



HAL
open science

Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans le sol des Antilles françaises

Chloé Merlin

► **To cite this version:**

Chloé Merlin. Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans le sol des Antilles françaises. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DI-JOS001 . tel-01508920

HAL Id: tel-01508920

<https://theses.hal.science/tel-01508920>

Submitted on 15 Apr 2017

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnement-Santé



INRA Dijon
UMR1347 Agroécologie



THESE

présentée par
Chloé Merlin
pour l'obtention du doctorat

RECHERCHE DE LA SIGNATURE BIOLOGIQUE DE LA DEGRADATION DU
CHLORDECONE DANS LE SOL DES ANTILLES FRANCAISES

Soutenu le 13 avril 2015
devant le jury composé de :

Edward Topp	Principal Research Scientist Agriculture and AgriFood Canada	Rapporteur
Pierre Benoit	Directeur de Recherche INRA Grignon – UMR EcoSys	Rapporteur
Isabelle Batisson	Maître de Conférences Université Blaise Pascal UMR Microorganismes : Génome et Environnement	Examineur
François Bussière	Directeur d'unité INRA Antilles-Guyane - UR ASTRO	Examineur
Cécile Grand	Ingénieur Sites et Sols Pollués ADEME	Examineur
Jean Guzzo	Professeur Université de Bourgogne	Président de jury
Marion Devers	Ingénieur d'étude INRA Dijon - UMR Agroécologie	Co-encadrante
Fabrice Martin-Laurent	Directeur de Recherche INRA Dijon - UMR Agroécologie	Directeur de thèse

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnement-Santé



INRA Dijon
UMR1347 Agroécologie



THESE

présentée par
Chloé Merlin
pour l'obtention du doctorat

RECHERCHE DE LA SIGNATURE BIOLOGIQUE DE LA DEGRADATION DU
CHLORDECONE DANS LE SOL DES ANTILLES FRANCAISES

Soutenu le 13 avril 2015
devant le jury composé de :

Edward Topp	Principal Research Scientist Agriculture and AgriFood Canada	Rapporteur
Pierre Benoit	Directeur de Recherche INRA Grignon – UMR EcoSys	Rapporteur
Isabelle Batisson	Maître de Conférences Université Blaise Pascal UMR Microorganismes : Génome et Environnement	Examineur
François Bussière	Directeur d'unité INRA Antilles-Guyane - UR ASTRO	Examineur
Cécile Grand	Ingénieur Sites et Sols Pollués ADEME	Examineur
Jean Guzzo	Professeur Université de Bourgogne	Président de jury
Marion Devers	Ingénieur d'étude INRA Dijon - UMR Agroécologie	Co-encadrante
Fabrice Martin-Laurent	Directeur de Recherche INRA Dijon - UMR Agroécologie	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Edward Topp, Pierre Benoit, Isabelle Batisson, François Bussière, Cécile Grand et Jean Guzzo pour avoir accepté de consacrer du temps à ce manuscrit et à la soutenance. Merci également à Alain Hartmann et un remerciement supplémentaire pour Isabelle Batisson pour leurs conseils lors des comités de pilotage et leur intérêt pour le sujet.

Merci à mes financeurs sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour : Merci à l'ADEME et le conseil régional de Bourgogne qui ont osé prendre ce risque et qui se sont montré solidaire de la problématique antillaise.

Les remerciements représentent l'occasion de se remémorer tous les bons moments passés au cours de la thèse, de se souvenir de toutes les personnes qui ont compté, alors c'est parti :

Un énorme merci à Fabrice Martin-Laurent, mon directeur de thèse, pour la prise de risque, pour m'avoir confié ce sujet passionnant, pour m'avoir fait confiance, pour ses conseils scientifiques, pour son incroyable capacité d'adaptation, son écoute, sa patience, sa sérénité : un directeur en or !

Un grand merci affectueux à Marion Devers, mon encadrante, pour son soutien au laboratoire, ses conseils pratiques avisés, son aide au quotidien, et mon amie, pour tous ces bons moments partagés et cette complicité.

Un grand merci à toute l'équipe pour cette cohésion, cette bonne entente et cette bonne ambiance : Merci à Laurent Philippot, chef d'équipe, pour ses dimensions humaines et son don pour détecter les moments difficiles. Merci à Nadine et Marie-Christine, mes deux mamans, pour leur bonne humeur légendaire, leur soutien et leur attention. Merci à Kadiya, pour avoir partagé ce bureau à l'ambiance mexicaine et chaleureuse. Merci à Jérémie pour son soutien technique en biologie moléculaire et ses soirées RockBand. Merci à Romain pour ces discussions, ses histoires improbables et ses leçons sur la technicité de pelletage. Merci à Aymé pour ses conseils en analyses statistiques et ses côtes de bœufs grillés au soleil. Merci à David et son sens de l'humour. Merci aux anciens thésards, Farhan et Fred. Merci à la relève, Luiz et son bon cœur, Veronika et ses yeux pétillants et plein de vie. Merci à Amy, Céline, Sana, Giorgia, Najoi, Abdel... Merci au retraité de l'équipe, Jean-Claude Germon, pour avoir toujours pris le temps de s'arrêter, de discuter et de m'encourager. Merci à mon unique stagiaire, Baptiste, pour son travail concernant l'impact du chlordécone sur la communauté microbienne et son intérêt pour le sujet.

Merci beaucoup à tous ceux qui m'ont accompagnée pendant ces trois années :

Merci à la p'tite Anne-Laure et sa douceur, sa gentillesse, sa faculté à penser aux autres et s'inquiéter de leur bien-être, merci pour ces discussions et ces midis Bagel. Merci à ma Cécile H nationale pour m'avoir enseigné la manipulation de champignons, pour son calme, sa patiente, sa flexibilité et sa gentillesse. Merci à Géraldine pour toujours être attentive et à l'écoute, pour ses conseils, et pour son esprit collectif. Merci à Aude pour ces bons moments et ce soutien. Merci à la grande Anne-Laure, Elodie, Murielle, Cécile R, Céline F, Emeline, Gilles, Emilie, Katarzyna, Jessica, Sébastien, Benoit, Manon... Merci à l'ensemble des personnes croisées en salle café pour ces échanges, Marie-Reine, Florence, Céline F-P, Sophie, Ariane, et j'en oublie probablement (désolée !). Merci à mes

anciens profs de l'IUT, Dominique Garmyn et Pascal Piveteau de m'avoir permis de passer du côté enseignant et de tester mes facultés pédagogiques.

Merci aux partenaires :

Merci à Olivier Crouzet pour sa participation à l'étude des champignons tolérants et sa disponibilité. Merci à Jean-Luc Beltramo et Myriam Laly pour les analyses HPLC et leur gentillesse à tous les deux. Merci à Guy Vollmer pour les analyses GC. Merci beaucoup à Pierre-Loïc Saaidi du Géoscope, pour son implication dans le projet, sa passion, les discussions au GFP, merci d'avoir penser à moi pour un post-doc. Merci à Patricia Gerbeau-Pissot pour l'étude de l'impact du chlordécone sur la fluidité membranaire. Merci à Stéphane Grégoire pour les analyses lipidiques.

Merci aux « personnes de l'ombre » sans qui rien ne serait possible :

Merci à Emilie et Virginie, les filles de laverie, pour être toujours disponible et pour leur gentillesse. Merci à Bernard, mon sauveur informatique. Merci au service administratif : Sylvie, Claudine, Sandrine, Christine, pour leur gentillesse et leur réactivité. Merci à Dominique pour son franc-parler !

Merci à mes anciens chefs sans qui je ne serais jamais arriver en thèse :

Merci à Lionel Ranjard et Noémie Pascault pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et m'avoir fait confiance du haut de mes 20 ans. Merci à Josselin Bodilis et Maité Niepceron pour m'avoir encadrée pendant 4 années et pour m'avoir soutenue. J'en profite pour faire hommage à Sylvie Barry, une femme douce, attentive et humaine.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais avec qui nous avons échangé quelques mots ou quelques sourires.

Merci aux copains normands de toujours, ils se reconnaîtront, pour leurs constances affectives, leurs présences sans faille.

Merci à mes parents et mon grand frère qui m'ont façonnée, éduquée, soutenue. Merci pour leurs valeurs, leurs rages et leurs engagements.

Merci à Cyril, mon amour, pour être là tout simplement, pour me faire rire et me consoler, et pour m'avoir supportée...

Merci à tous ceux qui luttent partout dans le monde, notre Terre est une « zone à défendre »...

*« Quand le dernier arbre aura été abattu, la dernière rivière empoisonnée, le dernier poisson pêché,
alors vous découvrirez que l'argent ne se mange pas »*

Proverbe amérindien

Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans le sol des Antilles françaises

Résumé

L'utilisation du chlordécone (CLD) pour éradiquer les populations de charançon noir dans les bananeraies des Antilles françaises (Guadeloupe et Martinique) entre 1972 et 1993 a conduit à la contamination des sols et de l'environnement. Cet insecticide organochloré très hydrophobe persiste dans les sols d'où il transfère lentement vers les ressources en eau et vers les biotes terrestre et aquatique (plantes, animaux, poissons, crustacées). Réputé « indégradable », le CLD résiste à la photolyse, à l'hydrolyse et à la biodégradation. A ce jour, il n'existe pas de méthode pour remédier les 20 000 hectares de sols pollués avec cet insecticide. Compte-tenu de l'étendue de la pollution avec le CLD, les procédés biologiques de décontamination paraissent appropriés au contexte antillais. Les objectifs de mon travail de thèse étaient d'explorer les possibilités de transformation microbienne du CLD et l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne des sols. Mes travaux reposent sur l'hypothèse selon laquelle des populations microbiennes exposées de manière chronique au CLD se seraient adaptées à sa dégradation pour détoxifier leur environnement ou éventuellement pour l'utiliser comme source d'énergie pour leur croissance.

Pour cela, j'ai développé une méthode d'analyse du CLD dans les sols et les cultures microbiennes basée sur l'isotopie stable. J'ai conduit des expériences d'enrichissement à partir de sols de Guadeloupe pollués avec le CLD. Une centaine de souches fongiques et près de 200 souches bactériennes ont été isolées. Aucune souche bactérienne dégradante n'ont pu être mises en évidence bien que certaines formaient un halo de dissolution du CLD sur milieu gélosé. Parmi les isolats fongiques, seul *F. oxysporum* sp. MIAE01197 se développait sur un milieu minéral contenant le CLD comme seule source de carbone et dissipait 40% du CLD. Cet isolat était deux fois plus tolérant au CLD qu'un isolat de référence jamais exposé au CLD. Cet isolat minéralisait très peu le ^{14}C -CLD, formait très peu de ^{14}C -métabolites, mais le ^{14}C -CLD s'adsorbait sur les parois fongiques, suggérant que l'adsorption était le principal mécanisme impliqué dans la dissipation du CLD. L'analyse de trois autres isolats appartenant au genre *Aspergillus* a confirmé que l'exposition au CLD était un des paramètres améliorant la tolérance des souches fongiques au CLD et que la biomasse fongique était capable d'adsorber le CLD dans des proportions proches de celles obtenues avec du charbon actif utilisé pour traiter l'eau potable aux Antilles.

L'évaluation de l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne et les fonctions qu'elle supporte a été menée sur deux sols aux propriétés physicochimiques contrastées n'ayant jamais été exposés au CLD. L'analyse de la structure globale (évaluée par RISA), de l'abondance et de l'activité de la communauté microbienne du sol argilo-limoneux n'étaient pas affectées par le CLD. En revanche, la composition taxonomique (qPCR) et l'activité respiratoire de la communauté microbienne étaient affectées par le CLD dans le sol sableux. Ces résultats montrent que la toxicité du CLD pour la communauté microbienne dépend des propriétés physicochimiques du sol qui conditionne sa biodisponibilité. Des études complémentaires devront être menées pour évaluer la toxicité possible du CLD sur des fonctions écosystémiques des sols des Antilles.

Mots-clefs : sols agricoles pollués, chlordécone, insecticide organochloré, communauté microbienne, dégradation, tolérance, sorption, écotoxicologie.

Directeur et co-encadrant de thèse : Fabrice Martin-Laurent et Marion Devers

Laboratoire d'accueil : INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle Ecoldur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Financeurs : ADEME et Conseil Régional de Bourgogne.

Search for biological signature of the degradation of chlordecone in soil of the French West Indies

Abstract

The use of chlordecone (CLD) to eradicate the weevil populations in the banana plantations in the French West Indies (Guadeloupe and Martinique) between 1972 and 1993 led to the contamination of the soil and the environment. This very hydrophobic organochlorine insecticide persists in the soil where it slowly transfers not only to the water resources but also to terrestrial and aquatic biota (plants, animals, fishes, shellfishes). Deemed “non-degradable”, CLD is resistant to photolysis, hydrolysis and biodegradation. To date, there is no method to remediate the 20,000 hectares of polluted soil with this insecticide. Given the extent of CLD pollution, biological decontamination processes appear appropriate to the Caribbean context. The objectives of my thesis were to explore the possibilities of microbial transformation of CLD and to assess the ecotoxicological impact of CLD on the soil microbial community. My work is based on the hypothesis that microbial populations chronically exposed to CLD would be adapted to its degradation to detoxify their environment or possibly for use as an energy source for growth.

To do so, I developed an analysis method in soils and microbial cultures based on the use of stable isotope to trace CLD. I conducted enrichment experiments with CLD polluted soils from Guadeloupe yielding in the isolation of one hundred fungal strains and nearly two hundred bacterial strains. No degrading bacterial strains have been identified although few of them formed dissolution halo of CLD on solid media. Among the fungal isolates, only *F. oxysporum* sp. MIAE01197 grew on a mineral medium containing CLD as sole carbon source and dissipated 40% of the CLD. This isolate was twice more tolerant than the reference isolate which had never been exposed to CLD. This isolate mineralizes ¹⁴C-CLD very lowly, formed very few ¹⁴C-metabolites, but the ¹⁴C-CLD was adsorbed on the fungal cell walls, suggesting that the adsorption was the main mechanism involved in the dissipation of the CLD. Analysis of three other isolates belonging to the genus *Aspergillus* confirmed that exposure to CLD was one of the parameters improving the tolerance of fungal strains to CLD and fungal biomass was capable of adsorbing the CLD in proportions close to those obtained with activated carbon used to treat drinking water in the French West Indies.

The assessment of the CLD ecotoxicological impact on the microbial community and functions it supports was carried out on two soils never exposed to CLD showing contrasting physicochemical properties. The analysis of the overall structure (evaluated by RISA), the abundance and the activity of the microbial community of the silty-clay soil were not affected by the CLD. However, the taxonomic composition (evaluated by group specific qPCR) and respiratory activity of the microbial community were affected by the CLD in the sandy soil. These results showed that the toxicity of CLD for microbial community depends on the physicochemical properties of the soil which may determine its bioavailability. Further studies are needed to evaluate the possible toxicity of the CLD on Caribbean soil ecosystemic functions.

Keywords: polluted agricultural soils, chlordecone, organochlorine insecticide, microbial community, degradation, tolerance, sorption, ecotoxicology.

Thesis director and co-supervisor: Fabrice Martin-Laurent and Marion Devers.

Host laboratory: INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle Ecolur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Funders : ADEME and Conseil Régional de Bourgogne.

LISTE DES ABBREVIATIONS

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
A	
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOSIM	Analysis of similarities
ANOVA	Analysis of variance
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail
APR	Appel à Projet de Recherche
APV	Autorisation Provisoire de Vente
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ATP	Adénosine triphosphate
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
AZF	Azote Fertilisants
B	
BCF	Facteur de BioConcentration
BRGM	Bureau de Recherche Géologique et Minière
C	
CAS	Chemical Abstracts Service
CDC	Center of Disease Control
CIRAD	Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement
CLD	Chlordécone
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
ComTox	Commission d'Etude de la Toxicité
D	
Δ_rG°	Energie libre de Gibbs
DAAF971	Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de Guadeloupe
DDASS	Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DDT	DichloroDiphénylTrichloroéthane
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DHHS	Department of Health and Human Services
DIREN	Direction Régionale de l'ENvironnement
DIVE	Direction du végétal et de l'environnement
DOM	Département d'Outre-Mer
DSDS	Direction de la santé et du développement social
E	
EPA	Environmental Protection Agency

Ephy	Catalogue en ligne des phytosanitaire
ETM	Éléments Traces Métalliques
F	
FWI	French West Indies
G	
GC	Chromatographie en Phase Gazeuse
GFP	Groupe Français des Pesticides
H	
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HCB	HexaChloroBenzène
HCH	HexaChlorocycloHexane
HCP	HexaChlorocycloPentadiène
HMX	High Melting point eXplosive
I	
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFAC	Institut des Fruits et Légumes Coloniaux
IFEN	Institut français de l'environnement
IFREMER	Institut Français de la Recherche pour l'Exploitation de la MER
INERIS	Institute National de l'EnviRonnement Industriel et des risques
IRFA	Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes
ISCR	<i>In situ</i> Chemical Reduction
IGS	Intergenic spacer
ITS	Internal transcribed spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	
Jafa	JAr dins Fa milia ux
K	
K_{AW}	Coefficient de partage air - eau
K_D	Coefficient de partage sol - eau
K_{OC}	Coefficient de partage carbone organique - eau
K_{OW}	Coefficient de partage octanol - eau
K_{SA}	Coefficient de partage sol-air
L	
LC	Chromatographie en phase liquide
LDA26	Laboratoire Départemental d'Analyse de la Drôme
LDH	Lactate déshydrogénase
LMR	Limite Maximales de Résidus
LSPC	Life Science Products Company
M	
MES	Matière En Suspension
MIAE	Microorganisme d'intérêt agro-environnemental

MS	Spectrométrie de masse
MS	Mineral Salt
N	
NIRS	Near infrared spectroscopy
NMDS	Non-Metric multiDimensional Scaling
NOR	Normal Operating Range
O	
ONEMA	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
P	
PCB	PolyChloroBiphényle
PNAC	Plan National d'Action Chlordécone
POP	Polluant Organique Persistant
Pv	Pression de vapeur
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
R	
RAIS	Risk Assessment Information System
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S	
SAU	Surface Agricole Utile
SDQPV	Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux
SICABAM	Société d'Intérêt Collectif Agricole Bananière de Martinique
SIG	Système d'Information Géographique
Seppic	Société d'Exploitation des Produits Pétroliers de l'Industrie Chimique
SPV	Service de Protection des Végétaux
T	
TD	Distance de transport
TLC	Thin layer chromatography
TNT	TriNitroToluène
U	
UCPI	Unités contrats et propriété intellectuelle
UNEP	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
UNESCO	Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture
UV	UltraViolet
V	
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VTR	Valeur Toxicologique de Référence
W	
WHO	World Health Organization
WISORCH	West-Indies, Soil, ORganoCHlorine

SOMMAIRE

<i>Préambule : réflexions sur le genre attribué à l'insecticide 'chlordécone'</i>	1
<i>Introduction générale</i>	1
<i>Organisation du manuscrit</i>	6
PARTIE 1 : Synthèse bibliographique	7
Chapitre 1- Caractéristiques du chlordécone	7
1-1- Généralités.....	7
1-2- Une structure « originale »... ..	7
1-3- Des propriétés physico-chimiques dignes d'un organochloré.....	9
1-4- Action insecticide.....	11
Chapitre 2- Production et usage	13
2-1- Synthèse du CLD	13
2-2- Production	13
2-2-1- Képone® 1951-1975 : les Etats-Unis fournissent le monde.....	14
2-2-2- Curlone® 1981-1990 : Reprise de la production par la France.....	16
2-3- Usage	16
2-3-1- Usage du Képone®	16
2-3-2- Usage du Curlone®	18
Chapitre 3- Autorisation de mise sur le marché du CLD	19
3-1- Aux Etats-Unis.....	19
3-2- En France	19
3-2-1- Cadre juridique.....	19
3-2-2- Avant-propos	20
3-2-3- Sur la période 1968-1972 : l'arrivée du CLD aux Antilles françaises et les premières suspicions envers les organochlorés... ..	21
3-2-4- Sur la période 1973-1981 : restrictions d'utilisation des organochlorés vs autorisations provisoires de ventes du Képone®... ..	24
3-2-5- Après 1981 : la période énigmatique du Curlone®	25
Chapitre 4- Le CLD, un polluant organique persistant (POP)	27
4-1- Persistance : Pollution « durable » des sols.....	29
4-1-1- Affinité pour la matière organique : rétention chimique.....	30
4-1-2- Les allophanes : piège physique du CLD.....	31
4-1-3- Une contamination importante et durable.....	34
4-1-3-1- Importante et hétérogène	34
4-1-3-2- Durable	35
4-2- Transfert.....	38
4-2-1- Vers l'atmosphère	39
4-2-2- Vers les rivières, eaux souterraines, estuaires et milieu marin.....	45

4-2-2-1- Contamination du bassin versant au littoral : un constat sans appel	45
4-2-2-2- Mécanismes de transfert sol-eau	49
4-2-3- Vers les plantes	55
4-2-3-1- La contamination des plantes est proportionnelle à la teneur en CLD des sols	55
4-2-3-2- La contamination des plantes par le CLD dépend du type de sol	56
4-2-3-3- Variabilité de la contamination avec le CLD selon le type de culture et distribution hétérogène au sein même des plantes	58
4-3- Bioaccumulation : la chaîne alimentaire est-elle contaminée avec le CLD ?.....	62
4-3-1- Définitions	62
4-3-2- Point sur les LMR.....	62
4-3-3- Faune dulcicole et marine	63
4-3-4- Faune terrestre	67
4-3-4-1- Œufs, foie et gras de volailles	68
4-3-4-2- Mammifères	70
4-4- Toxicité humaine	70
4-4-1- Classement Cancérogène/Mutagène/Reprotoxique et effets endocriniens.....	71
4-4-2- L'exposition professionnelle de Hopewell à l'origine d'une contamination aiguë.....	71
4-4-3- Exposition chronique de la population antillaise	74
4-4-4- Et concernant la toxicité des congénères du CLD ?.....	76
 Chapitre 5- Dégradation du CLD et décontamination/remédiation.....	 79
5-1- Le CLD est-il dégradable ? Réduction versus oxydation. Aérobie versus anaérobie.	79
5-2- Méthodes physico-chimiques de remédiation	80
5-3- Biodégradation spontanée du CLD dans les sols antillais : touche d'espoir.....	82
5-4- Biodégradation microbienne.....	83
5-5- Phytoremédiation.....	85
5-6- Décontamination des ressources alimentaires contaminées.....	86
5-6-1- Eau potable.....	86
5-6-2- Production animale.....	87
 Chapitre 6- L'après CLD et alternatives	 89
6-1- L'après CLD.....	89
6-1-1- Règlementation	89
6-1-2- Quand les chercheurs locaux vont à la rencontre de la population : Outil d'aide à la décision aux agriculteurs et à la population.....	90
6-1-3- Insecticides de remplacement.....	93
6-2- Des alternatives de lutttes biologiques contre le charançon du bananier ?.....	94
6-2-1- Le piégeage du charançon du bananier : technique ancestrale revisitée.....	95
6-2-2- Introduction de prédateurs du charançon du bananier.....	96
 Conclusion.....	 99
Objectifs de la thèse	100

PARTIE 2 : Partie expérimentale103

Organisation de la partie expérimentale103

Chapitre 1 : Mise au point méthodologique105

Article 1 : Mise au point d'une méthode de détection et de quantification du CLD dans des sols contaminés des Antilles françaises par GC-MS basée sur l'utilisation de l'isotope stable ¹³C₁₀-CLD comme traceur.....105

Introduction105

Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the ¹³C₁₀-chlordecone stable isotope as a tracer107

Abstract 107

1- Introduction..... 107

2- Materials and methods 108

2-1- Chemicals and reagents 108

2-2- Soil Samples..... 108

2-3- GC-MS analysis..... 108

3- Results and discussion 109

4- Conclusion 112

Acknowledgment..... 112

References 112

Conclusions113

Chapitre 2 : Recherche de couches microbiennes dégradant le CLD115

Article 2 : Caractérisation de populations fongiques tolérantes au CLD isolées d'un sol volcanique des Antilles françaises historiquement contaminé.115

Introduction115

Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies.....117

Abstract 117

1- Introduction..... 117

2- Materials and methods 119

2-1- Chemicals 119

2-2- Media 119

2-3- *F. oxysporum* strains and storage conditions..... 119

2-4- Soil sampling 119

2-5- Soil physicochemical properties 119

2-6- Enrichment culture 120

2-7- Isolation of fungal strains..... 120

2-8- DNA extraction..... 120

2-9- ITS amplification and sequencing..... 120

2-10- Chlordecone dissipation abilities..... 120

2-11- Chlordecone mineralization 121

2-12- Growth test on chlordecone..... 121

2-13- Tolerance to chlordecone	121
2-14- Toxicity of chlordecone for fungal strains	121
2-15- Chlordecone adsorption to fungal biomass	122
2-16- Statistical analysis	122
3- Results	122
3-1- Isolation and morphological characterization of fungal strains isolated from the Andosol	122
3-2- Characterization of the diversity of fungal isolates	122
3-3- Screening of the fungal isolates for growth on chlordecone-MS medium	124
3-4- Characterization of <i>F. oxysporum</i> MIAE01197 tolerance to chlordecone	124
3-5- Characterization of <i>F. oxysporum</i> MIAE01197 ability to dissipate chlordecone	125
4- Discussion	126
5. Conclusion	128
Acknowledgment	128
References	128
Conclusions	131
Article 3 : Caractérisation des capacités de populations fongiques à biosorber le CLD.	133
Introduction	133
Characterization of chlordecone biosorption capacities of fungal species isolated from a long-term polluted soil (French West Indies)	135
Abstract	135
1- Introduction	136
2- Materials and methods	138
2-1- Chemicals	138
2-2- Media	138
2-3- Fungal strains and storage conditions	139
2-4- Fungal biosorbents and activated charcoal	139
2-5- Tolerance to chlordecone (CLD)	139
2-6- Toxicity of CLD for fungal strains	140
2-7- CLD mineralization	140
2-8- CLD sorption to dead (non-living) fungal biomass experiments	141
2-9- Statistical analysis	142
3- Results	142
3-1- Characterization of isolated fungal strains and reference fungal strains tolerance to CLD	142
3-2- Characterization of fungal isolates abilities to dissipate CLD	144
3-3- Characterization of fungal strains and charcoal sorption abilities	144
4- Discussion	147
Conclusion	150
Acknowledgments	151
Conclusions	153

Chapitre 3 : Impact du CLD sur la structure, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne des sols	155
Article 4 : Impact du CLD sur les communautés microbiennes de sols non pré-exposées	155
Introduction	155
Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance and function.....	157
Abstract	161
Introduction.....	162
Materials and methods	163
Chemicals.....	163
Soil sampling and soil physico-chemical properties	164
Microcosms establishment.....	164
Fate of chlordecone (CLD) in soil microcosms	165
Soil DNA extraction, purification and quantification.....	165
Inhibition test.....	166
Abundance of the total and of phylum-specific groups.....	166
Genetic structure of total bacterial community	167
Mineralization of 2,4-D and sodium acetate by soil microbial community.....	167
Results	168
Fate of ¹⁴ C-CLD in the sandy loam and silty loam soils.....	168
Impact of CLD on the abundance of the total bacterial community and 11 of targeted phyla	169
Impact of CLD on genetic structure of bacterial communities	170
Impact of CLD on the mineralization of 2,4-D and sodium acetate	171
Discussion	172
Fate of CLD in the soils.....	172
Estimation of ecotoxicological impact of CLD	174
Conclusion.....	176
Acknowledgements	177
Figure legends	177
References	178
Conclusions	189
 PARTIE 3 : Discussion générale et conclusions	 191
Discussion générale.....	191
Conclusions et perspectives.....	202
 Bibliographie	 205
Réglementation	220
Sites internet	223
Annexes.....	225
Annexe 1 : 'Supplementary files' de l'article 1.....	225

<i>Annexe 2 : 'Supplementary file' de l'article 2 (Amount of ¹⁴C₁₀-chlordecone adsorbed to fungal biomass measured in 0.1, 0.5 and 1 OD600 F. oxysporum MIAE01197 suspension cultures. Linear relationship calculated between the amount of ¹⁴C₁₀-chlordecone adsorption and fungal biomass)</i>	229
<i>Annexe 3 : 'Supplementary file' de l'article 3 (Effective concentrations of chlordecone that decrease biomass production by 10% compared to the control)</i>	230
<i>Annexe 4 : 'Supplementary file' de l'article 4 (Summary of statistical analysis)</i>	231

LISTE DES FIGURES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1. Vue dorsale d'un charançon noir adulte du bananier, <i>Cosmopolites sordidus</i>	3
Figure 2. Représentation graphique de molécules synthétiques de la famille des cubanes.	8
Figure 3. (a) Structure 3D du chlordécone, (b) structure 3D de gem-diol de l'hydrate de chlordécone (d'après Wang <i>et al.</i> 2001).	10
Figure 4. Synthèse de pesticides du type cyclodiènes chlorés à partir de HCP (EPA 1978).	13
Figure 5. Liste des polluants organiques persistants identifiés par la convention de Stockholm.	29
Figure 6. Teneurs actuelles calculées en CLD de trois types de sols, selon les K_{oc} apparents moyens issus de l'inversion du modèle WISORCH, sur des sols ayant reçu les mêmes apports de CLD (reproduction de Cabidoche <i>et al.</i> 2006a).	31
Figure 7. Carte pédologique et aire de répartition du « croissant bananier » de la Guadeloupe.	32
Figure 8. Evolution de la concentration en CLD normalisée par la teneur en carbone organique du sol en fonction de la teneur en allophane (tirée de Woignier <i>et al.</i> 2012).	33
Figure 9. Cartes des risques de pollution des sols par le CLD en Martinique et en Guadeloupe établies à partir de l'analyse de l'occupation des sols.	34
Figure 10. Prédiction de l'évolution des teneurs en CLD dans trois types de sols antillais (andosol, ferralsol et nitisol) obtenue avec le modèle WISORCH (adaptée de Cabidoche <i>et al.</i> 2009).	36
Figure 11. Prédiction de l'évolution de la teneur en CLD et β -HCH dans l'andosol selon le modèle WISORCH (modifié d'après Cabidoche <i>et al.</i> 2006b).	37
Figure 12. Persistance du CLD (exprimée en jour) dans l'environnement comparée à la persistance d'autres substances dont des POPs (tirée de Vulykh <i>et al.</i> 2006).	38
Figure 13. Technique d'épandage du CLD en bananeraie	40
Figure 14. Relation des concentrations sol-air pour des pesticides organochlorés (tiré de Bidleman et Leone 2004).	42
Figure 15. Concentrations de différents pesticides organochlorés mesurées par l'échantillonneur de terrain dans l'air ambiant à 150 cm du sol et à 3 cm du sol dans une parcelle cultivée avec du soja (tirée de Meijer <i>et al.</i> 2003a)	42
Figure 16. Régression linéaire entre la distance de transport et le temps de demi-vie dans l'air d'après Rodan <i>et al.</i> (1999).	43
Figure 17. Distance de transport du CLD comparée à d'autres substances (tirée de Vulykh <i>et al.</i> 2006).	44
Figure 18. Amplification du « stemflow » dû au feuillage en forme d'impluvium du bananier.	50
Figure 19. Concentration moyenne en CLD sur les différents compartiments à l'aval de la rivière Mansarde lors d'évènement de crue (reproduit de Rocle <i>et al.</i> 2009).	53
Figure 20. Part de pesticide transporté par les sédiments en fonction de la teneur en sédiments d'après Leonard (1990). L'encadré rouge présente le positionnement des domaines concernés par le CLD en Martinique d'après Rocle <i>et al.</i> (2009).	54
Figure 21. Teneur en CLD observée dans les racines et tubercules de différents légumes en fonction de la teneur en CLD observée dans les sols (tiré et modifié de Cabidoche <i>et al.</i> 2006a).	56

Figure 22. Teneur en CLD dans les organes de végétaux (feuilles de laitue (a), tubercule d'igname (b), tubercule de dachine (c)) en fonction de la teneur en CLD dans des sols non-allophaniques ou allophaniques (tirée de Woignier <i>et al.</i> 2012).....	57
Figure 23. Teneur en CLD contenue dans les tubercules d'ignames en fonction de la teneur en CLD du sol. Cet essai a été mené avec un dispositif « split-root » pour tester l'hypothèse de contamination par le CLD par contact du sol contaminé avec le tubercule de l'igname (Cabidoche <i>et al.</i> 2006b).....	59
Figure 24. a- Teneur en CLD observée dans des différents tissus de l'igname en fonction de la teneur en CLD dans les sols (Cabidoche <i>et al.</i> 2006a) ; b- Teneur en CLD dans la peau et la pulpe de la patate douce en fonction de la teneur en CLD mesurée dans le fruit entier (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).....	59
Figure 25. Abaque de contamination de légumes-racines par le CLD en fonction de la surface d'échange et de la durée du cycle de développement des organes souterrains (tirée de Cabidoche <i>et al.</i> 2006b).....	60
Figure 26. Contamination par le CLD des différentes parties de bananiers cultivés sur un andosol fortement pollué (tirée de Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).....	61
Figure 27. Grandeurs statistiques représentant la teneur en CLD mesurée dans la chair de différents poissons (exprimée $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair humide) (modifié de Rocle <i>et al.</i> 2009).	65
Figure 28. Relation entre niveau trophique et niveau de contamination (Bodiguel <i>et al.</i> 2011).....	66
Figure 29. Concentration en CLD dans les œufs et le gras abdominal de poules pondeuses en fonction de la quantité de CLD ingérée issu d'andosol, de nitisol ou d'huile de colza contaminés (tirée de Joindreville <i>et al.</i> 2013).....	69
Figure 30. $^{14}\text{CO}_2$ résultant de la minéralisation du ^{14}C -CLD dans les microcosmes de sol prélevés dans les horizons A et B d'un andosol fortement contaminé (tirée de Fernandez-Bayo <i>et al.</i> 2013a).....	83
Figure 31. Cartographie des zones d'interdictions totale et partielle de pêche en raison de la pollution au CLD en Guadeloupe en 2013 (tirée de l'annexe 1 de l'arrêté préfectoral 2013177-0012 daté du 2 juin 2013).	89
Figure 32. Cartographie des zones d'interdictions totale et partielle de pêche liées à la présence de CLD en Martinique (tirée de du site internet de l'Observatoire de l'eau de Martinique et relatif à l'arrêté 2012335-0003 du 30 novembre 2012).	90
Figure 33. Détermination de la limite maximale « tolérable » de la contamination de nitisols par le CLD en-dessous de laquelle le risque de dépassement de la LMR CLD définie par la commission européenne est nul (tirée de Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012).....	91
Figure 34. Plaquette pédagogique destinée à la population pour conseiller dans le choix de culture en fonction du niveau de contamination de la parcelle (tirée de la plaquette « la chlordécone et les végétaux »).	92

ARTICLE 1

Figure 1. Linear regression between ^{12}C - and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone in the Andosol. Evolution of the amount of ^{12}C -chlordecone quantified in the soil extract as a function of the ^{13}C -chlordecone spiked into the Andosol prior to extraction	110
Figure 2. Linear regression between the amount of chlordecone spiked into the Andosol and the quantification of the corresponding ion m/z by GC-ECD-MS. Evolution of the peak surface	

of m/z 272 or 277 ions quantified by GC-ECD-MS in the soil extract as a function of the $^{13}\text{C}_{10}$ - or ^{12}C -chlordecone spiked into the Andosol, respectively 110

ARTICLE 2

Figure 1. Rarefaction curve of the observed diversity of the fungal morphotypes as a function of the number of fungal strains isolated from enrichment cultures obtained from the Andosol perfused for 1 year with chlordecone–MS medium in a soil–charcoal device. The rarefaction curve was obtained by applying the freeware program aRarefactWin. Error bars represent 95 % confidence intervals calculated from the variance of the number of fungal morphotypes 123

Figure 2. Phylogenetic neighbor-joining tree of the ITS sequences of the fungal strains isolated from enrichment cultures obtained from the Andosol perfused for 1 year in a soil–charcoal device. 124

Figure 3. a Growth curves of *F. oxysporum* MIAE01197 recorded from cultures on chlordecone–MS medium (solid lines). As a control, the growth of *F. oxysporum* MIAE01197 inoculated MS medium was monitored (dashed lines). b Growth curves of *F. oxysporum* MIAE00047 grown on MS medium (solid lines). As a control, the growth of *F. oxysporum* MIAE00047 inoculated MS medium was monitored (dashed lines). 125

Figure 4. Tolerance to chlordecone of *F. oxysporum* MIAE01197 isolated from a chlordecone-contaminated Andosol as compared to that of the reference strain *F. oxysporum* MIAE00047 not previously exposed to the insecticide. The growth of the two isolates on glucose–MS medium added with 0.1, 1, and 10 mg l^{-1} of chlordecone or not (control) was monitored over 7 days incubation at 25 °C in the Bioscreen C Microbiological Growth Analyser. For each condition tested, five replicates were performed (ntot=40). Growth rates (micrometer) were estimated by fitting growth curves with the Gompertz model. Tolerance to chlordecone was estimated by calculating the $\mu\text{m}[\text{CLD}]/\mu\text{m}[\text{control}]$ ratio. Gray bars represent $\mu\text{m}[\text{CLD}]/\mu\text{m}[\text{control}]$ values obtained for *F.oxysporum* MIAE01197 and white bars those obtained for the *F.oxysporum* MIAE00047 reference strain. Values are the means and standard errors of five replicates. Values labeled with the same letter are not significantly different according to the Student's t test at $P<0.005$, $n=5$ 125

Figure 5. Kinetics of $^{14}\text{CO}_2$ evolution from $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone over a 3-week incubation period in cultures of *F. oxysporum* MIAE01197 grown on chlordecone–MS medium (triangle, dashed lines) or on glucose–chlordecone–MS medium (cross, solid lines). 126

Figure 6. Search for $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone metabolites in *F. oxysporum* MIAE01197 cultures conducted on glucose–chlordecone–MS medium (lanes 1 and 2) or on chlordecone–MS medium (lanes 3 to 5) using thin layer chromatography. 126

ARTICLE 3

Figure 1. Impact of CLD on growth rates of *Aspergillus* strains isolated from a CLD contaminated andosol as compared of *Aspergillus* reference strains not previously exposed to the insecticide. 143

Figure 2. Search for $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD metabolites in *Aspergillus terreus* MIAE01220, *Aspergillus flavus* MIAE01259 and *Aspergillus nomius* MIAE01233 cultures conducted on glucose-CLD-MS medium using thin layer chromatography. Non-inoculated glucose-CLD-MS was used as control

(lanes a). $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD and ^{14}C -metabolites extracted from the cultures were separated in a glass-silica gel layer. Radioactive compounds were detected by autoradiography.....	144
Figure 3. Chlordecone sorption kinetics by dead mycelia and charcoal.....	145
Figure 4. Sorption isotherms of chlordecone on dead mycelia and charcoal.....	146

ARTICLE 4

Figure 1. Evolution of ^{14}C -chlordecone mass balance in the sandy loam and silty loam soils. Quantified ^{14}C -residues (mineralized, soluble, extractable and non-extractable fractions presented in panels A, B, C and D respectively) were expressed as a percentage of the overall ^{14}C -residues retrieved in microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) spiked with two different concentrations of chlordecone (D1, the agronomic dose and D10, ten times the agronomic dose) and analyzed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Data were subjected to ANOVA test (Tukey's test, $p < 0.05$). Significant dose effect is designated by different letters..... 182

Figure 2. Estimation of the impact of chlordecone on the abundance of the total bacterial community determined by qPCR. 16S rRNA copy number was quantified from DNA extracted from the soil microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) spiked at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose) and analyzed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Each value is the mean of three replicates \pm standard error. Data were subjected to ANOVA test (Tukey's test, $p < 0.01$)..... 183

Figure 3. Estimation of the impact of chlordecone on the relative abundance of selected bacterial taxa determined by qPCR carried out on DNA extracted from soil microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) spiked at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose) and analyzed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). The relative abundance of each selected group was calculated as the ratio of the abundance of a specific taxa over the sum of the abundances of all quantified taxa. Each value is the mean of three replicates \pm standard error. Data were subjected to ANOVA analysis (Tukey's test, $p < 0.01$). * indicates significant dose effect on the abundance of the microbial group..... 184

Figure 4. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of the A-RISA profiles revealing the evolution of the bacterial genetic structure in the microcosms of sandy loam (panel A) and silty loam (panel B) soils spiked at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose). A-RISA analyses were performed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Data were subjected to ANOSIM statistical test (ANOSIM, $p < 0.05$). 185

Figure 5. Impact of chlordecone on the parameters of mineralization kinetics of ^{14}C -sodium acetate and ^{14}C -2,4-D by soil microorganisms. Percentages of mineralization reached at 50 days (A50) are presented on panel A-1 for sodium acetate and A2 for 2,4-D; number of days required to reach 20% mineralization (t20) is presented on panel B-1 for sodium acetate and B-2 for 2,4-D. Microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) were spiked with chlordecone at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose) and collected after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and

T32). Data were subjected to ANOVA statistical analysis (Tukey's test, $p < 0.05$). Significant dose effect is indicated by different letters..... 186

LISTE DES TABLEAUX

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Solubilité du Képone® en fonction du pH de la solution (Dawson <i>et al.</i> 1979)	9
Tableau 2. Producteurs, localisation des usines de production, période de production et quantité de Képone® produites (adapté d'Epstein 1978).....	14
Tableau 3. Normes de potabilité de l'eau de consommation vis-à-vis des pesticides (tiré de Rateau 2013).	46
Tableau 4. Niveau de contamination en CLD des eaux superficielles et souterraines, des sédiments en Guadeloupe et Martinique.	48

ARTICLE 1

Tableau 5. Table 1 - Soil physicochemical properties.....	109
Tableau 6. Table 2 - Estimation of chlordecone and metabolites β -monohydrochlordecone and dihydrochlordecone in different soil types	111

ARTICLE 2

Tableau 7. Table 1 - Description of the 103 fungal strains isolated from the Andosol heavily contaminated with chlordecone. The isolates were distributed into 18 morphotypes. Species identification based on ITS analysis is shown. The numbers of isolates for each morphotype observed and for each species are given	123
--	-----

ARTICLE 3

Tableau 8. Table 1 - Parameters of the Freundlich equation describing the sorption isotherms of chlordecone on dead mycelia and charcoal.....	147
--	-----

ARTICLE 4

Tableau 9. Table 1 - Soil physicochemical properties.....	187
Tableau 10. Table 2 - Description of taxa-specific primers used in the qPCR assays for each targeted taxonomic groups.	188

Introduction générale

Préambule : réflexions sur le genre attribué à l'insecticide 'chlordécone'

Le genre de cet insecticide n'est évidemment pas une préoccupation anglo-saxonne mais ne rédigeant pas entièrement le manuscrit de ma thèse dans la langue de Shakespeare, j'ai donc dû assumer les racines latines de ma langue maternelle et me préoccuper d'attribuer un genre pour le composé placé au cœur de mes travaux de thèse. Faut-il alors dire « le » ou « la » chlordécone ? Les deux genres ayant été utilisés dans la littérature scientifique française, chacun fait son choix. A l'origine, « chlordécone » était employé au masculin probablement parce qu'il s'agit d'un insecticide. Toutefois, on voit de plus en plus apparaître l'emploi du féminin, à partir du milieu des années 2000. Les chercheurs avaient proposé l'emploi du genre féminin en raison de la présence d'une fonction cétone et non pas en raison du fait qu'il représente une véritable peste pour la santé de l'environnement et de l'homme. Aujourd'hui, les deux genres sont utilisés dans les rapports officiels. Avec le temps qui passe, l'usage scientifique du genre féminin semble s'imposer : au congrès du Groupe Français des Pesticides 2014 (Schœlcher, Martinique), tous les chercheurs venus discuter 'chlordécone' utilisaient le genre féminin. J'étais alors la seule à employer le masculin... Je maintiendrai ma position, en attribuant le genre masculin au chlordécone, dans un souci de respect de l'usage commun originel et non de l'appropriation scientifique, en raison du désir de ne pas oublier les origines et l'histoire¹ de cette molécule peu banale, et dans un souci de cohérence avec ses semblables, le kélévan et le Mirex®, n'ayant, eux, jamais été victimes de 'crise du genre'.

