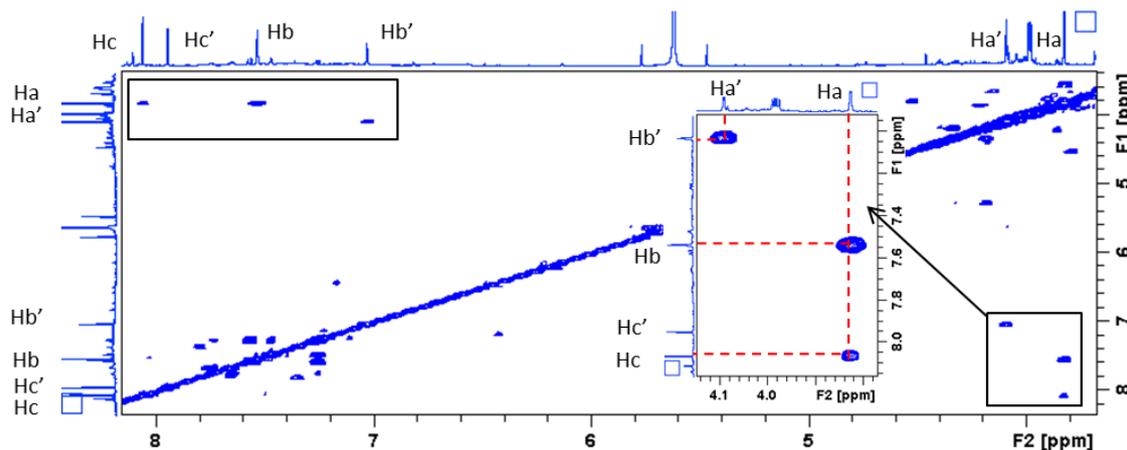


Figure 163 : Analyse COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et attribution des signaux des protons aux composés C3 et C4 (acétone- $d_6$ , Bruker, 600 MHz).

Par manque de temps, aucune expérience bidimensionnelle  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  n'a pu être réalisée. Cependant, la valeur de la constante de couplage à 1,5 entre les protons Ha et Hb d'une part, Ha' et Hb' d'autre part, ainsi que les similitudes de ces observations avec les métabolites B3 et B3' nous permettent d'anticiper la position des protons Ha et Ha' des métabolites C3 et C4 respectivement, sur l'atome de carbone en position 1 de la structure indène, et les protons Hb et Hb' des métabolites C3 et C4 respectivement sur l'atome de carbone en position 3 de la structure indène (Figure 129). Les couplages entre protons qui ont pu être établis sont replacés sur la structure partiellement élucidée en Figure 164.

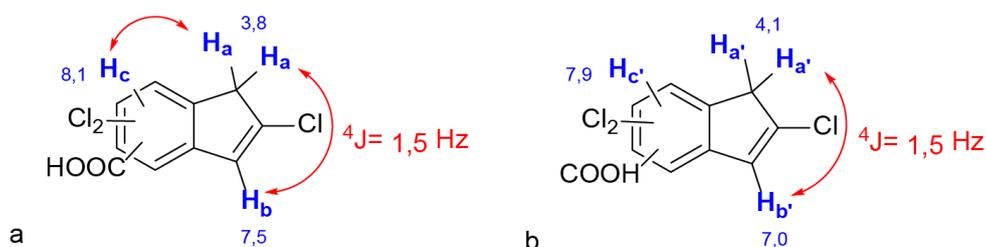


Figure 164 : Structure partielle proposée des composés (a) C3 et (b) C4 et couplages observés entre les protons d'après les spectres RMN  $^1\text{H}$  et COSY.

De même que dans le cas des composés C1 et C2, la structure partielle proposée ne fait pas de distinction entre les composés C3 et C4. La position du proton Hc ou Hc' ainsi que la position de la fonction acide carboxylique sur le cycle à six membres sont encore à déterminer.

### C. Elucidation structurale du métabolite C5 et C6

Les composés C5 et C6, issus des voies de transformation chimiques de la chlordécone (fer zéro valent et vitamine B<sub>12</sub>), ont pu être séparés des autres composés chlorés. Le rapport C6/C5 estimées sur la base des données de LC-Orbitrap-MS des de 1,2.

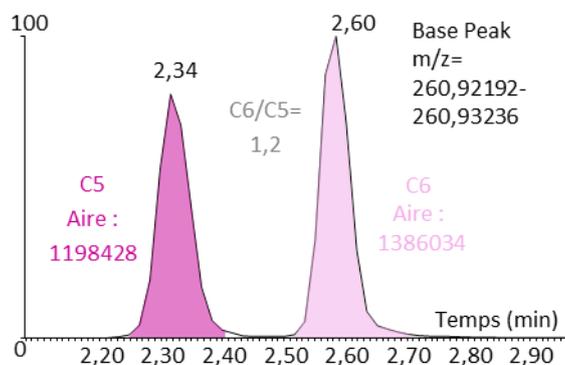


Figure 165 : Chromatogramme extrait pour l'ion m/z 260,92714 du mélange C5/C6 analysé par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange C6/C5.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H ne présente en apparence que 4 signaux associés à ces deux composés. Dans la zone allylique, deux triplets H<sub>a</sub> et H<sub>a'</sub> intègrent pour 2 et 0,9 protons respectivement. Ce ratio de 2,2 plus élevé confirme aussi la tendance supposée à l'équilibre entre les régioisomères. Dans la zone aromatique, deux signaux complexes intégrant pour environ 1 proton. La complexité des signaux laisse penser que plusieurs multiplets se superposent à chaque fois. Par analogie avec le métabolite B2 qui présentait un système de spins H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub> et H<sub>c</sub> similaire, nous proposons que chaque signal complexe regroupe les signaux H<sub>b</sub> et H<sub>b'</sub> d'une part et H<sub>c</sub> et H<sub>c'</sub> d'autre part, correspondant aux protons placés sur les carbones 2 et 3 de la structure indène (Figure 137-c) des deux composés C5 et C6. Par manque de temps, aucune autre analyse n'a pu être réalisée sur cet échantillon.

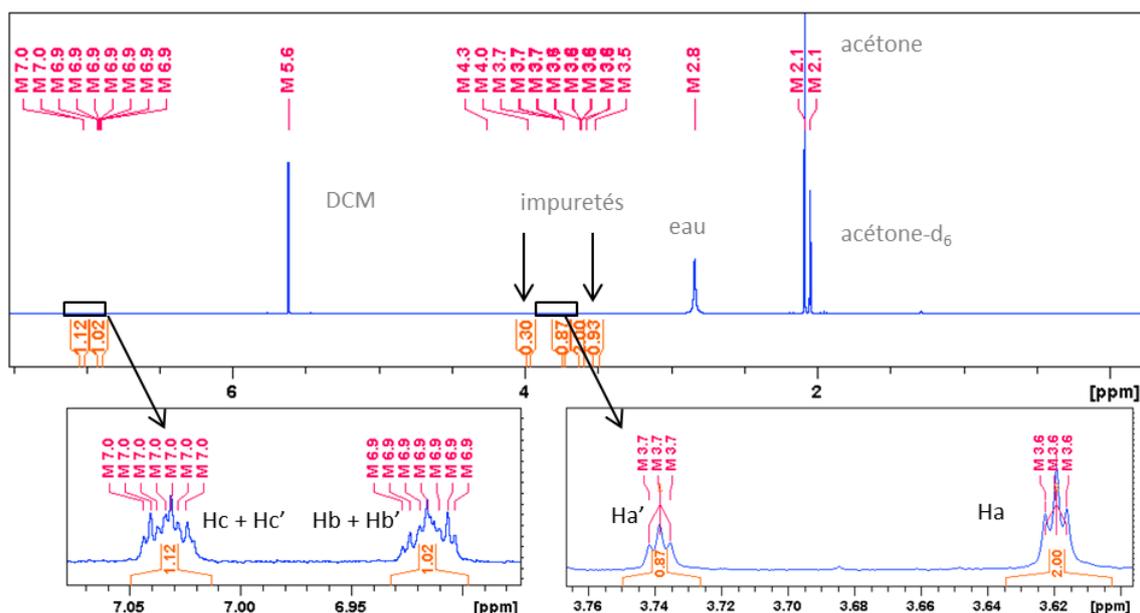


Figure 166 : Spectre RMN <sup>1</sup>H d'un mélange contenant les composés C5 et C6 (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz).

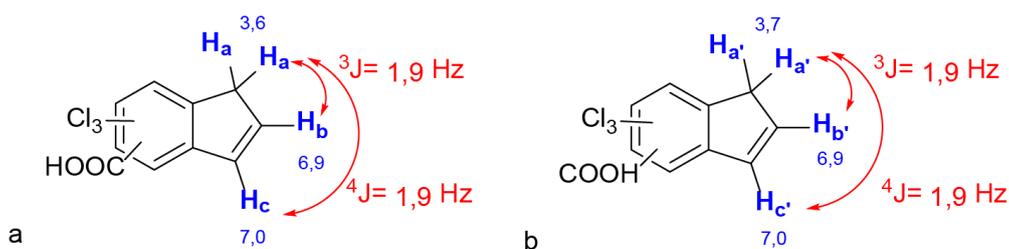


Figure 167 : Structure proposée pour les composés C5 et C6 et couplages observés entre les protons d'après le spectre RMN <sup>1</sup>H.

#### D. Elucidation structurale des métabolites C7 et C8

Les composés C7 et C8 ont été produits à l'issue de la transformation de la chlordécone par voie chimique (fer zéro valent et vitamine B<sub>12</sub>). La purification a conduit à deux mélanges contenant

ces composés. Par analyse LC-MS, les deux mélanges contiennent les composés C7 et C8 avec des rapports C7/C8 de 1,2 et C8/C7 de 4,5 (Figure 168).

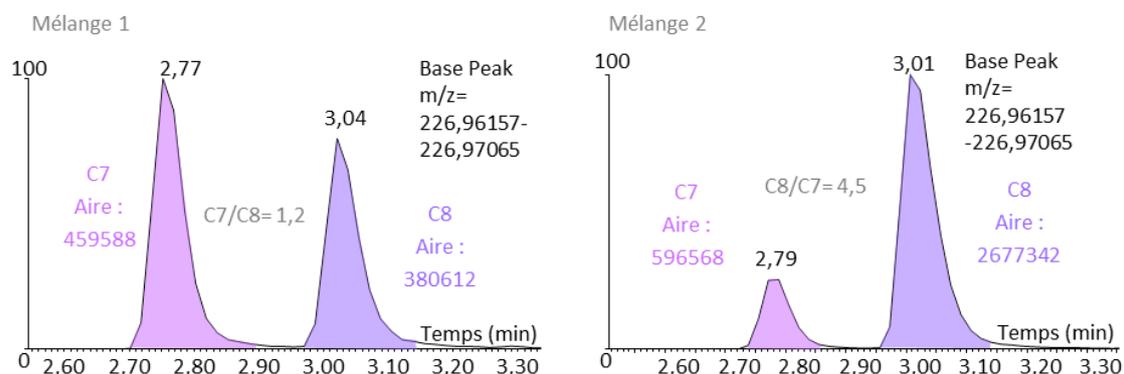


Figure 168 : Chromatogrammes extraits pour l'ion  $m/z$  226,96611 des deux mélanges C7/C8 analysés par LC-Orbitrap-MS permettant d'estimer les proportions du mélange 1 C7/C8 à 1,2 et du mélange 2 C8/C7 à 4,5.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  des deux mélanges (Figure 169 et Figure 170) contiennent aussi des signaux dans différentes proportions. La comparaison des deux spectres nous a permis d'associer les signaux Ha, Hb, Hc et Hd qui sont très majoritaires dans le mélange 2, au métabolite C8 et par déduction, d'attribuer les signaux Ha', Hb', Hc' et Hd' au métabolite C7.

Les signaux attribués au métabolite C8 sont donc un triplet à 3,9 ppm intégrant pour 2,0 protons et qui présente une constante de couplage de 1,5 Hz, deux doublets de triplets à 6,9 et 7,1 ppm qui intègrent pour 0,82 et 0,78 proton respectivement et qui présentent tous les deux une constante de couplage de 5,6 Hz et une de 1,5 Hz, et un singulet à 8,0 ppm qui intègre pour 0,78 proton (Figure 169). Les signaux attribués au métabolite C7 sont un triplet à 3,6 ppm qui intègre pour 2,0 protons et qui présente une constante de couplage de 1,5 Hz, deux triplets de doublets à 6,9 et 7,6 ppm qui intègrent chacun respectivement pour 1,36 et 1,27 proton et présentes tous les deux une constante de couplage de 5,6 Hz et de 1,5 Hz, ainsi qu'un singulet à 8,1 ppm intégrant pour 1,05 proton (Figure 170).

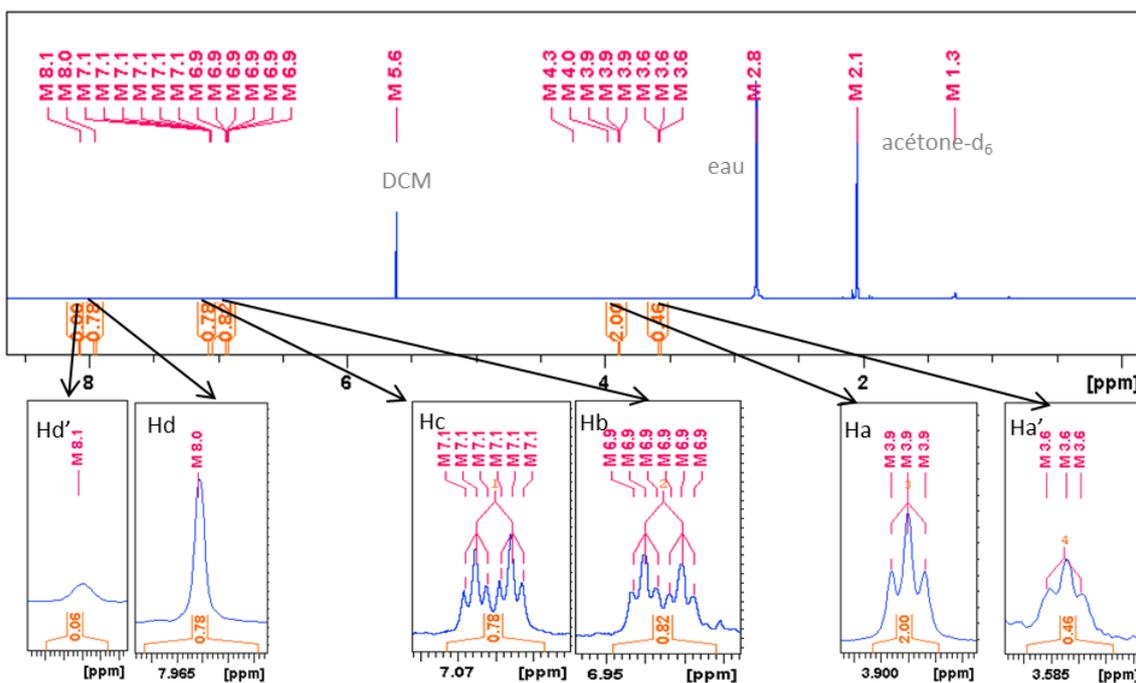


Figure 169 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  des composés C8 (majoritaire) et C7 (minoritaire) (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

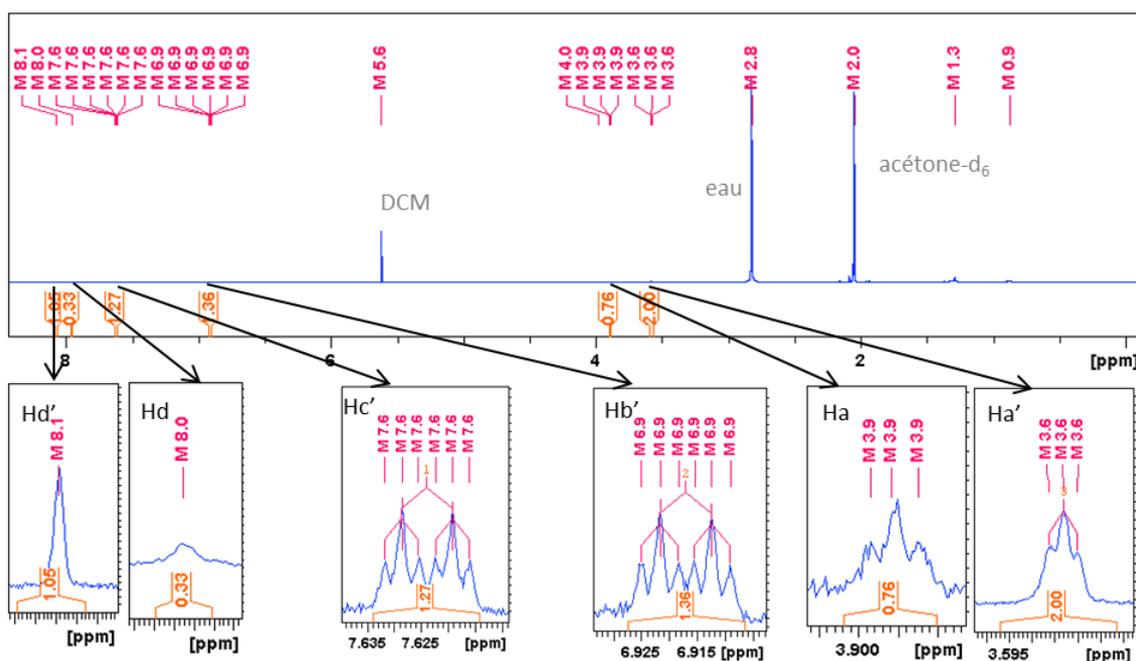


Figure 170 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du premier mélange contenant des composés C7 (majoritaire) et C8 (minoritaire) (acétone- $d_6$ , 600 MHz).

Les deux métabolites ont des signaux très similaires et la seule différence marquante est le déplacement chimique de Hc', de 7,6 ppm en comparaison avec le proton Hc mais aussi avec les

déplacements chimiques des protons des métabolites de la famille B et ceux précédemment cités de la famille C. Le même cas avait été rencontré pour le métabolite C3 pour lequel les protons sur l'atome de carbone en position 3 avait un déplacement chimique de 7,5 ppm.

Par analogie avec le composé B2 pour lequel deux doublets de triplets étaient aussi observés dans la zone aromatique, les protons responsables de ces signaux seraient positionnés sur les carbones 2 et 3 de la structure indène (Figure 129). Les protons Hd et Hd' représentés par un singulet correspondraient respectivement pour les métabolites C8 et C7, à un proton porté par un des carbones 4, 5, 6 ou 7 de la structure indène.

Par manque de temps, aucune autre analyse n'a été réalisée pour approfondir l'étude structurale des métabolites C7 et C8. Pour ces deux métabolites, nous proposons une structure avec trois protons portés par les atomes de carbone 1, 2 et 3 de la structure indène et un proton sur un des atomes de carbone 4, 5, 6 ou 7 (Figure 171). Les informations obtenues d'après les valeurs de constante de couplage sont présentées sur chacune des structures proposées pour chaque métabolite (Figure 171).

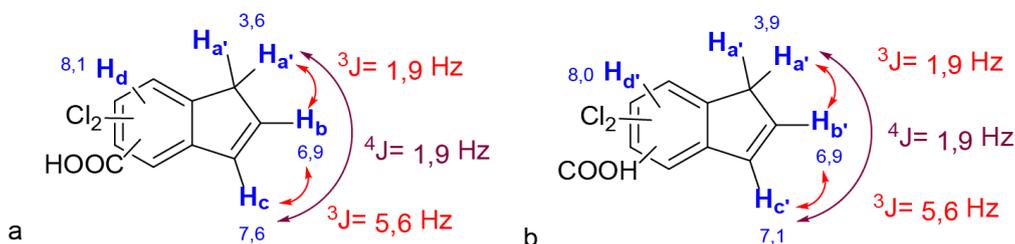


Figure 171 : Structure partielle proposée pour les composés C7 et C8 et couplages observés entre les protons d'après le spectre RMN  $^1\text{H}$ .

### E. Position de la fonction acide carboxylique sur la structure indène pour les composés Ci avec $i = 1$ à 8

Pour tous les composés de la famille C des acides polychloroindènes carboxyliques, peu d'informations ont été obtenues concernant la position de la fonction acide carboxylique.

La présence des protons sur les atomes de carbone 1, 2 et 3 dans les composés Ci,  $i = 1$  à 8 laissent les carbones 4, 5, 6 et 7 comme seules positions possibles pour la fonction acide carboxylique.

Par ailleurs, on notera que les composés de cette famille ont toujours été isolés par paires dont la position des protons sur le cycle à cinq membres est toujours la même. Dans le cas des composés C1 et C2 d'une part et C5 et C6 d'autre part, la seule différence de structure possible est donc la position de la fonction acide carboxylique. Les composés C3, C4, C5 et C8 ont un proton sur le cycle à 6 carbones dont la position aussi pourrait être à l'origine des différences entre des molécules C3 et C4 d'une part et C7 et C8 d'autre part.

En comparant les déplacements chimiques des protons de chaque position de la structure indène pour l'ensemble des composés (Ci, i = 1 à 8), il apparaît que les protons des carbones 2 et 3 lorsqu'ils sont présents, ont généralement un déplacement chimique compris entre 6,9 et 7,1 ppm (Tableau 12). C'est aussi le cas des métabolites PCI, pour lesquels les protons portés par l'atome de carbone 3 a un déplacement chimique compris entre 6,9 et 7,0 ppm. Dans deux cas seulement, pour les composés C3 et C7, le proton porté par l'atome de carbone 3 présente un déplacement chimique à plus haut champ, entre 7,5 et 7,6 ppm.

Tableau 12 : Récapitulatif des déplacements chimiques des protons des composés APCIC.

Composé	formule brute	Protons aromatiques			Protons allyliques
		position des protons sur le noyau indène			
		4, 5, 6 ou 7	3	2	1
C1	C <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H <sub>4</sub>		7,0		3,9
C2	C <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> H <sub>4</sub>		7,0		4,0
C3	C <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	8,1	7,5		3,8
C4	C <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	7,9	7,0		4,1
C5	C <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		7,0	6,9	3,6
C6	C <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		7,0	6,9	3,7
C7	C <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	8,1	7,6	6,9	3,6
C8	C <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	8,0	7,1	6,9	3,9

Selon la position du groupement acide carboxylique sur le cycle à six membres, les protons pourraient voir leur environnement chimique suffisamment changé pour impacter dans certains cas très significativement le déplacement chimique du proton en position 3 du noyau indène.

Des acides carboxyindanes commerciaux ont été analysés en RMN mais aucune information n'a pu être obtenue par comparaison, sur la position de la fonction acide carboxylique. Une expérience

d'hydrodéphalogénéation en présence de palladium sous atmosphère de dihydrogène, comme réalisée sur le métabolite B1 pourrait permettre de comparer le produit obtenu avec les différents composés commerciaux. Par analogie avec les résultats obtenus par l'hydrodéphalogénéation du métabolite B1, dans le cas des APCIC, les produits seraient probablement des acides carboxyindanes. L'ensemble de ces acides carboxyindanes est disponible commercialement et la comparaison des produits de transformation aux standards permettrait d'attribuer la position de la fonction acide carboxylique des produits et confirmerait la structure APCIC proposée. Cependant, cette étude ne serait pas suffisante pour attribuer la position exacte de la fonction acide carboxylique pour chacun des composés Ci (i = 1 à 8) car lors de l'hydrodéphalogénéation, la structure carboxyindène est transformée en structure carboxyindane, ce qui ne permet plus de distinguer la position des carbones. Pour plus de clarté, l'exemple d'une hydrodéphalogénéation des acides 4-carboxyindène et 7-carboxyindène est illustrée en Figure 172 .

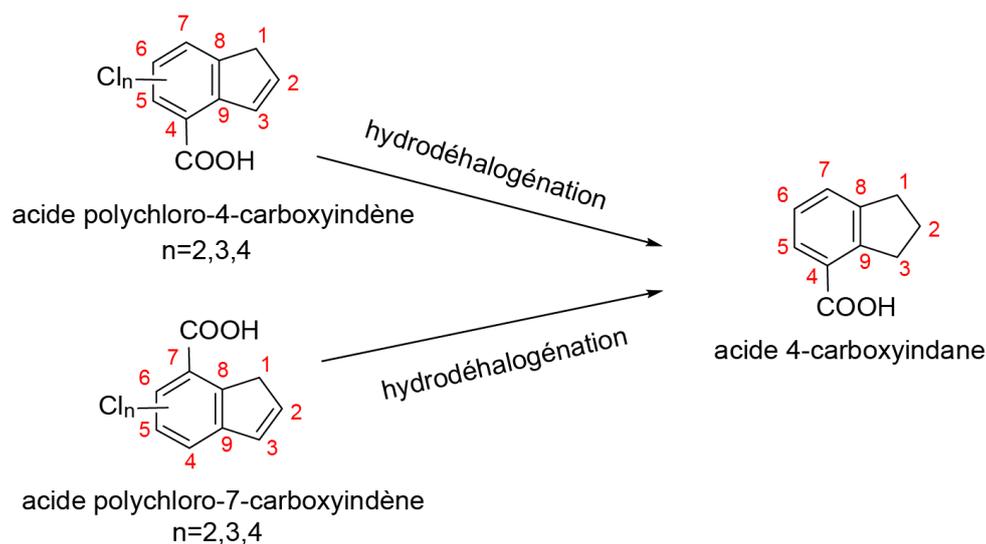


Figure 172 : Structure acide 4-carboxyindane résultant de l'hydrodéphalogénéation des acides polychloro-7-carboxyindène et polychloro-4-carboxyindène.

## Conclusion

Une étude structurale des métabolites obtenus lors de la transformation par voie microbiologique de la chlordécone a été présentée au Chapitre 2. Ces données, issues de l'analyse des spectres de masse, ont permis de classer les différents métabolites en trois familles : les hydrochlordécones, les polychloroindènes et les acides polychloroindènes carboxyliques. Dans le cas de ces deux dernières familles, des preuves directes restent encore à apporter pour valider de manière indubitable le noyau indène. Pour les hydrochlordécones, l'étude des spectres de masses issus de l'ionisation par impact électronique en GC-MS a permis de réduire le nombre de structures possibles. L'analyse des spectres RMN mono- et bidimensionnels a conduit à l'élucidation complète du composé A1, le 10-monohydrochlordécone, issu des transformations microbiologiques et chimiques. La même stratégie a été appliquée avec succès aux produits de transformation photochimique A2 et A3 qui avaient déjà été identifiés précédemment (Wilson & Zehr, 1979). Les analyses RMN de routine n'ont cependant pas permis d'élucider la structure du métabolite B1 (C<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>H<sub>3</sub>). Il a fallu réaliser dans un premier temps une hydrodéphalogenation de ce métabolite afin de valider l'existence d'un noyau indène puis synthétiser et étudier par une expérience COSY <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C le composé [<sup>13</sup>C]<sub>7</sub>- B1 pour finaliser l'élucidation de sa structure (2,4,5,6,7-pentachloroindène). A l'aide de cette molécule utilisée comme référence et des données de routine collectées (<sup>1</sup>H, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC et HMBC), le métabolite B2 a pu être identifié comme étant le 4,5,6,7-tétrachloroindène. L'étude par RMN du métabolite B3 a révélé qu'il s'agissait en fait de deux régioisomères, a priori indiscernables à la fois en GC-MS et LC-MS avec les méthodes développées jusque-là. Leur structure n'a pu être que partiellement résolue : la position d'un proton sur le cycle à six membres de la structure indène reste à déterminer (position 4, 5, 6 ou 7). Les acides polychloroindènes carboxyliques ont été étudiés à partir de fractions de mélanges faiblement concentrées contenant à chaque fois des paires de régioisomères accompagnés d'impuretés non identifiées. Les données collectées n'ont pas pu confirmer de manière certaine la structure générique carboxyindène supposée. Cependant, les informations tirées des spectres RMN pour ces huit composés nous ont permis d'établir la position des protons et des éventuels atomes de chlore sur les positions 1, 2 et 3 de la structure indène. Des analyses complémentaires par RMN <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC et ROESY avec de plus grandes quantités de produit seraient nécessaires pour améliorer l'élucidation structurale de cette nouvelle famille de métabolites. Ces données sont très importantes car cette famille de métabolites de la chlordécone n'a jamais été décrite à ce jour.



## **Chapitre 6 : Etude des voies de transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone**

---

---

## Introduction

La transformation par voie microbiologique de la chlordécone avec les consortia bactériens et les souches de *Citrobacter* isolées mènent à la production de trois familles principales de métabolites. Certains de ces composés avaient déjà été détectés dans des travaux antérieurs. Les hydrochlordécones (Belghit *et al.*, 2015; Devault *et al.*, 2016 ; Schrauzer & Katz, 1978; Wilson & Zehr, 1979), les composés apolaires à la structure supposée chloroindène ont été décrits (Jablonski *et al.*, 1996; Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978), et la présence de composés polaires a été mise en évidence par Jablonski (Jablonski *et al.*, 1996) sans caractérisation chimique. Les transformations microbiologiques et chimiques étudiées au Genoscope recourent certaines des informations antérieures mais cette fois avec une transformation totale de la chlordécone. Ainsi, la compréhension de ces mécanismes contribuera aussi à celle des travaux précédents.

Dans ce chapitre, nous investiguerons les voies mécanistiques de la transformation de la chlordécone au travers de deux approches distinctes. Dans un premier temps, nous étudierons le rôle de la vitamine B<sub>12</sub> et du potentiel d'oxydoréduction du milieu des transformations chimiques, dans le but de mieux comprendre les conditions qui induisent chacune des familles de métabolites. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux différentes étapes de la transformation de la chlordécone en étudiant à leur tour, la transformation de ses différents métabolites. L'élucidation structurale de chaque métabolite est un jalon pour comprendre le mécanisme de transformation de la chlordécone et l'approcher avec plus de certitude. La proposition d'une voie de transformation conclura cette étude.

## **I. Rôle des catalyseurs et des agents réducteurs au cours des transformations chimiques de la chlordécone**

Au cours des expériences de transformation par voies microbiologiques de la chlordécone, le milieu de cultures contient le sulfure de sodium comme agent réducteur. Aucune donnée directe n'a été obtenue sur la présence éventuelle d'un catalyseur biologique. Les travaux de Jablonski *et al.* (Jablonski *et al.*, 1996) ont montré une transformation de la chlordécone en présence d'archées et ont approché la transformation par des transformations chimiques avec la vitamine B<sub>12</sub>, d'autres cofacteurs et des enzymes purifiées, en présence de citrate de titane (III) comme agent réducteur. Dans le cas de la transformation avec les consortia 86 et 92, et les bactéries isolées *Citrobacter* 86-1 et 92-1, le milieu de culture contient des traces de vitamine B<sub>12</sub> et les analyses de séquence ont montré que les bactéries *Citrobacter*, aussi présentes dans les consortia, possèdent les enzymes de la voie de biosynthèse de la vitamine B<sub>12</sub>. Des ajouts supplémentaires de vitamine B<sub>12</sub> dans les milieux en présence de bactéries ont été réalisés et n'ont pas conduit à une transformation plus efficace de la chlordécone. Aussi, les milieux de cultures qui contiennent des traces de vitamine B<sub>12</sub> seuls, ne permettent pas de transformer la chlordécone. A ce stade, plutôt que de faire une étude de transcriptomique ou des mutants de délétion de gènes impliqués dans la biosynthèse de la vitamine B<sub>12</sub>, nous avons préféré tirer profit des nombreux résultats chimiques afin d'essayer de formuler des hypothèses.

### **A. Catalyseurs chimiques**

#### **1. Comparaison des catalyseurs**

Différents catalyseurs ont été testés pour la production par voie biomimétique des métabolites issus de la transformation microbiologique de la chlordécone (Chapitre 4). Les différentes combinaisons de catalyseurs et d'agents réducteurs appliquées ont montré des résultats cohérents avec la littérature (Chiu & Reinhard, 1995; Holmstead, 1976; Lewis *et al.*, 1996; Marks *et al.*, 1989; Rodríguez-Garrido *et al.*, 2004). L'implication de la vitamine B<sub>12</sub> et de l'hématine en présence de certains agents réducteurs (le sulfure de sodium, le fer zéro valent et le citrate de titane (III)) a provoqué une transformation totale de la chlordécone. Avec le dithionite de sodium, une transformation partielle a pu être observée. La transformation chimique de la chlordécone impliquant la chlorophylle a, associée au sulfure de sodium comme agent réducteur, n'a entraîné qu'une transformation mineure de la chlordécone en composé A1. Ces différences de réactivité entre les différents complexes métalliques pourraient avoir comme origine la nature du métal compris au cœur

de la structure corrine, porphyrine ou chlorine respectivement (Figure 23). La chlorophylle comprend, comme l'hématine et la vitamine B<sub>12</sub>, un métal chélaté par un noyau riche en électrons. Dans le cas de la chlorophylle a, il s'agit du magnésium qui ne fait pas partie des métaux de transitions mais des alcalino-terreux et ne présente qu'un ion stable : Mg<sup>2+</sup>. La vitamine B<sub>12</sub> et l'hématine en revanche contiennent au centre de leur noyau corrine et porphyrine respectivement, les éléments cobalt et fer respectivement faisant partie des métaux de transition. Cette distinction est importante car les métaux de transition ont la caractéristique d'avoir plusieurs états ioniques stables dont la transition entre ces états d'oxydation demande peu d'énergie (de l'ordre de 500 à 2500 kJ/mol) du fait de l'énergie similaire des orbitales 3d et 4s, qui contiennent les électrons de valence (Eugen Schwarz, 2010). Le cobalt présente trois degrés d'oxydation stables : I, II et III et de nombreux types de vitamine B<sub>12</sub> existent dans la nature (Schrauzer, 1976). Cette diversité est due au grand nombre de groupements pouvant coordiner le cobalt en position axiale. Le fer chélaté dans l'hématine peut être aux degrés d'oxydations II et III.

La vitamine B<sub>12</sub> est le catalyseur qui a permis d'obtenir le profil de produits de transformation le plus proche de celui rencontré dans le cas des transformations microbiologiques réalisées en présence des consortia 86 et 92, et des souches de *Citrobacter*. Pour cette raison, nous nous focaliserons sur ce complexe de cobalt pour l'étude des voies de transformation de la chlordécone.

## 2. Implication de la vitamine B<sub>12</sub> dans les voies de transformation de la chlordécone

### Etude des produits de transformation

Dans le cas de la transformation de la chlordécone, trois familles de métabolites aux structures distinctes sont produites. Leur formation dépend de l'agent réducteur employé avec la présence éventuelle de la vitamine B<sub>12</sub> comme catalyseur. Un rappel des produits obtenus par transformations chimiques est présenté en Figure 173. Les transformations sont réalisées à partir de chlordécone (5,0 mg ; 9,8 10<sup>-6</sup> mol), dans les conditions détaillées au Chapitre 8. Dans cette partie, nous discuterons de transformations pour lesquelles la chlordécone a été introduite à une concentration identique de 3,3 10<sup>-4</sup> mol/L avec un large excès d'agent réducteur et sous atmosphère inerte d'argon. Lorsqu'elle est impliquée, la vitamine B<sub>12</sub> est introduite à une concentration de 1,0 10<sup>-4</sup> mol/L ((4,0 mg ; 3,0 10<sup>-6</sup> mol).

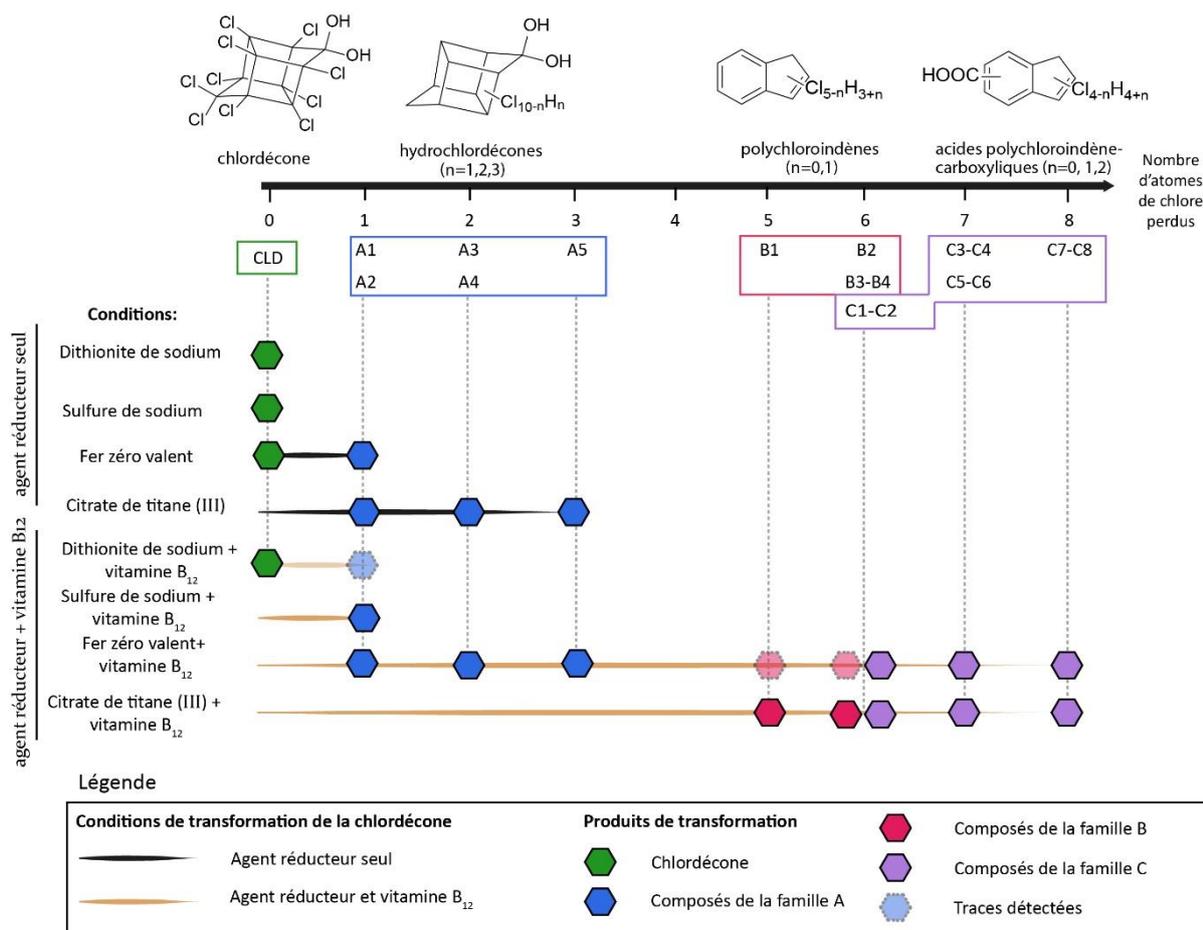


Figure 173 : Orientation des produits de transformations par réactions chimiques de la chlordécone en fonction des agents réducteurs utilisés, et de l'utilisation éventuelle de vitamine B<sub>12</sub>. Ces résultats sont donnés pour une durée n'excédant pas 4 jours, ne permet pas d'observer la transformation totale de la chlordécone dans les conditions avec le fer zéro valent comme décrit au Chapitre 4.

En absence de vitamine B<sub>12</sub>, les produits de transformation sont majoritairement des hydrochlorodécane (Figure 173). Les autres familles de composés, les polychloroindènes (PCI) et les acides polychloroindénecarboxyliques (APCIC) ne sont détectées qu'à l'état de traces dans ces conditions. En présence de vitamine B<sub>12</sub>, la transformation de la chlordécone est globalement plus efficace, avec plus d'atomes de chlore libérés et une ouverture de la cage bishomocubane favorisée : alors qu'avec le sulfure de sodium, aucune transformation n'avait lieu sans vitamine B<sub>12</sub>, elle est alors totale en présence du catalyseur. Avec le fer zéro valent, seuls les hydrochlorodécane étaient observés sans vitamine B<sub>12</sub>. Lorsqu'elle est présente dans le milieu, la famille des APCIC est produite et les PCIC sont détectés en moindres proportions. Enfin avec le citrate de titane (III) seul, les hydrochlorodécane sont produits et leur déchloration peut aller jusqu'à trois atomes de chlore perdus. En présence de vitamine B<sub>12</sub>, la cage bishomocubane est ouverte et les familles PCI et APCIC sont produites

majoritairement, avec cinq à huit atomes de chlore perdus pour ces familles (Figure 173). Ces résultats mettent en évidence le rôle capital de la vitamine B<sub>12</sub> dans l'ouverture de la cage bishomocubane, en présence de ces réducteurs. Selon l'agent réducteur employé, la vitamine B<sub>12</sub> change de couleur, dû au changement de degré d'oxydation du cobalt (Dolphin, 1971). Dans les expériences réalisées sur la chlordécone, elle est rose fuchsia initialement (sans agent réducteur), devient orange en présence de dithionite de sodium et beige-marron en présence de sulfure de sodium et de fer zéro valent, ce qui correspondrait aux degrés d'oxydation III, II et I respectivement. La solution de citrate de titane (III) est noire opaque et il en est de même en mélange avec la vitamine B<sub>12</sub>, ce qui nous empêche de conclure sur le degré d'oxydation du cobalt au travers de la couleur de la solution (Figure 174). Des données bibliographiques indiquent cependant que le fer zéro valent ne réduit la vitamine B<sub>12</sub> qu'autre degré d'oxydation II (Kim & Carraway, 2002). En présence de dithionite de sodium, l'ajout de vitamine B<sub>12</sub> permet une conversion partielle de la chlordécone en métabolites A1 et en traces de B1. D'autres réducteurs conduisant le cobalt aux degrés d'oxydation I et II devraient être testés pour confirmer la tendance observée.



Figure 174 : Colorations de la vitamine B<sub>12</sub> en fonction de l'agent réducteur ajouté au milieu réactionnel, de gauche à droite : citrate de titane (III), sulfure de sodium, fer zéro valent, dithionite de sodium et sans agent réducteur, sous atmosphère inerte d'argon. Les solutions en présence de citrate de titane (III) et de dithionite de sodium sont amenées à pH 12 (NaOH). En présence de sulfure de sodium le pH est imposé par l'agent réducteur en solution (pH =12,6). Le mélange avec le fer zéro valent est à pH 7.

#### Etude par voltampérométrie cyclique de la vitamine B<sub>12</sub>

La vitamine B<sub>12</sub> semble jouer un rôle-clé dans l'ouverture de la cage bis-homocubane. Une étude par voltampérométrie cyclique de la vitamine B<sub>12</sub> et du mélange vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone a été réalisée par Florian Lagarde au cours d'un stage de Master 2, co-encadré par Sophie Peulon (Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, Université d'Evry Val d'Essonne, Evry) et Pierre-Loïc Saaidi (Laboratoire de Génomique et de Biochimie du Métabolisme,

Genoscope, Evry). L'étude du comportement électrochimique de la vitamine B<sub>12</sub> à pH 12 a été menée afin de déterminer les systèmes électrochimiques impliqués et estimer leur potentiel. Le balayage en pénitentiel de (0 V à -1,6V) d'une solution contenant de la vitamine B<sub>12</sub> montre différents systèmes (Figure 175) (Lagarde *et al.*, 2015).

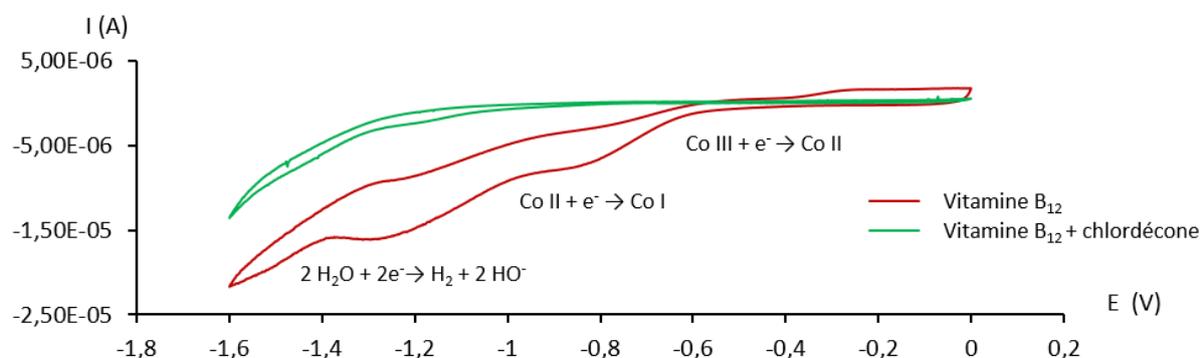


Figure 175 : Voltampérométrie cyclique de la vitamine B<sub>12</sub> avec ou sans chlordécone à pH 12 à 10 mV/s avec une électrode au dioxyde d'étain.  $E_{ESM}=+0.66$  V (Lagarde *et al.*, 2015).

Ces différents systèmes sont à comparer avec les travaux de Lexa et Savéant (Lexa & Savéant, 1983) qui ont établi le diagramme E-pH de la vitamine B<sub>12</sub> à partir de suivis spectrophotométriques et voltampérométriques pour des pH compris entre pH 1 et pH 11. Dans le cas de la vitamine B<sub>12</sub> seule, les différentes vagues observées correspondent aux réductions successives du noyau cobalt. Les potentiels d'oxydo-réduction apparents à pH 12 estimés ( $E_{app,pH12}(Co(III)/Co(II)) = -0,15$  V et  $E_{app,pH12}(Co(II)/Co(I)) = -0,50$  V) sont en accord avec les données précédemment publiées (Lexa & Savéant, 1983). Une étude par voltampérométrie cyclique (Annexe 9) de la chlordécone seule à pH 12 ne montre aucun système électrochimique (Lagarde *et al.*, 2015). L'ajout de chlordécone à la vitamine B<sub>12</sub> modifie totalement les systèmes électrochimiques présents (Co(III)/Co(II) et Co(II)/Co(I)) ce qui indique la formation d'un complexe vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone, probablement dès le degré d'oxydation III du cobalt. Ces résultats sont à confirmer en faisant une étude plus exhaustive en voltampérométrie cyclique (variation étendue du balayage et du ratio vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone) ainsi qu'en réalisant une étude spectrophotométrique.

## B. Etude du potentiel d'oxydoréduction des transformations chimiques de la chlordécone

Le potentiel d'oxydoréduction d'une solution est un indicateur de la capacité des composés en solution à gagner ou perdre des électrons. Dans le cas des transformations microbiologiques et

chimiques de la chlordécone, les conditions sont réductrices afin de favoriser une déchloration réductive (Dolfing *et al.*, 2012). Des agents réducteurs comme le sulfure de sodium, ou le citrate de titane sont ajoutés au milieu microbiologique pour maintenir les conditions réductrices contrôlées à l'aide de la résazurine, un indicateur redox dont le potentiel de virage se situe entre +10 et -110 mV à pH 7 (Chaussonnerie *et al.*, 2016). L'atmosphère des cultures microbiologiques (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 98 :2 v/v) ainsi que l'anaérobiose, favorisent également les conditions réductrices. La transformation de la chlordécone dans ces conditions a conduit à la production de trois familles de métabolites de structures très différentes. Nous nous sommes demandé si le potentiel d'oxydoréduction au cours des différentes transformations biomimétiques pouvait favoriser la production de certaines familles.

### 1. Etude bibliographique des potentiels d'oxydoréduction associés aux agents réducteurs employés

Les agents réducteurs utilisés présentent des pouvoirs de réduction dépendant du milieu dans lequel ils sont placés (pH, autres espèces en solution pouvant interagir), il n'est donc pas évident de trouver des valeurs de potentiel d'oxydo-réduction pertinentes pour notre étude. Le Tableau 13 présente les couples oxydant/réducteur et le pKa des espèces éventuellement présentes, en association avec le pH du milieu de la réaction.

Tableau 13 : Agents réducteurs utilisés dans les transformations chimiques de la chlordécone.

Espèce chimique introduite dans le milieu	pH du milieu de transformation	Couple oxydant/réducteur supposé intervenir	pKa des espèces éventuellement présentes *
Dithionite de sodium	pH amené à 12 par ajout de NaOH	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> /S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	pKa (HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) = 7,2
Sulfure de sodium	pH imposé à 12 par le sulfure de sodium	S <sub>8</sub> /HS <sup>-</sup>	pKa(H <sub>2</sub> S/HS <sup>-</sup> ) = 7 pKa (HS <sup>-</sup> /S <sup>2-</sup> ) = 12,3
Fer zéro valent solide	7 (milieu aqueux)	Fe <sup>2+</sup> /Fe(s)	
Citrate de titane	pH amené à 12 par ajout de NaOH	Citrate de Ti(IV)/Citrate de Ti(III)	

\* le dithionite étant métastable, toute valeur thermodynamique l'impliquant ne reflètera probablement son comportement (Louis-André & Gelbard, 1986).