Introduction générale

Minamata, Sandoz, Hudson River, AZF, Seveso, Tchernobyl, Bhopal, Hopewell... autant de noms ancrés dans la mémoire collective comme de sinistres catastrophes industrielles ayant des conséquences sanitaires et écologiques. Au-delà de ces événements extrêmes, qui ne constituent probablement que la partie émergée de l'iceberg, les scientifiques de par le monde constatent rapports après rapports la détérioration de l'environnement qui est contaminé de manière chronique avec de nombreuses molécules tels que les PCBs, les engrais azotés et phosphatés, les dioxines, les radioéléments, les pesticides, résultant de l'activité humaine. Cette contamination est quasi généralisée à la surface du globe et des écosystèmes supposés préservés de toutes activités humaines (glace polaire, lac alpin,...) se trouvent contaminés par ces polluants en raison de leur

¹ Le chlordécone en 1972 lors de son introduction aux Antilles, le chlordécone en 1981 lors de la commercialisation de la 2^e formulation commerciale, le chlordécone en 2002 lorsque Libération titre 'en Martinique, patates douces et toxiques durs' révélant au grand public le scandale sanitaire, le chlordécone en 2007 dans le rapport controversé du professeur Dominique Belpomme, le chlordécone en 2010 et 2011 dans les travaux de Pierre-Benoit Joly et Matthieu Fintz révélant le scandale politique... bref, le chlordécone.

transfert à longue distance par la voie atmosphérique et leur redéposition par les précipitations. Le Professeur Paul Crutzen, Prix Nobel de Chimie en 1995, a même proposé que depuis la révolution industrielle, notre planète serait entrée dans une nouvelle ère géologique, l'anthropocène, se caractérisant par l'influence prédominante de l'homme sur le système terrestre. Elle se manifeste notamment par la dispersion à l'échelle de la planète de différents types de polluants dans tous les compartiments de l'environnement (eau, sol et air) sans exception. Moins médiatique que l'émission de gaz à effet de serre entraînant le changement climatique, la pollution du globe terrestre n'en demeure pas moins une des composantes principales du changement global qui représente une menace pour la santé de l'environnement mais également pour la santé des organismes qui le peuplent. L'agriculture conventionnelle, ayant recours de manière quasi généralisée à l'application de produits de protection des plantes d'origine chimique, reste encore largement utilisée pour nourrir l'humanité. Toutefois elle est un large contributeur à la contamination de l'environnement et le cas de la contamination quasi-systémique des Antilles par le chlordécone en est l'illustration.

Ainsi cet insecticide, le chlordécone (CLD), aussi connu sous le nom Képone® et Curlone®, est placé au cœur de mes travaux de thèse. Cet insecticide organochloré a été utilisé dans la lutte contre l'ennemi n°1 du bananier, le charançon *Cosmopolites sordidus*. Voilà alors trois acteurs identifiés : le bananier, le charançon, le CLD, non sans rappeler le bon, la brute et le truand.

Le bananier, connu comme étant « la plus grande herbe du monde », est une plante herbacée monocotylédone de grande taille appartenant au genre *Musa*, originaire d'Asie du Sud-Est, dont il existe plus d'un millier de variétés. Les migrations humaines et les échanges de matériel végétal ont introduit le bananier dans l'ensemble des régions tropicales. Il est aujourd'hui cultivé dans plus de 120 pays sur les 5 continents. Après le riz, le blé et le maïs, la banane est l'une des plus importantes cultures vivrières du monde et se place en 4^{ème} position de la production agricole mondiale. En effet, les « bananes à cuire » (43% de la production mondiale) communément appréciées dans les régions productrices, parmi lesquelles la banane plantain, sont consommées cuites comme un légume et occupent une place prépondérante dans les habitudes alimentaires de base des populations locales. Les « bananes dessert » (57% de la production mondiale) sont quant à elles appréciées des consommateurs occidentaux et sont donc essentiellement destinées à l'exportation et font l'objet d'un important commerce international. Malgré la grande diversité génétique rencontrée au sein du genre *Musa*, le marché d'exportation repose quasi exclusivement (environ 97%) sur le seul cultivar Cavendish (Lassois *et al.* 2009). Aux Antilles françaises, la banane est cultivée de longue date, mais le développement de la production à un stade industriel date des années 1920. Elle devient la première richesse agricole après la crise de la canne à sucre dans les années 60 (CIRAD 2012). Sur les terres antillaises, la banane se substitue à la production de canne à sucre mais s'inscrit dans une même logique économique : une monoculture de rente, contrôlée par

de grands planteurs et orientée vers le marché métropolitain (Joly 2010). Aujourd'hui, la production de la banane représente 42% et 27% de la production agricole totale de la Martinique et de la Guadeloupe, respectivement. Le système de production basé sur la monoculture et le poids économique de la banane sont deux données de base qui conditionnent une utilisation intensive de pesticides (Joly 2010). En effet, la monoculture intensive se caractérise par la plantation d'une seule variété végétale sur de grands espaces traités avec des herbicides pour contrôler la prolifération de plantes adventices pouvant entrer en concurrence avec la plante d'intérêt dont le rendement doit être maximisé pour satisfaire le marché. Le déploiement d'un cultivar unique s'accompagne d'une diminution de la biodiversité des agrosystèmes se manifestant par une simplification de la faune et de la flore pré-existante, libérant ainsi des habitats propices aux bioagresseurs² en l'absence d'organismes auxiliaires tels des plantes répulsives et autres prédateurs. Dans la bananeraie, le bananier constituant le seul organisme végétal, il est la cible de nombreux insectes, nématodes et champignons. Parmi les ravageurs ayant un impact économique majeur, nous pouvons citer les organismes phytopathogènes causant les cercosporioses et les fusarioses, les bioagresseurs tels que les nématodes et les charançons, qui « nécessitent » l'usage de fongicides, nématicides et insecticides, respectivement pour les éradiquer.

Le charançon, *Cosmopolites sordidus*, est considéré comme l'ennemi n°1 du bananier. C'est un coléoptère originaire d'Asie du sud-est tout comme son mets préféré, le bananier. Aujourd'hui son aire de répartition peut aisément se calquer sur la distribution mondiale des bananiers (Abera-Kalibata *et al.* 2006). Adulte, il est noir, mesure 10 à 15 mm de long, et vit au niveau du sol dans les débris de végétaux, les plants morts ou fraîchement coupés dont il se nourrit (**figure 1**).

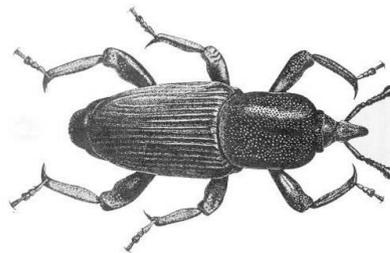


Figure 1. Vue dorsale d'un charançon noir adulte du bananier, *Cosmopolites sordidus*³.

Les femelles pondent leurs œufs, blancs et ovales, au niveau du collet du bananier (entre le bulbe et le pseudo-tronc), à la fréquence mensuelle de 5 à 8 œufs par femelle. Les larves se développent au sein du bulbe du bananier tout en creusant des galeries pour se nourrir, et ce, sur une période de deux mois. Ces galeries affaiblissent le pied de bananier par altération du système vasculaire. La structure du bananier ainsi fragilisée augmente le risque de chute du pied et le sensibilise vis-à-vis du

² Le terme 'ravageur' est alors employé.

³ Figure tirée de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/borers/banana_root_borer.htm (Université de Floride)

vent. La nymphose s'effectue généralement en périphérie du bulbe, et le jeune adulte en sortira alors pour vivre sur le sol non loin des bananiers (INRA 1999). Dans des conditions d'attaques sévères, les pertes peuvent atteindre la totalité de la bananeraie (Abera-Kalibata *et al.* 2006).

Le CLD fût alors présenté, dans les années 60, comme une solution efficace pour éradiquer les charançons et ainsi pallier l'infestation des bananeraies. A l'usine de production de la société Allied Chemical basée à Hopewell en Virginie, le CLD fut responsable d'une pollution aiguë de l'environnement (James River et Chesapeake Bay) et des travailleurs à l'origine de la fermeture de l'usine en 1975. Allied Chemical ne contesta pas 940 des 1097 chefs d'accusation de violation des lois fédérales anti-pollution, et fut reconnue coupable des rejets de déchets de CLD dans la James River (Wilson 2011). Sur les 13 millions de dollars d'amende, 8 millions ont permis la création de la fondation Virginia Environment (Virginia Environment Endowment) (Wilson 2011). La communauté scientifique américaine fut alors mobilisée, produisant alors entre 1976 et le milieu des années 80 une bibliographie massive sur le CLD essentiellement axée sur les questions toxicologique et épidémiologique. Le traumatisme d'une telle contamination fit aussi couler l'encre des médias américains (Time, Richmond Magazine, etc.) et inspira même un groupe punk (Kepone Factory des Dead Kennedys).

Le CLD est également responsable d'une contamination chronique avérée de la population des Antilles françaises, suite à l'utilisation de cet insecticide dans les bananeraies entre 1972 et 1993. Aujourd'hui, la situation est catastrophique : 20 000 hectares de terres pollués au CLD ce qui représente 25% de la surface agricole utile (SAU), fermeture de sources et forages destinés à l'alimentation en eau potable et réglementation voire interdiction totale de pêche ayant pour cause un dépassement des normes de potabilité et des limites maximales de résidus (LMR) relatives aux denrées alimentaires, et enfin imprégnation de la population antillaise (détection de CLD dans le sang), et ce, 20 ans après l'interdiction d'utilisation du CLD. Bien que la contamination des eaux ait été mise en évidence pour la première fois en Martinique en 1999 à la suite d'une grande campagne de mesures financée par la 'Direction de la Santé et du Développement Social' (DSDS) de Martinique et en partenariat avec le 'Laboratoire d'analyses de la Drôme' (LDA 26), c'est en août 2002 seulement que la problématique CLD aura un retentissement national (article de Libération titré « En Martinique, patates douces et toxiques durs » signé Pons 2002) : une tonne et demie de patates douces en provenance de Martinique et arrivant sur le port de Dunkerque ont été incinérées pour cause de contamination au CLD. Après quoi, une phase prospective consistant à dresser l'état de la situation aux Antilles⁴ a généré le déblocage de financements dans le cadre du Plan National d'Action

⁴ Arrêtés préfectoraux n°030725 du 20 mars 2003 pour la Martinique et n°1496-2003 du 20 octobre 2003 pour la Guadeloupe instituant des analyses préventives de sols pour la recherche d'organochlorés avant mise en culture ; Rapport d'information n°2430 déposé en 2005 à l'Assemblée Nationale et rapporté par Joël Beaugendre ; Les conclusions du groupe

CLD (PNAC)⁵ permettant enfin à la communauté scientifique française de se pencher sur la question. L'étude bibliométrique du CLD⁶ est d'ailleurs assez évocatrice : sur 656 publications référencées, 507 ont été produites aux Etats-Unis sur une période s'étalant de 1975 à 2012, avec un boom à la fin des années 70 et début des années 80, en réponse à la catastrophe de Hopewell ; côté français, mis à part deux rapports bien connus dans le monde du CLD, le rapport Snegaroff (1977), et le rapport Kermarrec (1980) tirant alors la sonnette d'alarme concernant la situation antillaise, seules 37 publications scientifiques⁷ ont pu voir le jour entre 2006 et aujourd'hui.

Le cas antillais, qualifié de très grave par le ministère de l'Agriculture (Torny 2010) voire de désastre sanitaire pire que le sang contaminé (Belpomme 2007), soulève la question des effets délétères qui suivraient une exposition à faibles doses mais sur une très longue période. Une plainte contre X a été déposée en 2006 avec comme chefs d'accusation « *mise en danger de la vie d'autrui et administration de substances nuisibles* » par des associations de consommateurs et producteurs guadeloupéens et martiniquais et la confédération paysanne (Piro 2014) marquant l'implication de la population. Face à un scandale environnemental, sanitaire, social, économique et politique, la population antillaise est désireuse de réponses et de solutions. C'est là qu'intervient la communauté scientifique et la mise en place de PNAC. Le PNAC I (2008-2010) visait à identifier les actions à renforcer ou à mettre en œuvre, et à améliorer la coordination de l'ensemble des acteurs et la communication sur les actions menées. S'inscrivant dans la continuité du précédent et sur une mobilisation et une implication importante des acteurs locaux, le PNAC II (2011-2013) s'organise autour de quatre objectifs : (i) approfondir l'état des connaissances des milieux, rechercher et expérimenter des techniques de remédiation de la pollution, (ii) consolider le dispositif de surveillance de l'état de santé de la population, et approfondir les connaissances des effets sur la santé, (iii) poursuivre la réduction de l'exposition des populations, en assurant la qualité de la production alimentaire locale et soutenant les professionnels impactés et, (iv) gérer les milieux contaminés et assurer une bonne information de la population. Dans le cadre du PNAC II, Demichlord, l'appel à projet de recherches de l'INRA, a financé trois projets, AbaChlord, ChlorDeg, Biodechlord visant à rechercher des traces de biotransformation du CLD. Ma thèse, co-financée par l'ADEME et le Conseil Régional de Bourgogne, a été réalisée dans le cadre du projet Biodechlord ayant pour objectif la recherche de la signature biologique de la dégradation du CLD dans le sol des Antilles.

d'études et de prospective CIRAD-INRA à partir du document « Pollutions par les organochlorés aux Antilles, aspects agronomiques », 2006, Cabidoche Y.M., Jannoyer M. et Vannièr H. ; Documents informels relatant l'état d'avancement des études scientifiques menées par l'INSERM de Guadeloupe ; Rapport d'expertise et d'audit externe concernant la pollution par les pesticides en Martinique coordonné par le professeur Belpomme, 2007.

⁵ PNAC I 2008-2010 ; PNAC II 2011-2013.

⁶ Moteur de Recherche : Web of science ; Termes recherchés : chlordecone, kepone, curlone

⁷ Les rapports ne sont pas inclus dans cette recherche. Seuls les articles publiés dans les revues scientifiques le sont.

Voici donc présenté en **introduction bibliographique**, l'histoire du CLD :

- Sa « carte d'identité » (*chapitre 1*),
- Son utilisation et sa production (*chapitre 2*),
- Le parcours troublant de son « autorisation » (*chapitre 3*),
- Son écodynamique *i.e.* sa persistance, son transfert, sa capacité à se bioaccumuler et sa toxicité (*chapitre 4*),
- Ses possibles voies de dégradation et de remédiation (*chapitre 5*),
- Et enfin, les alternatives de lutte contre le charançon (*chapitre 6*).

Bien que des références à la catastrophe d'Hopewell soient inévitables, cette étude bibliographique se concentre sur la problématique CLD aux Antilles françaises respectant ainsi le cadre d'étude du projet.

Dans la **partie expérimentale** de ce manuscrit, les résultats des diverses expériences réalisées au cours de ma thèse sont présentés **sous forme d'articles scientifiques publiés, soumis ou en cours de préparation**. Pour faciliter la lecture du manuscrit, la démarche scientifique associée à ces travaux est indiquée pour introduire chaque article, et les principaux résultats obtenus sont résumés en guise de conclusion.

- Un premier chapitre traite de la question de la mise au point d'une méthodologie de détection et de quantification du CLD et est constitué d'un article scientifique publié dans la revue *Environmental Science and Pollution Research*.
- Un deuxième chapitre traite de la recherche de microorganismes capables de dégrader le CLD. Il est constitué d'un article scientifique publié dans la revue *Environmental Science and Pollution Research* et d'un autre article en cours de préparation.
- Un troisième chapitre traite de l'évaluation de l'impact de l'application du CLD sur communautés microbiennes de sols n'ayant jamais été exposés au CLD. Il est constitué d'un article scientifique soumis pour publication.

PARTIE 1

Introduction bibliographique

Le chlordécone (CLD) aux Antilles françaises

Chapitre 1

Caractéristiques du chlordécone

Chapitre 1- Caractéristiques du chlordécone

1-1- Généralités

Le chlordécone (1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta [cd]pentalen-2-one dans la nomenclature CAS ; decachloropentacyclo[5.3.0.0^{2.6}.0^{3.9}.0^{4.8}]decan-5-one dans la nomenclature IUPAC) est un insecticide organochloré⁸ (UNEP 2006). De formule chimique brute C₁₀Cl₁₀O, ce composé organique de synthèse se présente sous forme de poudre blanche sans odeur (Epstein 1978). N'étant pas connu pour être produit par un être vivant, le CLD est un xénobiotique (IARC 1979). Le CLD est un insecticide efficace contre les insectes défoliateurs⁹, et peut servir par ailleurs de larvicide contre la mouche. Le CLD a été employé comme insecticide contre le doryphore de la pomme de terre, le charançon du bananier, les acariens de la rouille sur les plantes du genre Citrus non productives, le ver fil de fer¹⁰ de la pomme de terre et du tabac (WHO 1984; Cabidoche *et al.* 2006b). Bien qu'il s'agisse d'un insecticide, d'autres usages ont été rapportés pour ce composé et notamment, le CLD a été employé comme fongicide contre la tavelure et l'oïdium du pommier.

1-2- Une structure « originale »...

Le CLD appartient à la famille des bishomocubanes, caractérisée par une structure en cage (**figure 2**). Le cubane est un des hydrocarbures platoniciens, c'est-à-dire que la structure moléculaire reproduit un solide de Platon (cinq polyèdres réguliers : le tétraèdre, l'hexaèdre ou cube, l'octaèdre, le dodécaèdre et l'icosaèdre¹¹). Bien que la synthèse d'une telle molécule ait longtemps été considérée comme impossible compte-tenu des liaisons carbone-carbone avec des angles inhabituels de 90°, le cubane a été synthétisé pour la première fois en 1964 par Philip Eaton (Eaton et Cole 1964).

⁸ **Organochloré** : composé organique de synthèse comportant au moins un atome de chlore. La chimie des organochlorés a différents débouchés : synthèse de polyvinyle de chlorure (PVC), de solvants organiques chlorés (chlorométhane, dichlorométhane, chloroforme...), d'isolants chimiques (PCBs) et de pesticides dont des insecticides.

⁹ **Défoliateur** : qui provoque la perte de tout ou partie des feuilles d'une plante.

¹⁰ **Ver fil de fer** : larve du taupin

¹¹ Seuls le tétraèdre, le cube et le dodécaèdre ont été synthétisés (Griffin et Marchand, 1989)

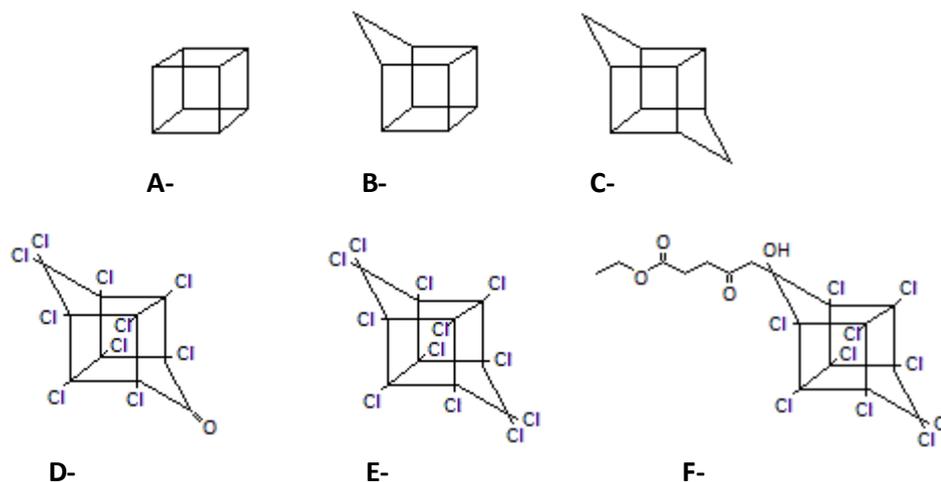


Figure 2. Représentation graphique de molécules synthétiques de la famille des cubanes.

A- Le cubane (un des hydrocarbures platonicien ; alcane synthétique de formule brute C_8H_8 : les huit atomes de carbone sont disposés aux sommets d'un cube). **B-** L'homocubane (dérivé de cubane de formule brute C_9H_{10}). **C-** Le bishomocubane (dérivé de cubane de formule brute $C_{10}H_{12}$). **D-** Le chlordécone (CLD), bishomocubane chloré de formule chimique $C_{10}Cl_{10}O$. **E-** Le Mirex[®] (perchlordécone de formule $C_{10}Cl_{12}$), insecticide organochloré utilisé notamment contre les fourmis de feu (*Solenopsis invicta*). **F-** Le kélévan ($C_{17}H_{12}Cl_{10}O_4$), insecticide organochloré utilisé en Europe contre le doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata*), dont le CLD est un métabolite de dégradation.

Le cubane et ses dérivés se caractérisent par les propriétés suivantes : (i) des liaisons carbone-carbone de 90° ; (ii) la plus forte densité de tous les hydrocarbures ($1,29 \text{ g.cm}^{-3}$ pour un cubane simple, $1,40 \text{ g.cm}^{-3}$ pour le CLD, et jusqu'à 2 g.cm^{-3} pour l'octanitrocubane, contre $1,21 \text{ g.cm}^{-3}$ en moyenne pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques) ce qui contribue à sa capacité à stocker de grande quantité d'énergie ; (iii) la plus haute énergie de déformation (pour le cubane simple : $166 \text{ kcal.mol}^{-1}$) de tous les composés organiques lui conférant une haute stabilité cinétique ; (iv) une grande stabilité thermique (décomposition lente au-delà de 200°C) (sites web¹² ; Engelke et Stine 1990).

Un regain d'intérêt sur la chimie des cubanes et de leurs dérivés a été déclenché par diverses applications potentielles : en armement (heptanitrocubane et octanitrocubane¹³, explosifs plus puissants que le TNT, la nitroglycérine et même le HMX), en médecine (dipivaloylcubane présentant

¹² A mon grand regret, je n'ai pas pu me procurer les publications scientifiques relatives à la chimie des cubanes pourtant existantes (Bashir-Hashemi 2009 'Chemistry of cubane and other prismanes' ; Dilling 1993 'Bishomocubane chemistry' ; Marchand 1989 'Synthesis and chemistry of homocubane, bishomocubanes and trihomocubanes' et Eaton 2003 'Cubanes: Starting Materials for the Chemistry of the 1990s and the New Century'). Ainsi, les pages web visitées sont celles du département de chimie de l'Imperial College London (<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/wang/index.html> ; http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/b_muir/Cubane/Cubanepro/Applications.html), du créateur du cubane Philip Eaton de l'Université de Chicago (<https://chemistry.uchicago.edu/faculty/faculty/person/member/philip-e-eaton.html>), et d'Anthony Melvin Crasto (PhD) (<http://fr.slideshare.net/anthonycrasto64/the-magic-of-cubane>).

¹³ Heptanitrocubane et octanitrocubane synthétisés par l'équipe d'Eaton en 1999 (Zhang *et al.* 2000)

des propriétés anti-VIH) (Weatherford 1997), en nanotechnologie (synthèse de polymères de cubanes), et bien sûr, en industrie agrochimique (synthèse de trois insecticides : CLD, Mirex® et kélévan).

1-3- Des propriétés physico-chimiques dignes d'un organochloré...

Le CLD présente des caractéristiques physico-chimiques qui expliquent pour partie les problèmes de santé environnementale et humaine qu'il cause. Cette substance de haut poids moléculaire (490,68 g.mol⁻¹) présente 10 substitutions par des atomes de chlore, responsables de sa stabilité chimique élevée. Compte-tenu de sa haute chloration périphérique, le CLD est très peu soluble dans l'eau (de 1 à 3 mg.L⁻¹ à pH 7¹⁴). Sa solubilité dépend du pH : à des pH basiques sa solubilité est augmentée (**tableau 1**).

Tableau 1. Solubilité du Képone® en fonction du pH de la solution (Dawson *et al.* 1979)

pH	Képone® (mg.L⁻¹)
4	1,75
7	2,22
8	2,37
8,5	2,44
9	3,96
9,4	4,79
9,6	24,8
9,8	46,8
10	68,8
10,9	176

Par ailleurs, la solubilité est très dépendante du degré d'hydratation du CLD. Il est susceptible d'évoluer vers une forme plus soluble en fonction des conditions du milieu. D'après Epstein (1978), il forme facilement des hydrates (mono- à tri-hydrate) à température ambiante. Une étude plus récente menée en ¹³C-NMR (Spectroscopie RMN) a montré qu'une forme commerciale du CLD, le Képone® (Supelco, Inc.) était essentiellement constituée de CLD-hydrate (Wang *et al.* 2001). Ces auteurs suggèrent que le Képone® n'existe que sous la forme hydrate mais que la plupart des scientifiques l'ignorent parce que la chromatographie gazeuse couramment utilisée pour détecter le CLD dans différents matrices conduit à la transformation de la forme hydrate à la forme carbonyl du

¹⁴ 2,7 mg.L⁻¹ selon Cabidoche *et al.* (2006b) ; 3 mg.L⁻¹ selon Bonvallot et Dor (2004) ; 2 mg.L⁻¹ selon Epstein (1978) ; entre 1 et 3 mg.L⁻¹ selon ATSDR (1995).

Képone®. D'après Cabidoche *et al.* (2006b), dans le sol le CLD comme les autres cétones, subit une réaction d'hydratation à l'issue de laquelle se forme un "gem-diol"¹⁵ appelé CLD-hydrate (**figure 3**).

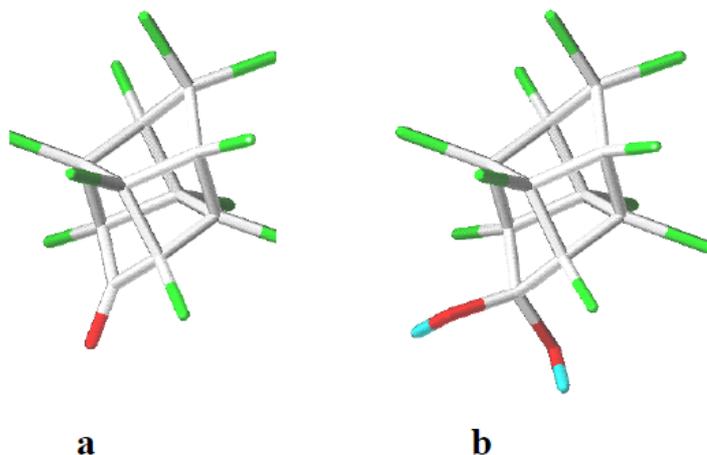


Figure 3. (a) Structure 3D du chlordécone, (b) structure 3D de gem-diol de l'hydrate de chlordécone (d'après Wang *et al.* 2001). Les atomes de carbone, de chlore, d'oxygène et d'hydrogène sont représentés en blanc, vert, rouge et bleu respectivement.

En revanche, cette molécule est soluble dans des solvants apolaires type benzène et hexane (Epstein 1978; Cabidoche *et al.* 2006b). Le CLD est caractérisé par un coefficient de partage octanol/eau élevé (Log K_{ow} compris entre 4,5 et 5¹⁶) le classant comme un composé hydrophobe lui donnant un caractère lipophile (Bonvallot et Dor 2004; Scheringer *et al.* 2006; Cabidoche *et al.* 2009; Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012). De ce fait, le CLD présente une affinité pour les membranes biologiques, les pénétrant facilement et s'accumulant dans les tissus riches en graisses des organismes vivants (tissu adipeux, foie, système nerveux central). Comme l'indique le coefficient de concentration (BCF) de 1,7 estimé par 'PBT profiler', le CLD est susceptible de se bioaccumuler dans différents organismes vivants et par conséquent de contaminer la chaîne alimentaire (Bonvallot et Dor 2004).

Le CLD présente un fort coefficient de sorption au carbone organique, K_{oc} ¹⁷, variant entre 1 218 et 24 000 L.kg⁻¹ (*i.e.* 1 218 à 2 547 L.kg⁻¹ selon Fernandez-Bayo *et al.* (2013b); 2000 L.kg⁻¹ selon Bonvallot et Dor (2004); 2 400 L.kg⁻¹ selon Kenaga (1980); 2 400 à 2 600 L.kg⁻¹ selon Howard *et al.* (1981); 17 500 L.kg⁻¹ selon RAIS (2006); 2 000 à 24 000 L.kg⁻¹ selon Cabidoche *et al.* (2009); soit 3,086

¹⁵ **Diol** : qui porte deux groupes hydroxyles (-OH) ; **Gem-diol** : les deux groupes hydroxyles sont portés par le même atome de carbone.

¹⁶ Le K_{ow} correspond au rapport à l'équilibre entre la concentration de la substance considérée dans la phase octanol et la concentration de la substance dans la phase eau. Ainsi, un $\log K_{ow}$ inférieur à 1 indique que la molécule présente un caractère hydrophile / lipophobe ; un $\log K_{ow}$ supérieur à 1 indique un caractère hydrophobe / lipophile. A titre comparatif, le $\log K_{ow}$ du saccharose est de -3,67, de l'atrazine 2,75 (wikipédia), de la dieldrine 5,20 et du Mirex® 7,18 (Cabidoche, 2006b).

¹⁷ Le K_{oc} correspond au rapport à l'équilibre entre la concentration de la substance considérée adsorbée par le carbone organique du sol et la concentration de cette même substance en solution aqueuse. Plus le K_{oc} est grand, plus la substance est liée aux particules du sol, et moins elle a tendance à se trouver en solution.

< Log K_{oc} < 4,380). Cela signifie, qu'à l'équilibre, il y aura entre 1 218 et 24 000 fois plus de CLD adsorbé à un kg de matière organique du sol que contenu dans un litre de solution du sol. Par conséquent, le CLD s'adsorbe très fortement dans les sols riches en matières organiques (Bonvallet et Dor 2004). Les études menées par Cabidoche *et al.* (2009) sur des sols des Antilles (très riche en matières organiques) mettent en évidence des valeurs très élevées allant de 2 000 à 4 000 L.kg⁻¹ pour les nitisols et de 12 000 à 24 000 L.kg⁻¹ pour les andosols. Dans les sols, et en particulier ceux des Antilles, le CLD s'adsorbe sur les matières organiques formant des résidus liés qui persistent dans le milieu (Bonvallet et Dor 2004).

D'autre part, le CLD présente une faible volatilité (pression de vapeur¹⁸ : $2,5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg à $3 \cdot 10^{-5}$ mm Hg, soit 0,003 à 0,004 Pa), à la différence d'autres composés organiques lipophiles tels que les HAPs (Mackay *et al.* 1997; Cabidoche *et al.* 2006b). Il est donc peu mobile vers l'atmosphère du moins sous la forme gazeuse. Il est thermiquement stable jusqu'à son point de sublimation (350°C) et ne subit pas d'oxydation rapide avant d'avoir atteint des températures de 450 à 500°C (Epstein 1978; Bonvallet et Dor 2004; Cabidoche *et al.* 2006b). A ces températures l'oxydation du CLD aboutit à la production d'hexachlorobenzène (fongicide interdit d'usage en Europe en 1981, et listé parmi les polluants organiques persistants (POPs) de la convention de Stockholm en 2001) (Dawson *et al.* 1979). Par conséquent, la destruction du CLD par incinération à des températures supérieures à 1000°C est alors préconisée, afin d'éviter la production de dioxines à des températures inférieures (Picot et Rabache 2005; Cabidoche *et al.* 2006b). Comme tous les organochlorés, le CLD se classe parmi les pesticides non-ionisables (Cabidoche *et al.* 2006b).

1-4- Action insecticide

L'action insecticide du CLD n'est pas décrite précisément. Toutefois, les nombreuses études conduites par des équipes de chercheurs américains suite à l'incident d'Hopewell en 1975 ont permis d'identifier quelques mécanismes qui pourraient expliquer pour partie la propriété insecticide du CLD. Ainsi, comme je l'ai évoqué précédemment, le CLD étant un composé hydrophobe, il présente une forte affinité pour la bicouche lipidique des membranes biologiques. Chez l'Homme après son ingestion par voie orale, le CLD est très facilement absorbé (75-90%) passant la barrière intestinale (EPA 2009). Toutefois, le CLD se fixe sur les protéines du plasma et les lipoprotéines et, sous ces formes, il est véhiculé vers le foie où une fraction du CLD est transformée en CLD-alcool. Le CLD s'accumule alors dans les graisses. La distribution du CLD chez les travailleurs d'Hopewell était 15:7:1 pour foie:graisses:sang (Cohn *et al.* 1978). Le CLD n'est *a priori* pas génotoxique selon les études à court terme menées avec des essais *in vivo* et *in vitro*. Par contre, il cause des lésions du foie et des

¹⁸ A titre comparatif, $P_{v\text{eau}}$ à 20°C = 2 337 Pa ; $P_{v\text{dichlorométhane}}$ à 20°C = 47,4 kPa

reins, des problèmes de reproduction et des troubles neurologiques. Les lésions du foie (hyperplasie) peuvent conduire à la formation de tumeurs cancéreuses selon un mécanisme qui reste inconnu. Les études menées sur le caractère neurotoxique du CLD chez l'Homme suggèrent qu'il résulte d'une altération du fonctionnement de protéines transmembranaires (ATPase-Mg²⁺ et ATPase-Ca²⁺) induisant la disruption de l'homéostasie du calcium et des dysfonctionnements énergétiques liés à la rupture du gradient de protons. Bien que le mode d'action du CLD ne soit pas complètement élucidé, l'interaction du CLD avec les protéines transmembranaires explique pour partie l'altération des fonctions cellulaires du système nerveux central (altération de l'activité neurotransmetteur en conséquence de la modification de l'homéostasie du calcium), du foie (altération du transport actif du glutamate et du stockage du glycogène) et du cerveau (augmentation de l'activité des pompes ATPases Na⁺, K⁺ et Ca²⁺). Au-delà de l'effet induit par le CLD sur les membranes biologiques par une interaction directe ou indirecte sur des transporteurs transmembranaires, il a été rapporté que le CLD était capable de se lier sur les récepteurs œstrogéniques, ainsi que sur d'autres récepteurs endocriniens, provoquant les effets d'un excès d'œstrogène et suggérant l'existence d'un mode d'action œstrogénique expliquant la toxicité du CLD pour la reproduction animale (Fujimori *et al.* 1982; Squibb et Tilson 1982; Linder *et al.* 1983; Desaiyah 1985; Herr *et al.* 1987; Swartz *et al.* 1988; Kodavanti *et al.* 1990; Kodavanti *et al.* 1993; Vaccari et Saba 1995).

Même si le mode d'action du CLD n'est pas précisément décrit, ces études montrent que la toxicité de cet insecticide résulte de son caractère hydrophobe lui conférant des propriétés lipophiles conduisant à une forte affinité pour les membranes biologiques. L'interaction du CLD avec les membranes biologiques conduit à une déstabilisation de l'homéostasie cellulaire ayant des conséquences énergétiques en particulier sur les mitochondries, causant des dysfonctionnements cellulaires. Les interactions du CLD avec des récepteurs hormonaux sont responsables d'un effet hormone-like conduisant à des problèmes de reproduction. Les mécanismes impliqués dans le mode d'action du CLD, identifiés principalement sur des organismes supérieurs animaux, étant très conservés au sein du monde vivant, il est fort probable qu'ils soient semblables pour les autres organismes vivants qui tous se caractérisent par la présence d'une membrane biologique lipidique.

Chapitre 2
Production et usage

Chapitre 2- Production et usage

2-1- Synthèse du CLD

Le CLD est fabriqué en trois étapes : (i) tout d'abord, une réaction entre l'hexachlorocyclopentadiène (HCP) et l'anhydride sulfurique chauffée et sous pression, et ce en présence de pentachlorure d'antimoine jouant le rôle de catalyseur ; (ii) le produit de réaction subit ensuite une hydrolyse en milieu basique suivie d'une neutralisation à l'acide, formant une suspension gélatineuse de CLD ; (iii) le CLD est alors récupéré par centrifugation ou filtration, pour être enfin séché à l'air chaud (Epstein 1978). Les divers produits obtenus à partir de HCP, appelés *cyclodiènes chlorés*, sont présentées en **figure 4**.

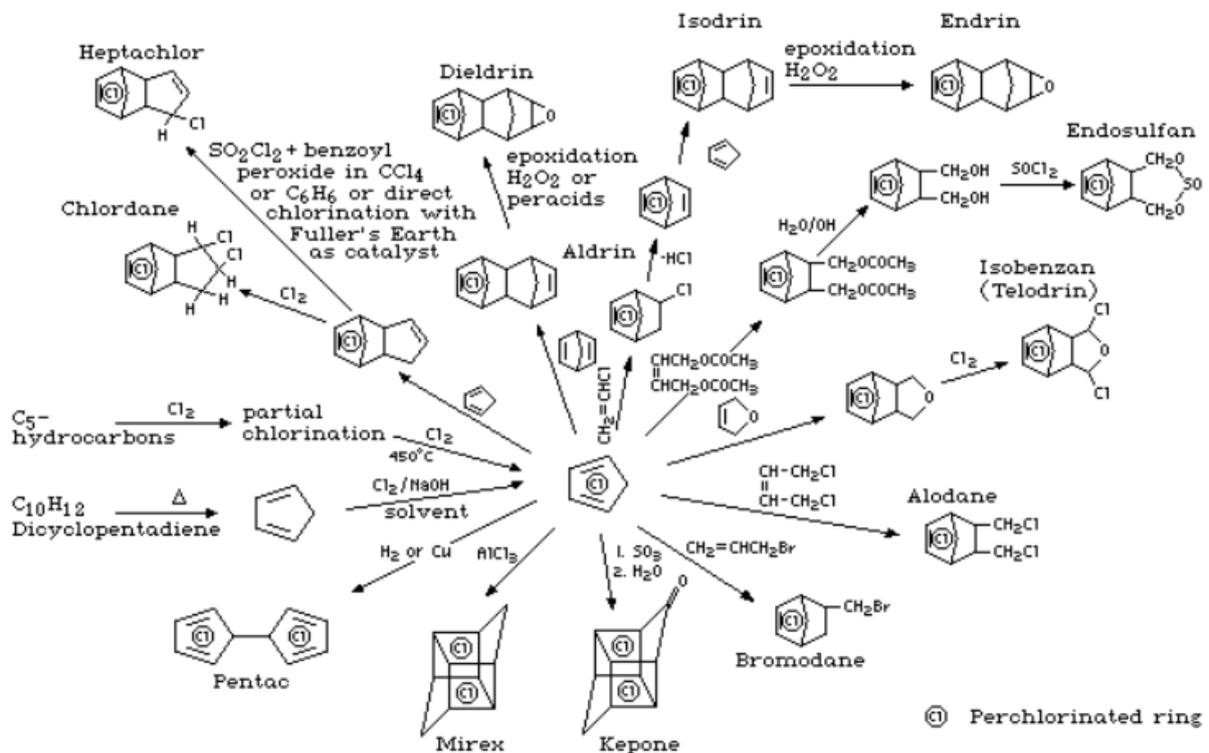


Figure 4. Synthèse de pesticides du type cyclodiènes chlorés à partir de HCP (EPA 1978).

2-2- Production

Deux vagues de production différenciées ont régi le commerce mondial du CLD. La première, menée par les Etats-Unis, a généré la marque déposée Képone® (1951-1975) ; et la deuxième, menée par la France, a généré la marque déposée Curlone® (1981-1990). Ces deux étapes sont décrites ci-après.

2-2-1- Képone® 1951-1975 : les Etats-Unis fournissent le monde

Le Képone® a été produit dès 1951 dans les usines d'Allied Chemical, et breveté en 1952 (caractérisé alors comme décachlorotétrahydro-4,7-méthanoindénéone) (Epstein 1978; Beaugendre 2005). La molécule de CLD a été distribuée aux Etats-Unis comme fongicide et insecticide à partir de 1958 par la société *Dupont de Nemours* sous la nomination commerciale déposée Képone®, ou sous le nom moins connu de GC-Compounds 1189® (Epstein 1978; ATSDR 1995; Beaugendre 2005). Allied Chemical, assurant la synthèse du CLD, a contracté avec la *Nease Chemical* à la fin des années 50 et au début des années 60 pour que celle-ci produise le Képone®, puis avec la *Hooker Chemical* à partir du milieu des années 60. Les chimistes de la Hooker déposent un autre brevet en 1962 (édité en 1963) en précisant que le Képone® était jusqu'ici « incorrectement connu » et la firme caractérise le Képone® comme décachlorotétrahydro-1,3,4-méthéno-2H-cyclobuta-(cd)-pentalène-2-one. Face à la demande accrue, Allied Chemical chargea en 1974 la *Life Science Products Company* (LSPC) de produire du Képone® dans son usine d'Hopewell en Virginie qui devint dès lors le plus gros producteur : sur une courte période d'environ 8 mois, la LSPC a produit plus de Képone® que ne l'a fait Allied Chemical entre 1968 et 1974 (**tableau 2**). Environ 1 650 tonnes de CLD ont été produites sur la période allant de 1951 à 1975.

Tableau 2. Producteurs, localisation des usines de production, période de production et quantité de Képone® produites (adapté d'Epstein 1978)

<i>Compagnie</i>	<i>Localisation des usines</i>	<i>Période</i>	<i>Production (kg)</i>
<i>Allied</i>	Claymont, DE	1951	1360
	Marcus Hook, PA	1962-1963	6983
	Hopewell, VA	1966-1967	83427
	Semi-works, Hopewell, VA	1968-1974 (mars)	733681
<i>Nease</i>	State College, PAS	1959-1960	10683
	State College, PAS	1963	18126
	State College, PAS	1966	1036
<i>Hooker</i>	Niagara Falls, NY	1965	16275
	Niagara Falls, NY	1967	6260*
<i>Life Science Products Co.</i>	Hopewell, VA	15 nov. 1974-28 juil. 1975	769394

*Stock résiduel de matériau hors-normes

Entre 1972 et 1976, le Képone®, titré à 5 % de CLD, a été importé aux Antilles par la société *Vincent De Lagarrigue*, qui avait acheté le produit *via* une filiale de *Dupont de Nemours* basée à

Miami afin de traiter les bananeraies des Antilles Françaises pour annihiler le développement du charançon du bananier (Le Déaut et Procaccia 2009).

En juillet 1975, trois employés de l'usine de production de la LSPC à Hopewell en Virginie sont hospitalisés pour des troubles neurologiques (tremblements, nervosité, irritabilité pour les symptômes les plus courants, puis anorexie, faiblesse, douleur pleurale, douleurs articulaires sont également communément rencontrées). Sur 113 employés de l'usine d'Hopewell, 62 s'avèrent être contaminés par le Képone® (Epstein 1978). A la toxicité humaine observée sur les employés s'est ajoutée la toxicité environnementale avec la contamination de la James River et de la Chesapeake Bay (Joly 2010). Suite à cet évènement, l'usine d'Hopewell est fermée le 24 juillet 1975 sur ordre des autorités fédérales de l'Etat de Virginie (DHHS 2011). Les exigences d'étiquetage pour la norme professionnelle ont été modifiées « en conséquence » et comprennent la déclaration suivante : «*Danger! Extreme Health Hazard; Cancer suspect agent; and nerve destroying agent*» (Epstein 1978). Suite à l'incident d'Hopewell, l'EPA (Environmental Protection Agency) a interdit la production, la vente et l'usage de Képone® aux Etats-Unis en avril 1977 (Epstein 1978; Joly 2010). La décision de l'EPA était motivée par les conditions de travail dans l'usine d'Hopewell de la LSPC :

« Workers wore clothing home on many occasions. Respirators were not used on a regular basis until the plant was shut down. Food was also consumed on a regular basis in the dry or packing area due to the work load. When food was consumed in break areas, special precautions were not made to protect against contamination of this area. Work clothing was worn into lunch area and a coating of powder was found on lunchroom floor and tables. Although air pollution equipment in the form of a baghouse was installed, this too appears to have added to the occupational exposure in that workers went inside the baghouse on a regular basis to shake down filter bags » (Epstein 1978).

Des plans de surveillance menés par le département de santé de l'Etat de Virginie, le CDC (Center of Disease Control) et le NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) ont été initiés pour évaluer à long terme les effets du Képone® sur la neurologie, le comportement, la santé (cancérogène et reproduction) des travailleurs de la LSPC (Epstein 1978).

Au 1^{er} mai 1978, toutes les formulations destinées à un usage alimentaire et non-alimentaire précédemment autorisées aux Etats-Unis ont été retirées du marché (ATSDR 1995).

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer comment les producteurs de bananes des Antilles ont pu se procurer du Képone® après l'interdiction de sa production aux Etats-Unis : (i) Epstein (1978) pense que sur cette période le Képone® aurait été produit en Europe par Sandoz, en Suisse, sous la licence d'Allied Chemical et principalement vendu à *Spieß und Sohn* en République Fédérale d'Allemagne, (ii) Le Déaut et Procaccia (2009) estiment que les stocks de Képone® auraient suffi à satisfaire les besoins des Antilles Françaises entre 1976 et 1978.

2-2-2- Curlone® 1981-1990 : Reprise de la production par la France

Au début des années 1980, les planteurs de bananes des Antilles françaises se trouvent dans une impasse technique : le Képone® n'est plus produit par les Etats Unis et les stocks s'épuisent tandis que les populations de charançon pullulent suite aux dégâts causés dans les bananeraies par deux cyclones importants.

« En l'absence d'un insecticide ayant une bonne efficacité et malgré l'action complémentaire, réelle mais insuffisante des différents nématicides sur le charançon, les populations se sont progressivement accrues et les attaques sont devenues importantes. En 1981, la situation devenait préoccupante. En 1982 elle s'aggravait » (Vilardebo 1984).

En 1981, les établissements *Laurent De Lagarrigue*, localisés en Martinique, demandent alors à l'Etat français (service du Ministère de l'agriculture) l'autorisation de commercialisation d'une « nouvelle » formulation de CLD, le Curlone®, malgré son interdiction aux Etats-Unis. Cet insecticide comporte 5% de CLD, tout comme son grand frère le Képone® 5% utilisé en bananeraie ! La synthèse du Curlone® est assurée par *AgroKimicos*, situé à Riberão Preto dans l'état de Sao Paulo au Brésil. Le Curlone® de qualité technique transite par l'intermédiaire de la société *AgroCeres* avant d'être envoyé à la société *Calliope*, située à Port-la-Nouvelle dans l'Aude (France) pour y être formulé. La société Laurent De Lagarrigue achète alors le Curlone®, et le vend aux Antilles (Le Déaut et Procaccia 2009). 90% de cette production étaient destinés aux deux îles antillaises, et 10% étaient exportés au Cameroun et en Côte d'Ivoire où ces molécules ont été utilisées jusqu'en 1995 et 1998 (Le Déaut et Procaccia 2009). La France interdit la production du CLD, la vente, et l'utilisation du Curlone® en 1990, soit 25 ans après l'interdiction promulguée par les Etats-Unis.

2-3- Usage

2-3-1- Usage du Képone®

Depuis son introduction en 1958, le CLD a fait l'objet de 55 formulations commerciales comportant différentes doses de CLD (Epstein 1978; ATSDR 1995; Le Déaut et Procaccia 2009). La formulation majeure autorisée aux Etats-Unis est une formulation dosée à 5% de CLD sous forme de poudre mouillable. Cette formulation était utilisée pour la lutte contre le charançon du bananier au sein du *commonwealth* de Puerto Rico¹⁹ et constituait la seule et unique forme autorisée pour un usage alimentaire (Epstein 1978; ATSDR 1995). La plus haute concentration de CLD répertoriée dans les formulations commerciales était de 50% et était utilisée pour contrôler la courtilière ou taupe grillon (« grass mole cricket ») en Floride (usage non-alimentaire).

¹⁹ Etat souverain rattaché aux Etats-Unis

D'autres formulations de moindre teneur en CLD ont également été autorisées aux Etats-Unis pour un usage non-alimentaire : dans des produits ménagers tels que les pièges à fourmis et cafards à des concentrations de l'ordre de 0,125% ; des formulations à 5% de CLD destinées à l'exportation pour le traitement du charançon du bananier ; sous forme d'appât pour fourmis et cafards à une concentration de 25% dans les zones intérieures et extérieures inaccessibles aux enfants et aux animaux de compagnie ; et également des formulations à 5% et 10% de CLD sous forme de granulés et de poussières, à des fins non alimentaires, pour le contrôle du taupin dans les champs de tabac, des escargots et fourmis de feu dans les bâtiments, pour traiter les citronniers, les arbustes d'ornement...

Disponible jusqu'en 1976, le Képone® de qualité technique présente une teneur de 94.5% de CLD. Le Képone® a été utilisée comme produit de base pour établir les différentes formulations commerciales (ATSDR 1995).

Entre 90 et 99% de la production américaine est exportée vers l'Europe, l'Asie, l'Amérique Latine et l'Afrique (Cannon *et al.* 1978; EPA 1978; ATSDR 1995; DHHS 2011). 80% des exports de CLD ont été vendus à la société *Spieß und Sohn* (République Fédérale d'Allemagne) qui l'utilisait pour préparer le kélévan commercialisé sous la forme de Despirol (spécialité mouillable à 50% de kélévan). Cette formulation a été utilisée comme insecticide dans les pays d'Europe de l'est et en Irlande pour contrôler les infestations de doryphores dans les cultures de pomme de terre, bien que cet usage ne fût pas autorisé aux Etats-Unis (Epstein 1978). Il n'est pas impossible que le kélévan ait également été appliqué en Europe occidentale (y compris en France métropolitaine) dans les zones de production de pommes de terre (Le Déaut et Procaccia 2009). Il est intéressant de noter que le kélévan se dégrade dans les sols en quelques semaines sous forme d'acide kélévanique principalement (68%), mais également sous forme de CLD (4%) et d'acide acétique-CLD (13%) (EPA 1978). Les 20% des exports restant, dosés à 5% de CLD, étaient essentiellement exportés vers le Cameroun, les Caraïbes (dont les Antilles françaises), et l'Amérique du sud pour la lutte contre le charançon du bananier. Aux Antilles françaises, la dose d'application recommandée était de 30 g de produit (poudre cristalline) par pied ($75 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, soit approximativement $3 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de matière active) à disposer manuellement en couronne sur 10 cm autour du "pseudotrunc", tous les 6 à 18 mois en fonction du niveau d'infestation de la parcelle (Cabidoche *et al.* 2006a; Cabidoche *et al.* 2006b). On estime qu'approximativement 120 tonnes de CLD (matière active ! soit 2 400 t de Képone®), soit environ 1/10^{ème} de la production mondiale ont été appliquées dans les bananeraies des Antilles françaises (Martinique et Guadeloupe).

Il est à noter aussi que, à partir de 1964, le Képone® a également été utilisé dans la lutte contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* GERM au Cameroun, en zone francophone, à

la station expérimentale de l'Institut des Fruits et Légumes Coloniaux²⁰ (IFAC) à Nyombé et en zone anglophone, au Centre de Recherches de la Cameroun Development Corporation à Ekona (Vilardebo *et al.* 1974; Joly 2010).

2-3-2- Usage du Curlone®

L'usage du Curlone® est principalement à mettre à l'actif de la France. En effet, il a été quasi exclusivement destiné à la lutte contre les charançons du bananier en Martinique et en Guadeloupe. Aucun autre usage officiel n'a été être répertorié. Le Curlone® était dosé à 5% de CLD comme l'était le Képone®. Selon le rapport publié par le Sénat (Le Déaut et Procaccia 2009), 180 tonnes de CLD (soit 3 600 tonnes de Curlone®) ont été utilisées dans les plantations de bananiers aux Antilles sur la période Curlone® (1981-1993).

²⁰ L'IFAC, créée en 1942 et parfois nommée « institut français de recherche fruitière d'outre-mer », est devenue l'Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes (IRFA) en 1975, et a été intégrée au CIRAD en 1984.

Chapitre 3

Autorisation de mise sur le marché

Chapitre 3- Autorisation de mise sur le marché du CLD

3-1- Aux Etats-Unis

Les autorités américaines ont délivré des autorisations d'usage agricole du Képone® pour (i) le contrôle du charançon dans la culture de la banane à Puerto Rico, un territoire non incorporé des États-Unis avec un statut de *Commonwealth* situé dans les Caraïbes, (ii) le contrôle de la prolifération des criquets en Floride et (iii) la lutte contre le taupin du tabac. Elles ont également délivré des autorisations d'usage non-agricole du CLD pour piéger les fourmis et les cafards dans les habitations. En juillet 1975, suite à l'intoxication de plusieurs dizaines de travailleurs à Hopewell (Virginie), les autorités fédérales américaines décidaient d'interdire la production, la formulation et l'usage agricole et non-agricole du Képone® sur le territoire américain (Fintz 2010).

3-2- En France

3-2-1- Cadre juridique

Aujourd'hui la mise sur le marché et le suivi post-homologation des pesticides sont encadrés et harmonisés au niveau européen, règlement (CE) n°1107/2009 qui a abrogé la directive cadre 91/414/CEE. A l'issue de cette démarche, les pesticides autorisés sont inscrits dans l'annexe 1 de la directive. L'autorisation de mise sur le marché (AMM) de produits phytosanitaires est délivrée par les états membres de la Commission Européenne sur la base d'une évaluation nationale. Le cadre juridique en vigueur relatif à l'homologation des produits antiparasitaires à usage agricole repose sur la loi du 2 novembre 1943 proclamée par le régime de Vichy. L'article 1^{er} de cette loi interdit la vente, la mise en vente ou la distribution à titre gratuit de tous produits antiparasitaires n'ayant pas fait l'objet d'une AMM²¹, d'une autorisation provisoire de vente ou d'une autorisation de distribution pour expérimentation. Cette homologation concerne à la fois la substance active mais aussi la spécialité commerciale (formulation mise en circulation sous un nom de marque). Elle est accordée par la Sous-Direction de la Qualité et de la Protection des Végétaux (SDQPV) de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du Ministre de l'agriculture au terme d'une procédure qui a pour objectif de déterminer l'efficacité et la sélectivité vis-à-vis de la culture concernée et l'innocuité vis-à-vis de l'applicateur du produit. Pour ce faire la DGAL/SDQPV fait appel à l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES, ex.AFSSA-DIVE) qui conduit

²¹ Autorisation de mise sur le marché est le terme actuel (2014). En 1972, le terme *homologation* était utilisé. A cette époque, l'autorisation de distribution pour expérimentation n'existait pas.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 3 : Autorisation de mise sur le marché du CLD

l'évaluation des risques liés aux pesticides. Ces travaux d'expertise sont menés sur la base d'un dossier toxicologique déposé par le demandeur, répertoriant les risques d'effets directs et indirects sur l'Homme, les animaux et l'environnement, du produit pour lequel l'homologation est demandée. L'ANSES doit également donner un avis sur les conditions d'emploi du produit en tenant compte de ces risques. L'ANSES évalue les dossiers, émet un avis qu'elle transmet à la DGAL/SDQP qui se charge de délivrer l'AMM. Au terme de cette procédure, le Ministre prend souverainement sa décision parmi 4 possibilités :

- L'homologation (terme de 1943) ou AMM (terme actuel), valable pour 10 ans renouvelable pour un usage agricole déterminé.
- Le refus d'homologation ; le demandeur peut faire appel et demander une nouvelle instruction.
- La mise en étude du produit, engendrant des essais physiques, chimiques, toxicologiques et biologiques.
- L'autorisation provisoire de vente (APV), accordée pour 4 ans maximum.

Il est à noter qu'avant la création de l'ANSES, ce travail d'expertise était mené la Commission d'étude de la toxicité (ComTox) des produits antiparasitaires à usage agricole. Cette instance d'experts était placée sous la tutelle du Ministère de l'agriculture et elle s'appuyait sur la Structure scientifique mixte créée conjointement par l'INRA et le Ministère de l'agriculture et de la pêche.

L'homologation peut être retirée à tout moment si le produit ne satisfait plus aux conditions d'innocuité. Le Ministre de l'agriculture peut cependant accorder des délais d'écoulement des stocks. Le titulaire de l'homologation se doit d'informer le Ministère de l'agriculture de tout fait nouveau faisant apparaître un danger pour l'Homme et l'environnement (Collet *et al.* 2002; Beaugendre 2005).

3-2-2- Avant-propos

Dans le contexte agricole des Antilles, il est difficile de ne prendre en compte que le CLD indépendamment des autres produits employés pour contrôler les insectes ravageurs dans les bananeraies. En effet, comme le souligne Matthieu Fintz dans son rapport publié par l'AFSSET de 2009, « *une approche centrée sur la seule substance du chlordécone peut apparaître peu pertinente du point de vue historique dans la mesure où on ne peut penser l'arrivée du chlordécone indépendamment des substances qui l'ont précédé* », c'est-à-dire le HCH (HexaChlorocycloHexane), « *et de ses dérivés qui arrivent sur le marché des pesticides dans le même temps* », c'est-à-dire le Mirex® et le kélévan.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 3 : Autorisation de mise sur le marché du CLD

En 1950, le charançon est considéré comme « l'ennemi n°1 du bananier », et dès 1951, des premiers essais d'utilisation du HCH pour lutter contre les vers blancs (*Heteroligus meles*) sont conduits en Guinée (Vilardebo *et al.* 1974). Au milieu des années 50, l'utilisation du HCH pour lutter contre le charançon du bananier est vulgarisée aux Antilles par l'IFAC. Avec l'utilisation régulière du HCH, des populations de charançon résistantes apparaissent très vite, ce qui engendre l'expérimentation de nouvelles molécules. A partir de 1964, le CLD est utilisé au Cameroun, en zone francophone, à la station expérimentale de l'IFAC à Nyombé (Joly 2010).

3-2-3- Sur la période 1968-1972 : l'arrivée du CLD aux Antilles françaises et les premières suspicions envers les organochlorés...

Au cours de l'année 1968, deux demandes d'homologation ont été déposées auprès du comité d'études des produits antiparasitaires à usage agricole pour le Mirex® dans la lutte contre la fourmi-manioc (*Acromyrmex octospinosus*), et le Képone® (à 5% de CLD) dans la lutte contre le charançon du bananier (Fintz 2009; Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). Ces demandes étaient portées par la SOPHA (société basée à Fort-de-France), et ont été reprises par la Seppic (Société d'Exploitation des Produits Pétroliers de l'Industrie Chimique), filiale de la société Dupont de Nemours. Pour le comité, il s'agit de « *substances nouvelles qui doivent être examinées par la commission des toxiques (ComTox)* ». Ces deux spécialités ont été alors mises en étude sans délivrance d'APV (Fintz 2009; Joly 2010). A deux reprises, la ComTox a conclu par un ajournement de l'examen des dossiers en raison des dangers potentiels pour la santé humaine et animale (Le Déaut et Procaccia 2009), et du caractère incomplet des dossiers de demande d'homologation (trop sommaires et non-conformes). Le compte-rendu de la ComTox rapporte que « *la nature de ce composé organochloré* », le CLD (à cette époque, confusion des services du ministère de l'Agriculture entre les différentes appellations de la substance active « CLD », et de ses formulations « Képone® » et « Mirex® »), « *est proche de l'heptachlore par analogie à leur toxicité* », et qu'il présente une « *tendance à forte accumulation dans les graisses* » (Fintz 2009).

Dans les années 1967-1969, de vives critiques des insecticides organochlorés apparaissent au-devant de la scène au niveau national, européen et mondial. En 1967, la ComTox écoute un rapport oral sur la mort suspecte de gibier, probablement liée à l'utilisation de deux cyclodiènes chlorés, l'heptachlore et le lindane (autre dénomination du γ -HCH). Lors d'une séance de la ComTox en mars 1969, un rapport oral sur les résidus d'aldrine et de dieldrine (insecticides chlorés) retrouvés dans les pommes de terre ouvre de nouveaux débats : les questions de « dose journalière acceptable » et de « tolérance ». En mai 1969, le directeur du laboratoire de phytopharmacie de l'INRA annonce à la ComTox des mesures restrictives de vente concernant les insecticides chlorés : interdiction de l'aldrine et de l'heptachlore pour la culture du maïs, suppression du chlordane pour la

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 3 : Autorisation de mise sur le marché du CLD

culture de la betterave, et suppression de tous les pesticides chlorés pour la culture des oignons et des carottes. A l'automne de la même année, un arrêté interdit l'utilisation du HCH dans l'industrie laitière « *pour motif économique relatif aux mesures restrictives prises par les pays importateurs vis-à-vis des produits laitiers français* » qui présentaient effectivement des résidus de HCH (Fintz 2009; Joly 2010). En novembre 1969, l'usage du HCH est interdit dans les cultures (Joly 2010). Ces observations inquiétantes, et les pressions sur l'utilisation des organochlorés compte-tenu de leurs très fortes persistances, poussent la Commission Européenne et l'Organisation Mondiale de la Santé à demander à leurs pays membres des données en termes de résidus dans les denrées alimentaires (Fintz 2009).

En 1969 la Seppic a fourni à la ComTox un dossier de demande d'homologation plus fourni pour le Mirex[®] 450 (dosé à 0,45% de matière active) : une première partie traite des données toxicologiques et montre qu'aucun impact n'a été détecté sur la vie sauvage ; une deuxième partie aborde la fameuse question des résidus. Des essais en bananeraies datant des années 1963-1964, réalisés par la « United Fruit Company », montrent que moins de 0,002 ppm de CLD (limite de détection) étaient retrouvées dans la peau et la pulpe des fruits pour un produit ayant une teneur de... 0,075% de matière active. Le dossier est basé sur des documents écrits par Allied Chemical, l'USDA²² (United States Department of Agriculture) et Thornton Laboratories (cabinet de consultants) (Fintz 2009).

Dans ce contexte, la ComTox donne de nouveau un avis défavorable en novembre 1969 à la demande d'homologation pour le Képone[®] du fait qu'une autorisation poserait « *le problème de l'introduction d'un nouvel organochloré toxique et persistant* », et qu'elle présenterait « *un risque de contamination du milieu environnant, bien qu'il n'y ait pratiquement pas de résidus dans les bananes* » (Fintz 2009; Joly 2010). Le cas du Mirex[®] est également examiné lors de cette séance. Compte-tenu des données toxicologiques, la ComTox fait le constat d'une « *toxicité cumulative nette* », et conclut que « *ce produit pourrait être autorisé seulement s'il présentait une supériorité incontestable sur les autres cyclodiènes chlorés* ». En décembre 1969, le Comité d'Homologation refuse l'autorisation de vente du Képone[®] 5% de la Seppic, respectant ainsi l'avis de la ComTox (Fintz 2009).

Au cours du mois de janvier 1970, des échanges de courrier entre le chef du Service de Protection des Végétaux (SPV) et l'inspecteur de la Protection des Végétaux de la circonscription Antilles-Guyane ont eu lieu sur l'intérêt du HCH dans les cultures tropicales. L'Inspecteur a répondu que le HCH était « *encore très largement utilisé* » mais que son utilisation était « *limitée à la lutte contre le charançon du bananier* », en insistant sur la « *supériorité économique du HCH face aux*

²² Equivalent du ministère de l'agriculture en France.

esters phosphoriques » alors disponibles. Il s'en suit, en février 1970, une réunion du Comité d'Homologation spécifique sur le HCH, qui a conclu que le retrait d'homologation du HCH ne s'appliquerait pas aux cultures tropicales (Fintz 2009)... Le HCH bénéficiera d'un régime de prolongation aux Antilles françaises jusqu'en 1973, car « *la défense des cultures est le vecteur du profit en culture bananière d'une part et en second lieu aucun insecticide anti-charançon n'avait été homologué* » (Kermarrec 1980; Boutrin et Confiant 2007).

A partir de là, plusieurs éléments participent à ouvrir légalement le marché francophone de la filière bananes au CLD. En effet, les restrictions d'usage des organochlorés de 1969 préviennent leurs interdictions prochaines... laissant les producteurs Antillais dans une impasse technique pour contrôler la prolifération du charançon du bananier.

Lors de la séance d'avril 1970, le Comité d'Homologation attribue une APV pour le Mirex® 450. Bien que la ComTox y était défavorable (compte-tenu des propriétés toxiques cumulatives de la matière active), le SPV a proposé un avis favorable du fait des difficultés rencontrées pour lutter contre les fourmis-manioc. Le Comité d'Homologation proposera alors une APV assortie de précautions particulières (interdiction d'utilisation dans les cultures ; épandage exclusif dans les fourmilières et sur les chemins des fourmis) (Fintz 2009).

En janvier 1971, la ComTox porte son attention sur le classement des substances dans les tableaux A et C de la Section I des substances vénéneuses (Section I relative aux substances destinées à l'industrie et à l'agriculture ; le tableau A répertorie les substances dites toxiques, et le tableau C les substances dites dangereuses selon le Code de la santé publique). Le rapporteur de la sous-commission qui a planché sur la question recommande d'inscrire le DDT, le chlordane, le lindane (γ -HCH) ainsi que le Képone® sur le tableau A. Deux membres influents, le président de la ComTox et le chef du laboratoire de phytopharmacie de l'INRA, considèrent qu'il n'est pas justifié d'inscrire ces substances dans le tableau A étant donné que les données épidémiologiques chez l'Homme sont indisponibles (et peu convaincus de l'extrapolation chez l'Homme des données obtenues à partir de l'exposition d'animaux aux organochlorés). Mais c'est surtout afin de prévenir l'interdiction générale des organochlorés que ces substances sont déclassées du tableau A au tableau C²³ (Fintz 2009; Joly 2010), ce qui leurs ouvrait le marché des produits phytosanitaires.

En s'appuyant sur cette décision (déclassement du Képone® dans le tableau C des substances vénéneuses), la ComTox accorde, en avril 1971, une APV pour le Képone® sous forme d'appât pour lutter contre les blattes constituant une première brèche dans le marché des produits phytosanitaires français (Fintz 2011).

²³ Les substances inscrites au tableau C peuvent être utilisées comme phytosanitaire.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 3 : Autorisation de mise sur le marché du CLD

En février 1972, une réunion du Comité d'Homologation aboutira au retrait d'homologation du HCH destiné à la lutte contre le charançon du bananier dans un premier temps, et dans un second temps, une APV d'un an pour le Képone® 5% (dossier porté par la Seppic) destiné à lutte contre le charançon à la dose d'usage de 30g/pied ou 75 kg.ha⁻¹ (Fintz 2009; Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). Le motif : « *La dérogation accordée aux DOM* », du HCH, « *est arrivée à terme le 31 décembre 1973, on s'est aperçu que seul le kepone 5% récemment homologué peut remplacer avantageusement le HCH dans la lutte contre Cosmopolites sordidus* » (Kermarrec 1980; Joly 2010).

Cependant, pour Joël Beaugendre (2005), alors député de Guadeloupe (2002-2007), l'APV pour le Képone® 5% aurait été délivré en 1972. En effet, Dominique Bussereau (ministre de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité, 2004-2007), en réponse à la demande de Beaugendre concernant les conditions « *d'homologation* » de 1972, affirme dans un échange de courriers en 2004 : « *En l'absence de conservation de cette autorisation dans la base informatique du ministère, mes services considèrent comme vraisemblable que cette autorisation n'a pas été maintenue au-delà de 1973. Je ne suis donc pas en mesure de vous adresser copie l'autorisation de 1972* » (Beaugendre 2005). Boutrin et Confiant (2007) confirment : « *concernant l'aspect provisoire de cette autorisation, personne n'est en mesure de le confirmer* ».

3-2-4- Sur la période 1973-1981 : restrictions d'utilisation des organochlorés vs autorisations provisoires de ventes du Képone®...

Tout comme le Képone® était présenté comme une réponse à l'apparition de résistance au HCH, le Despirol® (spécialité à base de 50% de kélévan) était présenté comme une réponse à l'apparition de résistance au DDT et au lindane dans la lutte contre le doryphore de la pomme de terre dans un rapport du SPV en 1973. Le kélévan a été autorisé en Allemagne dès 1967 (Fintz 2009), et semble ne pas l'avoir été en France puisque ni la substance active (kélévan) ni la formulation commerciale (Despirol®) ne sont répertoriées sur la base de données « ephy »²⁴.

En 1975, l'homologation définitive du Mirex® 450 est confirmée par le Comité d'Homologation (Boutrin et Confiant 2007; Fintz 2009). Par ailleurs, la Seppic a demandé une autorisation pour une nouvelle formulation de Mirex® nommé Mirex® 300 (à 0,3% de perchlordécone) dans le but d'élargir l'usage à la culture d'ananas aux Antilles. Selon l'IFAC et le SPV, aucune substance de lutte contre les fourmis de l'ananas n'est disponible depuis l'interdiction des cyclodiènes chlorés. La ComTox ayant autorisé le Mirex® 450 hors culture, le Comité d'Homologation a attribué une APV pour le Mirex® 300 sur sols nus avant culture de l'ananas (Fintz 2009).

²⁴ Le kélévan a été autorisé en Espagne, en République Fédérale d'Allemagne, en République Démocratique d'Allemagne, en Estonie jusqu'en 1975, 1982, 1984 et 1999 respectivement, et également en Hongrie et URSS au moins jusqu'en 1986. En Pologne, 350 « tombes à pesticides » stockent 10 000 tonnes de pesticides dont 114 tonnes d'organochlorés (dont 20 tonnes de kélévan).

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 3 : Autorisation de mise sur le marché du CLD

En avril 1976, l'APV pour le Képone® 5% a été prolongée, la dose d'usage étant la même qu'en 1972, bien que l'usine d'Allied Chemical basée à Hopewell ait fermée un an avant en raison de la contamination de travailleurs exposés au CLD et de la persistance du CLD dans la rivière présente sur le site de l'usine (Fintz 2009; Joly 2010).

La directive européenne 79/117/CEE du 21 décembre 1978 régissant la mise sur le marché des produits phytosanitaires interdit l'utilisation de nombreux organochlorés (interdiction chlordane, dieldrine, HCH, HCB (hexachlorobenzène), et réglementation aldrine, DDT, Heptachlore) (Boutrin et Confiant 2007). En 1980, le tableau d'homologation mentionne toujours le Képone® 5% mais il indique que le demandeur a annulé sa demande d'homologation (Fintz 2009)...

3-2-5- Après 1981 : la période énigmatique du Curlone®.

Après le passage des cyclones Allen en 1979 et David en 1980, les populations de charançons rencontrèrent des conditions climatiques favorables favorisant leur pullulation²⁵. Face à l'épuisement des stocks de Képone®, les planteurs de banane étaient dans une impasse technique et se dirent démunis (Beaugendre 2005; Fintz 2009; Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). Les *Etablissements Laurent De Lagarrigue* rachetèrent alors à la Seppic le brevet du CLD. Dès lors ils produisirent une spécialité à base de 5% de CLD sous le nom de Curlone®. Il est intéressant de noter que Monsieur De Lagarrigue était également à la tête d'une grande bananeraie et d'une maison d'exportation de bananes à la Martinique (Patriarca 2006; Boutrin et Confiant 2007)...

Les *Etablissements Laurent De Lagarrigue* demandèrent le 6 mai 1981 l'homologation pour le Curlone® (Fintz 2009). Selon les sources, Le Déaut et Procaccia (2009), Boutrin et Confiant (2007) parlent d'homologation officielle ; en revanche Fintz (2009), Joly (2010) et Beaugendre (2005) sont plus sceptiques. Pour sa part, Fintz (2009) parle d'APV attribuée le 30 juin 1981 en attente de l'avis définitif de la ComTox tandis que Joly (2010) insiste sur le fait que le procès-verbal de la ComTox est introuvable : « *la mission parlementaire n'a pas pu avoir accès au procès-verbal de la ComTox. Par ailleurs, la direction générale de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET) a demandé par deux fois à la DGAL l'accès aux dossiers d'archive de la ComTox et du Comité d'Homologation. Les informations finalement transmises par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) ne comprennent aucun élément couvrant la période 1981-1993. Il faut noter en outre que les archives concernant ce dossier n'ont pas été conservées par les directions départementales de l'agriculture à la Martinique et en Guadeloupe* ». Beaugendre (2005) met en avant les « incertitudes concernant le dossier d'homologation » : seul un courrier de 1990 du chef du SPV adressé aux établissements De Lagarrigue fait état d'une autorisation de vente du Curlone®

²⁵ Les précipitations qui accompagnent les cyclones favorisent la multiplication des charançons.

datant de 1981 et portant le numéro 8100271. De plus et de manière étonnante, le CLD (c'est-à-dire la matière active du Curlone®), quant à lui, *aurait été* homologué par l'arrêté du 5 juillet 1982 fixant les conditions de délivrance et d'usage en agriculture... après l'éventuelle autorisation de la spécialité commerciale. Seule la version en vigueur de l'arrêté de 1982 est consultable sur le site Legifrance²⁶, et il n'est pas possible de consulter la version initiale.

En 1989, La ComTox est revenue sur la décision d'autorisation (provisoire ou pas) du Curlone® à l'occasion du réexamen du dossier. Elle s'est prononcée pour l'interdiction d'utilisation du produit le 7 septembre 1989 (Beaugendre 2005; Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). En février 1990, le Comité d'Homologation a retiré l'autorisation de vente du Curlone® portant le n°8100271. Le Ministre de l'agriculture a notifié alors le retrait de l'homologation du Curlone® aux *Etablissements Laurent De Lagarrigue* (Beaugendre 2005; Boutrin et Confiant 2007; Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). Il a rappelé que lorsqu'une spécialité faisait l'objet d'un retrait d'*homologation*, sa vente devait cesser un an après la notification du retrait et son utilisation 2 ans après (Le Déaut et Procaccia 2009; Joly 2010). La substance active, le CLD, a été interdite en juillet 1990 (Le Déaut et Procaccia 2009). Suite à cela, le Curlone® a bénéficié de plusieurs autorisations dérogatoires : Henry Nallet (gouvernement Rocard), ministre de l'agriculture et des forêts, a autorisé une dérogation de 2 ans pour écouler les stocks de Curlone® ; en mars 1992, Louis Mermaz (gouvernement Béregovoy), Ministre de l'agriculture, a accordé à titre dérogatoire un délai supplémentaire d'un an ; enfin, en février 1993 (gouvernement Balladur), Jean-Pierre Soisson, Ministre de l'agriculture, a répondu favorablement à la demande des gros planteurs (SICABAM, association de gros planteurs) pour utiliser le reliquat de Curlone®, dérogation valable jusqu'au 30 septembre 1993, en précisant que « *toute publicité est interdite* » (Beaugendre 2005; Boutrin et Confiant 2007)....

²⁶ <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00000292978>

Chapitre 4

Le chlordécone, un polluant organique persistant

Chapitre 4- Le CLD, un polluant organique persistant (POP)

« L'homme a un droit fondamental à la liberté, à l'égalité et à des conditions de vie satisfaisantes, dans un environnement dont la qualité lui permette de vivre dans la dignité et le bien-être. Il a le devoir solennel de protéger et d'améliorer l'environnement pour les générations présentes et futures [...]»
Principe 1, Déclaration de Stockholm, 1972

Un polluant organique persistant (POP) est une molécule organique définie (i) toxique pour l'homme et l'environnement, (ii) persistant dans l'environnement, (iii) susceptible de se bioaccumuler et (iv) d'être transportée sur de longues distances. La limitation de rejets de POPs fait l'objet de deux accords internationaux de l'Organisation des Nations Unies (ONU) : le protocole d'Aarhus (Danemark) sur les POPs signé en 1998 et la convention de Stockholm (Suède) sur les POPs signée en 2001.

Le protocole d'Aarhus sur les POPs (communément appelé « protocole POP ») fait suite à la convention de Genève de 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance. La convention initiale ciblait le dioxyde de soufre (SO₂) notamment responsable des pluies acides. Elle a ensuite ciblé des pollutions spécifiques via la négociation de huit « protocoles »²⁷. Ratifié par la France, le protocole POP n'est entré en vigueur qu'en 2003. Selon l'article 2, « *le présent Protocole a pour objet de lutter contre les rejets, les émissions et les fuites de polluants organiques persistants, de les réduire ou d'y mettre fin* ». Le protocole prévoit de mettre fin à la production et l'utilisation de 8 molécules organiques (aldrine, chlordane, CLD, dieldrine, endrine, hexabromobiphényle, Mirex®, et toxaphène) et l'élimination différée de 4 autres (DDT, heptachlore, hexachlorobenzène, PCB). Il restreint l'utilisation du DDT, HCH (y compris le lindane) et des PCBs. Enfin, il oblige également les parties à réduire leurs émissions de dioxines, de furanes, d'HAP et d'HCB en dessous de leurs niveaux en 1990. Revu en 2009, le nouveau protocole a banni d'autres composés tels que des hydrocarbures chlorés (naphthalènes polychlorés, paraffines chlorées à courte chaîne), des retardateurs de flammes bromés (octabromodiphényl éther, pentabromodiphényl éther), des tensioactifs fluorés (perfluorooctane sulfonates) et un sous-produit de l'industrie chimique (hexachlorobutadiène, sous-produit de production de solvant chloré).

²⁷ Le protocole EMEP (Programme concerté de surveillance et d'évaluation) ; le protocole d'Helsinki (sur les émissions acides type SO₂) ; le protocole de Sofia (sur les émissions de NO_x) ; le protocole de Genève (sur les composés organiques volatils COV) ; le protocole d'Aarhus sur les POPs ; le protocole d'Oslo (second protocole sur les émissions de SO₂) ; le protocole d'Aarhus sur les métaux lourds ; le protocole de Göteborg (protocole multi-polluant/multi-effets sur les émissions de SO₂, NO_x, COV et NH₃ responsables de l'acidification, de l'eutrophisation, de la pollution photochimique (ozone)). Les deux derniers (protocole sur les métaux lourds et de Göteborg) n'ont pas encore été ratifiés par la France.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

La convention de Stockholm sur les POPs vise à limiter, interdire voire éliminer certains produits chimiques polluants l'environnement. Elle est entrée en vigueur le 17 mai 2004, et compte 151 pays signataires. A l'origine, 12 substances utilisées à différents fins ont été reconnues comme POPs. Il s'agit de :

- Pesticides : aldrine, chlordane, DDT, dieldrine, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, Mirex® et toxaphène ;
- Produits chimiques industriels : polychlorobiphényles (PCBs) et hexachlorobenzène ;
- Sous-produits industriels : polychlorodibenzo-p-dioxines et polychlorodibenzo-furanes (PCDD et PCDF), PCBs et hexachlorobenzène.

Ces substances ont alors été qualifiées de « *douze salopards* » (« *dirty dozen* » en anglais, probablement en référence au film du même nom de l'américain Robert Aldrich). Parmi les neuf pesticides listés, huit sont des insecticides organochlorés dits de première génération (l'hexachlorobenzène est un fongicide). En 2009, lors de la 4^{ème} conférence ayant eu lieu à Genève en Suisse, la liste des « douze salopards » a été étendue à 21 : quatre pesticides organochlorés, (i) α -hexachlorocyclohexane, (ii) β -hexachlorocyclohexane, (iii) CLD, (iv) lindane (γ -hexachlorocyclohexane) ; et cinq produits industriels, (i) hexabromobiphényle, (ii) hexa- et hepta-bromodiphényléther, (iii) pentachlorobenzène, (iv) acide perfluorooctane sulfonique, ses sels et fluorure de perfluorooctane sulfonyle, et enfin (v) tetra- et penta-bromodiphényléther ont été ajoutés. La convention de Stockholm comprend différentes annexes ; les annexes A et B sont relatives aux productions et utilisations intentionnelles. L'annexe A prévoit d'interdire et/ou d'éliminer les substances listées, tandis que l'annexe B prévoit de limiter la production et l'usage des substances (article 3). L'annexe C, relative aux productions non intentionnelles, prévoit de réduire le volume annuel total des rejets d'origine anthropique des substances (article 5). Le CLD est inscrit sur l'annexe A (**figure 5**).

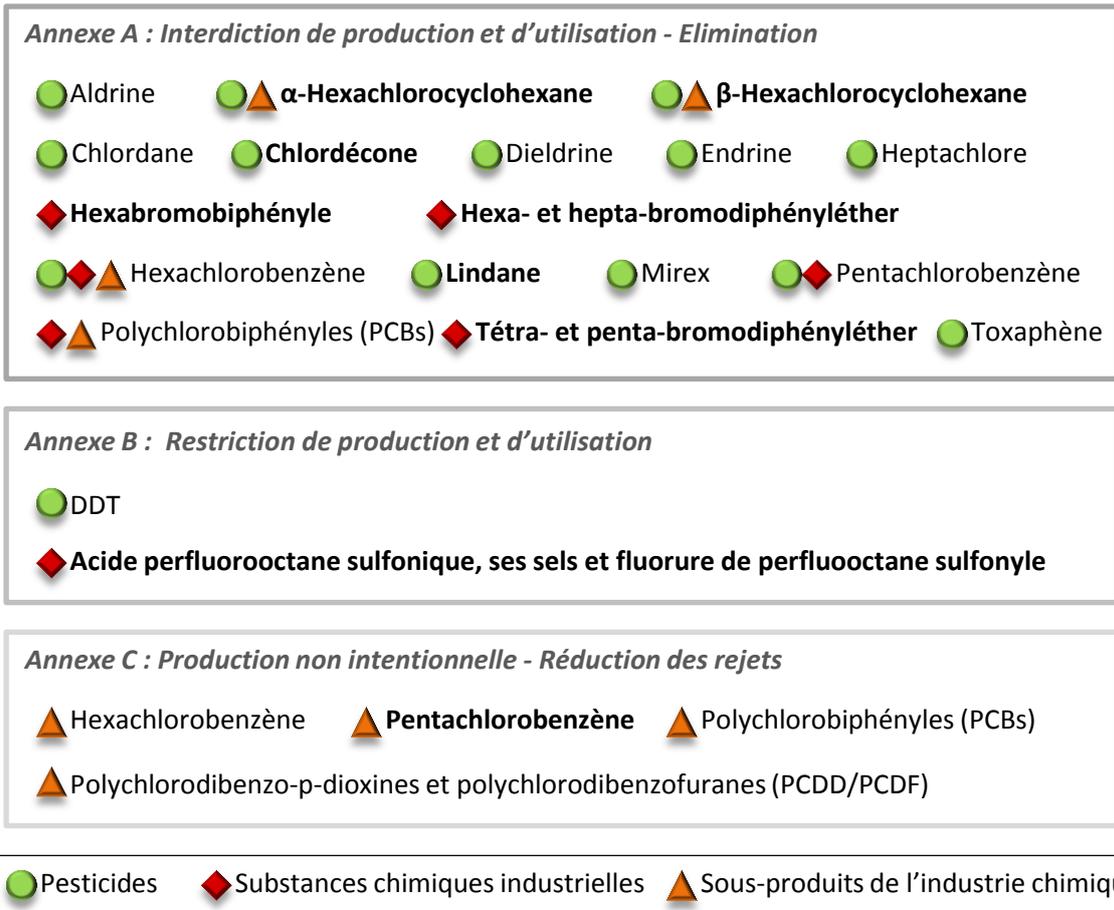


Figure 5. Liste des polluants organiques persistants (POPs) identifiés par la convention de Stockholm. Les substances notées en gras ont été ajoutées à la liste lors de la conférence de Genève en 2009.

Le règlement européen (CE n°850/2004 du 29/04/2004) a permis l'intégration des dispositions de la convention de Stockholm et du protocole d'Aarhus au sein de la réglementation européenne.

Dans les paragraphes suivant je décrirai les propriétés (persistance, transfert, bioaccumulation, toxicité) qui contribuent à qualifier le CLD de POP.

4-1- Persistance : Pollution « durable » des sols

« A persistent nightmare »

Sterrett et Boss (1977) dans Careless Kepone

La persistance du CLD dans les différents compartiments de l'environnement est expliquée par ses propriétés physico-chimiques (faible solubilité, forte hydrophobicité) lui conférant une haute affinité pour la matière organique contribuant à son adsorption. De ce fait, ce composé est peu biodisponible et faiblement dégradable en raison de sa structure chimique particulière (bishomocubane) et de l'entrave stérique causée par la présence de dix atomes de chlore (Woignier *et al.* 2012). Dans le cas du sol des Antilles françaises, l'adsorption du CLD est particulièrement forte

en raison de la présence d'argiles particulières jouant un rôle de piège à CLD (Fernandes *et al.* 2010; Woignier *et al.* 2012). La question de la « biodégradabilité » du CLD ne sera pas abordée dans ce paragraphe, mais dans un chapitre spécifiquement dédié à ce phénomène.

4-1-1- Affinité pour la matière organique : rétention chimique

Du fait de sa structure chimique, le CLD est stable, très hydrophobe (quasi-insoluble²⁸), non volatil. En conséquence, il présente une forte affinité pour la matière organique, expliquant sa persistance dans les sols et les sédiments (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011). Dans des systèmes sol/eau à l'équilibre, le CLD s'associe préférentiellement avec la matière organique par des liaisons de faible énergie (type van der Waals) (Cabidoche *et al.* 2006b) de sorte que les teneurs en résidus observées sont 10^4 - 10^5 fois plus élevées que les teneurs enregistrées dans l'eau environnante (Dawson *et al.* 1979). D'après la classification proposée par le comité de liaison des ministères de l'environnement et de l'agriculture, le CLD serait considéré comme étant peu à très peu mobile²⁹, le log K_{oc} variant de 3,1 à 4,2 (selon les données de la littérature, et selon la teneur en matière organique du sol considéré). Compte tenu du fait que le K_{oc} varie selon la teneur en matière organique du sol, la rétention du CLD varie selon le type de sol. Ainsi, les andosols naturellement plus riches en matières organiques que les ferralsols (=sol ferrallitique) ou les nitisols (=sol brun-rouille) présentent la capacité de rétention du CLD la plus élevée et par conséquent, le niveau de contamination le plus élevé (Cabidoche *et al.* 2009) (**figure 6**).

²⁸ Selon la directive 67/548/CEE, une substance est dite insoluble si sa solubilité dans l'eau est inférieure à 1 mg.L⁻¹. Pour rappel, la solubilité du CLD est comprise entre 1 et 3 mg.L⁻¹.

²⁹ Le comité de liaison des ministères de l'environnement et de l'agriculture (document du 01-08-1994) propose une classification du caractère mobile d'une molécule en fonction du log K_{oc} . Une molécule est considérée comme : très mobile si $\log K_{oc} < 1$; mobile si $1 < \log K_{oc} < 2$; moyennement mobile si $2 < \log K_{oc} < 3$; peu mobile si $3 < \log K_{oc} < 4$; très peu mobile si $4 < \log K_{oc} < 5$; et enfin immobile si $\log K_{oc} > 5$. Dans le cas du chlordécone, les données de la littérature du K_{oc} varient entre 2000 et 24000 L.kg⁻¹, soit un log K_{oc} allant de 3,3 à 4,4 correspondant à la classe dite 'peu mobile'.

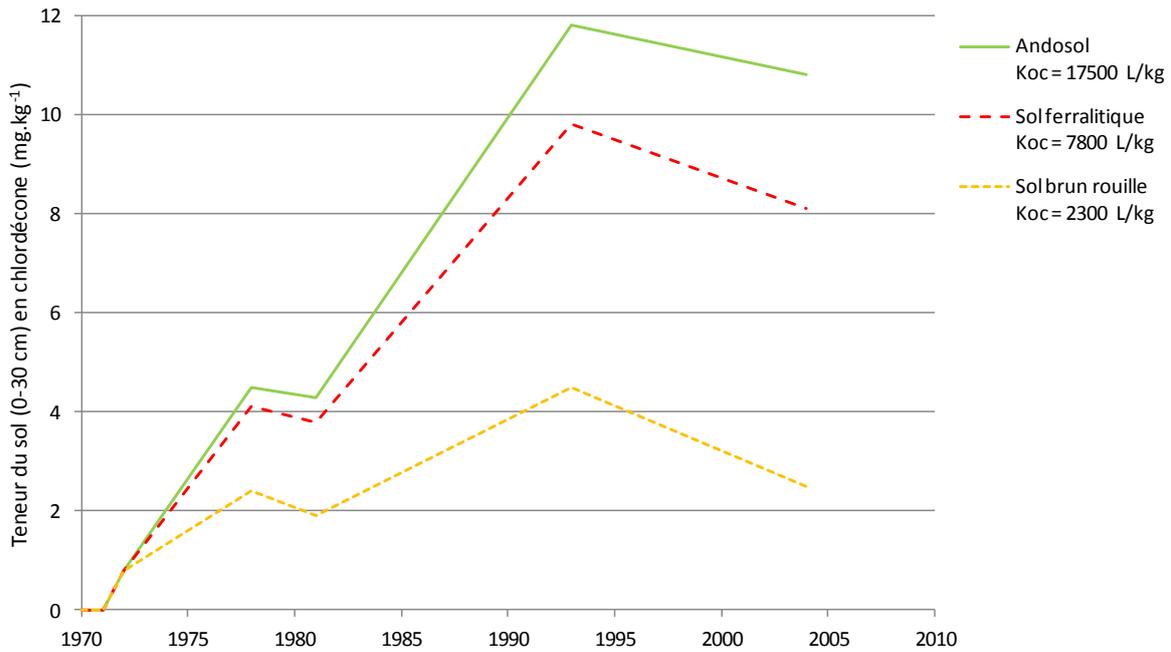


Figure 6. Teneurs actuelles calculées en CLD de trois types de sols, selon les K_{oc} apparents moyens issus de l'inversion du modèle WISORCH, sur des sols ayant reçu les mêmes apports de CLD (reproduction de Cabidoche *et al.* 2006a).

Fernandes *et al.* (2010) ont montré que l'apport de compost sur l'andosol modifiait sa porosité et réduisait fortement la labilité du CLD. Ainsi, la matière organique des sols semble jouer un rôle de puits pour le CLD dans le sol et les sédiments (Cabidoche *et al.* 2006b). Il est à noter que, pour d'autres composés (organophosphorés et HAP), leurs affinités pour la matière organique dépendent de sa qualité (notamment son contenu en composés aromatiques) (Ahmad *et al.* 2001; Xing 2001). En effet, Fernandes *et al.* (2010) ont montré que l'intensité de l'effet produit par l'apport de compost sur la labilité du CLD dans les sols dépend de sa richesse initiale en carbone tandis que la persistance du CLD dans les sols dépendrait de la complexité de la composition biochimique de la matière organique. Plus récemment, Fernandez-Bayo *et al.* (2013b) ont montré que le CLD présentait une plus grande affinité pour les chaînes alkyles courtes que pour les groupements carboxyles.

4-1-2- Les allophanes : piège physique du CLD

Les travaux de Fernandes *et al.* (2010) et de Woignier *et al.* (2012) ont mis en évidence le rôle des argiles dans la rétention du CLD dans les sols. En effet, aux Antilles françaises, les cultures de bananes ont été menées principalement sur des sols volcaniques argileux dérivés de pyroclastes andésitiques, et notamment des andosols, nitisols et ferralsols, et aussi dans une moindre mesure sur des alluvions récentes type fluvisols (**figure 7**).