La vitamine B<sub>12</sub> contient l'atome de cobalt qui peut être à l'état d'oxydation I, II ou III. Le Tableau 14 présente pour les différents couples d'oxydoréduction de la vitamine B<sub>12</sub>, les valeurs apparents des potentiels d'oxydoréduction en fonction du pH du milieu (Lagarde *et al.*, 2015; Lexa & Savéant, 1983)

Tableau 14 : Valeurs des potentiels apparents des couples d'oxydoréduction de la vitamine B<sub>12</sub> à pH 7 et pH 10 mesurés sur une électrode à goutte de mercure (Lexa & Savéant, 1983) et pH 12 sur une électrode d'oxyde d'étain (Lagarde *et al.*, 2015).

	pH 7	pH 10	pH 12
Co(III)/Co(II)	-0,20	-0,06	-0,15
Co(II)/Co(I)	-0,61	-0,51	-0,5

## 2. Suivi du potentiel d'oxydoréduction au cours des transformations chimiques de la chlordécone : dispositif expérimental

Toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées au Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE, Université d'Evry Val d'Essonne), sous la direction de Sophie Peulon. Le potentiel d'oxydoréduction est suivi au cours des transformations chimiques de la chlordécone par une électrode de travail qui est dans notre cas un fil de platine. L'électrode de référence est une électrode au sulfate mercurieux, placée dans une allonge en verre remplie de solution de sulfate de sodium ( $10^{-5}$  M) afin d'éviter toute pollution. Les réactions sont réalisées dans des cellules à trois cols de 50 ml (Figure 176). Le mélange est désaéré par un flux d'argon tout au long de la réaction et le bullage de ce flux crée une agitation du milieu. Les réactions sont lancées en introduisant tout d'abord les poudres, puis les liquides au préalable désaérés, en ajustant éventuellement le pH du milieu avec de la soude (1M). Le mélange est ensuite désaéré. Des duplicats concordants ont été réalisés mais par souci de clarté une seule expérience pour chaque condition est présentée.

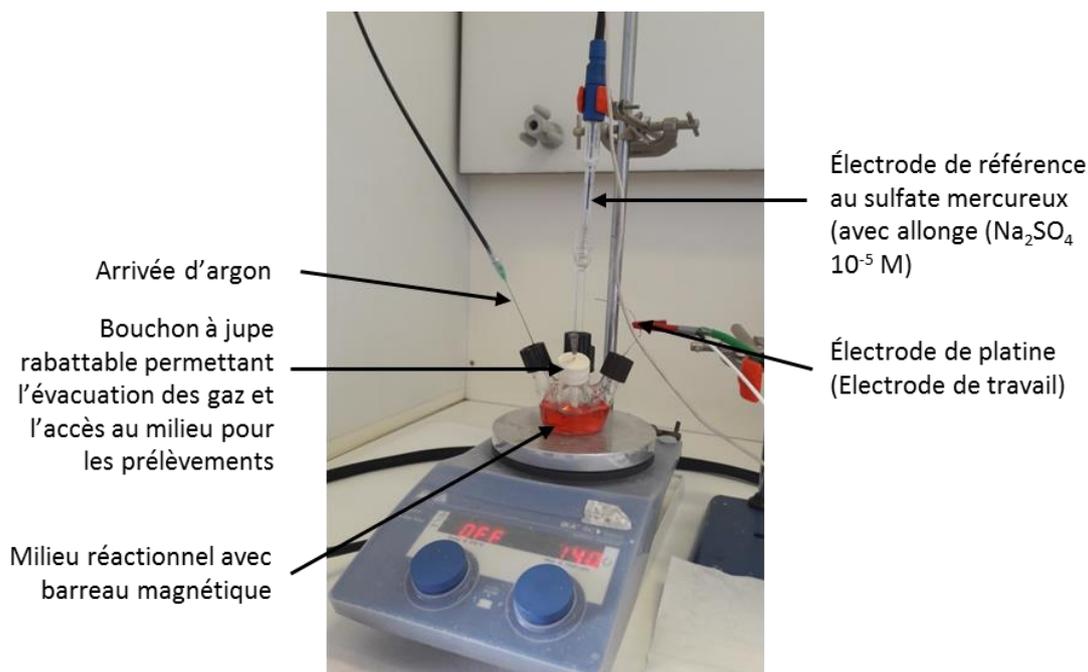


Figure 176 : Montage réalisé pour le suivi du potentiel d'oxydoréduction au cours des transformations chimiques de la chlordécone.

### 3. Suivi du potentiel d'oxydoréduction du milieu au cours des transformations chimiques de la chlordécone

Le potentiel d'oxydoréduction a été suivi au cours des différentes réactions biomimétiques conduisant ou non à la transformation de la chlordécone. Les valeurs décrites du potentiel sont celles recalculées par rapport à l'électrode normale à hydrogène ( $E_{ENH}$ ). Sur les courbes, la valeur expérimentale mesurée est précisée entre parenthèses.

#### Suivi du potentiel d'oxydoréduction en fonction des conditions du milieu réactionnel

Les conditions impliquant le dithionite de sodium et la vitamine B<sub>12</sub> ont conduit en présence de chlordécone et sous atmosphère d'argon, à un potentiel initial de - 0,47 V après l'introduction de la solution de NaOH pour amener le mélange réactionnel à pH 12,0, qui se stabilise dans un premier temps à - 0,24 V. Après cette remontée et malgré une pente moindre le potentiel continue d'augmenter au cours du temps et atteint - 0,04 V au bout de 13 heures (Figure 177). Dans ces conditions, la transformation de la chlordécone est très faible et des traces du composé A1 sont détectées. L'augmentation du potentiel au cours du temps peut être expliquée par l'instabilité du dithionite de sodium à de fortes concentrations en solution et à des pH supérieurs à 9. Des études sur

sa stabilité montrent qu'il se dismute en thiosulfate et en bisulfite selon l'équation 1, somme des équations 2 et 3 (Louis-André & Gelbard, 1986).

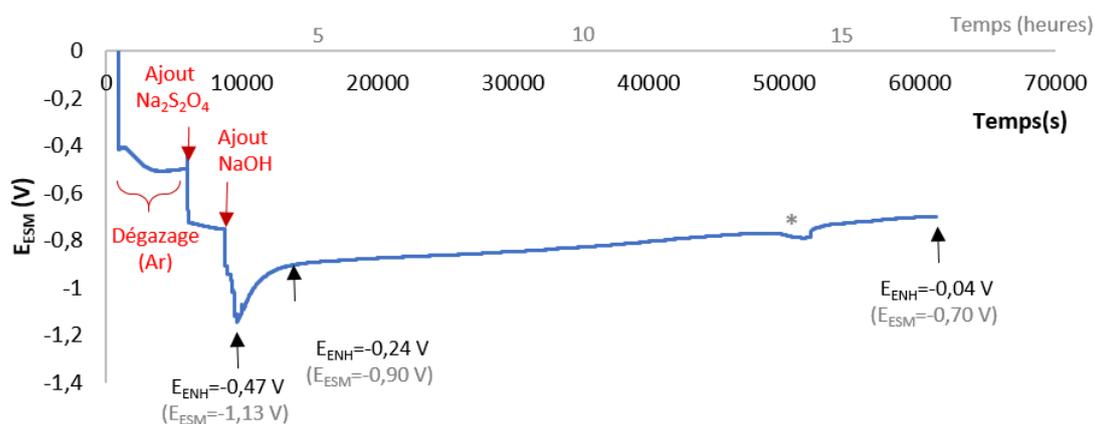
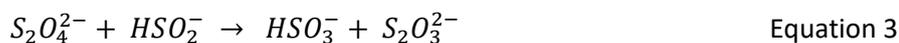
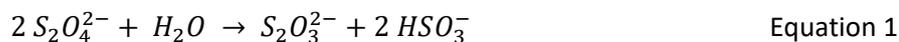


Figure 177 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurique ( $E_{\text{réf}}(\text{Sulfate Mercurique}) = 0,66 \text{ V}$ ) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de dithionite de sodium. \* artefact dû à un prélèvement.

En présence de sulfure de sodium et de vitamine B<sub>12</sub>, le potentiel dans le milieu est de  $-0,33 \text{ V}$  et est stable tout au long de la réaction (Figure 178). Ces conditions permettent la transformation totale de la chlordécone après 30 heures avec formation sélective du composé A1.

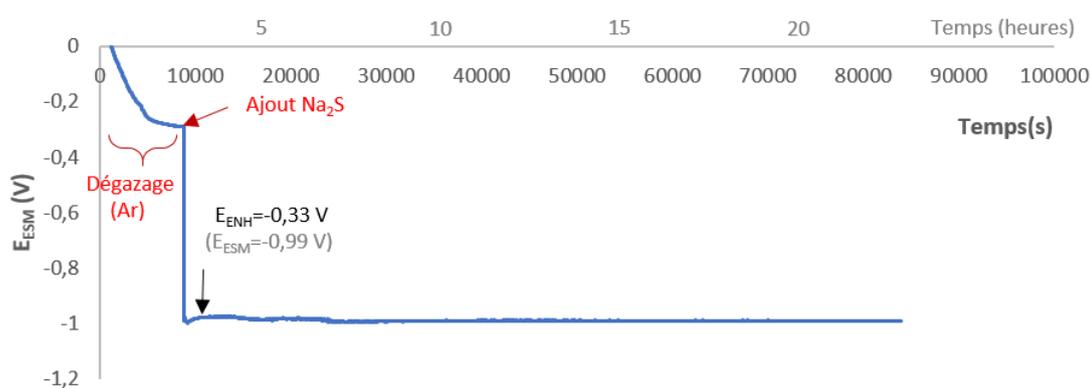


Figure 178 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurique ( $E_{\text{réf}}(\text{Sulfate Mercurique}) = 0,66 \text{ V}$ ) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de sulfure de sodium et de vitamine B<sub>12</sub>.

En présence du fer zéro valent, le milieu de transformation de la chlordécone s'établit à un potentiel d'oxydoréduction stable de  $-0,32$  V (Figure 179). Cette valeur semble moins basse qu'attendue par rapport au potentiel du couple  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}_{(s)}$  de  $-0,44$  V et aux valeurs expérimentales rencontrées lors de l'utilisation du fer zéro valent pour le traitement d'eau contaminée (Shi *et al.*, 2015) (potentiel mesuré compris entre  $-0,4$  et  $-0,6$  V). Il est à rappeler toutefois que le potentiel mesuré expérimentalement est un potentiel mixte dépendant des courants d'oxydation et de réduction dus à l'ensemble des espèces électroactives présentes, il peut donc différer des données thermodynamiques. Au cours de cette transformation, le composé A1 est produit majoritairement avec présence de traces d'autres hydrochlordécones. La transformation complète de la chlordécone en présence de fer zéro valent prend plusieurs semaines. Le suivi de potentiel n'a pu être réalisé sur une telle durée dû au balayage en continu d'argon qui doit être maintenu toute au long de la réaction. Le suivi a été réalisé sur 44 heures au bout desquelles la transformation n'était pas encore complète.

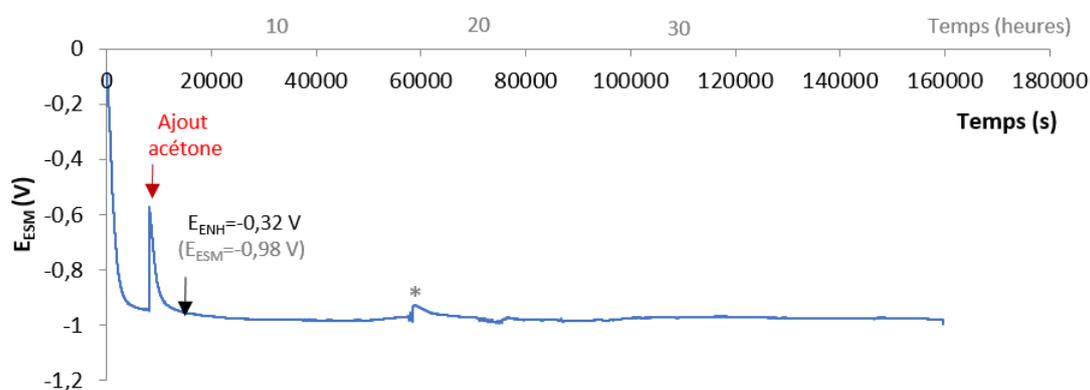


Figure 179 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercureux ( $E_{réf}(\text{Sulfate Mercureux}) = 0,66$  V) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de fer zéro valent. \* artefact dû à un prélèvement.

Avec le fer zéro valent et la vitamine  $B_{12}$  (Figure 180), le potentiel se stabilise à  $-0,28$  V. Un saut de potentiel, reproductible entre duplicats, apparaît entre 34 000 et 41 000 secondes (10 heures), le potentiel variant de  $-0,31$  V à  $-0,39$  V valeur à laquelle il se stabilise. Ces valeurs sont globalement assez proches de celles mesurées pour les expériences avec le fer zéro valent seul. Des suivis réactionnels en GC-MS et LC-MS ont été réalisés avant et après ce saut : à  $t = 25000$  s (7h), seul le composé A1 est détecté alors qu'à  $t = 68000$  s (19h), les composés  $C_i$  ( $i = 1$  à 4) sont également présents dans le milieu. Le saut de potentiel indique une modification des espèces électroactives présentes générant le potentiel observé. Puisqu'aucun saut de potentiel n'est décelable dans l'expérience avec le fer zéro valent seul, l'espèce électroactive responsable pourrait être la vitamine  $B_{12}$ . Dans cette

gamme de potentiels et à un pH neutre, la vitamine B<sub>12</sub> (native ou modifiée) serait sous la forme Co(II) (Tableau 14). La vitamine B<sub>12</sub> est connue pour subir des échanges de ligands axiaux en solution pouvant donner lieu à des réactions d'oxydo-réduction (Lexa & Savéant, 1983). L'étude préliminaire par voltampérométrie cyclique tend à montrer la formation d'un complexe vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone. La modification d'un ligand modifiant les valeurs de potentiel d'oxydo-réduction, le saut de potentiel pourrait indiquer la réduction au degré d'oxydation I du complexe vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone ce qui enclencherait le mécanisme d'ouverture de la cage bis-homocubane et conduirait ainsi à la production de la famille des composés polaires. Des prélèvements et analyse des métabolites plus proches du saut de potentiel permettraient de confirmer ces observations. Des analyses par voltampérométrie cyclique tout au long de la réaction pourraient également mettre en lumière la formation/disparition des espèces électroactives supposées.

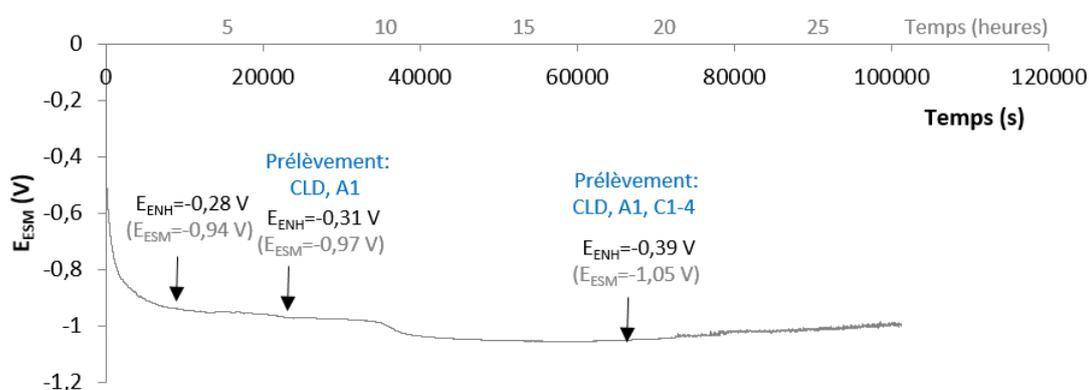


Figure 180 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercurieux ( $E_{réf}(\text{Sulfate Mercurieux}) = 0,66 \text{ V}$ ) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de fer zéro valent et de vitamine B<sub>12</sub>.

La transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane avec ou sans vitamine B<sub>12</sub> a été réalisée et le potentiel d'oxydoréduction a été suivi. Avec l'agent réducteur seul, le potentiel atteint - 0,79 V après l'ajout de NaOH pour amener la solution à pH 12. Le potentiel atteint rapidement - 0,70 V et augmente progressivement pour atteindre - 0,50 V (Figure 181). Ce potentiel, même avant ajout de NaOH, est nettement plus bas que ceux observés en présence de fer zéro valent de sulfure de sodium, attestant ainsi du pouvoir réducteur plus fort du citrate de titane (III). Dans ce cas, les hydrochlordécones, seuls produits de transformations observés, apparaissent très précocement juste après l'ajout de NaOH et s'accumulent ensuite dans le milieu.

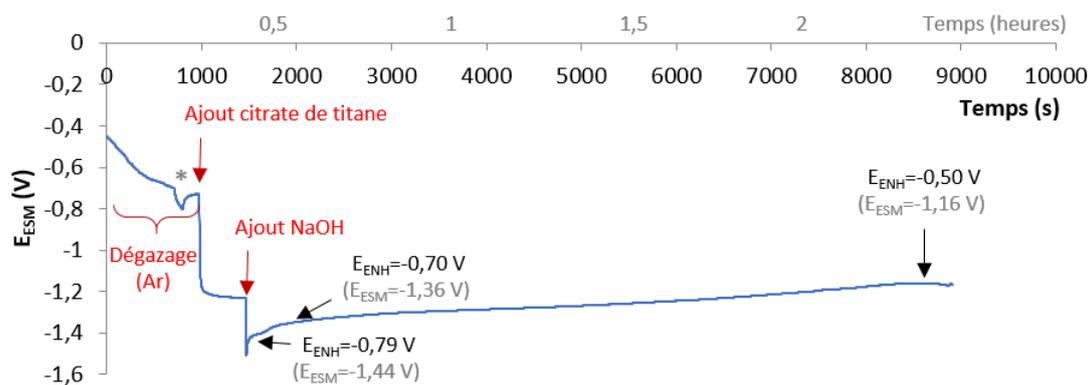


Figure 181 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction avec l'électrode au sulfate mercureux comme électrode de référence ( $E_{ESM}=0,656\text{ V}$ ) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de citrate de titane.

En présence de vitamine B<sub>12</sub> et de citrate de titane (III), le potentiel se stabilise vers  $-0,57\text{ V}$  (Figure 182) puis remonte lentement jusqu'à  $-0,50\text{ V}$ . Les analyses GC-MS et LC-MS permettent d'observer la formation immédiate d'hydrochlordécones (notamment A1) dont la disparition est ensuite associée à la formation de PCI et d'APCIC.

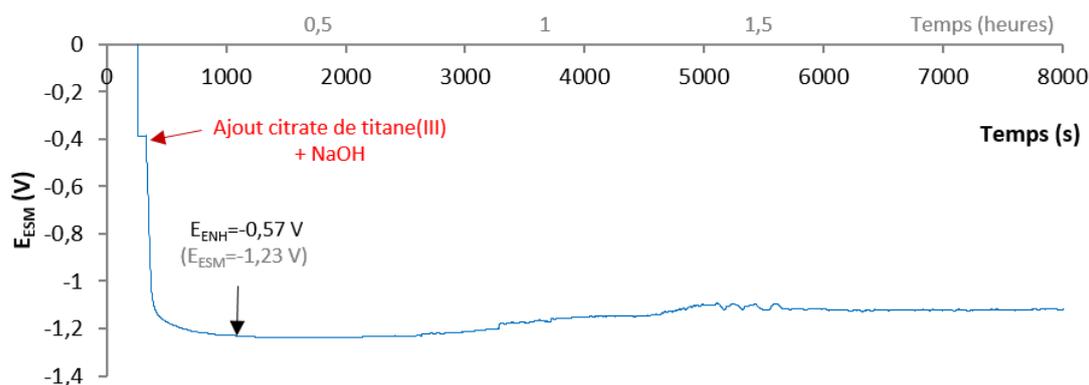


Figure 182 : Suivi du potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode au sulfate mercureux ( $E_{réf}(\text{Sulfate Mercureux}) = 0,66\text{ V}$ ) de la transformation chimique de la chlordécone en présence de citrate de titane et de vitamine B<sub>12</sub>.

Etude des conditions de formation des différentes familles de composés par suivi du potentiel d'oxydoréduction au cours de la transformation chimique avec la vitamine B<sub>12</sub> et le citrate de titane (III)

Les deux expériences impliquant le citrate de titane sont réalisées avec un large excès de cet agent réducteur (32,6 équivalents par rapport à la chlordécone) ce qui entraîne un abaissement fort

du potentiel et la formation quasi-immédiate des premiers produits de transformation. Afin d'évaluer l'influence de la quantité d'agent réducteur et donc l'effet du potentiel du milieu sur l'aspect cinétique de la réaction, plusieurs suivis ont été réalisés à l'aide d'ajouts successifs de citrate de titane (III). La réaction en présence de vitamine B<sub>12</sub> conduisant au profil de produits le plus proche de celui des expériences microbiologiques, c'est elle qui sera investiguée (Figure 183). Le milieu réactionnel contenant la chlordécone et la vitamine B<sub>12</sub> (0,3 équivalent par rapport à la chlordécone) est basifié avec 0,8 ml de NaOH 3M et la solution-mère de citrate de titane (III) à pH 7 est introduite par ajouts successifs de 0,2 ml (1/25<sup>ième</sup> de 5 ml soit 1,3 équivalent par rapport à la chlordécone). La stabilisation du potentiel après chaque ajout est respectée avant l'ajout suivant. Au total, 5 ml de la solution-mère de citrate de titane (soit 32,6 équivalents par rapport à la chlordécone) sont introduits, ce qui correspond à la même quantité qu'au cours des transformations chimiques précédentes. Le potentiel a été suivi tout au long de cette expérience et des prélèvements pour analyses en GC-MS et LC-MS ont été réalisés avant et après chaque ajout de citrate de titane. Chacun de ces ajouts provoque une chute de potentiel suivie d'une remontée vers une valeur quasi-constante au cours du temps (- 0,04 V). Au fil des ajouts, la chute de potentiel se fait plus forte et la remontée plus lente, attestant de la modification du milieu. Le double suivi analytique GC-MS/LC-MS a permis de détecter les conditions provoquant le début de production des différents composés au cours de cette réaction (Figure 183).

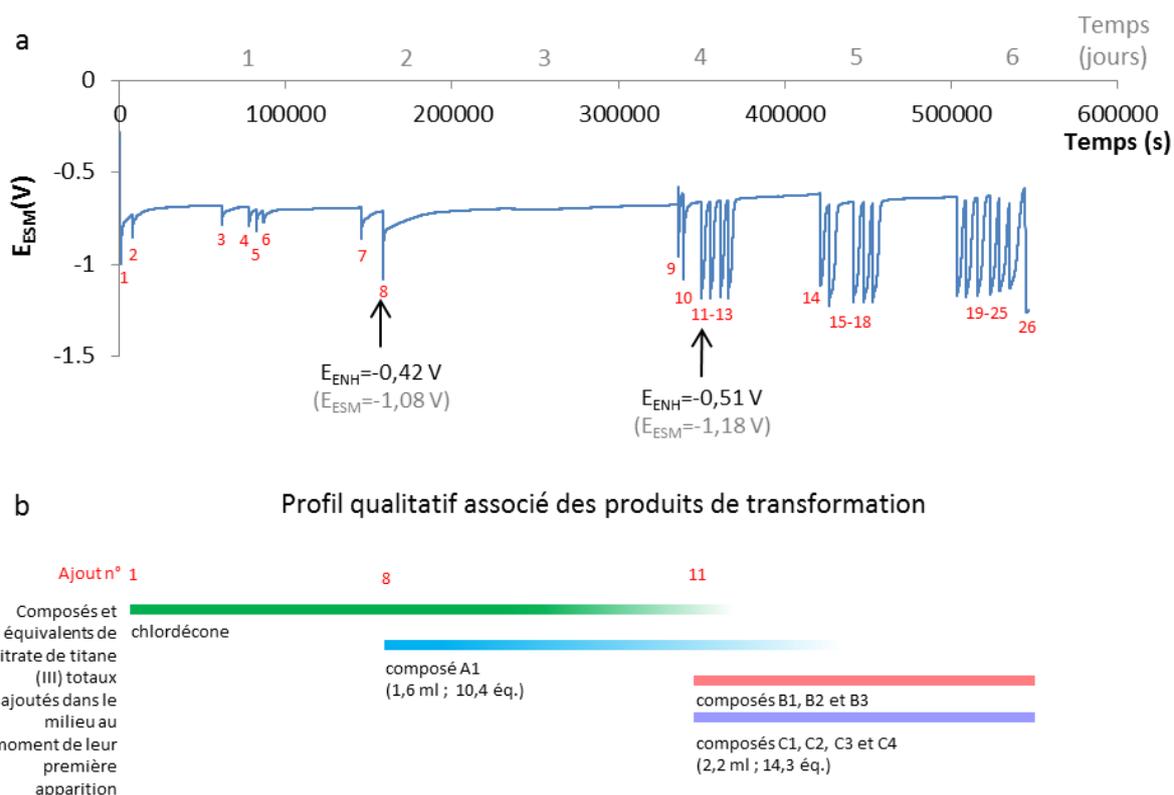


Figure 183 : (a) Suivi du potentiel d'oxydoréduction lors de la transformation chimique de la chlordécone en présence de vitamine B<sub>12</sub> et ajouts successifs de citrate de titane. En rouge, les chiffres correspondent au n<sup>ième</sup> ajout de citrate de titane (III) et (b) apparition des différents produits en fonction des ajouts.

Le tableau suivant résume les conditions (nombre d'équivalent de citrate de titane (III) et potentiel mesuré) observées lors de la détection initiale de chaque famille de composés (Tableau 15).

Tableau 15 : Nombre d'équivalents de citrate de titane introduit et potentiel d'oxydoréduction atteint pour déclencher la formation de chaque famille de composés.

première détection du composé :	A1	B1-3 et C1-4
Equivalents de citrate de titane (III)	10,4	14,3
$E_{ENH}$ (V)	- 0,42	- 0,51

L'apparition du premier produit de transformation (A1) après 10,4 équivalents de citrate de titane (III) introduit indique qu'une part significative de citrate de titane (III) serait consommée par d'autres réactions ne transformant pas la chlordécone. Ce réducteur fort réagit probablement d'abord avec les traces de dioxygène du milieu (et ou d'autres oxydants encore présents) puis doit réduire la vitamine B<sub>12</sub> (native ou modifiée) du degré III au degré II puisque le potentiel d'équilibre est de l'ordre

de -0,15 V (Tableau 14). Ces résultats semblent indiquer que la production des différentes familles est donc sensible au potentiel d'oxydoréduction du milieu. La formation des hydrochlorodécones démarre lorsque le potentiel s'abaisse à - 0,42 V. Il faut atteindre un potentiel plus bas encore (- 0,51V) pour voir apparaître simultanément les composés des familles B (PCI) et C (APCIC). Pour ces deux familles, la cage bishomocubane de la chlordécone est ouverte. Ces résultats suggèrent donc que l'ouverture de la cage requiert un potentiel plus réducteur que la formation de la famille A, compatible avec une réduction au degré I du cobalt.

En reprenant les valeurs de potentiel d'oxydoréduction obtenues pour l'ensemble des conditions de transformation réalisées, nous pouvons distinguer de manière plus générale une influence du potentiel sur la formation des différentes familles de composés. Alors que les hydrochlorodécones sont observés pour des transformations présentant un potentiel de - 0,31 V à - 0,70 V, les APCIC sont observés à des potentiels de - 0,39 V à - 0,57 V. Les PCI sont observés dans le seul cas où le potentiel atteint au moins - 0,51 V. Dans tous les cas, l'ouverture de la cage bishomocubane requière la présence de la vitamine B<sub>12</sub>, qui complexée à la chlordécone, se réduirait au degré d'oxydation I pour un potentiel de l'ordre de - 0,4 à - 0,5 V. Ceci enclencherait alors l'ouverture de la cage bishomocubane formant les produits des familles B et C. De manière plus générale, en classant les conditions du milieu en fonction du potentiel réducteur qu'elles imposent, on observe une tendance à une déchloration et à un changement dans la structure plus poussé à mesure que le milieu est réducteur (Figure 184).

Les expériences réalisées permettent de confirmer la tendance déjà décrite dans la littérature : plus le potentiel imposé par l'agent réducteur est négatif, plus les composés issus de la transformation sont déchlorés (Lewis *et al.*, 1996).

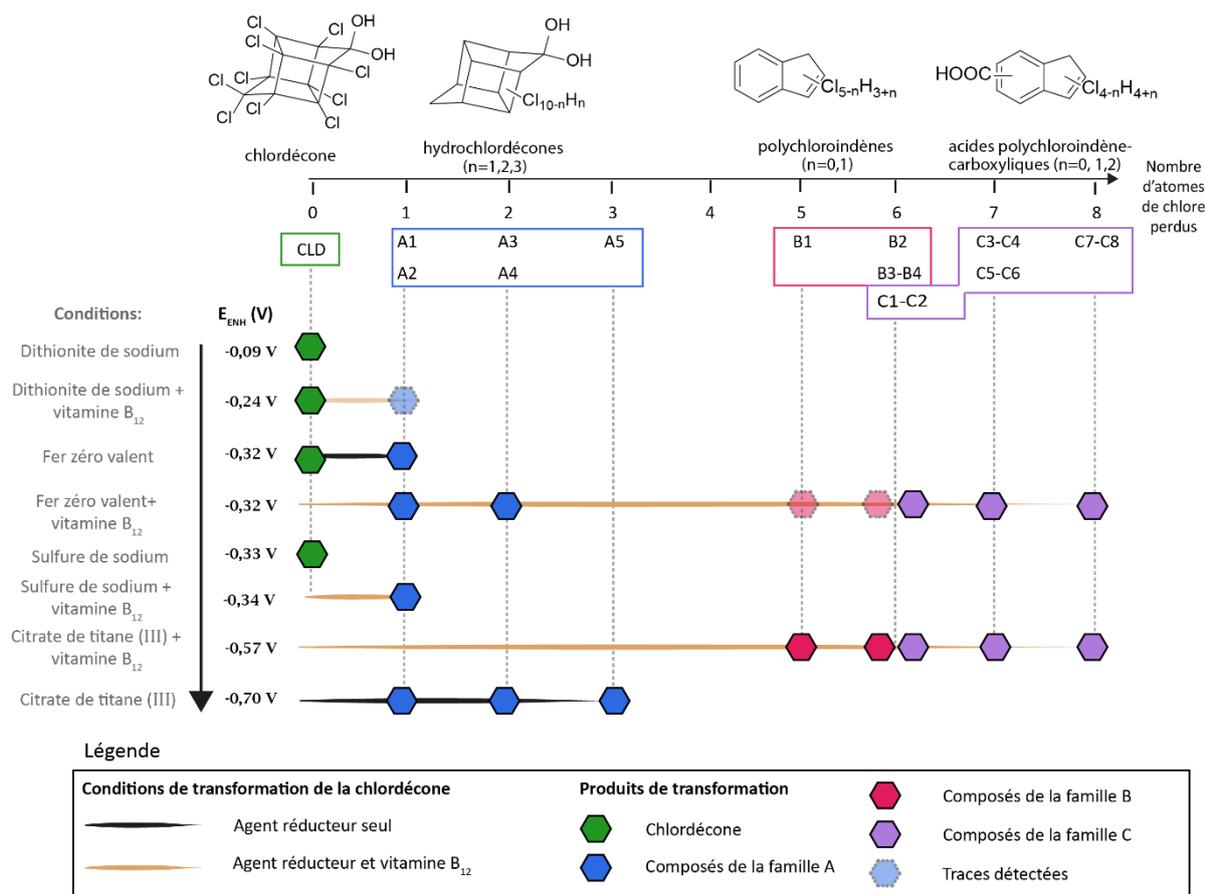


Figure 184 : Produits de transformations obtenus en fonction du potentiel d'oxydoréduction.

#### 4. Imposition d'un potentiel d'oxydoréduction

Dans le cas de la chlordécone, si le potentiel seul ne suffit pas à dicter les produits de la transformation, il apparait clairement comme un acteur dans le mécanisme. Afin de mieux distinguer l'influence des agents réducteurs en tant qu'espèces chimiques, et le potentiel d'oxydoréduction qu'ils imposent au milieu, des essais de transformation de la chlordécone ont été réalisés en imposant le potentiel dans le milieu. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un stage de Master 2 (Lagarde *et al.*, 2015) à l'époque où les méthodes de détection des composés polaires n'avaient pas encore été mises au point. Les résultats présentés ne sont donc que partiels.

En présence seule de la vitamine B<sub>12</sub> ou du sulfure de sodium, la chlordécone ne subit aucune transformation. L'imposition d'un potentiel de - 0,59 V ou de - 0,74 V a permis la détection d'une très faible conversion de la chlordécone en composés A1 et B1 à l'état de traces dans le cas de la vitamine B<sub>12</sub> seule, et du composé A1 dans le cas du sulfure de sodium seul. Le potentiel de - 0,34 V imposé au

système vitamine B<sub>12</sub>-chlordécone n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque transformation. Ces résultats indiquent que les agents réducteurs utilisés dans les réactions chimiques n'ont pas comme seul rôle d'imposer le potentiel, ils doivent aussi intervenir spécifiquement dans les mécanismes.

En conclusion de ces études, nous avons confirmé le rôle capital de la vitamine B<sub>12</sub> pour l'ouverture de la cage de la chlordécone. Les suivis de potentiels d'oxydoréduction ont permis de constater une transformation plus marquée de la chlordécone lorsque le potentiel est plus réducteur. Les composés des familles B et C pour lesquels la transformation de la chlordécone est allée jusqu'à l'ouverture de la cage nécessitent un potentiel plus réducteur que les hydrochlordécones pour se former. Enfin, les études préliminaires menées sur la transformation chimique de la chlordécone en imposant un potentiel dans le milieu pour s'affranchir des espèces chimiques sont prometteuses (Lagarde *et al.*, 2015). L'ensemble des travaux initiés méritent d'être approfondis afin de confirmer les premiers résultats. Une étude électrochimique additionnelle des expériences de transformation microbiologique de la chlordécone permettra de faire le lien entre tous ces résultats et ainsi approcher au plus près l'ensemble des mécanismes opérants.

## II. Place des métabolites au cours des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone

Trois familles de métabolites produits par la chlordécone ont été observées et nous cherchons à savoir si elles sont formées de façon indépendante ou en lien étroit les unes aux autres. Nous étudierons dans un premier temps la capacité des bactéries (consortium 86 et souche *Citrobacter* 86-1) à transformer ou non les métabolites précédemment isolés avant d'appliquer les protocoles chimiques de transformation. Afin d'évaluer si l'intégralité des atomes de carbone des métabolites provient bien de la chlordécone, des expériences de transformation de la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  ont également été réalisées.

### A. Etude de la distribution isotopique des métabolites produits à partir de la chlordécone marquée au carbone $^{13}\text{C}$

#### 1. Présentation de la chlordécone marquée au $^{13}\text{C}$

La chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  employée pour ces études de transformation provient de la société Azur Isotopes et est produite à façon à partir d'hexachlorocyclopentadiène marqué sur quatre des cinq atomes de carbone (Figure 185).

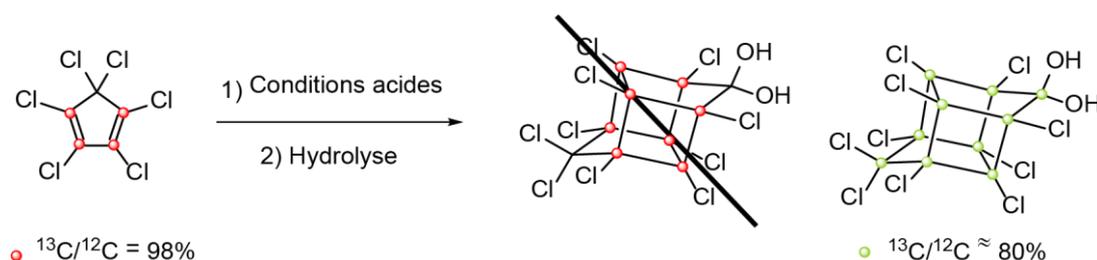


Figure 185 : Synthèse de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone à partir d'hexachlorocyclopentadiène.

Alors que la chlordécone finalement obtenue après synthèse totale était supposée être marquée sur les huit atomes de carbone de la cage mais pas ceux des pointes de la structure bishomocubane, des études menées en RMN nous ont permis de prouver son marquage homogène sur les dix atomes de carbone avec une probabilité moyenne de marquage au  $^{13}\text{C}$  approchant 0,8 pour chacune des dix positions. Les conditions opératoires très acides de dimérisation de l'hexachlorocyclopentadiène (communication personnelle de A. T. Lormier, Azur Isotopes) nécessaires à la formation de la cage bis-homocubane sont sans doute propices à une telle isomérisation. L'étude du spectre de masse obtenu en LC-MS en mode négatif a permis de proposer par simulation du massif

moléculaire de la chlordécone marquée, les proportions de 56% de  $^{13}\text{C}_8^{12}\text{C}_2\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ , 33% de  $^{13}\text{C}_7^{12}\text{C}_3\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$  et 11% de  $^{13}\text{C}_6^{12}\text{C}_4\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ . (Figure 186).

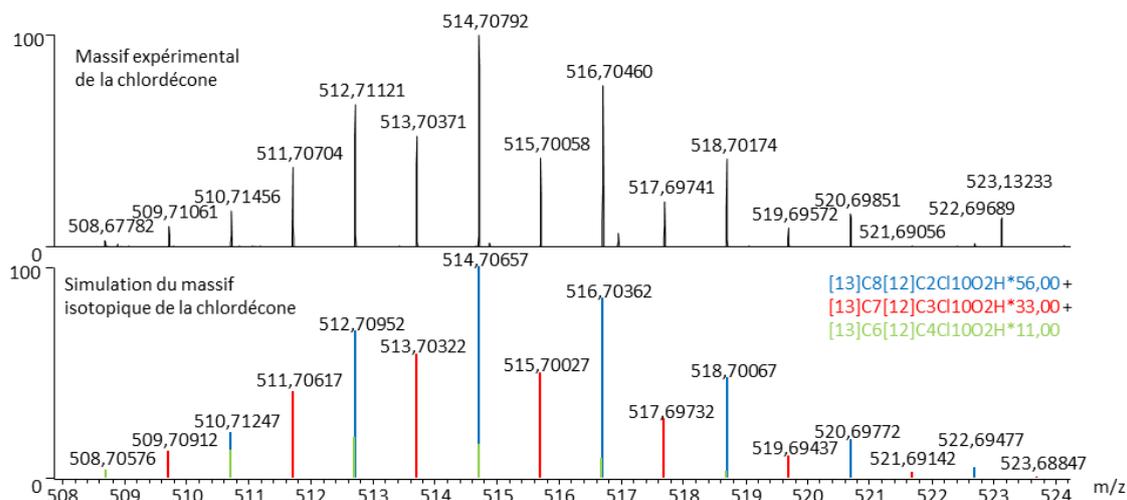


Figure 186 : Comparaison du massif isotopique obtenu par ESI-Orbitrap (haute résolution) de la chlordécone ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) marquée au  $^{13}\text{C}$  avec une simulation.

L'homogénéité de la distribution isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  a également été étudiée par RMN. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la chlordécone marquée au carbone  $^{13}\text{C}$  dans l'acétone- $\text{d}_6$  montre les cinq signaux caractéristiques attendus avec, cependant, des valeurs d'intégration éloignées de celles correspondant à une distribution statistique (C5/C10/C9/C4/C8 1:1:2:2:4) (Figure 187).

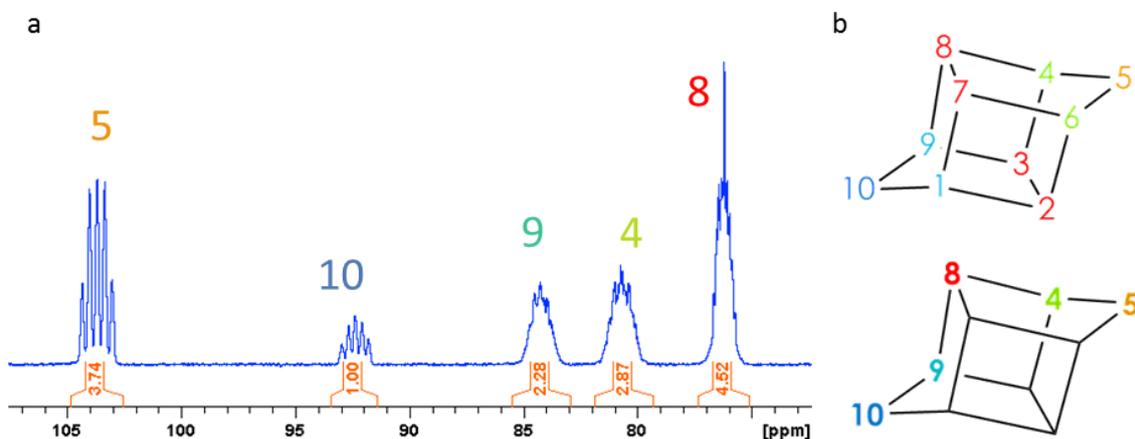


Figure 187 : (a) Extrait du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone- $\text{d}_6$  à 75 MHz et (b) numérotation des atomes de carbone selon la nomenclature IUPAC pour correspondance avec les signaux du spectre. Les atomes de carbone chimiquement équivalents sont représentés d'une même couleur. Le chiffre retenu pour représenter les atomes de carbone équivalents est indiqué sur la structure inférieure.

Une deuxième expérience RMN  $^{13}\text{C}$  avec une séquence impulsionnelle optimisée pour la quantification des atomes de carbone  $^{13}\text{C}$  (délai de relaxation allongé à 40 s) est réalisée mais sans modification notable des valeurs d'intégration (Figure 188).

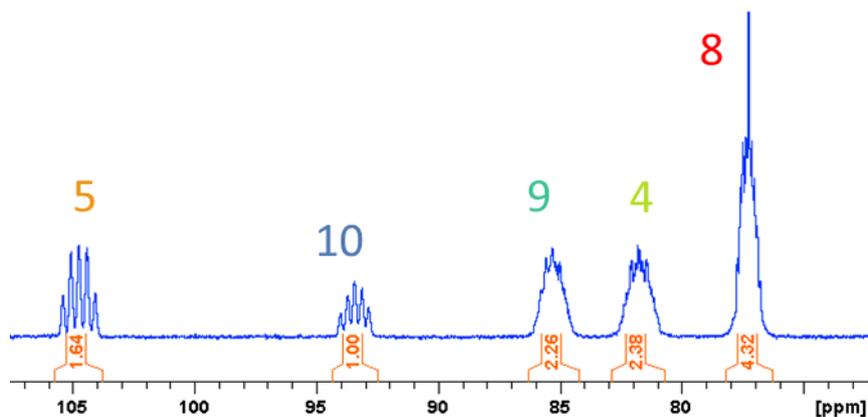


Figure 188 : Extrait du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  quantitatif de la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone- $\text{d}_6$  à 75 MHz.

C'est surtout le signal de l'atome de carbone C5 qui interroge car il montrerait un enrichissement apparent  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  trois à quatre fois supérieur à la moyenne des autres atomes de carbone. Cette possible anomalie pourrait s'expliquer par le fait que le découplage  $^1\text{H}$  simultané à l'acquisition du signal  $^{13}\text{C}$  conduise à un transfert d'aimantation sur l'atome de carbone C5 portant les protons de la fonction gem-diol. Une expérience est donc réalisée en introduisant quelques gouttes de  $\text{D}_2\text{O}$  à l'échantillon afin de remplacer les protons de la fonction gem-diol par les atomes de deutérium. Le spectre  $^{13}\text{C}$  obtenu montre bien une modification nette de l'intensité du signal de l'atome de carbone C5, la distribution expérimentale  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du squelette carboné est alors bien en accord avec la distribution statistique a priori attendue (Figure 189).

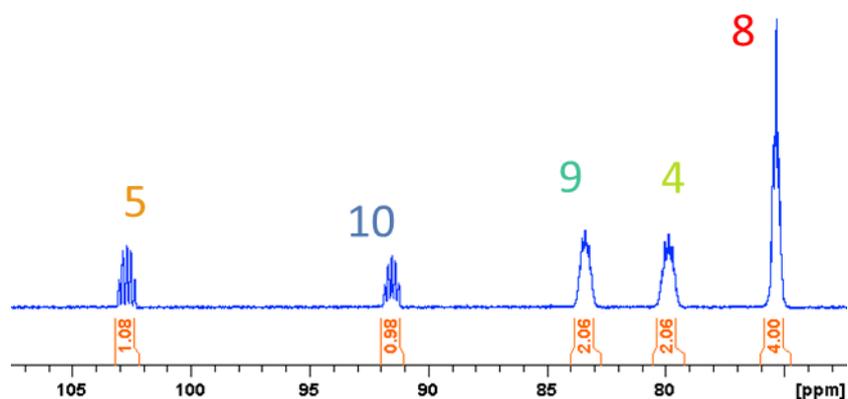


Figure 189 : Extrait du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  quantitative avec séquence optimisée de la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  commercialisée par Azur Isotope réalisé dans l'acétone- $\text{d}_6$  en présence de  $\text{D}_2\text{O}$ , à 150 MHz.

A ce stade, nous pouvons donc affirmer que le marquage  $^{13}\text{C}$  est bien homogène sur l'ensemble de la structure. Ces résultats préliminaires sont importants pour l'étude mécanistique puisque nous cherchons à évaluer la distribution des atomes de carbone dans les métabolites dont le squelette carboné est modifié. Les informations utiles pour la suite de la distribution isotopique de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone, considérée comme homogène, sont résumées en Figure 190.

#### Marquage initial de la chlordécone

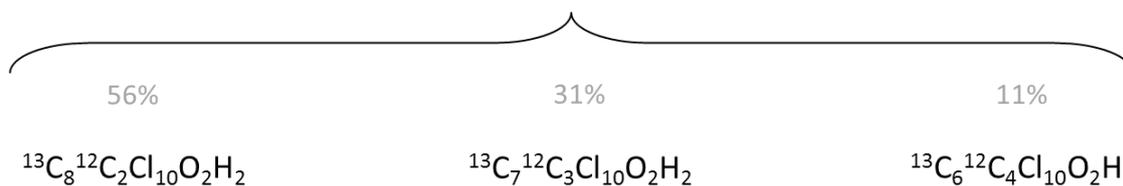


Figure 190 : Distribution isotopique des atomes de carbone de carbone dans la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$ .

## 2. Résultats de la transformation de la chlordécone marquée au $^{13}\text{C}$ en conditions microbiologiques

La transformation de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone est étudiée afin d'évaluer si l'intégrité du squelette carboné des métabolites provient de la chlordécone, en particulier dans le cas des APCIC qui pourraient résulter de la carboxylation des PCI.

Du fait de la faible quantité de chlordécone marquée au carbone  $^{13}\text{C}$ , une modification du protocole de transformation microbiologique a été effectuée en induisant la chlordécone à une concentration de 5 mg/L au lieu de 50 mg/L.

Dans ces conditions, un contrôle positif a été réalisé au préalable avec de la chlordécone marquée au carbone  $^{12}\text{C}$  (Figure 191 et Figure 192). La transformation de la chlordécone marquée au carbone  $^{13}\text{C}$  s'est également déroulée avec succès en produisant les métabolites principaux marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  (A1, B1, C1, C2, C3 et C4) (Figure 193 et Figure 194). La distribution de leur marquage a été étudiée afin de s'assurer que les atomes de carbone des métabolites proviennent tous de la chlordécone. Les chromatogrammes présentés proviennent d'analyses de prélèvement réalisés après 45 jours de transformation.

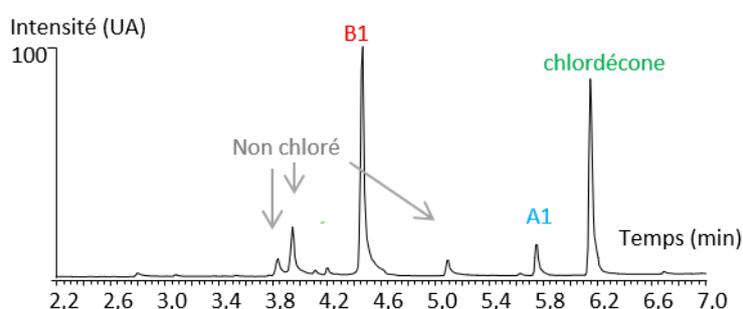


Figure 191 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbiologique de la chlordécone par *Citrobacter* 86-1 après extraction.

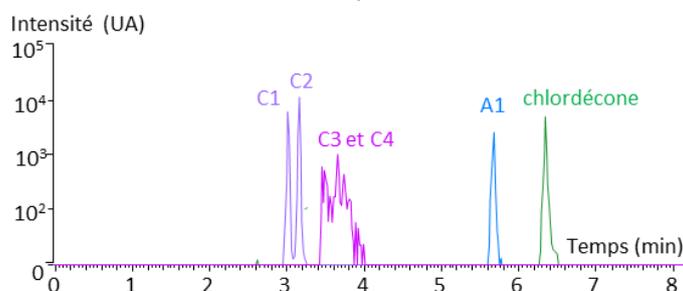


Figure 192 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbiologique de la chlordécone par *Citrobacter* 86-1.

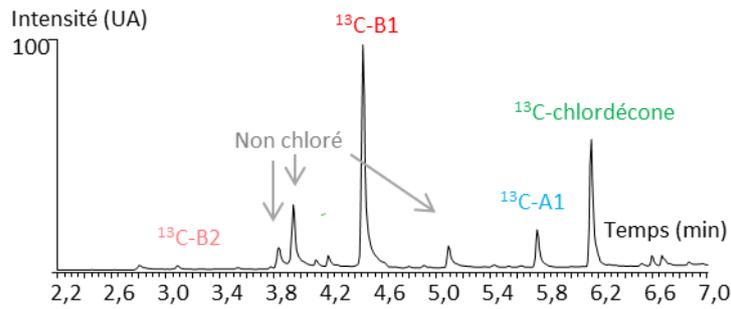


Figure 193 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbienne de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone par *Citrobacter* 86-1 après extraction.

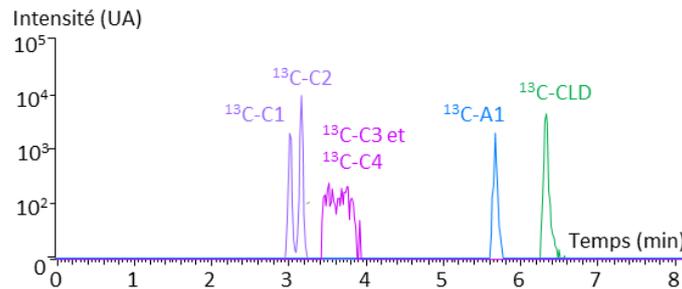


Figure 194 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbienne de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone par *Citrobacter* 86-1.

Le monohydrochlordécone A1 a la même distribution isotopique que la chlordécone (Figure 195). Ce résultat est attendu du fait de la structure bishomocubane dont l'ouverture et la reformation serait statistiquement improbable au vu des conditions thermiques et chimiques nécessaires pour la créer (Epstein, 1978).

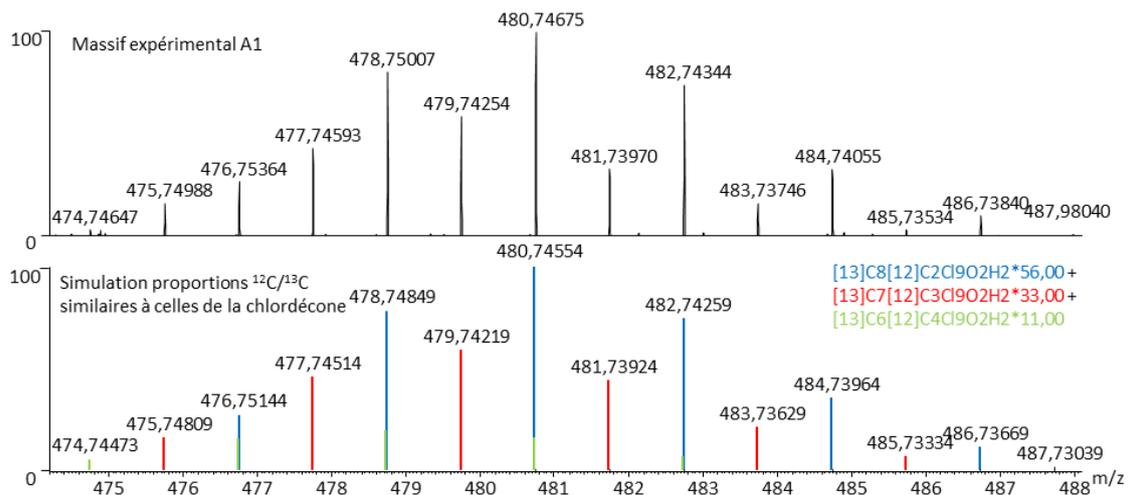


Figure 195 : Comparaison du massif isotopique moléculaire obtenu par ESI-Orbitrap-MS (haute résolution) du métabolite A1 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) marquée au  $^{13}\text{C}$  avec une simulation.

Les PCI ont une distribution isotopique des atomes de carbone légèrement différente de celle de la chlordécone. La perte d'un carbone qu'il soit un isotope léger ( $^{12}\text{C}$ ) ou lourd ( $^{13}\text{C}$ ) perturbe la distribution et conduit à quatre distributions possibles : huit  $^{13}\text{C}$  et un  $^{12}\text{C}$  (dans le cas où un  $^{12}\text{C}$  est perdu au cours de la transformation depuis  $^{13}\text{C}_8^{12}\text{C}_2\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ ), sept  $^{13}\text{C}$  et deux  $^{12}\text{C}$  (dans le cas où un  $^{13}\text{C}$  est perdu depuis  $^{13}\text{C}_8^{12}\text{C}_2\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$  ou si un  $^{12}\text{C}$  est perdu depuis  $^{13}\text{C}_7^{12}\text{C}_3\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ ), six  $^{13}\text{C}$  et trois  $^{12}\text{C}$  (si un  $^{13}\text{C}$  est perdu depuis  $^{13}\text{C}_7^{12}\text{C}_3\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$  ou si un  $^{12}\text{C}$  est perdu depuis  $^{13}\text{C}_6^{12}\text{C}_4\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ ) ou cinq  $^{13}\text{C}$  et quatre  $^{12}\text{C}$  (si un  $^{13}\text{C}$  est perdu depuis  $^{13}\text{C}_6^{12}\text{C}_4\text{Cl}_{10}\text{O}_2\text{H}_2$ ). La Figure 196 présente les différentes origines expliquées pour la distribution isotopique des composés PCI marqués au  $^{13}\text{C}$ .

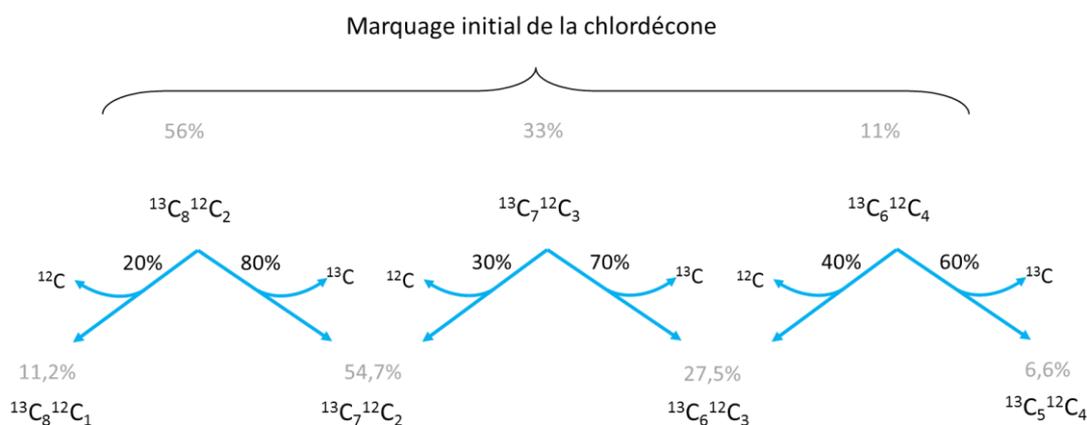


Figure 196 : Origine des différents massifs isotopiques observés pour le métabolite B1 depuis la transformation microbologique de la chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$ .

La simulation du massif avec les proportions décrites ci-dessus, dans le cas du métabolite B1 correspond assez bien au massif moléculaire du métabolite B1, observé par GC-EI-MS (Figure 197).

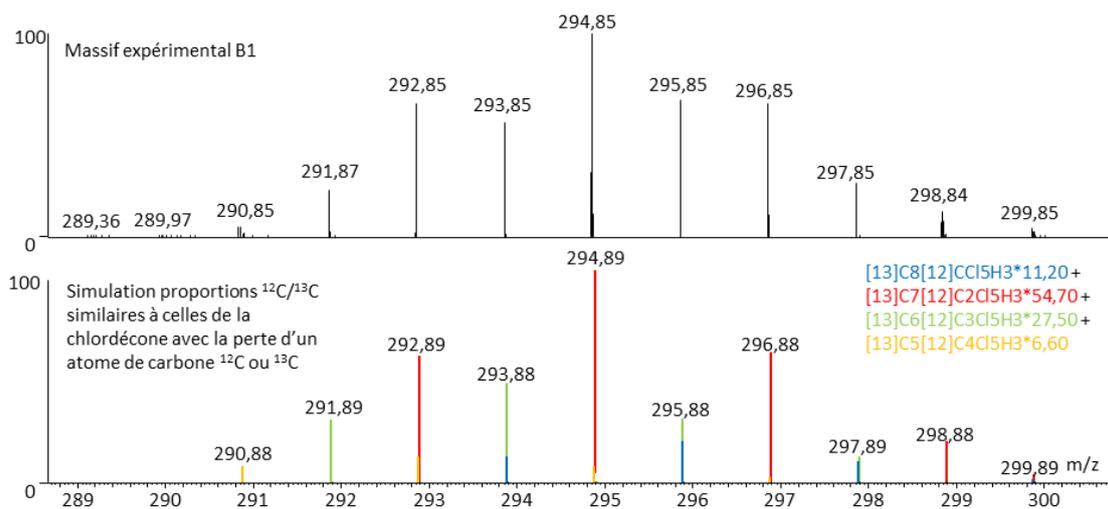


Figure 197 : Comparaison du massif isotopique obtenu par GC-EI-MS (basse résolution) de l'ion moléculaire du métabolite B1 marqué au  $^{13}\text{C}$  avec une simulation.

La famille des acides polychloroindénecarboxyliques (APCIC) présente une fonction acide carboxylique dont l'origine pourrait être une carboxylation depuis la structure des PCI (Chakraborty & Coates, 2005; Ebenau-Jehle *et al.*, 2012; Mouttaki, *et al.*, 2012). En effet, la provenance exogène d'un carbone changerait la distribution isotopique et se traduirait par une différence de proportions des massifs isotopiques en spectrométrie de masse, comme présenté en Figure 198. L'abondance naturelle des isotopes du carbone est de 98,9% pour le  $^{12}\text{C}$  et 1,1% pour le  $^{13}\text{C}$ . A partir d'une structure à neuf atomes de carbone, l'intégration d'un carbone exogène (isotope  $^{12}\text{C}$  pris en compte uniquement) conduirait à une répartition de 11,2% de  $^{13}\text{C}_8^{12}\text{C}_2\text{Cl}_4\text{O}_2\text{H}_4$ , de 54,7% de  $^{13}\text{C}_7^{12}\text{C}_3\text{Cl}_4\text{O}_2\text{H}_4$ , de 27,5% de  $^{13}\text{C}_6^{12}\text{C}_4\text{Cl}_4\text{O}_2\text{H}_4$  et de 6,6% de  $^{13}\text{C}_5^{12}\text{C}_5\text{Cl}_4\text{O}_2\text{H}_4$  (Figure 198).

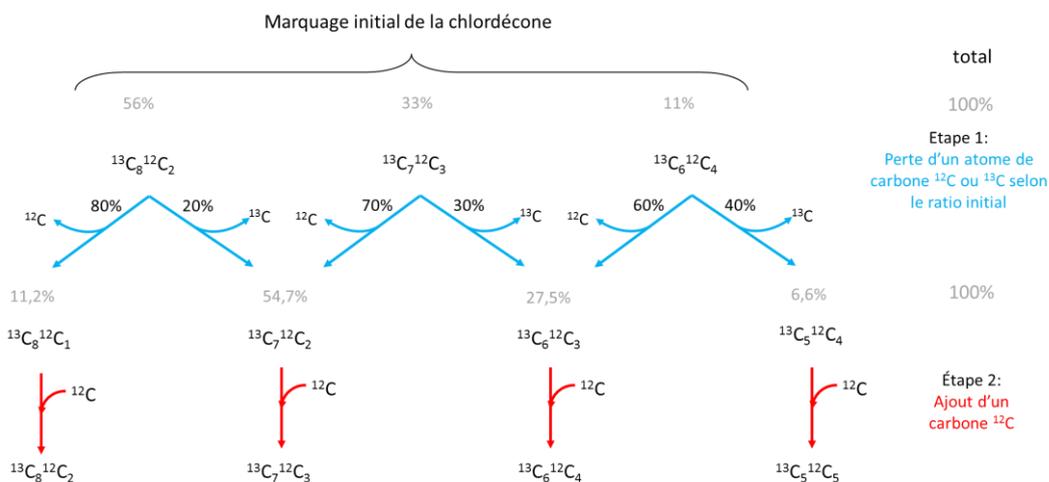


Figure 198 : Origine des différents massifs isotopiques dans la perte d'un atome de carbone suivie de l'incorporation d'un carbone exogène ( $^{12}\text{C}$  uniquement pour simplification).

Les massifs isotopiques du métabolite C1 sont présentés en Figure 199. Le massif moléculaire du métabolite C2 présente le même profil. La comparaison du massif moléculaire expérimental du métabolite C3 avec les simulations correspondantes est présentée en Annexe 10.

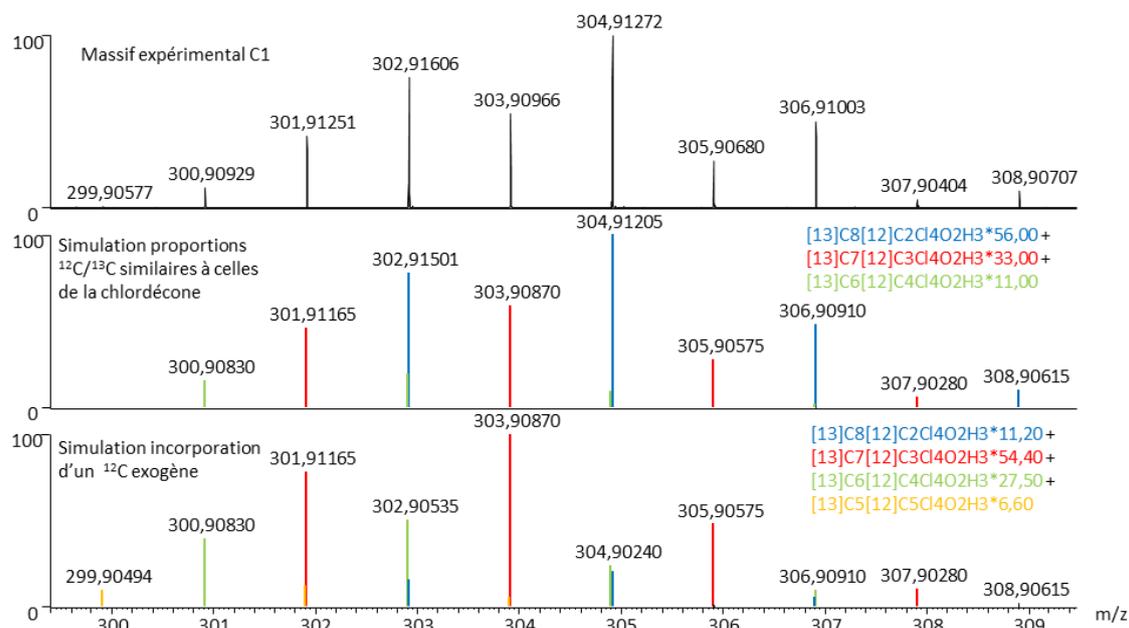


Figure 199 : Comparaison du spectre de masse obtenu par ESI-Orbitrap (haute résolution) du métabolite C1 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) marquée au  $^{13}\text{C}$  avec simulation du massif dont les 10 atomes de carbone seraient issus de la chlordécone et simulation du massif issu de la perte d'un carbone  $^{12}\text{C}$  ou  $^{13}\text{C}$  suivi de l'incorporation d'un atome de carbone exogène ( $^{12}\text{C}$ ).

La transformation de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone nous a permis de lever le doute sur l'origine du carbone de la fonction acide carboxylique présente sur les métabolites polaires. La distribution

isotopique du massif moléculaire de ces composés est similaire à celle de la chlordécone (Figure 199). Nous pouvons ainsi affirmer que les dix atomes de carbone de ces composés proviennent bien de la chlordécone.

## B. Transformation microbiologiques et chimiques des métabolites isolés

L'hypothèse actuellement privilégiée pour expliquer la formation des dérivés PCI et APCIC est une déchloration partielle (-1, -2 ou -3 Cl) de la chlordécone suivie d'une ouverture de la cage. Afin de conforter cette hypothèse, les trois hydrochlordécones A1, A2 et A3 produits et purifiés par voie chimique ont été mis en présence des bactéries (consortium 86 et *Citrobacter* 86-1) afin de voir s'ils étaient transformés et s'ils conduisaient à la formation des autres familles de métabolites. Les témoins négatifs (en présence de chlordécone sans bactérie) n'ont pas montré de transformation. Les témoins positifs (en présence de chlordécone et de bactéries) ont bien validé la capacité de transformation des microorganismes dans cette série d'expériences. Les chromatogrammes obtenus pour les expériences avec le consortium 86 et la bactérie *Citrobacter* 86-1 sont très proches (Annexe 11) et seuls ceux obtenus avec la bactérie *Citrobacter* 86-1 sont présentés (Figure 191 et Figure 192).

Les chromatogrammes présentés ci-dessous sont issus d'expériences microbiologiques réalisées avec chacun des métabolites purifiés disponibles (A1, A2 ou A3). Les quantités de métabolites disponibles étant faibles, les cultures sontensemencées à 5 mg/L de substrat.

La faible concentration des composés dans les cultures n'a pas permis de les suivre par la méthode classique en GC-MS. La détection des composés polychloroindènes (PCI) a nécessité le développement d'un protocole d'extraction poussé avec le toluène comme solvant d'extraction ainsi que l'utilisation du mode d'acquisition SIM (Single Ion Monitoring) afin d'améliorer la sensibilité de la détection (Delphine Muselet, Tiphonie Pruvost, Pierre-Loïc Saaidi). Le courant ionique total est présenté, les métabolites et composés détectés sont précisés sur le chromatogramme. Le suivi des composés polaires et hydrochlordécones issus des analyses par LC-MS contient la superposition des chromatogrammes par extrait des ions à partir du pic monoisotopique de l'analyte déprotoné [M-H].

### 1. Transformations microbiologique et chimique du métabolite A1

En conditions microbiologiques avec le consortium 86 et la bactérie *Citrobacter* 86-1, le composé A1 n'a subi aucune transformation détectable ce qui concordant avec l'apparente

accumulation de A1 au cours de la transformation de la chlordécone par voie microbologique (Figure 200 et Figure 201).

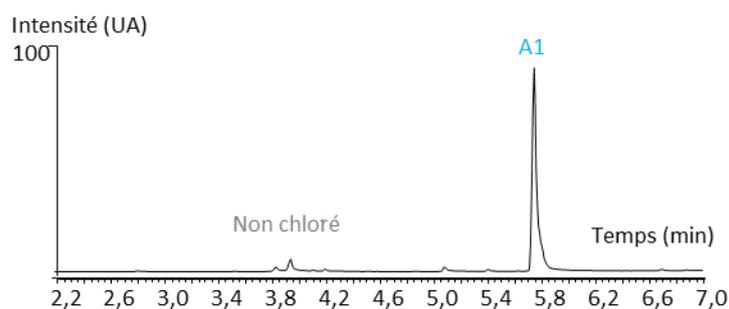


Figure 200 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A1 par *Citrobacter* 86-1 après extraction.

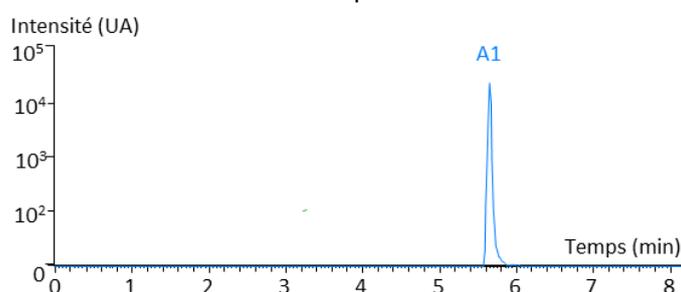


Figure 201 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A1 par *Citrobacter* 86-1.

Il semblerait donc qu'il ne soit pas un intermédiaire réactionnel mais plutôt un produit final d'une des voies de transformation de la chlordécone. Cependant, à ce stade on ne peut pas exclure d'autres aspects qui bloqueraient la transformation du métabolite A1. Par exemple, dans le cas où la chlordécone serait transformée à l'intérieur des bactéries, il serait possible que malgré leurs structures très proches, le composé A1 ne puisse traverser la membrane cellulaire et ainsi y être transformé (Renpenning *et al.*, 2015).

Afin de s'affranchir d'éventuelles limitations biologiques et ainsi se concentrer sur l'aspect mécanistique, nous avons décidé d'essayer de transformer le composé A1 par voie chimique. Les résultats précédents (Chapitre 4) ont montré que les conditions {citrate de titane (III)-vitamine B12} conduisaient au profil de produits le plus proche de celui observé lors des transformations par voie microbologique (familles de métabolites B et C privilégiés). Ces conditions biomimétiques, appliquées au composé A1, ont conduit à de nombreux composés chlorés incluant des hydrochlordécones, des PCI et des APCIC. Parmi les PCI, B2 semble être le composé majoritaire d'après les intensités des pics chromatographiques (GC-MS). Il est accompagné de trois composés de formule brute  $C_9Cl_3H_5$  (Figure

202) mais c'est surtout l'absence de B1 et de B3 qui doit être soulignée. Les APCIC formés sont C5, C6, C7, C8 ainsi que deux acides dichloroindèncarboxyliques minoritaires nommés C9 et C10. Ni C1, ni C2 ne sont détectés en LC-Orbitrap-MS à l'issue de la réaction chimique (Figure 203).

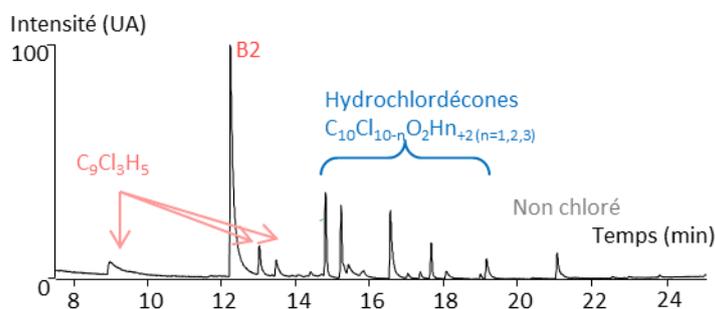


Figure 202 : Chromatogramme (GC-MS) de la transformation chimique (vitamine B<sub>12</sub> et citrate de titane) du composé A1 après extraction.

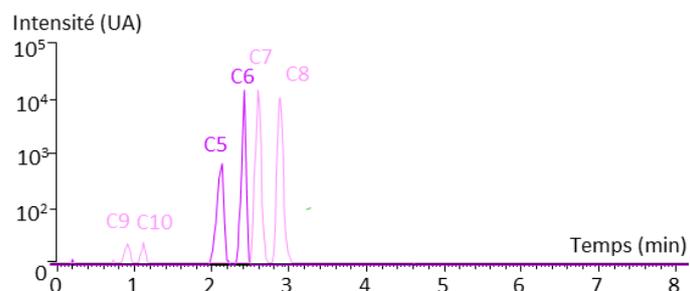


Figure 203 : Chromatogramme (LC-Orbitrap-MS) de la transformation chimique (vitamine B<sub>12</sub> et citrate de titane) du composé A1.

L'identification du composé B2 comme représentant majoritaire des PCI et l'absence de B1 et B3 sont d'une importance primordiale dans l'élucidation du mécanisme de transformation de la chlordécone. Connaissant la position du seul proton fixé à la structure bis-homocubane du composé A1 et sachant que les conditions chimiques appliquées provoquent la transformation de la chlordécone en composé B1, nous en déduisons que l'atome de carbone en position 10 sur la cage bis-homocubane de la chlordécone et de A1 se retrouve en position 2 dans la structure indène (Figure 204).

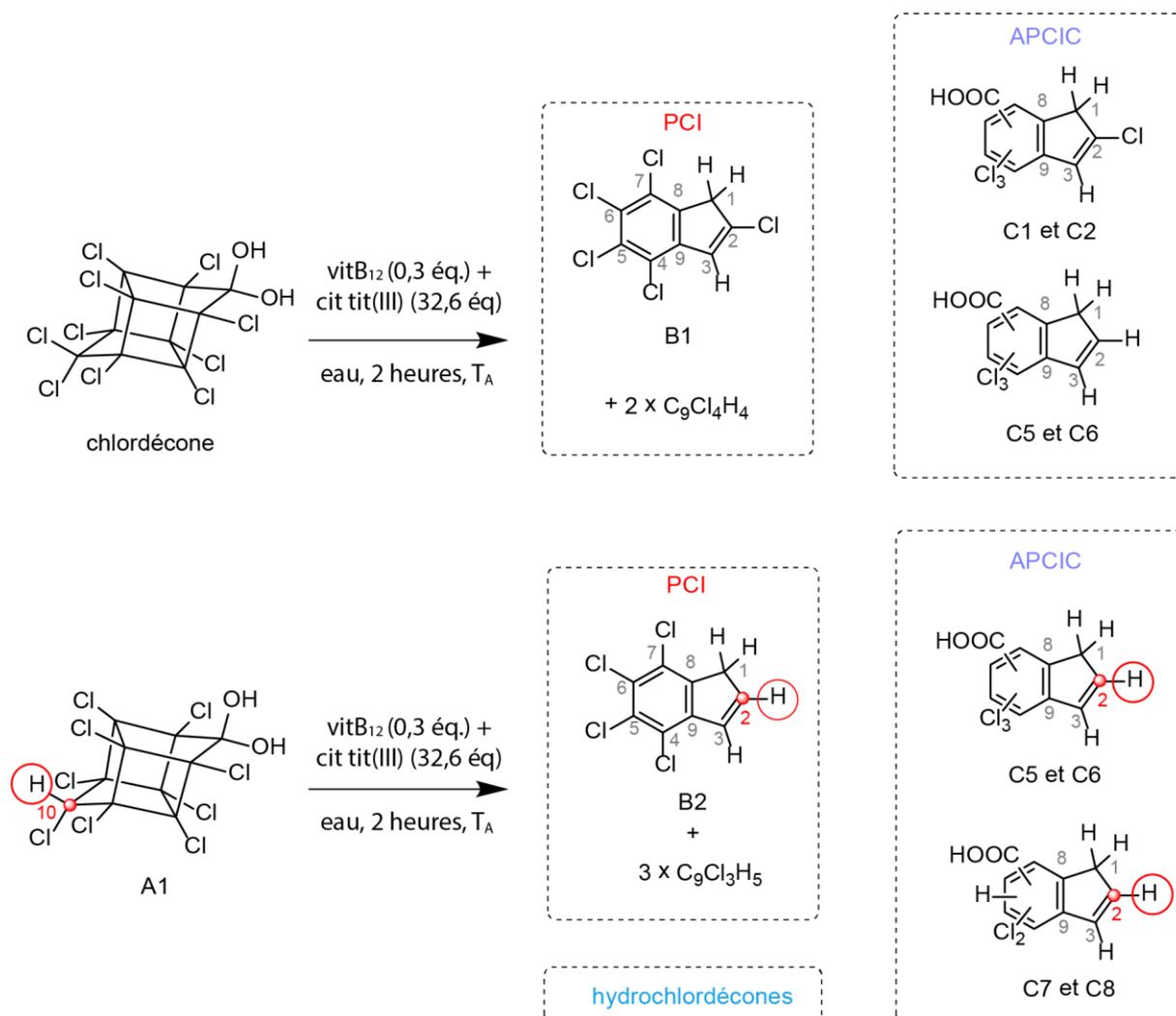


Figure 204 : Comparaison des produits de réaction à l'issue des transformations chimiques de la chlordécone et du métabolite A1.

De plus, les structures des composés C5, C6, C7 et C8 qui possèdent tous un proton en position 2 de la structure indène vont dans le sens de cette hypothèse. La présence des composés C5 et C6, dont l'atome de carbone en position 2 porte un proton sont produits au cours de la transformation de la chlordécone par voie chimique. Leur présence n'est pas contradictoire avec la démonstration de l'hypothèse car le métabolite A1 est lui-même détecté au cours de cette transformation et les composés C5 et C6 pourraient en être issus.

## 2. Transformation microbologique du métabolite A2

Le composé A2 (8-monohydrochlordécone) est transformé en présence des bactéries. Les transformations microbologiques avec le consortium 86 et la bactérie *Citrobacter* 86-1 ont provoqué la consommation du composé A2 et la détection associée à l'état de traces des polychloroindènes B1,

B2 et B3 (Annexe 12 et Annexe 13) les acides polychloroindènedicarboxyliques C1 et C2 ainsi que C3 et C4 mais en plus faibles proportions (Figure 206). Deux dihydrochlorodécones dont A4, présenté au chapitre 2 et un autre, différent du composé A3 ont aussi été observés dans ce cas. Parce que les métabolites issus de la transformation du métabolite A2 sont très proches de ceux formés par la chlordécone dans les mêmes conditions, ces résultats laissent penser que le composé A2 pourrait être un métabolite intermédiaire au cours de la transformation microbologique de la chlordécone.

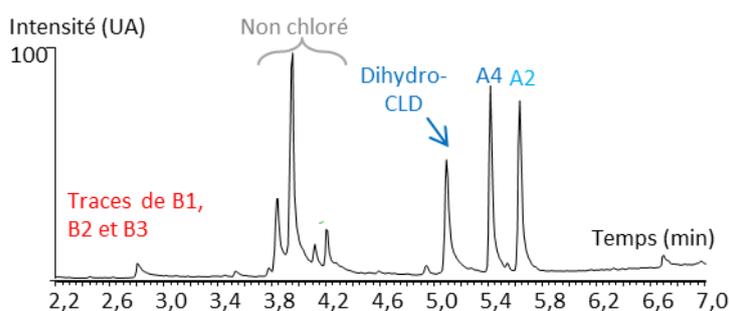


Figure 205 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A2 par *Citrobacter* 86-1 après extraction.

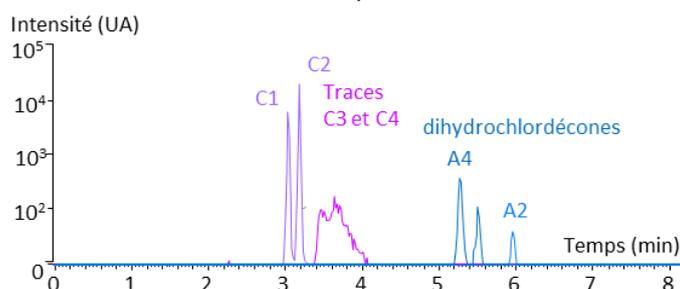


Figure 206 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A2 par *Citrobacter* 86-1.

### 3. Transformation microbologique du métabolite A3

Au cours de la transformation du composé A3 en présence des bactéries, aucun PCI n'a encore été observé. Cependant, les métabolites polaires C3 et C4 ont été détectés en LC-MS (Figure 208). La transformation du composé A3 aboutit à des métabolites communs à ceux de la chlordécone. Cependant, certains ne sont pas observés comme les APCIC C1 et C2. Cela ne l'exclut pas du rôle de métabolite intermédiaire. Il pourrait agir comme un intermédiaire « spécialisé ». Cela expliquerait que les composés C1 et C2 par exemple ne puissent être produits si l'atome de carbone qui porte le proton supplémentaire du composé A3 porte un chlore dans les composés C1 et C2.

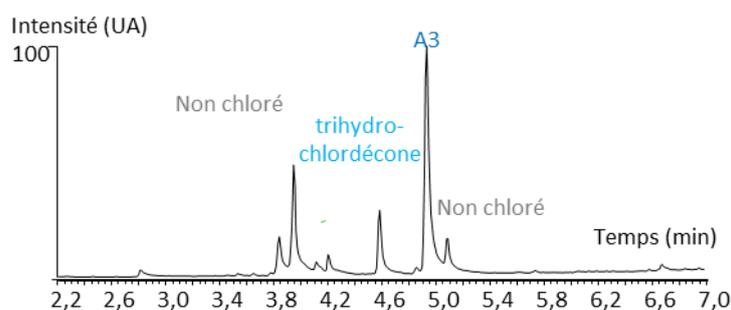


Figure 207 : Chromatogramme GC-MS de la transformation microbologique du composé A3 par *Citrobacter* 86-1 après extraction.

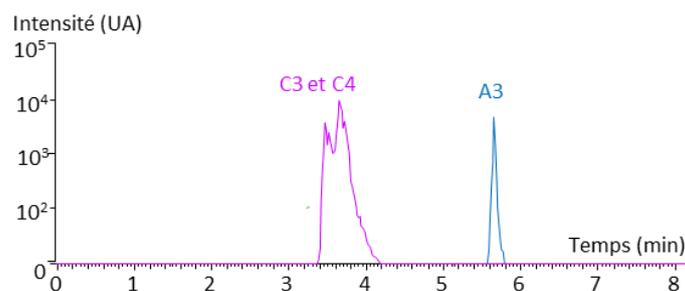


Figure 208 : Chromatogramme LC-Orbitrap-MS de la transformation microbologique du composé A3 par *Citrobacter* 86-1.

#### 4. Transformation microbologique du pentachloroindène B1

Aucun composé connu n'a été détecté à partir du métabolite B1, au terme de plusieurs mois de culture microbologique, en présence de la bactérie *Citrobacter* 86-1. Son intensité semble être stable au cours du temps. Ce résultat est en accord avec son accumulation au cours de la transformation par voie microbologique de la chlordécone.

De même, par voie chimique en présence de citrate de titane (III) et de vitamine B<sub>12</sub>, aucune transformation n'est observée.

#### 5. Transformation microbologique des acides tetrachloroindèncarboxyliques C1 et C2

La séparation des métabolites C1 et C2 des autres familles de métabolites a permis de tester leur transformation en tant que mélange des deux régioisomères par voie microbologique en présence de la bactérie *Citrobacter* 86-1 en duplicats. Aucun produit de transformation n'a été observé en GC-MS ni en LC-MS et l'intensité des pics de ces métabolites semble stable d'après les analyses en LC-MS, depuis quatre semaines. Ces premières données laissent penser que les métabolites C1 et C2 ne sont pas transformés par *Citrobacter* 86-1. Les métabolites C1 et C2 seraient des produits finaux des transformations microbologiques.

### C. Discussion des voies de transformation de la chlordécone par voie microbiologique

A l'issue de nos travaux, trois familles de métabolites ont été détectées : les hydrochlordécones, les PCI et APCIC. Les expériences de transformation des métabolites isolés a conduit à la transformation des hydrochlordécones A2 et A3 uniquement, en PCI et APCIC similaires à ceux produits lors de la transformation de la chlordécone dans ces mêmes conditions microbiologiques (consortium 86 et bactérie isolée *Citrobacter* 86-1). L'absence de transformation des PCI et des APCIC laisse penser qu'il n'y a pas de lien de transformation entre ces deux familles. La transformation par voie chimique du métabolite A1 a conduit au métabolite A2, permettant d'identifier l'atome de carbone à la pointe chlorée de la chlordécone (position 10) à l'atome de carbone de la position 2 de la structure indène. Avec ces informations, nous proposons une voie de transformation de la chlordécone en hydrochlordécones puis en PCI et APCIC. D'après nos travaux d'étude du potentiel, il apparaît que la vitamine B<sub>12</sub> jouerait un rôle déterminant dans cette transformation. Par soucis de clarté, nous avons volontairement omis de le représenter. D'autres mécanismes proposés par Schrauzer et Katz (Schrauzer & Katz, 1978) et par Ranguin *et al.* (Ranguin *et al.*, 2017) présentent aussi la transformation de la chlordécone en polychloroindènes. Notre proposition des voies de transformations tient compte de la fonction gem-diol de la chlordécone, qui est celle présente dans les milieux réactionnels (Figure 209). De plus, nous ajoutons la formation d'une nouvelle famille de métabolites, les APCIC qui pourraient représenter une part significative de la transformation et sont décrit pour la première fois.

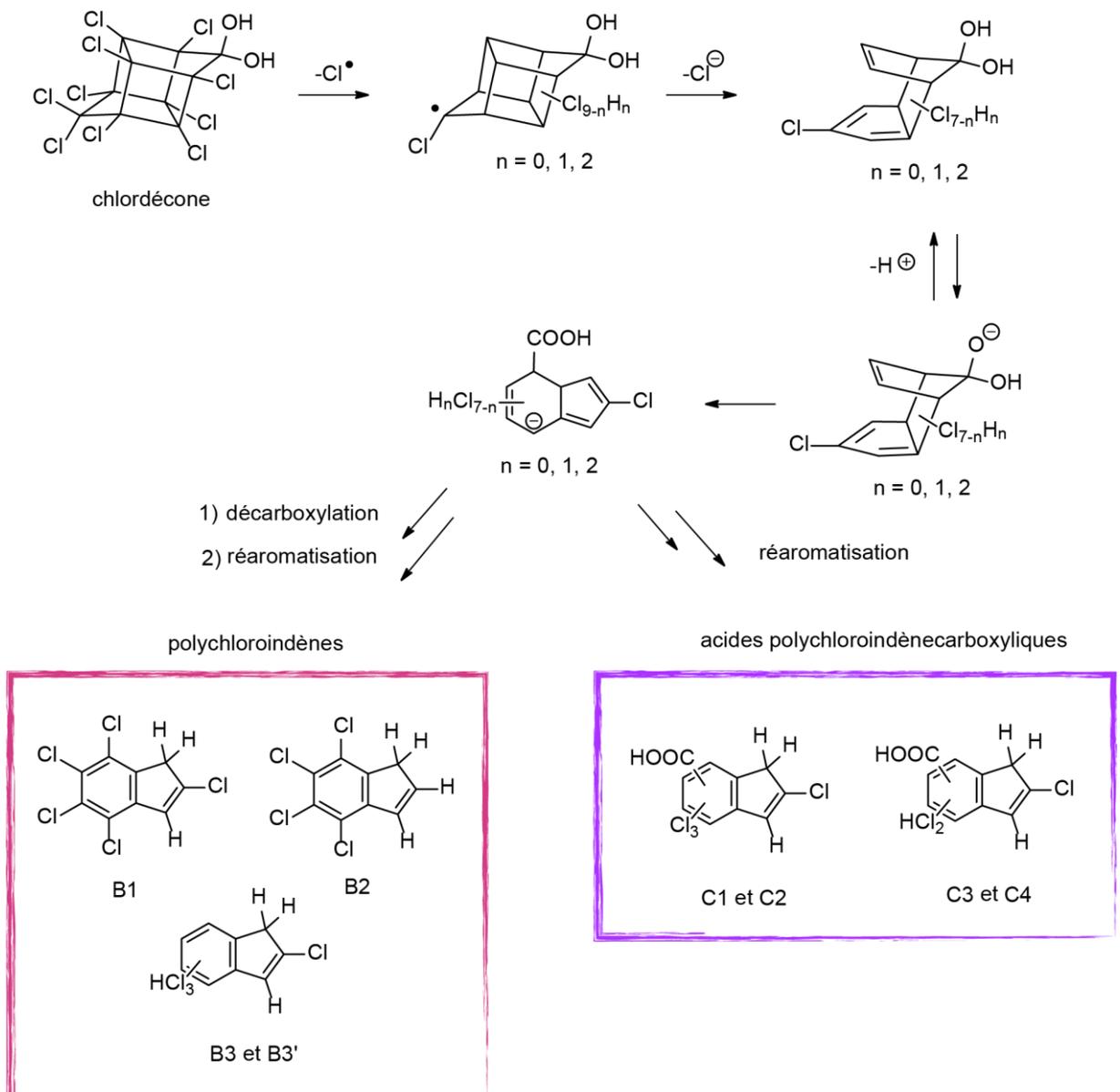


Figure 209 : Propositions de voie de transformation de la chlordécone.

## Conclusion

Au cours des transformations microbiologiques de la chlordécone, trois familles de métabolites sont produites : les hydrochlordécones, les PCI et les APCIC, dont les deux dernières ont une structure qui comporte un noyau indène attestant de l'ouverture de la cage bis-homocubane de la chlordécone au cours de la transformation. Nos travaux de suivi du potentiel d'oxydoréduction des transformations chimiques ont permis de montrer un lien entre la forme de la vitamine B12 selon le degré d'oxydation du cobalt et la production des familles de métabolites. L'étude de la transformation par voie microbiologiques et chimique des métabolites A1, A2, A3, B1 et {C1 et C2} indique des liens possibles entre la formation des hydrochlordécones et celle des deux autres familles de composés PCI et APCIC, mais pas de lien entre ces deux dernières : l'hypothèse de carboxylation des PCI pour conduire aux APCIC est réfutée et la transformation microbiologique d'APCIC n'indique pour l'instant pas de production de PCI. Ces travaux nous ont permis de proposer une voie de transformation tenant compte de la fonction gem-diol de la chlordécone et intègre les trois familles de métabolites détectés contrairement aux mécanismes proposés jusqu'ici (Schrauzer & Katz, 1978 ; Ranguin *et al.*, 2017). Cette proposition de voie de transformation sera affinée par des études de modélisation théorique initiées (en collaboration avec Gilles Frison Ecole Polytechnique, Palaiseau et Eddy Elisée, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette).



**Chapitre 7 : Etude du fractionnement isotopique  
au cours des transformations par voie  
microbiologiques et chimiques de la chlordécone**

---

---

## Introduction

Certains éléments chimiques présentent plusieurs isotopes stables naturellement présents dans l'environnement. Les isotopes stables du carbone sont le carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) et le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) qui contiennent dans leur noyau six et sept neutrons respectivement, en plus des six protons. Pour respecter l'électroneutralité, le nombre d'électrons est de six pour les deux isotopes. Dans les composés naturels, l'atome de carbone  $^{12}\text{C}$  est présent à 98,9% alors que l'isotope  $^{13}\text{C}$  à 1,1%. Les isotopes  $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  ont un comportement similaire et sont impliqués dans les mêmes types de réactions. La masse très légèrement supérieure du carbone  $^{13}\text{C}$  par rapport au carbone  $^{12}\text{C}$  conduit à la formation de liaisons légèrement plus fortes avec les autres atomes, d'après la loi de Hooke qui lie la fréquence de vibration d'une liaison en fonction de la masse des atomes impliqués. Plus la fréquence de vibration est grande et plus l'énergie de liaison est élevée. Ces liaisons nécessitent donc une énergie un peu plus élevée pour être rompues. D'un point de vue cinétique, cela se traduit par une plus faible vitesse de réaction des isotopes lourds ( $^{13}\text{C}$ ) par rapport aux isotopes légers ( $^{12}\text{C}$ ). Les isotopes légers réagissant plus vite que les isotopes lourds, il en résulte un enrichissement en isotopes lourds de la fraction résiduelle du substrat au cours d'une réaction. Cet enrichissement sera d'autant plus marqué que l'étape correspondant à la formation ou à la rupture de la liaison impliquant les isotopes léger/lourd sera l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme réactionnel.

L'étude du fractionnement isotopique au cours d'une réaction consiste à évaluer le rapport isotopique  $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  au cours du temps, à mesure que le substrat est consommé. Le fractionnement isotopique d'une réaction peut être quantifié par le facteur d'enrichissement. Pour certaines réactions, le mécanisme peut être approché par la mesure du fractionnement isotopique (Elsner, *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014). En laboratoire ou dans l'environnement, le rapport isotopique peut aussi être investigué afin d'évaluer si une dégradation, biotique ou abiotique, a lieu (Meckenstock *et al.*, 2004 ; Morasch *et al.*, 2001 ; Richnow *et al.*, 2003). Des précautions sont à appliquer que ce soit pour l'étude du mécanisme ou pour attester d'une transformation sur le terrain. Ces possibilités traduisent cependant la puissance de cette approche, dont les développements récents laissent entrevoir de nombreuses perspectives prometteuses (Aelion *et al.*, 2009) (Figure 210).

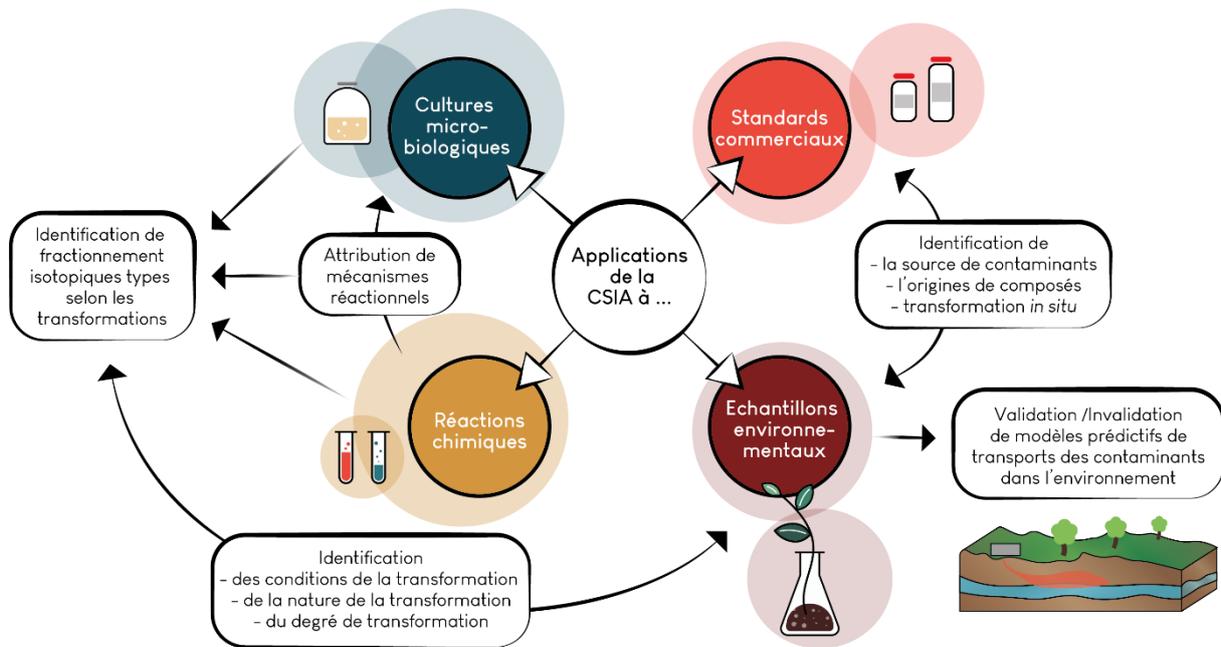


Figure 210 : Applications possibles des mesures du fractionnement isotopiques.

Nous avons cherché à développer cette approche à la chlordécone pour investiguer les mécanismes et la possibilité d'une évaluation de transformation dans les sols.

## Résumé

### Approche des mécanismes par l'étude du fractionnement isotopique

La chlordécone est une molécule difficile à dégrader et pour laquelle peu de mécanismes ont été proposés (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978). La transformation totale de la molécule en présence des consortia bactériens et des souches isolées de *Citrobacter* conduit à la formation de trois familles de molécules : des hydrochlordécones, des composés apolaires à structure polychloroindène (Chaussonnerie *et al.*, 2016) et des acides polychloroindène carboxyliques. Dans le cas des deux dernières familles, le noyau indène traduit l'ouverture de la structure cage de la chlordécone. Cette variété de métabolites pourrait indiquer l'existence de plusieurs voies mécanistiques. Une première hypothèse impliquant les déhalogénases réductives comme enzymes à l'origine de la transformation n'a pu être confirmée par analyses métagénomiques. D'après les transformations chimiques étudiées (Chapitre 4), les profils des produits des réactions qui impliquent la vitamine B<sub>12</sub> se rapprochent le plus de celui obtenu par voie microbiologique (conditions {Vitamine B<sub>12</sub> - sulfure de sodium}, {Vitamine B<sub>12</sub> - fer zéro valent} et {Vitamine B<sub>12</sub> - citrate de titane}). Par ailleurs, les analyses des génomes des souches de *Citrobacter* notamment, ont révélé la présence de la voie de biosynthèse anaérobie de la vitamine B<sub>12</sub> ainsi que des gènes codant des enzymes dépendantes à la vitamine B<sub>12</sub> (Chaussonnerie *et al.*, 2016). Nous avons voulu utiliser un autre outil pour confirmer ces premiers résultats. Parmi la sélection de conditions chimiques testées (Chapitre 4), celles conduisant aux meilleures sélectivités ont été étudiées par fractionnement isotopique afin de valider la méthode en observant des fractionnements isotopiques dans le cas où un effet isotopique est observé. La chlordécone est une molécule contenant 10 atomes de carbone, ce qui provoque une dilution de l'effet isotopique et réduit les chances de détecter un effet.

La méthode adaptée à la mesure précise du rapport isotopique est la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à ratio isotopique (GC-IRMS). Cet instrument permet la séparation des composés par chromatographie. En sortie de colonne, les molécules sont introduites dans un four à combustion où elles sont converties en plus petites molécules (CO<sub>2</sub> dans le cas du carbone). Selon l'isotope du carbone qu'elles contiennent, les molécules de CO<sub>2</sub> (<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> et <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>) sont séparées par un champ magnétique et le rapport est mesuré par dans le spectromètre de masse (Figure 211) (Elsner *et al.*, 2012).

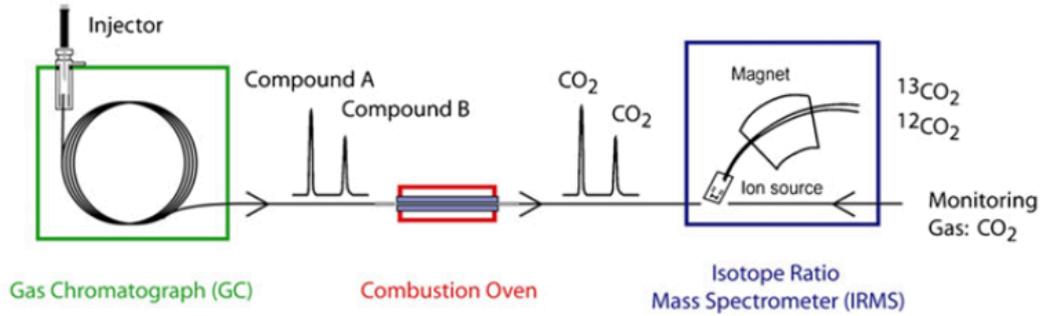


Figure 211 : Schéma des différentes étapes conduisant à la mesure du rapport isotopique d'une molécule par GC-IRMS (tiré de (Elsner *et al.*, 2012)).