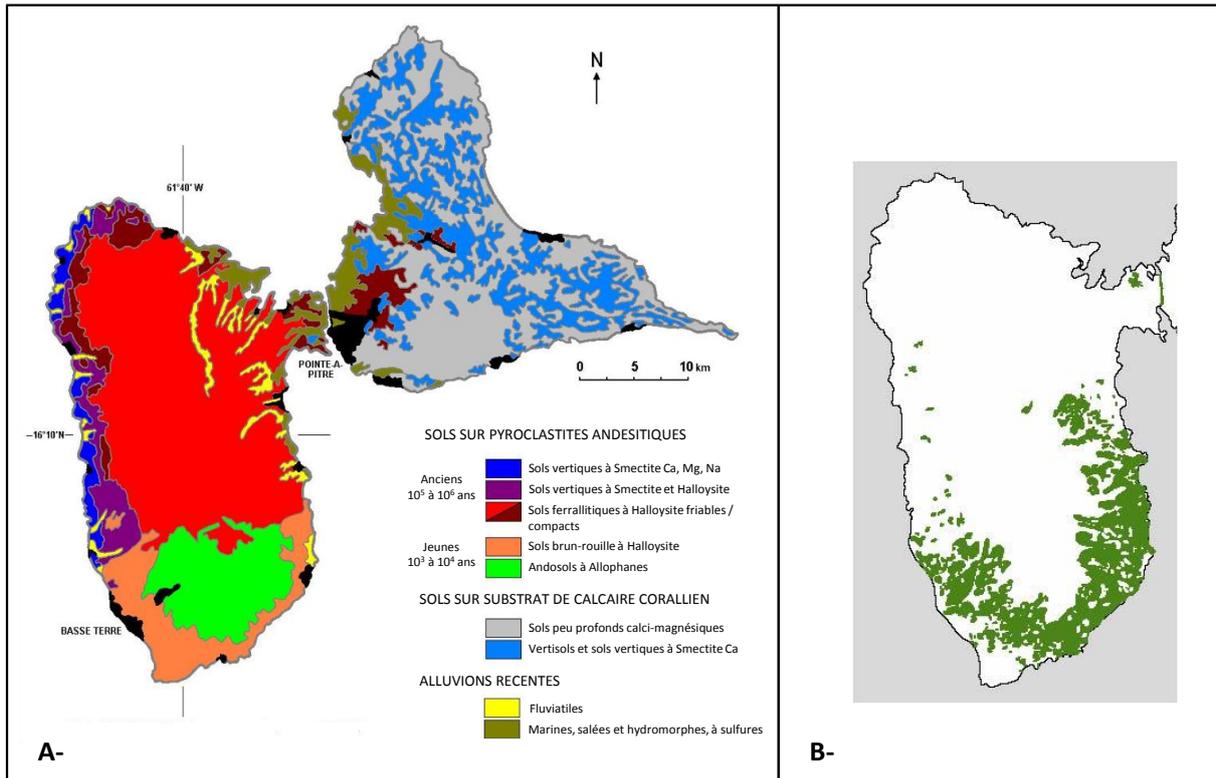


Figure 7. Carte pédologique et aire de répartition du « croissant bananier » de la Guadeloupe.

A- Carte pédologique INRA-CRAG-APC, Cabidoche (1997). Les surfaces vertes correspondent aux andosols ; les surfaces orange-saumon aux nitisols (=sols brun-rouille à halloysite) ; les surfaces rouges aux ferralsols friables (sols ferrallitiques à halloysite friables) ; les surfaces jaunes aux fluvisols (=fluviatiles). **B-** Carte tirée de Dulcire et Cattan (2002) mettant en évidence le « croissant bananier » de Basse-Terre à la Guadeloupe (surface verte).

Tous les minéraux primaires des roches andésitiques ont été altérés³⁰, c'est pourquoi les sols ont une forte teneur en minéraux secondaires³¹ : argiles³² amorphes type allophanes pour les andosols, argiles type halloysites pour les nitisols et les ferralsols (avec un enrichissement en oxydes de fer - Fe-oxyhydroxides - pour les ferralsols) (Cabidoche *et al.* 2009; Woignier *et al.* 2012). A l'échelle nanométrique, la microstructure d'allophane s'agrège dans une structure fractale présentant une porosité et une surface d'échange importante (Woignier *et al.* 2007). Les propriétés structurales des allophanes combinées à leur arrangement spatial en agrégats contribuent à former un piège pour la molécule de CLD, ainsi retenue physiquement (Fernandes *et al.* 2010). En effet, pour une même teneur en carbone organique, les sols riches en allophane retiennent davantage le CLD (**Figure 8**) (Woignier *et al.* 2012). Ainsi, la rétention du CLD dans les sols est non seulement régie par une interaction chimique avec le carbone organique du sol, mais également par une interaction physique avec les microstructures d'argile à allophane (Woignier *et al.* 2012). Compte-tenu de ses propriétés physico-chimiques, les andosols retiennent plus le CLD que les sols non-allophaniques (nitisols,

³⁰ Les mécanismes d'action sont de trois natures : dissolution, hydrolyse et oxydation.

³¹ Les minéraux secondaires sont issus de l'altération chimique, tandis que les minéraux primaires sont issus de l'altération mécanique.

³² Argiles : ensemble des minéraux d'un taille inférieure à 2 µm.

ferralsols), combinant les processus de rétention d'origines physique et chimique (Fernandes *et al.* 2010; Woignier *et al.* 2012). En conséquence, les andosols sont en effet les sols présentant les plus fortes concentrations en CLD. Toutefois, Fernandes *et al.* (2010) supposent que les résidus liés de CLD formés dans les andosols sont stables et, qu'en conséquence, ils n'agissent pas comme une source de contamination pour les autres compartiments de l'environnement et les cultures. Les données existantes concernant le transfert du CLD vers le milieu aqueux et vers les plantes (voir les paragraphes associés) laissent en revanche penser qu'une remobilisation du CLD n'est pas à exclure.

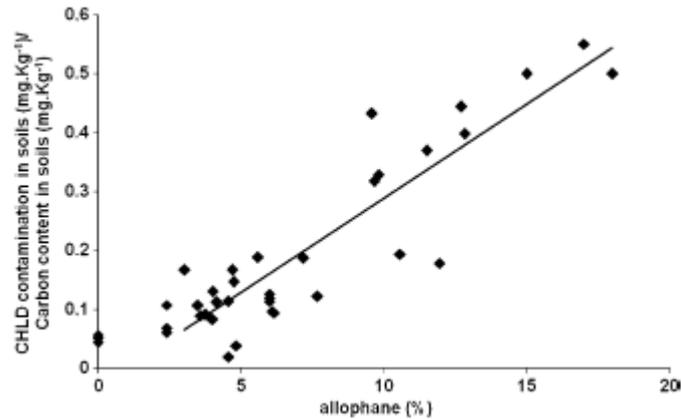


Figure 8. Evolution de la concentration en CLD normalisée par la teneur en carbone organique du sol en fonction de la teneur en allophane (tirée de Woignier *et al.* 2012).

Les données CLD ont un intervalle de confiance de 30%.

Il est également important de garder en tête que la rétention d'un pesticide dans un sol est influencée par les facteurs du milieu. D'une part, la teneur en eau affecte le processus d'adsorption par modification de l'accessibilité des sites d'adsorption et des propriétés de surface du sol. D'autre part, les changements de température ont un effet direct sur la distribution, la solubilité et la biodégradabilité d'un pesticide. La question de l'influence de ces facteurs sur l'écodynamique du CLD dans les sols antillais, en conditions climatiques tropicales (chaud et humide) se pose alors (Cabidoche *et al.* 2006b). D'autre part, la réversibilité du phénomène d'adsorption des pesticides sur les composants du sol se caractérise généralement par un phénomène d'hystérèse inverse³³ dont les paramètres cinétique pour ce qui concerne le CLD restent inconnus.

³³ L'hystérèse inverse est la différence entre les cinétiques d'adsorption de pesticides (rapide de l'ordre de quelques heures à quelques jours) et les cinétiques de désorption (très lente, jusqu'à plusieurs décennies) expliquant le phénomène de pollution ultra-différée avec des composés interdits d'usage depuis de nombreuses années.

4-1-3- Une contamination importante et durable...

4-1-3-1- Importante et hétérogène

Dès 1977, Snegaroff signalait des concentrations de résidus de 9,5 mg.kg⁻¹ dans le sol et de 0,135 mg.kg⁻¹ dans les sédiments au voisinage d'une plantation de bananes en Guadeloupe. Le K_{oc} élevé du CLD et la teneur en carbone organique élevée des sols volcaniques (*i.e.* > 40 g.kg⁻¹ soit > 4%) ont conduit à la fixation et à la persistance du CLD dans des quantités importantes avoisinant plusieurs dizaines de mg.kg⁻¹ dans la couche supérieure d'andosol (Cabidoche *et al.* 2009). Dans un contexte de pollution aiguë, les concentrations de CLD s'élevaient jusqu'à 10 mg.kg⁻¹ dans les sédiments de la baie de Bailey (exutoire de la James River), et variaient dans les sols de 10 000 à 20 000 mg.kg⁻¹ aux abords de l'usine de production d'Allied Chemical (la LSPC) et de 2 à 6 mg.kg⁻¹ à une distance de 1 km (WHO 1984).

Des travaux conduits dans le cadre du plan national d'action CLD I (PNAC I) ont permis de cartographier le risque de contamination des sols des Antilles françaises afin d'évaluer le risque d'exposition de la population antillaise. Cette cartographie de la Guadeloupe³⁴ et de la Martinique³⁵ a été réalisée à partir de l'analyse de l'occupation des sols et des historiques de cultures des parcelles agricoles (**figure 9**).

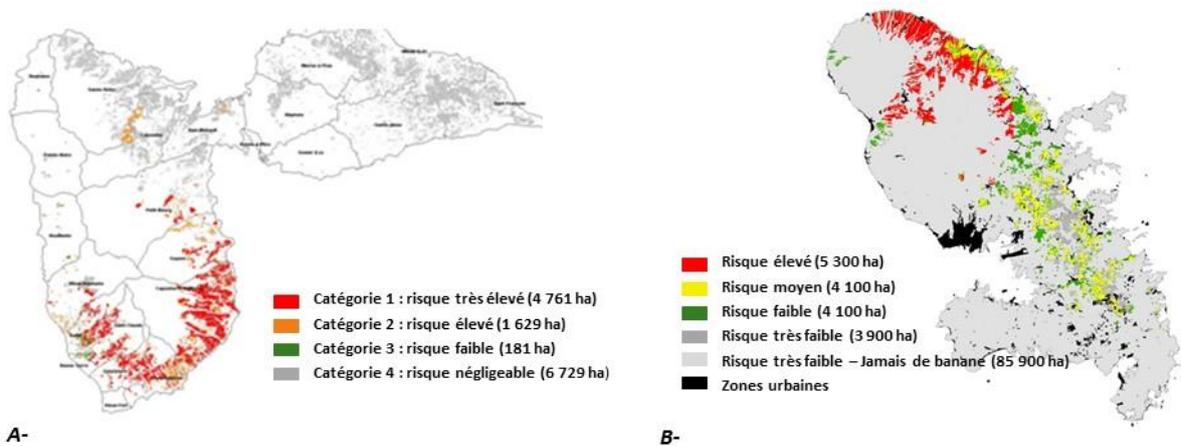


Figure 9. Cartes des risques de pollution des sols par le CLD en Martinique et en Guadeloupe établies à partir de l'analyse de l'occupation des sols.

A- Carte des sols potentiellement contaminés par le CLD en Guadeloupe (Tillieut et Cabidoche 2006). Risque très élevé : du fait de la présence de bananeraies pendant plus de 10 ans ; Risque élevé : du fait de la présence de bananeraies avant 1980 ou seulement sur les îlots défrichés en 1984-1987 ; Risque faible : présence de bananeraies entre 1977-1982, pas de présence relevée sur les autres périodes (avant 1970 et après 1995) ; Risque négligeable : pas de présence de bananeraies sur les périodes considérées (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011).

³⁴ Pour la Guadeloupe ce travail a été réalisé par la DAAF-SA avec la collaboration de l'INRA-ASTRO en 2005-2006 (Tillieut et Cabidoche 2006) à partir de photos et de cartes d'occupations des sols (1969, 1977, 1984, 1996).

³⁵ Pour la Martinique, le BRGM (Desprat *et al.* 2004) a utilisé des images cartographiques ou photographiques (1970, 1980, 1992).

B- Carte des sols potentiellement contaminés par le CLD en Martinique (SIG DIREN Martinique, septembre 2007). La signification des niveaux de risque n'est pas spécifiée. Cependant, cette carte de risque ayant été établie à partir de photographie et de cartographie d'occupation des sols comme l'a été celle de Guadeloupe, on peut supposer que les niveaux de risque sont comparables à ceux déterminés pour la Guadeloupe (*i.e.* un niveau de risque est dit élevé lorsque le territoire considéré a été majoritairement occupé par des bananeraies entre les années 70 et 90, période d'utilisation du CLD).

Des efforts ont été menés pour tenter de valider cette cartographie au travers d'une campagne d'analyse de la teneur en CLD dans des échantillons de sols appartenant aux 4 différentes catégories. Les résultats montrent que le CLD a été détecté dans plus de 90% des échantillons prélevés dans les zones à risque élevé à très élevé et dans seulement 6% des sols prélevés dans les zones à risque faible à négligeable, validant partiellement la carte de risque d'exposition (n=2 400) (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011). Toutefois, au vu de l'importance des surfaces de sol contaminées avec le CLD (Guadeloupe, 6 400 ha sur 34 800 ha de SAU en incluant Marie-Galante ; et Martinique, 14 000 ha sur 26 000 ha de SAU), il est difficile de valider finement la cartographie des risques par des campagnes de prélèvement.

Lesueur-Jannoyer *et al.* (2007) et Achard et Chabrier (2004) précisent que les expérimentations qu'ils ont menées aux champs ont toujours montré une très forte hétérogénéité de la teneur du sol en CLD au sein même d'une parcelle, probablement en raison du mode d'application sous forme solide du CLD au pied de chaque bananier. En raison de cette variabilité intra-parcellaire, Clostre *et al.* (2013a) ont proposé une méthode d'échantillonnage appropriée afin d'éviter les distorsions liées à l'échantillonnage, écueil classique des mesures chimiques et/ou biologiques effectuées sur des échantillons environnementaux. Il est à noter qu'il existe, en plus de la variabilité observée en surface, un gradient haut-bas de contamination en CLD : sur les 60 premiers cm du sol, l'horizon de surface (0-30 cm) représente 80% de la contamination alors que l'horizon plus profond (30-60 cm) représente 20% de la contamination (Marie *et al.* 2007; Rocle *et al.* 2009).

4-1-3-2- Durable

En raison de différents processus (rétention chimique et piégeage physique) le CLD est peu biodisponible, récalcitrant à la biodégradation et par conséquent très persistant dans les sols (Cabidoche *et al.* 2009). Des travaux ont tenté d'évaluer la persistance du CLD dans différents sols des Antilles : l'application d'un modèle simple de lessivage, en appliquant une cinétique de premier ordre basée sur la teneur en carbone organique du sol considéré, le K_{oc} , et le drainage des stocks de CLD, permet de représenter les résidus actuels de CLD dans les sols volcaniques de Guadeloupe et de Martinique. Cabidoche *et al.* (2009) suggèrent que le CLD persistera pendant des dizaines d'années pour les nitisols, plusieurs centaines d'années pour les ferralsols, et plus d'un demi-millénaire pour les andosols (**figure 10**)... Ce modèle propose de prédire la dissipation du CLD en prenant en compte

le lessivage du CLD des différents types de sols qui est principalement conditionné par le K_{oc} (K_{oc} nitisol < K_{oc} ferralsol < K_{oc} andosol). Il est à noter qu'implicitement ce modèle suggère que le CLD sera transféré vers les ressources en eau des Antilles impliquant la dégradation de la qualité des eaux de surface et l'exposition au CLD des organismes vivants qui les peuplent.

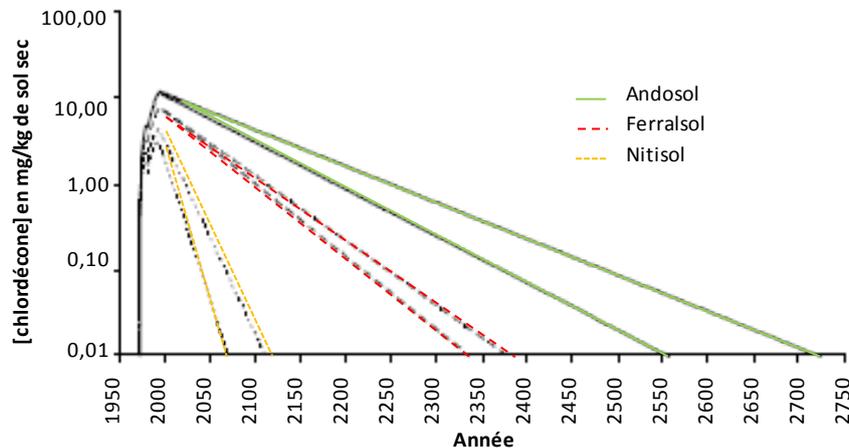


Figure 10. Prédiction de l'évolution des teneurs en CLD dans trois types de sols antillais (andosol, ferralsol et nitisol) obtenue avec le modèle WISORCH (adaptée de Cabidoche *et al.* 2009).

Pour chaque type de sol, les deux courbes délimitent l'intervalle de confiance des valeurs prédites par le modèle ($p = 0,05$). Les lignes vertes et continues représentent l'andosol, les lignes rouges brisées le ferralsol, et les lignes orange pointillées le nitisol.

Le CLD est très hydrophobe, il présente une forte affinité pour la matière organique, et il est piégé par les argiles, autant de processus qui contribuent à sa récalcitrance à la dégradation et qui explique son exceptionnelle stabilité dans les sols. On comprend alors l'argument du Comité d'homologation qui vantait l'efficacité du CLD et justifiait l'abandon du HCH: « *Des insecticides, tels que le chlordécone et le pirimiphos éthyl, qui font l'objet d'un avis favorable de la part du Comité, peuvent remplacer très avantageusement l'HCH, tant sur le plan de l'efficacité, que sur le plan de la quantité de produit épandu dans le sol* ». Cette vision agronomique ne prenait pas en compte les conséquences environnementales de l'application répétée de ce produit (à raison de 3kg/ha/an) sur une période de 20 ans qui a conduit à la contamination de l'andosol pendant environ 700 ans, alors que le HCH appliqué à une dose bien plus importante (*i.e.* 320 kg/ha/an) sur une période de 10 ans est en bonne voie pour être dissipée (**figure 11**).

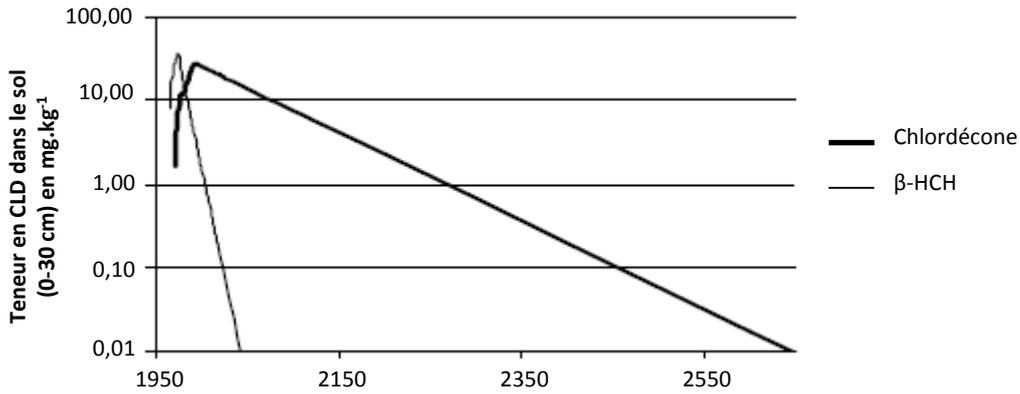


Figure 11. Prédiction de l'évolution de la teneur en CLD et β -HCH dans l'andosol selon le modèle WISORCH (modifié d'après Cabidoche *et al.* 2006b).

Evolution de la pollution d'un andosol sous bananeraie pérenne, après apport de 3kg/ha/an de CLD 1972-1978 et 1981-1993, et après un apport de 320 kg/ha/an de HCH technique 1965-1975.

Les POPs inscrits dans la convention de Stockholm sont des contaminants caractérisés par un temps de demi-vie ($T_{1/2}$) dans les sols et les sédiments de plus de 6 mois, et de plus de 2 mois dans les eaux (Rodan *et al.* 1999; Vulykh *et al.* 2006). Le $T_{1/2}$ dans l'air n'est pas inclus dans les critères de persistance mais dans les critères de transport sur de longue distance (Rodan *et al.* 1999). Dans la littérature, les temps de demi-vie du CLD sont variables : $T_{1/2 \text{ SOL}}$ varie d'un à 10 ans, $T_{1/2 \text{ EAU}}$ de moins d'un an à 2 ans, et $T_{1/2 \text{ AIR}}$ de 3 à 200 ans (ATSDR 1995; Mackay *et al.* 1997; Scheringer *et al.* 2006). D'après le rapport de l'UNEP, le temps de demi-vie calculé dans l'environnement serait alors de 9 ans, en considérant des valeurs $T_{1/2}$ respectifs de l'air, du sol et de l'eau de 150 ans, 10 ans et 2 ans (**Figure 12**) (Vulykh *et al.* 2006). Toutefois, il faut prendre avec précautions ces 'valeurs absolues' car d'une part, elles sont issues de simulations et non de données expérimentales, et d'autre part, les paramètres d'entrée du calcul de demi-vie (processus de dégradation, dépôt sec et humide, l'échange gazeux avec la surface sous-jacente) doivent être bien connus pour une bonne appréciation du résultat. Cependant, étant donné qu'aucune publication n'a pu être répertoriée à ce sujet pour le CLD, il est probable que ces paramètres aient été fixés à 'dire d'expert'.

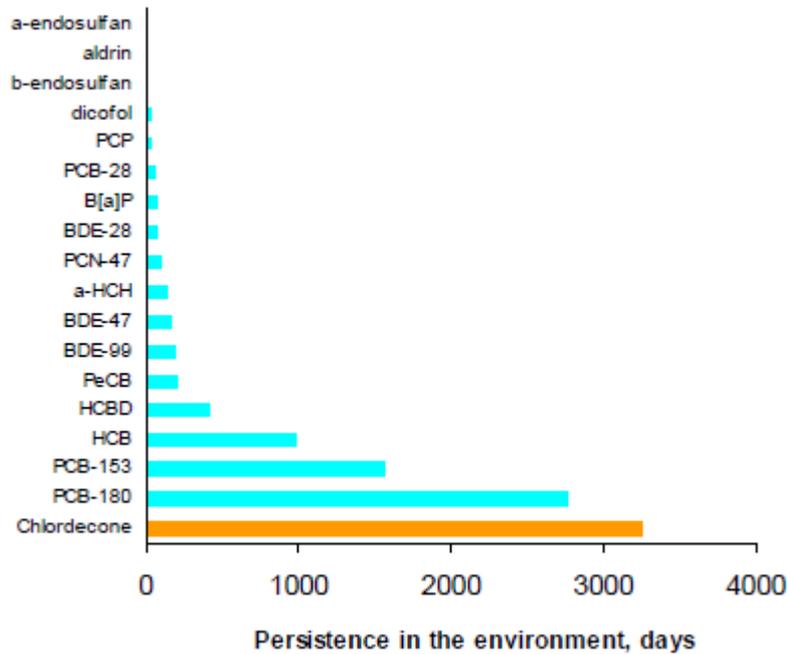


Figure 12. Persistance du CLD (exprimée en jour) dans l’environnement comparée à la persistance d’autres substances dont des POPs (tirée de Vulykh *et al.* 2006).

Le CLD est classé parmi les POPs les plus persistants étant même plus persistant que le PCB-180 connu pour être le PCB le plus persistant dans l’environnement (**Figure 12**).

Comme je viens de le démontrer, le CLD appliqué sur les sols des bananeraies est stocké dans les sols en raison de l’existence de différents processus qui le rendent récalcitrant à la biodégradation. Les sols traités avec le CLD sont donc pollués avec ce composé et à l’heure actuelle, le principal processus expliquant sa dissipation est le lessivage qui conduit à son transfert vers les ressources en eau (Cabidoche *et al.* 2006b). Le paragraphe suivant vise à mettre en lumière la question du transfert du CLD des sols agricoles vers les autres compartiments de l’environnement (eau, air), et vers des organismes vivants (flore, faune).

4-2- Transfert...

« Souvent, on n’a guère prêté attention aux incidents que les pesticides pourraient avoir sur les organismes utiles ou au fait qu’ils risqueraient d’être entraînés, d’une façon ou d’une autre, vers des zones non visées »

Kermarrec (1980)

De manière générale, les molécules de pesticide épandues volontairement sur les parcelles agricoles se retrouvent pour partie dans les différentes phases du sol : dans la phase liquide par dissolution, dans la phase solide par adsorption aux constituants du sol (minéraux et matière

organique) et la phase gazeuse par volatilisation (Bedos *et al.* 2002a; Rocle *et al.* 2009). Elles sont alors soumises à différents processus, dont les processus de dégradation (transformation voire minéralisation) et de transfert (Rocle *et al.* 2009). Volatilisées dans la phase gazeuse, elles pourront potentiellement être transférées vers l'atmosphère. Dissoutes dans la phase aqueuse, les molécules pourront potentiellement être transférées vers les compartiments aqueux de l'environnement vers les systèmes hydriques de surface par ruissellement et vers les systèmes hydriques sous-terrain par infiltration (lixiviation). Dans la phase dissoute, elles seront également biodisponibles et seront alors susceptibles d'être transférées vers la flore et la faune du sol et/ou d'être transformées voire minéralisées par les microorganismes. Enfin, adsorbées aux constituants du sol, elles seront stockées dans les sols sur des périodes pouvant être assez longues. Toutefois, l'adsorption sur les composés du sol n'est pas irréversible et les molécules piégées dans le sol pendant de nombreuses années peuvent se désorber contribuant au phénomène de pollution ultra-différée (Cattan *et al.* 2007). L'affinité d'une molécule pour le sol est exprimée par le rapport des concentrations dans le sol rapporté à celles dans l'eau (K_D), et conditionne sa capacité à se désorber. En effet, plus il est faible, plus la molécule sera relarguée facilement et pourra être transférée au compartiment « eau ». Une désorption progressive mais lente de la molécule fixée en masse conduit à une pollution chronique (Cattan *et al.* 2007). Les molécules adsorbées peuvent aussi être transférées par érosion mécanique : (i) vers l'atmosphère sous forme particulaire (poussière de sol chargés de polluant) par érosion éolienne, et (ii) vers le compartiment « eau », par ruissellement et lessivage de particules de sols. Ces différents processus (adsorption, solubilisation, volatilisation, désorption, dégradation) conditionnant le devenir des pesticides dans l'environnement interagissent de façon complexe et n'ont pas la même intensité au cours du temps en fonction de la variation des conditions pédoclimatiques (Cattan *et al.* 2007).

4-2-1- Vers l'atmosphère

Le transfert sol-air se fait majoritairement par la dérive lors de l'épandage, notamment lorsque le pesticide est pulvérisé (Bidleman 1999). Toutefois, de plus en plus d'étude montrent l'importance de la volatilisation des pesticides (depuis le sol, les plantes, la surface de l'eau) et de l'érosion éolienne dans le transfert des pesticides vers l'atmosphère (Bedos *et al.* 2002b).

Le CLD étant épandu manuellement, sous forme de poudre autour du pseudo-tronc du bananier (**figure 13**), il n'est *a priori* pas soumis à la dérive. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas de donnée disponible dans la littérature à ce sujet. Le processus de **volatilisation**³⁶ quant à lui peut opérer plusieurs jours ou plusieurs semaines après le traitement, voire plusieurs mois dans le cas de pesticides particulièrement persistants et donc des organochlorés (Bedos *et al.* 2002a). En effet, entre 53 et 58% de la dose appliquée de deux organochlorés, le DDT et le toxaphène, peuvent être « perdus » par volatilisation un mois après épandage (Willis *et al.* 1983). Dans le cas d'un herbicide, le trifluraline, de 54 à 74%, et jusqu'à 90% de la dose appliquée peuvent être perdus 5 jours et une semaine après épandage respectivement (Majewski *et al.* 1993; Bedos *et al.* 2002a). L'intensité de ce processus est fonction de la pression de vapeur du composé. Etant donné, sa très faible pression de vapeur (P_v)³⁷ le CLD a, *a priori*, une probabilité réduite de passer dans la phase gazeuse du sol, puis dans l'atmosphère. Cependant aucune donnée quantitative de CLD mesurée dans l'atmosphère n'a pas été répertoriée. Il n'existe pas non plus de données sur l'importance de l'érosion éolienne dans le transfert du CLD vers l'atmosphère.



Figure 13. Technique d'épandage du CLD en bananeraie

Devant le peu de données disponibles concernant le transfert sol-air du CLD, j'ai compulsé la littérature concernant le transfert atmosphérique d'autres pesticides organochlorés.

Pour aborder cette question, je me suis intéressée aux paramètres généralement utilisés pour estimer le potentiel de transfert d'une substance organique, telle qu'un pesticide, d'un milieu à un autre. Généralement des coefficients de partage sont calculés afin de caractériser l'affinité d'une substance considérée pour un milieu. Bien que le coefficient de partage sol-air, K_{SA} , soit fréquemment employé, Meijer *et al.* (2003a) proposent le calcul du quotient de partage sol-air, Q_{SA} ³⁸. D'après leur étude, les pesticides organochlorés présentent des valeurs de $\log Q_{SA}$ comprises entre 6,38 et 9,24 (pour un $\log K_{SA}$ théorique compris entre 6,93 et 9,50) suggérant une très forte affinité pour les composantes du sol comparativement à l'air. Au-delà de ces coefficients, d'autres

³⁶ **Volatilisation** : processus physico-chimique par lequel une substance est transférée dans l'atmosphère. Il peut résulter de l'évaporation depuis un compartiment liquide, sublimation depuis un compartiment solide, évaporation depuis la solution aqueuse ou désorption depuis la matrice sol (Bedos *et al.* 2002a).

³⁷ Selon Cabidoche *et al.* (2006a), la P_v du chlordécone est de $2,5 \cdot 10^{-5}$ mm Hg (soit 0,003 Pa), en accord avec Tsai (2010) qui estime la P_v du chlordécone inférieure à 0,03 Pa.

³⁸ Le coefficient de partage sol-air, K_{SA} , correspond au rapport entre les concentrations à l'équilibre dans le sol et l'air. Si l'équilibre n'est pas atteint, on parle alors de quotient de partage sol-air, Q_{SA} .

paramètres tels que l'énergie associée au transfert d'une substance d'une phase à une autre, noté ΔH , peuvent rendre compte de la capacité de transfert d'un composé d'un milieu à un autre. Ainsi, l'énergie nécessaire pour transférer un pesticide organochloré du sol vers l'air, ΔH_{SA} , est généralement supérieure au ΔH_{OA} ou ΔH_{VAP} (respectivement énergie nécessaire au transfert de phase octanol-air, et énergie nécessaire pour être vaporisé). Cela indique qu'une énergie additionnelle est nécessaire pour ôter ce type de substance du sol, comparée à l'octanol ou au composé lui-même, indiquant sa très forte stabilité (Meijer *et al.* 2003b). D'autre part, le transfert de substances chimiques d'un corps aqueux vers l'air atmosphérique (par volatilisation) est un processus ayant une incidence environnementale (Tsai 2010). Dans la littérature, le CLD présente plusieurs valeurs de coefficient de partage air-eau (K_{AW}) ou constante de Henry³⁹ : moins de $0,003 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ selon Tsai (2010), $0,002 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ selon Mackay *et al.* (1997) jusqu'à $2\cdot 10^{-7} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\log K_{AW} = -6,69$) selon Scheringer *et al.* (2006). Toutefois, toutes ces valeurs sont extrêmement faibles⁴⁰, suggérant que le processus de volatilisation de l'eau à l'air est négligeable pour le CLD. Selon la classification proposée par Scheringer (2009) qui oppose les « flyers », c'est-à-dire des substances volatiles transportées rapidement et en grandes quantités par l'air, et les « swimmers », c'est-à-dire des substances ayant une constante d'Henry faible et une persistance suffisamment élevée pour être transportées par les ressources en eau, le CLD serait classé comme « swimmer ». Toutefois, ce sujet reste débattu et Tsai (2010) rappellent que la faible solubilité des organochlorés en général tendrait tout de même à ce qu'ils diffusent depuis la phase aqueuse vers la phase atmosphérique.

D'après leurs caractéristiques (faible volatilité, coefficient de partage sol-air élevé, coefficient de partage air-eau faible) rien ne prédispose les organochlorés à contaminer l'atmosphère. Pourtant, une corrélation positive statistiquement significative a été montrée entre la concentration de différents pesticides organochlorés dans le sol et celle mesurée dans l'air ambiant (Bidleman et Leone 2004) (**figure 14**). Les concentrations mesurées dans l'air sont toutefois assez basses (de l'ordre de $100 \text{ pg}\cdot\text{m}^{-3}$) au regard de la limite réglementaire de $10 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ définie par la directive cadre européenne sur l'air.

³⁹ K_{AW} ou constante de Henry : rapport entre la concentration du toxique dans l'air et la concentration du toxique dans l'eau à l'équilibre.

⁴⁰ Une substance est considérée comme volatile si la constante de Henry est supérieure à 1 (Tissier *et al.* 2005)

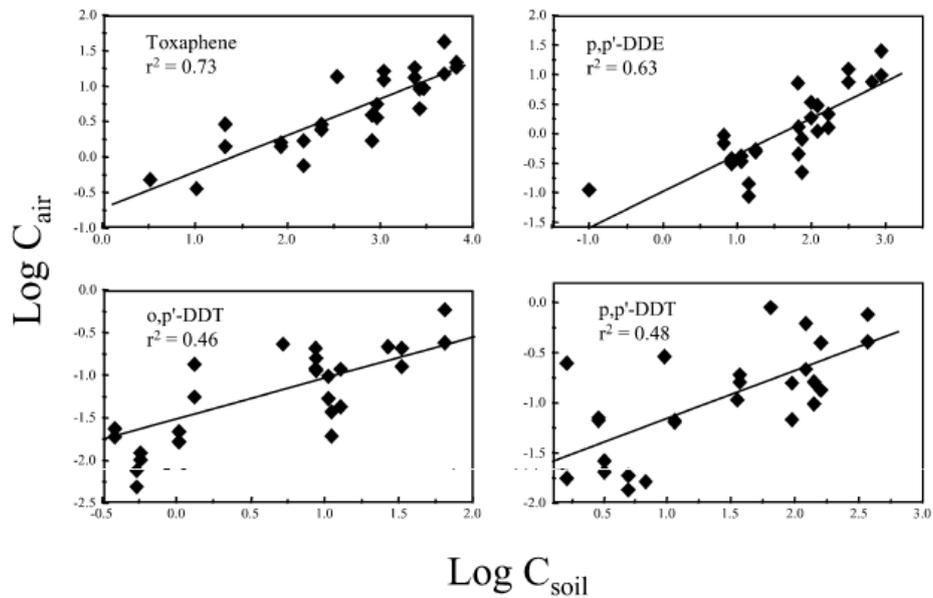


Figure 14. Relation des concentrations sol-air pour des pesticides organochlorés (tiré de Bidleman et Leone 2004). La concentration dans l'air est ng.m^{-3} , et dans le sol en ng.g^{-1} .

Meijer *et al.* (2003a) vont un peu plus loin dans l'étude du transfert sol-air de pesticides en montrant la présence de pesticides organochlorés⁴¹ dans des sols agricoles (*i.e.* de 0,57 à 85 ng.g^{-1} de sol sec) et dans l'air (5,3 à 180 pg.m^{-3} à 150 cm du sol). Par ailleurs, ils ont montré que la concentration dans l'air à 3 cm du sol (*i.e.* de 42 à 1800 pg.m^{-3}) était pour la plupart des composés supérieure à celle observée à 150 cm (**figure 15**), indiquant que le sol agirait comme la source de contamination de l'atmosphère.

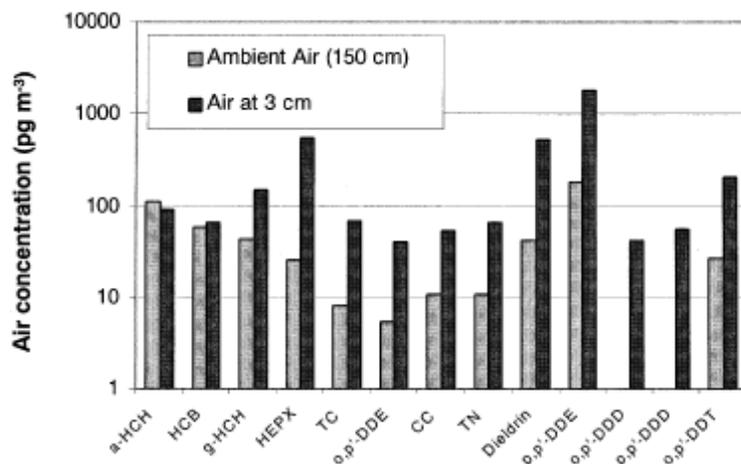


Figure 15. Concentrations de différents pesticides organochlorés mesurées par l'échantillonneur de terrain dans l'air ambiant à 150 cm du sol (barres grises) et à 3 cm du sol (barres noires) dans une parcelle cultivée avec du soja (concentration dans l'air exprimée en pg.m^{-3}) (tirée de Meijer *et al.* 2003a). HCB, hexachlorobenzène ; Hepx, Heptachlore époxyde ; TC, *trans*-chlordane ; CC, *cis*-chlordane ; TN, *trans*-nonachlore.

⁴¹ Isomères d'HCH, HCB, heptachlore, dieldrine, DDT et ses métabolites (DDE et DDD), chlordane

Comme le souligne Bedos *et al.* (2002a), une fois véhiculées vers l'atmosphère, les substances chimiques peuvent être transportées sur de grandes distances. De nombreuses études montrent la déposition de pesticides organochlorés loin de leur site d'application (Wong *et al.* 2010). Le « potentiel de transport sur de longue distance » est d'ailleurs un des critères employés pour qualifier une substance comme POP. Les paramètres employés pour évaluer ce critère sont la pression de vapeur et le temps de demi-vie dans l'atmosphère ($T_{1/2}^{atm}$) qui doivent respectivement être inférieure à 1000 Pa (pour rappel, $2.10^{-7} < P_{v_{CLD}} < 2.10^{-3}$ Pa, consensus, « contrat rempli ») et supérieur à 2 jours (pour rappel, de 1 jour à 200 ans, pas de consensus mais « contrat *a priori* rempli ») (Rodan *et al.* 1999). Ces deux paramètres conditionnent la distance de transport (TD) calculée comme la distance entre la source et le point où la concentration atmosphérique annuelle de la substance en question est diluée 1000 fois par rapport à la concentration à la source (Vulykh *et al.* 2006). Ainsi, il existe une corrélation positive entre le $T_{1/2}^{atm}$ et la TD lorsque la constante d'Henry est supérieure à $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ (marqueurs noirs de la **figure 16**).

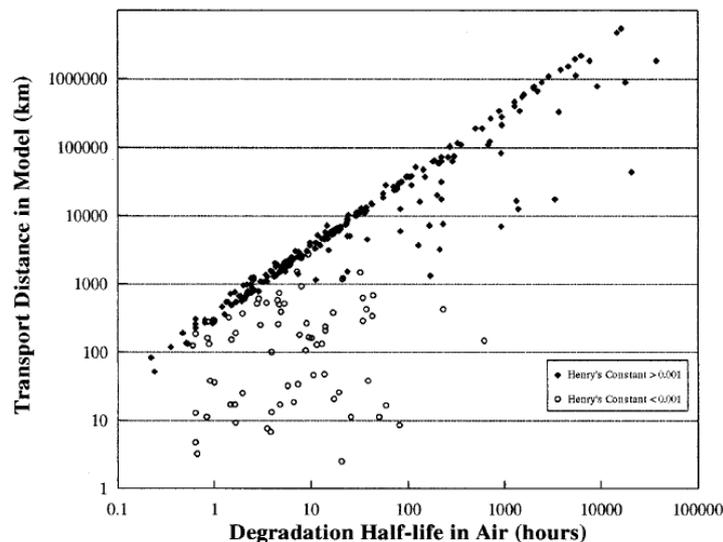


Figure 16. Régression linéaire entre la distance de transport (TD exprimée en km) et le temps de demi-vie dans l'air (exprimé en heure) d'après Rodan *et al.* (1999).

Le TD prédit par un modèle de transport atmosphérique et le $T_{1/2}^{atm}$ de 316 substances chimiques sont représentés graphiquement. Les substances ayant une constante d'Henry inférieure à $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ sont indiquées par les marqueurs blancs, et supérieure à $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ sont indiquées par les marqueurs noirs. Les deux axes sont en échelle logarithmique.

Selon ce graphe et les données de la littérature concernant le temps de demi-vie dans l'atmosphère (de 1 jour à 200 ans), le CLD est susceptible d'être transporté au-delà d'un millier de kilomètre, si toutefois il passait dans l'atmosphère. D'autres données de la littérature indiquent une tendance similaire, avec pour le CLD des TDs de 1290 et 1500 km calculées à l'aide de deux modèles différents (Vulykh *et al.* 2006). Toutefois, ces données prédictives doivent être prises avec précautions puisqu'elles résultent de la modélisation basée sur des valeurs d'entrée arbitraires (**Figure 17**).

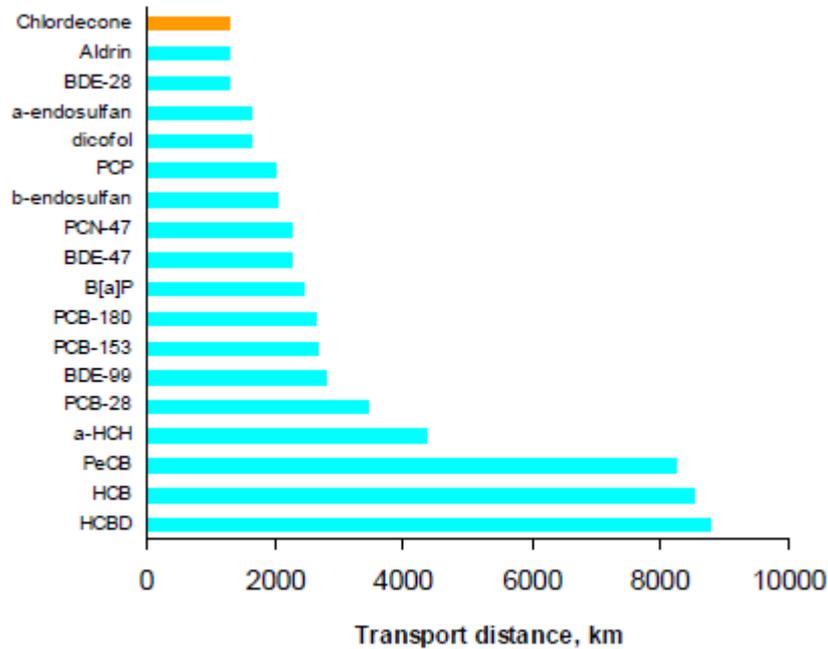


Figure 17. Distance de transport du CLD comparée à d'autres substances (tirée de Vulykh *et al.* 2006).

Pour résumé, il existe très peu de données concernant le transfert du CLD vers l'atmosphère et, celles existantes sont parfois incertaines. Il existe dans la littérature pour le CLD :

- un consensus sur sa pression de vapeur très faible ($2,5$ à $3 \cdot 10^{-5}$ mm Hg) et sur le potentiel extrêmement faible de transfert du sol vers l'air ;
- une incertitude sur l'ordre de grandeur de sa constante de Henry, $2 \cdot 10^{-2}$ à $2 \cdot 10^{-7}$ Pa, et sur la distance de transfert bien que des valeurs aient été attribuées (plus de 1000 km) ;
- des données contradictoires sur le temps de demi-vie dans l'atmosphère (variant de 1 jour à 200 ans !) selon les modèles employés.

Toutefois, malgré quelques difficultés à attribuer des valeurs descriptives du comportement du CLD vis-à-vis du compartiment gazeux, l'analyse de la littérature montre que le CLD se comporte de manière similaire à d'autres pesticides organochlorés.

Mon analyse bibliographique montre toutefois de nombreuses zones d'ombres pour lesquelles des données élémentaires pour comprendre le devenir du CLD dans l'environnement sont manquantes. En effet, je n'ai pas été en mesure de trouver des données relatives au coefficient de partage sol-air, au mode de transfert (part de perte à l'épandage, part de volatilisation, part d'érosion éolienne, transfert sous forme volatilisée ou adsorbée ?), ou à l'évaluation de la contamination atmosphérique. D'après Cabidoche *et al.* (2009), aucun transfert atmosphérique n'a pu être observé compte-tenu du fait de la très faible volatilité du CLD... Il est également possible qu'il n'existe pas de méthodes ou d'outils suffisamment performants pour évaluer la contamination atmosphérique à de très faibles doses (de l'ordre du $\text{pg} \cdot \text{m}^{-3}$). Compte-tenu du transfert avéré sur de

longues distances de pesticides organochlorés via l'atmosphère, on peut aisément imaginer qu'un transfert, même en quantité infime, puisse s'être opéré pour le CLD...

4-2-2- Vers les rivières, eaux souterraines, estuaires et milieu marin

« Quiconque aura corrompu l'eau d'autrui [...] en y jetant certaines drogues, ou l'aura détournée en creusant ou enfin dérobée [...], outre la réparation du dommage, sera tenu de nettoyer la source ou le réservoir. »

Platon – Les Lois – Livre VIII

Les mécanismes de transfert sol-eau sont en particulier déterminés par l'affinité des molécules de pesticides pour les composants du sol (Rocle *et al.* 2009). Le rapport des concentrations dans le sol rapporté à celles dans l'eau, K_D , permet de mesurer le degré d'affinité du pesticide pour les composants du sol. Les données de la littérature concernant la capacité de sorption du CLD au sol sont extrêmement variables mais s'accordent quant à la description d'une valeur dite élevée⁴² ($35,56 < K_D < 144,96 \text{ L.kg}^{-1}$ ⁴³ selon Fernandez-Bayo *et al.* 2013b ; 2 000 à 10 000 L.kg^{-1} selon Cabidoche *et al.* 2006b). Présentant des K_D , K_{OC} , K_{OW} élevés, le CLD est très hydrophobe et peu soluble dans l'eau (solubilité dans l'eau à température ambiante et pH7 compris entre 1 et 3 mg.L^{-1}). Rien ne prédispose donc le CLD à contaminer les ressources en eau et pourtant...