La valeur obtenue en sortie d'analyse correspond à la déviation de rapport isotopique de l'échantillon mesuré par rapport à un standard et est exprimé en notation  $\delta$  (delta) (Coplen, 2011), selon l'équation 1. Le standard dans le cas du carbone provient de calcaires de foraminifères marins dont la composition isotopique est très riche en  $^{13}\text{C}$ .

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) = \left( \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \quad (\text{Equation 1})$$

La mesure du fractionnement isotopique a nécessité de nombreux développements pour définir des conditions permettant une mesure stable du rapport isotopique de la chlordécone. La gamme de stabilité du rapport isotopique a été définie entre 20 et 40 nmol équivalent carbone brûlé dans le four ce qui représente 5 à 40 fois la quantité requise pour d'autres composés organiques (Sessions, 2006). Une étape supplémentaire de réactivation du four par oxydation a été introduite après chaque série d'analyses pour maintenir une mesure stable du rapport isotopique de la chlordécone. Une fois ces développements réalisés, nous avons pu suivre l'évolution du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la chlordécone pour plusieurs réactions chimiques. Les transformations microbiologiques avec le consortium 86 et la bactérie isolée *Citrobacter* 86-1 ont également été étudiées. Des cultures sacrificielles en duplicats de réactions ont permis d'évaluer un profil de fractionnement isotopique pour chaque transformation et de le quantifier d'après le calcul du facteur d'enrichissement ( $\epsilon_{\text{bulk}}$ ) selon l'équation 2, équation de Rayleigh (Griebler *et al.*, 2004; Martin-Gonzalez *et al.*, 2015).

$$\ln \left( \frac{R_t}{R_0} \right) = \ln \left( \frac{\delta^{13}\text{C}_t + 1000}{\delta^{13}\text{C}_0 + 1000} \right) = \ln \left( \frac{C_t}{C_0} \right) \times \frac{\epsilon_{\text{bulk}}}{1000} \quad (\text{Equation 2})$$

Les transformations étudiées sont soit microbiologiques avec le consortium 86 et la bactérie isolée *Citrobacter* 86-1, soit chimiques avec le fer zéro valent, la combinaison {sulfure de sodium-

vitamine B<sub>12</sub>} et la combinaison {citrate de titane (III)-vitamine B<sub>12</sub>}. Sur la Figure 212, Les données obtenues pour chaque transformation (R<sub>t</sub>, le rapport isotopique <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C de la chlordécone à un instant t et R<sub>0</sub>, le rapport isotopique initial, C<sub>t</sub> la concentration du substrat à un instant t et C<sub>0</sub> la concentration initiale du substrat) sont tracées selon l'équation de Rayleigh (Equation 2). La pente de la droite d'approximation représente la force du fractionnement qui a lieu au cours de la réaction. Plus elle est négative, proche de l'axe des ordonnées, plus le fractionnement isotopique est marqué. Les valeurs des pentes, exprimées en ‰ sont précisées pour chaque transformation.

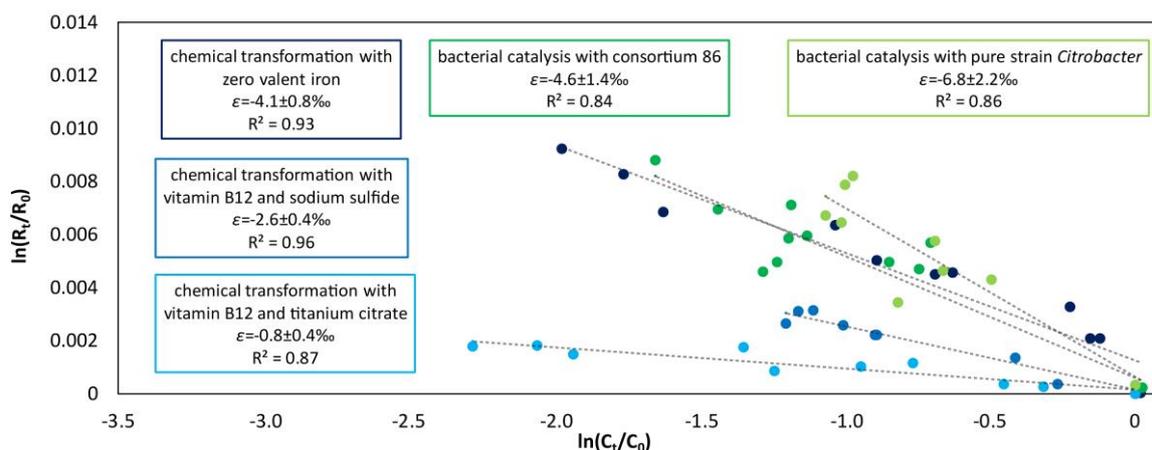


Figure 212 : Profil de fractionnement isotopique des réactions microbiologiques (vert) et chimiques (bleu) de la chlordécone (Graphique réalisé d'après l'équation de Rayleigh).

Les expériences microbiologiques ont conduit à un fractionnement isotopique élevé ( $\epsilon = -4,6 \pm 1,4\text{‰}$  avec le consortium 86 et  $\epsilon = -6,8 \pm 2,2\text{‰}$  avec la bactérie *Citrobacter* 86-1) compte tenu du nombre d'atomes de carbone dans la chlordécone qui atténue le phénomène et comparable entre elles en considérant la marge d'erreur. Cette observation peut s'expliquer par la présence de *Citrobacter* 86-1 dans le consortium 86 mais nous indique aussi que dans le cas où d'autres microorganismes interviendraient dans la transformation, le mécanisme employé serait *a priori* le même. La transformation avec le fer zéro valent a aussi conduit à un fractionnement élevé ( $\epsilon = -4,6 \pm 0,8\text{‰}$ ). Avec le sulfure de sodium et la vitamine B<sub>12</sub>, le fractionnement reste modeste ( $\epsilon = -2,6 \pm 0,4\text{‰}$ ). Il est négligeable dans le cas du citrate de titane et de la vitamine B<sub>12</sub> ( $\epsilon = -0,8 \pm 0,4\text{‰}$ ). Les deux transformations chimiques impliquant la vitamine B<sub>12</sub> n'ont pas un profil de fractionnement isotopique proche de celui observé pour les transformations microbiologiques. Cependant d'autres paramètres comme le pH peuvent affecter le mécanisme et devraient être pris en compte pour de futures études.

L'adaptation de la méthode de mesure du rapport isotopique en GC-IRMS a permis d'observer des différences de fractionnement entre les différentes transformations de la chlordécone ce qui conduit à l'obtention de facteurs d'enrichissements distincts pour les transformations étudiées.

### Possibilité d'évaluer la dégradation dans les sols par l'étude du fractionnement isotopique

Dans les sols contaminés, la chlordécone ne semble pas subir de transformation, en effet les concentrations trouvées plus de vingt après restent élevées. Cependant, une étude de la concentration dans les sols est difficile compte tenu du mode d'épandage de la chlordécone dans les bananeraies. En effet, la chlordécone était déposée au pied, tout autour du tronc du bananier. Les analyses de métabolites se limitent au seul dérivé commercial, le 8-monohydrochlordécone, dont un standard peut être utilisé pour la quantification. L'étude du fractionnement isotopique pourrait être une façon d'évaluer si une transformation a lieu dans ces sols. Afin de réaliser une telle étude temporelle, il serait nécessaire de connaître le rapport isotopique initial de la chlordécone utilisée. Durant les années 1975 à 1983, différentes formulations ont été mises sur le marché. Une étude de Devault *et al.* (Devault *et al.*, 2016) décrit quatre lots commerciaux de chlordécone : un de Kepone et trois de Curlone qui seront distingués selon l'institution l'ayant fourni : le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et l'Université des Antilles et de la Guyane (UAG). Ces lots ont été synthétisés à deux époques différentes et dans trois sites de production et représentatives de toutes les formulations proposées (Devault *et al.*, 2016). Nous nous sommes procuré des échantillons de ces lots commerciaux et avons mesuré leur rapport isotopique, noté  $\delta^{13}\text{C}$  dans le Tableau 16, valeur calculée relativement à un standard.

Tableau 16 : Comparaison des valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  des différents lots commerciaux de pesticides contenant la chlordécone comme substance active.

	Kepone	Curlone		
		Cirad	IRD	UAG
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-33,0 ± 0,4	-34,2 ± 0,2	-33,2 ± 0,1	-31,1 ± 0,2

Les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  des différents lots sont proches et permettraient théoriquement de détecter une dégradation en champ, à condition que le fractionnement soit significatif. De cette façon, nous nous affranchissons de l'étude de l'historique de traitement de la parcelle et des éventuels risques de contamination par la chlordécone utilisée sur les parcelles voisines.



## **Conclusion**

Des études du fractionnement isotopique ont été réalisées sur la transformation de la chlordécone par voies microbiologiques et chimiques. Après des adaptations de la méthode de mesure, des facteurs d'enrichissement ont pu être déterminés et caractérisent la force du fractionnement isotopique qui a lieu sur l'élément carbone selon la transformation. Les profils de fractionnement isotopique ne montrent pas de tendance commune en fonction de l'implication de la vitamine B<sub>12</sub> dans la transformation, contrairement aux profils des produits de transformation initialement observés. Les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  de plusieurs lots commerciaux de chlordécone lors de son usage en tant que pesticide ont été mesurées. Etant proches, elles permettent d'envisager une évaluation de la dégradation de la chlordécone sur le terrain, par comparaison avec les valeurs de la chlordécone présente dans les sols.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Biogéochimie des Isotopes, au Centre de Recherche pour l'Environnement UFZ, à Leipzig en Allemagne, et dont les principaux interlocuteurs sont Lorenz Adrian, Myriel Cooper, Steffen Kümmel et Hans Richnow. Quatre séjours d'une durée totale de trois mois dans ce laboratoire ont permis de réaliser ces mesures.

2

3 **Distinct isotope fractionation signatures during biotic and abiotic reductive**  
4 **transformation of chlordecone**

5

6 Marion L. Chevallier<sup>1,2,3,4</sup>, Myriel Cooper<sup>5,6</sup>, Steffen Kümmel<sup>5</sup>, Agnès Barbance<sup>1,2,3,4</sup>, Denis Le  
7 Paslier<sup>1,2,3,4</sup>, Hans H. Richnow<sup>5</sup>, Pierre-Loïc Saaidi<sup>1,2,3,4</sup> and Lorenz Adrian<sup>5,7,\*</sup>

8 <sup>1</sup> CEA, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

9 <sup>2</sup> Université d'Evry-Val-d'Essonne, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

10 <sup>3</sup> CNRS-UMR8030, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

11 <sup>4</sup> Université Paris-Saclay, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

12 <sup>5</sup> Helmholtz Centre for Environmental Research – UFZ, Isotope Biogeochemistry, Permoserstraße 15,  
13 04318 Leipzig, Germany

14 <sup>6</sup> Chair of Environmental Technology, Technische Universität Berlin, Ernst-Reuter-Platz 1, 10587  
15 Berlin, Germany

16 <sup>7</sup> Chair of Geobiotechnology, Technische Universität Berlin, Ackerstraße 74, 13355 Berlin, Germany

17

18

19

20 Running title: Chlordecone isotopic fractionation

21

22 \*To whom correspondence should be addressed: Lorenz Adrian, Helmholtz Centre for Environmental  
23 Research – UFZ, Isotope Biogeochemistry, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany, Tel.: +49 (0)  
24 341 235 1435, Fax: +49 (0) 341 235 1443, E-Mail: lorenz.adrian@ufz.de

25

26 Keywords: Chlordecone, *Citrobacter*, CSIA, reductive dechlorination, vitamin B<sub>12</sub>, ZVI

27

28

## Abstract

29 Chlordecone is a synthetic organochlorine pesticide extensively used in banana plantations of the French  
30 West Indies from 1972 to 1993. Due to its environmental persistence and bioaccumulation, it causes  
31 public health and socio-economic problems. Recently, bacterial consortia and *Citrobacter* strains were  
32 shown to transform chlordecone to lower chlorinated hydrochlordecones and indenenes. Here we compare  
33 microbial with abiotic transformation processes involving reducing agents and vitamin B<sub>12</sub> as a catalyst.  
34 Formation of polychloroindenes required the presence of vitamin B<sub>12</sub> or microorganisms. Abiotic  
35 reduction with zero-valent iron or with sodium sulfide and vitamin B<sub>12</sub> led to formation of  
36 monohydrochlordecone. A method for compound specific isotope analysis (CSIA) was developed to  
37 detect changes in chlordecone carbon isotopic composition. Significant carbon isotopic enrichments  
38 were observed for microbially mediated ( $\epsilon_{\text{bulk}}=-6.8\text{‰}$  with a *Citrobacter* strain and  $\epsilon_{\text{bulk}}=-4.6\text{‰}$  with a  
39 bacterial consortium) and abiotic transformations ( $\epsilon_{\text{bulk}}=-4.1\text{‰}$  with zero-valent iron;  $\epsilon_{\text{bulk}}=-2.6\text{‰}$  with  
40 sodium sulfide and vitamin B<sub>12</sub>). Abiotic reaction with Ti(III) citrate and vitamin B<sub>12</sub> favoring  
41 polychloroindene production did not lead to significant carbon isotope enrichment. CSIA of  
42 representative chlordecone formulations applied in the banana fields of the French West Indies showed  
43 similar chlordecone relative difference of isotope ratios, from  $\delta^{13}\text{C}=-31.1 \pm 0.2\text{‰}$  to  $-34.2 \pm 0.2\text{‰}$ . The  
44 methodology may be applied for monitoring natural and stimulated chlordecone transformation at field  
45 sites.

46

47

## Introduction

48 Chlordecone is a perchlorinated synthetic pesticide with a bis-homocubane structure (anhydrous form:  
49  $C_{10}Cl_{10}O$ ) that can be hydrated in the presence of water to a gem-diol form in place of the ketone moiety  
50 (Figure 1). (Alley *et al.*, 1974; Bristeau, 2012 ; Wilson & Zehr, 1979) Between the 1960s and 1990s,  
51 chlordecone was the active ingredient of pesticide formulations in many countries, including the French  
52 West Indies, among them Kepone<sup>®</sup> which was introduced in 1958. Chlordecone toxicity was  
53 demonstrated in 1975 at the Hopewell chlordecone production plant (USA) where a lack of safety  
54 controls led to poisoning of workers and extended environmental pollution.(Cannon & Kimbrough,  
55 1979; Cannon *et al.*, 1978; Chernoff & Rogers, 1976; Reuber, 1978) This disaster prompted the USA to  
56 prohibit the production and use of chlordecone in 1978. In spite of its ban in the United States strong  
57 pest pressure led French authorities to allow the use of a new chlordecone formulation, Curlone<sup>®</sup>, to  
58 control the banana black weevil *Cosmopolites sordidus*. Curlone<sup>®</sup> was used in the French West Indies  
59 from 1981 until its final prohibition in 1993.(Beaugendre, 2005; Epstein, 1978 ; Le Déaut & Procaccia,  
60 2009) This massive use resulted in a strong pollution of French West Indies soils and water, estimated  
61 to persist for decades to centuries. (Cabidoche *et al.*, 2009) Long-term exposure to chlordecone through  
62 food and drinking water(Dubuisson *et al.*, 2007) can have severe impacts on human health such as an  
63 increase of the risk of prostate cancer and impacts on the neurological development of infants.(Multigner  
64 *et al.*, 2016) To decrease human exposure in the French West Indies, local regulations have been  
65 implemented to stop river and coastal fishing (Le Déaut & Procaccia, 2009) and to determine  
66 chlordecone concentrations in any fruits, vegetables or meat produced in the French West Indies, thus  
67 massively impacting cultural and economic life of the inhabitants.

68

69 Because of its bis-homocubane structure and numerous chlorine atoms, chlordecone is highly  
70 recalcitrant in the environment although, according to thermodynamic calculations, the reductive  
71 transformation of chlordecone to less chlorinated products is exergonic. (Dolfing *et al.*, 2012) Indeed,  
72 chlordecone has been described to undergo abiotic chemical transformation under reducing conditions:  
73 hydrochlordecones could be observed after incubation with zero-valent iron(Belghit *et al.*, 2015) or  
74 when incubated under UV-light,(Wilson & Zehr, 1979) while apolar  $C_9$  compounds were detected when  
75 vitamin  $B_{12}$  was used as catalyst in the presence of reducing agents (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer &  
76 Katz, 1978). Detection of  $C_9$ -compounds, assigned as polychloroindenes (Ranguin *et al.*, 2017;  
77 Schrauzer & Katz, 1978), led the authors to propose a mechanism for chlordecone dechlorination in  
78 which the cage opening was mediated by vitamin  $B_{12}$ .

79 Few studies have addressed the microbial transformation of chlordecone under aerobic or anaerobic  
80 conditions. Under aerobic conditions, *Pseudomonas aeruginosa* strains as well as a mixed aerobic  
81 enrichment culture could transform chlordecone to the lower chlorinated monohydrochlordecone,

82 dihydrochlordecone and chlordecol (Orndorff & Colwell, 1980). By using  $^{14}\text{C}$ -labeled chlordecone  
83 Merlin *et al.* showed sorption of chlordecone to fungal biomass and traces of  $^{14}\text{C}$ -metabolites were  
84 detected, indicating partial transformation.(Merlin *et al.*, 2014) In a study with the anaerobic archaea  
85 *Methanosarcina thermophila* apolar and polar compounds were detected as transformation  
86 products(Jablonski *et al.*, 1996) while the removal of one or two chlorine atoms was demonstrated when  
87 chlordecone was incubated with bacterial cultures. (George & Claxton, 1988) In a detailed study under  
88 anaerobic conditions, a bacterial consortium and two isolated *Citrobacter* strains transformed  
89 chlordecone to several different products: The major transformation product of this biotic incubation  
90 had the same mass spectrum as the  $\text{C}_9$ -compounds produced in a previous study under abiotic conditions  
91 (Ranguin *et al.*, 2017; Schrauzer & Katz, 1978) and was identified as  $\text{C}_9\text{Cl}_5\text{H}_3$ . Minor products such as  
92 mono-, di- and tri-hydrochlordecones and one  $\text{C}_9\text{Cl}_4\text{H}_4$  compound were also detected. (Chaussonnerie  
93 *et al.*, 2016) In contrast to hydrochlordecones, the opening of the bis-homocubane cage leading to  
94 presumable indene-structure compounds and the loss of five chlorine atoms suggest a different  
95 mechanism from hydrochlordecone production.

96 Two main processes have been used to decrease chlordecone concentration in water and soils: In  
97 wastewater treatment facilities filters filled with activated carbon were placed,(Durimel *et al.*, 2013;  
98 Mouvet *et al.*, 2016) however, adsorption of chlordecone was limited.(Durimel *et al.*, 2013; Rana, 2017)  
99 In soils, 'In Situ Chemical Reduction' (ISCR) using zero-valent iron led to chlordecone removal ranging  
100 from 22% to 74% depending on the soil type. The products of this treatment were identified as  
101 hydrochlordecones ( $\text{C}_{10}\text{Cl}_{10-n}\text{H}_{n+2}\text{O}_2$ , with  $n=1$  to 5).(Mouvet *et al.*, 2016) However, ISCR was applied  
102 only on limited areas where the pollutant concentration was high. In the French West Indies, 200  $\text{km}^2$   
103 of surface is contaminated with chlordecone and such a wide-scale treatment is financially not  
104 viable.(Mouvet *et al.*, 2016) Therefore, a feasible remediation system to limit health and environmental  
105 problems is urgently needed.

106 In polluted soils from the French West Indies, the only chlordecone derivative that can be detected is 8-  
107 monohydrochlordecone (IUPAC nomenclature; 5b-monohydrochlordecone for CAS nomenclature)  
108 present in low amount (2% of the chlordecone amount) (Devault *et al.*, 2016). Its detection by gas  
109 chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) is relatively easy due to the formation of  
110 characteristic fragment ions similar to those obtained from chlordecone. In contrast, other transformation  
111 products are very difficult to detect in complex environmental samples because standards are not  
112 available. To nevertheless be able to monitor chlordecone transformation in environmental samples, a  
113 detection method that is independent from potential transformation products is needed.

114

115 Compound specific isotope analysis (CSIA) is such a method. It was developed in the 1990s and  
116 improved considerably the field of stable isotope analysis with Gas Chromatography-Combustion-

117 Isotope Ratio Mass spectroscopy (GC-C-IRMS), allowing compound separation from complex mixtures  
118 (Meckenstock *et al.*, 2004). It is an efficient tool to assess transformation of pollutants in the  
119 environment. The method measures the natural ratio of stable isotopes (e.g., the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio for carbon)  
120 of a pollutant source and its slight changes during microbial or chemical transformation. In general, an  
121 enrichment of heavier isotopes ( $^{13}\text{C}$ ) is observed in the pool of not-yet transformed (residual) pollutant  
122 molecules when transformation takes place. This results from the slightly faster reaction rate when the  
123 lighter isotope is involved in the chemical bond that is broken during the reaction. Using a factor  
124 determined in laboratory experiments (denominated as ‘enrichment factor’ -  $\epsilon$ ), this slight change in the  
125 isotope ratio can be translated into a quantitative evaluation of a transformation reaction, either biotic or  
126 abiotic, either in the laboratory or directly in the environment.(Meckenstock *et al.*, 2004 ; Morasch *et*  
127 *al.*, 2001, Richnow *et al.*, 2003) The decisive advantage of CSIA in the context of chlordecone  
128 transformation is to enable assessment of transformation rates without detection of transformation  
129 products that might evade chemical analysis. Previous studies described isotope fractionation patterns  
130 for dechlorinating microcosms and pure cultures e.g., transforming chlorinated hydrocarbons,(Cichocka  
131 *et al.*, 2008; Cichocka *et al.*, 2007; Fletcher *et al.*, 2011; Nijenhuis *et al.*, 2005; Sherwood Lollar *et al.*,  
132 2001) or chlorinated benzenes.(Griebler *et al.*, 2004; Griebler, *et al.* 2004) Contaminants with a high  
133 number of carbon atoms usually do not show significant carbon fractionation because of the dilution of  
134 the isotope effect on the reactive carbon among the non-reacting carbon atoms.(Aelion *et al.*, 2009)  
135 However, small but distinct fractionation could be identified on dioxins containing 12 carbon  
136 atoms.(Ewald *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010) To the best of our knowledge, isotope fractionation for  
137 molecules with a bis-homocubane structure such as chlordecone has not been described so far. CSIA  
138 could be a powerful tool to monitor chlordecone transformation in the laboratory and in the field.

139

140 The objective of this study was therefore the development of a method to measure  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios  
141 of chlordecone and its application to assess shifts in isotopic composition for abiotic and biotic  
142 transformations. Technical adaptations of classically described CSIA methods were necessary to  
143 provide reliable isotope measurements for chlordecone. In order to evaluate the adjusted CSIA tool, we  
144 investigated chemical reaction conditions leading to different transformation product profiles via distinct  
145 mechanisms. Also, we used previously described microbial cultures (Chaussonnerie *et al.*, 2016) to  
146 monitor isotope shifts during microbial transformation. Finally, commercial formulations of original  
147 pesticide batches of Kepone<sup>®</sup> and Curlone<sup>®</sup> were analyzed to evaluate the isotope ratio range for the  
148 various chlordecone sources that were spread in banana plantations over space and time.

## 149 **Material and Methods**

### 150 **Chemicals**

151 Chlordecone batches were obtained from Cil Cluzeau (Dr. Ehrenstorfer, reference C11220000, batch  
152 number 10725, purity 96.7%) and from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) (Supelco, reference  
153 LC00470V, purity 99.9%). The latter sample was only used as comparative material for elemental  
154 analyzer values. Standard reference material for indene (>99%), indane (97.5%) and *cis*-perhydroindane  
155 were purchased from Sigma Aldrich. Vitamin B<sub>12</sub> (≥96%), Palladium (10% on charcoal) and Na<sub>2</sub>S  
156 (purity ≥98%) were purchased from Sigma Aldrich. Titanium (III) citrate was prepared from Ti(III)  
157 chloride (<12%) (Sigma-Aldrich) and sodium citrate and neutralized with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. (Zehnder &  
158 Wuhrmann, 1976) Gases were obtained from Linde Gas AG (Pullach, Germany) at a purity of 99.999%  
159 (v/v). Solvents used were of the best available quality (“analysis grade”). Micrometric Fe<sup>0</sup> was obtained  
160 from Dousselin (iron powder NC 100.24; Dousselin & Geoffroy-Jacquet Réunion, 69270 Couzon au Mont  
161 D'Or, France). It had a fine and homogeneous grain size with 98.4% of fine particles smaller than 50  
162 μm and 1.6% between 50 and 160 μm.

163 Four chlordecone commercial formulations applied on the banana fields in the French West Indies were  
164 studied. The samples were in powder form of the technical grade chlordecone, later referred as Kepone-  
165 VIMS, Curlone-Cirad, Curlone-IRD and Curlone-UAG, according to the names of the institutions that  
166 supplied them (Table 1). (Devault *et al.*, 2016) The authors of the latter study specified that no other  
167 sample could be found due to destruction of the pesticide batches, after it was finally banned by the  
168 French Authorities in 1993.

### 169 **Chlordecone transformation protocols**

170 For biological experiments, we used intact cells of *Citrobacter* strain 86\_1 and the mixed bacterial  
171 consortium 86\_1 that contains *Citrobacter* strain 86\_1. (Chaussonnerie *et al.*, 2016). The culture  
172 medium contained 10 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) phosphate buffer at pH 7.5. Its full composition is  
173 described in (Chaussonnerie *et al.*, 2016) and referred to as MM6. For cultivation, 20 ml tubes with  
174 screw-caps and Teflon-lined septa were used under strictly anaerobic conditions (98 vol% N<sub>2</sub>, 2 vol%  
175 H<sub>2</sub>). MM6 medium was inoculated by adding 1% (v/v) of fresh active bacterial culture. After 6 hours,  
176 200 ml of culture in exponential growth phase (optical density of 0.3 to 0.4) was divided into 20 tubes.  
177 Chlordecone was added at a final concentration of 100 μM from 200 mM stock solution in  
178 dimethylformamide to each tube. The same procedure was followed for incubations with the pure  
179 *Citrobacter* 86\_1 strain and with the mixed bacterial consortium 86\_1. Abiotic control tubes without  
180 inoculum were incubated under identical conditions.

181

182 For abiotic experiments, anoxic aqueous solutions with 330  $\mu\text{M}$  chlordecone were set up together with  
183 a variety of reducing agents. The headspace (70-90 ml) was flushed with pure  $\text{N}_2$  before adding all other  
184 components and the flasks were mildly agitated for the entire reaction duration. Reactions with  
185 chlordecone and zero-valent iron were performed in 12 batches of 10 ml, each containing chlordecone  
186 (330  $\mu\text{M}$ ) solubilized in water/acetone (3:1, v/v).  $\text{Fe}^0$  (75 mg) was added to each batch resulting in a  
187 final nominal concentration of 131 mM. (Belghit *et al.*, 2015) Two batches were stopped every week  
188 over a time period of 6 weeks by acidification (80  $\mu\text{l}$  of  $\text{HCl}$  6 M) to pH 1.0.

189  
190 Two experimental replicates with sodium sulfide as reducing agent were set up. In a deoxygenated  
191 aqueous solution of chlordecone (330  $\mu\text{M}$ ), sodium sulfide (94 mM) and vitamin  $\text{B}_{12}$  (96  $\mu\text{M}$ )  
192 chlordecone transformation was monitored in both duplicates over 4 hours. Glass bottles with a total  
193 volume of 100 ml capped with Teflon-lined butyl rubber septa and aluminum crimps were used for these  
194 reactions.

195  
196 Experimental duplicates of 30 ml reaction were continuously monitored for chlordecone transformation  
197 with vitamin  $\text{B}_{12}$  and titanium (III) citrate. Titanium (III) citrate (11.9 mM) was added to a deoxygenated  
198 solution containing vitamin  $\text{B}_{12}$  (96  $\mu\text{M}$ ) and chlordecone (330  $\mu\text{M}$ ) adjusted to pH 12.0 with  $\text{NaOH}$   
199 4 M.

## 200 **Chlordecone extraction**

201 Chlordecone was extracted from four commercial formulations of Kepone<sup>®</sup> and Curlone<sup>®</sup>. Each solid  
202 sample (56 mg for Kepone<sup>®</sup>, 502 mg for Curlone UAG, 2.64 g for Curlone CIRAD and 496 mg for  
203 Curlone IRD, details available in Table 1) was consecutively extracted 6 times with pentane agitated on  
204 a horizontal shaker at 300 rpm for 15 min. The combined organic phases were concentrated under  
205 reduced pressure (650 mbar, 30°C) and finally air-dried to dryness. Solubilization in hexane/acetone  
206 (85%:15% v/v) followed by GC-IRMS analysis provided the chlordecone concentration for each  
207 sample.

208 Liquid samples were extracted after acidification with 6 M  $\text{HCl}$  to pH 1.0. Each sample was extracted  
209 three successive times with dichloromethane (each time with a volume ratio of 1:1 sample to  
210 dichloromethane) and the combined extracts were concentrated under reduced pressure (600 mbar,  
211 30°C). The residual fractions containing chlordecone and its transformation products were solved in  
212 150  $\mu\text{l}$  of hexane/acetone (85%/15% v/v). Biological experiments and experiments with zero-valent  
213 iron, both conducted in tubes with 10 ml of medium were sacrificed for the analysis by acidifying with  
214 6 M  $\text{HCl}$  to a final  $\text{HCl}$  concentration of 100 mM and then extracted ten times successively (each time  
215 with a volume ratio of 2:1 sample to dichloromethane). To ensure complete chlordecone extraction, the

216 last organic extract was controlled with GC-MS to contain a maximal amount of 0.1% chlordecone with  
217 respect to the first extract. After concentration under reduced pressure (600 mbar, 30°C), the residual  
218 fractions were solved in 150 µl of hexane/acetone (85%/15% v/v).

### 219 **Identification of transformation products**

220 Hydrodechlorination of metabolite B1 to indane structure was performed using 2.0 mg of Pd on charcoal  
221 (10%) in ethanol/tetrahydrofurane/water (35:15:2 volume ratios) under atmospheric pressure of  
222 dihydrogen (99.999%, v/v purity).

223 Identification of transformation products was done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS;  
224 ThermoFisher Focus GC-DSQII). For sample separation an apolar DB-5MS column was used (50 m,  
225 0.32 mm, inner diameter, 0.25 µm film thickness, SGE). The oven temperature started at 80°C (7 min),  
226 then increasing at 20°C min<sup>-1</sup> to 220°C (0 min), then increasing at 6°C min<sup>-1</sup> to 300°C (3 min) and finally  
227 increasing at 20°C min<sup>-1</sup> to 320°C (5 min). To identify the transformation products of compound B1  
228 hydrodechlorination, the GC program started at 40°C (4 min), increasing at 18°C min<sup>-1</sup> to 82°C (10  
229 min), and increasing at 28°C min<sup>-1</sup> to 270°C (3 min).

230 Exact masses for metabolites A1, B1 and B3 were determined through LC-MS analyses conducted on a  
231 Dionex Ultimate 3000 LC system (ThermoFisher Scientific) coupled to a LTQ-OrbiElite mass  
232 spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionization source used in  
233 negative mode. Details about voltage optimization for each compound are given in (Chaussonnerie *et*  
234 *al.*, 2016). To separate transformation products, we used a ThermoFisher Synchronis C<sub>18</sub> column (50 mm  
235 length, 2.1 mm inner diameter, 1.7 µm particle size) carried out at 30°C. Solvents used were A: NH<sub>4</sub>OAc  
236 buffer (10 mM, pH 7, adjusted with NH<sub>4</sub>OH) and B: acetonitrile. Elution started at 20% of solvent B (1  
237 min constant at 20% B), then increased to 100% within 7 min (2 min constant at 100% B) and went back  
238 to the initial conditions within 2 min (3 min constant at 20% B).

### 239 **Bulk stable carbon isotope analysis of commercial chlordecone**

240 For δ<sup>13</sup>C analysis of pure chlordecone standards without previous compound separation, an EuroEA3000  
241 elemental analyzer (HEKAtech, Germany) in which the samples were completely combusted to CO<sub>2</sub>  
242 was used. Approximately 1.6 mg of chlordecone was weighted into small tin foil capsules (3.5 mm × 5  
243 mm, HEKAtech, Germany) and applied to the elemental analyzer using an auto-sampler (AS200, CE  
244 Instruments, Italy). The flash combustion was performed with a 10 mL O<sub>2</sub> pulse in a commercially  
245 available combustion reactor filled with tungsten oxide (WO<sub>3</sub>) and silver cobalt oxide (HE46820995,  
246 HEKAtech, Germany). The following elemental analyzer conditions were used: reactor temperature at  
247 1050°C, carrier gas flow at 75 mL min<sup>-1</sup>, and purge flow at 50 mL min<sup>-1</sup>. Conversion products were  
248 transferred with helium as carrier gas (99.999% purity) via a ConFlo IV open split system to a MAT

249 253 IRMS (Thermo Fisher, Bremen). Normalization of measured isotope ratios was done by a two-point  
250 calibration with two reference materials IAEA-CH6 ( $10.45 \pm 0.03\%$ ) and IAEA-CH7 ( $32.15 \pm 0.04\%$ )  
251 from the International Atomic Energy Agency. In addition, IAEA-CH3 ( $-24.72 \pm 0.04\%$ ) was used as  
252 a third reference material to evaluate the calibration and to control the normalization.

### 253 Chlordecone carbon isotope measurements from compound mixtures

254 Compound-specific isotopic analysis (CSIA) of chlordecone was done by gas chromatography - isotope  
255 ratio mass spectrometry (GC-IRMS). Therefore, a GC 7890A (Agilent Technologies, Germany) was  
256 equipped with a GC IsoLink interface containing a commercially available combustion reactor with a  
257 Cu/Ni catalyst which was held at  $1000^\circ\text{C}$  (Thermo Fisher, Bremen, Germany). Two of these reactors  
258 were used successively over the measuring period. Later they are referenced as “reactor 1” and “reactor  
259 2”. This set-up was coupled via a ConFlo IV open split system to a MAT 253 IRMS (Thermo Fisher,  
260 Bremen, Germany). Samples were separated on a BPX5 column (50 m length, 0.32 mm inner diameter,  
261  $0.5 \mu\text{m}$  film thickness; SGE, Australia) at a constant helium carrier gas flow of  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$  with the  
262 following temperature program:  $80^\circ\text{C}$  (hold for 7 min), increasing at  $28^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $220^\circ\text{C}$  (0 min),  
263 increasing at  $6^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $300^\circ\text{C}$  (hold for 3 min) and increasing at  $20^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $320^\circ\text{C}$  (hold for 5  
264 min). Samples were introduced into the GC via the splitless injection mode. After each analysis, a short  
265 oxidation of the combustion reactor was performed employing the following parameters: oxidation with  
266  $\text{O}_2$  for 6 min followed by flushing the system with helium for 6 min and final purging of the condition  
267 lines for 2 min with helium. For all analyses, the carbon amount injected on-column was adapted through  
268 the injection volume (1 to 5  $\mu\text{L}$ ) to reach the stable range in the GC-IRMS which corresponds to 20 to  
269 40 nmol of carbon on column.

270 Isotope nomenclature is given here according to Coplen.(Coplen, 2011) Absolute carbon isotope ratios  
271  $R(N(^{13}\text{C})/N(^{12}\text{C}))$ , in the following abbreviated as  $R(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ , of samples  $R_{\text{sample}}$  and the Vienna Pee Dee  
272 Belemnite (VPDB) standard  $R_{\text{standard}}$  were measured. From these  $R$  values relative differences of isotope  
273 ratios were calculated and are expressed in delta notation ( $\delta^{13}\text{C}$ ) according to equation 1:

$$274 \delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \quad (1)$$

275 Because of the typically small variations in the relative differences of carbon isotope ratios,  $\delta$ -values are  
276 reported in parts per thousand (‰) and e.g. a  $\delta^{13}\text{C}$ -value of 5‰ means a relative difference of isotope  
277 ratios of 0.005.(Brand, 2009; Cretnik *et al.*, 2013) Each sample was measured in at least three technical  
278 replicates to secure accuracy and reproducibility of the measurement. Additionally, a chlordecone  
279 standard was measured every 6 samples to ensure the reliability of the measurements. The maximal  
280 standard deviation tolerance was set to 1‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  values of chlordecone.

## 281 **Determination of chlordecone transformation rate**

282 Very good linear response was obtained from the calibration curve from 15 to 800 mg L<sup>-1</sup> when  
283 chlordecone was injected into the GC-IRMS (R<sup>2</sup>=0.99, Figure S1). Amplitudes are corrected by the  
284 injected volume value to assess chlordecone transformation rates in the different reactions. For each  
285 transformation, relative amplitude comparison from initial t (time 0) and following times enabled  
286 determination of chlordecone conversion rate over time.

## 287 **Evaluation and quantification of carbon isotope fractionation**

288 For quantification of carbon isotope fractionation, a carbon isotope enrichment factor ( $\epsilon_{\text{bulk}}$ ) was  
289 calculated using a simplified Rayleigh equation:(Griebler *et al.*, 2004; Martin-Gonzalez *et al.*, 2015)

$$290 \ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) = \ln\left(\frac{\delta^{13}\text{C}_t+1000}{\delta^{13}\text{C}_0+1000}\right) = \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) \times \frac{\epsilon_{\text{bulk}}}{1000} \quad (2)$$

291 where ( $\delta^{13}\text{C}_0$ ,  $C_0$ ) and ( $\delta^{13}\text{C}_t$ ,  $C_t$ ) are the relative differences of isotope ratios and concentrations of the  
292 compound at time 0 and time  $t$ , respectively. Therefore, the enrichment factor ( $\epsilon_{\text{bulk}}$ ) correlates the time-  
293 dependent change in isotope ratios with the change in concentration on a log/log scale.

## 294 **Results and Discussion**

### 295 **Development of a CSIA method to measure the carbon isotope ratio of chlordecone from** 296 **compound mixtures**

297 Initial measurements of chlordecone-containing sample extracts on several GC-IRMS machines  
298 available showed that the highly oxidized bis-homocubane structure of chlordecone is difficult to  
299 combust completely (Bell & Whitmore, 1978; Duvall & Rubey, 1976; Epstein, 1978) as compared to  
300 chloroethenes (Wu & Won, 2003; Yasuhara, 1993) and the combustion reactor was quickly deactivated.  
301 However, the complete combustion is inevitably necessary to obtain stable values for the isotopic  
302 composition of a compound in GC-IRMS. An oxidation cycle was therefore introduced for the  
303 combustion reactor previous to each single measurement increasing the oxidative capacity of the reactor,  
304 enabling full compound combustion and resulting in a stable and linear response for chlordecone  
305 concentrations ranging from 15 to 400 mg L<sup>-1</sup>. Under the applied conditions, the response in signal  
306 intensity was linearly dependent on the injection volume of the sample in a range of 1 to 5  $\mu\text{l}$ . The  
307 established method enabled the chlordecone-specific determination of the isotopic composition of the  
308 residual fraction of chlordecone from complex samples over time.

309

310 To determine the concentration range in which stable and reproducible chlordecone isotopic  
311 composition values could be obtained, quantification limits were defined. The two criteria setting this

312 quantification limit were i) that the standard deviation of triplicate analyses at a particular concentration  
313 was less than  $\pm 0.5\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$  and ii) that the mean value of triplicate measurements for a particular  
314 concentration was within  $\pm 0.5\text{‰}$  of the mean of all analyses over the range of tested  
315 concentrations.(Jochmann *et al.*, 2006) Following these criteria, the lower detection limit for  
316 chlordecone was determined to be at a concentration of  $200\text{ mg L}^{-1}$  for  $5\text{ }\mu\text{l}$ -volume injections, and  $400$   
317  $\text{mg L}^{-1}$  as higher detection limit. This stable range from  $200$  to  $400\text{ mg L}^{-1}$  represents between  $20$  and  $40$   
318  $\text{nmol}$  of equivalent carbon. It also corresponds to  $20$  to  $40\text{ nmol}$  of equivalent chlorine according to the  
319 chemical formula  $\text{C}_{10}\text{Cl}_{10}\text{O}$  of chlordecone, representing the ketone form only present when chlordecone  
320 is heated in the GC instrument. For the same level of precision, these values are  $4$  to  $400$  times higher  
321 than the ones described for other compounds such as chloroethenes and nitroaromatic compounds for  
322 which typical carbon sensitivity is  $0.1$  to  $5\text{ nmol}$  with a precision of  $0.1$  to  $0.3\text{‰}$ .(Berg *et al.*, 2007;  
323 Hunkeler & Aravena, 2000; Sessions, 2006)

324

325 In an attempt to rationalize the difficulties of the combustion we focused on the chemical structure of  
326 chlordecone and the reactor. Normally the IRMS combustion reactor oxidizes organic compounds at  
327 high temperature to  $\text{CO}_2$  using copper oxide ( $\text{CuO}$ ) and nickel oxide ( $\text{NiO}$ ) as oxidizing agents. During  
328 this oxidation process,  $\text{CuO}$  and  $\text{NiO}$  are reduced to  $\text{Cu}_2\text{O}$  and  $\text{Ni}_2\text{O}$  which decreases the oxidizing  
329 capacities with time.(Li *et al.*, 2012) By periodical flushing with  $\text{O}_2$  the metal oxides can normally be  
330 reoxidized to  $\text{CuO}$  and  $\text{NiO}$ . We hypothesized that this reoxidation was obstructed in the IRMS analysis  
331 of chlordecone due to the large amount of chlorine in the compound which could have led to the  
332 formation of copper and nickel chlorides not able to further oxidize chlordecone. Only the frequent  
333 reoxidation could mitigate this phenomenon in our experiments. Such difficulties to completely combust  
334 chlordecone have been described also by others.<sup>8,46,47</sup>

335

### 336 **Biotic and abiotic transformation of chlordecone**

337 In incubations of chlordecone with microbial cultures, either with the isolated *Citrobacter* strain 86\_1  
338 or with the mixed bacterial consortium from which this stain was isolated, several products were  
339 detected. The main transformation product named B1 ( $\text{C}_9\text{Cl}_5\text{H}_3$ ) was identified as pentachloroindene  
340 based on its mass spectrum and retention time. Two other products referred to as B3 ( $\text{C}_9\text{Cl}_4\text{H}_4$ ,  
341 tetrachloroindene structure) and A1 ( $\text{C}_{10}\text{Cl}_9\text{H}_2\text{O}_2$ , monohydrochlordecone) were detected in minor  
342 amounts (Figure 2).

343

344 In abiotic approaches (Table 2, Figure 3), chlordecone was incubated with different reducing agents  
345 and/or vitamin  $\text{B}_{12}$  as possible catalyst. Under these conditions, transformation products belonging to

346 one of the two product families, hydrochlordecones and polychloroindenes were detected. A biomimetic  
347 reaction inspired from (Schrauzer & Katz, 1978) and (Chaussonnerie *et al.*, 2016) implied vitamin B<sub>12</sub>  
348 as catalyst and sodium sulfide as reducing agent. This biomimetic condition led to the conversion of  
349 chlordecone to a major product A1 identified as monohydrochlordecone (~50% of the initial  
350 chlordecone molar amount) and the pentachloroindene B1 as a minor product after 4 hours (Figure 3).  
351 Chemical transformation with zero-valent iron (Belghit *et al.*, 2015) approximates the in situ chemical  
352 reduction applied in the field (Mouvet *et al.*, 2016) and was therefore also investigated. Within five  
353 weeks of incubation the monohydrochlordecone A1 was formed (50% of the initial chlordecone molar  
354 amount) (Figure 3). When chlordecone was incubated with titanium (III) citrate as reducing agent and  
355 vitamin B<sub>12</sub> the pesticide was transformed to several products of which the main one had the molecular  
356 formula C<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>H<sub>3</sub>, identified as B1. Minor products were detected and identified as B3 and A1 (Figure  
357 3).

358 A simple experiment consisting in the hydrodechlorination of compound B1 in presence of palladium  
359 on charcoal as catalyst under dihydrogen pressure in tetrahydrofuran/ethanol/water (35:15:2 v/v) led to  
360 complete dechlorination of compound B1 to an indane structure compound. This indicated that  
361 compound B1 has a pentachloroindene structure and shows that the opening of the chlordecone cage  
362 into an indene structure is possible for biotic transformations and abiotic transformation with vitamin  
363 B<sub>12</sub> and titanium (III) citrate. The two other abiotic transformations both led to compound A1. However,  
364 Belghit *et al.*, showed that with zero-valent iron as reducing agent over a longer transformation duration,  
365 A1 is further transformed to other polyhydrochlordecones. (Belghit *et al.*, 2015) This transformation of  
366 A1 does not occur with sodium sulfide and vitamin B<sub>12</sub> which suggest different pathways for these two  
367 chemical conditions, even if the main transformation product A1 is shared at first sight.

### 368 **Carbon isotope fractionation during biotic and abiotic chlordecone transformations**

369 Absolute carbon isotope ratios ( $R_{\text{Sample}}$  and  $R_{\text{Standard}}$ ) were measured and the resulting  $\delta^{13}\text{C}$  values were  
370 calculated for biotic (Figure 4) and abiotic (Figure 5) reactions. In pure *Citrobacter* microbial cultures,  
371 49% of the initial chlordecone was transformed within 9 weeks of incubation. Within this time the  
372 relative differences of isotope ratios ( $\delta^{13}\text{C}$ -values) of chlordecone increased from -32‰ to -24‰, an  
373 absolute difference of 8‰ (Figure 4). The carbon-13 enrichment factor of this transformation was  
374  $\epsilon_{\text{bulk}} = -6.8 \pm 2.2\text{‰}$  (Figure 6). With the mixed bacterial consortium 86\_1, a similar enrichment by an  
375 absolute  $\delta^{13}\text{C}$ -value of 8‰ was measured while over 75% of chlordecone was converted within 8 weeks  
376 (Figure 4). A carbon-13 enrichment factor of  $\epsilon_{\text{bulk}} = -4.6 \pm 1.4\text{‰}$  was calculated under these conditions  
377 (Figure 6). Both biological transformations therefore showed significant carbon fractionation, however,  
378 the two reactions could not be differentiated from each other on the basis of their carbon fractionation  
379 as the confidence intervals overlap (Figure 6). This is consistent with the fact that *Citrobacter* 86\_1 was

380 identified in metagenomics analysis of bacterial consortium 86\_1 and the identical profiles of metabolite  
381 production of the two biotic transformations.

382 In contrast to this relatively similar fractionation behavior under biotic conditions, in different abiotic  
383 reactions we found significantly different carbon enrichment factors. With sodium sulfide as reducing  
384 agent and vitamin B<sub>12</sub> as catalyst, chlordecone  $\delta^{13}\text{C}$ -values increased during the incubation time by an  
385 absolute value of 3.1‰ (Figure 5). This modest but significant isotope effect was determined to occur  
386 in four hours of transformation, with a fractionation factor of  $\epsilon_{\text{bulk}}=-2.6\pm 0.4\text{‰}$  (Figure 6).

387 After six weeks of incubation with zero-valent iron 86% of the initial chlordecone was transformed  
388 abiotically even in the absence of vitamin B<sub>12</sub>. After this time, the  $\delta^{13}\text{C}$ -values of chlordecone showed  
389 an increase of a value of 9.0‰ (Figure 5). The Rayleigh equation was applied to determine a carbon  
390 isotope enrichment factor of  $\epsilon_{\text{bulk}}=-4.1\pm 0.4\text{‰}$ , which represent a strong carbon isotope fractionation  
391 similar to that observed in transformations with the microbial consortium (Figure 6).

392 Abiotic chlordecone transformation with titanium (III) citrate and vitamin B<sub>12</sub> was fast and 88% of the  
393 initial chlordecone concentration was transformed within 95 minutes (Figure 5). The transformation,  
394 however, did not lead to a significant carbon fractionation. Between the beginning and the end of the  
395 reaction, a difference of 1.8‰ (absolute  $\delta^{13}\text{C}$ -value), which is below our significance threshold of 2‰,  
396 was measured. The enrichment factor was calculated to be  $\epsilon_{\text{bulk}}=-0.8\pm 0.4\text{‰}$  (Figure 6).

397  
398 Pronounced carbon isotope effects indicate that the rate-limiting step of the investigated reaction  
399 involves at least one carbon atom of chlordecone. In previous works, single element isotope analysis on  
400 carbon was successfully applied on pollutants such as  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (Zhang *et al.*, 2014)  
401 and chloroethenes (Elsner *et al.*, 2008) with zero-valent iron to correlate fractionation factor ranges with  
402 specific reaction mechanisms. The larger the difference between enrichment factors of distinct reactions,  
403 the easier it is to assert that distinct mechanisms occur. However, when the number of carbon atoms in  
404 a molecule increases, enrichment factors tend to decrease due to the dilution effect of carbon atoms in  
405 the molecule not involved in the reaction. It has been stated in this regard, that values of  $\epsilon_{\text{bulk}}$  between 0  
406 and -10‰ are common when a molecule contains more than six carbon atoms.(Aelion *et al.*, 2009) The  
407 same study states that according to calculations, no significant carbon isotope fractionation can be  
408 expected for polyaromatic hydrocarbons consisting of 11 or more carbons.(Aelion *et al.*, 2009) Under  
409 sulfate reducing conditions enrichment factors of -1.1‰ and -0.9‰ were observed for the microbial  
410 transformation of naphthalene (10 carbon atoms) and methylnaphthalene (11 carbon atoms),  
411 respectively.(Griebler *et al.*, 2004) However, CSIA was successfully applied onto the dechlorination of  
412 tri- and tetrachlorodibenzodioxins by *Dehalococcoides*-containing cultures.(Ewald *et al.*, 2007; Liu *et*  
413 *al.*, 2010) These studies together with the fact that dibenzodioxins contain 12 carbon atoms indicate that  
414 the isotopic characterization of polycyclic C<sub>10</sub>-molecules like chlordecone is feasible. With the

415 information on the number of carbon atoms in a molecule (n), the number of carbons at the reactive site  
416 involved in the reaction (x) and the number of indistinguishable reactive sites (z) in case of a symmetry  
417 in the molecule, the Apparent Isotope Kinetic Effect (AKIE) can be calculated according to equation 3  
418 from measured isotope fractionation data.(Aelion *et al.*, 2009) In contrast to the  $\epsilon_{\text{bulk}}$  value described  
419 above, the  $\epsilon_{\text{AKIE}}$  considers only active sites in the fractionation process.

$$420 \quad \epsilon_{\text{AKIE}} = z \cdot \frac{n}{x} \cdot \epsilon_{\text{bulk}} \quad (3)$$

421 By ignoring inactive sites in the isotope fractionation calculations, the  $\epsilon_{\text{AKIE}}$  enables comparison of  
422 fractionation between different compounds, which is not possible otherwise because the parameters of  
423 the transformation n, x and z are not the same. For chlordecone, the ten carbon atoms are not all involved  
424 in bond cleavage and are therefore responsible for a strong dilution of the isotope effect. However, the  
425 few approaches on the mechanism proposed in the literature do not enable clear distinction of active site  
426 number and the  $\epsilon_{\text{AKIE}}$  could not be calculated. Another alternative to avoid this diluting effect is to  
427 combine carbon isotope analysis with another element isotope analysis, such as chlorine in our case.  
428 Dual elemental isotope analysis with chlorine was successfully performed with tetrachloroethene (Badin  
429 *et al.*, 2014; Cretnik *et al.*, 2013; Renpenning *et al.*, 2014), trichloroethane(Palau *et al.*, 2014) and  
430 chloroform.(Torrento *et al.*, 2017) It allows comparison of isotope fractionation on a single carbon–  
431 chlorine bond implicated in the limiting step, instead of considering all carbons of the  
432 molecule.(Nijenhuis & Richnow, 2016) However, chlorine isotope analysis is still under development  
433 for other organochlorine compounds and could not yet be applied on chlordecone.(Nijenhuis &  
434 Richnow, 2016)

435 The three chemical transformations of chlordecone analyzed in our study showed distinct carbon isotope  
436 effects. Transformation involving zero-valent iron shows the closest isotope effect pattern to biotic  
437 transformations. This may be put in correlation with the neutral pH of the reaction medium, for biotic  
438 transformations and for the chemical transformation with zero-valent iron. For the two other chemical  
439 conditions, transformation occurs in alkaline medium, at pH 12. Solubility tests show that chlordecone  
440 solubility increases significantly above pH 9.4.(Dawson *et al.*, 1979) This solubility profile suggests  
441 that below pH 9.4 the chlordecone gem-diol group is in its acidic form whereas above pH 9.4, it loses a  
442 proton and becomes negatively charged (Figure 1). These two different forms could play a role in the  
443 mechanism.

444 Two product families were detected during abiotic and biotic transformation of chlordecone:  
445 hydrochlordecone derivatives ( $\text{C}_{10}\text{Cl}_{10-n}\text{H}_n\text{O}$  with n=1,2,3), and polychloroindenes ( $\text{C}_9\text{Cl}_3\text{H}_3$  and  
446  $\text{C}_9\text{Cl}_4\text{H}_4$ ) (Figure 3). While the formation of hydrochlordecones was observed in all biotic and abiotic  
447 reactions, the formation of chlorinated indene products occurred only in abiotic reactions with vitamin  
448 B<sub>12</sub> and in the biotic experiments. Also, there was a marked increase in the reaction speed when Ti(III)

449 citrate instead of sodium sulfide was used as the reducing agent. Therefore, vitamin B<sub>12</sub> and a strong  
450 negative redox-potential seemed necessary for the opening of the bis-homocubane cage to give rise to  
451 chlorinated indene structures as transformation products. Corrinoids could also be involved in the biotic  
452 transformations as both, the *Citrobacter* bacterium and bacterial consortium 86\_1 were shown to have  
453 cofactor B<sub>12</sub>-dependent enzymes encoded in their genome. (Chaussonnerie *et al.*, 2016). However, the  
454 hypothesis, that chlordecone is microbially transformed by cofactor B<sub>12</sub>-dependent enzymes is not  
455 supported by our isotope fractionation data because we obtained the largest differences in the enrichment  
456 factors between biotic and abiotic vitamin B<sub>12</sub> / Ti(III) citrate-mediated transformation. This might  
457 indicate that other enzymes are involved in *Citrobacter* or that there is another limiting step in  
458 *Citrobacter*.

### 459 **Chlordecone commercial formulations: comparison of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratios**

460 Four different commercial formulations of chlordecone stemming from different production periods  
461 between 1978 and 1993 were analyzed. This analysis required the extraction of chlordecone from the  
462 commercial formulations as a first step. Chlordecone extraction efficiency ranged from 88 to 105%  
463 based on literature values (Devault *et al.*, 2016) which confirmed full extraction of the active substance  
464 from the mixed ingredients. The isotope ratio of each formulation was measured from values obtained  
465 in the most stable concentration range in our IRMS i.e. 200 to 300 mg L<sup>-1</sup>.  $\delta^{13}\text{C}$  values of the four  
466 batches were all close to each, ranging from  $-31.1 \pm 0.4\text{‰}$  to  $-34.2 \pm 0.2\text{‰}$  (Table 3).

467 As Devault *et al.* have stated (Devault *et al.*, 2016) the four commercial chlordecone-containing  
468 compound formulations are representative in regard to isotope signatures for the 55 different commercial  
469 formulation applied in the French West Indies between 1972 and 1993. (Beaugendre, 2005) These 55  
470 different products have been manufactured at three different plants (Brazil, Martinique and Guadeloupe)  
471 during at least two distinguishable periods of time (before 1976 and in 1983).

472 Because of the highly similar isotope signature of the different original commercial chlordecone  
473 formulations, our measurements could enable the assessment of chlordecone transformation in the field  
474 by comparing the  $\delta^{13}\text{C}$ -values of chlordecone at a site with  $\delta^{13}\text{C}$ -values of the original compounds.  
475 Occurrence of active transformation could be concluded if the isotope ratios of the detected  
476 contaminants were outside of the range of the original values. According to our data this would  
477 especially occur when microbial transformation similar to that observed with *Citrobacter* strain takes  
478 place. The determined enrichment factors would then also allow for a quantitative assessment. On the  
479 other hand, our method now also enables an approach to measure the  $\delta^{13}\text{C}$ -values of samples at different  
480 locations downstream of an original contamination to detect changes in the  $\delta^{13}\text{C}$ -values with the flow  
481 path and therefore to evaluate if transformation occurs from relative changes in the  $\delta^{13}\text{C}$ -values.

482 As a perspective to advance the study of chlordecone isotope ratio in the laboratory and in the field,  
483 more accurate data could be obtained from dual-element isotope analysis to evaluate transformation  
484 with lower sensitivity thresholds. This may also allow to gain insight on the mechanism of microbial  
485 and abiotic chlordecone transformation.

486

### 487 **Acknowledgements**

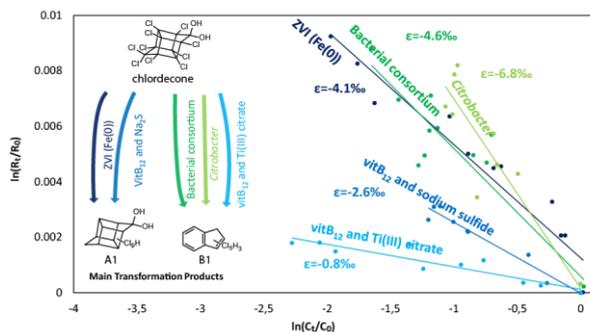
488 The authors thank Ivonne Nijenhuis and Julian Renpenning for critical discussion and helpful comments,  
489 Ursula Günther, Sébastien Chaussonnerie and Tiphane Pruvost for technical assistance. We thank Hervé  
490 Macarie, Sébastien Bristeau and Christophe Mouvet for chlordecone commercial formulations  
491 provision. We are also grateful for grants provided by the University of Evry Val d'Essonne.

492 The work was financially supported by the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies  
493 Alternatives (CEA) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft to L.A.

494

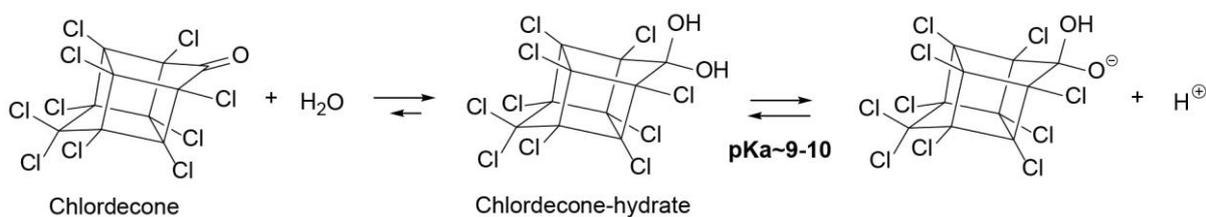
495 **Figures**

496 **Graphical Abstract**



497

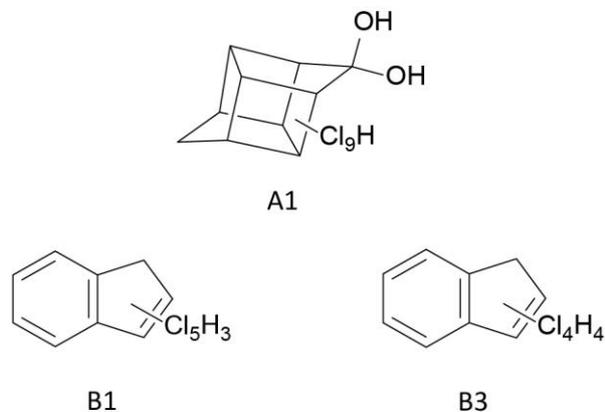
498



499

500 **Figure 1.** Chlordecone equilibrium between the ketone form (left), the gem-diol form (middle) and the  
501 deprotonated form at alkaline pH values (right)

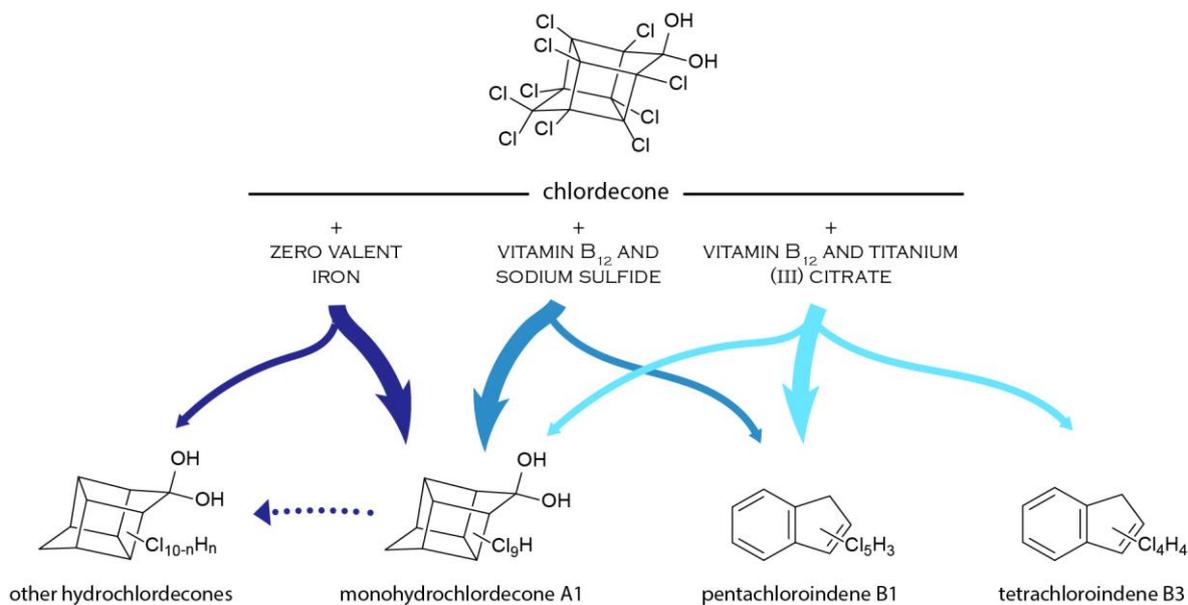
502



503

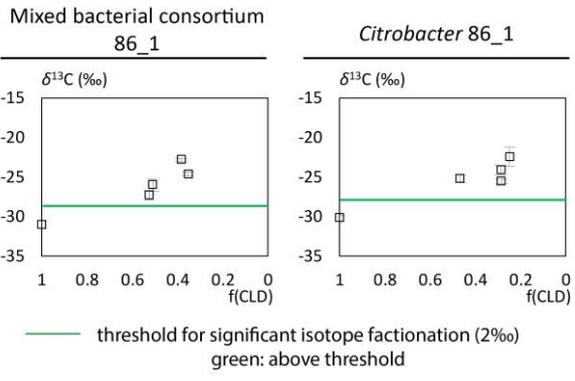
504 **Figure 2.** Main transformation product families obtained from chlordecone: A1 –  
505 monohydrochlordecone, B1 – pentachloroindene, B3 – tetrachloroindene

506



507

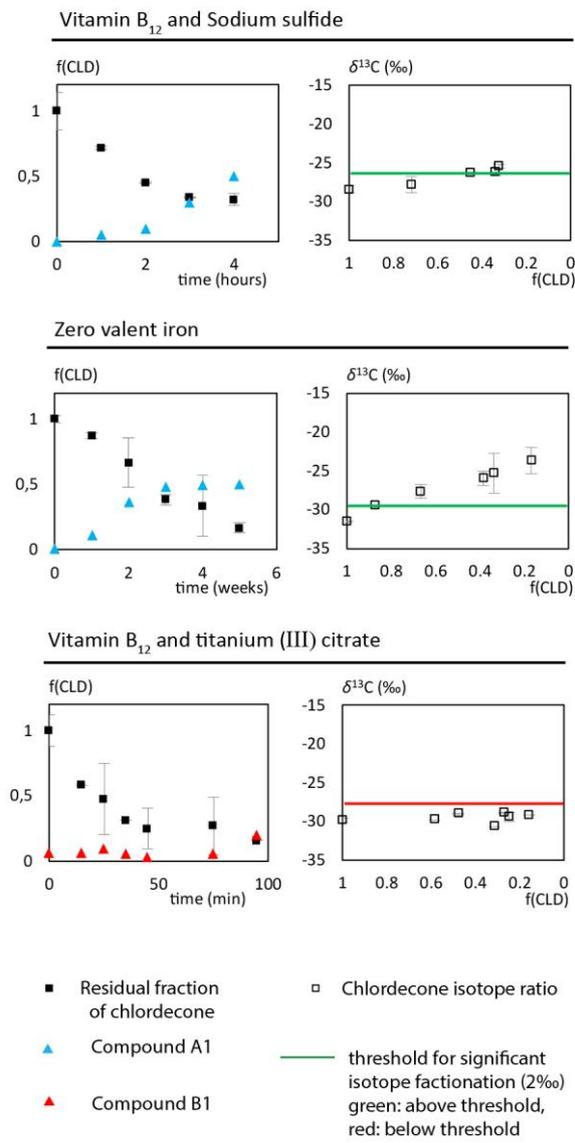
508 **Figure 3.** Overview on observed abiotic transformation paths and products. Symbols: thick arrows -  
 509 major transformation path, thin arrow – minor transformation path, dotted arrow – transformation not  
 510 observed here but described by others (Belghit *et al.*, 2015) after longer incubation time.



511

512 **Figure 4.** Isotopic composition of residual chlordecone during biotic transformations

513

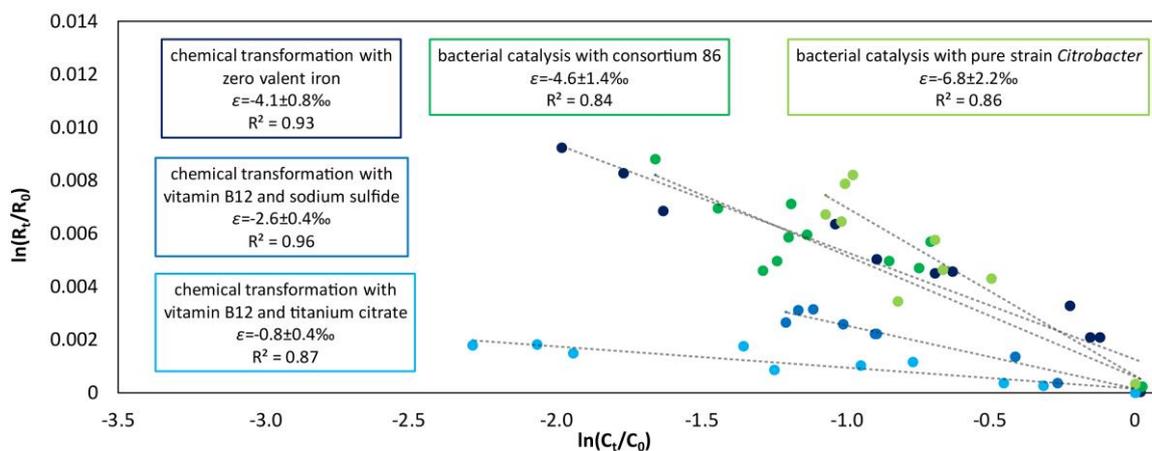


514

515 **Figure 5.** Chlordecone residual fraction over time and isotopic composition of residual chlordecone

516 during abiotic transformations

517



518

519 **Figure 6.** Rayleigh plot for carbon fractionation during chlordecone transformation according to  
 520 biological (green) and chemical (blue) experiments

## 521 Tables

522 **Table 1.** Chlordecone commercial formulation provenance and chlordecone content

Sample ID	Origin	Producer	Date of formulation	Date of sampling	Chlordecone concentration (mean mass % $\pm$ SD) <sup>1</sup>
Kepon-VIMS	Virginia	Allied Chemicals	Before 1976	05/2012	71.9 $\pm$ 8.28
Curlone-IRD	Martinique	Laurent de Lagarrigue S.A.	09/1983	07/2012	4.76 $\pm$ 0.37
Curlone-Cirad	Guadeloupe	Laurent de Lagarrigue S.A.	Unknown	2004	4.23 $\pm$ 0.27
Curlone-UAG	Guadeloupe	Laurent de Lagarrigue S.A.	09/1983	03/2012	4.26 $\pm$ 0.19

523 <sup>1</sup>Concentration of chlordecone in the sample given as the mean of triplicate measurements  $\pm$  SD.

524

525 **Table 2.** Relative differences of isotope ratios ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of chlordane from commercial formulations

	Kepone	Curlone		
		Cirad	IRD	UAG
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$-33.0 \pm 0.4$	$-34.2 \pm 0.2$	$-33.2 \pm 0.1$	$-31.1 \pm 0.2$

526

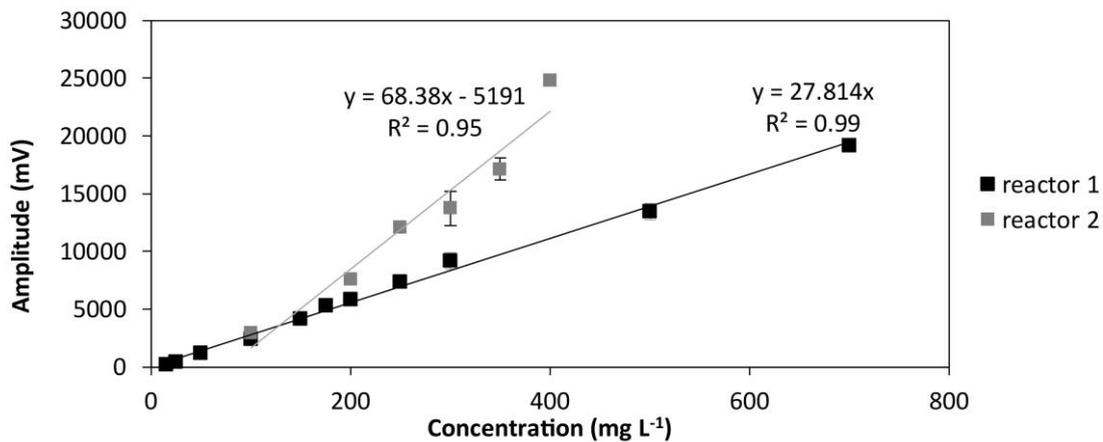
527 **Table 3.** Incubation of chlordecone with different catalysts and reducing agents. \*Chlordecone standard  $\delta^{13}C = -28.5 \pm 0.3\text{‰}$  (measured with reactor 1),  
 528 \*\*Chlordecone standard  $\delta^{13}C = -30.2 \pm 0.5\text{‰}$  (measured with reactor 2).

Transformation conditions			Chlordecone transformation <sup>1</sup>			Isotope fractionation					
	catalyst	Reducing agent	Degree (%)	Main TP <sup>2</sup>	Minor TP <sup>2</sup>	Start (‰)	End (‰)	$\epsilon_{\text{bulk}}$ (‰)	CI (‰)	R <sup>2</sup>	Number of replicates
biotic	Citrobacter 86_1	Sodium sulfide	49	C <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub> C <sub>9</sub> Cl <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	-31.0	-26.0	-6.8	2.2	0.86	2
	Consortium 86_1	Sodium sulfide	75	C <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub> C <sub>9</sub> Cl <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	-30.1	-22.4	-4.6	1.4	0.84	2
abiotic	Vitamin B <sub>12</sub>	Sodium sulfide	69	C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	-28.5	-24.5	-2.6	0.4	0.96	2
	None	Zero valent iron	83	C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> Cl <sub>8</sub> O <sub>2</sub> H <sub>4</sub> C <sub>10</sub> Cl <sub>7</sub> O <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-31.5	-23.7	-4.1	0.8	0.93	2
	Vitamin B <sub>12</sub>	Titanium (III) citrate	88	C <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub> H <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> Cl <sub>9</sub> O <sub>2</sub> H <sub>3</sub> C <sub>9</sub> Cl <sub>4</sub> H <sub>4</sub>	-30.4	-28.9	-0.8	0.4	0.87	2

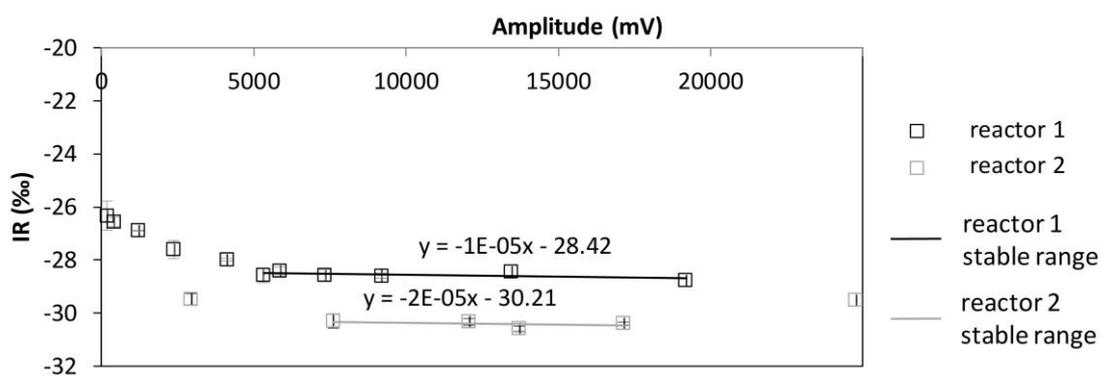
529 <sup>1</sup>Chlordecone transformation in % of the initial concentration; <sup>2</sup>TP – Transformation product

530

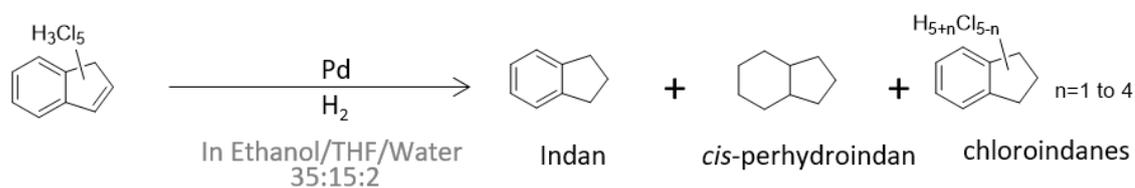
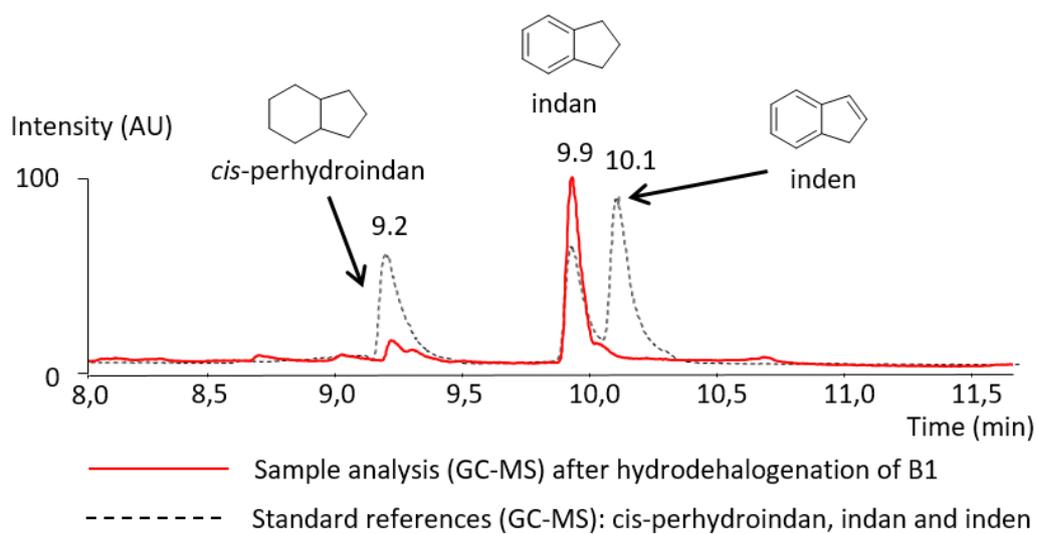
## Supplementary Material



**Figure S1.** Linear response of chlordecone amplitude with concentration in hexane/acetone 85:15



**Figure S2.** Calibration curve of the chlordecone isotope ratio in hexane/acetone 85:15



**Figure S3:** Complete dechlorination of transformation product B1 into indane structure

## **Chapitre 8 : Matériel et Méthodes**

---

---

## I. Protocoles généraux et équipements

### A. Généralités

Les réactions de dégradation par voie chimique de la chlordécone sont réalisées à partir de chlordécone (Laboratoire Dr. Ehrenstorfer GmbH, 97,5% et Azur Isotopes, 97%). La chlordécone marquée au  $^{13}\text{C}$  provient d'Azur Isotopes (97%). La vitamine B<sub>12</sub> (cyanocobalamine,  $\geq 98\%$ ), la vitamine B<sub>12a</sub> (hydroxocobalamine,  $>96\%$ ), la méthylcobalamine et l'hématine proviennent de Sigma-Aldrich. La chlorophylle a provient de Solaray.

Le sulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ , 98%) et la solution de chlorure de titane ( $>12\%$  en solution aqueuse contenant 10% d'acide chlorhydrique) proviennent de Sigma Aldrich. Le dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) provient de VWR. Le fer zéro valent a été généreusement fourni par Christophe Mouvet du Bureau des Ressources Géologiques et Minières (BRGM).

L'évolution des réactions est suivie par analyses GC-MS, LC-MS ou GC-FID d'extraits de prélèvements du milieu. A la fin de la réaction, l'extraction finale est réalisée. Les solvants utilisés sont fournis par l'entreprise Sigma-Aldrich (qualité GC pour les solvants d'extraction).

### B. Instruments et méthodes et instruments d'analyses

#### 4. GC-MS

Les échantillons liquides sont analysés sur la GC-MS Thermo Fisher Focus GC – DSQ II avec détecteur simple quadripole équipée d'un injecteur split/splitless. Deux méthodes d'analyse ont été développées au cours de ces travaux et sont qualifiées par la durée de la méthode.

##### Méthode longue (routine)

Les analyses sont réalisées sur une colonne DB-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (Agilent J&W). Le gaz vecteur est l'hélium à un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 3  $\mu\text{L}$  et l'injection se fait en mode splitless. La programmation en température est la suivante : plateau à 80°C (1 min), gradient de 50°C/min jusqu'à 140°C puis 6°C/min jusqu'à 280°C et plateau à 280°C (5 min). L'injecteur, la source d'ion et la ligne de transfert sont maintenus respectivement

à 200°C, 220°C et 280°C. L'ionisation est réalisée par impact électronique à 70 eV, la détection se fait en mode positif et l'analyse en mode full scan (m/z : 50-650).

Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 17. Les temps de rétention présentés sur les chromatogrammes peuvent différer dû à la longueur de la colonne légèrement raccourcie au cours des montages et démontages dans le four.

Tableau 17 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par GC-MS avec la méthode longue.

composé	CLD	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3
temps de rétention (min)	20,13	18,82	18,42	16,52	17,76	16,71	14,99	12,55	11,37

#### Méthode courte

Les analyses sont réalisées sur les mêmes appareils que décrits précédemment. Le volume d'injection est de 5 µl. Une colonne Zebron ZB-XLB de dimensions 10 mx 0,18 mm x 0,18 µm (Phenomenex) est utilisée. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit de 1,8 ml/min. Les échantillons sont injectés en mode splitless et le programme de température est le suivant : plateau à 125°C (30 s), gradient de 50°C/min jusqu'à 180°C puis 12,5°C/min jusqu'à 225°C, 25°C/min jusqu'à 275°C et plateau à 275°C (1 min). L'injecteur est maintenu à 200°C, la ligne de transfert à 280°C et la source d'ions à 220°C. L'impact électronique est réalisé à 40 eV et la détection est réalisée en mode positif, full scan ou SIM (Single Ion Monitoring) selon le besoin.

Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par GC-MS avec la méthode courte.

composé	CLD	A1	A2	A3	B1
temps de rétention (min)	6,2	5,8	5,6	4,9	4,45

#### Méthode d'analyse des produits d'hydrodéhalogénéation du métabolite B1

Les analyses sont réalisées sur une colonne DB-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent J&W). Le gaz vecteur est l'hélium à un débit de 1 ml/min. Le volume d'injection est de 3 µL et l'injection se fait en mode splitless. Le gradient de température suivi est le suivant : plateau à 40°C (4 min), gradient de 18°C/min jusqu'à 82°C (10 min) puis 28°C/min jusqu'à 270°C (3 min). L'injecteur, la source d'ion et la ligne de transfert sont maintenus respectivement à 200°C, 220°C et 280°C. L'ionisation est réalisée par impact électronique à 70 eV, la détection se fait en mode positif et l'analyse en mode full scan (m/z : 50-650).

Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 19. Les temps de rétention présentés sur les chromatogrammes peuvent différer dû à la longueur de la colonne légèrement raccourcie au cours des montages et démontages dans le four.

Tableau 19 : Temps de rétention du métabolite B1 et des produits issus de l'hydrodéhalogénéation.

composé	B1	perhydroindène	indane	indène
temps de rétention (min)	23,1	10,1	9,9	9,2

#### 5. LC-Orbitrap-MS

Les analyses sont réalisées avec un système Dionex Ultimate 3000 LC (Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse LTQ-OrbiElite (Thermo Fisher Scientific) équipé d'un ionisateur par électrospray (électrospray) utilisé en ionisation négative. Les spectres de masse sont obtenus avec un intervalle m/z de 50 à 2000 avec la résolution de masse fixée à 30 000 FWHM à m/z 400 dans l'analyseur Orbitrap. La tension de cône est fixée à 4,5kV, le niveau sLens RF à 67,9%, la température du four à 50°C et la température du capillaire à 275°C. Les

débites du gaz gaine et auxiliaire (diazote) sont respectivement optimisés à 60 et 50 (unités arbitraires), et le gaz de balayage est fixé à 0 (unité arbitraire).

Deux colonnes C18 analytiques ont été utilisées. La colonne 1 : Xbridge C<sub>18</sub> (Waters) 150 x 4,6 mm, granulométrie 5 µm, Waters et la colonne 2 : Synchronis C<sub>18</sub> (Thermo Fisher) 50 x 2,1mm, granulométrie 1,7 µm.

Les solvants utilisés en voie A et B respectivement sont un tampon acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc, 10 mM, ajusté à pH 7 avec NH<sub>4</sub>OH 1M) et l'acétonitrile. La méthode LC1 associée à la colonne 1 suit le gradient suivant : 0-2 min 20% B, 22-24 min 100% B, 30-35 min 20% B. Le volume d'injection est de 3 µl. Le débit est de 0,8 ml/min et la température 30°C. Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode LC1 associée à la colonne 1.

composé	chlordécone	A1	A2	A5	C1	C2	C3	C4
temps de rétention (min)	17,6	15,7	16,6	15,4	4,8	5,4	6,1	6,5

La méthode LC2 associée à la colonne 2 suit le gradient suivant : 0-1 min 20% B, 8-10 min 100% B, 12-14,5 min 20% B. Le volume d'injection est de 3 µl. Le débit est de 0,5 ml/min et la température 25°C. Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode LC2 associée à la colonne 2.

Composé (chlordécone famille A)	CLD	A1	A2	A3	A4	A5
temps de rétention (min)	6,4	5,7	6,0	5,7	5,3	5,7

Composé (famille C)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
temps de rétention (min)	3,1	3,2	3,5	3,7	2,2	2,5	2,7	2,9

## 6. LC-MS Qtrap

Le système est composé d'une UHPLC Dionex ultimate 3000 est couplée à un MS-MS Qtrap 5500, AB Sciex. La colonne utilisée est la colonne 2 décrite précédemment.

Les solvants utilisés sont A : tampon acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc, 10 mM, ajusté à pH 7 avec NH<sub>4</sub>OH 1M) et B : acétonitrile. Le gradient suivant est appliqué : 0-1,5min 12% B, à 6min 40% B, 21-24 min 100% B, 27-30 min 12% B. Le débit est de 0,5 ml/min et la température 25°C.

Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par LC-MS avec la méthode associée à la colonne 1.

composé	chlordécone	A1	C1	C2	C3	C4
temps de rétention (min)	11,6	10,3	4,9	5,3	6,0	5,4

## 7. GC-FID

Les échantillons liquides sont analysés à l'aide d'une GC-FID Thermo Scientific Trace 1300 comportant une colonne TG-5Sil MS 20m x 0,15mm x 0,15 mm (Thermo Scientific). L'injection (3 µl) est effectuée en split 1:3 à 350°C. Les conditions d'élution sont les suivantes : gradient de 180°C à 290°C de 0 à 4,8 min. Puis la température est maintenue à 290°C pendant 0,6 min. La température de la ligne de transfert est fixée à 320°C.

Pour cette méthode, les temps de rétention des différents composés sont résumés dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Temps de rétention des composés de la chlordécone et de ses métabolites de transformation au cours des analyses réalisées par GC-FID.

composé	chlordécone	A1	B1
temps de rétention (min)	3,9	2,6	1,9

## 8. Chromatographie sur couche mince

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été réalisées à l'aide de feuilles d'aluminium supportant un gel de silice 60 F254 et fournies par Merck Analytical Chromatography. La lecture des plaques est effectuée soit par révélation chimique à l'aide d'une solution aqueuse de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$  3 g,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  20 g, 5ml de NaOH à 5% et 300 ml d'eau) et sous irradiation UV (254 nm et 365 nm de longueur d'onde).

## 9. HPLC préparative

Le système est constitué d'une chaîne Shimadzu LC-20 AP couplée à un détecteur UV visible SPD-20AV. La colonne 3 utilisée est une colonne X-Bridge Prep C18 5  $\mu\text{m}$  OBD (150 x 19 mm). La colonne 4 est une colonne X-Bridge Prep C18 5  $\mu\text{m}$  OBD (150 x 30 mm).

Selon les métabolites à purifier, différentes méthodes ont été développées et sont décrites selon la colonne utilisée.

La méthode 1, associée à la colonne 3 comprend un isocratique MeOH/THF/eau (51 : 26 : 23) à un débit de 10 ml/min. La détection se fait par suivi de l'absorbance aux longueurs d'onde 200 et 270 nm.

Les temps de rétention des métabolites B1 et B3 sont respectivement  $RT_{B1} = 22,0$  et  $RT_{B3} = 17,5$  min (co-élution avec le soufre colloïdal).

Les méthodes 2, 3, 4 et 5 sont appliquées à la colonne 4.

Les méthodes 2, 3 et 4 impliquent pour solvant en voie A le tampon acétate d'ammonium 10 mM, ajusté à pH 7 avec  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1M), l'acétonitrile en voie B. Le débit est de 35 ml/min et la détection se fait par suivi de l'absorbance aux longueurs d'onde 230 et 270 nm.

La méthode 2 présente le gradient suivant, appliqué au solvant B : 0-4 min : 12%, à 24 min : 50% puis 100% de 28 à 35 min. Pour la méthode 2, les composés de la famille C sortent non séparés entre 15 et 20 min et ceux de la famille A entre 27 et 32 min.

Le gradient de la méthode 3, aussi appliqué au solvant B est le suivant : 0-4 min : 12%, à 15 min : 28%, à 30 min 30% et de 36 à 40 min : 100%. Les composés C1, C2 ont les temps de rétentions 18,4 min et 19,2 min respectivement.

La méthode 4 comprend le gradient suivant, appliqué au solvant B : 0-4 min : 12%, à 15 min : 29%, à 30 min 30% et de 36 à 40 min : 100%. Les composés de la familles C ont les temps de rétention résumés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Temps de rétention des composés de la famille C au cours de la séparation par la méthode 4 avec la colonne 4.

composé	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
temps de rétention (min)	21,6	22,8	25,0	27,9	17,6	18,2	18,7	20,2

La méthode 5 comprend un isocratique THF/MeCN/ tampon carbonate d'ammonium (10 mM, pH 9,5) 29:29:42 à un débit de 20ml/min. A la sortie de la colonne, un dixième du liquide est envoyé sur un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) à 70°C et 340 bar. La chlordécone, les métabolite A1, A2 et A3 ont les temps de rétention de 12,7 min, 9,0 min, 10,2 min et 7,7 min respectivement.

La méthode 6 présente un isocratique eau/acétonitrile 70 :30 avec un débit de 25 ml/min. Les métabolites B1, B2 et B3 ont les temps de rétentions de 42,3 min, 27,9 min et 3,9 min respectivement.

## 10. Chromatographie sur colonne de gel de silice

Le système est constitué d'un appareil Combi Flash® Companion® (Teledyne ISCO). Des colonnes pré-conditionnées de gel de silice (GraceResolv Flash Silica, Grace Davison, Discovery Sciences) de 4 et 40 g sont utilisées selon les méthodes.

Dans les méthodes 6 et 7 le solvant en voie A est l'heptane et le solvant en voie B est le mélange chloroforme/acétone 1:1. La détection est faite à 360 nm.

La méthode 7 est appliquée à une colonne de 40g Le gradient suivant est appliqué pour le solvant B : 0-7 min : 0%, à 12 min : 50% et de 15 à 30 min : 100%. A partir de 30 min, 0,05% d'acide formique est ajouté dans le solvant B. Le débit est de 40 ml/min. Au cours de cette séparation, les composés de la famille A, B et C ont des temps de rétention respectivement compris entre 8 et 29 min, entre 1 et 9 min et entre 12 et 26 min.

La méthode 8 est appliquée à une colonne de 4 g et comprend le gradient suivant, appliqué pour le solvant B : 0-14 min : 0% et de 40 à 50 min : 100% B. Le débit est de 16 ml/min. Au cours de cette séparation les composés de la famille B ont des temps de rétention compris entre 2 et 9 min.

### C. Protocole d'extraction pour les suivis

#### 1. Prélèvements

Des prélèvements de 500 µl pour les analyses GC-MS et LC-MS sont réalisés à intervalles réguliers dans le milieu réactionnel. Ils sont réalisés avec une seringue de 500 µl en verre et d'une aiguille jetable. Les volumes prélevés sont introduits dans des flacons de 1,5 ml en verre. Pour les analyses LC-MS, 100 µl sont utilisés dans le cas des analyses des transformations biologiques et 20 µl dans le cas des analyses des transformations chimiques.

#### 2. Extraction pour analyse GC-MS et GC-FID

Le prélèvement de 500 µl du milieu réactionnel est acidifié à pH 3 par HCl 6M (10 µl) puis extrait par 500 µl de DCM (agitation au vortex pendant 30 secondes). La phase organique extraite est analysée par GC-MS (méthode courte ou longue) après une dilution d'un facteur deux au DCM.

#### 3. Préparation pour analyse LC-MS

Dans le cas des analyses des milieux microbiologiques, 100 µl du prélèvement du milieu réactionnel sont mélangé à 400 µl du mélange tampon acétate d'ammonium 10mM, pH7 /acétonitrile 3 :1 afin d'atteindre les proportions du mélange initial des analyses par LC-MS (tampon acétate d'ammonium 10mM, pH7 /acétonitrile 4 :1 v/v).

Dans le cas des analyses des transformations chimiques, 20 µl du prélèvement du milieu réactionnel sont mélangé à 480 µl du mélange tampon acétate d'ammonium 10mM, pH7 /acétonitrile 38:10 afin d'atteindre les proportions du mélange initial des analyses par LC-MS (tampon acétate d'ammonium 10mM, pH7 /acétonitrile 4 :1 v/v).

Dans les deux cas, le mélange est filtré par un filtre Millex –GV 0,22 µm.

## II. Expériences microbiologiques et chimiques

### A. Expériences de transformation de la chlordécone et de ses métabolites à petite échelle (de 0,5 à 5 mg de chlordécone ou métabolite engagés)

1. Expériences de transformation microbiologiques de la chlordécone, de la <sup>13</sup>C–chlordécone et des métabolites purifiés A1, A2, A3, B1, C1 et C2.

#### Milieu de culture (MM6)

Le milieu minéral utilisé est décrit par (Löffler *et al.*, 1996) en remplaçant KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> par un tampon phosphate (mélange KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM, pH 7). Le sulfure de sodium (5 mM), le chlorohydrate de cystéine monohydraté (0,3 mM) et le dithiothréitol (5 mM) sont utilisés comme agents réducteurs. La résazurine (0,1%) est utilisée comme indicateur coloré de l'anaérobiose.

#### Préparation des cultures

Le clone de *Citrobacter* isolé au Genoscope est conservé au congélateur dans le milieu de culture contenant 20% de glycérol. Après décongélation, une oese est plongée dans le tube contenant le clone bactérien puis dans un eppendorf contenant 100 µL de milieu nutritif LB (lysogeny broth). Une nouvelle oese est plongée dans l'eppendorf et sert à l'étalement (par la méthode des cadrans) sur une boîte de Petri contenant une gélose et du milieu nutritif solide LB qui est ensuite placée une nuit à l'étuve (37°C). Une colonie isolée est alors prélevée et mise en solution dans un tube eppendorf contenant 100 µL de milieu nutritif LB (lysogeny broth) qui est alors introduit dans la boîte à gants (BAG). Les premières étapes se déroulent en dehors la BAG et sous hotte à flux laminaire pour conserver la stérilité du clone ceci étant permis par le caractère aéro-tolérant de *Citrobacter*. Dans la BAG. Avant de les utiliser pour des expériences, une préculture est réalisée pendant une nuit dans le milieu MM6 utilisé dans le but d'adapter les bactéries aux conditions anaérobies et de s'assurer d'avoir des cellules fraîches et phase de croissance exponentielle avant l'ensemencement par les métabolites organochlorés.

Des cultures liquides avec le consortium bactérien APW sont en permanence conservées dans la BAG, avec les utiliser une préculture sur une nuit est effectuée.

### Ajout des métabolites au milieu de culture

Les métabolites A1 (0,5 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$ ), A2 (0,5 mg ; 1,1  $\mu\text{mol}$ ), A3 (0,5 mg ; 1,2  $\mu\text{mol}$ ), B1 (0,5 mg ; 1,7  $\mu\text{mol}$ ) purifiés sont solubilisés dans 1 ml d'acétone et répartis chacun dans cinq fioles en verre de 100 ml. Une fois l'acétone évaporée à pression atmosphérique, le milieu de culture (20 ml) est ajouté en BAG, ce qui conduit à une concentration finale des métabolites de 5 mg/L dans chaque fiole.

### Ensemencement des milieux

Une préculture de 50 ml dans un flacon de 100 ml est inoculée par 1 ml d'une culture du consortium APW. Les fioles contenant les métabolites et le milieu de culture sont ensemencés au centième à partir des précultures. Elles sont incubées dans une boîte à gants sous atmosphère  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$  (98%,2%).

### 2. Expériences de transformation chimiques de la chlordécone – criblage des conditions de transformations chimiques

Les modes opératoires de chaque réaction sont présentés, classés selon l'agent réducteur employé. En effet, leur différence de solubilité (le fer zéro valent est une poudre métallique et donc non soluble dans les solvants utilisés) ne permet pas de décrire une procédure commune pour toutes les réactions. Les complexes métalliques (cobalamines, hématine et chlorophylle) sont tous hydrosolubles. Les réactions sont présentées pour 5,0 mg (9,8  $\mu\text{mol}$ ) de chlordécone dans un volume final de 30,0 ml. Le nombre d'équivalents molaire (éq.) est donné pour les réactifs par rapport à la chlordécone. Le détail des quantités massiques et molaires utilisées pour chaque réactif est détaillé en Annexe 14. Les conditions de transformation (pH du milieu, durée et métabolites produits) sont résumées en Annexe 14 et Annexe 15.

### Désaération des solvants

Toutes les transformations chimiques se font dans un milieu aqueux ou un mélange eau/solvant organique. La première étape est la désaération de l'eau par bullage d'un flux de diazote. Ce courant de gaz inerte est maintenu pendant 30 minutes pour 100 ml d'eau à désaérer. Les solvants organiques (acétone, éthanol et méthanol) sont aussi désaérés de cette façon, sous hotte.

## Désaération de la chlordécone

La chlordécone est pesée (5 mg, 9,8  $\mu\text{mol}$ ) dans une fiole de 100 ml ensuite sertie et désaérée par un flux de diazote pendant 20 minutes.

### Mode opératoire en condition réductrice avec le dithionite de sodium

- Transformation de la chlordécone en présence de dithionite de sodium

Le dithionite de sodium (220,0 mg ; 1,3 mmol, 133 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est désaérée par un courant de diazote puis dissous dans l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée. Le mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes puis introduit dans la fiole désaérée contenant la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante avec agitation.

- Transformation de la chlordécone en présence de dithionite de sodium et de vitamine B<sub>12</sub>

Le dithionite de sodium (220,0 mg ; 1,3 mmol ; 133 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite et le mélange est amené à pH 12 avec une solution d'hydroxyde de sodium (3M). Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9  $\mu\text{mol}$ , 0,3 éq.) sous forme de poudre. Ce mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes puis introduit dans la fiole désaérée contenant la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante avec agitation.

- Transformation de la chlordécone en présence de dithionite de sodium et d'hématine

Le dithionite de sodium (220,0 mg ; 1,3  $10^{-3}$  mol, 133 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant l'hématine (31,2 mg ; 4,9  $10^{-5}$  mol, 5,0 éq.) solubilisée au préalable à 2,1  $10^{-2}$  M dans une solution de carbonate de sodium à 0,1 M. Ce mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes, puis est introduit dans la fiole désaérée

contenant la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante avec agitation.

#### Mode opératoire en condition réductrice avec le sulfure de sodium

- Transformation de la chlordécone en présence de sulfure de sodium

Le sulfure de sodium (220,0 mg ; 2,8 mmol ; 286 équ.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole de ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite. Le mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes, puis est introduit dans la fiole désaérée contenant le chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante.

- Transformation de la chlordécone en présence de sulfure de sodium et de vitamine B<sub>12</sub>

Le sulfure de sodium (220,0 mg ; 2,8 mmol ; 286 équ.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9  $\mu\text{mol}$  ; 0,3 équ.) sous forme de poudre. Ce mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes puis introduit dans la fiole désaérée contenant la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante.

- Transformation de la chlordécone en présence de sulfure de sodium et d'hématine

Le sulfure de sodium (220,0 mg ; 2,8 mmol ; 286 équ.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant l'hématine (31,2 mg ; 4,9  $10^{-5}$  mol ; 5,0 équ.) solubilisée à 2,1  $10^{-2}$  M dans une solution de carbonate de sodium à 0,1 M. Ce mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes puis introduit dans la fiole désaérée contenant la chlordécone

(5,0 mg ; 9,8  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante.