4-2-2-1- Contamination du bassin versant au littoral : un constat sans appel

Les autorités américaines rapportent dès 1973, soit un an après la première APV française, la contamination des eaux continentales par le perchlordécone (matière active du Mirex[®]) appliqué comme insecticide. Cette substance présente une structure très proche du CLD et, comme ce dernier, elle est connue comme étant théoriquement insoluble (Borthwick *et al.* 1974). Suite à l'incident d'Hopewell, la contamination des eaux de la Chesapeake Bay et de la James River par le Képone[®] a été rapportée (Bahner *et al.* 1977; Huggett et Bender 1980).

Pour une meilleure appréciation de la contamination des ressources en eau des Antilles, il est nécessaire de rappeler les normes françaises de potabilité de l'eau fixées par le décret n°2011-1220 du 20 décembre 2011 (**tableau 3**).

⁴² Un K_D est considéré comme élevé lorsque qu'il est supérieur à 100 L.kg^{-1} (Domange 2005).

⁴³ Cela signifie qu'il y aura 35 à 145 fois plus de chlordécone fixée à un kg aux constituants du sol que contenu dans un litre de solution du sol

Tableau 3. Normes de potabilité de l’eau de consommation vis-à-vis des pesticides (tiré de Rateau 2013).

Niveau de traitement des eaux	Substance active individuelle	Somme des substances actives
Eau pouvant être distribuée sans traitement spécifique d’élimination des pesticides	< 0,1 µg/L	< 0,5 µg/L
Eau nécessitant un traitement spécifique d’élimination des pesticides avant distribution	0,1 µg/L < teneur < 2 µg/L	0,5 µg/L < teneur < 5 µg/L
Eau ne pouvant être utilisée qu’après l’autorisation du ministère de la santé et après traitement spécifique d’élimination des pesticides	> 2 µg/L	> 5 µg/L

Dès 1977, soit 5 ans après la première APV du Képone®, Snegaroff rapportait aux Antilles la pollution des sols de bananeraies et des milieux aquatiques avoisinants (eaux et sédiments) par l’HCH et le CLD. Les trois rivières testées (Grand Carbet, Rivière du Bananier, Petit Carbet) étaient toutes contaminées avec le CLD à des teneurs allant de 0,06 à 0,21 µg.L⁻¹; les sols avoisinants présentaient un niveau de contamination allant de 0 à 9,5 mg.kg⁻¹, et enfin, les sédiments présentaient des teneurs d’environ 0,135 mg.kg⁻¹ (nombre limité d’échantillons). Ne pouvant pas évaluer les conséquences d’une telle pollution, Snegaroff s’interrogeait non seulement sur l’impact des résidus du CLD sur les biocénoses aquatiques et terrestres mais également sur le comportement de ces résidus dans l’environnement (stabilité, dégradation, adsorption, accumulation, répartition dans le milieu, transfert, contamination des plantes...). Par ailleurs, il rappelait que, dans la mesure où le CLD était appelé à remplacer l’HCH de manière « durable », d’avantages de données étaient nécessaires pour que cette substance puisse obtenir une autorisation de mise sur le marché en bonne et due forme. Snegaroff donne le ton en précisant que « réaliser ce genre d’étude serait montrer qu’on se préoccupe enfin sérieusement des conséquences de l’emploi de pesticides en bananeraies et leurs répercussions sur la santé humaine, sur l’agriculture, et sur le potentiel économique de la Guadeloupe ». Snegaroff en « lanceur d’alerte » avait tiré le premier la sonnette d’alarme pressentant les conséquences désastreuses de l’utilisation de cet insecticide dans les bananeraies.

Toutefois à ma connaissance, il faudra attendre l’interdiction du CLD à l’aube des années 2000 pour qu’on se penche de nouveau sur la contamination des ressources en eau des Antilles... Ainsi une étude datant de 1993 sur la rémanence des pesticides dans l’estuaire du Grand Carbet

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

(Guadeloupe), l'une des rivières les plus exposées, rapporte que le CLD a été détecté dans les sédiments (8 fois sur 12) et dans l'eau (2 fois sur 2), à des concentrations supérieures à 0,1 mg.kg⁻¹ ou à 0,1 mg.L⁻¹, respectivement, avec une décroissance de ces concentrations selon un gradient allant de l'amont vers l'aval.

Le rapport Bonan et Prime (2001) rapporte des résultats d'enquêtes conduites par la DDASS et financées par la DIREN en Guadeloupe (1999-2000). Les résultats sont édifiants : seulement 16,7% des eaux de rivières (n=24) ne sont pas contaminées par le CLD (au seuil de détection de la méthode employée ne signifiant pas nécessairement qu'elles en soient indemnes), 16,7% sont dans les normes, et 66,6% montrent une teneur en CLD supérieure à la norme (0,1 µg.L⁻¹), dont 25% dépassent 10 fois la norme (**tableau 4**)... La contamination des eaux de rivières est avérée⁴⁴ mais aussi celles des eaux de sources⁴⁵ (plus de 50% dépassent le seuil de potabilité de 0,1 µg.L⁻¹), suggérant la contamination des eaux souterraines. Toutefois, les eaux de captage de forages semblent peu impactées, le CLD n'y étant pas détecté, mais le nombre d'échantillons testés reste faible (n=6). Les eaux brutes au niveau des captages (rivière, source et forage confondus) et les eaux de distribution ne sont pas épargnées : respectivement, 39,6% (n=101) et 32,4% (n=111) dépassent le seuil de potabilité (0,1 µg.L⁻¹). Les records enregistrés sont de 13, 3 µg.L⁻¹ au niveau du captage de la source Lumia et 1,4 µg.L⁻¹ au robinet d'un abonné...

En Martinique, l'Office de l'Eau a suivi la qualité chimique des cours d'eau (eau douce de surface) sur 28 stations de prélèvement entre 4 et 12 fois par an (Rateau 2013). Le CLD est le pesticide le plus fréquemment détecté à hauteur de 75%⁴⁶, suggérant une contamination généralisée et chronique. Dans 49% des cas de dépassement de la norme haute (2 µg.L⁻¹), il s'agit du CLD, suivi en deuxième position par des fongicides utilisés dans le traitement post-récolte des bananes (imazalil, thiabendazole, azoxystrobine et bitertanol) qui représentent 38% des cas. Dans 87% des cas de dépassement de la norme 2 µg.L⁻¹, les pesticides utilisés pour la production de bananes sont mis en cause...

L'IFEN (2006) et Robert (2011) ont rapporté la contamination des eaux souterraines, en Guadeloupe et en Martinique. Cette contamination semble toutefois moins importante que celle observée dans les eaux de surface (en fréquence de détection et en niveau de contamination). Ces données indiquent également que le CLD peut être lixivié et/ou lessivé.

⁴⁴ En Guadeloupe, les eaux de rivières représentent 84,6% de la consommation en eau (irrigation, hydroélectricité, industrie, et alimentation en eau potable). L'alimentation en eau potable est issue à 71,5% des rivières, à 17,5% des sources, et à 8,5% des forages (et à 2,5% de dessalement pour les îles de Saint-Barthélemy et Saint-Martin). La totalité de l'eau utilisée pour l'irrigation est issue des rivières (Bonan et Prime 2001).

⁴⁵ En Guadeloupe, 96,6% des eaux captées dans les sources finissent en bouteilles.

⁴⁶ 5b-hydro-chlordécone et β-HCH sont également fréquemment détectés à hauteur de 60 et 50% respectivement

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

Tableau 4. Niveau de contamination en CLD des eaux superficielles et souterraines, des sédiments en Guadeloupe et Martinique.

Lieu	Compartment étudié	Niveau de contamination	Référence
Guadeloupe	Eaux de rivières Sédiments	100% contaminées : 0,06 à 0,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 135 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ maximum	Snegaroff (1977)
Guadeloupe (Grand Carbet)	Eaux Sédiments	Déecté pour 2 échantillons sur 2 Déecté pour 8 échantillons sur 12	UNESCO (1993)*
Guadeloupe	Eaux de rivières (embouchure) Sources Forages Eaux brutes Eaux de distribution	Non-déecté pour 16,6% (n=24) 16,6% < 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 66,6% > 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ dont 25% > 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Non-déecté pour 7% (n=43) 9,3% < 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 58,1 % entre 0,1 et 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 25,6% > 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Non-déecté (n=6) 39,6% > 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=101) 32,4% > 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=111)	Bonan et Prime (2001)
Guadeloupe Martinique	Eaux superficielles Eaux souterraines Eaux superficielles Eaux souterraines	0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=10) 0,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=5) 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=35) 0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=4)	IFEN (2006)
Martinique	Eaux douces de surface	Déecté dans 75% des cas (28 stations, prélèvement 4 à 12 fois/an)	Rateau (2013)
Martinique	Eaux de surface Eaux souterraines Sédiments (exutoire) Sédiments (FdB-R**) Sédiments (FdB-G**)	20,4% non-déecté (n=48) 30,6% < 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 46,9 % compris entre 0,1 et 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 2,1% > 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 5,7% > 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=35) 5,7% > 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 22,7% non-déecté (n=22) 22,7% compris entre 1 et 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ 36,4% compris entre 10 et 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ 18,2% > 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ 92,9% < 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ (n=14) 7,1% > 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ 33,3% < 6 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$ (n=9) 66,7% compris entre 10 et 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}\text{PS}^*$	Robert (2011)
Martinique (Mansarde aval)	Rivière Eaux brutes Eaux filtrée < 1 μm MES*** > 1 μm Sédiments	0,453 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en moyenne (19 dates) 0,506 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (14 dates) 0,250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ 293 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 3 à 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=3x3)	Rocle <i>et al.</i> (2009)
Martinique	Sédiments MES***	38% compris entre 31 et 44 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=8) 62% non-déecté (<10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) 50% compris entre 22 et 57 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=8) 50% non-déecté (<10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Bocquené et Franco (2005)
Martinique	Sédiments de rivières	17% > 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n=23) 57% compris entre 3 et 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 26% non-déecté (<1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Bertrand <i>et al.</i> (2009)

* PS : poids sec

** FdB : fond de baie ; R : baie du Robert ; G : baie du Galion

*** MES : matière en suspension

* Cité par Bonan et Prime (2001)

Une étude prospective de 2012, conduite par l'ONEMA, concernant la contamination par les pesticides émergents des cours d'eau dans les DOM a fait l'objet d'une présentation lors du congrès du « Groupe Français des Pesticides » 2014 (Botta *et al.* 2014) où il a été rapporté que 90% des cours d'eau de Guadeloupe et 100% des cours d'eau de Martinique seraient contaminés par le CLD (rapport à paraître).

Bertrand *et al.* (2009) ont relevé dans 74 % (17/23) des échantillons de sédiments issus d'exutoire des rivières martiniquaises des concentrations en CLD comprises entre 3 à 552 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, le restant étant, non pas non-contaminé, mais sous le seuil de détection ($< 1\mu\text{g.kg}^{-1}$). La majorité des échantillons (57%) présente des teneurs en CLD de l'ordre de quelques $\mu\text{g.kg}^{-1}$ à quelques dizaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$, en accord avec les travaux de (Bocquené et Franco 2005; Rocle *et al.* 2009; Robert 2011). Le record est détenu par l'IFREMER qui a relevé des teneurs s'approchant des 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de sédiments à l'exutoire de rivières (Robert 2011).

L'ensemble des données présentées sont répertoriées dans le **tableau 4**.

Le CLD appliqué de manière répétée dans les bananeraies contamine les sols qui agissent comme une source de contamination des ressources en eau. L'effort de surveillance mis en œuvre pour suivre la qualité des eaux (eaux de surface, souterraines et des estuaires) aux Antilles révèle une contamination chronique et importante du CLD. Ces études montrent par ailleurs le transfert du CLD depuis le bassin versant vers les estuaires et le compartiment marin. Comment une molécule stable, hydrophobe et peu soluble a-t-elle contaminé la quasi-totalité des ressources en eau des Antilles ?

4-2-2-2- Mécanismes de transfert sol-eau

Deux types de transport peuvent être distingués selon que les écoulements des eaux s'effectuent à la surface du sol (transfert horizontal ou ruissellement) ou dans le sol en profondeur (transfert vertical ou infiltration).

➤ Ruissellement *versus* infiltration

Tout d'abord, il est nécessaire de rappeler les conditions pédoclimatiques spécifiques des Antilles qui se caractérisent par des événements pluvieux extrêmes entraînant des flux hydriques importants. Ces flux sont soumis en grande partie au ruissellement (entraînant un important flux érosif) mais aussi au transfert vertical en raison de la forte infiltrabilité des sols. En effet, bien que les sols aient des capacités d'infiltration élevée (conductivité hydraulique à saturation supérieure à 60 mm/h), la forte pluviométrie des Antilles (2500-4500 mm par an)⁴⁷ dépasse souvent la capacité

⁴⁷ A titre comparatif, en région Basse-Normandie réputée pluvieuse, l'Ifremer a mesuré entre 700 et 1300 mm de précipitation par an (http://envlit.ifremer.fr/region/basse_normandie/milieu/climatologie/la_pluviometrie).

d'infiltration provoquant du ruissellement (Cattan *et al.* 2006). De plus, le paysage de mornes⁴⁸ (en pente) est favorable à la formation de ravines⁴⁹ lors d'évènements pluvieux importants s'accompagnant d'une érosion importante des sols. En bananeraie, le ruissellement moyen mesuré en Guadeloupe sur andosol à l'échelle d'une pluie varie du simple au double (de 5 à 11%) avec des taux maximum mesurés de 34%. Les pratiques agricoles influent fortement sur l'équilibre en quantités d'eau ruisselées et infiltrées en modifiant la capacité d'infiltration des sols (augmentation par labour) et la rugosité de surface (paillage ou couvert végétal) (Cattan *et al.* 2006). De plus, la redistribution des eaux de pluie par la canopée, et spécialement l'écoulement des eaux vers le bas de la tige de la plante, le « stemflow »⁵⁰, modifie le taux de précipitation incident sur la surface du sol. Dans le cas des bananiers (**figure 18**), le feuillage en forme d'impluvium accentue la collecte des eaux de pluie qui se concentrent alors à leurs pieds, où était également appliqué le CLD, devenant ainsi des zones de départ de ruissellement (Charlier *et al.* 2009).



Figure 18. Amplification du « stemflow » dû au feuillage en forme d'impluvium du bananier.

Ce phénomène de « stemflow » cause des zones d'infiltration préférentielles : $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ au niveau de l'inter-rang *versus* $0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ sous les bananiers au début de la période humide, teneurs pouvant atteindre $0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $2,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ en période de fortes pluies⁵¹ (Cabidoche *et al.* 2006a). L'érosion des sols⁵² engendrée par d'importants ruissellements résultant d'une pluviométrie importante est connue pour entraîner des matières particulaires contaminées par les organochlorés dans les cours d'eau adjacents où ils peuvent se désorber et contaminer la ressource aquatique (Bonvallot et Dor 2004; Marie *et al.* 2007). Toutefois dans le cas du CLD, il a été suggéré que le ruissellement ne participerait peu ou pas à l'extension de la contamination (Belpomme 2007). Cette hypothèse est étayée par le fait que le transfert inter-parcellaire de CLD est rare, les sols pollués étant ceux ayant reçu le CLD. Toutefois, des cas de transfert inter-parcellaire ont été observés au niveau de talwegs en

⁴⁸ Colline d'une île ou d'un littoral

⁴⁹ Incisions créées par le ruissellement des eaux. Leur formation est favorisée sur les versants nus et imperméables soumis à des précipitations pluvieuses courtes mais intenses.

⁵⁰ De l'anglais, *stem* = tige, *trunc*, et *flow* = écoulement

⁵¹ Données basées sur l'analyse d'eaux drainées dans des lysimètres.

⁵² Deux types d'érosion hydrique coexistent en bananeraie : l'érosion en nappe, diffuse sur toute la parcelle, liée à l'énergie cinétique des gouttes de pluie qui en tombant arrachent les particules du sol, et l'érosion linéaire, induite par des flux d'eau qui entaillent les parcelles et forment des ravines de plus en plus larges et profondes (Marie *et al.* 2007).

aval des zones contaminées⁵³ lorsque le ruissellement transporte des particules terreuses (Cabidoche *et al.* 2006a; Cabidoche *et al.* 2009). Par ailleurs, des parcelles n'ayant pas reçu de CLD peuvent être contaminées au niveau des terrasses et replats d'émergence de nappes phréatiques contaminées⁵⁴. A titre d'exemple, un des bassins versants du Robert (Martinique), le bassin Voltaire, qui, compte-tenu de l'absence d'antécédent de culture bananière (*i.e.* d'usage de CLD), ne devrait pas être contaminé, est contaminé à un faible niveau. Dans ce cas l'hypothèse avancée pour expliquer cette contamination, en l'absence de l'application de CLD sur le bassin versant, est la contamination du sol par des remontées de la nappe sous-jacente contaminée à de fortes teneurs en CLD (Rocle *et al.* 2009) qui viendraient contaminer la rivière Voltaire.

Les eaux souterraines sont également contaminées en raison du lessivage (transport solide *i.e.* la molécule est adsorbée aux particules du sol) et/ou de la lixiviation (transport dissout) du CLD depuis l'horizon de surface. Cette contamination chronique alimente lentement, mais de manière quasi-permanente, le réseau hydrographique et donc les ressources en eau. D'après Cabidoche *et al.* (2006b et 2009), la teneur en CLD des eaux d'infiltration est en cohérence avec la teneur mesurée dans le sol, tandis que la teneur en CLD des eaux de ruissellement est faible représentant moins de 3% du flux de CLD dans la fraction aqueuse. L'infiltration serait alors le vecteur principal de transfert (Cattan *et al.* 2007; Cabidoche *et al.* 2009).

Quoi qu'il arrive (pollution événementielle pouvant participer à une arrivée massive de polluant dans le réseau hydrographique et/ou pollution chronique et diffuse participant à un transfert constant, faible et de longue durée vers le réseau hydrographique), le CLD est transféré du sol vers les ressources en eau causant sa dispersion dans l'environnement. Sous quelle forme le CLD est-il transporté : sous forme dissoute et/ou adsorbée aux particules ?

➤ Transport sous forme dissoute *versus* adsorbée

Le transport de pesticides est classiquement décomposé en trois composantes : l'émission (c'est à dire la remobilisation) du pesticide, le transfert à proprement parler et le dépôt (Rocle *et al.* 2009). Les processus de remobilisation sont (i) la diffusion, *i.e.* la convection des molécules dissoutes dans la solution du sol vers le réseau hydrique, (ii) la désorption d'une partie des pesticides adsorbés sur les particules du sol vers la solution du sol ou le réseau hydrique (iii) la dissolution, *i.e.* des pesticides stockés à l'état solide dans la solution du sol, et (iv) le décapage *i.e.* la mise en suspension des pesticides à l'état solide ou adsorbés. Dans les trois premiers cas, le pesticide est transporté sous forme de soluté dans le réseau hydrogéologique. Dans le dernier cas (le décapage), le pesticide est

⁵³ Des parcelles contaminées ont pu entraîner une contamination des zones réceptrices d'écoulements concentrés sur des parcelles aval (*i.e.* les talwegs, de l'allemand *tal*, « vallée », et *weg*, « chemin »).

⁵⁴ C'est le cas d'une parcelle d'arrière-mangrove imprégnée par les eaux d'émergence d'une nappe située sous des sols cultivés en banane à l'époque des apports de chlordécone (Cabidoche *et al.* 2006a).

transporté sous forme adsorbée ou solide aussi bien par les eaux de ruissellement (eaux de surface) ou de lessivage (eaux souterraines). La plupart des pesticides, sont transférés sous forme dissoutes (diffusion, désorption, dissolution) vers le réseau hydrographique. Toutefois, lorsque la charge en MES est élevée ($> 5 \text{ g.L}^{-1}$), lorsque les pesticides sont peu solubles ($< 10 \text{ mg.L}^{-1}$) ou présentent un K_D élevé ($> 100 \text{ L.kg}^{-1}$), ils sont transférés sous la forme solide (Domange 2005). Par conséquent, les propriétés du CLD et les conditions pédoclimatiques des Antilles laissent donc penser que le transfert sous forme dissoute ne serait pas le principal processus responsable de la contamination des ressources en eau.

...pluie et érosion : transport du sol au littoral...

En effet, comme nous l'avons déjà vu, le K_D du CLD est élevé et, pour cette raison, il est adsorbé sur les constituants du sol. Une faible fraction de la quantité épandue se retrouve dans la solution du sol où elle est susceptible d'être transférée par lixiviation (transfert vertical sous forme dissoute) et par ruissellement (transfert horizontal) vers les ressources en eaux (Fernandez-Bayo *et al.* 2013b). D'un point de vue quantitatif et, en faisant quelques approximations, on peut estimer que dans un sol contaminé avec 35 mg.kg^{-1} de CLD, la solution de sol contiendrait de $0,0175$ à 1 mg.L^{-1} de CLD (en prenant en compte les valeurs extrêmes de K_D , *i.e.* 35 et $10\,000 \text{ L.kg}^{-1}$).

De plus, le pédoclimat des Antilles conduit à l'érosion importante de la couche superficielle des sols lors d'évènements pluvieux extrêmes entraînant une charge importante de particules terrigènes dans les ressources en eau superficielle qui peuvent être véhiculées jusqu'aux estuaires⁵⁵ (Brugneaux *et al.* 2004; Bertrand *et al.* 2009; Robert 2011). Ainsi, sur la frange littorale, les apports terrigènes les plus récents sont retrouvés dans sur les couches superficielles des sédiments qui présentent une teneur en CLD plus forte que les sédiments d'origine marine (Marie *et al.* 2007; Robert 2011). De plus, l'intensité de la contamination des sédiments par le CLD est inversement proportionnelle à la distance de la frange côtière montrant l'importance de la contribution de l'érosion à la dispersion de la contamination sous forme particulaire depuis les parcelles agricoles vers les sédiments des baies (Marie *et al.* 2007; Bertrand *et al.* 2009; Robert 2011).

...transport dans les rivières...

Bien qu'il soit avéré que les apports terrigènes sont à l'origine de la contamination des sédiments lotiques et marins, on peut se poser la question de la réversibilité de l'adsorption du CLD. La littérature rapporte un coefficient de partage sédiment-eau élevé avoisinant 5.10^3 (Strobel *et al.* 1981). Cette valeur élevée montre une forte affinité du CLD pour les sédiments ce qui n'est pas très surprenant au regard de la forte hydrophobicité du CLD. Toutefois, elle est à prendre avec précaution

⁵⁵ Charge torrentielle : 5 g.L^{-1} de sédiments en suspension (Rocle *et al.* 2009).

parce qu'elle résulte d'une étude effectuée sur des sédiments de la James River (Virginie, USA), et non pas sur des sédiments d'une rivière des Antilles (coefficients de partage variables selon la composition des sédiments). Rocle *et al.* (2009) rapportent des teneurs de CLD plus élevées dans les matières en suspension ($> 1\mu\text{m}$, de l'ordre de $300 \mu\text{g.kg}^{-1}$) dans la colonne d'eau que dans les sédiments (de 3 à $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Dans cette étude il n'est pas fait état de biais qui pourraient être dû à l'extractabilité du CLD de ces deux matrices différentes du point de vue physicochimique. Toutefois, sur la base de ces résultats, il semblerait que la granulométrie joue un rôle prépondérant dans la répartition des transferts de la molécule. Dans la littérature deux mécanismes de transport de particules solides dans les rivières sont décrits : le transport par charriage⁵⁶ ou par suspension⁵⁷. Le charriage représenterait moins de 10% du transport solide total⁵⁸ (hors transport dissout), les éléments les plus fins présentant un pouvoir d'adsorption plus fort (surface spécifique plus importante, caractère hydrophobe plus marqué, taux d'aromaticité plus élevé du fait de l'humification) que les matériaux grossiers (Rocle *et al.* 2009). Le CLD aurait, comme attendu, tendance à s'adsorber préférentiellement sur les MES plus fines (**figure 19**).

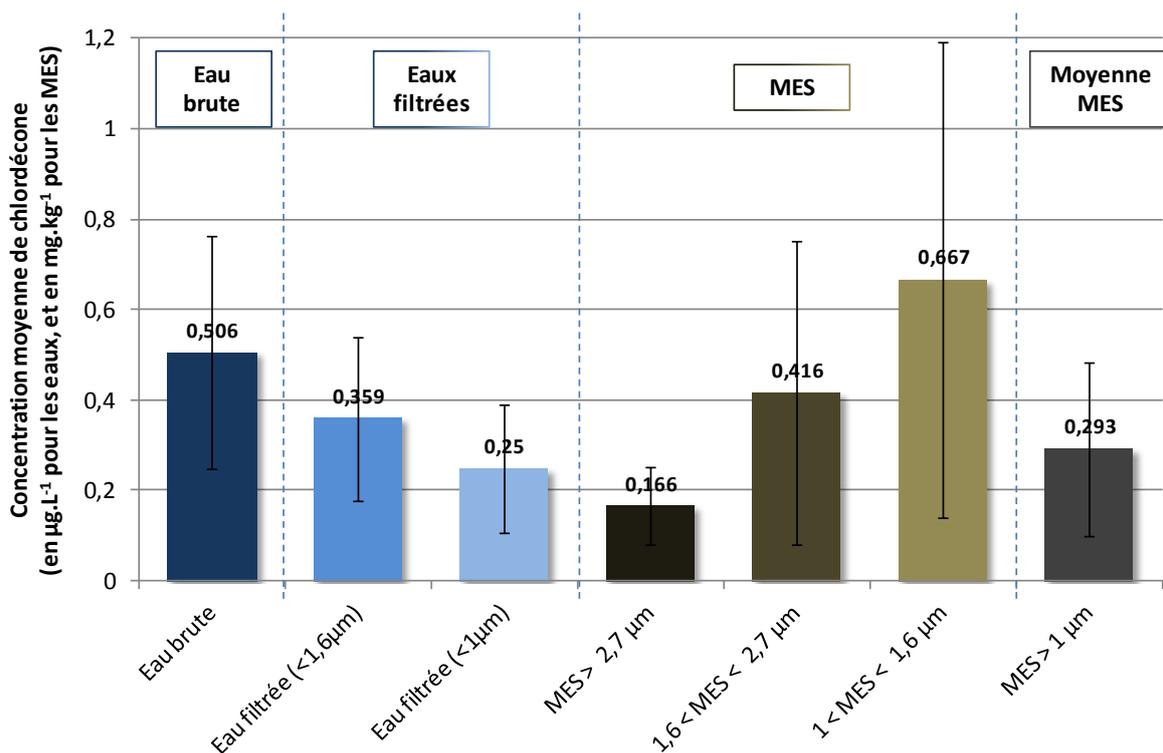


Figure 19. Concentration moyenne en CLD sur les différents compartiments à l'aval de la rivière Mansarde lors d'évènement de crue (reproduit de Rocle *et al.* 2009).

⁵⁶ Transport des matériaux du lit souvent plus grossiers entraînés au fond du cours d'eau par le courant sans qu'il y ait mise en suspension.

⁵⁷ Mise en suspension de particules dont la taille est suffisamment faible pour être transporté par l'eau.

⁵⁸ Ce taux a été calculé sur la base d'une expérimentation sur la ravine Mansarde, et peut représenter jusqu'à 40% du transport solide en début de saison des pluies, pour diminuer sensiblement à 5% en fin de saison (Rocle *et al.* 2009).

D'après ce jeu de données, le transport *via* les matières en suspension représenterait 50% du transport total (0,25 mg.kg⁻¹ dans l'eau filtrée et 0,3 mg.kg⁻¹ dans les MES). Toutefois, ces données sont à prendre avec précaution, puisque en effet, au sein de l'eau filtrée à 1 µm subsistent des MES très fines dont il conviendrait d'estimer la teneur en CLD, connaissant l'affinité du CLD pour les particules fines. D'après les courbes établies par Leonard (1990), à partir de l'ordre de grandeur de K_D rapporté par Cabidoche *et al.* (2006b) (*i.e.* entre 2 000 et 10 000 L.kg⁻¹), et d'une estimation de la charge en MES d'un courant en régime torrentiel (environ 5 g.L⁻¹), Rocle *et al.* (2009) ont estimé que la part relative de CLD transportée par les sédiments dans un cours d'eau lors d'une crue est comprise entre 55% et 100% (**figure 20**). Ils suggèrent même que la fraction de CLD transportée sous forme adsorbée tendrait vers 100% pour les débits les plus importants.

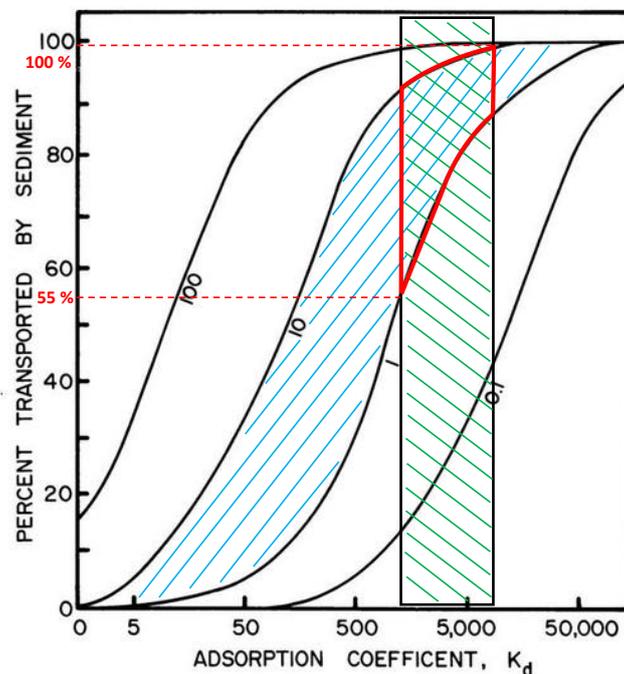


Figure 20. Part de pesticide transporté par les sédiments en fonction de la teneur en sédiments (chiffre sur les courbes en g.L⁻¹) d'après Leonard (1990). L'encadré rouge présente le positionnement des domaines concernés par le CLD en Martinique d'après Rocle *et al.* (2009).

Pour conclure, les travaux scientifiques menés jusqu'à présent semblent indiquer que le CLD est principalement transporté adsorbé à des particules de sol. Toutefois, le transport sous forme dissoute aurait également lieu mais dans la limite de la solubilité du CLD dans l'eau. Ainsi le CLD serait transporté du sol vers les ressources en eau de manière chronique (faible dose) par infiltration et de manière aiguë (forte dose) par le flux érosif provoqué par le ruissellement. Une fois exporté du sol vers les ressources en eau de surface, le CLD est transporté tout du long du bassin versant pour atteindre les estuaires et contaminer les sédiments marins. Le CLD contaminant les eaux souterraines pourrait de nouveau contaminer les sols et/ou les eaux de surface lors d'évènement de battance de la nappe phréatique.

4-2-3- Vers les plantes

Dès 1977, Snegaroff s'inquiétait de la phytotoxicité des résidus de CLD : « *Les bananeraies ont reçu des traitements répétés et massifs avec des insecticides : l'HCH technique puis le chlordécone. Cela soulève le problème de pollution des sols dans les secteurs de bananeraies, et d'autant plus que dans certains endroits, celles-ci sont remplacées par des cultures maraîchères. Les résidus d'insecticides dans les sols peuvent être considérés de deux points de vue : risque de phytotoxicité en cas de pollution trop forte, et risque de contamination des plantes à partir de résidus dans le sol. Ce risque est différent suivant que les cultures de remplacement des bananiers sont des cultures de légumes comme les aubergines ou de plantes-racines* ». Aujourd'hui que savons-nous du transfert du CLD du sol vers les végétaux ?

Une étude menée en hydroponie a montré que des plants de pois et de haricots cultivés avec une solution nutritive comprenant du Mirex® marqué au ¹⁴C absorbaient le toxique et l'accumulaient dans certains de leurs tissus après 48h d'exposition (Mehendale *et al.* 1972). Ces travaux précurseurs ont montré que ces espèces végétales étaient capables d'absorber le perchlordécone par son système racinaire et de le stocker dans les tissus végétaux...

En 2002, un lot de patate douce en provenance de la Martinique est saisi lors d'un contrôle à son arrivée à Dunkerque car il présentait une forte contamination par le CLD. A la suite de cet incident, des études ont été conduites afin de mieux comprendre le mode de contamination des denrées alimentaires par le CLD (Achard *et al.* 2007). Ces études ont démontré que le transfert du CLD vers les plantes pouvait avoir lieu (selon différents processus qui sont décrits ci-après) et qu'il pouvait aboutir au dépassement de la LMR définie par l'Union Européenne (i.e. 20 µg de CLD par kg de matière fraîche) pour les denrées alimentaires.

Les efforts menés par les scientifiques ont permis de montrer que (i) la contamination des plantes est proportionnelle à la teneur en CLD des sols, (ii) qu'elle dépend du type de sol, et notamment de sa capacité à retenir le CLD et de sa teneur hydrique, (iii) que les cultures n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis du CLD (« légumes-racines » vs cucurbitacées vs fruits aériens), et (iv) que la distribution de la contamination est hétérogène au sein des plantes (peau vs pulpe ; base de la tige vs fruit aérien). Les bases scientifiques de ces différentes assomptions sont détaillées ci-dessous.

4-2-3-1- La contamination des plantes est proportionnelle à la teneur en CLD des sols

Le niveau de pollution du sol (source) régit sa capacité à contaminer les organes souterrains des plantes (puits). En effet, plus un sol est pollué, plus le CLD sera transféré vers la plante (Achard *et al.* 2007; Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012; Woignier *et al.* 2012) (**figure 21**). Cette relation de proportionnalité est vérifiée quelle que soit l'espèce. Par conséquent le niveau de contamination du

sol semble être un bon proxy pour évaluer le risque de contamination des plantes (et notamment des légumes racines dont la culture et la consommation sont importantes aux Antilles).

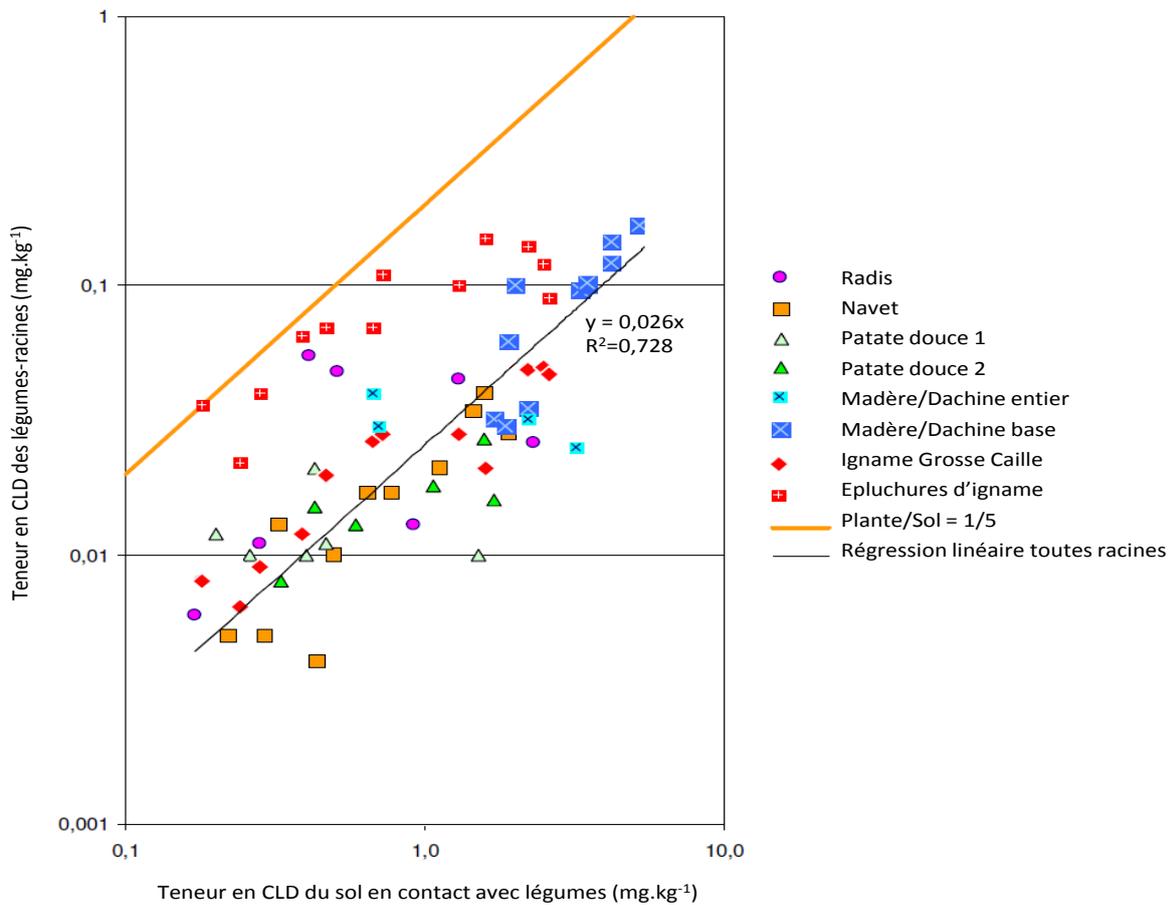


Figure 21. Teneur en CLD observée dans les racines et tubercules de différents légumes en fonction de la teneur en CLD observée dans les sols (tiré et modifié de Cabidoche *et al.* 2006a).

La droite orange (végétaux = 0,2 sols) représente le transfert maximal observé du CLD vers les cultures : aucune donnée ne montre une teneur en CLD des racines et tubercules au-delà de 20 % de celle mesurée dans le sol. Au-dessus de cette courbe, le risque de contamination est nul. Tous les points respectent l'inégalité $y \leq 0,2 x$, avec y , la teneur en CLD de la plante (mg.kg^{-1} de matière fraîche) et x , la teneur en CLD du sol (mg.kg^{-1} de sol sec).

Il est à noter que, quel que soit l'espèce ou l'organe considéré, les teneurs mesurées en CLD au sein de la plante sont toujours inférieures aux teneurs mesurées dans les sols. Sur la base de cette observation, des auteurs ont suggéré que le transfert du CLD du sol vers la plante pourrait s'effectuer de manière passive (Lesueur-Jannoyer *et al.* 2012).

4-2-3-2- La contamination des plantes par le CLD dépend du type de sol

Le transfert du CLD du sol vers la plante dépend également des propriétés physicochimiques du sol : son transfert vers les plantes est plus élevé dans un sol non-allophanique (type nitisol ou ferralsol) que dans un sol allophanique (type andosol) (**figure 22**). Ainsi, le transfert ($[\text{CLD}]_{\text{PLANTE}} /$

[CLD]_{sol}) est 3 fois plus élevé (Woignier *et al.* 2012), voire 10 fois plus élevé dans le cas de l'igname (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012) dans un sol non-allophanique que dans un sol allophanique.

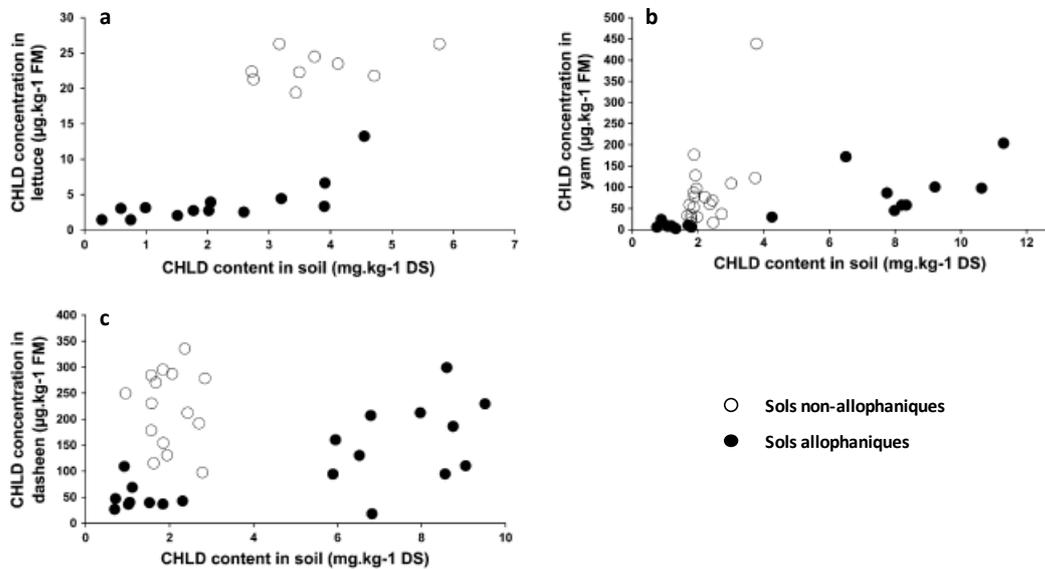


Figure 22. Teneur en CLD dans les organes de végétaux (feuilles de laitue (a), tubercule d'igname (b), tubercule de dachine (c)) en fonction de la teneur en CLD dans des sols non-allophaniques ou allophaniques (tirée de Woignier *et al.* 2012)

FM : matière fraîche ; DS : sol sec. Les teneurs en CLD sont données avec 30% d'intervalle de confiance.

Cette différence de potentiel de transfert entre sol allophanique et non-allophanique peut s'expliquer par leur potentiel à retenir le CLD. Pour un même niveau de pollution du sol, le K_{oc} inférieur et l'absence d'allophane du nitisol aboutissent à une plus grande contamination de la phase aqueuse, le rendant plus disponible (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012; Woignier *et al.* 2012). Ainsi « à contaminations égales », les sols allophaniques seront « moins contaminants » pour les cultures que les sols non-allophaniques. Par ailleurs, les pratiques culturales telles que l'addition de compost, connu pour modifier la porosité du sol (surface spécifique et volume de pores), réduisent fortement la labilité du CLD et, par conséquent, la contamination des tissus des plantes (Fernandes *et al.* 2010). Il est évident que la réduction de la contamination des cultures par addition de compost, et par conséquent la diminution de l'exposition de la population par la voie alimentaire, n'est pas une fin en soi mais bien une pratique présentant une utilité à court-terme.

4-2-3-3- Variabilité de la contamination avec le CLD selon le type de culture et distribution hétérogène au sein même des plantes

La contamination avec le CLD est variable selon le type de culture : sans surprise, les légumes-racines (patates douces, dachines⁵⁹, ignames, carottes, navets, radis...), très consommés aux Antilles, se développant dans les sols sont les plus contaminés (i.e. taux de transfert maximum sol-plante (i.e. ratio des concentrations dans la plante et dans le sol) de 20%) ; les plantes se développant à la surface du sol, telles que les cucurbitacées sont susceptibles d'être contaminées (giraumon, courgette, concombre, melon...); les produits issus des cultures fruitières arbustives (ananas, banane, mangue, goyave...) et de certaines cultures maraîchères (tomate, aubergine, haricot) sont épargnées par la contamination (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012). Toutefois, on peut noter que les plantes maraîchères et fruitières sont contaminées par le CLD (transfert sol-plante) sans fort heureusement que les parties consommées soient contaminées.

➤ Légumes-racines

Même si de nombreux processus peuvent entrer en compte dans la contamination des végétaux par le CLD, la contamination surfacique des organes souterrains (racines, tubercules) au contact des sols pollués compte pour une part principale (Fernandes *et al.* 2010; Woignier *et al.* 2012). Ainsi, une étude menée dans un système de « split-root » rapporte que des ignames dont les tubercules étaient cultivés dans un sol sain et dont les racines étaient dans un sol contaminé étaient très nettement moins contaminés par le CLD tandis que des ignames dont le tubercule et les racines étaient cultivés en sol contaminé (Cabidoche *et al.* 2006b) (**figure 23**). Cette étude a démontré que la contamination surfacique était le processus principal.

⁵⁹ Plante cultivée en région tropicale pour son tubercule. Diverses dénominations lui sont attribuées : taro, colocase, dachine, madère ou bien chou de Chine (les 3 derniers étant les plus usités aux Antilles françaises).

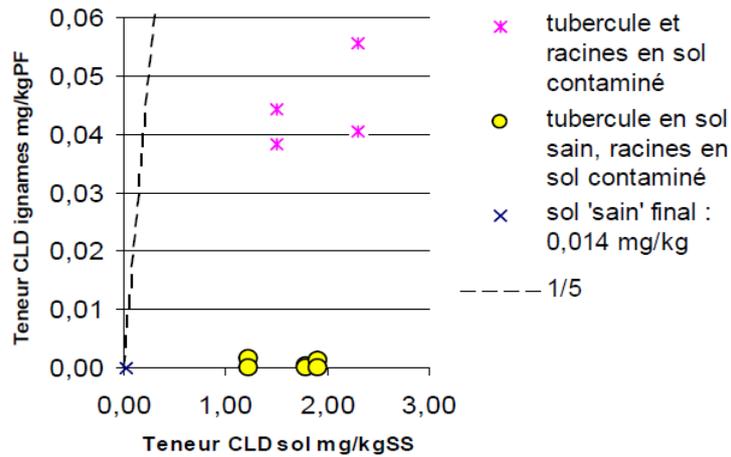


Figure 23. Teneur en CLD contenue dans les tubercules d’ignames en fonction de la teneur en CLD du sol. Cet essai a été mené avec un dispositif « split-root » pour tester l’hypothèse de contamination par le CLD par contact du sol contaminé avec le tubercule de l’igname (Cabidoche *et al.* 2006b).
PF = poids frais ; SS = sol sec

L’analyse de la contamination de légumes-racines cultivés dans des sols contaminés a montré que la peau était 4 à 20 fois plus contaminée que la pulpe de la patate douce et de l’igname, respectivement (**figure 24**) (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012; Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012). Ceci renforce l’hypothèse d’une contamination des légumes-racines principalement par contact. En effet, si la contamination était majoritairement due au flux de sève contaminée, la pulpe serait préférentiellement contaminée (vu qu’elle agirait comme un puits pour le CLD dans cette situation). Toutefois, une faible exportation du CLD vers les parties aériennes existe comme le montre la contamination de feuilles de patates douces (Cabidoche *et al.* 2006b), et de feuilles de radis contaminées à $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ versus $1\,500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour la racine comestible (Fernandes *et al.* 2010).

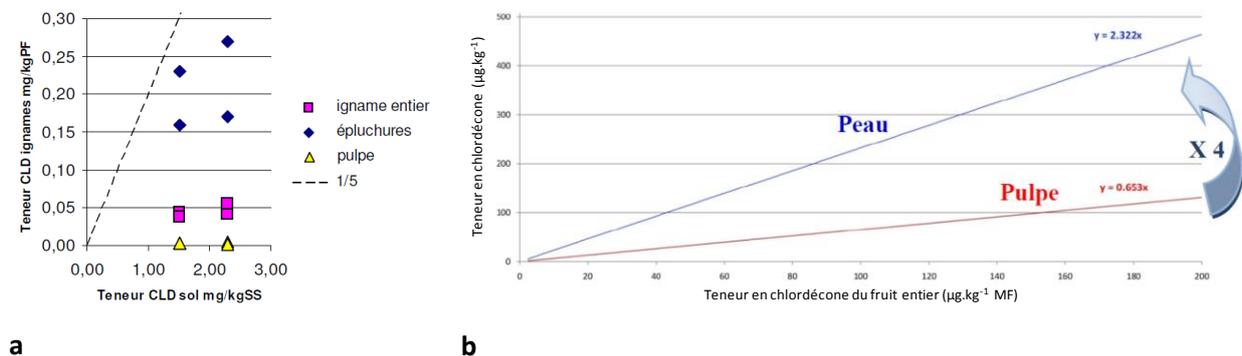


Figure 24. a- Teneur en CLD observée dans des différents tissus de l’igname en fonction de la teneur en CLD dans les sols (Cabidoche *et al.* 2006a) ; b- Teneur en CLD dans la peau et la pulpe de la patate douce en fonction de la teneur en CLD mesurée dans le fruit entier (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).

PF ou MF = Poids frais, matière fraîche. SS = sol sec

Des modèles simples indiquent que le niveau de contamination de la peau de légumes racines dépend de la surface d'échange et de la durée du cycle de développement (temps de contact) de l'organe sous-terrain (**figure 25**). Plus le légume-racine aura un développement lent et plus il aura une surface spécifique élevée, plus son épiderme sera contaminé par le CLD (Cabidoche *et al.* 2006b).

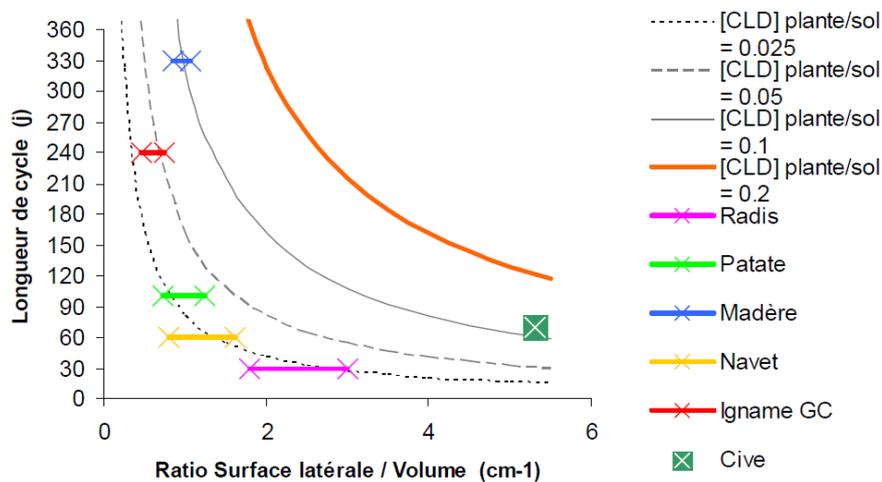


Figure 25. Abaque de contamination de légumes-racines par le CLD en fonction de la surface d'échange et de la durée du cycle de développement des organes souterrains (tirée de Cabidoche *et al.* 2006b).

➤ Organes rampants

Aux Antilles, les cucurbitacées ont parfois été montrées comme étant contaminées au-delà de la LMR ; le taux de transfert sol-plante est au maximum de 2% (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012). La contribution du concombre et giraumon à l'exposition humaine par l'alimentation n'est pas négligeable en raison de leur consommation fréquente aux Antilles (Dubuisson *et al.* 2007), sachant aussi qu'ils sont faciles à cultiver et souvent présents dans les jardins créoles (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).

Bien qu'il existe un contact partiel des organes comestibles des cucurbitacées avec le sol pollué, l'hypothèse de l'absorption racinaire du CLD est largement privilégiée. En effet, ces plantes sont connues pour leurs capacités d'extraction de différents polluants du sol probablement en raison de mécanismes particuliers d'acquisition des nutriments (White *et al.* 2005). Les cucurbitacées sont connues pour émettre des acides organiques dans leurs exsudats racinaires permettant de désorber des molécules persistantes (dioxines et furanes) et d'augmenter leur disponibilité pour un prélèvement racinaire (Huelster *et al.* 1994; Gent *et al.* 2005). Campanella et Paul (2000) ont eux établi l'hypothèse selon laquelle des exsudats racinaires pourraient se lier au polluant, puis le complexe formé deviendrait alors assez hydrophile pouvant être absorbé par les racines et être transféré *via* le flux de sève vers les différents organes de la plante.

➤ Fruits aériens

Le transfert sol-plante du CLD n'affecte pas la majorité des cultures arbustives fruitières ou maraîchères dont les parties consommées ne sont pas contaminées par le CLD (contamination nulle ou inférieure à $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ donc en-dessous de la LMR fixée à $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012). Par exemple, Woignier *et al.* (2012) ne détectent pas de CLD dans des tomates cultivées sur des sols contaminés. Des analyses de teneurs en CLD dans les différents organes de bananiers cultivés sur un andosol (riche en allophane) montrent une dilution dans les différents organes de la plante depuis la souche vers les fruits (**figure 26**).

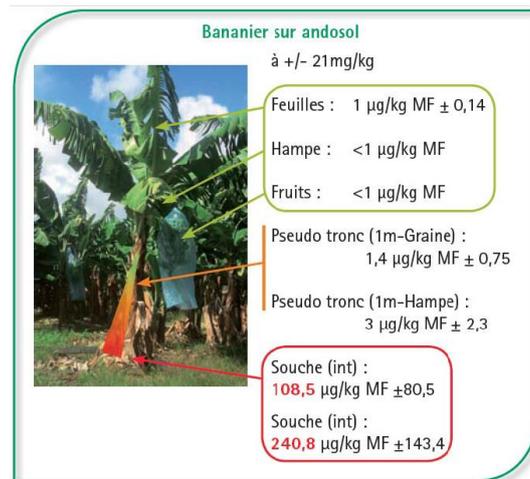


Figure 26. Contamination par le CLD des différentes parties de bananiers cultivés sur un andosol fortement pollué (tirée de Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).

Ces données indiquent que le CLD est assez peu mobile dans le bananier, la majeure partie de la contamination étant détectée sur la souche du bananier et qu'il atteint dans de faibles concentrations ($< 1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) les fruits (en considérant que toutes les précautions ont été prises lors de la récolte des fruits *i.e.* sans contact avec le sol). De manière similaire, la canne à sucre présente une contamination en gradient le long de la tige ; le bas de tige étant nettement plus contaminé (1 à $130 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de matière fraîche *versus* moins de $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ en haut de tige) (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012). Malheureusement, dans le cas de la canne à sucre, la partie basse est la plus sucrée et donc la plus appréciée pour une consommation familiale... Pour cette raison, la canne est classée, comme les cucurbitacées, comme plante à risque moyen, bien qu'aucune contamination du sucre et du rhum n'ait été observée (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).

De nombreuses interrogations subsistent sur les processus impliqués dans le transfert du CLD depuis le sol vers la plante : Quels sont les facteurs qui affectent la biodisponibilité du CLD pour la plante ? Le CLD transfère-t-il par la voie apoplastique⁶⁰ ou par la voie symplastique⁶¹ ? Existe-t-il des

⁶⁰ Espace intercellulaire.

⁶¹ Communication entre cytoplasmes des cellules.

voies de circulation privilégiées dans la plante (phloème, xylème,...) ? Et concernant la physiologie du prélèvement par la racine : quel type d'interactions existe-t-il entre la racine et la molécule de CLD ? Sous quelle forme le CLD est-il transféré ? Quelle est la voie de pénétration de la molécule dans la racine ? (Guimont 2006). La compréhension de ces processus est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait permettre de donner les clés pour utiliser la plante pour développer une méthode de phytoremédiation des sols contaminés par le CLD.

4-3- Bioaccumulation : la chaîne alimentaire est-elle contaminée avec le CLD ?

4-3-1- Définitions

La bioaccumulation désigne le processus par lequel un organisme absorbe (par toutes les voies d'exposition possible : la nourriture, l'eau, l'air et le sol) et accumule une substance chimique dans ses tissus. Il y a bioaccumulation lorsque l'absorption de contaminant excède les capacités de métabolisation et d'excrétion de l'organisme l'ayant ingéré. La bioaccumulation étant proportionnelle à la durée d'exposition, la concentration de polluant dans les tissus augmente lorsque l'organisme vieillit (Tissier *et al.* 2005; Rocle *et al.* 2009; Bodiguel *et al.* 2011).

La bioconcentration est définie comme l'absorption d'un contaminant à partir du milieu ambiant et son accumulation à une concentration supérieure à celle présente dans l'environnement. Lorsque les constantes de cinétique d'absorption et d'élimination du contaminant sont connues, le facteur de bioconcentration (BCF) peut être calculé à partir du rapport de ces deux constantes. Toutefois, dans la plupart des cas, le BCF équivaut au rapport entre la concentration de la substance toxique mesurée dans l'organisme et sa concentration dans l'environnement, à l'équilibre (Tissier *et al.* 2005; Bodiguel *et al.* 2011).

La bioamplification ou biomagnification est définie comme l'accumulation et le transfert du contaminant le long de la chaîne alimentaire *via* l'ingestion de nourriture contaminée. Le facteur de bioamplification est défini comme le rapport de la concentration dans la chair du prédateur et celle de la nourriture. La concentration du contaminant est d'autant plus forte que l'organisme est à un niveau élevé de la chaîne trophique (Tissier *et al.* 2005; Rocle *et al.* 2009; Bodiguel *et al.* 2011).

4-3-2- Point sur les LMR

Avant 2005, aucune LMR relative à la teneur en CLD dans les denrées alimentaires d'origine animales et végétales n'avait été établie. Ainsi, les produits de consommation étaient normés par la limite de quantification analytique couramment admise de 10 µg.kg⁻¹ (Torny 2010).

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

Les arrêtés ministériels du 5 et 10 octobre 2005 définissent la teneur maximale en CLD tolérée dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine à hauteur de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les viandes de volaille, et 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les autres denrées d'origine animale, et dans les denrées d'origine végétale destinées à la consommation humaine à hauteur de 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les denrées végétales « à risques » (carotte, concombre, dachine, igname, melon, patate douce, tomate), et 200 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les autres végétaux.

Deux ans plus tard, la Commission Européenne a défini également des LMR pour le CLD dans différentes matrices alimentaires d'origine végétale ou animale (LMR CLD du 24 octobre 2007) :

- 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les denrées végétales cultivables sous climat tropical (agrumes, fruits tropicaux, tous les légumes, maïs, canne à sucre) ;
- 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, soit la limite de quantification communément admise, pour les produits spécifiques aux régions tempérées ou susceptible d'être importé de pays autres que les Antilles (blé, pommes, poires, fruits à noyaux, betterave sucrière) ;
- 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les denrées d'origine animale (terrestre ou aquatique).

L'état Français s'est mis en conformité par rapport à la directive européenne en publiant un arrêté ministériel le 30 juin 2008, abrogeant les deux arrêtés de 2005.

Ces évolutions successives de la réglementation bien que destinées à protéger les populations humaines a été perçue par la population des Antilles comme des hésitations n'aidant pas rétablir la confiance avec les représentations locales de l'état français comme le soulignait Torny (2010) : « *Ces changements de normes, loin de rétablir la confiance des consommateurs dans les produits locaux, nuisent en fait à la crédibilité des mesures d'évaluation et de gestions de risques. [...] De plus, la double norme de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les produits locaux et de 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour les produits « métropolitains » alimente le schéma du « laisser-aller » gouvernemental voire de l'empoisonnement autorisé des Antillais, dans une période marquée par la figure du scandale sanitaire.* ».

4-3-3- Faune dulcicole et marine

Le transfert du CLD vers le biotope aqueux est avéré, générant une contamination chronique et à des concentrations importantes des ressources en eau dépassant régulièrement la limite de potabilité de l'eau (0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$), et engendrant des fermetures de captages d'eau potable. Il est alors légitime de se demander si la faune dulcicole et marine exposée au CLD est capable de l'absorber.

La bibliographie fait état de la contamination d'espèces dulcicoles et d'espèces marines : des poissons ou des crustacées, ayant un comportement benthique ou pélagique, ayant aussi bien un régime herbivore ou carnivore (EPA 1978; Huggett et Bender 1980; Nichols 1990; Faroon *et al.* 1995;

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

Coat *et al.* 2006; Luellen *et al.* 2006; Monti et Coat 2007; Bertrand *et al.* 2009; Rocle *et al.* 2009; Bodiguel *et al.* 2011).

Les plus hauts niveaux de contamination en CLD jamais enregistrés sur les organismes aquatiques ont été observés lors du déversement de cet insecticide dans la James River (Virginie, Etats-Unis), au voisinage de l'usine de fabrication : phytoplancton contaminé à 1300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, zooplancton à 4800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, poissons dulcicoles à 2500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, mollusque benthique à 1500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Ce constat catastrophique a provoqué l'interdiction immédiate de toute forme de pêche au sein de la James River (Nichols 1990; Faroon *et al.* 1995; Monti et Coat 2007).

Dès 1977, Bahner *et al.* mettaient en évidence le transfert du CLD vers des organismes estuariens (huîtres, crevettes, divers poissons) dès que la concentration en CLD atteignait 0,023 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Plus tard, le rapport Kermarrec (1980) mentionnait des teneurs en perchlordécone (matière active du Mirex® chimiquement très proche du CLD) allant jusqu'à 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ chez une espèce de crabe et 1 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ chez une espèce de crevette vivant dans un milieu aquatique contaminé à 0,01 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ seulement, suggérant que le CLD était susceptible à la bioconcentration. Bahner *et al.* (1977), dans leurs essais de laboratoire, ont estimé des BCF (calculé comme le rapport entre la teneur en CLD mesurée dans l'organisme et la teneur en CLD mesurée dans son biotope) de 10 à 340 et de 900 à 13 500 dans des conditions d'exposition en eaux stagnantes, ou en eaux courantes, respectivement. La littérature mentionne diverses valeurs de BCF suggérant un fort potentiel de bioconcentration de la faune aquatique : de 230 à 800 pour des algues unicellulaires (24 heures d'exposition à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), 9357 chez l'huître *Crassostrea virginica*, de 5127 à 11 427 chez la crevette *Palaemonetes pugioi* (28 jours d'exposition à 0,023 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 0,04 $\mu\text{g.L}^{-1}$), 16 600 chez le vairon à grosse tête *Pimephales promelas* (56 jours d'exposition à 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$), 60 200 chez un poisson estuarien *Menidia menidiu* (28 jours d'exposition) (WHO 1984; INERIS 2012). Ces facteurs de bioconcentration dépendent bien évidemment de la durée d'exposition, du niveau de contamination du milieu et de l'espèce considérée.

Le régime alimentaire des espèces peut expliquer pour partie leur niveau de leur contamination par le CLD. Dès 1977, une huître nourrie avec des algues (du genre *Chlorococcum*) contaminé à 34 mg.kg^{-1} de poids humide atteignait une teneur en CLD de 210 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids humide en 14 jours (Bahner *et al.* 1977). Une étude récente menée en milieu marin antillais montre un niveau de contamination très variable allant de la limite de détection dans la chair de poissons d'élevage (ombrines, *Sciaenops ocellatus*) jusqu'à 1 mg.kg^{-1} dans la chair de langouste blanche (*Panulirus argus*), en passant par quelques μg à plusieurs dizaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair fraîche de poissons sauvages (**Figure 27**) (Rocle *et al.* 2009).

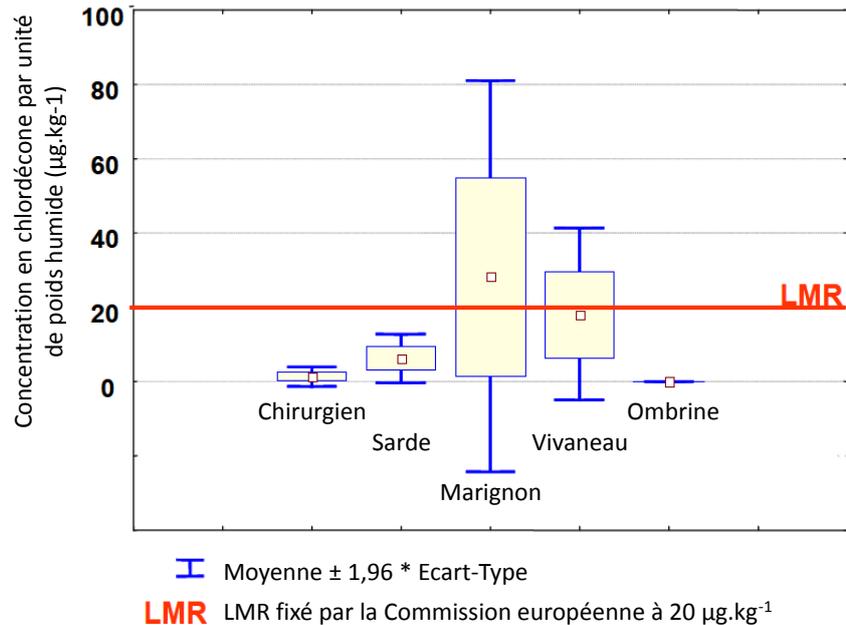


Figure 27. Grandeurs statistiques représentant la teneur en CLD mesurée dans la chair de différents poissons (exprimée $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair humide) (modifié de Rocle *et al.* 2009).
Chirurgien docteur (*Acanthurus chirurgus*) ; Sarde à queue jaune (*Ocyurus chrysurus*) ; Marignon soldat (*Holocentrus rufus*) ; Vivaneau dent-chien (*Lutjanus apodus*) ; Ombrine ocellée (*Sciaenops ocellatus*)

La non-contamination des ombrines ocellées par le CLD, issue de l'aquaculture et donc principalement nourris avec des aliments importés et donc non contaminés au CLD, laisse penser que l'alimentation serait la voie de contamination privilégiée des poissons. La croissance de ces poissons en aquaculture étant rapide la durée d'exposition dans le milieu aquatique n'est pas suffisante pour atteindre des niveaux de CLD détectables avec les moyens d'analyse actuels. *A contrario*, les concentrations les plus faibles ($1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en moyenne) ont été mesurées dans la chair de poissons herbivores (chirurgien docteur). Des niveaux un peu plus élevés (de l'ordre de 3 à $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$) ont été observés chez des poissons carnivores (sarde à queue jaunes) (Rocle *et al.* 2009). Ces observations sont en accord avec celles de Coat *et al.* (2006) qui rapportaient que les tipalias, espèces dulcicoles carnivores, présentaient les plus fortes concentrations en CLD (de l'ordre de plusieurs centaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$) tandis que les espèces herbivores (poisson chirurgien) présentaient quant à elles les niveaux de contamination les moins importants, suggérant la prépondérance du phénomène de bioamplification. Enfin, les travaux de Bodiguel *et al.* (2011) confirment la bioamplification du CLD le long du réseau trophique, depuis les producteurs primaires jusqu'aux espèces de rang trophique le plus élevé tels que les carnivores de deuxième ordre, en passant par les espèces omnivores, planctonophages et carnivores de premier ordre (Figure 28).

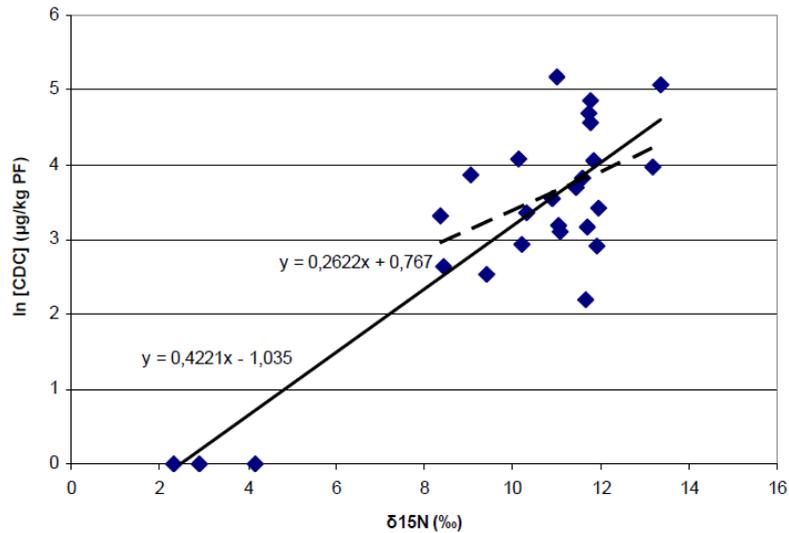


Figure 28. Relation entre niveau trophique et niveau de contamination (Bodiguel *et al.* 2011).

Les signatures isotopiques de $\delta^{15}\text{N}$ permettent d’exprimer le positionnement trophique des espèces les unes en fonction des autres. Les producteurs primaires (végétaux) présentent les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ les plus faibles (de 2 à 4 ‰), suivis des espèces herbivores (de 8 à 9 ‰), les espèces omnivores et planctonophages (de 9 à 11 ‰), les espèces détritivores (11 ‰), et enfin les espèces carnivores de premier ordre (de 11 à 12 ‰) et de second ordre (de 12 à 14 ‰). En trait continu, la droite de régression de l’ensemble des espèces. En trait pointillé, la droite de régression sans les producteurs primaires.

Bien que la voie de contamination par l’alimentation soit privilégiée, le milieu de vie des espèces semble également influencer leur niveau de contamination en CLD. Par exemple, la contamination par les sédiments n’est pas à exclure puisque les espèces à comportement benthique (marignon soldat et vivaneau dent-chien) sont plus contaminées que les espèces pélagiques (Rocle *et al.* 2009). D’autre part, les espèces dulcicoles (tilapias et crevettes) vivant dans une rivière traversant des bananeraies présentent des niveaux de contamination élevée de l’ordre de quelques dizaines à plusieurs centaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Les espèces vivant en eau saumâtre présentent quant à elles une contamination de 3 à 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, d’un ordre de grandeur comparable à la contamination observée chez des espèces marines (de 1 à 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). En revanche, les espèces offshores (*i.e.* vivant au large des côtes) ne seraient pas contaminées (Coat *et al.* 2006). Cette observation ne paraît pas étonnante, sachant que la source de la pollution au CLD est le sol des bananeraies, d’évidence on s’attend à ce qu’une dilution de la contamination s’opère à mesure que l’on s’éloigne de la source. Bodiguel *et al.* (2011) ont en revanche montré que, à l’échelle d’une baie, aucune différence significative n’a pu être observée en termes de niveaux de contamination en CLD entre les espèces aquatiques vivant en fond de baie⁶² et en milieu de baie. Toutefois, les concentrations en CLD sont significativement plus faibles chez des espèces vivant en sortie de baie.

⁶² Une baie est une étendue de mer presque entièrement entourée de terres ; le fond de baie correspond à la zone de la baie proche de la côte ; la sortie de baie correspond à la zone d’ouverture sur la mer.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

Le mode de vie (sédentaire *versus* migrateur) peut aussi influencer le niveau de contamination : les poissons sédentaires de la James River étaient contaminés à plus de 2 mg.kg⁻¹ tandis que les poissons migrateurs présentaient un niveau de contamination de l'ordre de 0,4 mg.kg⁻¹ (Nichols 1990; Faroon *et al.* 1995).

Les crustacées, et notamment les crustacées décapodes (crevettes, langoustes, homards), dont les ouassous (*Macrobachium rosenbergii*) particulièrement appréciés des antillais pour leurs vertus culinaires, sont particulièrement sensibles à la contamination au CLD, avec des niveaux de contamination généralement supérieurs à ceux des poissons dépassant ainsi régulièrement la LMR (Coat *et al.* 2006; Rocle *et al.* 2009). Les espèces de poissons halieutiques sauvages (marignon, vivaneau) ne sont pas épargnées et présentent aussi des dépassements de la LMR rendant leur chair impropre à la consommation (Rocle *et al.* 2009).

Luellen *et al.* (2006) ont montré que, dans le cas d'une contamination aiguë (James River, Virginia), des niveaux très élevés de contamination dépassant les 2 mg.kg⁻¹ ont pu être observés chez des poissons d'eau douce. Le suivi de la contamination des espèces aquatiques de la James River entre 1976 et 2002 montre que le niveau de contamination de la chair des poissons revenait en dessous de la limite réglementaire (fixée à 300 µg.kg⁻¹ aux Etats-Unis) au bout d'une dizaine d'années. Cette décontamination naturelle s'explique d'une part, par l'absence de source de contamination chronique et, d'autre part, de l'enfouissement des sédiments contaminés (Rocle *et al.* 2009). Toutefois, la remise en suspension de sédiments peut contribuer à la réapparition d'une contamination biologique, comme cela a été le cas à la suite du passage du cyclone Isabel en 2003 (Monti et Coat 2007). Dans le cas des Antilles, il est probable que l'enfouissement des sédiments les plus contaminés avec le CLD contribuera à atténuer la contamination du milieu aquatique. Toutefois ce processus sera compromis par le relargage continu des sols de bananeraies vers le milieu aquatique qui selon toute vraisemblance durera encore plusieurs centaines d'années (selon le modèle WISORCH). Par ailleurs, les cyclones frappant régulièrement les Antilles remettront en suspension les sédiments fortement contaminés avec le CLD et les mélangeront avec les sédiments nouvellement déposés avec pour conséquence, le retard de la mise en place de processus de restauration observé dans la James River...

4-3-4- Faune terrestre

La faune terrestre est susceptible de se retrouver exposée au CLD par l'ingestion de fourrage contaminé, d'herbe contaminée et de terre polluée pour les herbivores, d'animaux contaminés pour les carnivores, et également par la consommation d'eau contaminée pour l'ensemble d'entre eux.

En 1980, à la veille de l'attribution d'une autorisation pour le Curlone®, une cohorte d'organochlorés (HCH, dieldrine, Mirex®) avait déjà été retrouvée en faible quantité chez des mammifères (rats) et des oiseaux (faucon gligli, gros bec, cici et héron)⁶³ échantillonnés en zone bananière antillaise ainsi qu'une quantité non négligeable de CLD jusqu'à des teneurs de l'ordre d'une dizaine de ppm dans les muscles et d'une centaine de ppm dans le foie d'un rat. Cette contamination plus importante en CLD dans des tissus animaux se vérifiait aussi chez des rats échantillonnés en moyenne bananeraie à l'approche d'une mangrove, et chez des oiseaux échantillonnés au sein de la mangrove donc hors zone bananière, à des concentrations plus faibles (Kermarrec 1980). Compte-tenu de ces observations, Kermarrec concluait alors : « *La pollution par le chlordécone pose un problème dépassant le cadre du programme de recherche présent. Il paraît utile de poursuivre les investigations. En particulier, il conviendrait d'examiner les relations qui existent entre la pollution du sol de la région bananière, et son transfert dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, de déterminer la signification toxicologique des teneurs observées tant au niveau du sol que des espèces étudiées* ».

4-3-4-1- Œufs, foie et gras de volailles

La contamination des volailles ne concernerait que les petits élevages familiaux (jardins créoles), car, en effet, dans les Antilles les systèmes d'élevage majoritaires sont des systèmes de type hors sol (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011). Toutefois, le poulet est la viande la plus consommée en Guadeloupe comme en Martinique et un fort taux d'approvisionnement par circuit court a été observé (60% en zones contaminées) conduisant à une exposition des foyers auto-consommateurs de leur élevage familial (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2011).

Une étude menée sur une cohorte de femelles de canards de Barbarie, laissée en liberté dans un verger planté sur un sol modérément contaminé (400 µg.kg⁻¹ de matière sèche) afin de réguler les mauvaises herbes⁶⁴, montre qu'après 4 et 22 semaines d'exposition⁶⁵ au sol contaminé les concentrations en CLD ont augmenté de 258 à 1051, de 96 à 278, de 60 à 169 et de 48 à 145 µg.kg⁻¹ de matière fraîche dans le foie, la graisse abdominale et la cuisse avec et sans peau, respectivement. Les teneurs mesurées dans des œufs récoltés dans le verger contenaient jusqu'à 1000 µg.kg⁻¹ de matières fraîches. Toutes ces valeurs dépassaient très nettement (de 7 fois à 50 fois) la LMR. Par conséquent, il est conseillé d'éviter la consommation de canards en liberté, même dans les zones faiblement contaminées par le CLD (Joindreville *et al.* 2014).

⁶³ Échantillons de muscles et foies.

⁶⁴ Les canards pourraient alors être exposés au chlordécone par ingestion de sol pollué (sachant que les mauvaises herbes sont peut être elles-mêmes contaminées).

⁶⁵ Les canards ont été élevés à l'intérieur jusqu'à l'âge de 6 semaines, puis ont été par la suite autorisés à aller librement dans le verger contaminé.

Une étude menée sur des poules pondeuses a montré une augmentation significative de la concentration en CLD dans leurs œufs et leur gras abdominal en réponse à une exposition alimentaire sur une période de 23 jours seulement (**figure 29**). La comparaison statistique des droites de régression montre que le type de sol ne module pas la biodisponibilité du CLD qu'il contient chez la poule pondeuse. Exprimée en quantité de CLD par masse de matière fraîche, la teneur en CLD mesurée dans les œufs est 0,4 fois moins importante que dans le gras abdominal. Cependant, si elle est exprimée en quantité de CLD par masse grasseuse, la teneur en CLD dans le gras de l'œuf serait alors 3,5 fois plus importante que dans le gras abdominal, suggérant un transfert préférentiel du CLD vers le gras de l'œuf (Joindreville *et al.* 2013).

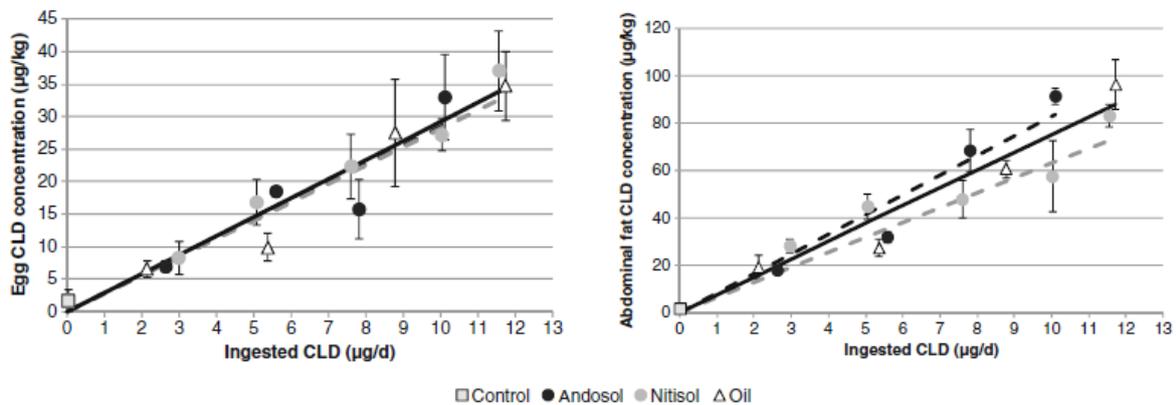


Figure 29. Concentration en CLD dans les œufs et le gras abdominal de poules pondeuses ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) en fonction de la quantité de CLD ingérée ($\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$) issu d'andosol, de nitisol ou d'huile de colza contaminés (tirée de Joindreville *et al.* 2013).

Les lignes en pointillés noirs représentent les droites de régression calculées pour le régime enrichi en andosol contaminé ; les lignes en pointillés gris, les droites de régression calculées pour le régime enrichi en nitisol contaminé ; les lignes pleines noires, les droites de régression calculées pour le régime enrichi en huile de colza elle-même enrichie en CLD.

Ces deux études montrent la sensibilité des volailles, et en particulier des œufs et du foie, à l'accumulation du CLD, suggérant un processus de bioamplification. Par ailleurs, ce mécanisme semble aussi s'appliquer à la faune aviaire sauvage comme l'a mis en évidence une campagne de prélèvement de gibiers à plumes réalisée en Guadeloupe rapportant leur contamination par le CLD (malheureusement les résultats de cette campagne d'analyse ne sont pas disponibles). En réponse à cette étude, un arrêté préfectoral (n°2012-747) publié en juin 2012 a interdit la consommation de tourterelles à queue carrée (*Zenaida aurita*) et de grives à pieds jaunes (*Turdus Iherminieri*) chassées dans un périmètre défini (la majorité de la zone d'interdiction correspond au croissant bananier).

4-3-4-2- Mammifères

Aux Antilles, la contamination des bovins a été découverte suite au plan de surveillance mis en place entre 2008 et 2010 (DAAF971). Malheureusement, aucune donnée n'a fait l'objet d'une publication dans une revue scientifique mis à part dans un diaporama mis en ligne sur le site de la DAAF971⁶⁶.

Aux USA, un an après traitement aérien au Mirex®, le taux le plus bas de résidus était mesuré chez les mammifères herbivores stricts alors que les plus élevés étaient relevés chez les insectivores et les carnivores (Kermarrec 1980). Ainsi, la contamination des êtres vivants non visés apparaît nettement liée à leurs habitudes alimentaires, suggérant un processus de bioamplification.

Malgré une séquestration dans les sols, le CLD peut contaminer les ressources en eau (y compris potable), les sédiments, les cultures et les animaux. La population antillaise est exposée de manière chronique au CLD *via* différentes voies (Dubuisson *et al.* 2007). L'imprégnation de la population est avérée mais les risques liés à l'exposition à de faibles doses de CLD ne sont que très peu documentés (Guldner *et al.* 2010).

4-4- Toxicité humaine

"Bien que la santé soit au centre de toutes les mesures relatives à la « gestion » de l'environnement, les services de santé proprement dits sont souvent tenus à l'écart".

Kermarrec (1980)

La vaste question de la toxicité d'une substance, si l'on veut être exhaustif, peut aisément nous entraîner dans de longs paragraphes descriptifs. Le choix de ne traiter que l'impact du CLD sur la santé humaine est motivé par la problématique même de la thèse, la pollution du sol des Antilles françaises par le CLD, à l'origine de la pollution de l'environnement et des ressources alimentaires exposant ainsi l'Homme au CLD par différentes voies. En raison des nombreuses données disponibles dans la littérature, les effets aigus du CLD chez l'Homme suite à la catastrophe d'Hopewell seront décrits en premier lieu. Ensuite, je présenterai l'impact de l'exposition chronique au CLD sur l'Homme.

⁶⁶ Diaporama disponible sur http://daaf971.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/GREPP-chlordecone-elevage_cle04e1b7.pdf

4-4-1- Classement Cancérogène/Mutagène/Reprotoxique et effets endocriniens

Dès 1979, l'IARC⁶⁷ classe le CLD comme cancérogène possible pour l'Homme (groupe 2B⁶⁸). Il est par contre cancérogène avéré chez le rongeur (rat et souris), par induction de carcinomes hépatocellulaires (INERIS 2012). D'après les informations sur la toxicodynamique et les résultats des tests de génotoxicité, il semblerait que le CLD ne soit pas génotoxique (Bonvallot et Dor 2004). Selon un rapport de l'Afssa (2003), le CLD réduit la fertilité et induit des effets embryo- et foeto-toxiques. Le CLD fait partie des substances pour lesquelles des effets endocriniens ont été mis en évidence (Petersen *et al.* 2007). Pour l'homme, le CLD est classé en catégorie 1 ; pour la faune sauvage, en catégorie 2.

Au niveau européen, la substance est inscrite à l'Annexe VI du règlement (CE) n°1272/2008 et est classée « carc.2 »⁶⁹, mais ne fait pas l'objet d'un classement pour la mutagénèse ni pour la reprotoxicité.

4-4-2- L'exposition professionnelle de Hopewell à l'origine d'une contamination aiguë

L'une des premières références disponibles relatives aux effets du CLD sur des rats et des lapins, issue de la documentation produite par Allied Chemical en 1958, décrit des tremblements typiques d'une intoxication au DDT (« *typical DDT-like tremors even as long as 4 weeks after exposure* »). La même année la Nease Chemical proposa de prendre certaines précautions concernant la manipulation du Képone^{®70}. Allied fournit alors en 1961 une documentation complète à ce sujet⁷¹ reconnaissant alors pleinement les effets toxiques de la substance. En 1966, les mesures de sécurité se renforcent⁷². En 1971, en plus des mesures de sécurité relatives à la manipulation des produits, les effets chroniques sont mentionnés : « *Le Kepone est un composé toxique cumulatif et peut produire des effets chroniques* ». Enfin la documentation soumise par Allied Chemical à la

⁶⁷ International Agency for Research on Cancer

⁶⁸ Classification de l'IARC : *Groupe 1*, cancérogène pour l'Homme ; *Groupe 2A*, cancérogène probable pour l'Homme ; *Groupe 2B*, cancérogène possible pour l'Homme ; *Groupe 3*, inclassable quant à sa cancérogénicité ; *Groupe 4*, probablement pas cancérogène pour l'Homme.

⁶⁹ Carc.1 = substances que l'on sait être cancérogènes pour l'Homme ; Carc.2 = substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'Homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption de causalité entre l'exposition de l'Homme et la survenue d'un cancer. Carc.3 = Substances préoccupantes pour l'Homme en raison d'effets cancérogènes possibles.

⁷⁰ « *Working areas should not be allowed to become contaminated with compound. To assist in avoiding skin contact, clean work clothing should be provided and changed daily. During handling of the compound, exposed skin areas should be washed frequently with soap and water.* »

⁷¹ « *Warning. Hazardous by skin contact inhalation or swallowing. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Wear heavy synthetic rubber gloves. Wash thoroughly with soap and water after handling and before eating or smoking. [...] In case of contact, immediately remove all contaminated clothing and wash skin thoroughly with soap and water. For eyes flush with water for at least 15 minutes and get medical attention. [...] Do not breathe vapor or spray mist. [...] Do not handle indoors unless adequate mechanical exhaust ventilation is provided. Do not contaminate food or foodstuffs.* »

⁷² « *The raw materials and desired products of this process are very toxic [...] and must be handled carefully and kept from skin, eyes, respiratory system and mouth. Neoprene gloves, rubber shoes, and face shield must be worn when handling these chemicals and adequate ventilation maintained to remove vapors and dust. [...]* »

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

société Life Science Products en 1975 est très claire : « [...] Accordingly, strict hygiene procedures must be followed when working with this material. To avoid contamination, food and/or smoking materials must not be stored or consumed in or near areas where Kepone is manufactured or processed. [...] If clothing becomes seriously contaminated with dust or with solution as by spillage, change clothing immediately. Shoes contaminated with solution cannot be adequately cleaned and should be discarded. [...] Employees should be provided with double lockers to keep street clothes and work clothes separate and they should not be permitted to wear contaminated work clothes to their homes. [...] Symptoms of overexposure to Kepone are similar to those of DDT and other highly chlorinated pesticides, namely fatigue, salivation, nausea, vomiting, etc., progressing to tremors and convulsions [...]» (Epstein 1978).

Sur la base des témoignages⁷³ de travailleurs de l'usine d'Hopewell indiquant que les eaux de drainage de l'usine étaient directement déversées dans la James River (rivière avoisinant l'usine d'Hopewell) (Epstein 1978), Mahon et Kelley (1987) n'hésitaient pas à affirmer que la contamination de la James River, mais également celle du Love Canal pendant la période de la Hooker Company, était une action délibérée de la firme accompagnée d'un laxisme apparent du gouvernement : « *The James River was contaminated with kepone as a result of poor safety precautions at Life Science Products, the manufacturer, and even poorer governmental scrutiny by the town of Hopewell and the State of Virginia's Water Quality Control Board* », et à propos du Love Canal, « *again, apparent government laxity, ignorance of the toxicity of the wastes involved, and questionable company actions contributed to a massive toxic waste site* ».

En 1974, un employé de la LSCP dépose plainte à l'office régional de l'OSHA⁷⁴ au motif qu'il a été licencié après avoir refusé de travailler face à un séchoir lui soufflant des poussières de CLD au visage. L'OSHA a ignoré cette plainte jusqu'à ce que le dossier soit ré-ouvert en 1976. En juillet 1975, un autre employé d'Allied Chemical consulte son propre médecin à propos de divers symptômes : perte de poids, tremblement, nervosité, opsoclonus⁷⁵. L'analyse de sang prescrite par le médecin et analysée par le CDC révèle la présence de 7,5 mg.L⁻¹ de CLD dans le sang... A la fin du mois de juillet 1975, le CDC notifiait un de ses agents à l'inspection de la LSPC, à l'examen sanguin de 10 employés de l'usine (3 d'entre eux ont été par la suite hospitalisés), suivi de la fermeture volontaire de la LSPC, puis 2 jours après, de la fermeture officielle par ordre de l'Etat de Virginie, et enfin l'interdiction de production et d'usage du CLD en août de la même année (Epstein 1978).

⁷³ « *Workers were clothing home on many occasions. Respirators were not used on a regular basis until the plant was shut down. Food was also consumed on a regular basis in the dry or packing area due to the work load. When food was consumed in break area, special precautions were not made to protect against contamination of this area. Work clothing was worn into lunch area and a coating of powder was found on lunchroom floor and tables [...]* » (Epstein 1978).

⁷⁴ L'Occupational Safety and Health Administration est, aux États-Unis, l'agence fédérale principale chargée de l'application de la législation concernant la santé et la sécurité au travail.

⁷⁵ Opsoclonus fait référence à des mouvements anarchiques des globes oculaires.

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 4 : Le CLD, un polluant organique persistant

L'observation des conséquences de l'exposition au CLD des employés de la LSCP (Hopewell), mais aussi chez des habitants résidant à proximité de l'usine engendra alors de nombreuses informations, et même l'essentiel des informations, concernant la dangerosité du CLD chez l'Homme, décrites de manière détaillée dans la littérature scientifique internationale (américaine essentiellement). Cette exposition aiguë au CLD, combinant contamination par contact, inhalation et voie orale, a été associée à un syndrome neurologique clinique appelé « Kepone Shakes » ou « Kepone Syndrome ». Les symptômes prédominants, décrits par les travailleurs d'Hopewell, sont les tremblements et la nervosité observés dans 49% des cas d'intoxication au Képone® d'où la dénomination de « Kepone Shakes » (Epstein 1978). Globalement, ce syndrome se caractérise par des atteintes neurologiques (tremblements, incoordination motrice, troubles de l'humeur et de la mémoire récente, insomnie, anorexie, opsoclonus) et de la spermogénèse (modifications de certaines caractéristiques spermatiques) (Cannon *et al.* 1978; Cohn *et al.* 1978; Taylor *et al.* 1978). Des éruptions cutanées évoquant une dermatite de contact ont également été reportées chez 86% (76/113) des travailleurs de la LSPC (Cannon *et al.* 1978; Epstein 1978). L'apparition ainsi que la sévérité du tableau clinique ont été corrélées à la teneur en CLD dans le sang, permettant d'établir un seuil minimal associé à la présence d'un signe ou d'un symptôme clinique (1 mg.L^{-1}) et un seuil associé à une absence d'effet indésirable observé ($500 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) (Guzelian 1992). Les employés d'Hopewell présentant des symptômes avaient en effet une teneur moyenne de $600 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de CLD dans le sang, avec un maximum mesuré de 26 mg.L^{-1} , tandis que des employés intoxiqués à $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ n'en présentaient pas. Des teneurs supérieures à $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de CLD dans le sang ont pu être détectées chez 39% des riverains vivant aux abords de la LSPC, et chez 3% des riverains vivant à 1 mile (environ 1,6 km) plus loin (Epstein 1978). Bien que le CLD soit excrété par les voies biliaires, il subit une réabsorption intestinale importante et, de ce fait, son élimination est particulièrement lente. L'administration par voie orale de cholestyramine a été employée chez les cas les plus graves. En se fixant au CLD dans la lumière intestinale, il empêche sa réabsorption et facilite son élimination par les fèces. Cette thérapeutique a entraîné une diminution de la concentration plasmatique en CLD ainsi qu'une amélioration notable sur le plan clinique. Au terme d'un suivi sur une dizaine d'années, les manifestations cliniques avaient disparu dans la plupart des cas, tout comme le CLD devenu indétectable dans le plasma (Guzelian 1992).