- Transformation de la chlordécone en présence de sulfure de sodium et de chlorophylle a

Le sulfure de sodium (220,0 mg ; 2,8 mmol ; 286 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote puis l'eau (30,0 ml) préalablement désaérée est introduite. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant la chlorophylle a (567  $\mu$ l de la solution à  $6,6 \cdot 10^{-2}$  M soit 33,3 mg ;  $3,7 \cdot 10^{-5}$  mol ; 3,8 éq.). Ce mélange est désaéré à nouveau par un flux de diazote durant vingt minutes puis introduit dans la fiole désaérée contenant la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu$ mol). Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante avec agitation.

#### Mode opératoire en conditions réductrices avec le fer zéro valent

- Transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent

Le fer zéro valent (220,0 mg ; 3,9 mmol ; 398 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est désaérée par un courant de diazote. La chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu$ mol) est pesée et introduite dans une fiole sertie ensuite désaérée le mélange eau/acétone 3:1 (30 ml) est introduit. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant le fer zéro valent. Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante, avec agitation sur un plateau agitant.

- Transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent et de vitamine B<sub>12</sub>

Le fer zéro valent (220,0 mg ; 3,9 mmol ; 398 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est désaérée par un courant de diazote. La chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu$ mol) et la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9  $\mu$ mol, 0,3 éq.) sont pesées et introduites dans une fiole sertie ensuite désaérée et le mélange eau/acétone 3:1 (30 ml) est introduit. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant le fer zéro valent. Le mélange réactionnel est

maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante, avec agitation sur un plateau agitant.

- Transformation de la chlordécone en présence de fer zéro valent et de l'hématine

Le fer zéro valent (220,0 mg ; 3,9 mmol ; 398 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote. Le fer zéro valent étant insoluble, la chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ) et l'hématine (31,2 mg ; 4,9  $10^{-5}$  mol, 5,0 éq.) solubilisée à 2,1  $10^{-2}$  M dans une solution de carbonate de sodium à 0,1 M sont introduites dans une fiole sertie ensuite désaérée et solubilisée dans 30,0 ml d'eau. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant le fer zéro valent. Le mélange réactionnel est maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante, avec agitation sur un plateau agitant.

#### Mode opératoire en conditions réductrices avec le citrate de titane (III)

La solution de citrate de titane est préparée selon le protocole de Zehnder *et al.* (Zehnder & Wuhrmann, 1976) en mélangeant 2 ml de solution de chlorure de titane  $\text{TiCl}_3$ , ( $\geq 12\%$  dans HCl) avec 20,0 ml de solution de citrate de sodium à 0,2 M. 3,4 ml de carbonate de sodium saturée (2,83 M) sont utilisés pour amener la solution de citrate de titane à pH 7. La solution de citrate de titane est basifiée par 3,5 ml de soude (3 M) pour amener la solution à pH 12,7. Le mélange est réalisé au contact de l'air. La solution est ensuite désaérée par un flux de diazote.

- Transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) dans l'eau

La chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ) est pesée sous hotte et introduite dans une fiole ensuite sertie et désaérée. L'eau désaérée (25 ml) est transférée dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) ( $3,2 \cdot 10^{-4}$  mol ; 32,6 éq.) basifié sont ajoutés. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

- Transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) et de vitamine B<sub>12</sub> dans l'eau

La chlordécone (5,0 mg ; 9,8  $\mu\text{mol}$ ) et la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9  $\mu\text{mol}$ , 0,3 éq.) sont pesées sous hotte et introduite dans une fiole ensuite sertie et désaérée. L'eau désaérée (25 ml) est transférée dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) ( $3,2 \cdot 10^{-4}$  mol ; 32,6 éq.)

basifié sont ajoutés. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

- Transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) et de vitamine B<sub>12</sub> dans le mélange eau/méthanol 3:1

La chlordécone (5,0 mg ; 9,8 µmol) et la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9 µmol, 0,3 éq.) sont pesées sous hotte et introduite dans une fiole ensuite sertie et désaérée. Un mélange eau/méthanol 7:3 (25 ml) est transféré dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) (3,2 10<sup>-4</sup> mol ; 32,6 éq.) basifié sont ajoutés pour conduire à un mélange final eau/méthanol 3:1. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

- Transformation du métabolite A1 en présence de citrate de titane (III) et de vitamine B<sub>12</sub> dans le mélange eau/méthanol 3:1

Le métabolite A1 (5,0 mg ; 2,6 10<sup>-5</sup> mol) et la vitamine B<sub>12</sub> (4,0 mg ; 2,9 µmol ; 0,3 éq.) sont pesées sous hotte et introduite dans une fiole ensuite sertie et désaérée. Un mélange eau/méthanol 7:3 (25 ml) est transféré dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) (3,2 10<sup>-4</sup> mol ; 32,6 éq.) basifié sont ajoutés pour conduire à un mélange final eau/méthanol 3:1. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

- Transformation de la chlordécone en présence de citrate de titane (III) et d'hématine

La chlordécone (5,0 mg ; 9,8 µmol) et l'hématine (31,2 mg ; 4,9 10<sup>-5</sup> mol ; 5,0 éq.) solubilisée à 2,1 10<sup>-2</sup> M dans une solution de carbonate de sodium à 0,1 M sont introduites dans une fiole sertie ensuite désaérée. L'eau désaérée (25 ml) est transférée dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) (3,2 10<sup>-4</sup> mol ; 32,6 éq.) basifié sont ajoutés. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

## B. Expériences à grande échelle (de 5,0 mg à 1 g de chlordécone ou de métabolites engagés)

### 1. Expérience de transformation par voie microbologique de la chlordécone avec le consortium 86 : Production des métabolites B1, C1 et C2

La chlordécone (Dr. Ehrenstorfer GmbH) est solubilisée dans le diméthylformamide (DMF) à une concentration de 200 mg/mL. Cette solution mère est diluée dans la culture à une concentration finale de 50 µg/mL.

Le milieu de culture décrit au § II.A.1. (1,2 L ml) est introduit dans une bouteille de 2L. Une préculture de 50 mL dans un flacon de 100 mL est inoculée par 1 mL d'une culture du consortium APW. Un volume de 1,2 L de milieu avec 50 mg/l de chlordécone (60,0 mg ; 118,1 µmol) sontensemencés au centième à partir des précultures (§ II.1.A.). La bouteille de 2L, fermée par une membrane poreuse, est incubée dans une boîte à gants sous atmosphère N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> (98%,2%) pendant deux ans.

### 2. Expérience de transformation de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le sulfure de sodium : production du métabolite A1

La chlordécone (100,0 mg ; 2,0 10<sup>-4</sup> mol) est pesée sous hotte et introduite dans un ballon de 500 ml, bouché par un septum en caoutchouc à jupe rabattable qui est ensuite désaéré. Le sulfure de sodium (2,2 g ; 2,8 10<sup>-2</sup> mol ; 140 éq.) et la vitamine B<sub>12</sub> (40,0 mg ; 2,9 10<sup>-5</sup> mol ; 0,15 éq.) sont pesés sous hotte et introduits dans un ballon de 500 ml bouché par un septum en caoutchouc à jupe rabattable. Le ballon est ensuite désaéré par un courant de diazote et 300 ml d'eau préalablement désaérée sont introduits. La solution est désaérée pendant une heure. Elle est ensuite transférée dans le ballon désaéré contenant la chlordécone. Le mélange réactionnel est maintenu pendant trente heures sous atmosphère inerte, à température ambiante.

### 3. Expérience de transformation de la <sup>13</sup>C-chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le sulfure de sodium : production du métabolite <sup>13</sup>C-A1

La <sup>13</sup>C-chlordécone (11,0 mg ; 21,3 µmol) est pesée sous hotte et introduite dans une fiole de 100 ml sertie puis désaérée. Le sulfure de sodium (220,0 mg ; 2,8 mmol ; 132 éq.) et la vitamine B<sub>12</sub> (3,8 mg ; 2,8 µmol ; 0,13 éq.) sont pesés sous hotte et introduits dans une fiole de 100 ml sertie. La fiole est ensuite désaérée par un courant de diazote et 30 ml d'eau

préalablement désaérée sont introduits. La solution est désaérée pendant trente minutes. Elle est ensuite transférée dans la fiole désaérée contenant la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone. Le mélange réactionnel est maintenu pendant trente heures sous atmosphère inerte, à température ambiante et sans agitation.

4. Expérience de transformation de la chlordécone avec la vitamine  $\text{B}_{12}$  et le citrate de titane (III) : production des métabolites B1, B2 et B3

La chlordécone (200,0 mg ;  $3,9 \cdot 10^{-4}$  mol) et la vitamine  $\text{B}_{12}$  (80,0 mg ;  $5,8 \cdot 10^{-5}$  mol ; 0,15 éq.) sont pesées sous hotte et introduites dans un ballon de 1 L bouché par un septum en caoutchouc à jupe rabattable qui est ensuite désaéré durant vingt minutes. Un mélange eau/méthanol 64 :36 (250 ml) est transféré dans la fiole et 50 ml du mélange de citrate de titane (III) (3,3 mmol ; 8,4 éq.) basifié sont ajoutés pour conduire à un mélange final eau/méthanol 7:3. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

5. Expérience de transformation de la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone avec la vitamine  $\text{B}_{12}$  et le citrate de titane (III) : production du métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1

Le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 a été obtenu suite à la transformation d'un total de 22,0 mg de  $^{13}\text{C}$ -chlordécone ( $4,2 \cdot 10^{-5}$  mol) menées successivement au cours de deux transformations impliquant 11,0 mg ( $2,1 \cdot 10^{-5}$  mol). Pour chacune de ces transformations, la  $^{13}\text{C}$ -chlordécone (11,0 mg ;  $2,1 \cdot 10^{-5}$  mol) et la vitamine  $\text{B}_{12}$  (4,0 mg ;  $2,9 \mu\text{mol}$  ; 0,14 éq.) sont pesées sous hotte et introduite dans une fiole ensuite sertie et désaérée. Un mélange eau/méthanol 7:3 (25 ml) est transféré dans la fiole et 5 ml du mélange de citrate de titane (III) ( $3,2 \cdot 10^{-4}$  mol ; 15,0 éq.) basifié (pH 12,7 par NaOH 3M) sont ajoutés pour conduire à un mélange final eau/méthanol 3 :1. Le mélange est désaéré puis maintenu sous atmosphère inerte avec agitation.

6. Expérience de transformation de la chlordécone avec la vitamine  $\text{B}_{12}$  et le fer zéro valent : production des métabolites  $\text{C}_i$  ( $i = 1$  à 4)

Les métabolites C1, C2, C3 et C4 ont été obtenus suite à la transformation d'un total de 30,0 mg de chlordécone ( $5,9 \cdot 10^{-5}$  mol) menée en parallèle sur six fioles contenant chacune 5,0 mg de chlordécone ( $9,8 \mu\text{mol}$ ). Pour chacune de ses transformations, le fer zéro valent (220,0 mg ; 3,9 mmol ; 398 éq.) est pesé sous hotte et introduit dans une fiole ensuite sertie. La fiole est désaérée par un courant de diazote. Le fer zéro valent étant insoluble, la chlordécone (5,0 mg ;  $9,8 \mu\text{mol}$ ) et la vitamine  $\text{B}_{12}$  (4,0 mg ;  $2,9 \mu\text{mol}$  ; 0,3 éq.) sont pesées et introduite dans

une fiole sertie ensuite désaérée et solubilisée dans 30 ml du mélange eau/acétone 3:1. Le mélange est ensuite transféré dans la fiole désaérée contenant le fer zéro valent. Le mélange réactionnel est maintenu en boîte à gants sous atmosphère N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 98 :2 v/v durant trois jours à température ambiante.

#### 7. Expérience de transformation de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le fer zéro valent : production des composés C<sub>j</sub> (j = 5 à 8)

Les composés C5, C6, C7 et C8 ont été obtenus suite à la transformation d'un total de 10,0 mg de chlordécone (2,0 10<sup>-5</sup> mol) menée en parallèle sur deux fioles contenant chacune 5,0 mg de chlordécone (9,8 μmol). Le même protocole que celui réalisé pour obtenir les métabolites C1, C2, C3 et C4 est appliqué (paragraphe ci-dessus) à la différence que le mélange réactionnel est maintenu durant deux mois en boîte à gants sous atmosphère N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> 98 :2 v/v, à température ambiante.

#### 8. Expérience de transformation par voie photochimique de la chlordécone : production des métabolites A2 et A3

La chlordécone (33,9 mg ; 6,7 10<sup>-5</sup> mol) est pesée et solubilisée dans 600 ml de toluène avec ajout de 1% d'isopropanol. Le mélange est placé sous flux de diazote durant 20 minutes. Une fois désaéré, le réacteur contenant la solution est irradié par une lampe au mercure à moyenne pression (Heraeux) UV de 150 Watts durant trois heures.

### III. Purifications

#### A. Purification du métabolite B1 depuis la culture microbiologique (consortium 86)

Le milieu de culture bactérien (1,2 L) issu de la transformation décrite au § II.B.1. est acidifié (HCl, 6 M) à pH 4. Un bullage de diazote est maintenu dans le milieu pendant 2 heures afin d'évacuer le sulfure d'hydrogène formé pour réduire la formation de soufre colloïdal, créé par l'oxydation du sulfure de sodium dans le milieu bactérien et gênant pour la suite de la purification. Le milieu de culture est dilué par de l'eau afin d'abaisser la densité de la phase aqueuse et limiter l'émulsion lors de l'extraction. La phase aqueuse est séparée en deux et chaque moitié est extraite 5 fois par 250 ml du mélange dichlorométhane/chloroforme (4 :1). Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite (T<sub>bain</sub>= 25-30°C ; P = 200 mbar).

L'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P= 600$  mbar) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice de 40 g et élué par un appareil Combi Flash® Companion® d'après la méthode 7. Les fractions de 18 ml sont collectées et après analyses par GC-MS, celles contenant le métabolite B1 sont réunies (entre 1 et 9 min) puis concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}}= 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 500$  mbar).

La purification par HPLC préparative est réalisée à l'aide de la colonne 3 et d'après la méthode 1. L'extrait à sec est solubilisé dans le mélange MeOH/THF/eau (51:26:23) (10 ml). Les séparations sont réalisées par injections de 1,5 ml du mélange. Les fractions comprises entre 21,0 min et 22,5 min contenant le métabolite B1 sont réunies puis évaporées à 120 mbar à température ambiante afin d'éliminer le THF et le méthanol. Après acidification à pH 3 (HCl 6M) elles sont ensuite extraites trois fois volume à volume au DCM.

L'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 0,6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P= 600$  mbar) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice de 4 g et élué par un appareil Combi Flash® Companion® d'après la méthode 8. Les analyses GC-MS permettent d'identifier parmi les premières fractions, celles qui contiennent le métabolite B1 (2 à 9 min). Après concentration sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P=30$  mbar), 3,1 mg de métabolite B1 pur ( $1,1 \cdot 10^{-5}$  mol ; 11%) sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

## **B. Purification des métabolites C1 et C2 depuis la culture microbiologique (consortium)**

Le milieu de culture bactérien (1,2 L) issu de la transformation décrite au § II.B.1. est acidifié (HCl, 6 M) à pH 4. Un bullage de diazote est maintenu dans le milieu pendant 2 heures afin d'évacuer le sulfure d'hydrogène formé pour réduire la formation de soufre colloïdal, créé par l'oxydation du sulfure de sodium dans le milieu bactérien et gênant pour la suite de la purification. Le milieu de culture est dilué par de l'eau afin d'abaisser la densité de la phase aqueuse et limiter l'émulsion lors de l'extraction. La phase aqueuse est séparée en deux et chaque moitié est extraite 5 fois par 250ml du mélange dichlorométhane/chloroforme (4:1). Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}}= 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 200$  mbar).

L'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P = 600 \text{ mbar}$ ) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice (colonne de 40 g) et élué par un appareil CombiFlash® Companion® d'après la méthode 7. Les fractions de 18 ml sont collectées et après analyses par LC-MS, celles contenant les métabolites C1 et C2 sont réunies (entre 12 et 26 min) puis concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^\circ\text{C}$  ;  $P = 500 \text{ mbar}$ ). L'extrait sec est solubilisé dans 20 ml du mélange tampon acétate d'ammonium/acétonitrile 4 :1, en ajustant le pH à 7 avec le tampon acétate d'ammonium 1 M à pH7. Le mélange est filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) puis injecté. Le volume d'injection est de 4 ml. Les métabolites polaires sont séparés des hydrochlorodécones sur la colonne 4 d'après le méthode 2. Les fractions de 5 à 20 ml sont collectées manuellement. Après analyse LC-MS, les fractions contenant les métabolites polaires dont C1 et C2 entre 15,0 min et 20,0 min sont réunies. Les fractions sont évaporées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^\circ\text{C}$  ;  $P = 200 \text{ mbar}$  afin d'éliminer les solvants, sont acidifiées à pH 2 (HCl 6M) et sont ensuite extraites 3 fois par 50 ml de DCM. Les extrait sont évaporés sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^\circ\text{C}$  ;  $P = 500 \text{ mbar}$ ).

L'extrait sec est solubilisé dans 10 ml du mélange tampon acétate d'ammonium/acétonitrile 4 :1, en ajustant le pH à 7 avec le tampon acétate d'ammonium 1 M à pH 7. Le mélange est filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) puis injecté. Le volume d'injection est de 4 ml. Les métabolites C1 et C2 sont séparés sur la colonne 4 avec la méthode 3. Les fractions de 5 à 20 ml sont collectées manuellement. Après analyse LC-MS, les fractions contenant le métabolite C1 aux temps de rétention compris entre 18,2 min et 18,7 min et entre 19,0 min et 19,4 min pour le métabolite C2, sont réunies. Les fractions sont évaporées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^\circ\text{C}$  ;  $P = 200 \text{ mbar}$  afin d'éliminer les solvants, sont acidifiées à pH 2 (HCl 6M) et sont ensuite extraites 3 fois par 50 ml de DCM. Chaque fraction concentrée sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 30^\circ\text{C}$ ,  $P = 30 \text{ mbar}$ ) contient de façon inattendue des mélanges des métabolites C1 et C2 et des impuretés sont encore présentes dans les fractions.

### **C. Purification du métabolite A1 depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le sulfure de sodium**

Le milieu réactionnel aqueux après transformation mise en place selon la procédure décrite au § II.B.2. impliquant la chlordécone (100,0 mg ;  $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$ ), le sulfure de sodium (2,2 g ;  $2,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol}$ ) et la vitamine B<sub>12</sub> (40,0 mg ;  $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ ) dans 300 ml d'eau est acidifié (HCl,

1 M) à pH 4 après 30 heures de réaction. Un bullage de diazote d'une heure permet l'évacuation du soufre colloïdale et cinq extractions de 200 ml du mélange dichlorométhane/chloroforme (4:1) sont réalisées pour extraire totalement les métabolites chlorés de la phase aqueuse. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25-30^{\circ}\text{C}$ ;  $P = 500\text{mbar}$ ).

L'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P = 600\text{ mbar}$ ) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice de 40 g et élué par un appareil Combi Flash® Companion® d'après la méthode 7. Les fractions de 18 ml sont collectées et après analyses par GC-MS, celles contenant le métabolite A1 sont réunies (entre 8 et 29 min) puis concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25-30^{\circ}\text{C}$ ;  $P = 500\text{ mbar}$ ).

La purification par HPLC préparative est réalisée à l'aide de la colonne 4 et de la méthode 5. L'extrait à sec est solubilisé dans le mélange THF/MeCN/tampon carbonate d'ammonium (10 mM, pH 9,5) 29:29:42 (10 ml). Les séparations sont réalisées par injections de 1,5 ml du mélange. Les fractions collectées au temps de rétention compris entre 8,8 min et 9,5 min contiennent le métabolite A1, sont réunies et évaporées sous pression réduite à température ambiante afin d'éliminer le THF et l'acétonitrile. Elles sont ensuite acidifiées à pH 3 (HCl 6M) et extraites trois fois volume à volume au DCM. Les phases organiques réunies sont évaporées à 500 mbar résultant en un solide blanc qui est ensuite solubilisé dans 450 ml de NaOH (1M). La phase aqueuse est lavée par 250 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle 95:5, puis acidifiée jusqu'à pH 3 (32 ml de HCl à 12M). La phase aqueuse est alors extraite trois fois par 250 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle 95 :5. Après concentration sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P=30\text{ mbar}$ ), le métabolite A1 (46,4 mg ;  $9,8 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$  ; 50%) est obtenu pur sous forme d'un solide blanc.

#### **D. Purification des métabolites A2 et A3 depuis la transformation par voie photochimique de la chlordécone**

Le milieu de la transformation décrite au § II.B.8. consiste en 600 ml de toluène dans lesquels 35,0 mg de chlordécone ( $6,9 \cdot 10^{-5}\text{ mol}$ ) ont été transformés. Les composés hydrochlordécones sont extraits par trois fois 200 ml de soude (1 M). La phase aqueuse est

ensuite acidifiée par 100 ml d'acide chlorhydrique (HCl, 6 M) sous agitation et les composés sont extraits par trois fois 200 ml de DCM. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 500 \text{ mbar}$ ).

La purification par HPLC préparative est réalisée à l'aide de la colonne 2. La détection est faite à l'aide d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) à  $70^{\circ}\text{C}$  et 340 bar. L'extrait à sec est solubilisé dans le mélange THF/MeCN/tampon carbonate d'ammonium (10 mM, pH 9,5) 29:29:42 (10 ml). Les séparations sont réalisées par injections de 1,5 ml du mélange et les métabolites A2 et A3 sont séparés entre eux et de la chlordécone par une méthode isocratique THF/MeCN/ tampon carbonate d'ammonium (10 mM, pH 9,5) 29:29:42 à un débit de 20 ml/min. Les fractions contenant les métabolites A2, entre 9,8 min et 10,5 min et A3, entre 7,3 min et 7,9 min respectivement sont évaporées sous pression réduite à température ambiante afin d'éliminer le THF et le MeCN, sont acidifiées à pH 3 (HCl 6 M) et sont ensuite extraites trois fois volume à volume au DCM. Les phases organiques réunies sont évaporées à 500 mbar résultant en un solide blanc qui est ensuite solubilisé dans 450 ml de NaOH (1 M). La phase aqueuse est lavée par 250 ml du mélange Hexane/acétate d'éthyle 95 :5, puis acidifiée jusqu'à pH 3 (32 ml de HCl à 12 M). La phase aqueuse est alors extraite trois fois par 250 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle 95 :5. Après concentration sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P=30 \text{ mbar}$ ), 3,2 mg ( $6,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$  ; 10%) de métabolite A2 pur et 3,5 mg ( $8,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$  ; 12%) sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

#### **E. Purification des métabolites B1, B2 et B3 depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le citrate de titane (III)**

Le milieu réactionnel issu de la transformation décrite au § II.B.4. impliquant la chlordécone (200,0 mg ;  $3,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$ ), la vitamine B<sub>12</sub> (80,0 mg ;  $5,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$ ) et le citrate de titane (3,3 mmol) dans est composé d'eau et de méthanol (7:3). Les produits de transformation (PCI) sont extraits cinq fois par 250 ml de pentane sans acidification préalable. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 500 \text{ mbar}$ ).

La purification par HPLC préparative est réalisée à l'aide de la colonne 2 et de la méthode 6. L'extrait contenant les métabolites B1, B2 et B3 est solubilisé dans 34 ml d'un mélange eau/MeCN/THF (16:7:12). Les injections sont réalisées par 4 ml de ce mélange et les composés B1, B2 et B3 sont ensuite séparés. Les fractions collectées sont extraites par 2 ml de pentane

puis analysées par GC-MS. Celles contenant les métabolites B1, B2 et B3 respectivement sont réunies. Les métabolites sont ensuite extraits par trois fois 50 ml de pentane et le solvant est évaporé à pression réduite (500 mbar, 25°C).

Pour chaque composé, l'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 0,6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P= 600$  mbar) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice de 4 g et élué d'après la méthode 8. Les analyses GC-MS permettent d'identifier parmi les premières fractions, celles qui contiennent le métabolite B1, B2 et B3 respectivement (2 à 9 min). Après concentration sous pression réduite de chaque ensemble de fractions ( $T_{\text{bain}} = 30^\circ\text{C}$ ,  $P=30$  mbar), les métabolites B1 (32,6 mg ;  $1,2 \cdot 10^{-4}$  mol ; 30%), B2 ((3,0 mg ;  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol ; 3%) et B3 (4,1 mg ;  $1,6 \cdot 10^{-4}$  mol ; 4%) purs sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

#### **F. Purification du métabolite $^{13}\text{C}$ -B1 issu de la transformation par voie chimique de la $^{13}\text{C}$ -chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le citrate de titane(III)**

Le milieu réactionnel issu du mélange des réactions la transformation décrite au § II.B.5. est composé d'eau et de méthanol (3:1). Les produits de transformation (PCI) sont extraits cinq fois par 250 ml de pentane sans acidification préalable. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}}= 25\text{-}30^\circ\text{C}$  ;  $P = 500$  mbar).

La purification par HPLC préparative est réalisée à l'aide de la colonne 2. L'extrait contenant le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 est solubilisé dans 4 ml d'un mélange eau/MeCN/THF (16:7:12). Les injections sont réalisées par 1 ml de ce mélange et le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 est séparé d'après la méthode 6. Après extraction par 2 ml de pentane, les fractions collectées sont analysées par GC-MS et celles contenant le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 entre 23,0 min et 25,2 min sont réunies. Les métabolites sont ensuite extraits par du pentane et le solvant est évaporé à pression réduite (500 mbar, 25°C).

L'extrait brut est dissous dans le dichlorométhane, mélangé avec 0,6 g de silice (70-200  $\mu\text{m}$ , Sigma Aldrich) et après évaporation à sec ( $P= 600$  mbar) l'échantillon solide est déposé sur une colonne pré-conditionnée de gel de silice de 4g et élué d'après la méthode 8. Les analyses GC-MS permettent d'identifier parmi les premières fractions, celles qui contiennent le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 (2 à 9 min). Après concentration sous pression réduite des fractions

( $T_{\text{bain}} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P=30$  mbar), le métabolite  $^{13}\text{C}$ -B1 pur (2,7 mg ;  $9,2 \cdot 10^{-6}$  mol ; 22%) est obtenu sous forme d'un solide blanc.

### **G. Purification des métabolites Ci (i = 1 à 4) et des composés Cj (j = 5 à 8) depuis la transformation par voie chimique de la chlordécone avec la vitamine B<sub>12</sub> et le fer zéro valent**

Les milieux issus des transformations chimiques de la chlordécone décrite au § II.B.6 et § II.B.7. sont réunis. Comme ils sont composés d'eau et d'acétone (3:1), l'acétone est évaporée du milieu et la phase aqueuse restant est acidifiée (HCl, 6M) à pH 1. Les produits de transformation (hydrochlordécones et APCIC) sont extraits au DCM. Les phases organiques réunies sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}}= 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 500$  mbar).

L'extrait sec est solubilisé dans 10 ml du mélange tampon acétate d'ammonium/acétonitrile 4 :1, en ajustant le pH à 7 avec le tampon acétate d'ammonium 1 M à pH 7. Le mélange est filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) puis injecté. Le volume d'injection est de 4ml. Les métabolites Ci (i = 1 à 4) et les composés Cj (j = 5 à 8) sont séparés sur la colonne 2 à d'après la méthode 4. Les fractions de 5 à 20 ml sont collectées manuellement. Après analyse LC-MS, les fractions contenant les métabolites C1, C2, C3, C4, aux temps de rétention de 21,6 min, 22,8 min, 25,0 min et 27,2 min respectivement, ainsi que les composés C5, C6, C7 et C8, aux temps de rétention 17,6 min, 18,2 min, 18,7 min et 20,2 min respectivement, sont évaporées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}}= 25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  ;  $P = 200$  mbar) afin d'éliminer les solvants. La phase aqueuse basifiée à pH 10 par un tampon de carbonate de potassium (10 mM, pH 10) et lavée par 50 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle 95 :5, puis acidifiée jusqu'à pH 3 (HCl 12M). La phase aqueuse est alors extraite trois fois par 50 ml du mélange hexane/acétate d'éthyle 95 :5. Les phases organiques sont concentrées sous pression réduite ( $T_{\text{bain}} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P=30$  mbar). Après analyse par LC-MS, les fractions contiennent de façon inattendue des mélanges des métabolites : C1 et C2, C3 et C4, C5 et C6 et C7 et C8. Des masses de l'ordre de 2,0 mg ont été obtenues par couple de composé. Des impuretés sont encore présentes dans certaines fractions.

## IV. Analyses structurales des métabolites et produits de transformation

### A. Expériences d'hydrodéhalogénéation du métabolite B1

Afin de prouver la structure indène du métabolite B1, une expérience d'hydrodéhalogénéation catalysée par du palladium a été réalisée. Le métabolite B1 purifié (0,5 mg ; 17,5  $\mu\text{mol}$ ) est placé dans un ballon en verre de 10 ml. Le palladium sur charbon (10%) est introduit puis l'ensemble est purgé au diazote. Un volume de 3,5 ml du mélange de solvants éthanol/tétrahydrofurane/eau (35:15:2, ratios volumiques) désaérés au préalable sont introduits dans le ballon, à nouveau désaéré au diazote. Le ballon est ensuite placé sous atmosphère de dihydrogène ( $\text{H}_2$ , 99,999%) pendant 16 heures à température ambiante. Le suivi de la réaction est réalisé toutes les heures par des prélèvements de 300  $\mu\text{l}$  extraits volume à volume trois fois par du DCM. Les phases organiques sont ensuite réunies et analysées par GC-MS avec la « méthode d'analyse des produits d'hydrodéhalogénéation du métabolite B1 ».

### B. Analyses structurales par résonance magnétique nucléaire

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été réalisés sur plusieurs spectromètres selon les expériences.

Les spectres RMN du métabolite A1 ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker Avance Ultra Shield (300 MHz pour RMN  $^1\text{H}$  à l'Université d'Evry Val d'Essonne (UEVE)). L'échantillon (46,4 mg ;  $9,8 \cdot 10^{-5}$  mol) a été solubilisé dans 0,75 ml d'acétone deutérée. Les déplacements chimiques  $\delta$  des spectres RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) sont exprimés en ppm à partir de la référence du solvant et les constantes de couplage (J) en Hz.

A1: RMN  $^1\text{H}$  (acétone- $\text{d}_6$ , 300 MHz) :  $\delta=5,0$  (s, 1H), 6,9 (s, 2H) ppm

A1: RMN  $^{13}\text{C}$  (acétone- $\text{d}_6$ , 75 MHz) :  $\delta=67,8$  ; 75,2 ; 76,9 ; 80,5 ; 81,5 ; 104,0 ppm

Les spectres RMN des métabolites A2 et A3 ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker 600 MHz (UEVE). Les échantillons (3,2 mg ;  $6,5 \cdot 10^{-6}$  mol et 3,5 mg ;  $8,3 \cdot 10^{-6}$  mol) ont été solubilisés chacun dans 0,75 ml d'acétone deutérée. Les déplacements chimiques  $\delta$  des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) sont exprimés en ppm à partir de la référence du solvant et les constantes de couplage (J) en Hz.

A2 : RMN  $^1\text{H}$  (acétone- $\text{d}_6$ , 600 MHz) :  $\delta=4,0$  (s, 1H), 6,7 (s, 1H), 6,8 (s, 1H) ppm

A2 : RMN  $^{13}\text{C}$  (acétone- $\text{d}_6$ , 150 MHz) :  $\delta$ = 60,4 ; 69,5 ; 74,5 ; 76,3 ; 78,7 ; 78,8 ; 81,2 ; 84,9 ; 93,6 ; 104,0 ppm

A3 : RMN  $^1\text{H}$  (acétone- $\text{d}_6$ , 600 MHz) :  $\delta$ =3,9 (s, 2H), 6,6 (s, 2H) ppm

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du métabolite B1 ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker Avance Ultra Shield 300 MHz (UEVE). L'échantillon (3,1 mg ;  $1,1 \cdot 10^{-5}$  mol) a été solubilisé dans 0,75 ml de chloroforme deutéré. Les déplacements chimiques  $\delta$  des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) sont exprimés en ppm à partir de la référence du solvant et les constantes de couplage (J) en Hz. Les expériences RMN HMBC et HSQC du métabolite ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker (600 MHz pour RMN  $^1\text{H}$  à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ISCN), Gif-sur-Yvette, France). L'échantillon (3,1 mg ;  $1,1 \cdot 10^{-5}$  mol) a été solubilisé dans 0,75 ml de dichlorométhane deutéré.

B1 : RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$ =3,7 (d, 2H), 6,9 (t, 1H) ppm

B1 : RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 75 MHz) :  $\delta$ = 45,4 ; 124,3 ; 127,1 ; 127,9 ; 129,4 ; 131,9 ; 139,5 ; 141,4 ; 142,4 ppm

Les spectres RMN COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  du métabolite [ $^{13}\text{C}_7$ ]-B1 ont été réalisés sur des spectromètres Bruker (600 MHz pour RMN  $^1\text{H}$ , et 800 MHz pour RMN  $^1\text{H}$ , ICSN). L'échantillon (2,7 mg ;  $9,2 \cdot 10^{-6}$  mol) est solubilisé dans de le dichlorométhane deutéré.

Les spectres RMN des métabolites B2 et B3 ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker 600 MHz (UEVE). Les échantillons (3,0 mg ;  $1,2 \cdot 10^{-5}$  mol et 4,1 mg ;  $1,6 \cdot 10^{-5}$  mol) mg ont été solubilisés chacun dans 0,75 ml de tétrahydrofurane deutérée. Les déplacements chimiques  $\delta$  des spectres RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) sont exprimés en ppm à partir de la référence du solvant et les constantes de couplage (J) en Hz.

B2 : RMN  $^1\text{H}$  (THF- $\text{d}_8$ , 600 MHz) :  $\delta$ =3,6 (t, 2H), 6,9 (t, 1H), 7,0 (t, 1H) ppm

B3 : RMN  $^1\text{H}$  (THF- $\text{d}_8$ , 600 MHz) :  $\delta$ =3,8 (d, 2H), 7,0 (t, 1H), 7,6 (s, 1H) ppm

B3' : RMN  $^1\text{H}$  (THF- $\text{d}_8$ , 600 MHz) :  $\delta$ =3,9 (d, 2H), 6,9 (t, 1H), 7,5 (s, 1H) ppm

Les spectres RMN des métabolites C<sub>i</sub> (i = 1 à 4) et des composés C<sub>j</sub> (j = 5 à 8) ont été obtenus à partir d'analyses sur un spectromètre Bruker 600 MHz (UEVE). Les échantillons impurs, de 1 à 3 mg ont été solubilisés chacun dans 0,75 ml d'acétone deutérée. Les déplacements chimiques  $\delta$  des spectres RMN <sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (150 MHz) sont exprimés en ppm à partir de la référence du solvant et les constantes de couplage (J) en Hz.

C1 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,9 (d, 2H), 7,0 (t, 1H) ppm

C2 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =4,0 (d, 2H), 7,0 (t, 1H) ppm

C3 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,8 (d, 2H), 7,5 (t, 1H), 8,1 (s, 1H) ppm

C5 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,6 (t, 2H), 6,9 (m, 1H), 7,0 (m, 1H) ppm

C6 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,7 (t, 2H), 6,9 (m, 1H), 7,0 (m, 1H) ppm

C7 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,6 (t, 2H), 6,9 (doublet de triplets, 1H), 7,6 (doublet de triplets, 1H), 8,1 (s, 1H) ppm

C8 : RMN <sup>1</sup>H (acétone-d<sub>6</sub>, 600 MHz) :  $\delta$ =3,9 (t, 2H), 6,9 (doublet de triplets, 1H), 7,1 (doublet de triplets, 1H), 8,0 (s, 1H) ppm

## **VI. Montage électrochimique pour les suivis de potentiel**

Les réactions électrochimiques sont menées dans une cellule à trois cols de 50 ml. L'électrode de référence est une électrode au sulfate mercurieux. Afin d'éviter toute pollution, l'électrode de référence est placée dans une allonge en verre remplie d'une solution de sulfate de sodium à 1.0x10<sup>-5</sup> mol/L. Le potentiel de cette électrode (E=0.66 V / ESH) a été vérifié préalablement. L'électrode de travail est un fil de platine. Les enregistrements sont réalisés par un potentiostat/galvanostat VersaSTAT 3 (Princeton Applied Research/AMETEK) contrôlé par le logiciel VersaStudio Software.

Les réactions sont réalisées dans les mêmes conditions et proportions que celles décrites au § II. A. Un flux d'argon maintient le milieu réactionnel anaérobie et assure l'agitation par un bullage doux dans le milieu. Dans le cas de la réaction impliquant le fer zéro valent seul ainsi que la vitamine B<sub>12</sub>, le milieu contient un solvant organique (eau/acétone 3 :1). Le volume du milieu

est de 50 ml au lieu de 30 ml et les réactifs sont ajustés en proportion (chlordécone : 8,3 mg ; 16,3  $\mu\text{mol}$ , fer zéro valent : 367 mg ; 6,5 mmol ; 398  $\text{eq.}$  et vitamine B<sub>12</sub> : 6,7 mg ; 4,8  $\mu\text{mol}$  ; 0,3  $\text{eq.}$ ), afin d'anticiper l'évaporation d'une partie de l'acétone au cours de la transformation, tout en permettant que les électrodes plongent dans le milieu tout au long de la réaction.



# Conclusions et perspectives

La chlordécone est un pesticide persistant causant aujourd'hui de nombreux problèmes sanitaires, socio-économiques et environnementaux aux Antilles. Les travaux développés au Genoscope sur la recherche de bactéries capables de dégrader la chlordécone ont permis la découverte de plusieurs consortia bactériens ainsi que de bactéries isolées du genre *Citrobacter* induisant une transformation complète de la chlordécone en quelques semaines. Les travaux de thèse présentés ici ont eu pour objet l'étude de cette transformation, au travers de différents outils analytiques (GC-MS, GC-FID, GC-IRMS, LC-MS, RMN, électrochimie). Les conclusions tirées des résultats obtenus seront présentées dans les parties suivantes, accompagnées des perspectives associées. L'étude des métabolites, puis des voies de transformations seront abordées. Une dernière partie traitera des perspectives environnementales envisageables d'après les nouveaux résultats apportés par ces travaux.

## **I. Etude des métabolites issus des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone**

Trois familles de métabolites ont été mises en évidence et étudiées : les hydrochlordécones (famille A), les métabolites apolaires comportant seulement neuf atomes de carbone (famille B) et les métabolites polaires (famille C). Afin d'en produire des quantités suffisantes pour ce travail d'analyse, des protocoles de synthèse biomimétiques favorisant chaque famille de métabolites ont été développés. Des séquences de purifications adaptées à chaque métabolite ont été mises au point, ce qui a permis, pour la plupart des métabolites principaux, de les obtenir avec un excellent degré de pureté. Les élucidations structurales initiées avec les données de spectrométrie de masse ont été finalisées grâce à l'apport de la résonance magnétique nucléaire. La structure indène, proposée indépendamment dans nos travaux initiaux et les travaux antérieurs d'autres équipes a enfin pu être prouvée, attestant de manière indubitable de l'ouverture de la cage de la chlordécone et ainsi d'un changement de paradigme dans la recherche d'une voie de biominéralisation de cette molécule.

La structure de cinq métabolites (A1, A2, A3, B1 et B2) a pu être élucidée complètement et partiellement dans le cas de dix autres (Figure 213). La finalisation de l'élucidation des dix derniers métabolites peut être envisagée par différentes approches, selon la structure de la molécule et l'origine de l'indétermination de chacun d'entre eux.

La structure des hydrochlordécones A4 et A5 pourrait être approfondie par des analyses par GC-MS-MS, rendues possibles par l'acquisition d'une GC-MS équipée d'un quadripôle par le LAMBE.

Dans le cas des métabolites B3 et B3' (régioisomères), l'indétermination concerne la position du proton du cycle à six atomes de carbone de la structure indène. Des expériences RMN de type ROESY ou NOESY pourraient apporter des informations sur la distance entre le proton du cycle à six atomes de carbone, par rapport aux deux autres groupes de protons. La comparaison des distances évaluées entre les différents groupes permettrait probablement de situer la position du proton dont la position est inconnue. Cette technique, associée aux informations obtenues par l'expérience RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , devrait permettre d'attribuer une structure propre à chacun des métabolites B3 et B3'.

Les composés de la famille C comportent une fonction acide carboxylique (suggérée d'après les analyses par LC-MS-Orbitrap). L'hydrodéphalogenation du métabolite B1 avait conduit à la production détectable d'indane. Par analogie, les produits de l'hydrodéphalogenation des acides polychloroindèncarboxyliques, comparés aux quatre carboxyindanes commerciaux permettraient de prouver la présence de la fonction acide carboxylique mais aussi de restreindre les possibilités de positions de la fonction. Comme évoqué au chapitre 5, la position de la fonction acide carboxylique ne pourrait être déterminée par cette voie du fait de l'hydrogénation rapide de la double liaison entre les atomes 2 et 3 de la structure indène qui provoque la perte d'asymétrie de la structure. L'équilibre proposé entre les régioisomères C1/C2, C3/C4, C5/C6 et C7/C8 pourrait être démontré par la solubilisation des composés dans des solvants protiques deutérés comme l'eau deutérée ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou le méthanol deutéré ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ). En infusion en mode négatif, la détection des composés avec 3 unités de masse supplémentaires validerait cette hypothèse.

L'élucidation structurale complète ou partielle de quinze métabolites permet d'avoir un meilleur aperçu global des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone. Alors que deux familles (familles A et B) avaient été identifiées par GC-MS, l'exploration des échantillons a permis l'identification d'une troisième, comportant des composés polaires (famille C). D'autres métabolites pourraient être produits et être encore inconnus. Des composés gazeux par exemple pourraient échapper aux analyses actuellement réalisées. Afin d'explorer cette hypothèse, deux approches sont envisagées : une collaboration initiée avec le LAMBE ayant récemment acquis une GC-MS disposant d'un échantillonneur d'espace de tête (headspace) d'un triple quadripôle permet d'envisager des analyses des composés volatils éventuellement produits durant les transformations. Une deuxième approche consiste à utiliser de la chlordécone radioactive, marquée au  $^{14}\text{C}$  pour suivre la totalité des atomes de carbone de la chlordécone au cours des transformations et notamment explorer le devenir de l'atome de carbone libéré au cours de la transformation de la chlordécone en métabolites de la famille B qui ne contiennent que neuf atomes de carbone. Des expériences

préliminaires permettent d'envisager de telles démarches (résultats non présentés) pour suivre les différentes familles de métabolites et de répondre à la question : mais où donc est passé le dixième carbone ? Une collaboration développée avec le laboratoire de marquage au  $^{14}\text{C}$  (CEA, Saclay, France), avec Olivier Loreau, David Buisson, Céline Chollet et Frédéric Taran élargit les moyens analytiques et les méthodes de séparation mises au point durant la thèse (non présentés) seront exploitées au cours d'une nouvelle thèse, démarrée le 01/10/17 par Oriane Della Negra à l'interface entre les équipes du LMP (Genoscope, Evry, France) et le Laboratoire de marquage au  $^{14}\text{C}$  (CEA, Saclay, France) (Figure 213).

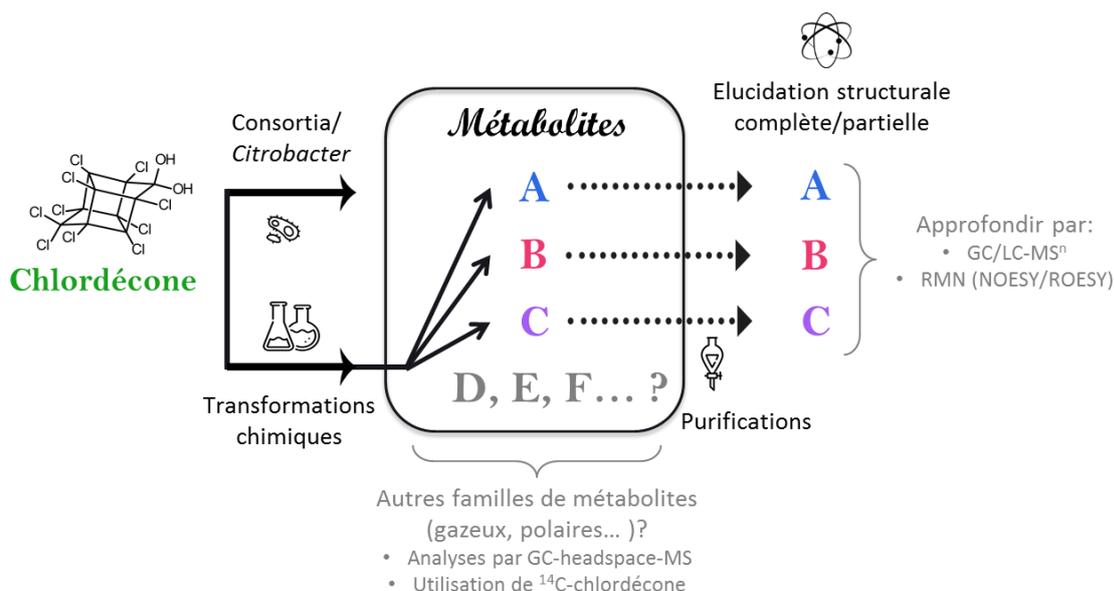


Figure 213 : Etude des métabolites issus des transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone et perspectives possibles.

## II. Etude des voies de transformations microbiologiques et chimiques de la chlordécone

Les mécanismes de transformation par voies chimiques et microbiologiques de la chlordécone en ces trois familles de métabolites ont été investigués via différentes approches. Le potentiel d'oxydoréduction mesuré au cours des réactions chimiques apparait comme un paramètre important : plus le milieu est réducteur, plus la production des familles B et C est favorisée. Leur formation nécessite en outre la présence d'un catalyseur tel la vitamine  $\text{B}_{12}$ . Les études électrochimiques ont également mis en évidence une interaction entre la vitamine  $\text{B}_{12}$  et la chlordécone. Aucune des enzymes susceptibles d'enclencher ces mécanismes comme les déhalogénases réductives n'ayant été trouvée, les résultats obtenus orientent donc les futures recherches vers les corrinoides bactériens qui joueraient un rôle primordial dans l'ouverture de la cage conduisant aux familles B et C. En cherchant à dégrader les métabolites précédemment isolés, des liens entre les familles ont été montrés permettant ainsi de proposer une voie générale de transformation de la chlordécone. Il s'agit d'une

première étape cruciale pour comprendre comment la chlordécone est transformée et ce qui pourrait favoriser cette transformation.

Le rôle de la vitamine B<sub>12</sub> a été mis en évidence dans l'ouverture de la cage de la chlordécone, au cours des transformations chimiques. L'interaction entre la chlordécone et les différents complexes métalliques testés pourrait être étudiée de manière plus approfondie. L'approche par voltampérométrie cyclique à différents temps réactionnels (Sophie Peulon, LAMBE, UEVE, France) permettrait de suivre cette interaction au cours des transformations. Un suivi parallèle des métabolites produits par GC/LC-MS pourrait permettre d'établir un lien entre cette interaction et la nature de la transformation : ouverture de la cage par exemple. Par ailleurs, si la vitamine B<sub>12</sub> a été utilisée comme modèle pour mimer les transformations microbiologiques, il existe de nombreux corrinoïdes naturels, décrits dans l'implication de déhalogénations réductives. La caractérisation des corrinoïdes produits par la bactérie *Citrobacter* isolée est en cours par l'équipe de Torsten Schubert au Centre de Recherche pour l'Environnement (UFZ, Jena, Allemagne). Chez les bactéries capables de synthétiser la vitamine B<sub>12</sub>, la voie de biosynthèse est complexe et implique de nombreux gènes. Les bactéries du genre *Citrobacter* isolées ont tous les gènes de la voie de biosynthèse de la vitamine B<sub>12</sub>. Des mutants par délétion de certains de ces gènes ont été obtenus et sont en cours d'analyse (LMP, Genoscope).

L'ouverture de la cage bishomocubane de la chlordécone et la formation des métabolites des familles A, B et C implique notamment un état de transition. Des travaux de modélisation des états intermédiaires proposés ont été réalisés (Gilles Frison et Eddy Elisée, Ecole Polytechnique, Palaiseau, France) et permettraient d'évaluer la possibilité du chemin d'ouverture (Figure 214).