Des expériences de laboratoires mettent en jeu le système nerveux (démýélination des nerfs périphériques), mais aussi le foie (taux de phosphatase alcaline en augmentation, et taux de transaminase et LDH au-delà de la normalité), et les testicules (oligospermie sans formes mobiles) (Cannon *et al.* 1978; Cohn *et al.* 1978; Epstein 1978; Taylor *et al.* 1978). Chez l'animal adulte de laboratoire, l'exposition au CLD entraîne également des effets neurologiques similaires à ceux observés chez l'Homme (Guzelian 1982). Sont observés également des atteintes testiculaires et

ovariennes entraînant des troubles de la reproduction, mais aussi des atteintes du développement intra-utérin et du développement neurocomportemental post-natal chez la portée (Chernoff et Rogers 1976; Mactutus et Tilson 1985; Faroon *et al.* 1995). Des études, *in vitro* puis *in vivo*, ont montré sans ambiguïté que le CLD possède des propriétés hormonales œstrogéniques (Palmiter et Mulvihill 1978; Hammond *et al.* 1979; Eroschenko 1981). Enfin, le CLD induit la survenue de tumeurs malignes hépatiques chez le rat et la souris en dépit de l'absence de génotoxicité (Reuber 1979).

4-4-3- Exposition chronique de la population antillaise

"Most people are exposed to very low level of mirex and chlordane".

ATSDR (1995)

Etant donné l'arrêt officiel de l'utilisation du CLD depuis 1993, aujourd'hui, la source principale de contamination par le CLD est l'exposition par l'ingestion d'eau potable et de denrées alimentaires contaminées avec le CLD (Dubuisson *et al.* 2007).

Des analyses réalisées récemment en Guadeloupe montrent que le CLD est présent dans le sang d'hommes adultes, de femmes enceintes, et de nouveau-nés (Multigner *et al.* 2006; Multigner *et al.* 2007; Guldner *et al.* 2010). Dans leur étude menée sur des femmes enceintes, Guldner *et al.* (2010) montrent que 76% d'entre elles (n=191) présentent des valeurs de CLD dans le sang supérieures au seuil de détection, et que cette teneur pouvait être corrélée à l'exposition prédite en compulsant leurs habitudes alimentaires (incriminant les produits de la mer, les légumes-racines et les cucurbitacées). En 2003 (étude Hibiscus), le CLD avait été détecté dans 40% des prélèvements de lait maternel, et, fort heureusement, la concentration moyenne plasmatique en CLD chez les nourrissons (cordon ombilical) était inférieure à celle retrouvée dans le sang des mères (Guldner 2011). Une étude menée sur une cohorte d'hommes montre que 88% d'entre eux (n=100) présentaient des traces de CLD dans le sang, à hauteur de 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en moyenne chez des individus travaillant en bananeraies (avec un maximum de 105 $\mu\text{g.L}^{-1}$), contre 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en moyenne chez des individus travaillant dans un secteur non-agricole (avec un maximum de 47 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Multigner *et al.* 2006). Compte-tenu des concentrations plasmatiques en CLD de la population antillaise (de l'ordre de quelques $\mu\text{g.L}^{-1}$) nettement inférieures à celles observées chez les employés de la LSPC présentant des troubles cliniques (de l'ordre de centaines de $\mu\text{g.L}^{-1}$ à quelques mg.L^{-1}), le risque de survenue du syndrome Képone est très faible aux Antilles. Cependant, il reste de nombreuses incertitudes quant à l'impact de la contamination chronique sur la santé humaine (Multigner *et al.* 2007).

L'exposition au CLD de la population antillaise étant essentiellement attribuée à l'alimentation, une valeur toxicologique de référence (VTR) a été définie à 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel.jour⁻¹ sur la

base d'effets néphrotoxiques observés dans une étude long terme sur le rat⁷⁶ (Afssa 2007). Une enquête de consommation réalisée par l'AFSSA montre le dépassement de la VTR pour 7% de la population. Par comparaison aux adultes, l'exposition alimentaire au CLD était supérieure chez les enfants de 3 à 5 ans, mais inférieure chez les jeunes enfants (≤ 18 mois) et les femmes enceintes. Le pourcentage maximal de personnes susceptibles de dépasser la VTR était en effet de 18,5% chez les enfants de 3 à 5 ans (zone contaminée, Martinique), et 0,2% chez les nourrissons allaités (Guadeloupe) ainsi que chez les adultes de plus de 16 ans (zone contaminée, Guadeloupe). Ce pourcentage était nul chez les enfants de 18 mois et les femmes enceintes, quelle que soit la zone d'habitation (Guldner 2011; Torny 2011). L'étude Kannari conduite à une grande échelle est actuellement en cours sur les deux îles des Antilles afin de préciser la distribution des niveaux d'imprégnation en CLD, l'évolution de l'état de santé de la population, les comportements alimentaires, et ce, sur une cohorte de 200 enfants de 3 à 6 ans (population identifiée comme étant la plus sensible), 150 enfants de 7 à 10 ans, 150 enfants de 11 à 15 ans, 700 individus de plus de 16 ans, 400 auto-consommateurs de produits de la pêche, et 400 auto-consommateurs de produits de jardins créoles en zone contaminée pour chaque île (diaporama de présentation du projet⁷⁷). Les résultats de cette étude sont attendus en 2015.

Les pathologies survenant à un âge avancé n'ont pas été observées à Hopewell probablement en raison de l'absence de suivi à très long terme de la cohorte exposée au CLD. Le CLD est, de par ses propriétés hormonales et cancérogènes, susceptible de moduler la survenue de pathologies tumorales, en particulier les cancers hormonodépendants et de la sphère urogénitale (Multigner *et al.* 2007). Deux études ont exploré ces hypothèses. La première, réalisée en Guadeloupe de 1999 à 2003 sur une cohorte d'hommes de 20 à 45 ans, ne montre aucune corrélation entre les concentrations plasmatiques en CLD et divers paramètres mesurant la fertilité des hommes (Multigner *et al.* 2006), ce qui est cohérent avec ce qui a été observé à Hopewell où des modifications de caractéristiques spermatiques ont été constatées pour des niveaux d'exposition dépassant 1 mg.L^{-1} (Cohn *et al.* 1978). L'incidence du cancer du sein aux Antilles est du même ordre de grandeur que celle observée dans la plupart des autres îles de la Caraïbe et inférieure à celle des populations caucasiennes dans les pays occidentaux, France comprise (Dieye *et al.* 2007). L'étude Karuprostate (Guadeloupe, 2004-2007) s'intéresse au risque de survenu du cancer de la prostate chez une cohorte de 1200 hommes de plus de 45 ans dont la moitié n'ont pas de cancer (Multigner *et al.* 2010). Avant toute chose, il faut rappeler que la population antillaise, tout comme les populations des îles des Caraïbes et les populations afro-américaines, est particulièrement touchée

⁷⁶ La VTR de $0,5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.jr}^{-1}$ est relative à une exposition chronique. Une VTR à hauteur de $10 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ pc.jr}^{-1}$ a été définie comme expliquant une exposition aiguë sur la base d'effets neurotoxiques.

⁷⁷ Disponible sur <http://www.invs.sante.fr/content/download/52381/220254/version/1/file/2+-+Etude+Kannari.pdf>

par le cancer de la prostate (Mallick *et al.* 2005; Dieye *et al.* 2007). Par ailleurs, le cancer du testicule, dont l'incidence augmente régulièrement dans de nombreux pays occidentaux, est exceptionnellement élevé parmi les populations antillaises. L'étude Karuprostate a montré un accroissement significatif du risque de contracter un cancer de la prostate avec l'augmentation de la concentration plasmatique en CLD et de l'index d'exposition cumulative⁷⁸. Le risque de survenue d'un cancer de la prostate associé à l'exposition au CLD est plus important chez les sujets ayant des antécédents familiaux de cancer de la prostate, et est également particulièrement marqué chez les patients ayant vécu longtemps à l'ouest de la Guadeloupe (*i.e.* Basse-Terre) (Multigner *et al.* 2010).

Deux études menées en Guadeloupe s'intéressent quant à elles à l'incidence de l'exposition de femmes enceintes et l'exposition pré-natale et post-natale de nouveau-nés. L'étude Hibiscus de 2003 avait pour objectif d'évaluer la prévalence des expositions au CLD, et montre la présence de CLD dans le sang des femmes enceintes, des cordons ombilicaux, et dans le lait maternel (Multigner et Kadhel 2004). L'étude Timoun menée en Guadeloupe entre 2004 et 2007 montre que, dans des circonstances d'exposition *in utero* et post-natale, du fait de l'exposition maternelle (essentiellement par voie orale en lien avec la consommation de denrées alimentaires contaminées), un accroissement du risque de présenter de plus faibles scores sur l'échelle de développement de la vitesse d'acquisition d'information visuelle et de la motricité fine a été mis en évidence chez des nourrissons (7 mois) et des jeunes enfants (18 mois) (Dallaire *et al.* 2012; Boucher *et al.* 2013). Boucher *et al.* (2013) suggèrent un effet sexe-dépendant du CLD puisque les retards cognitifs et moteurs n'ont été observés que chez les petits garçons.

4-4-4- Et concernant la toxicité des congénères du CLD ?

Dans un objectif de recherche de voie de dégradation biotique du CLD, impossible d'éviter la question de la toxicité des métabolites du CLD, surtout quand on sait que les métabolites de dégradation de pesticide sont parfois plus toxiques que la molécule mère (Andreu et Pico 2004). Des tests comparatifs de toxicité menés sur quelques congénères du CLD disponibles comme composés purs ont montré que la toxicité du CLD alcool est supérieure à celle du CLD, elle-même supérieure à la toxicité du 8-monohydro-CLD, le 3,7-dihydro-CLD étant la moins toxique des 4 substances testées, suggérant que la toxicité des congénères du CLD diminue avec la diminution du degré de chlorination (Carver et Griffith 1979; Soileau et Moreland 1983). Il est intéressant de noter que chez l'homme le CLD est transformé en CLD-alcool dans le foie par la CLD-réductase ; ce métabolite est alors éliminé par excrétion biliaire diminuant ainsi la toxicité du CLD (Molowa *et al.*

⁷⁸ Produit de la concentration plasmatique en chlordécone et du nombre d'années de résidence dans les Antilles françaises depuis 1973.

1986b). Toutefois, l'absence de standard analytique des métabolites du CLD ne permet pas d'envisager d'étudier l'occurrence de ces métabolites dans différentes matrices environnementales. Par ailleurs, les méthodes de détection et de dosage des métabolites du CLD ne sont pas encore optimisées. D'une manière générale, cette remarque pose la question de l'appréhension de la problématique du CLD dans les Antilles françaises. Avons-nous jusqu'à présent travaillé uniquement sur la partie émergée de l'iceberg ? Et par conséquent avons-nous sous-estimé la problématique environnementale posée par le CLD et ses métabolites ? Personne n'est actuellement en mesure de répondre à ces interrogations.

Chapitre 5

Dégradation du chlordécone et décontamination/remédiation

Chapitre 5- Dégradation du CLD et décontamination/remédiation

Au vue de la grande stabilité de la molécule de CLD, aux Antilles françaises son atténuation naturelle est considérée comme très lente (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011). Elle est censée s'effectuer principalement par le transfert de la CLD vers le réseau hydrique, puis les sédiments et les biotes étant donné que le CLD est récalcitrant à la biodégradation. C'est pourquoi des solutions de traitement visant à remédier à la pollution des sols afin de réduire, voire complètement éliminer les risques de contamination des différents compartiments environnementaux restent à explorer. Deux méthodes peuvent être envisagées pour dépolluer des sols : la remédiation par extraction du polluant *in situ*, les extraits sont alors traités *ex situ*, et la remédiation par dégradation de la substance (*in situ* ou *ex situ*). Généralement, deux voies principales de dégradation des pesticides sont distinguées : les phénomènes de biodégradation (ou dégradation biotique), des phénomènes physico-chimiques (ou dégradation abiotique).

5-1- Le CLD est-il dégradable ? Réduction versus oxydation. Aérobie versus anaérobie.

Dans l'environnement, le CLD a la réputation d'être réfractaire à la dégradation : ni biodégradation, ni photolyse, ni hydrolyse (INERIS 2012). En termes de biodégradation, la forte hydrophobicité et la faible solubilité du CLD le rendant faiblement biodisponible indique intuitivement que cette molécule serait très difficile à dégrader biologiquement. Pour ne rien arranger, en raison de son origine synthétique et de sa structure chimique lui conférant une stabilité stérique importante en raison de la présence des 10 atomes de chlore, le CLD est très résistant à la biodégradation. En effet, les atomes de chlore facilitent la délocalisation des électrons, limitant fortement les possibilités d'oxydation des atomes de carbone et en conséquence, rendant résistant le CLD à la biodégradation en condition aérobie (Dolfing *et al.* 2012). En revanche, le CLD présente tout de même deux « talons d'Achille » : le carbone de la fonction cétone et le carbone portant deux atomes de chlore qui lui est opposé. Les atomes de carbone dans ces deux positions seraient susceptibles d'être concernés par des transformations d'origine abiotiques ou enzymatiques (déshalogénéation, hydratation) préférentiellement en milieu réducteur (Orndorff et Colwell 1980). En effet, de nombreux composés organochlorés sont connus pour être dégradés en conditions anaérobie⁷⁹ par une déchlorination réductive⁸⁰. Cette réaction est exergonique, c'est-à-dire qu'elle est thermodynamiquement favorable, suggérant que les microorganismes pourraient utiliser les

⁷⁹ Le nombre élevé d'atome de chlore n'est pas un problème pour les microorganismes anaérobies, au contraire, plus le nombre de chlore est élevé, plus le composé leur est accessible.

⁸⁰ Remplacement d'un chlore par un hydrogène, et libération du chlore sous forme Cl⁻.

organochlorés comme source d'énergie pour leur croissance (Macarie et Dolfig 2011). Toutefois, comme pour d'autres composés organochlorés, une fois la dégradation du CLD « lancée » en condition anaérobie, la dégradation des métabolites déchlorés serait plus facile en milieu aérobie (Orndorff et Colwell 1980). Ceci suggère qu'une stratégie de bioremédiation en deux étapes (déchlorination réductive en conditions anaérobie suivie d'une déchlorination en condition aérobie), analogue à celle utilisée pour les congénères du PCB à haut poids moléculaire, pourrait être applicable (Field et Sierra-Alvarez 2008; Furukawa et Fujihara 2008). Sur le même principe (remédiation en deux temps), le procédé *In Situ* Chemical Reduction (ISCR), combinant réduction chimique et dégradation biologique (déchlorination par ajout d'agent réducteur / biodégradation aérobie), a été appliqué pour traiter des sols de sites contaminés par de nombreux pesticides organochlorés tels que le DDT, le toxaphène (Frazar 2000), le chlordane, le lindane, le HCB et la dieldrine (Colombano 2011). Toutefois, si cette solution de dégradation en deux temps (déchlorination réductive / minéralisation aérobie) était envisagée pour traiter les sols contaminés par le CLD, on mesure bien la difficulté d'obtenir des conditions anaérobies sur 20 milliers d'hectares de sols contaminés. Dans ce contexte, l'identification de processus microbiens aérobies assurant la transformation de la CLD représente un enjeu environnemental.

Une étude théorique approfondie du comportement thermodynamique du CLD et de certains de ses métabolites a permis d'estimer l'énergie libre de Gibbs ($\Delta_r G^\circ$) de 62 des 485 métabolites déchlorés théoriques ainsi que les variations d'énergie libre de Gibbs associées à diverses réactions théoriques. Les $\Delta_r G^\circ$ calculées en phase aqueuse pour le CLD et ses congénères moins chlorés varient de -92,0 kJ/mol à 171,9 kJ/mol pour le CLD et le décahydro-CLD respectivement. Le $\Delta_r G^\circ$ diminue avec l'augmentation du nombre de substituants chlorés (Dolfig *et al.* 2012). Toutes les réactions envisagées (déchloration réductive avec H₂ comme donneur d'électron, déchlorination réductive en conditions méthanogènes, réduction en CLD-alcool, minéralisation du CLD avec O₂ comme accepteur d'électron, dégradation aérobie par la voie CLD-lactone) sont exergoniques, c'est-à-dire qu'elles libèrent suffisamment d'énergie pour permettre la synthèse d'ATP et donc la croissance microbienne. Du point de vue théorique, il n'y a alors thermodynamiquement aucune raison pour que la dégradation réductive ou même oxydative du CLD ne puisse pas avoir lieu (Dolfig *et al.* 2012).

5-2- Méthodes physico-chimiques de remédiation

La remédiation thermique par incinération est une technologie éprouvée en matière de décontamination de sites pollués par des composés xénobiotiques. Cette technologie requiert l'excavation et le transport du sol pollué. Des températures comprises entre 900 et 1200°C (1600-

2200°F) sont nécessaires pour aboutir à la dégradation complète des composés organiques et éviter la formation de dioxines et d'HCB concernant le CLD. Les cendres peuvent alors être éliminées dans une décharge (EPA 1994) ou utilisées comme compost (Van Aken 2011). Cette pratique est très coûteuse et, vu l'étendu de la contamination avec le CLD (environ 200 km²), pratiquement irréalisable. Il y a donc un intérêt considérable à tester des solutions de remédiation peu coûteuses utilisant des microorganismes (bioaugmentation et biostimulation) ou des plantes (phytoremédiation) (Van Aken 2011).

Les procédés de dépollution par voie chimique appliqués au CLD s'orientent plutôt vers une dégradation en conditions réductrices. Le procédé LARC (Light Activated Reduction of Chemical) mis au point en 1976 aux Etats-Unis consiste à solubiliser le CLD dans une solution de soude puis d'appliquer des UV en présence d'hydrogène (conditions réductrices). Schrauzer et Katz (1978) ont montré que la vitamine B12, en présence d'un agent réducteur, pouvait transformer le CLD en métabolite de type C₉Cl_{8-n}H, ouvrant ainsi la « cage » carbonée.

Le concept d'ISCR consiste à provoquer une très forte baisse du potentiel oxydo-réducteur du milieu (en l'occurrence du sol contaminé) par l'ajout d'agents réducteurs en conditions d'anaérobiose momentanée (saturation du sol en eau) favorisant la déchloration réductive. Une phase d'aérobiose est ensuite instaurée pour maximiser l'intervention microbienne. Cette alternance anaérobiose/aérobiose constitue un cycle qui doit être répété un nombre variable de fois en fonction de la récalcitrance de la substance et des objectifs de dépollution à atteindre (Mouvet *et al.* 2010; Mouvet *et al.* 2011). La mise en œuvre de ce procédé sur un ancien site de production du lindane a permis un abattement de la charge polluante de 92%, sans toutefois que sa dégradation ait pu être démontrée (Colombano 2011). Techniquement, le procédé consiste en un labour agronomique d'un sol contaminé avec ajout d'un amendement au potentiel réducteur et hydratation du sol jusqu'à sa capacité de rétention (Mouvet *et al.* 2014). Ce procédé est actuellement testé par le BRGM⁸¹ dans le cadre du projet AbaChlor, dont voici les premiers résultats concernant la première étape de déchloration réductive. Les sols amendés de fer à valence zéro (FZV) présentent des taux d'abattement du CLD à hauteur de 54 ou 68% selon s'il s'agit de FZV grossier ou fin, et la formation d'un composé déchloré de 3 atomes de chlore. Quel que soit l'amendement (FZV seul ou FZV + matière organique), tous les sols traités se caractérisent par la présence de monohydro- et dihydro-CLD (Mouvet *et al.* 2014). Les taux d'abattement du CLD présentent une forte variabilité posant la question de l'efficacité du traitement (d'autant qu'aucun test statistique n'a été présenté au colloque du GFP 2014). La formation du composé déchloré de 3 atomes de chlore reste également incertaine : l'absence d'étalon analytique empêche la détection, l'identification et la quantification du composé

⁸¹ Bureau de Recherches Géologiques et Minières

en question, et encore une fois la forte variabilité (aire du pic en moyenne est de 29 (sans unité) avec un écart-type de 21) temporiserait les conclusions. L'équipe du BRGM a également mentionné la formation d'un métabolite du CLD déchloré de 7 atomes de chlore dans l'eau du sol sans donner plus de précision à ce sujet (Mouvet *et al.* 2011; Mouvet *et al.* 2014). A notre grand regret, ces résultats pourtant prometteurs n'ont pas fait l'objet de publication scientifique.

In situ, les procédés chimiques de remédiation sont généralement appliqués sur de petites surfaces dans des sites pollués présentant des teneurs élevées en polluant. Ces procédés « intensifs » semblent alors peu ou pas applicables dans le cas de la contamination au CLD sur les îles antillaises. Les procédés de dépollution microbienne ou de phytoremédiation présenteraient des possibilités d'application plus appropriées au contexte local (Colombano 2011).

5-3- Biodégradation spontanée du CLD dans les sols antillais : touche d'espoir

Pour rappel, Cabidoche *et al.* (2009) évoquaient, en absence de voie de dégradation naturelle connue, une « décontamination⁸² » naturelle des sols par lessivage. Toutefois, ce processus d'atténuation de la contamination des sols sera lent (plusieurs centaines d'années) et il se fera au détriment de la qualité des ressources en eau...

Alors que, pendant des décennies, on considérait que le CLD n'était pas spontanément dégradé dans les sols (et même pas dégradé du tout...), en 2013 pour la première fois, (Fernandez-Bayo *et al.* 2013a) mettaient en évidence la minéralisation faible mais significative du CLD dans un andosol antillais, en condition aérobie, à hauteur de 4,9% dans l'horizon de surface (0-20 cm) et 3,2% dans l'horizon plus profond (30-60 cm) sur une période de 230 jours. L'émission de ¹⁴CO₂ quasi nulle observée dans les microcosmes stériles et significativement inférieure à celle des autres microcosmes indique l'origine biologique de la minéralisation du CLD dans les microcosmes non-stériles (**figure 30**).

⁸² Il s'agit d'un abus de langage. Certes les sols seront « décontaminés » par lessivage, mais entraînant la contamination du réseau hydrographique et la dispersion de la contamination dans l'environnement...

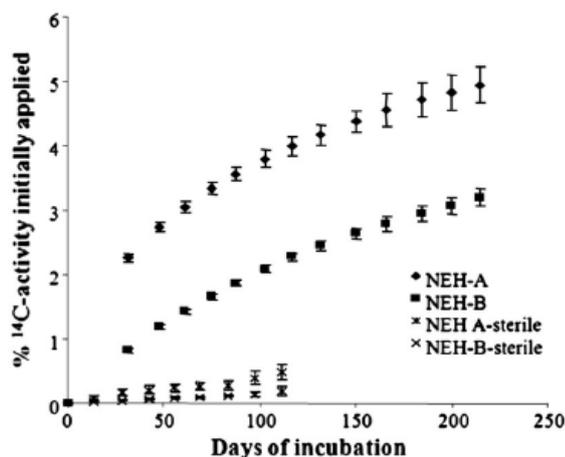


Figure 30. ¹⁴CO₂ résultant de la minéralisation du ¹⁴C-CLD dans les microcosmes de sol prélevés dans les horizons A et B d'un andosol fortement contaminé. Des contrôles stériles ont été inclus dans cette expérience (tirée de Fernandez-Bayo *et al.* 2013a).

Cette étude encourageante apporte une touche d'optimisme quant à l'existence d'une microflore indigène capable de minéraliser le CLD en aérobie dans les sols antillais. Cependant, les raisons pour lesquelles cette activité microbienne dégradante est limitée devraient être élucidées pour envisager le développement d'une méthode de bioremédiation.

5-4- Biodégradation microbienne

De nombreux xénobiotiques, dont certains pesticides, sont dégradés par la microflore du sol. L'exposition répétée aux xénobiotiques conduit en effet, à l'adaptation génétique de certaines populations de la communauté microbienne conduisant à l'amélioration de l'efficacité de la biodégradation microbienne. Ce processus adaptatif conduit parfois à la mise en place de la biodégradation accélérée du xénobiotique considéré (Topp *et al.* 1998). L'un des prérequis pour qu'un composé xénobiotique puisse être dégradé par la communauté microbienne est qu'il doit être biodisponible. Cependant, le CLD présentant un K_{oc} très élevé est fortement adsorbé sur les composants du sol et, il est par conséquent, faiblement biodisponible pour les micro-organismes du sol, diminuant ainsi ses chances d'être dégradé (Cattan *et al.* 2007).

Jusqu'à présent, il n'existe que très peu d'étude rapportant la transformation du CLD par voie microbienne. A partir de boues contaminées par le CLD et stockées dans un lagon en plein air, Wagner et Dixon (1981) ont isolé et mis en évidence des champignons capables de pousser sur milieu liquide Sabouraud dextrose broth additionné de CLD (50 mg.L⁻¹). Après 7 jours de culture, un abattement de 90% du CLD était observé dans le surnageant de culture, comparativement à une culture non-inoculée. L'analyse du surnageant des cultures d'*Aspergillus* sp. avait révélé l'existence de trois métabolites du CLD (CLD-alcool, un composé déchloré et un composé non-identifié) et la

capacité des cellules fongiques d'adsorber à leur surface le CLD. Malheureusement, aucune autre étude n'a été depuis publiée à ce sujet. Toutefois, la voie de dégradation fongique n'est probablement pas à négliger car, par exemple, les pourritures blanches (white-rot fungi) sont connues pour dégrader des composés organochlorés tels que le chlordane, le lindane et le DDT (Bumpus et Aust 1987; Safferman *et al.* 1995; Alexander 1999).

Orndorff et Colwell (1980) font état de l'isolement d'une souche bactérienne, *Pseudomonas* sp. KO3, purifiée à partir d'une culture complexe obtenue par enrichissement aérobie à partir de boues d'eaux usées d'une lagune. Cette souche bactérienne est capable, en condition aérobie, de transformer le CLD en monohydro-CLD principalement et, dans une moindre mesure, en dihydro-CLD. Cabidoche *et al.* (2009) ont récemment suggéré que cette étude souffrait d'un manque d'information concernant la caractérisation de la pureté du Képone® utilisé et, notamment la teneur initiale du CLD en monohydro- et dihydro-CLD, affaiblissant ainsi les conclusions de l'étude. Ces deux métabolites en effet sont connus comme des contaminants du Képone®. Les métabolites observés dans cette étude pourraient donc provenir d'une chlorination incomplète de la molécule durant la synthèse du CLD et non pas de la biodégradation microbienne du CLD.

D'après Cabidoche *et al.* (2009), l'étude de George et Claxton (1988) rapportant la dégradation du CLD par trois souches de *Pseudomonas* spp., souffre des mêmes faiblesses, jetant aussi le doute sur leurs conclusions selon lesquelles le CLD pourrait être sensible à la dégradation microbienne en conditions aérobies.

Jablonski *et al.* (1996) rapportèrent la transformation du CLD par une culture de *Methanosarcina thermophila* conduite sur acétate en présence de CLD à 0,79 mg.ml⁻¹ en conditions anaérobies. En utilisant du CLD uniformément marquée au ¹⁴C, ils ont montré que jusqu'à 86 % du CLD étaient dégradés en 10 jours, conduisant à l'accumulation de métabolites détectés par chromatographie sur couche mince (CCM). Bien que les mécanismes et les métabolites de transformation du CLD par *Methanosarcina thermophila* n'aient pas été complètement identifiés, Jablonski *et al.* (1996) suggérèrent que la bactérie méthanogène, *Methanosarcina thermophila*, cultivée sur acétate en anaérobiose est capable de réaliser une déchlorination réductive du CLD. Des résultats similaires ont également été obtenus avec la vitamine B12 réduite et le cofacteur de type III isolé du complexe enzymatique CO deshydrogénase ainsi qu'avec le cofacteur F430 réduit isolé du coenzyme méthyl de la méthylréductase de *M. thermophila*. Plus récemment, *Pseudonocardia* sp. KSF27 isolé d'un sol au Japon traité fréquemment avec l'endosulfan, a été montrée pour non seulement dégrader la dieldrine mais également d'autres composés organochlorés dont le CLD, sans donner de détails quant à la voie de dégradation mise en œuvre (Sakakibara *et al.* 2011).

Enfin, des résultats très prometteurs ont été présentés très récemment au 44^{ème} congrès du 'Groupe Français des Pesticides' (Saaidi *et al.* 2014). Un consortium issu d'un bassin aérobie de station

d'épuration et cultivé en anaérobiose a montré la capacité de transformer le CLD en un composé constitué de 9 carbones, suggérant l'ouverture de la cage carbonée. Ces résultats préliminaires n'ont, pour le moment, pas fait l'objet d'une publication.

5-5- Phytoremédiation

Sachant que les légumes-racines étaient capable de transférer le CLD depuis le sol vers leurs tissus, des chercheurs se sont posé la question d'utiliser cette propriété des végétaux pour tester la faisabilité de la dépollution des sols par la phytoremédiation. En effet, de nombreuses plantes connues pour leurs capacités d'extraction et de stockage⁸³ d'éléments traces métalliques (ETMs) (zinc, plomb, cadmium) sont employées à des fins de phytoremédiation (Coats et Anderson 1997; Susarla *et al.* 2002). Ces plantes accumulatrices sont récoltées et éliminées dans un site d'enfouissement de déchets dangereux (Coats et Anderson 1997). Récemment, il a même été proposé que la culture de plantes hyper-accumulatrices sur des sites contaminés avec des ETMs présentant un intérêt économique, pourrait être employée pour les phytoextraire (concept de phytomine : utilisation des plantes pour faire de l'extraction minière à partir de sol pollué). Concernant le CLD, bien que le dachine présente la contamination relative la plus élevée, sa culture ne pourrait permettre sa phytoextraction qu'en plusieurs siècles, pas de temps semblable à l'exportation du CLD des sols vers les ressources en eau par lessivage (Cabidoche *et al.* 2006b)... Même si ces premières considérations ne sont pas très encourageantes, des recherches pourraient être initiées pour tester la capacité d'espèces végétales indigènes des Antilles à phytoextraire le CLD des sols. Dans ce contexte, White (2011) a suggéré de réaliser des essais de phytoextraction du CLD avec des légumes telle que la courgette, connue pour phytoextraire d'autres POPs (chlordanes, PCB et DDT). Les POPs étant très peu biodisponibles et, par conséquent, très peu extractibles des matrices environnementales par le vivant, l'ajout de surfactants peut également augmenter l'efficacité de la phytoextraction (White 2011).

Bien que certaines études citées ci-dessus ouvrent des perspectives encourageantes, il n'existe pas, à ma connaissance, de voie de dégradation d'origine biotique connue du CLD, hormis celle rapportée chez l'Homme. L'identification de métabolites, indispensable pour caractériser la transformation du CLD et de manière ultime la voie de dégradation du CLD, se heurte à un frein analytique. En effet, en l'absence d'étalons analytiques, si on excepte le 5b-monohydro-CLD et le dihydro-CLD disponibles commercialement, la mise en évidence de leurs formations est rendue impossible. Par ailleurs, au-delà de l'identification des métabolites, les méthodes analytiques permettant d'extraire, détecter et quantifier le CLD dans des matrices environnementales présentent

⁸³ Voire des capacités de dégradation. On parle alors de phytodégradation.

des incertitudes de mesures importantes qui ne sont pas satisfaisantes. Ces problèmes analytiques posent également la question de l'étendue de notre connaissance de la problématique environnementale posée par le CLD. Actuellement, la plupart des mesures concernent le CLD : qu'en est-il des métabolites du CLD ? Existents-ils, sont-ils toxiques, contaminent-ils les autres compartiments de l'environnement ? S'accumulent-ils le long de la chaîne alimentaire ? Nul ne sait et à ce jour, tant qu'aucune méthodologie de dépollution abiotique et/ou biotique n'ait pu être mise au point, il faudra malheureusement se résoudre à cohabiter avec la pollution des sols (et des denrées issues de l'agriculture) par le CLD et ce, pour une longue période, d'autant que la pollution au CLD s'exporte vers les eaux (dont les eaux de consommation et la faune halieutique)... Compte-tenu de la situation, notons les travaux de Woignier *et al.* (2013) et Fernandes *et al.* (2010) qui ont montré l'intérêt d'amender les sols contaminés avec des composts afin de limiter le transfert du CLD des sols vers les différents compartiments de l'environnement. Ces travaux suggèrent que le développement de méthodes de stabilisation du CLD dans les sols pourrait être envisagé, en attendant la mise au point de remédiation du CLD.

5-6- Décontamination des ressources alimentaires contaminées

La pollution des sols et des eaux des Antilles avec le CLD cause la contamination de la chaîne alimentaire et à des répercussions sanitaires. L'impact sanitaire du CLD génère un besoin immédiat de solution de décontamination des ressources alimentaires.

5-6-1- Eau potable

Tant en Martinique qu'en Guadeloupe, la problématique du traitement de l'eau potable a trouvé une première réponse technique avec la mise en œuvre de systèmes de traitement de l'eau reposant sur l'utilisation de charbon actif ou bien par la dilution de l'eau contaminée par le CLD avec de l'eau indemne de toutes contaminations (Cabidoche *et al.* 2006b). Ces solutions sont mises en œuvre depuis 2000 sur les deux îles. Depuis cette date, la DSDS annonce que pour 99% des analyses, le CLD n'était pas détecté dans les eaux potables ; les rares quantifications ayant concerné des eaux filtrées sur des filtres à charbon saturés (Cabidoche *et al.* 2006b). En Martinique, une étape d'ultrafiltration a été ajoutée après traitement des eaux sur un filtre à charbon actif (INRA/CIRAD 2010). Ces traitements coûteux permettent d'assurer la qualité de l'approvisionnement en eau potable de la population Antillaise. Cependant, ils posent la question de (i) l'approvisionnement des Antilles en charbon actif et (ii) de la gestion des boues contaminées par le CLD.

5-6-2- Production animale

Mahieu *et al.* (2012) ont mis en évidence la possibilité de décontaminer les bovins contaminés par le CLD en les faisant paître sur des prairies se développant sur des sols non-contaminés par le CLD. Ainsi, le transfert d'un cheptel de bovins contaminés sur un pâturage non pollué a entraîné un abattement de 50% de la concentration sanguine en CLD en 44 jours. Toutefois, les auteurs rapportent une forte variabilité individuelle de la demi-vie du CLD dans le sang des bovins (entre 33 et 73 jours sur 13 animaux). En prenant en compte les résultats les plus pessimistes (demi-vie de 75 jours), les auteurs suggèrent que les bovins seraient décontaminés en une année. Des études semblables de transfert d'un site d'élevage pollué vers un site non-pollué ont été menées sur différents types d'animaux.

Ainsi, lors de la décontamination de canards de Barbarie, la concentration de CLD dans les tissus diminue rapidement pour atteindre, après 9 semaines de claustration, des valeurs de 47, 7, 6 et 9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le foie, la cuisse avec et sans peau et le gras abdominal⁸⁴ respectivement. Toutefois, les auteurs soulignent que la LMR de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le foie (Règlement (CE) n°396/2005) est dépassée dans tous les échantillons, même après 9 semaines de décontamination (Clostre *et al.* 2013b). Il est estimé que 12 à 13 semaines de claustration seraient nécessaires pour parvenir à la LMR dans le foie (Joindreville *et al.* 2014).

La décontamination d'huitres par transfert des animaux d'une eau polluée par le CLD à une eau non polluée serait rapide avec 35% d'abattement en 24 heures. En revanche, la décontamination de poissons et crustacées serait plus longue avec un abattement de 30 à 50% en un mois (Bahner *et al.* 1977).

Cependant, on peut noter que dans toutes ces études, seul le CLD est considéré sans qu'il ne soit fait état des problèmes de dosage du CLD possiblement rencontrés ni même de la possible formation de métabolites du CLD. Les données présentées dans ces études sont interprétées au regard d'un abattement de la concentration en CLD dans le sang des animaux sans que le processus (élimination et/ou transformation) mis en jeu ne soit compris ou évalué. Ces questions sont d'autant plus prégnantes que l'on sait que dans le foie humain par exemple⁸⁵, le CLD est réduit en CLD-alcool par l'action de la CLD-réductase (Molowa *et al.* 1986a). Par conséquent nous pouvons nous interroger s'il s'agit bien d'une dissipation ou d'une transformation du CLD ? Si la deuxième option était avérée, pourrait-on parler de décontamination des animaux si des métabolites du CLD s'y accumulaient ? Si

⁸⁴ Au début de l'expérience (avant les 9 semaines de claustration), les teneurs en chlordécone étaient de 1100, 150, 130, 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans le foie, la cuisse avec peau, la cuisse sans peau et le gras abdominal respectivement.

⁸⁵ La chlordécone réductase est aussi sécrétée par le foie de lapins et gerbilles. Elle est absente chez le rat, la souris et le hamster (Molowa *et al.* 1986b).

Partie 1 : Introduction bibliographique – Chapitre 5 : Dégradation du CLD et décontamination/remédiation

l'apparition de métabolites du CLD était avérée dans les tissus animaux des études toxico-cinétiques des viandes contaminées devraient être menées pour s'assurer de leurs innocuités ?

Chapitre 6

L'après chlordécone et alternatives

Chapitre 6- L'après CLD et alternatives

6-1- L'après CLD

6-1-1- Règlementation

En conséquence de la contamination des ressources en eau, des ressources halieutiques, et d'espèces animales, des arrêtés réglementant (voire interdisant) la pêche⁸⁶, la chasse de certaines espèces de gibier à plumes⁸⁷, et interdisant des captages d'eau potable ont été édictés par les services compétents de l'état. Pour plus de lisibilité, des représentations cartographiques des zones d'interdiction de pêche maritime ont été réalisées (**figure 31 et 32**).

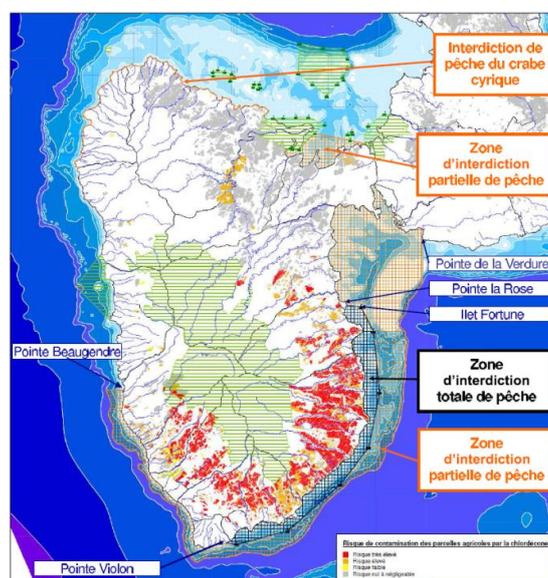


Figure 31. Cartographie des zones d'interdictions totale et partielle de pêche en raison de la pollution au CLD en Guadeloupe en 2013 (tirée de l'annexe 1 de l'arrêté préfectoral 2013177-0012 daté du 2 juin 2013).

Les hachures noires représentent la zone d'interdiction totale de pêche. Les hachures orange représentent les zones d'interdiction partielle de pêche (sont concernés 8 espèces de crustacés - 4 espèces de crabes, 2 espèces de crevettes et 2 espèces de langoustes - 28 espèces de poissons et 3 espèces de mollusques).

⁸⁶ En Martinique : Arrêtés préfectoraux n°2012191-0013, n°2012191-0014, n°2012191-0015 et n°2013198-0013 interdisant la pêche dans la baie du François, la baie du Robert, la baie de Sainte-Marie et la baie de Case-Pilote, respectivement. En Guadeloupe, arrêté préfectoral n°2013177-0012 concernant la réglementation de la pêche des espèces de la faune marine.

⁸⁷ Arrêté préfectoral PREF/DAAF n°2012-747 de juin 2012



Figure 32. Cartographie des zones d'interdictions totale et partielle de pêche liées à la présence de CLD en Martinique (tirée de du site internet de l'Observatoire de l'eau de Martinique⁸⁸ et relatif à l'arrêté 2012335-0003 du 30 novembre 2012).

Les surfaces rouges représentent la zone d'interdiction totale de pêche. Les surfaces orange représentent les zones d'interdiction de la langouste.

6-1-2- *Quand les chercheurs locaux vont à la rencontre de la population : Outil d'aide à la décision aux agriculteurs et à la population*

"Manjé local pou toujou doubout dwèt kon pikan⁸⁹"

Livret fruits, légumes et féculents de Guadeloupe – programme Jafa

Les chercheurs se sont particulièrement intéressés aux inquiétudes posées par l'autoconsommation et les circuits courts *via* l'autoproduction (jardins créoles) et les circuits informels de distribution (échanges entre voisins, ventes sur les bords de route) de denrées alimentaires. Le programme Jafa (jardins familiaux ou jardins créoles), débuté en 2009 en Guadeloupe, est un programme régional d'information et de prévention ayant pour objectif de « réduire l'exposition au chlordécone des populations ayant des habitudes d'approvisionnement et d'autoconsommation de denrées animales et végétales issues de jardins familiaux ». Ce programme s'adresse aux particuliers habitant sur ou à proximité des zones polluées et s'alimentant fréquemment avec leurs propres productions. Il consiste à informer la population sur la

⁸⁸ http://cartes.observatoire-eau-martinique.fr/interdiction_peche_plaisance/flash/

⁸⁹ « Consommons local pour être en bonne santé »

problématique CLD, diffuser des recommandations visant à limiter l'exposition des populations au CLD *via* des médias locaux (radios, presse écrite, TV) et des réunions de quartiers. Des enquêtes en porte-à-porte ont été menées dans les zones à risque afin d'évaluer si les habitudes alimentaires des particuliers présentaient un risque, et si tel était le cas, des analyses de sol étaient proposées afin de connaître le niveau de pollution du jardin considéré (Site internet du programme Jafa⁹⁰).

Comme nous l'avons vu, la teneur en CLD du sol semble être un bon proxy de la contamination des végétaux. Afin de fournir un outil de prédiction de la contamination des végétaux, et pour venir en aide aux agriculteurs et à la population antillaise de manière générale, des chercheurs ont déterminé des limites maximales « tolérables » de contamination du sol en dessous desquelles le risque que la LMR du produit soit dépassée est nul (**figure 33**).

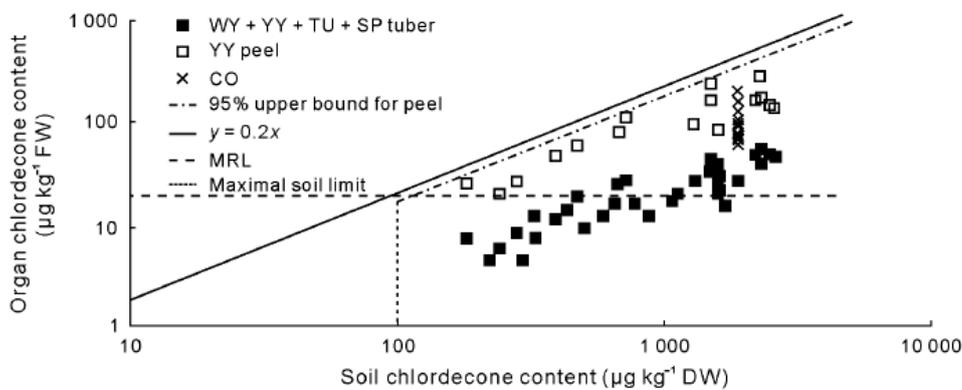


Figure 33. Détermination de la limite maximale « tolérable » de la contamination de nitisols par le CLD en-dessous de laquelle le risque de dépassement de la LMR CLD définie par la commission européenne est nul (tirée de Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012).

La teneur en CLD du sol est donnée pour un poids sec (DW) et celle des plantes est donnée pour un poids frais (FW). En noir, les données des tubercules d'ignames blancs (WY, White Yam), d'ignames jaunes (YY, Yellow Yam), de patates douces (SP, Sweet Potato) et de radis (TU, Turnip). En blanc, la peau d'ignames jaunes. Et les croix représentent les données des courgettes. La droite $y = 0,2x$ correspond au transfert maximal sol-plante observé (de 20% chez les légumes-racines). La LMR (=MRL) CLD de $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ est représentée.

Ainsi, la culture des végétaux les plus sensibles (« légumes-racines ») est déconseillée sur des sols contaminés à des concentrations supérieures à $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$; pour les végétaux moyennement sensibles (canne à sucre et produits se développant avec contact partiel avec le sol, cucurbitacées, laitues) la culture peut être menée sur des sols présentant des contaminations jusqu'à 1 mg.kg^{-1} de CLD ; et la culture des végétaux les moins sensibles au transfert (cultures fruitières et maraîchères sans contact avec le sol) ne présente pas de limite particulière. Les arrêtés préfectoraux du 20 mars 2003 pour la Martinique (n°030725) et du 30 octobre 2003 pour la Guadeloupe (n°1496-2003) ont institué des analyses préventives de sols pour la recherche d'organochlorés avant la mise en culture des terres. Ces analyses ont ainsi permis aux agriculteurs de connaître le niveau de contamination de

⁹⁰ <http://jafa.ireps.gp/>

leurs terres et à l'aide de l'outil de prédiction du risque de contamination des végétaux, ils sont en mesure de décider des cultures à mener sur leurs terres.

Pour faciliter les échanges, des supports pédagogiques sous forme de plaquettes et livrets ont été créés (figure 34) : plaquettes « du bassin versant à l'assiette : le transfert de la chlordécone », « la chlordécone et les végétaux » ; livret « la chlordécone et les volailles » ; « élevage et chlordécone : préconisations » ; fiche « transfert de la chlordécone du sol vers les cultures »⁹¹.