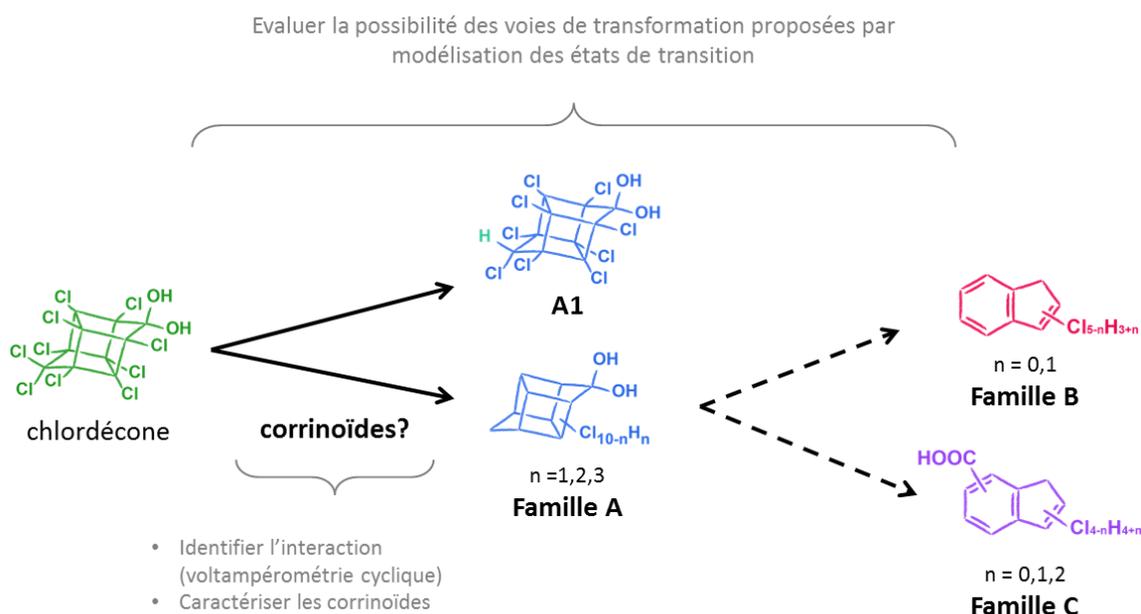


Figure 214 : Proposition d'une voie de transformation de la chlordécone par voie microbiologique et perspectives possibles.

### III. Dosage de la chlordécone, de ses métabolites et perspectives environnementales

Grâce aux efforts de synthèse et de purification chimique, plusieurs métabolites de la chlordécone sont maintenant mis à disposition de la communauté scientifique. Ce résultat majeur répond à l'un des défis listés dans le programme du Plan National d'Action Chlordécone 3 (2015-2020). L'accès aux métabolites synthétiques a récemment permis d'initier des études de toxicité (en collaboration avec Stefan Pflugmacher-Lima, Laboratoire d'Ecotoxicité de Berlin, Allemagne) et de biodégradabilité de ces composés (LMP, Genoscope, Evry, France) afin d'atteindre une minéralisation complète de la chlordécone, préalables à tout essai de bioremédiation des eaux et des sols pollués antillais. Des méthodes de suivi adaptées aux différentes familles de métabolites ont été développées par GC-MS, GC-FID, LC-MS Orbitrap et Qtrap. L'utilisation des métabolites purs en abondance naturelle ou marqués au <sup>13</sup>C (A1 et B1, Annexe 16) comme standards permet le développement de protocoles de quantification déjà en cours. Ces métabolites synthétiques pourront servir à mettre au point de nouvelles méthodes de suivi analytique et ainsi faciliter la recherche de possibles dégradations de la chlordécone en laboratoire et dans les matrices environnementales.

Des études plus approfondies pourront être réalisées par fractionnement isotopique, dont la méthodologie a été mise au point pour la chlordécone et appliquée à une étude préliminaire

comparant les transformations microbiologiques et chimiques. Cette méthode a également permis d'évaluer le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de différents lots commerciaux de pesticides (Curlone et Kepone) utilisés en Martinique et en Guadeloupe contenant la chlordécone comme substance active. La similitude des rapports isotopiques mesurés dans ces lots ouvre la possibilité d'appliquer cette technique aux sols pollués antillais afin de détecter d'éventuelles traces de transformation de la chlordécone. Des premiers essais de mesure du rapport isotopique pour l'élément chlore ( $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ ) sont en cours au Laboratoire « Isotope Biogeochemistry » (UFZ, Leipzig, Allemagne). L'analyse combinée du fractionnement isotopique des éléments chlore et carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ ) permettraient d'apporter une plus grande précision des tendances observées et éventuellement même de distinguer différentes voies de transformation.

La chlordécone contamine divers compartiments de l'environnement. Selon les types de sols, jusqu'à plusieurs mg/kg peuvent être mesurés. Dans les eaux de rivière, la chlordécone peut atteindre quelques  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Des filtres à charbon actif peuvent être ajoutés pour piéger la chlordécone dans les usines de traitement d'eaux usées ou de production d'eau potable. Ces systèmes ont été mis en place en Guadeloupe et plus récemment en Martinique. Cependant, ils ne font que de déplacer la pollution. Le traitement par ISCR avec du fer zéro valent (Mouvet *et al.*, 2016) n'est pas envisageable dû à la topographie de la plupart des sols contaminés (pentes) et pose le problème de la restauration de ces sols. Des essais de phytoremédiation ont permis l'extraction de quelques  $\mu\text{g}$  de chlordécone par kg de sol, ce qui reste négligeable devant la concentration actuelle des sols (Clostre *et al.*, 2017).

Dans une optique d'exploiter la transformation par la bactérie isolée *Citrobacter* de la chlordécone, différentes approches de remédiation peuvent être considérées. Le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S et quelques autres gènes présents dans le *Citrobacter* isolé permettrait de savoir s'il est présent ou non dans les sols antillais. En cas de réponse positive il sera envisagé de tenter de l'isoler et de vérifier ses capacités de dégradation et la possibilité d'une biostimulation. *Citrobacter* dispose dans son génome des gènes permettant la réalisation de symbiose avec des plantes pour la fixation du diazote notamment. Cette symbiose pourrait être exploitée dans le cadre d'une dépollution associant à la fois les bactéries et les plantes. Par ailleurs, les filtres à charbon actuellement utilisés pour piéger la chlordécone dans les eaux de traitement ne sont pas traités thermiquement pour des raisons économiques. Le traitement de ces filtres par les consortia bactériens ou les bactéries *Citrobacter* isolées pourrait être une alternative. La faisabilité de chacune des propositions serait à

étudier de manière plus approfondie afin d'exploiter au mieux le potentiel offert par la transformation décrite et étudiée dans ces travaux (Figure 215).

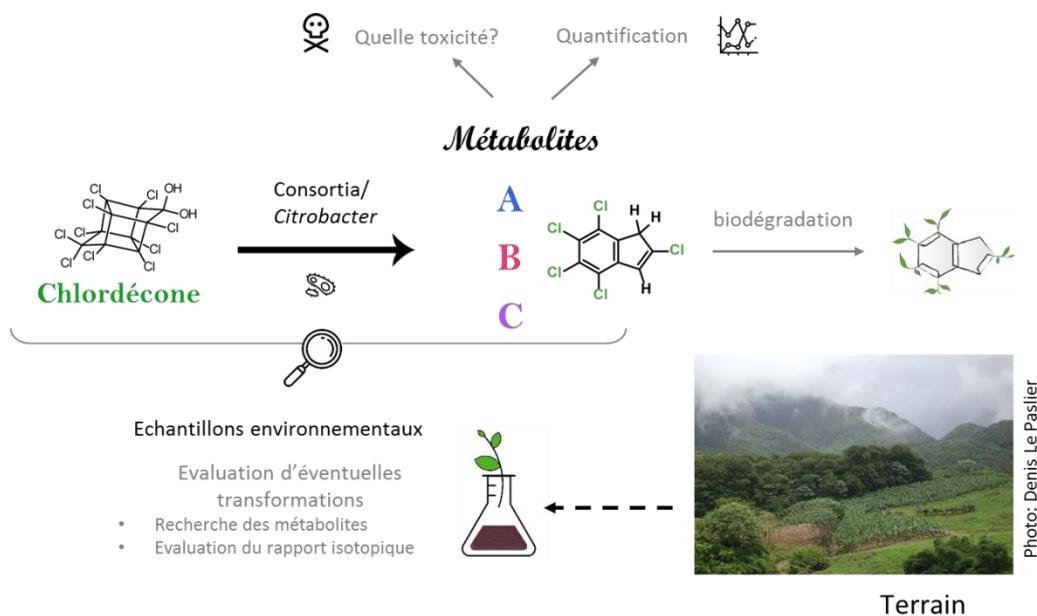
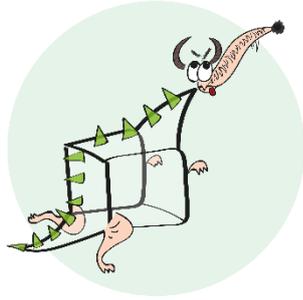


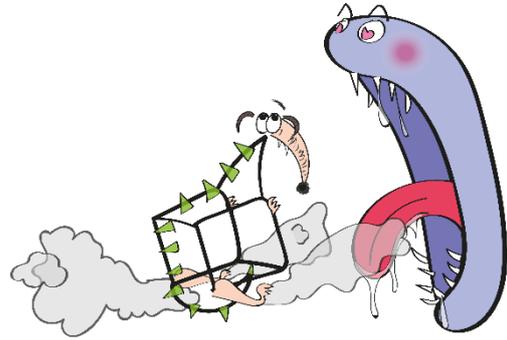
Figure 215 : Proposition d'une voie de transformation de la chlordécone par voie microbiologique et perspectives possibles.



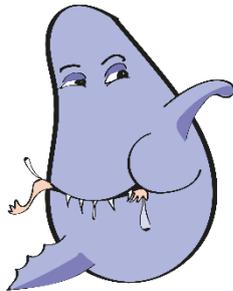
## Pour vous faire un dessin...



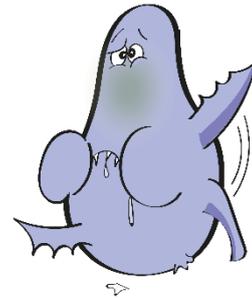
La chlordécone est une molécule monstrueuse.



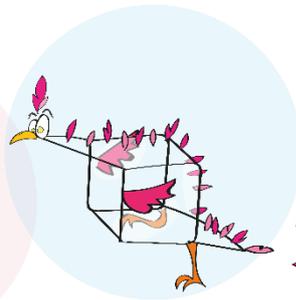
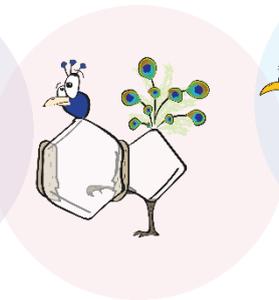
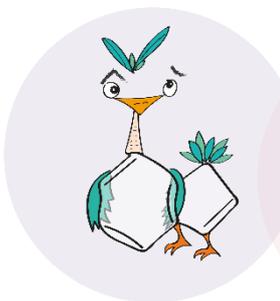
Des bactéries telles que Citrobacter essaient de la manger.



Elles essaient, elles essaient...



Mais elles trouvent la chlordécone tellement indigeste...



Qu'elles la recrachent, partiellement digérée, en de nouvelles molécules.

Marion Chevallier



# Bibliographie

- Aelion, M. C., Höhener, P., Hunkeler, D., & Aravena, R. (2009). *Environmental isotopes in biodegradation and bioremediation*: CRC Press - 2009-11-04.
- Alley, E. G., Layton, B. R., & Minyard, J. P., Jr. (1974). Identification of the photoproducts of the insecticides Mirex and Kepone. *J Agric Food Chem*, 22(3), 442-445.
- Assaf-Anid, N., Hayes, K. F., & Vogel, T. M. (1994). Reduction dechlorination of carbon tetrachloride by cobalamin(II) in the presence of dithiothreitol: mechanistic study, effect of redox potential and pH. *Environ Sci Technol*, 28(2), 246-252. doi: 10.1021/es00051a010
- Badin, A., Buttet, G., Maillard, J., Holliger, C., & Hunkeler, D. (2014). Multiple dual C-Cl isotope patterns associated with reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ Sci Technol*, 48(16), 9179-9186. doi: 10.1021/es500822d
- Bahlai, C. A., Xue, Y., McCreary, C. M., Schaafsma, A. W., & Hallett, R. H. (2010). Choosing organic pesticides over synthetic pesticides may not effectively mitigate environmental risk in soybeans. *PLoS One*, 5(6), e11250. doi: 10.1371/journal.pone.0011250
- Beaugendre, J. (2005). L'utilisation du chlordécone et des autres pesticides dans l'agriculture martiniquaise et guadeloupéenne. [Rapport]. *Assemblée Nationale*.
- Belghit, H., Colas, C., Bristeau, S., Mouvet, C., & Maunit, B. (2015). Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for identifying aqueous chlordecone hydrate dechlorinated transformation products formed by reaction with zero-valent iron. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(2), 93-105. doi: 10.1080/03067319.2014.994615
- Bell, B. A., & Whitmore, F. C. (1978). Kepone incineration test program. *United States Environmental Protection Agency*, 1-148.
- Benoit, P., Mamy, L., Servien, R., Li, Z., Latrille, E., Rossard, V., Martin-Laurent, F. (2017). Categorizing chlordecone potential degradation products to explore their environmental fate. *Sci Total Environ*, 574, 781-795. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.094
- Berg, M., Bolotin, J., & Hofstetter, T. B. (2007). Compound-specific nitrogen and carbon isotope analysis of nitroaromatic compounds in aqueous samples using solid-phase microextraction coupled to GC/IRMS. *Anal Chem*, 79(6), 2386-2393. doi: 10.1021/ac0622577
- Berry, J. D., & Stotter, D.A. (1977). Dechlorination of DDT by Vitamin B12 Under Mildly Reducing Conditions. *Chemosphere*, 6(11), 5.
- Bessière, S. (2010). *Le tourisme des Antilles françaises: le défi de la concurrence caribéenne*. Paris.
- Bichon, E., Guiffard, I., Venisseau, A., Marchand, P., Antignac, J. P., & Le Bizec, B. (2015). Ultra-trace quantification method for chlordecone in human fluids and tissues. *J Chromatogr A*, 1408, 169-177. doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.013
- Billeter, M. (2017). Non-uniform sampling in biomolecular NMR. *J Biomol NMR*, 68(2), 65-66. doi: 10.1007/s10858-017-0116-7

- Bodiguel, X., Bertrand, J. A., & Fremery, J. (2011). Devenir de la chlordécone dans les réseaux trophiques des espèces marines consommées aux Antilles (CHLORETRO) Rapport final DSVDVMartinique. *Ifremer, Martinique*.
- Bordwell, F. G., & Drucker, G. E. (1980). Acidities of Indene and Phenyl-, Diphenyl, and Triphenylindenes. *American Chemical Society*, 45(16), 4. doi: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo01304a037>
- Brand, W. A. (2009). Maintaining high precision of isotope ratio analysis over extended periods of time. *Isotopes Environ Health Stud*, 45(2), 135-149. doi: 10.1080/10256010902869097
- Bristeau, S. (2012). Validation de la méthode d'analyse de la chlordécone pour l'application au suivi des procédés de dépollution des sols Antillais. [Rapport]. *BRGM RP-60469-FR*.
- Bristeau, S., Amalric, L., & Mouvet, C. (2014). Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content. *Anal Bioanal Chem*, 406(4), 1073-1080. doi: 10.1007/s00216-013-7160-2
- Brunet, D., Woignier, T., Lesueur-Jannoyer, M., Achard, R., Rangon, L., & Barthes, B. G. (2009). Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Environ Pollut*, 157(11), 3120-3125. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.026
- Buisson, J. P. (2013). La pollution menace la pêche Antillaise. *Ouest France*.
- Cabidoche, Y. M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., & Sansoulet, J. (2009). Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue. *Environ Pollut*, 157(5), 1697-1705. doi: 10.1016/j.envpol.2008.12.015
- Cabidoche, Y.-M., & Lesueur-Jannoyer, M. (2011). Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles : comment la gérer ? *Innovations Agronomiques*, 16, 117-133.
- Cabidoche, Y. M., & Lesueur-Jannoyer, M. (2012). Contamination of Harvested Organs in Root Crops Grown on Chlordecone-Polluted Soils. *Pedosphere*, 22, 562-571.
- Cannon, S. B., Veazey, J. M., Jr., Jackson, R. S., Burse, V. W., Hayes, C., Straub, W. E., Liddle, J. A. (1978). Epidemic kepone poisoning in chemical workers. *Am J Epidemiol*, 107(6), 529-537.
- Cannon, S. B., & Kimbrough, R. D. (1979). Short-term chlordecone toxicity in rats including effects on reproduction, pathological organ changes, and their reversibility. *Toxicol Appl Pharmacol*, 47(3), 469-476.
- Chakraborty, R., & Coates, J. D. (2005). Hydroxylation and carboxylation--two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl Environ Microbiol*, 71(9), 5427-5432. doi: 10.1128/AEM.71.9.5427-5432.2005
- Chaussonnerie, S., Saaidi, P. L., Ugarte, E., Barbance, A., Fossey, A., Barbe, V., Le Paslier, D. (2016b). Microbial Degradation of a Recalcitrant Pesticide: Chlordecone. *Front Microbiol*, 7(2025), 2025. doi: 10.3389/fmicb.2016.02025

- Chernoff, N., & Rogers, E. H. (1976). Fetal toxicity of kepone in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, *38*(1), 189-194.
- Chiba, S., Xu, Y. J., & Wang, Y. F. (2009). A Pd(II)-catalyzed ring-expansion reaction of cyclic 2-azidoalcohol derivatives: synthesis of azaheterocycles. *J Am Chem Soc*, *131*(36), 12886-12887. doi: 10.1021/ja9049564
- Chiu, P. C., & Reinhard, M. (1995). Metallocoenzyme-Mediated Reductive Transformation of Carbon Tetrachloride in Titanium(III) Citrate Aqueous Solution. *Environ Sci Technol*, *29*(3), 595-603. doi: 10.1021/es00003a006
- Cichocka, D., Imfeld, G., Richnow, H. H., & Nijenhuis, I. (2008). Variability in microbial carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene upon reductive dechlorination. *Chemosphere*, *71*(4), 639-648. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.013
- Cichocka, D., Siegert, M., Imfeld, G., Andert, J., Beck, K., Diekert, G., Nijenhuis, I. (2007). Factors controlling the carbon isotope fractionation of tetra- and trichloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum* ssp. and *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *FEMS Microbiol Ecol*, *62*(1), 98-107. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00367.x
- Clermont, D., Motreff, L., Passet, V., Fernandez, J. C., Bizet, C., & Brisse, S. (2015). Multilocus sequence analysis of the genus *Citrobacter* and description of *Citrobacter pasteurii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, *65*(Pt 5), 1486-1490. doi: 10.1099/ijs.0.000122
- Clod, G., Angst, W., Holliger, C., & Schwarzenbach, R. P. (1997). Corrinoid-Mediated Reduction of Tetrachloroethene, Trichloroethene, and Trichlorofluoroethene in Homogeneous Aqueous Solution: Reaction Kinetics and Reaction Mechanisms. *Environ Sci Technol*, *31*(1), 8.
- Clostre, F., Cattan, P., Gaude, J. M., Carles, C., Letourmy, P., & Lesueur-Jannoyer, M. (2015). Comparative fate of an organochlorine, chlordecone, and a related compound, chlordecone-5b-hydro, in soils and plants. *Sci Total Environ*, *532*, 292-300. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.026
- Clostre, F., Letourmy, P., & Lesueur-Jannoyer, M. (2015). Organochlorine (chlordecone) uptake by root vegetables. *Chemosphere*, *118C*(1), 7.
- Clostre, F., Letourmy, P., & Lesueur-Jannoyer, M. (2017). Soil thresholds and a decision tool to manage food safety of crops grown in chlordecone polluted soil in the French West Indies. *Environmental Pollution*, *10*.
- Clostre, F., Letourmy, P., Thuries, L., & Lesueur-Jannoyer, M. (2014). Effect of home food processing on chlordecone (organochlorine) content in vegetables. *Sci Total Environ*, *490*, 1044-1050. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.082
- Coat, S., Bocquené, G., & Godard, E. (2006). Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquat Living Resour*, *19*, 7.
- Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., & Lepoint, G. (2011). Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): role of ecological factors in food web bioaccumulation. *Environ Pollut*, *159*(6), 10.

- Colmet-Daage, F., & Lagache, P. (1965). Caractéristiques de quelques groupes de sols dérivés de roches volcaniques aux antilles françaises. *Cah. ORSTOM Ser Pedol. III*, 3(2), 91-121.
- Colombano, S., Blanc, C., Guérin, V., & Chevrier, B. (2009). Examen des possibilités de traitement de la chlordécone dans les sols notamment sur les aires d'alimentation des captages d'eau potable, Rapport final,. *BRGM RP-57708-FR*.
- Coplen, T. B. (2011). Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25(17), 2538-2560. doi: 10.1002/rcm.5129
- Cravedi, J. P., Zalko, D., Savouret, J. F., Menuet, A., & Jegou, B. (2007). The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci (Paris)*, 23(2), 198-204. doi: 10.1051/medsci/2007232198
- Cretnik, S., Thoreson, K. A., Bernstein, A., Ebert, K., Buchner, D., Laskov, C., Elsner, M. (2013). Reductive dechlorination of TCE by chemical model systems in comparison to dehalogenating bacteria: insights from dual element isotope analysis ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ ). *Environ Sci Technol*, 47(13), 6855-6863. doi: 10.1021/es400107n
- Dalu, A., Rao, P. S., & Mehendale, H. M. (1998). Colchicine antimitosis abolishes resiliency of postnatally developing rats to chlordecone-amplified carbon tetrachloride hepatotoxicity and lethality. *Environ Health Perspect*, 106(9), 597-606.
- Dawson, G. W., Weimer, W. C., & Shupe, S. J. (1979). Kepone - A case study of a persistent material. *The American Institute of Chemical Engineers*, 190, 366-374.
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Cavailles, V., Balaguer, P., & Bourguet, W. (2014). Structural and functional profiling of environmental ligands for estrogen receptors. *Environ Health Perspect*, 122(12), 1306-1313. doi: 10.1289/ehp.1408453
- Devault, D. A., Laplanche, C., Pascaline, H., Bristeau, S., Mouvet, C., & Macarie, H. (2016). Natural transformation of chlordecone into 5b-hydrochlordecone in French West Indies soils: statistical evidence for investigating long-term persistence of organic pollutants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(1), 81-97. doi: 10.1007/s11356-015-4865-0
- Dilling, W. L., Braendlin, H. P., & Mcbee, E. T. (1967). Pentacyclodecane chemistry-II. Some reactions of dodecachloropentacyclo[5.3.0.0.2,6.03,9.04,8]decane and related compounds. *Tetrahedron*, 23, 14.
- 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(15), 8131-8139. doi: 10.1021/es301165p
- Dolphin, D. (1971). Preparation of the Reduced Forms of Vitamin B12 and of Some Analogs of the Vitamin B12 Coenzyme Containing a Cobalt-Carbon Bond. *Methods Enzymol*, 18, 19.
- Dromard, C. R., Bodiguel, X., Lemoine, S., Bouchon-Navaro, Y., Reynal, L., Thouard, E., & Bouchon, C. (2016). Assessment of the contamination of marine fauna by chlordecone in Guadeloupe and Martinique (Lesser Antilles). *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(1), 73-80. doi: 10.1007/s11356-015-4732-z

- Dubuisson, C., Heraud, F., Leblanc, J. C., Gallotti, S., Flamand, C., Blateau, A., . . . Volatier, J. L. (2007). Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to chlordecone. *Regul Toxicol Pharmacol*, 49(1), 5-16. doi: 10.1016/j.yrtph.2007.04.008
- Durimel, A., Altenor, S., Miranda-Quintana, R., Du Mesnil, P. C., Jauregui-Haza, U., Gadiou, R., & Gaspard, S. (2013). pH dependence of chlordecone adsorption on activated carbons and role of adsorbent physico-chemical properties. [Article]. *Chemical Engineering Journal*, 229, 239-249. doi: 10.1016/j.cej.2013.03.036
- Duvall, D. S., & Rubey, W. A. (1976). Laboratory evaluation of high-temperature destruction of kepone and related pesticides. *United States Environmental Protection Agency*, 299, 1-60.
- Eaton, D. L., & Klaassen, C. D. (1979). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, kepone, and polybrominated biphenyls on transport systems in isolated rat hepatocytes. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 51(1), 137-144.
- Ebenau-Jehle, C., Thomas, M., Scharf, G., Kockelkorn, D., Knapp, B., Schuhle, K., Fuchs, G. (2012). Anaerobic metabolism of indoleacetate. *J Bacteriol*, 194(11), 2894-2903. doi: 10.1128/JB.00250-12
- Elsner, M., Chartrand, M., Vanstone, N., Couloume, G. L., & Lollar, B. S. (2008). Identifying abiotic chlorinated ethene degradation: characteristic isotope patterns in reaction products with nanoscale zero-valent iron.. *Environ Sci Technol*, 42(16), 5963-5970.
- Elsner, M., Jochmann, M. A., Hofstetter, T. B., Hunkeler, D., Bernstein, A., Schmidt, T. C., & Schimmelmann, A. (2012). Current challenges in compound-specific stable isotope analysis of environmental organic contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(9), 21.
- Epstein, S. S. (1978). Kepone--hazard evaluation. *Sci Total Environ*, 9(1), 1-62.
- Eroschenko, V. P. (1981). Estrogenic activity of the insecticide chlordecone in the reproductive tract of birds and mammals. *J Toxicol Environ Health*, 8(5-6), 731-742. doi: 10.1080/15287398109530109
- Eroschenko, V. P., & Wilson, W. O. (1975). Cellular changes in the gonads, livers and adrenal glands of Japanese quail as affected by the insecticide Kepone. *Toxicol Appl Pharmacol*, 31(3), 491-504.
- Eugen Schwarz, W. H. (2010). The full story of the electron configurations of the transition elements. *Journal of Chemical Education*, 87(4), 5.
- Ewald, E. M., Wagner, A., Nijenhuis, I., Richnow, H. H., & Lechner, U. (2007). Microbial dehalogenation of trichlorinated dibenzo-p-dioxins by a *Dehalococcoides*-containing mixed culture is coupled to carbon isotope fractionation.. *Environ Sci Technol*, 41(22), 7744-7751. doi: 10.1021/es070935g
- Fariss, M. W., Blanke, R. V., Saady, J. J., & Guzelian, P. S. (1980). Demonstration of major metabolic pathways for chlordecone (kepone) in humans. *Drug Metab Dispos*, 8(6), 434-438.

- Fariss, M. W., Smith, J. D., Blanke, R. V., & Guzelian, P. S. (1982). Convenient Preparation of Chlordecone Alcohol (Kepone Alcohol) and Its Deuterated, Tritiated, and Dechlorinated Derivatives. *J Agric Food Chem*, *30*, 185-187.
- Faroon, O., Kueberuwa, S., Smith, L., & DeRosa, C. (1995). ATSDR evaluation of health effects of chemicals. II. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate. *Toxicol Ind Health*, *11*(6), 1-203.
- Fernández-Bayo, J. D., Saison, C., Voltz, M., Disko, U., Hofmann, D., & Berns, A. E. (2013). Chlordecone fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions. *Sci Total Environ*, *463-464*, 395-403. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.044
- Fetzner, S., & Lingens, F. (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev*, *58*(4), 641-685.
- Figge, K., & Rehm, H. (1977). On the behaviour of the insecticide "kelevan" and its metabolites in the ecological system "potato field". *Journal of plant disease and protection*, *84*, 385-409.
- Fletcher, K. E., Nijenhuis, I., Richnow, H. H., & Löffler, F. E. (2011). Stable carbon isotope enrichment factors for cis-1,2-dichloroethene and vinyl chloride reductive dechlorination by *Dehalococcoides*. *Environ Sci Technol*, *45*(7), 2951-2957. doi: 10.1021/es103728q
- Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S. Rimpo, J., Margolin, B. H., Resnick, M. A., Anderson, B. & Zieger, E. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, *10 Suppl 10*, 1-175.
- George, S. E., & Claxton, L. D. (1988). Biotransformation of chlordecone by *Pseudomonas* species. *Xenobiotica*, *18*(4), 407-416. doi: 10.3109/00498258809041677
- Griebler, C., Adrian, L., Meckenstock, R. U., & Richnow, H. H. (2004). Stable carbon isotope fractionation during aerobic and anaerobic transformation of trichlorobenzene.. *FEMS Microbiol Ecol*, *48*(3), 313-321. doi: 10.1016/j.femsec.2004.02.005
- Griebler, C., Safinowski, M., Vieth, A., Richnow, H. H., & Meckenstock, R. U. (2004). Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer.. *Environ Sci Technol*, *38*(2), 617-631.
- Griffin, B. M., Tiedje, J. M., & Löffler, F. E. (2004). Anaerobic microbial reductive dechlorination of tetrachloroethene to predominately trans-1,2-dichloroethene.. *Environ Sci Technol*, *38*(16), 4300-4303.
- Hammond, B., Katzenellenbogen, B. S., Krauthammer, N., & McConnell, J. (1979). Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen receptors.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(12), 6641-6645.
- Harless, R. L., Harris, D. E., Sovocool, G. W., Zehr, R. D., Wilson, N. K., & Oswald, E. O. (1978). Mass spectrometric analyses and characterization of Kepone in environmental and human samples. *Biomed Mass Spectrom*, *5*(3), 232-237. doi: 10.1002/bms.1200050312

- Harris, R. L., Huggett, R. J., & Slone, H. D. (1980). Determination of dissolved Kepone by direct addition of XAD-2 resin to water. *Anal Chem*, 52(4), 779-780.
- Holliger, C., Schraa, G., Stupperich, E., Stams, A. J., & Zehnder, A. J. (1992). Evidence for the involvement of corrinoids and factor F430 in the reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane by *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol*, 174(13), 4427-4434.
- Holmstead, R. L. (1976). Studies of the degradation of Mirex with an iron(II) porphyrin model system. *J Agric Food Chem*, 24(3), 620-624.
- Huang, Q., Huang, P. M., & Violante, A. (2008). *Soil Mineral Microbe-Organic Interactions - Theories and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Huber, J. J. (1963). *Some physiological effects of the insecticide Kepone in the laboratory mouse*. The Ohio State University.
- Huff, J. E., & Gerstner, H. B. (1978). Kepone: a literature summary. *J Environ Pathol Toxicol*, 1(4), 377-395.
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A., & Adrian, L. (2013). Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1616), 20120322. doi: 10.1098/rstb.2012.0322
- Hunkeler, D., & Aravena, R. (2000). Evidence of substantial carbon isotope fractionation among substrate, inorganic carbon, and biomass during aerobic mineralization of 1, 2-dichloroethane by *Xanthobacter autotrophicus*. *Appl Environ Microbiol*, 66(11), 4870-4876.
- Ivie, G. W., Dorrough, H. W., & Alley, E. G. (1974). Photodecomposition of mirex on silica gel chromatoplates exposed to natural and artificial light. *J Agric Food Chem*, 22(6), 933-935.
- Jablonski, P. E., Pheasant, D. J., & Ferry, J. G. (1996). Conversion of kepone by *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol Lett*, 139, 169-176.
- Jagnow, G., Haider, K., & Ellwardt, P. C. (1977). Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch Microbiol*, 115(3), 285-292.
- Jannoyer-Lesueur, M. (2017). [Diagnostic et gestion des pollutions liées à l'usage des pesticides aux Antilles: chlordécone et autres molécules].
- Jochmann, M. A., Blessing, M., Haderlein, S. B., & Schmidt, T. C. (2006). A new approach to determine method detection limits for compound-specific isotope analysis of volatile organic compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20(24), 3639-3648. doi: 10.1002/rcm.2784
- Jondreville, C., Lavigne, A., Jurjanz, S., Dalibard, C., Liabeuf, J. M., Clostre, F., & Lesueur-Jannoyer, M. (2014). Contamination of free-range ducks by chlordécone in Martinique (French West Indies): a field study. *Sci Total Environ*, 493, 336-341. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.083

- Kermarrec, A., & Maulon, H. (1974). Synergie entre le kepone et un ver nématode parasite d'insectes pour détruire *Cosmopolites sordidus*, le charançon du bananier. *Les Nouvelles Maraîchères et Vivrières de l'INRA aux Antilles*, 9, 24-26.
- Kim, Y. H., & Carraway, E. R. (2002). Reductive dechlorination of PCE and TCE by vitamin B12 and ZVMs. *Environ Technol*, 23(10), 1135-1145. doi: 10.1080/09593332308618332
- Krone, U. E., Thauer, R. K., Hogenkamp, H. P., & Steinbach, K. (1991). Reductive formation of carbon monoxide from CCl<sub>4</sub> and FREONs 11, 12, and 13 catalyzed by corrinoids.. *Biochemistry*, 30(10), 2713-2719.
- Lagarde, F., Peulon, S., & Saaidi, P.-L. (2015). *Recherches exploratoires pour le développement d'un procédé de dégradation chimique de la chlordécone*. Laboratoire de Génomique et de Biochimie du Métabolisme (LGBM) Genoscope - Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE), Université d'Evry Val d'Essonne.
- Lagarrigue, M., Lavigne, R., Tabet, E., Genet, V., Thome, J. P., Rondel, K., Pineau, C. (2014). Localization and in situ absolute quantification of chlordecone in the mouse liver by MALDI imaging. *Anal Chem*, 86(12), 5775-5783. doi: 10.1021/ac500313s
- Le Déaut, J. Y., & Procaccia, C. (2009). Les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles: bilan et perspectives d'évolution.. *OPECST*, 487.
- Legeay, S., Billat, P. A., Clere, N., Nesslany, F., Bristeau, S., Faure, S., & Mouvet, C. (2017). Two dechlorinated chlordecone derivatives formed by in situ chemical reduction are devoid of genotoxicity and mutagenicity and have lower proangiogenic properties compared to the parent compound. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi: 10.1007/s11356-017-8592-6
- Letondor, C., Pascal-Lorber, S., & Laurent, F. (2015). Uptake and distribution of chlordecone in radish: different contamination routes in edible roots. *Chemosphere*, 118, 20-28. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.102
- Lewis, T. A., Morra, M. J., & Brown, P. D. (1996). Comparative Product Analysis of Carbon Tetrachloride Dehalogenation Catalyzed by Cobalt Corrins in the presence of Thiol or Titanium (III) Reducing Agents. *Environ Sci Technol*, 30(1), 9.
- Lexa, D., & Savéant, J. M. (1983). The electrochemistry of vitamin B12. *American Chemical Society*, 16(7), 9. doi: 10.1021/ar00091a001
- Li, Z.-P., Li, L.-W., Tao, M.-X., Cao, C.-H., Du, L., Wang, G., & Xu, Y. (2012). Development of combustion reactor furnace applied to compound specific of carbon isotope ratio analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(9), 1439-1444. doi: 10.1016/s1872-2040(11)60573-2
- Linder, R. E., Scotti, T. M., McElroy, W. K., Laskey, J. W., Strader, L. F., & Powell, K. (1983). Spermotoxicity and tissue accumulation of chlordecone (Kepone) in male rats. *J Toxicol Environ Health*, 12(2-3), 183-192. doi: 10.1080/15287398309530417
- Liu, F., Cichocka, D., Nijenhuis, I., Richnow, H. H., & Fennell, D. E. (2010). Carbon isotope fractionation during dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by a *Dehalococcoides*-containing culture. *Chemosphere*, 80(10), 1113-1119. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.06.027

- Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Tiedje, J. M. (1996). Initial Characterization of a Reductive Dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl Environ Microbiol*, 62(10), 3809-3813.
- Louis-André, O., & Gelbard, G. (1986). Mise au Point Réductions Chimiques par le Dithionite de Sodium. *Bull. Soc. Chim. France*, 4(16), 565.
- Mackenzie, K. (1960). Bicyclo[2,2,1]heptadiene in the Diels-Alder reaction. [10.1039/JR9600000473]. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*(0), 473-483. doi: 10.1039/jr9600000473
- Mahieu, M. (2014). *Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide*. Retrieved from <http://www.theses.fr/2014LORR0230/document> Available from <http://www.theses.fr/2014LORR0230>
- Maier-Bode, H. (1976). The insecticide "Kelevan". *Residue Rev*, 63, 45-76.
- Marks, T. S., Allpress, J. D., & Maule, A. (1989). Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Appl Environ Microbiol*, 55(5), 1258-1261.
- Martin-Gonzalez, L., Mortan, S. H., Rosell, M., Parlade, E., Martinez-Alonso, M., Gaju, N., . . . Marco-Urrea, E. (2015). Stable carbon isotope fractionation during 1,2-dichloropropane-to-propene transformation by an enrichment culture containing *Dehalogenimonas* strains and a dcpA gene. *Environ Sci Technol*, 49(14), 8666-8674. doi: 10.1021/acs.est.5b00929
- Martin-Laurent, F., Sahnoun, M. M., Merlin, C., Vollmer, G., & Lubke, M. (2014). Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the <sup>13</sup>C<sub>10</sub>-chlordecone stable isotope as a tracer. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21(7), 4928-4933. doi: 10.1007/s11356-013-1839-y
- Mcbee, E. T., Diveley, W. R., & Burch, J. E. (1955). The Diels-Alders Reaction with 5,5-Dimethoxy-1,2,3,4-tetrachlorocyclopentadiene. *Journal of the Chemical Society*, 77(2), 2.
- Meckenstock, R. U., Morasch, B., Griebler, C., & Richnow, H. H. (2004). Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.*, 75(3-4), 215-255. doi: 10.1016/j.jconhyd.2004.06.003
- Merlin, C., Devers, M., Beguet, J., Boggio, B., Rouard, N., & Martin-Laurent, F. (2016). Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance, and function. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(5), 4185-4198. doi: 10.1007/s11356-015-4758-2
- Merlin, C., Devers, M., Crouzet, O., Heraud, C., Steinberg, C., Mougín, C., & Martin-Laurent, F. (2014). Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21(7), 4914-4927. doi: 10.1007/s11356-013-1971-8
- Molowa, D. T., Wrighton, S. A., Blanke, R. V., & Guzelian, P. S. (1986). Characterization of a unique aldo-keto reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man. *J Toxicol Environ Health*, 17(4), 375-384. doi: 10.1080/15287398609530832

- Monti, D. (2006). Évaluation de la contamination des Crustacés et des Poissons d'eau douce en Guadeloupe : compléments d'étude. *Convention UAG/Direction Régionale de l'Environnement Guadeloupe*
- Morasch, B., Richnow, H. H., Schink, B., & Meckenstock, R. U. (2001a). Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Appl Environ Microbiol*, 67(10), 4842-4849.
- Moriwaki, H., & Hasegawa, A. (2004). Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(11), 1243-1244. doi: 10.1002/rcm.1474
- Mortelmans, K., Haworth, S., Lawlor, T., Speck, W., Tainer, B., & Zeiger, E. (1986). Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ Mutagen*, 8 Suppl 7, 1-119.
- Moseman, R. F., Crist, H. L., Edgerton, T. R., & Ward, M. K. (1977). Electron capture gas chromatographic determination of kepone<sup>®</sup> residues in environmental samples. *Arch. Environm. Contain. Toxicol.*, 6, 221-231.
- Mouttaki, H., Johannes, J., & Meckenstock, R. U. (2012). Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Environ Microbiol*, 14(10), 2770-2774. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02768.x
- Mouvet, C. (2013). ABACHlor Analyse, Bactéries Anaérobies, Chlordécone. [Rapport]. *BRGM RP-62769-FR*.
- Mouvet, C., Collet, B., Gaude, J. M., Bristeau, S., Rangon, L., Lesueur-Jannoyer, M., & Jestin, A. (2016). Decontamination par in situ Chemical Reduction d'un nitisol et d'un sol alluvionnaire pollués par la chlordécone. Résultats physico-chimiques et agronomiques. In BRGM (Ed.), *BRGM RP-65462-FR* (pp. 188).
- Mouvet, C., Dictor, M. C., Bristeau, S., Breeze, D., & Mercier, A. (2016). Remediation by chemical reduction in laboratory mesocosms of three chlordecone-contaminated tropical soils. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi: 10.1007/s11356-016-7582-4
- Multigner, L., Kadhel, P., Rouget, F., Blanchet, P., & Cordier, S. (2016). Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(1), 3-8. doi: 10.1007/s11356-015-4621-5
- Multigner, L., Ndong, J. R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Blanchet, P. (2010). Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol*, 28(21), 3457-3462. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2153
- Nijenhuis, I., Andert, J., Beck, K., Kästner, M., Diekert, G., & Richnow, H. H. (2005). Stable isotope fractionation of tetrachloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S and abiotic reactions with cyanocobalamin. *Appl Environ Microbiol*, 71(7), 3413-3419. doi: 10.1128/AEM.71.7.3413-3419.2005

- Nijenhuis, I., & Richnow, H. H. (2016). Stable isotope fractionation concepts for characterizing biotransformation of organohalides. *Curr Opin Biotechnol*, *41*, 108-113. doi: 10.1016/j.copbio.2016.06.002
- Orndorff, S. A., & Colwell, R. R. (1980). Microbial transformation of kepone. *Appl Environ Microbiol*, *39*(2), 398-406.
- Palau, J., Shouakar-Stash, O., & Hunkeler, D. (2014). Carbon and chlorine isotope analysis to identify abiotic degradation pathways of 1,1,1-trichloroethane. *Environmental Science & Technology*, *48*(24), 14400-14408. doi: 10.1021/es504252z
- Palmiter, R. D., & Mulvihill, E. R. (1978). Estrogenic activity of the insecticide kepone on the chicken oviduct. *Science*, *201*(4353), 356-358.
- Parales, R. E., Bruce, N. C., Schmid, A., & Wackett, L. P. (2002). Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (b3). *Appl Environ Microbiol*, *68*(10), 4699-4709.
- Payne, K. A., Quezada, C. P., Fisher, K., Dunstan, M. S., Collins, F. A., Sjuts, H., Leys, D. (2015). Reductive dehalogenase structure suggests a mechanism for B<sub>12</sub>-dependent dehalogenation.. *Nature*, *517*(7535), 513-516. doi: 10.1038/nature13901
- Rana, V. K., Kissner, R., Jauregui-Haza, U., Gaspard, S., & Levalois-Grützmacher, J. (2017). Enhanced chlordecone (Kepone) removal by FeO-nanoparticles loaded on activated carbon. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *5*(2), 1608-1617. doi: 10.1016/j.jece.2017.01.039
- Ranguin, R., Durimel, A., Karioua, R., & Gaspard, S. (2017). Study of chlordecone desorption from activated carbons and subsequent dechlorination by reduced cobalamin. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi: 10.1007/s11356-017-9542-z
- Reich, M. R., & Spong, J. K. (1983). Kepone: a chemical disaster in Hopewell, Virginia. *Int J Health Serv*, *13*(2), 227-246.
- Reimers, R. S., Akers, T. G., & White, L. (1989). Use of applied fields in biological treatment of toxic substances, wastewater, and sludges. *Adv Biotechnol Processes*, *12*, 235-272.
- Renpenning, J., Keller, S., Cretnik, S., Shouakar-Stash, O., Elsner, M., Schubert, T., & Nijenhuis, I. (2014). Combined C and Cl isotope effects indicate differences between corrinoids and enzyme (Sulfurospirillum multivorans PceA) in reductive dehalogenation of tetrachloroethene, but not trichloroethene. *Environ Sci Technol*, *48*, 11837–11845. doi: 10.1021/es503306g
- Renpenning, J., Rapp, I., & Nijenhuis, I. (2015). Substrate hydrophobicity and cell composition influence the extent of rate limitation and masking of isotope fractionation during microbial reductive dehalogenation of chlorinated ethenes, *49*(7), 4293-4301. doi: 10.1021/es506108j
- Reuber, M. D. (1978). Carcinogenicity of kepone. [Review]. *J Toxicol Environ Health*, *4*(5-6), 895-911. doi: 10.1080/15287397809529710
- Richnow, H. H., Meckenstock, R. U., Reitzel, L. A., Baun, A., Ledin, A., & Christensen, T. H. (2003a). In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *J Contam Hydrol*, *64*(1-2), 59-72.

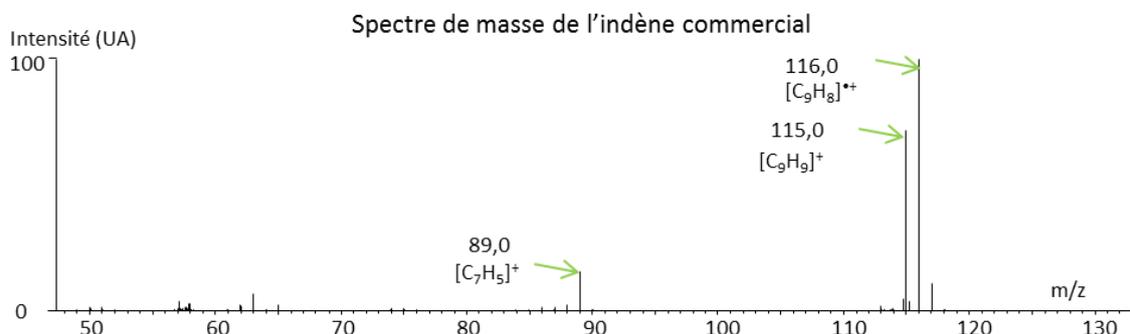
- Rodríguez-Garrido, B., Camps Arbestain, M., Monterroso, M. C., & Macías, F. (2004). Reductive Dechlorination of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane Isomers by Hydroxocobalamin in the Presence of Either Dithiothreitol or Titanium(III) Citrate as Reducing Agents. *Environ Sci Technol*, 38(19), 5046-5052. doi: 10.1021/es030153x
- Sakakibara, F., Takagi, K., Kataoka, R., Kiyota, H., Sato, Y., & Okada, S. (2011). Isolation and identification of dieldrin-degrading *Pseudonocardia* sp. strain KSF27 using a soil-charcoal perfusion method with aldrin trans-diol as a structural analog of dieldrin. *Biochem Biophys Res Commun*, 411(1), 76-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.096
- Saleh, F. Y., & Lee, G. F. (1978). Analytical Methodology for Kepone in Water and Sediment. *Environ Sci Technol*, 12(3), 287-301.
- Salvat, B., Roche, H., Berny, P., & Ramade, F. (2012). Study on the contamination of marine organisms by pesticides from French Polynesia coral reef food web *Rev Ecol*.
- Scherer, K. V., Ungefug, G. A., & Lunt, R. S. (1966). Studies in the chemistry of bicyclo[2.2.0] hexane. *J Am Chem Soc*, 88, 2.
- Schrauzer, G. N. (1976). New developments in the field of vitamin B<sub>12</sub>: Reactions of the cobalt atom in corrins and in vitamin B<sub>12</sub> model compounds.. *Angew Chem Int Ed Engl*, 15(7), 417-426. doi: 10.1002/anie.197604171
- Schrauzer, G. N., & Katz, R. N. (1978). Reductive dechlorination and degradation of mirex and kepone with Vitamin B<sub>12</sub>. *Bioinorg Chem*, 9(2), 123-143.
- Sessions, A. L. (2006b). Isotope-ratio detection for gas chromatography. *J Sep Sci*, 29(12), 1946-1961.
- Sherwood Lollar, B., Slater, G. F., Sleep, B., Witt, M., Klecka, G. M., Harkness, M., & Spivack, J. (2001). Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethene at area 6, Dover Air Force Base. *Environ Sci Technol*, 35(2), 261-269.
- Shi, Z., Fan, D., Johnson, R. L., Tratnyek, P. G., Nurmi, J. T., Wu, Y., & Williams, K. H. (2015). Methods for characterizing the fate and effects of nano zerovalent iron during groundwater remediation. *J Contam Hydrol*, 181, 17-35. doi: 10.1016/j.jconhyd.2015.03.004
- SDBSweb <http://sdb.sdb.aist.go.jp>, S. Retrieved 2017-08-06, from National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
- Huang, Q., Huang, P. M., & Violant
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2015). *Spectrometric identification of organic compounds* (eighth ed.): John Wiley & Sons, Inc.
- Sittig, M. (1980). Chlordecone & mirex In E. N. M. Sittig (Ed.), *Pesticide manufacturing and toxic materials control encyclopedia* (pp. 171-173, 533-535): Data Corporation.
- Smith, M. H., & Woods, S. L. (1994). Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin b(12s). *Appl Environ Microbiol*, 60(11), 4111-4115.
- Snegaroff, J. (1977). Les résidus d'insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 26:251-268, 26, 251-268.

- Soine, W. H., Forrest, T. J., & Smith, J. D. (1983). Thermal reduction of chlordecone in presence of alcohol. *Journal of chromatography*, 281, 95-99.
- Soni, M. G., & Mehendale, H. M. (1998). Role of tissue repair in toxicologic interactions among hepatotoxic organics. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 6, 1307-1317.
- Suta, B. E. (1977). Human population exposure to Mirex and kepone. In U. S. E. P. Agency (Ed.).
- Tabaei, S.-M., H., Pittman, C. U., & Mead, K. T. (1991). Dehalogenation of Organic Compounds. Part 2. The Metal-Catalyzed Sodium Borohydride or Sodium Alkoxyborohydride/Tetraethylene Glycol/ KOH Dechlorination of Mirex (I). *Tetrahedron Letters*, 32, 2727-2730.
- Taylor, J. R. (1982). Neurological manifestations in humans exposed to chlordecone and follow-up results. *Neurotoxicology*, 3(2), 9-16.
- Tilson, H. A., Squibb, R. E., & Burne, T. A. (1982). Neurobehavioral effects following a single dose of chlordecone (Kepone) administered neonatally to rats. *Neurotoxicology*, 3(2), 45-57.
- Torrento, C., Palau, J., Rodriguez-Fernandez, D., Heckel, B., Meyer, A., Domenech, C., Hunkeler, D. (2017). Carbon and chlorine isotope fractionation patterns associated with different engineered chloroform transformation reactions. *Environ Sci Technol*, 51(11), 6174-6184. doi: 10.1021/acs.est.7b00679
- Uk, S., Himel, C. M., & Dirks, T. F. (1972). Mass spectral pattern of Mirex (dodecachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta (cd) pentalene) and of Kepone (decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta (cd)-pentalen-2-one) and its application in residue analysis. *Bull Environ Contam Toxicol*, 7(4), 207-215.
- Vergani, L., Mapelli, F., Zanardini, E., Terzaghi, E., Di Guardo, A., Morosini, C., Borin, S. (2017). Phytoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: An outlook on plant-microbe beneficial interactions. *Sci Total Environ*, 575, 1395-1406. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.218
- Wackett, L.P., & Douglas Hershberger, C. (2001) Biocatalysis and Biodegradation Microbial Transformation of Organic Compounds, ASM Press (2001), 978-1555811792
- Wee, H.-Y., & Cunningham, J. A. (2008). Palladium-catalyzed hydrodehalogenation of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene in water-ethanol mixtures. *J Hazard Mater*, 155(1-2), 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.045>
- Wilson, N. K., & Zehr, R. D. (1979). Structures of some Kepone photoproducts and related chlorinated pentacyclodecanes by carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance. *J Org Chem*, 44(8), 1278-1282. doi: 10.1021/jo01322a020
- Woignier, T., Clostre, F., Fernandes, P., Soler, A., Rangan, L., Sastre-Conde, M. I., & Jannoyer, M. L. (2017). The pesticide chlordecone is trapped in the tortuous mesoporosity of allophane clays. *Environ Sci Pollut Res Int*. doi: 10.1007/s11356-017-9370-1
- Wu, Y. P., & Won, Y. S. (2003). Thermal decomposition of 1,1-dichloroethene diluted in hydrogen. *J Hazard Mater*, 105(1-3), 63-81.

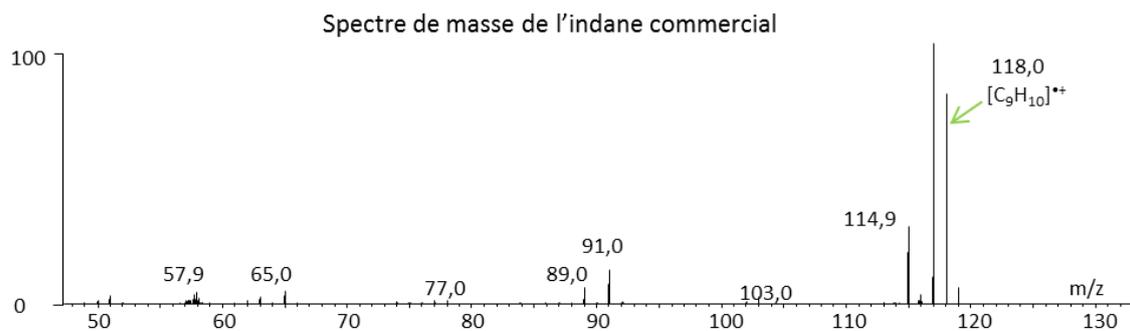
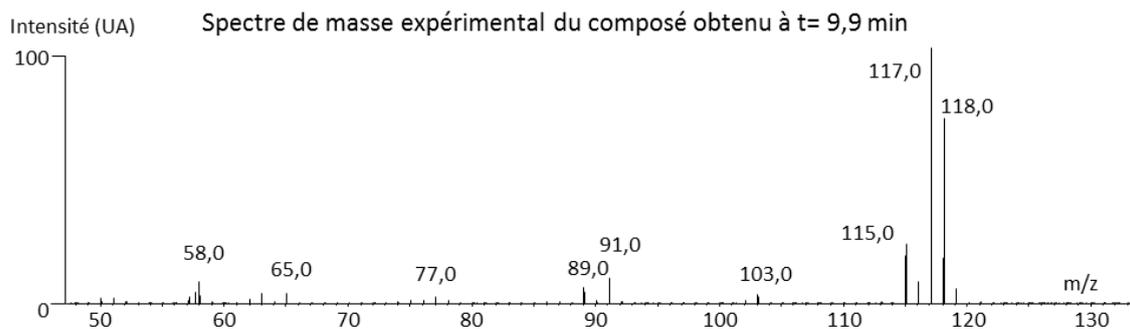
- Yasuhara, A. (1993). Thermal decomposition of tetrachloroethylene. *Chemosphere*, 26(8), 6. doi: [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90218-T](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90218-T)
- Zehnder, A. J., & Wuhrmann, K. (1976). Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science*, 194(4270), 1165-1166.
- Zhang, N., Bashir, S., Qin, J., Schindelka, J., Fischer, A., Nijenhuis, I., Richnow, H. H. (2014b). Compound specific stable isotope analysis (CSIA) to characterize transformation mechanisms of alpha-hexachlorocyclohexane. *J Hazard Mater*, 280, 750-757. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.08.046

# Annexes

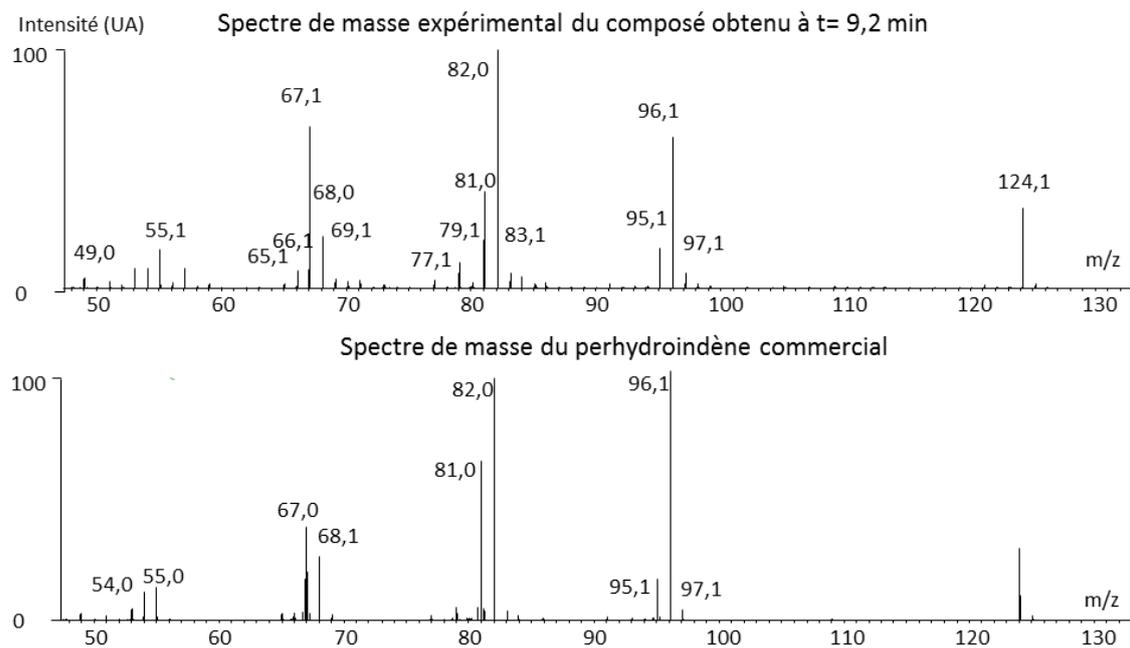
Annexe 1 : Spectre de masse de l'indène commercial (EI).



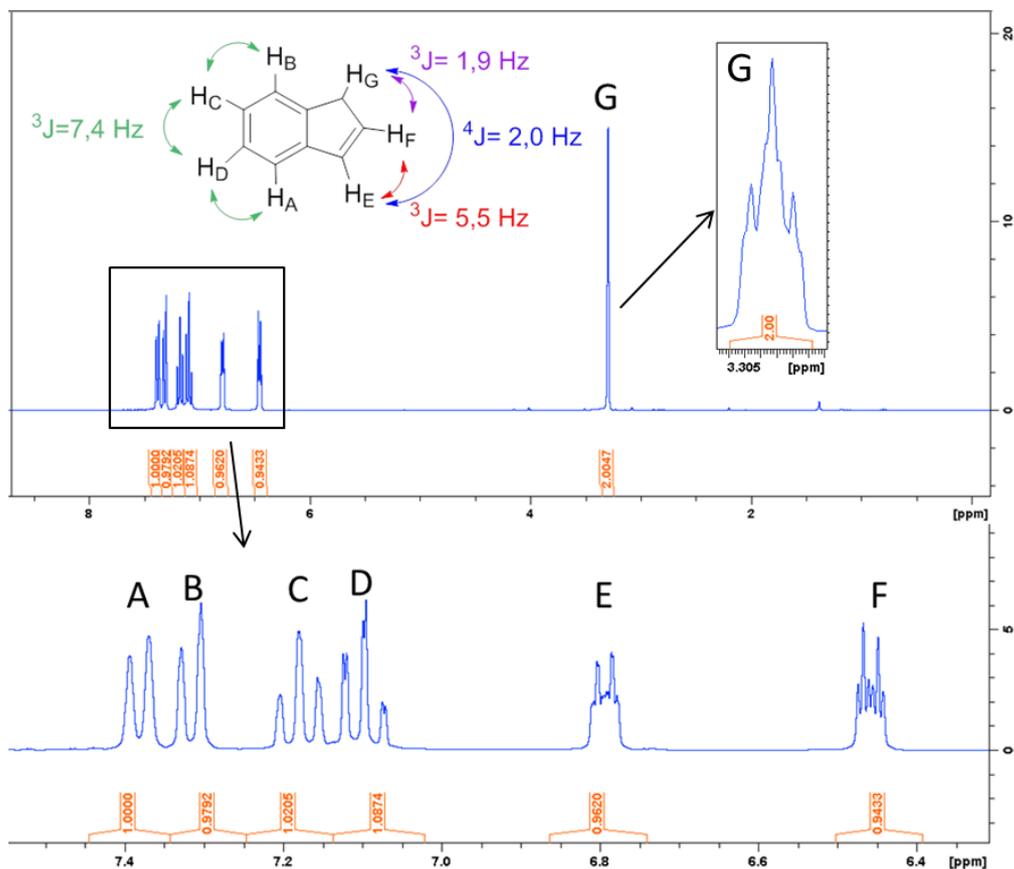
Annexe 2 : Comparaison du spectre de masse obtenu pour le composé à RT = 9,9 min au cours de l'expérience d'hydrodéhalogénéation du métabolite B1, et le spectre de masse de l'indane commercial.



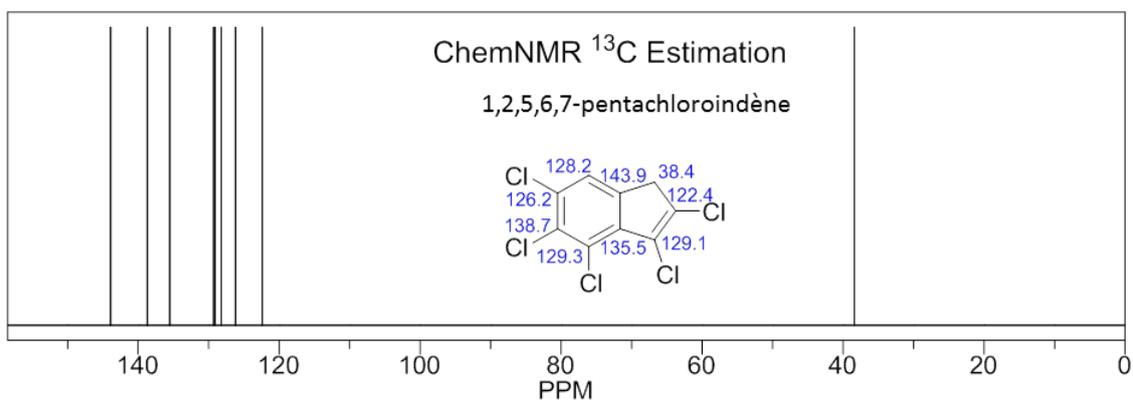
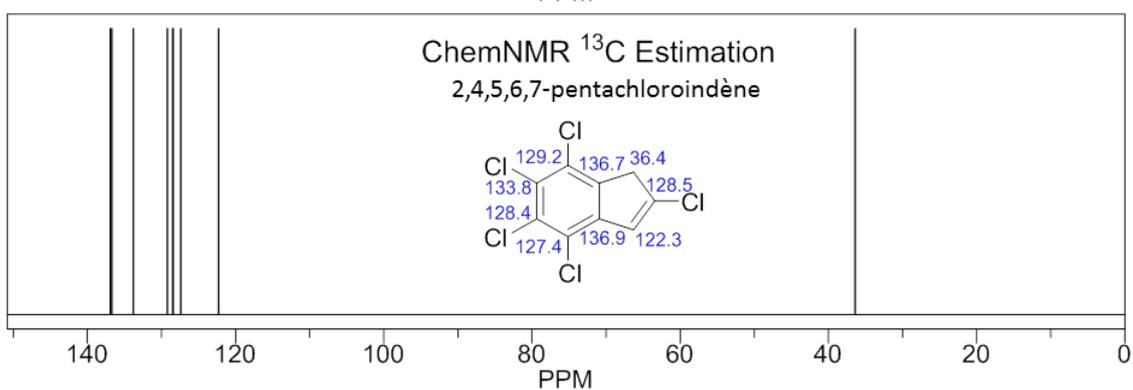
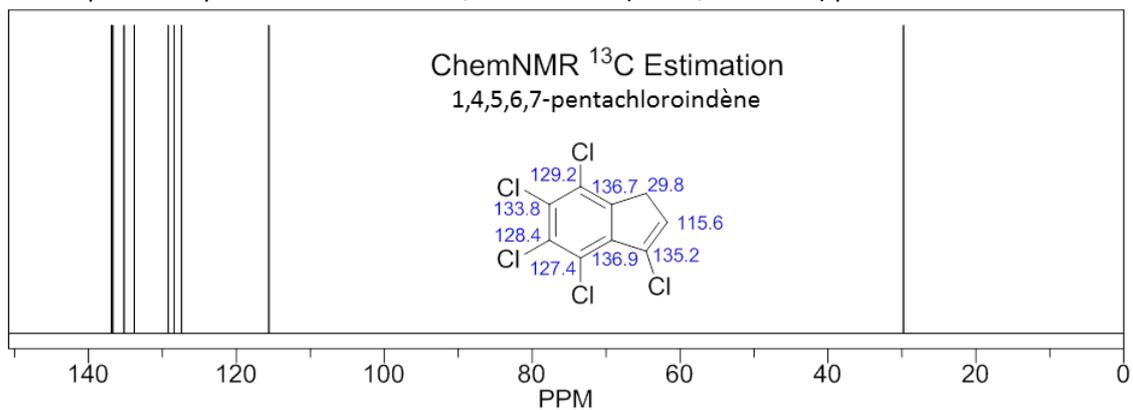
Annexe 3 : Comparaison du spectre de masse obtenu pour le composé à RT = 9,2 min au cours de l'expérience d'hydrodéphalogenation du métabolite B1, et le spectre de masse du *cis*-perhydroindène commercial.



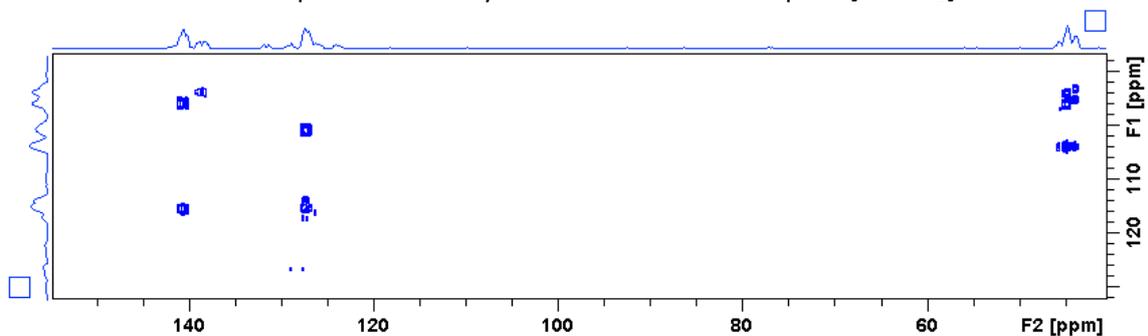
Annexe 4 : Spectre  $^1\text{H}$  de l'indène commercial et agrandissement de la zone de déplacement chimique aromatique. L'attribution des signaux est faite d'après SDBS (<http://sdb.sdb.aist.go.jp>). Les valeurs des constantes de couplages sont définies depuis le spectre obtenu sur l'indène commercial ( $\text{THF-}d_8$ , 300 MHz).



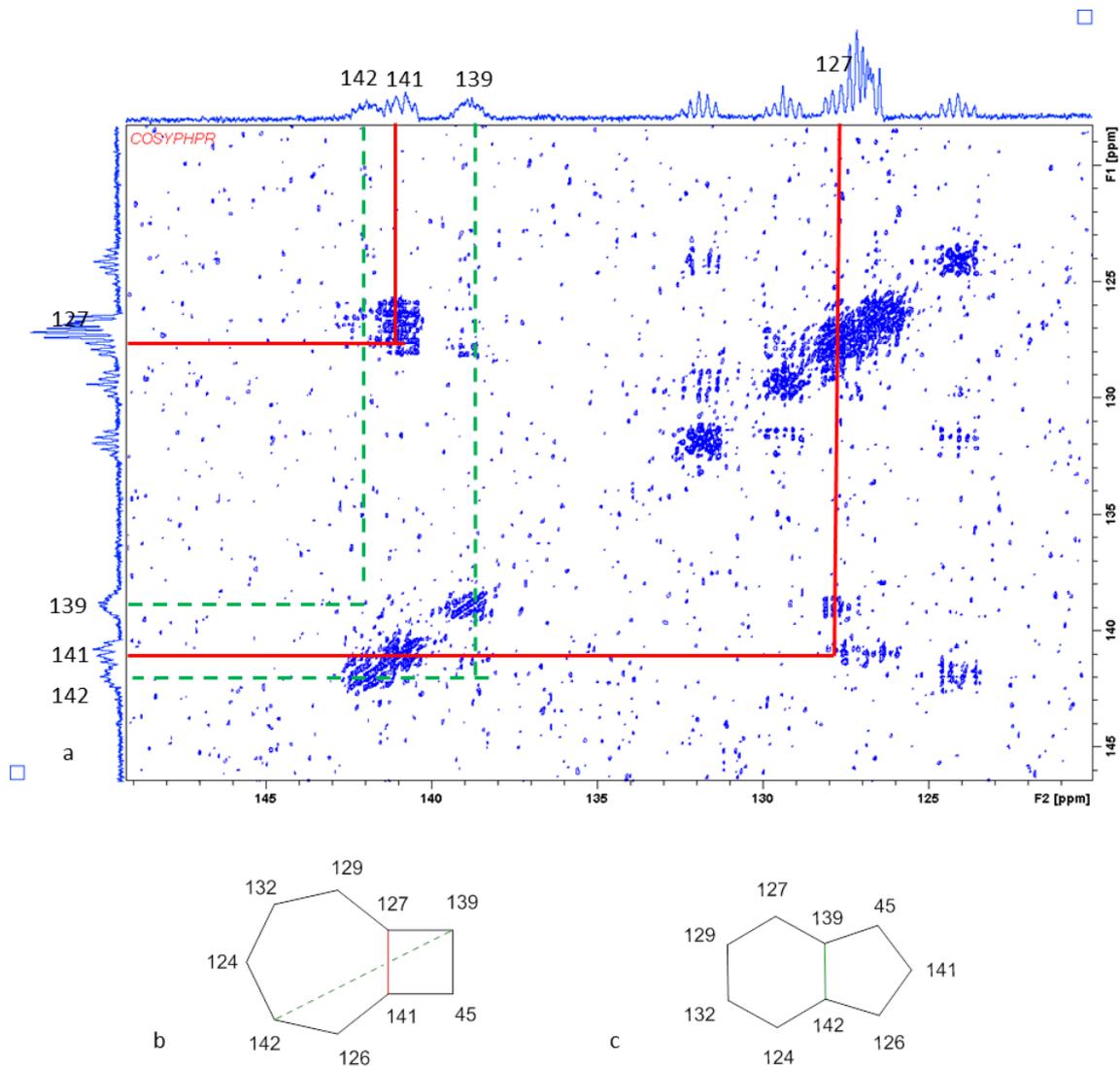
Annexe 5 : Prédiction des déplacements chimiques des atomes de carbone de différentes structures possibles pour le métabolite B1, en RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) par ChemDraw®.



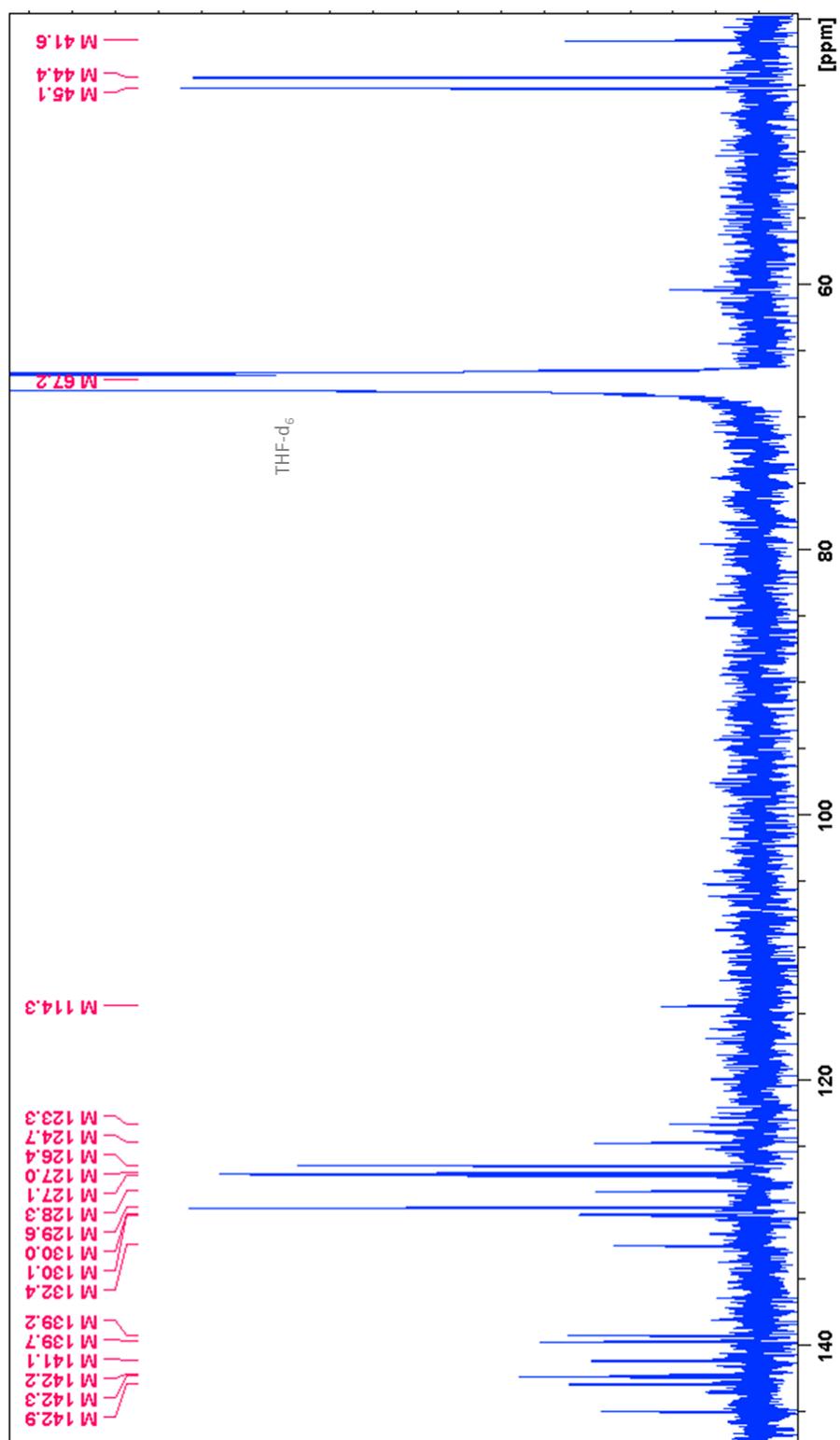
Annexe 6 : Spectre de l'analyse INADEQUATE du composé  $[^{13}\text{C}_7\text{-}^{12}\text{C}_2]$ -B1.



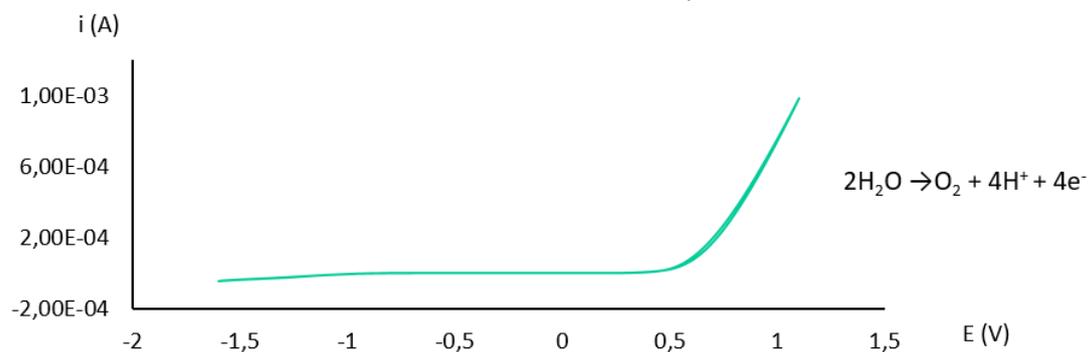
Annexe 7 : (a) Spectre COSY  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  obtenu du composé  $[^{13}\text{C}]_7\text{-B1}$ , après 9h d'acquisition sur un spectromètre RMN de 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). Le rapport signal sur bruit ne permet pas de distinguer correctement les signaux. La liaison rouge représente le lien établi entre les carbones 127 et 141 qui est observé par le manque de signal. En pointillés verts, le lien entre les carbones 139 et 142 qui n'est pas observé ici mais est clairement distingué en analyse sur le spectromètre 800 MHz ( $^1\text{H}$ ). Squelette carboné (b) déduit de ce spectre et (c) déduit du spectre  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  sur le spectromètre 800 MHz ( $^1\text{H}$ ).



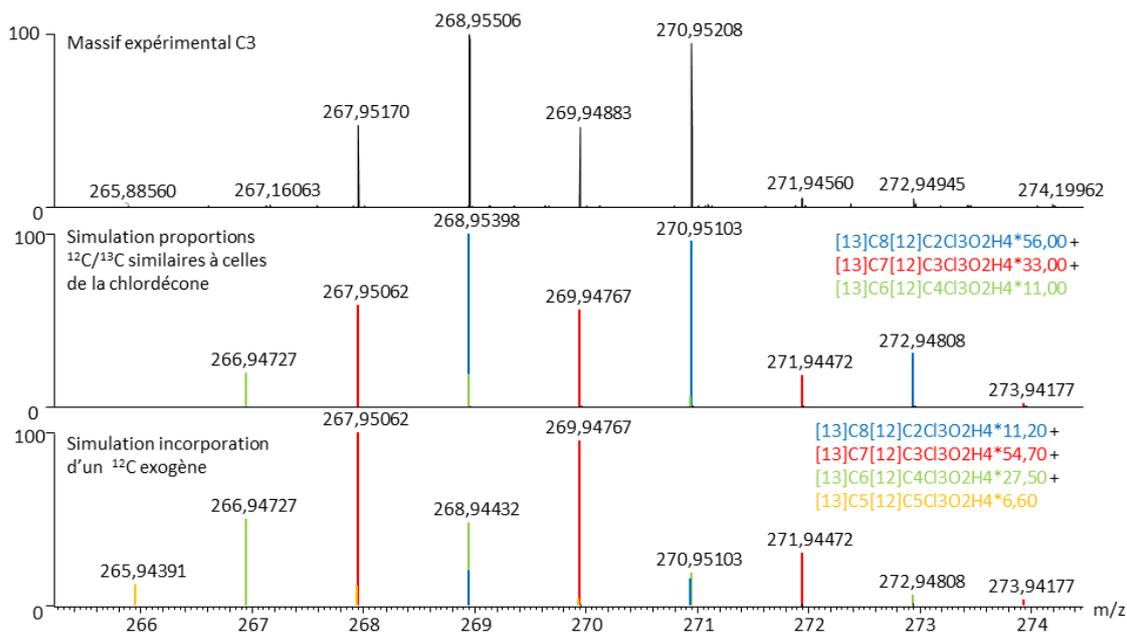
Annexe 8 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  des composés B3 et B3' (THF- $d_8$ , 150 MHz).



Annexe 9 : Voltampérométrie cyclique de la chlordécone ( $6,5 \cdot 10^{-4}$  mol/L) avec une électrode de dioxyde d'étain à 10 mV/s.



Annexe 10 : Comparaison du spectre de masse obtenu par ESI-Orbitrap (haute résolution) du métabolite C3 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) marquée au  $^{13}\text{C}$  avec simulation du massif dont les 10 atomes de carbone seraient issus de la chlordécone et simulation du massif issu de la perte d'un carbone  $^{12}\text{C}$  ou  $^{13}\text{C}$  suivi de l'incorporation d'un atome de carbone exogène ( $^{12}\text{C}$ ).



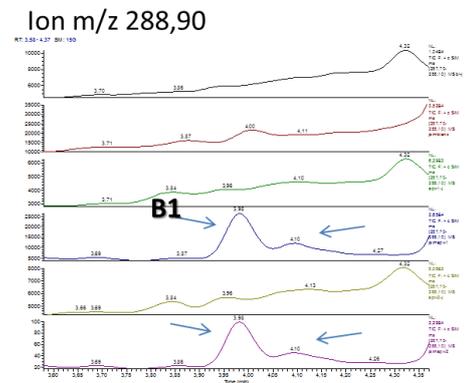
Annexe 11: Métabolites détectés par GC-MS après extraction du milieu de culture lors de la dégradation par voie microbiologique des hydrochlorodécones A1, A2 et A3.

Métabolite ensemencé dans l'expérience	Bactéries	Métabolites observés après analyse GC-MS
A1	Consortium 86	A1
A1	Consortium 86	A1
A1	<i>Citrobacter</i>	A1
A1	<i>Citrobacter</i>	A1
A1	Non	A1
A2*	Consortium 86	B2, B3 et traces A3*
A2*	Consortium 86	B2, B3 et traces A3*
A2*	<i>Citrobacter</i>	B2, B3 et traces A3*
A2*	<i>Citrobacter</i>	B2, B3 et traces A3*
A2*	Non	A2 et traces A3*
A3*	Consortium 86	hydrochlorodécones et traces A2*
A3*	Consortium 86	hydrochlorodécones et traces A2*
A3*	<i>Citrobacter</i>	hydrochlorodécones et traces A2*
A3*	<i>Citrobacter</i>	hydrochlorodécones et traces A2*
A3*	Non	A3 et traces A2*

\*Echantillon du composé A2 contaminé avec le composé A3 et réciproquement.

Annexe 12 : Chromatogrammes des expériences de dégradation microbiologique du composé A2 et identification du métabolite B1 d'après l'analyse par SIM.

T0 et T1 colonne xlb-zb méthode courte SIM : recherche de B => **traces de B1**



blanc T0

blanc T1

Consortium 86

réplicit 1 T0

Consortium 86

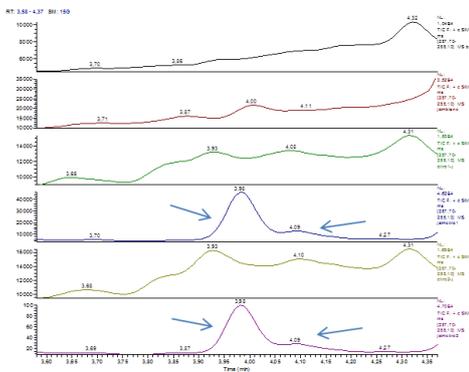
réplicit 1 T1

Consortium 86

réplicit 2 T0

Consortium 86

réplicit 2 T1



blanc T0

blanc T1

*Citrobacter* 86-1

réplicit 1 T0

*Citrobacter* 86-1

réplicit 1 T1

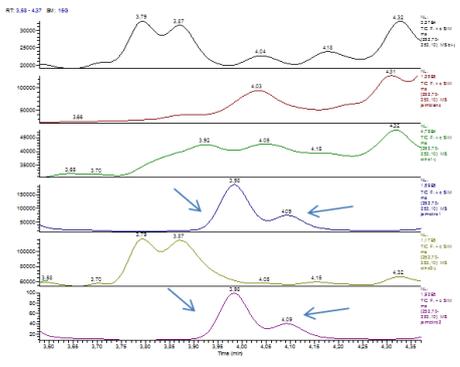
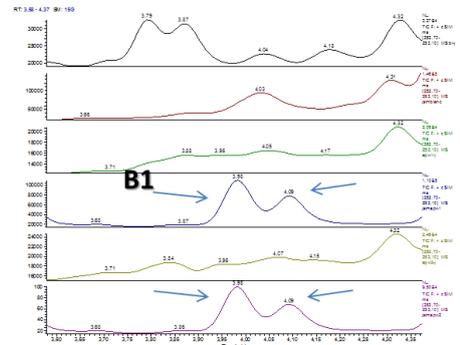
*Citrobacter* 86-1

réplicit 2 T0

*Citrobacter* 86-1

réplicit 2 T1

Ion 253,9



blanc T0

blanc T1

*Citrobacter* 86-1

réplicit 1 T0

*Citrobacter* 86-1

réplicit 1 T1

*Citrobacter* 86-1

réplicit 2 T0

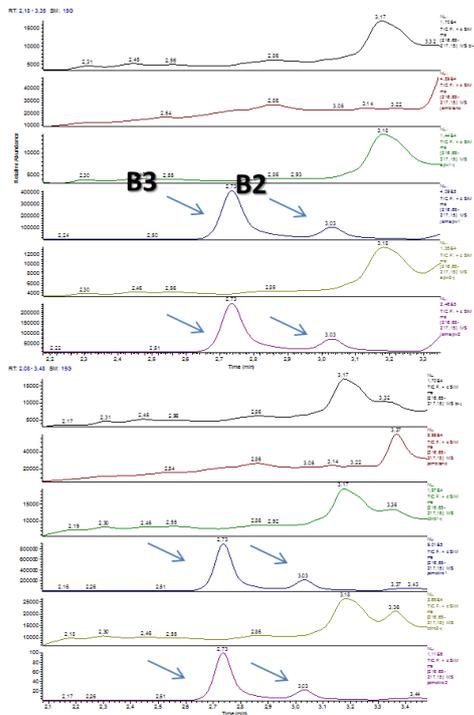
*Citrobacter* 86-1

réplicit 2 T1

Annexe 13 : Chromatogrammes des expériences de dégradation microbiologique du composé A2 et identification des métabolites B2 et B3 d'après l'analyse par SIM (avec APW= consortium 86 et CIT= *Citrobacter* 86-1).

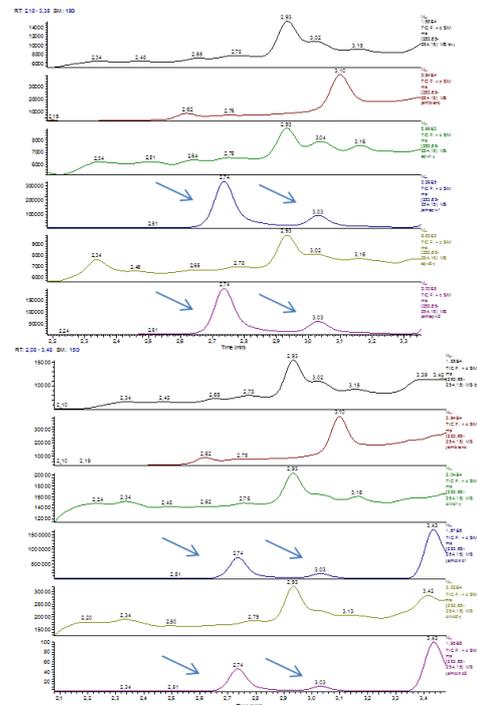
T0 et T1 colonne xlb-zb méthode courte SIM : recherche de B2 et B3

Ion 216,9



Ion 253,90

blanc T0  
 blanc T1  
 Consortium 86  
 réplicat 1 T0  
 Consortium 86  
 réplicat 1 T1  
 Consortium 86  
 réplicat 2 T0  
 Consortium 86  
 réplicat 2 T1  
  
 blanc T0  
 blanc T1  
*Citrobacter* 86-1  
 réplicat 1 T0  
*Citrobacter* 86-1  
 réplicat 1 T1  
*Citrobacter* 86-1  
 réplicat 2 T0  
*Citrobacter* 86-1  
 réplicat 2 T1



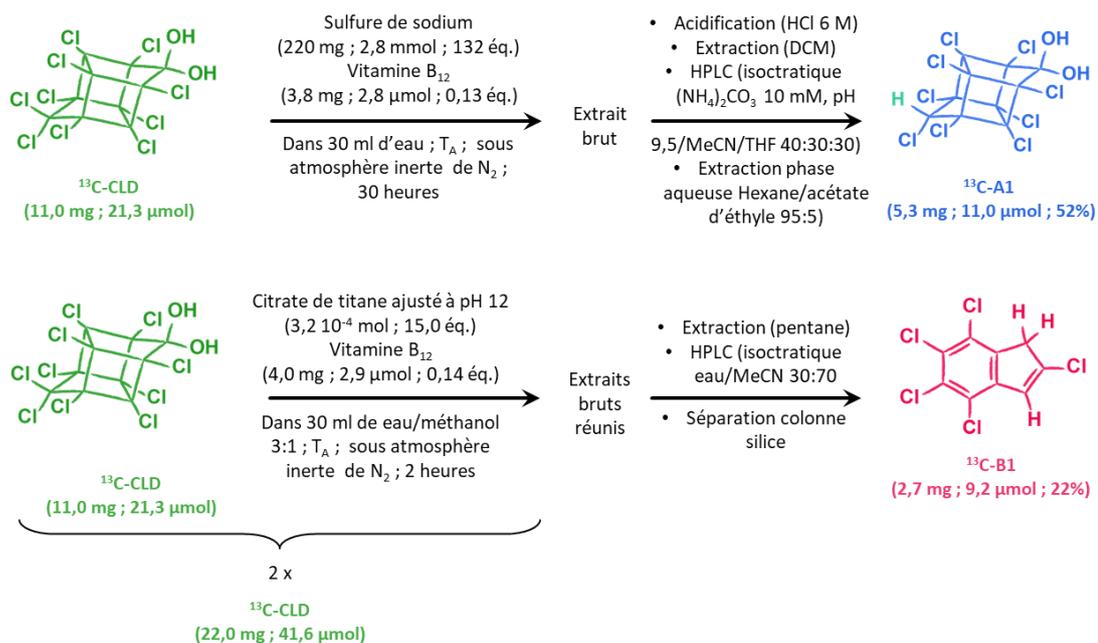
Annexe 14 : Condition d'utilisation des réactifs dans les transformations chimiques

	<b>Complexes métalliques (catalyseurs)</b>			
	Chlordécone	Vitamine B12	Hématine	Chlorophylle a
<b>masse (g)</b>	5,00E-03	4,00E-03	3,12E-02	3,33E-02
<b>masse molaire (g/mol)</b>	5,08E+02	1,38E+03	6,35E+02	8,94E+02
<b>quantité (mol)</b>	9,84E-06	2,89E-06	4,92E-05	3,72E-05
<b>volume réactionnel (petite échelle) (L)</b>	3,00E-02	3,00E-02	3,00E-02	3,00E-02
<b>concentration (mol/L)</b>	1,69E+04	4,61E+04	2,12E+04	1,24E-03
<b>équivalents par rapport à la chlordécone</b>	1,00E+00	2,94E-01	5,00E+00	3,78E+00
	<b>Agents réducteurs</b>			
	Dithionite de sodium	Sulfure de sodium	Fer zéro valent	Citrate de titane (III)
<b>masse (g)</b>	2,20E-01	2,20E-01	2,20E-01	1,27E-02
<b>masse molaire (g/L)</b>	1,74E+02	7,80E+01	5,59E+01	1,54E+02
<b>quantité (mol)</b>	1,26E-03	2,82E-03	3,94E-03	8,24E-05
<b>volume (L)</b>	3,00E-02	3,00E-02	3,00E-02	3,00E-02
<b>concentration (mol/L)</b>	4,21E-02	9,40E-02	1,31E-01	2,75E-03
<b>équivalents par rapport à la chlordécone</b>	1,28E+02	2,87E+02	4,00E+02	8,37E+00

Annexe 15 : Résumé des conditions de transformation et des produits de transformation

Conditions du milieu de transformation				Caractéristiques de la transformation		Produits de transformation	
Catalyseur	Agent réducteur	solvant	pH	avancement	durée	produits majoritaires	produits minoritaires
<b>Aucun</b>	aucun	aqueux (NaOH 10mM)	12	pas de transformation	-	-	
	dithionite de sodium	aqueux (NaOH 10mM)	12	pas de transformation	-	-	
	sulfure de sodium	eau	12	pas de transformation	-	-	
	fer zéro valent	eau/acétone 3:1	7	totale	plusieurs semaines (>7)	hydrochlordécone A1	PCI B1 et APCIC C1 à 4
	citrate de titane (III)	aqueux (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 60mM, NaOH 85mM)	12	totale	3 heures	hydrochlordécones	
<b>Vitamine B<sub>12</sub></b>	aucun	aqueux (NaOH 10mM)	12	pas de transformation	-		
	dithionite de sodium	aqueux (NaOH 10mM)	12	incomplète	7 jours	hydrochlordécone A1	PCI B1 (traces)
	sulfure de sodium	eau	12	totale	30 heures	hydrochlordécone A1	PCI B1 et APCIC C1 à 4
	fer zéro valent	eau/acétone 3:1	7	totale	5 jours	hydrochlordécone A1 APCIC C1 à C8	hydrochlordécones dont A4 polychloroindènes B1, B2, B3
	citrate de titane (III)	aqueux (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 60mM, NaOH 85mM)	12	totale	2 heures	PCI B1 APCIC C3 à C10	PCI B2, B3
<b>Hématine</b>	aucun	aqueux (NaOH 10mM)	12	pas de transformation	-		
	dithionite de sodium	eau	7	incomplète	3 jours	hydrochlordécone A1	hydrochlordécone A5
	sulfure de sodium	eau	12	totale	3 jours	hydrochlordécone A1	
	fer zéro valent	eau/acétone 3:1	7	totale	2 semaines	hydrochlordécone A1	hydrochlordécones A4, A5, pentachloroindène B1
	citrate de titane (III)	aqueux (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 60mM, NaOH 85mM)	12		3 heures	hydrochlordécones A1, A5	hydrochlordécones A4, PCI
<b>Chlorophylle a</b>	aucun	aqueux (NaOH 10mM)	12	pas de transformation	-		
	sulfure de sodium	eau	12	incomplète	7 jours	hydrochlordécone A1	

## Annexe 16 : Résumé des conditions de transformation et des produits de transformation



**Titre :** Etude de la dégradation biologique et chimique d'un pesticide persistant : la chlordécone

**Mots clés :** chlordécone, pesticide, pollution, Antilles, biomimétique, chloroindène

La chlordécone est un pesticide de structure bis-homocubane perchlorée. Elle a été utilisée de façon intensive aux Antilles françaises entre 1972 et 1993, pour lutter contre le charançon du bananier. Bien que son usage ait été interdit il y a plus de vingt ans, elle est encore présente dans les sols et contamine l'ensemble de l'environnement ainsi que toute la chaîne alimentaire jusqu'à l'Homme. L'exposition chronique augmente le risque de certains cancers et induit des retards de développement chez l'enfant ainsi que des troubles de la reproduction. Ses propriétés physico-chimiques la rendent particulièrement persistante, les estimations de la durée de pollution des sols sont de l'ordre de dizaines à centaines d'années. Les essais de biodégradation conduits par le passé n'ont permis qu'une transformation partielle du pesticide sans modification prouvée de sa structure cage et seulement perte avérée d'un ou deux atomes de chlore. Au Genoscope, des travaux ont conduit à l'identification de consortia bactériens ainsi qu'une bactérie isolée du genre *Citrobacter* capables de transformer totalement la chlordécone en quelques semaines. Ces transformations sont à l'origine de trois familles de métabolites chlorés.

Dans cette thèse, nous avons étudié ces transformations en détaillant la nature des différents métabolites puis en examinant leurs conditions de formation dans le but d'élucider les voies de transformation. Des protocoles chimiques biomimétiques ont été conçus et optimisés pour produire sélectivement quelques milligrammes des métabolites principaux. Après les avoir purifiés, nous avons étudié leur structure par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire. Les structures chimiques de trois hydrochlordécones et de deux polychloroindènes (PCI) ont ainsi été élucidées. La structure originale de ces deux derniers composés, même si postulée par plusieurs études précédentes, est démontrée pour la première fois. Pour les métabolites restants, des structures incluant des acides polychloroindénecarboxyliques (APCIC) ont été proposées. Les APCIC n'avaient jamais été décrits jusque-là comme produits de transformation de la chlordécone. Ces résultats éclairent d'un jour nouveau un certain nombre d'observations antérieures non comprises. Les métabolites purifiés ont ensuite été mis en culture afin d'étudier leur rôle d'intermédiaires ou de produits finaux lors des transformations chimiques et microbiologiques. Une proposition de voie de transformation générale de la chlordécone a été proposée pour justifier la formation de l'ensemble des familles de composés. Les métabolites PCI et APCIC ont une structure indène qui résulte de l'ouverture de la cage bis-homocubane. Une étude électrochimique a montré la nécessité de conditions réductrices particulièrement puissantes et la présence d'un catalyseur tel que la vitamine B<sub>12</sub> pour créer les conditions favorables à la formation des PCI et APCIC. Enfin, dans le but de mieux comprendre la dynamique des réactions, nous avons mesuré le fractionnement isotopique des atomes de carbone de la chlordécone au cours des transformations microbiologiques et de certaines transformations chimiques supposées approchées les mécanismes microbiologiques.

A l'issue de cette thèse, nous avons donc synthétisé, purifié et caractérisé les métabolites issus de la transformation microbiologique de la chlordécone. L'obtention des principaux métabolites par voie chimique est un point de départ pour de nouveaux travaux : la toxicité de ces composés pourra être évaluée, ils seront également utilisés pour développer des protocoles de dosage fiables afin de les quantifier dans les transformations chimiques et microbiologiques, mais aussi pour les rechercher dans les matrices environnementales. Enfin, l'étude de la biodégradation de ces composés par d'autres microorganismes permettra de poursuivre le but ultime de minéralisation complète de la chlordécone, préalable à tout essai de bioremédiation des eaux et des sols pollués antillais.

**Title :** Study of the biological and chemical degradation of a persistent pesticide : chlordecone

**Keywords :** chlordecone, pesticide, pollution, French West Indies, biomimetic, chloroindene

Chlordecone is a synthetic organochlorine pesticide bearing a perchlorinated bis-homocubane structure. It was extensively used in banana plantations of the French West Indies (FWI) from 1972 to 1993. Even if its use has been prohibited in the FWI more than two decades ago, chlordecone is present in all environmental compartments thus contaminating local food chain. Chronic exposure increases risk of cancers and induces reproductive and developmental disorders. Due to its environmental persistence, chlordecone pollution in soils and water is estimated to last for numerous decades or even centuries. Previous works reported on chlordecone biodegradation research led to low efficient transformations: one or two chlorine atoms at most lost and bis-homocubane core structure untouched. Recently in Genoscope, bacterial consortia and isolated *Citrobacter* strains were shown to mediate complete transformation of chlordecone into three main metabolites families within several weeks of action.

In the present work, this efficient microbiological transformation was investigated through complementary perspectives: structure elucidation of the main metabolites produced by bacteria-mediated transformations and study of their formation in order to approach the mechanistic pathways involved. Biomimetic transformation protocols were developed and optimized to produce several milligrams of each main metabolite. After successful isolation, the main metabolites were studied using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The structures of three hydrochlordecones and two polychloroindenes (PCI) were elucidated. Even if previously postulated as transformation product of chlordecone, the chlorinated indene core has been unambiguously demonstrated for the first time. The originality of the work also lies in the novel structure identification of four chlordecone transformation products bearing an unexpected polychloroindénecarboxylic acid (PCICA) structure. These results shed new lights on numerous earlier unclear results. Degradation experiments were run on the purified metabolites to explore their role in the chemical and microbiological transformations as intermediate or dead-end products. A general transformation mechanistic pathway that accounts for the formation of all three main metabolite families was proposed. PCI and PCICA metabolites resulting from ring-opening of the chlordecone bishomocubane core show a peculiar indene structure. Electrochemical study demonstrated the necessity of strong reductive conditions and presence of a catalyst such as vitamin B<sub>12</sub> in order to favour PCI and PCICA formation. Finally, to better understand the transformation dynamics, carbon isotope fractionation during biotic and abiotic transformations were measured.

In this work, several chlordecone biological transformation products were produced, isolated and fully characterized. These results open the way towards new perspectives: evaluation of metabolites toxicity, development of reliable quantification methods for monitoring chlordecone transformations in all types of matrix, including environmental samples. Last but not least, chlordecone metabolites biodegradation will be investigated in order to pursue complete biomineralization of chlordecone, pre-requisite for any bioremediation attempts in the FWI.