Productions végétales et contamination par la chlordécone : 3 comportements

Cultures peu sensibles : maraîchage, arbustes et arbres

Presque toutes les cultures maraîchères ont une faible sensibilité au transfert de chlordécone vers les « légumes » : christophines palissées, tomates, aubergines, gombos, haricots verts, piments... seules les cives, les laitues et la majorité des cucurbitacées ont un comportement différent.

De même, pour toutes les cultures pérennes (arbres et arbustes) ainsi que la banane et l'ananas on observe un très faible transfert de chlordécone vers leurs fruits.

Tous les résultats d'analyses de chlordécone effectués sur ces fruits et légumes sont très nettement inférieurs à la LMR. Les cultures fruitières et maraîchères peu sensibles peuvent donc être produites sur toutes les parcelles, quelle que soit la teneur en chlordécone.

Pas de restriction de mise en culture

Cultures intermédiaires : cucurbitacées et salades

En dehors de la christophine cultivée palissée, toutes les cucurbitacées (concombre, giraumon, courgette, pastèque...), de même que la laitue (et autres salades) peuvent être contaminées au-delà de la LMR.

Dans l'oignon pays ou cive, les parties consommées sont à la fois souterraines (bulbe) et aériennes (feuilles). Le bulbe est contaminé mais pas les feuilles.

Pour ce qui est de la canne à sucre, le bas de la tige est beaucoup plus contaminé que le haut. Sur la canne entière la contamination reste très faible.

Les teneurs en chlordécone de ces produits peuvent atteindre plusieurs dizaines de µg par kg de produit frais. Afin de ne pas dépasser la LMR pour ces productions, il faut éviter la mise en culture sur des sols contaminés au-delà de 1mg/kg de sol sec.

A éviter sur sol pollué au-delà de 1 mg/kg

Cultures très sensibles : les racines et tubercules

Les racines et tubercules sont très sensibles au transfert de chlordécone car la partie consommée se développe entièrement en contact direct avec le sol pollué.

Patate douce, igname, dachine (madère), carotte, navet, radis et tous les autres légumes racines sont concernés, mais aussi des épices comme le gingembre et le curcuma.

Les teneurs en chlordécone pour ces cultures peuvent largement dépasser la LMR (plus de 100 µg/kg de poids frais). Pour ne pas dépasser la LMR pour les racines et tubercules, il faut éviter la mise en culture sur des sols contaminés au-delà de 0.1mg/kg de sol sec.

A éviter sur sol pollué au-delà de 0,1 mg/kg

Figure 34. Plaquette pédagogique destinée à la population pour conseiller dans le choix de culture en fonction du niveau de contamination de la parcelle (tirée de la plaquette « la chlordécone et les végétaux »).

Par ailleurs, certaines pratiques culturales pouvant être mises en œuvre pour limiter le transfert vers les produits consommés sont conseillées à la population et aux agriculteurs : culture hors-sol sur substrat sain (laitue, cive), tuteurage (concombre), palissage (christophine), paillage (giraumon) (Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012).

⁹¹ Plaquettes disponibles sur : http://antilles-guyane.cirad.fr/content/download/5153/36512/version/1/file/obj_8581_file_Transfert-de-la-chlordecone.pdf ; <http://www.caec-carib.org/actualite/2014-fiche-chd-vegetaux.pdf> ; <http://www.caec-carib.org/actualite/2014-fiche-chd-volailles.pdf> ; http://daaf971.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Plaquette-Chlordecone-Elevage-2013_cle8cf6d4.pdf ; <http://ur-hortsys.cirad.fr/content/download/4815/34365/version/1/file/fichesCLDcirad.pdf>

6-1-3- Insecticides de remplacement

Sans surprise, depuis l'interdiction du CLD, une multitude de pesticides l'ont substitué afin de protéger les bananeraies (Bocquené et Franco 2005; Chabrier *et al.* 2005; Rateau 2013) parmi lesquels on dénombre :

-des spécialités commerciales à action insecticide strict :

- Le Bullit, autorisé en 1991, retiré en 2001 ; m.a.⁹² : pyrimifos-éthyl 250 g.L⁻¹, insecticide de la famille des phosphorothioates.
- Le Regent 5GR, autorisé en 1995, retiré en 2003 ; m.a. : fipronil 0,5 %, insecticide de la famille des phénylpyrazoles mis au point par Rhône-Poulenc.

-des spécialités commerciales à action mixte insecticide/nématicide :

- Le Counter 10G, autorisé en 1992, retiré en 2003 ; m.a. : terbufos 10 %, pesticide de la famille des phosphorodithioates.
- Le Rugby 10G+, autorisé en 1987, retiré en 2007 ; m.a. : cadusafos 10 %, pesticide de la famille des organophosphorés.
- Le Nemathorin 10G, autorisé (n° 9600199) pour les nématodes et ravageurs du sol de la pomme de terre et du bananier, et actuellement utilisé aux Antilles ; m.a. : fosthiazate 10%, pesticide de la famille des organophosphorés.
- Le Temik, autorisé en 1970, retiré en 2002 ; m.a. : aldicarbe 10%, pesticide de la famille des carbamates.

A ma connaissance, le seul pesticide aujourd'hui autorisé pour la lutte contre les charançons du bananier est le Nemathorin 10G (base de données e-phy⁹³). Ce pesticide mixte est positionné en 8^{eme} position des substances actives les plus vendues en Martinique, tous usages confondus (bananiers, canne à sucre, maraîchage et usages non-agricoles) (Rateau 2013).

Des techniques alternatives de lutte biologique telles que les pièges à phéromones sont maintenant également utilisées dans les bananeraies, et sont décrites en détails dans le paragraphe suivant.

⁹² Matière active

⁹³ <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

6-2- Des alternatives de lutttes biologiques contre le charançon du bananier ?

"Sé vyé kannari ka fè bon soup⁹⁴"

Proverbe Créole

Bien souvent, les pesticides sont utilisés à titre préventif en l'absence d'organismes nuisibles pour assurer la qualité sanitaire de la production végétale, sans prêter attention aux incidences qu'ils pourraient avoir sur les organismes non-cibles utiles ou au fait qu'ils risqueraient d'être entraînés vers des zones non-agricoles (Kermarrec 1980). Cette utilisation systématique associée à une logique de monoculture de rente a des répercussions néfastes. Elle conduit entre autres à l'acquisition d'une résistance aux pesticides chez les ravageurs⁹⁵ « nécessitant » le recours permanent à de nouvelles matières actives (INRA 1999; Cabidoche *et al.* 2005), à un effet létal sur la macrofaune (Saffache *et al.* 2005), à la prolifération de nouveaux nuisibles suite à la destruction des prédateurs⁹⁶, à l'altération des sols devenus impropre à la culture, à la contamination d'organismes non-cibles servant à l'alimentation de l'Homme tels que poissons et animaux d'élevage, à l'extermination de la faune sauvage... Cette observation n'est pas nouvelle. En effet, dans leur livre intitulé « Méthodes de lutte intégrée et de lutte biologique », Biliotti et Brader (1975) écrivaient : « *Les vingt dernières années ont été marquées par la prise de conscience progressive des inconvénients de tous ordres entraînés par l'emploi généralisé de produits de synthèse totalement « nouveaux » pour le milieu dans lequel ils intervenaient. En réaction contre ces excès il est logique de s'orienter vers l'utilisation préférentielle de substances ou d'organismes existant dans la biosphère, ce qui, pour beaucoup se traduit par l'utilisation de moyens naturels* ».

L'origine du questionnement sur notre manière de cultiver nos terres ne réside pas dans la seule question de l'usage des pesticides. Sont en cause, les pratiques culturales (monoculture, labour profond), les intrants (pesticides et engrais chimiques), les semences. Le marché des semences et des intrants chimiques sont tous deux détenus par une poignée de groupes industriels dominant l'agrochimie. En 1978, Poly écrivait : « *Les systèmes de culture simplifiés [...] aboutissant [...] à des monocultures engendrent davantage de problèmes, ou pis encore, de nouveaux problèmes phytosanitaires. Il devient de plus en plus nécessaire d'approfondir nos réflexions sur les objectifs d'une nouvelle politique en matière de protection sanitaire de nos cultures* ». Dans un livre intitulé « *Agriculture biologique en Martinique* » (François *et al.* 2005), auquel participent deux grands noms

⁹⁴ « C'est dans les vieilles marmites qu'on fait les meilleures soupes » *i.e.* c'est avec de vieilles méthodes éprouvées qu'on a les meilleurs résultats.

⁹⁵ C'est le cas pour *Cercospora musicola*, l'agent de la cercosporiose du bananier, mais aussi pour *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de l'anthracnose chez différentes espèces dont l'igname (Cabidoche *et al.* 2005).

⁹⁶ Prolifération de pucerons sur aubergine induite par l'utilisation d'insecticides organophosphorés qui détruisent *Acrostalagmus aphidum*, un champignon pathogène des pucerons ; prolifération de mouches mineuses (*Liriomyza* sp.) s'installant sur le melon à la faveur du « vide biologique » résultant de l'usage du prophénofos (Cabidoche *et al.* 2005)...

de la recherche française en matière de CLD, Yves-Marie Cabidoche et Éric Blanchard, Langlais et Taupier-Letage introduisent leur chapitre par une citation issue d'un article de Terre citoyenne (mars 2003) disant « *le droit des peuples à pouvoir choisir leur nourriture passe nécessairement par la maîtrise d'un des premiers maillons de la chaîne alimentaire : la semence. Or, celle-ci est en passe d'être confisquée, via les différentes législations nationales et internationales, par les multinationales de l'agro-industrie. C'est un vaste "hold-up" des connaissances et du travail des paysans qui se sont accumulés depuis des siècles qui est en train de se réaliser* » (Cabidoche et al. 2005). La culture bananière est un parfait exemple de la politique agricole productiviste : deux variétés de bananes (Cavendish et plantain) sont principalement cultivées alors que plus d'un millier de variétés de bananiers existe naturellement ; il s'agit d'une monoculture basée sur le marché d'exportation qui recourt massivement aux intrants chimiques (herbicides, insecticides, nématicides, fongicides) pour assurer sa productivité au détriment de l'environnement.

Aujourd'hui le scandale du CLD montre clairement les limites de ce type de production et aujourd'hui, la recherche d'alternatives semble inévitable : commençons par nous demander comment faisons-nous avant l'arrivée des pesticides dans le monde agricole ?

6-2-1- Le piégeage du charançon du bananier : technique ancestrale revisitée.

A l'origine, le premier procédé de lutte utilisé contre le charançon du bananier consistait en un piégeage à partir de pseudo-tronc de bananier. En effet, ces insectes fousseurs vivent au niveau du sol et des détritux de végétaux. Les femelles pondent leurs œufs au niveau du collet du bananier et le cycle de développement des larves a lieu dans le bulbe du bananier qu'elles grignotent pour se nourrir. Pour lutter contre le charançon, des pseudo-troncs de bananier étaient alors coupés (i) longitudinalement, formant un piège demi-cylindrique, la face coupée étant placée directement sur le sol ; ou bien (ii) transversalement constituant des rondelles déposées au sol. Les charançons, ne résistant pas au cœur tendre du pseudo-tronc, se réfugiaient sous les pièges et étaient alors récoltés manuellement (INRA 1999).

La seule alternative de lutte biologique proposée aujourd'hui pour lutter contre le charançon s'inspire en partie de cette méthode ancestrale reposant sur le piégeage. La mise en évidence de la production par le mâle d'une phéromone, la sordinine, ayant une activité attractive sur les deux sexes (Budenberg et al. 1993; Beauhaire et al. 1995) a en effet permis de développer une méthode de piégeage basée sur la confusion sexuelle. Le piège est constitué d'un bac rempli d'eau savonneuse surmonté d'un couvercle auquel est suspendu un diffuseur de sordinine. Un espace est laissé libre entre le bac et le couvercle pour que les charançons puissent passer et se noyer dans l'eau savonneuse. Cette méthode s'est développée sur le terrain et 28 121 diffuseurs ont été vendus en

2003. Une étude montre toutefois qu'en cas de forte infestation, le piégeage est insuffisant (Chabrier *et al.* 2005).

En 2002, une méthode de lutte biologique combinant l'utilisation du piège à phéromones avec l'inoculation de vers parasites des charançons, le nématode entomopathogène *Steinernema carpocapsae*, a été développée. Dans cette nouvelle version, le piège est identique au précédent si ce n'est que l'eau savonneuse a été remplacée par du sable contenant quelques chenilles de Teignes du rucher (*Galleria mellonella*) infestées par le nématode et le transmettant aux charançons. Les charançons parasités infecteront ensuite leurs congénères causant leur dépérissement. Pour assurer une pression entomopathogène suffisante, les chenilles doivent être renouvelées toutes les semaines, tandis que le diffuseur de sordinine est efficace pendant 180 jours. Cette technique testée sur 8 hectares de bananeraies pendant 3 ans a une efficacité au moins équivalente à celle des insecticides traditionnels. Toutefois, à ce jour, malgré l'intérêt qu'elle présente, l'autorisation d'importation aux Antilles de la souche de nématode n'a pas été obtenue (INRA Antilles-Guyane, Trans-FAIRE⁹⁷).

6-2-2- Introduction de prédateurs du charançon du bananier

Les insectes prédateurs de *Cosmopolites sordidus* ne sont pas présents aux Antilles. Le bananier, le charançon et ses prédateurs sont originaires du sud-est de l'Asie. Le bananier a été introduit aux Antilles par l'Homme tout comme son ennemi n°1, le charançon, mais hélas les prédateurs du charançon sont eux restés dans leur aire d'origine. Il existe en Guadeloupe des espèces généralistes de fourmis (*Azteca spp.*, *Solenopsis geminata*, *Wasmannia auropunctata* et *Pheidole fallax*) qui pourraient partiellement contrôler le développement de populations de charançon si les bananeraies n'étaient pas traitées avec des insecticides qui les éliminent (Sirjusingh *et al.* 1992). A la Jamaïque et aux îles Fidji, les essais de lutte biologique tentés à l'aide du crapaud *Bufo marinus* méritent également d'être mentionnés : ce vertébré vorace d'insectes serait friand d'un grand nombre de charançons (Cuillé 1950). Dans l'ouest du Kenya, le coléoptère *Dactylosternum abdominale* élimine jusqu'à 50 % des œufs de *C. sordidus*, ce qui est remarquable si l'on considère la faible fécondité de ce ravageur (Koppenhöfer 1991). Dans les cultures bananières cubaines, les fourmis prédatrices *Pheidole megacephala* et *Tetramorium guineense* se révèlent très efficaces : *T. guineense*, en particulier, est responsable de 67 % à 83 % de la mortalité larvaire dans les zones bananières très infestées à peu infestées (Roche et Abreu 1983; Castiñeiras *et al.* 1991). Toutefois, la littérature scientifique rapporte de nombreux échecs de la lutte biologique basée sur l'introduction de prédateurs (Roche et Abreu 1983; Neuenschwander 1988; Allard *et al.* 1991). Ceux-

⁹⁷ <http://transfaire.antilles.inra.fr/spip.php?article8>

ci peuvent s'expliquer en raison (i) du régime généraliste des prédateurs, (ii) d'une difficulté d'acclimatation des prédateurs aux nouvelles contrées, (iii) d'une compétition avec d'autres espèces autochtones, et (iv) d'une connaissance insuffisante de la biologie du ravageur lui-même (Traoré *et al.* 1991; Sirjusingh *et al.* 1992).

Dans ce paragraphe, j'ai rapporté les essais de lutte biologique menés pour lutter contre le charançon dans les bananeraies conduites selon des pratiques agricoles conventionnelles. Dans ce contexte, l'application de ces techniques de lutte biologique présente des contraintes et des limites (piégeage insuffisant en cas de forte infestation). Elles ouvrent toutefois des perspectives intéressantes de lutte intégrée plus ambitieuse reposant sur des pratiques agroécologiques (compagnonnage des plantes, cultures associées à l'élevage, rotation des cultures, etc...). En effet, la diversification végétale semble favorable à la régulation du ravageur : intercaler les cultures de bananier avec des plantations de café ou de cannelle, comme c'est le cas en Asie du Sud-Est (Abera-Kalibata *et al.* 2006), pourrait permettre une bonne régulation des populations de charançon dans le contexte Antillais.

Conclusion et objectifs

Conclusion

Le CLD, vu dans les années soixante-dix comme le sauveur de la filière bananière aux Antilles est maintenant qualifié par la communauté scientifique de « monstre chimique », responsable d'un désastre écologique et sanitaire. Il est certainement le « pire scénario » redouté par l'ensemble des parties prenantes du monde agricole pour lequel un produit phytosanitaire autorisé par les services compétents du Ministère de l'Agriculture pendant plusieurs dizaines d'années se retrouve inscrit à l'annexe A de la convention de Stockholm comme polluant organique persistant. Cet insecticide récalcitrant à la dégradation et par conséquent persistant, contamine désormais une grande partie des sols cultivés antillais et ce pour plusieurs centaines d'années. Malgré sa forte hydrophobicité et sa forte affinité pour la matière organique, le CLD se retrouve dans les compartiments aquatiques contaminant les ressources halieutiques et les ressources en eau potable. Transféré dans les tissus végétaux et animaux, le jeu du réseau trophique et la capacité du CLD à se bioaccumuler et se bioamplifier, contribuent à l'exposition de la population antillaise par la chaîne alimentaire à l'origine de sa contamination. Cette exposition provoque au sein de la population antillaise un risque accru de contracter un cancer de la prostate ou de présenter des retards cognitifs et moteurs chez de jeunes enfants. Face à cette problématique environnementale ayant des répercussions sur la santé humaine, l'état Français a mis en place un Plan National d'Action Chlordécone (PNAC) dont l'un des objectifs principaux était de réduire l'exposition des populations au CLD. Cet objectif a été atteint par différentes actions : mise en place du traitement de l'eau (filtration sur charbon actif ou dilution) pour fournir une eau potable indemne de CLD ; différents arrêtés préfectoraux réglementant ou interdisant la pêche et la chasse ; conseils aux agriculteurs et à la population dans leur choix de cultures et dans la mise en place de méthodes simples pour réduire l'exposition au CLD (outil d'aide au choix de culture en fonction du niveau de pollution du sol, culture hors-sol, paillage, tuteurage, épluchage des légumes, etc...). Des actions de recherche ont été menées dans le cadre du PNAC pour tester des approches alternatives aux techniques classiques de remédiation (excavation et incinération) de sols pollués non applicables sur de telles superficies. Dans le cadre du PNAC II, l'INRA a mis en place un appel à proposition de recherche sur le thème de la bioremédiation (APR Demichlord). Le projet Biodechlord, au sein duquel s'inscrivent mes travaux de thèse, visait à explorer la possibilité d'une dégradation microbienne du CLD dans le sol des Antilles.

Objectifs de la thèse

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet Biodechlord coordonné par Fabrice Martin-Laurent (UMR Agroécologie, INRA Dijon). Ils visaient à rechercher l'existence de traces de transformation microbienne aérobie du CLD dans les sols des Antilles. L'hypothèse sous-jacente est que suite à l'exposition continue au CLD depuis le début des années 70, une fraction de la communauté microbienne se serait adaptée en faisant l'acquisition de mécanismes de tolérance et/ou de détoxification (incluant le processus de biodégradation) du CLD. Pour atteindre cet objectif mon travail de thèse a d'abord consisté à développer une méthode permettant de quantifier le CLD et ses deux métabolites connus (monohydro- et dihydro-CLD) dans les sols et dans des cultures microbiennes. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode reposant sur l'utilisation de l'isotopie stable pour laquelle l'ajout de $^{13}\text{C}_{10}$ -CLD comme traceur isotopique permet d'estimer le rendement d'extraction du CLD, mais aussi de le quantifier (ainsi que ses deux métabolites) dans des extraits de sols sur la base du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Les résultats de ces travaux publiés cette année dans la revue *Environmental Science and Pollution Research* sont présentés dans la première partie expérimentale intitulée « **Mise au point méthodologique de quantification du CLD** ». Dans un second temps, j'ai recherché des microorganismes dans des cultures d'enrichissement préparées à partir de sols contaminés avec le CLD capables de se développer en présence de cet insecticide. Ces travaux ont conduit à l'isolement et à la caractérisation phylogénique d'isolats bactériens et fongiques tolérants au CLD. La tolérance de ces microorganismes au CLD a été évaluée *in vitro* par différentes approches. Les capacités de dégradation de ces microorganismes ont été évaluées par différentes approches (dissipation du CLD, accumulation d'ions chlorure et production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de ^{14}C -CLD). La formation de métabolites du ^{14}C -CLD a été recherchée par CCM. Parmi, les processus impliqués dans la dissipation du CLD dans les cultures microbiennes, nous avons étudié en détail les capacités d'adsorption des membranes de plusieurs isolats fongiques. Les résultats de ces travaux sont présentés dans la partie expérimentale intitulée « **Recherche de microorganismes dégradants** ».

Dans un troisième temps, j'ai développé une approche d'écotoxicologie microbienne visant à estimer l'impact du CLD sur la structure, l'abondance et l'activité des microorganismes du sol car, étrangement, bien que de nombreux travaux aient été conduits sur la contamination des sols des Antilles avec le CLD, aucun n'avait porté sur cette question. Pour mener à bien cette étude, j'ai travaillé sur des sols métropolitains, n'ayant jamais été exposés au CLD, traités avec différentes quantités de CLD. L'impact de ces traitements sur les communautés microbiennes des sols a été évalué au cours du temps *via* l'étude de l'impact sur l'abondance des communautés bactériennes et

Partie 1 : Introduction bibliographique – Objectifs de la thèse

fongiques (qPCR 16S et 18S), sur la diversité des communautés bactériennes (qPCR taxons spécifique), sur la structure génétique des communautés (B-ARISA et F-ARISA), et sur les fonctions écosystémiques des communautés (potentiel de minéralisation de l'acétate d'éthyle et d'un autre pesticide, le 2,4-D). Les résultats de cette étude sont présentés dans la troisième partie expérimentale intitulée « ***L'impact du CLD sur les communautés microbiennes des sols*** ».

PARTIE 2

Partie expérimentale

Organisation de la partie expérimentale

La seconde partie de ce manuscrit présente les résultats de mes expériences valorisés sous la forme de quatre articles scientifiques et d'une déclaration d'invention qui pour des questions de confidentialité ne peut pas être présentée dans ce manuscrit. Elle est divisée en trois chapitres :

- Le **chapitre 1** concerne la **mise au point d'une méthode de détection et de quantification du CLD** dans des échantillons de sols par GC-MS avec du ^{13}C -CLD utilisé comme traceur, ayant fait l'objet d'une publication dans la revue *Environmental Science and Pollution Research* (Martin-Laurent *et al.* 2014).

- Le **chapitre 2** est consacré à la **recherche de souches microbiennes dégradant le CLD**, axe principal de la thèse. Il se présente sous la forme de 2 articles. L'un présente la caractérisation de populations fongiques tolérantes au CLD et a fait l'objet d'une publication dans la revue *Environmental Science and Pollution Research* (Merlin *et al.* 2014). L'autre rend compte du potentiel de sorption de la biomasse fongique et est en cours de préparation (Merlin *et al.*, in prep). Il n'est pas encore soumis à une revue internationale car nous avons déposé auprès du service de Propriété Intellectuelle (UCPI) de l'INRA une déclaration d'invention pouvant, le cas échéant, déboucher sur la rédaction d'un brevet. Nous sommes dans l'attente de la réponse de l'UCPI pour savoir quelle démarche sera suivie.

- Le **chapitre 3** traite de la question de **l'impact du CLD sur la structure, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne des sols**. Il se présente sous la forme d'un article ayant été accepté à la revue *Environmental Science and Pollution Research* (Merlin *et al.*, accepted with minor revision).

Chapitre 1

Mise au point méthodologique

Article 1 : Mise au point d'une méthode de détection et de quantification du CLD dans des sols contaminés des Antilles françaises par GC-MS basée sur l'utilisation de l'isotope stable $^{13}\text{C}_{10}$ -CLD comme traceur.

Martin-Laurent et al. (2014) *Environmental Science and Pollution Research*. 21(7):4928-4933

Introduction

Le scénario d'exposition des populations antillaises au CLD a été établi sur la base de l'analyse de l'historique des usages des terres agricoles qui a permis de dessiner une carte de risque de pollution des sols en Martinique et en Guadeloupe. Afin de valider ces cartes de risque, plusieurs campagnes de prélèvement et d'analyse des sols ont été menées pour détecter et quantifier le CLD dans les sols.

Aujourd'hui, les analyses de quantification du CLD dans diverses matrices environnementales (sol, eau, tissus végétaux et animaux) mandatées par les services déconcentrés de l'état français sont réalisées dans des laboratoires d'analyses accrédités pour réaliser des analyses dans le cadre des contrôles réglementaires tels que le laboratoire départemental d'analyse (LDA) 972 ou le LDA 26 (Guldner *et al.* 2009). Toutefois, la détection et la quantification du CLD dans différentes matrices restent difficiles : la marge d'erreur relative à la seule quantification du CLD est estimée à plus de 30% selon le LDA 26 (Rocle *et al.* 2009). Ainsi, le LDA 26 et le LDA 972 rapportent que la quantification du CLD présente un intervalle de confiance de 30% à partir d'extraits de sols et tissus végétaux (feuilles de laitue, tubercules de dachines) (Woignier *et al.* 2012), tandis qu'une autre étude montre des coefficients de variations variant de 50 à 70% dans les tissus végétaux (Achard *et al.* 2007). Ces incertitudes sur les mesures du CLD dans différentes matrices démontrent les difficultés rencontrées par les laboratoires d'analyses pour quantifier cet insecticide et les précautions qu'il convient de prendre dans l'interprétation des données générées.

Récemment, de nombreux efforts ont été produits par différents groupes scientifiques, dont certains travaillant dans le cadre du Plan National Chlordécone (PNAC) mis en place par l'état Français, pour améliorer les méthodes analytiques pour détecter et quantifier le CLD et ses principaux métabolites par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, Frenich *et al.* 2000), par spectrométrie de masse en tandem (GC-MS-MS, Bristeau *et al.* 2014), ou par chromatographie haute performance liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, Moriwaki et Hasegawa 2004). En

raison, d'un seuil de détection très faible ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$), la GC-MS reste la méthode de référence pour quantifier le CLD dans les sols. D'autres méthodes moins sensibles mais moins onéreuses que les méthodes de GC- et LC-MS, telles que la spectroscopie proche infrarouge (NIRS) ont été proposées pour prédire la teneur en CLD dans les sols contaminés des Antilles (Brunet *et al.* 2009). Le principal avantage de la NIRS est qu'elle est réalisée directement sur l'échantillon de sol sans avoir à l'extraire par des solvants organiques. En effet, cette étape d'extraction est l'étape cruciale qui permet d'extraire ou non la molécule à détecter et ce d'autant plus pour le CLD qui est connu pour être peu soluble dans l'eau, lipophile et présentant des affinités pour la matière organique des sols. Dans la plupart des approches proposées, le rendement d'extraction n'est pas évalué et quand il l'est, les auteurs le réalisent par la technique de l'ajout dosé de ^{12}C -CLD dans l'échantillon à analyser (Frenich *et al.* 2000; Bristeau *et al.* 2014). En l'absence d'abaque reliant le rendement d'extraction aux propriétés physicochimiques du sol, cette technique doit être mise en œuvre pour chaque échantillon de sol. De plus, pour permettre le calcul du rendement d'extraction, le CLD doit être ajouté à plusieurs concentrations ($0,1$, $0,25$, $0,5$, 1 and 10 mg.kg^{-1} pour les nitisols et ferrasol, Bristeau *et al.* 2014). Par conséquent, même si cette méthodologie est fonctionnelle, elle est difficile à mettre en œuvre sur de grandes séries d'échantillons.

Afin de contourner cette difficulté, nous avons développé une méthode reposant sur l'utilisation du ^{13}C -CLD comme traceur isotopique pour estimer le taux d'extraction du CLD des sols mais également pour le quantifier dans des extraits de sols sur la base du ratio isotopique ^{13}C -CLD/ ^{12}C -CLD par analyse conduite en GC-MS.

Remarque : nous avons mis en évidence un problème rencontré dans l'analyse granulométrique de l'andosol présentée dans le tableau 1 de Martin-Laurent *et al.* (2014). La composition granulométrique de l'andosol se compose de : 362 g.kg^{-1} d'argiles ($<2 \mu\text{m}$), 535 g.kg^{-1} de limons fins ($2/20 \mu\text{m}$), 32 g.kg^{-1} de limons grossiers ($20/50 \mu\text{m}$), 25 g.kg^{-1} de sable fin ($50/100 \mu\text{m}$), 42 g.kg^{-1} de sable grossier ($200/2,000 \mu\text{m}$).

Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone stable isotope as a tracer

Fabrice Martin-Laurent · Mehdi M. Sahnoun ·
Chloé Merlin · Guy Vollmer · Markus Lübke

Received: 26 February 2013 / Accepted: 17 May 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Chlordecone is an organochlorine insecticide that has been widely used to control banana weevil in the French West Indies. As a result of this intense use, up to 20,000 ha are contaminated by this insecticide in the French West Indies, and this causes environmental damage and health problems. A scenario of exposure was drawn by French authorities, based on land usage records. Many efforts have been made to monitor the occurrence of chlordecone and its main metabolites using different analytical methods, including GC, GC/MS, LC/MS, and NIRS. Although these different methods allow for the detection and quantification of chlordecone from soils, none of them estimate the bottleneck caused by extraction of this organochlorine from soils with high adsorption ability. In this study, we used $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone as a tracer to estimate chlordecone extraction yield and to quantify chlordecone in soil extracts based on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope dilution. We report the optimization of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone extraction from an Andosol. The method was found to be linear from 0.118 to 43 mg kg $^{-1}$ in the

Andosol, with an instrumental detection limit estimated at 8.84 $\mu\text{g kg}^{-1}$. This method showed that chlordecone ranged from 35.4 down to 0.18 mg kg $^{-1}$ in Andosol, Nitisol, Ferralsol, and Fluvisol soil types. Traces of the metabolite β -monohydrochlordecone were detected in the Andosol, Nitisol, and Ferralsol soil samples. This last result indicates that this method could be useful to monitor the fate of chlordecone in soils of the French West Indies.

Keywords Chlordecone · Organochlorine pesticide · Soil contamination · Banana plantation

Introduction

Chlordecone (decachlorooctahydro-1,3,2-metheno-2H-cyclobuta[c,d]pentalen-2-one) is an organochlorine insecticide that was once used worldwide. In the French West Indies, it was used in banana plantations to control the development of weevil, *Cosmopolites sordidus*. Over the 1978–1993 period, approximately 300 t of chlordecone was applied to banana plantations in the French West Indies. As a result of this intensive use, the survey conducted in the context of the French National Action Plan for chlordecone revealed its presence in soils, rivers, springs, and drinking water (PNAC 2008–2010). Since May 2009, chlordecone has been classified as a persistent organic pollutant and listed in Annex A of the Stockholm Convention. Its persistence in the agricultural soils of the French West Indies (i.e., 20,000 ha that represents up to 25 % of the agricultural surface of the FWI) was estimated to last for several decades in Nitisol, centuries in Ferralsol, and half a millennium in Andosol soils (Cabidoche et al. 2009). On the basis of land usage, a map estimating the levels of chlordecone contamination was drawn in order to help the French authorities to establish land usage

Responsible editor: Philippe Garrigues

Fabrice Martin-Laurent and Mehdi Sahnoun M are equal first authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-013-1839-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Martin-Laurent · C. Merlin
INRA, UMR 1347 Agroecology, 17 rue Sully, BP 86510,
21065 Dijon Cedex, France

F. Martin-Laurent (✉)
Maison Régionale de l'Innovation, 64 A rue de Sully, CS 77124,
21071 Dijon Cedex, France
e-mail: fabrice.martin@dijon.inra.fr

M. M. Sahnoun · G. Vollmer · M. Lübke
Aromalyse, 3 rue des ciseaux, 21800 Quetigny, France

Published online: 04 June 2013

 Springer

recommendations (Le Déault and Procaccia 2009). It gives a first approach of local people's exposure risk to chlordane. However, it is important to monitor chlordane concentrations in various soil types of the French West Indies to test the validity of the scenario of exposure to chlordane and to revise it if discrepancies between expected and measured chlordane concentrations are recorded.

In a methodological review, Faroon and Kueberuwa (1995) report the detection of mirex and photomirex from soil samples using gas chromatography (GC) and capillary gas chromatography with electron capture detection. Soil samples are usually solvent extracted, cleaned up with Florisil columns, and analyzed by GC. More recently, chlordane residues extracted from soil were detected by GC coupled with mass spectrometry (MS) (Frenich et al. 2000). In addition, Moriwaki and Hasegawa (2004) proposed to detect chlordane by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. More recently, Brunet et al. (2009) explored the potential of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for determining chlordane contents in Andosols, Nitisols, and Ferralsols from Martinique. NIRS was proposed for classifying the chlordane contamination levels of agricultural soils but did not give a sharp estimation of these levels. Mirex was also quantified from Chinese soil using high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (Wang et al. 2010). Keeping in mind the very low detection limit (0.01 mg kg^{-1}), GC-MS remains the reference method for quantifying chlordane residues in soils. The usual method, notably applied by the laboratory analyses commissioned by the French authorities to analyze soil contamination, involves extraction with two solvents followed by a GC-MS analysis using $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordane as an injection tracer. However, although chlordane is known to be highly adsorbed onto soil components (i.e., Koc values ranging from 2,000 to 2,500 l kg^{-1} ; ATSDR 1995), the yield of chlordane extraction from different soil matrices is hardly ever considered.

In order to take into account this missing parameter to optimize detection and tune the detection of chlordane in contaminated soils of the French West Indies, we proposed the use of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordane as a tracer to not only estimate the yield of chlordane extraction, but also to quantify chlordane in soil extracts based on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. Here, we report the development of an analytical method for the detection and quantification of chlordane and its known degradation products (β -monohydrochlordane and dihydrochlordane) in contaminated soils spiked with $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordane, using GC-MS. The optimization of the extraction procedure for a typical West Indies clayish soil is described. This technique was evaluated on four different soil types representative of French West Indies soils.

Materials and methods

Chemicals and reagents

[^{12}C U]-Kepone PESTANAL[®] (kepone; 1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one) was purchased from Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Germany) (chemical purity 99.7 %), whereas [$^{13}\text{C}_{10}$ U]-chlordane[®] (kepone; 1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one) was from LGC standards (100 $\mu\text{g/ml}$ solution in nonane, chemical purity 99.0 %). Anthracene-d10, used as an internal standard, was obtained from Sigma-Aldrich. It was diluted to a final concentration of 0.1 mg l^{-1} in dichloromethane used to resuspend the soil extracts.

Soil samples

Experiments were performed on four soils collected in the French West Indies (i.e., Andosol, Ferralsol, Fluvisol, and Nitisol) which were chosen for their physicochemical diversity and for their representativeness of the different classes of soils found on the two islands—Guadeloupe and Martinique. The soil physicochemical properties were estimated by the Laboratory of Soil Analysis (INRA, Arras, France) using ISO procedures (Table 1). Concentrations of chlordane residues determined by La Drôme Laboratoire (LDA26, Valence, France) working under the French accreditation committee "COFRAC" and norm NF17025 are also shown. These measurements were done by GC-MS. Calibration was performed using the standard addition method, with $^{12}\text{C}_{10}$ -chlordane and two internal standards, hexabromobenzene and triphenylphosphate. The results are given with a 30 % confidence interval. The extraction procedure was developed on the Andosol that had the worst profile for chlordane extraction, with Koc values averaging $20 \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1}$ (Cabidoche et al. 2009) and then applied to the other soil types.

GC-MS analysis

GC-MS was performed using a QP2010+ (Shimadzu GC-MS 2010) equipped with an RTX-5 column (10 $\text{m} \times 0.18 \text{ mm}$ i.d., 0.18 μm film) purchased from Restek, using helium as a carrier gas, with a temperature ramp from 80 to 280 $^{\circ}\text{C}$ at 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Anthracene-d10 was used as an internal standard. Soil extracts were injected into the column using a splitless/split injector in splitless mode. Detection of ^{12}C -chlordane, its two metabolites, and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordane was performed using electronic impact at 70 eV, which breaks up the compounds into several fragments that display different mass spectra. The full mass spectra of ^{12}C -chlordane, its two metabolites, and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordane were acquired by full-scan single-quadrupole mass spectra in the 29 to 550

Table 1 Soil physicochemical properties

Soil type	Andosol	Nitisol	Ferralsol	Gleyic Fluvisol	Gleyic Fluvisol
Horizon	0–20 cm	0–20 cm	0–20 cm	0–20 cm	30–50 cm
Latitude	61°37'15"W	61°34'20.3"W	61°34'16.5"W	61°33'51"W	61°33'51"W
Longitude	16°03'57"N	16°05'29.5"N	16°06'08.4"N	16°07'54"N	16°07'54"N
Clay (<2 μm, g/kg)	128	666	na	288	208
Fine silt (2/20 μm, g/kg)	99	216	na	353	383
Coarse silt (20/50 μm, g/kg)	60	43	na	171	209
Fine sand (50/100 μm, g/kg)	37	28	na	164	181
Coarse sand (200/2,000 μm, g/kg)	676	47	na	24	19
Organic C (g/kg)	79.8	23.3	na	17.7	12
Total N (g/kg)	6.11	2.02	na	1.51	0.99
C/N	13.0	11.6	na	11.7	12.0
Organic matter (g/kg)	138	40.3	na	30.5	20.8
pH water (a.u.)	5.21	5.48	na	7.41	7.97
pH KCl (a.u.)	4.53	4.66	na	6.18	6.56
CaCO ₃ (g/kg)	<1	<1	na	<1	<1
P ₂ O ₅ (g/kg)	0.042	0.014	na	0.104	0.015
CEC Metson (cmol+/kg)	29.6	15.2	na	20.7	19.0
Chlordecone (mg/kg) ^a	33.6	1.61	1.79	0.06	0.06

na not available

^aChlordecone analysis done by LDA26 (France)

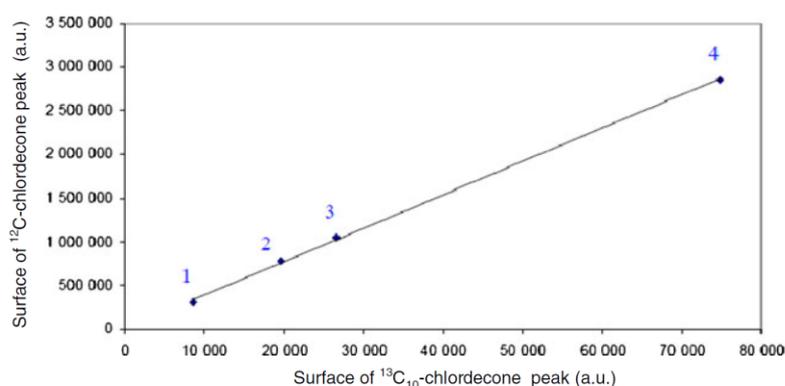
m/z range. Mass spectra and *m/z* fragments characteristic of these compounds are given in Fig. S1. Each prepared extract was then injected and detected in SIM mode in order to improve MS analysis sensitivity and accuracy. Target-specific fragments for each compound are listed hereafter: (a) ¹²C-chlordecone *m/z* 490 (molecular ion), 455 (C₁₀Cl₉O⁺), 272 (C₅Cl₆⁺), 237 (C₅Cl₅⁺), and 218 (C₅Cl₄O⁺); (b) ¹³C₁₀-chlordecone *m/z* 502 (molecular ion), 465 (C₁₀Cl₉O⁺), 277 (C₅Cl₆⁺), 242 (C₅Cl₅⁺), and 223 (C₅Cl₄O⁺); (c) β-monohydrochlordecone *m/z* 456 (molecular ion), 421 (C₁₀HCl₈O⁺), 272 (C₅Cl₆⁺), 237 (C₅Cl₅⁺), 203 (C₅HCl₄⁺); and (d) dihydrochlordecone *m/z* 418 (molecular ion), 238 (C₅HCl₅⁺) and 203 (C₅HCl₄⁺). The amounts of ¹²C-chlordecone and of ¹³C-chlordecone in the samples were estimated by quantifying *m/z* 272 and 277 ions, respectively. ¹²C-chlordecone (*m/z* 272) was directly quantified relative to ¹³C₁₀-chlordecone (*m/z* 277) spiked into the soil samples prior to chemical extraction. The yield of ¹³C₁₀-chlordecone extraction from the soil was calculated by measuring how much was recovered from soil extracts as compared to the injection of a standard solution containing ¹³C₁₀-chlordecone in GC-MS. In addition, the amounts of β-monohydrochlordecone and dihydrochlordecone were quantified by quantifying *m/z* 272 and 238 ions, respectively. We observed that although chlordecone and β-monohydrochlordecone were both quantified using the *m/z* 272 ion, the metabolite had a shorter migration time than the mother compound, and this allowed for their discrimination. Similarly, the amount of chlordecone

metabolites was calculated by taking into account the response factor between *m/z* 272 and 238 ions and the *m/z* 277 ion of ¹³C₁₀-chlordecone. Those response factors were determined—thanks to a separate injection that contained the two metabolites and ¹³C₁₀-chlordecone. By doing so, we assumed that the extraction yield of the two metabolites was equivalent to that of chlordecone.

Results and discussion

In a first approach, the extraction procedure was optimized on the Andosol which represented the worst case scenario: it was rich in clay and presented a very high adsorption capacity. Three parameters were optimized: (a) soil sample homogenization (aqueous suspension, soil matrix dispersion), (b) type of solvent used for the extractions (dichloromethane versus pentane/acetone), and (c) pH of the extractant (pH 3, 7, or 11). The influence of the homogenization of soil samples on chlordecone quantification was addressed. To do so, 10 g (dry weight equivalent) of air-dried and sieved Andosol was spiked with 10 μl of ¹³C₁₀-chlordecone dissolved in nonane at 100 μg ml⁻¹. After evaporation of the solvent by incubating the soil samples at room temperature for 2 h, the samples were then homogenized in 10 ml of 100 mM phosphate buffer, pH 7. The soil mixtures were then placed in an ultrasonic bath for 10 min at room temperature. Half of the samples were mixed with 1:8

Fig. 1 Linear regression between ^{12}C - and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone in the Andosol. Evolution of the amount of ^{12}C -chlordecone quantified in the soil extract as a function of the ^{13}C -chlordecone spiked into the Andosol prior to extraction



anhydrous sodium sulfate (*w/w*). Homogenized samples were then extracted with 80 ml of distilled dichloromethane. The extracts were shaken with a magnetic stirrer and placed in an ultrasonic bath for 10 min at room temperature. After decanting, the organic phase was recovered and purified by solid phase extraction using Florisil adsorbent. The extract was dried, concentrated, and redissolved in 200 μl of dichloromethane containing anthracene-d10 used as an internal standard. The purified extracts were then injected and analyzed in GC-MS. Quantification of the surface of the *m/z* 272 fragment revealed that soil homogenization in phosphate buffer with anhydrous sodium sulfate added increased the yield of chlordecone extraction 9.5-fold as compared to soil homogenization in phosphate buffer (Fig. S2). Therefore, this homogenization method was kept for the rest of the study. The influence of the solvent used for the extraction of homogenized soil was also studied, by extracting homogenized soil using either dichloromethane or a mixture made of pentane/acetone (1/1; *v/v*). Extraction, purification, and injection conditions were similar to those described above. Quantification of the surface of the *m/z* 272 peak revealed that extraction with dichloromethane yielded 2.5-fold more chlordecone as compared to extraction with the pentane/acetone mixture (Fig. S3). Dichloromethane was therefore chosen as the solvent for extracting chlordecone from the soil. Finally, the influence of the pH of the extractant on chlordecone extraction

was studied by conducting homogenization in 100 mM phosphate buffer at pH 3, pH 7, or pH 11. Anhydrous sodium sulfate was added, extraction was done with dichloromethane, and purification and injection conditions were similar to those described above. Quantification of the surface of the *m/z* 272 peak revealed that soil homogenization with phosphate buffer at pH 7 yielded 1.3-fold more chlordecone as compared to homogenization with phosphate buffer at pH 3, while hardly any difference was recorded between the soil samples homogenized with phosphate buffer at pH 7 or pH 11 (Fig. S4). The extractant at pH 7 was therefore chosen to conduct chlordecone extraction from the soil.

In order to validate the use of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone as a tracer to estimate chlordecone extractability from the soil, $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone was spiked into the soil and extracted using the different procedures tested above. The surfaces of the *m/z* 272 and *m/z* 277 peaks specific for ^{12}C -chlordecone and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone, respectively, were recorded (Fig. S4). It is noteworthy that whatever the procedure used to extract chlordecone from the soil, a linear relationship was found between the amounts of $^{13}\text{C}_{10}$ - and $^{12}\text{C}_{10}$ -chlordecone (Fig. 1). This observation suggests that $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone was extracted from the Andosol in a similar manner to unlabelled chlordecone from the Andosol. It also suggests that the protocol used for addition of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone to soil yields a distribution within the soil which

Fig. 2 Linear regression between the amount of chlordecone spiked into the Andosol and the quantification of the corresponding ion *m/z* by GC-ECD-MS. Evolution of the peak surface of *m/z* 272 or 277 ions quantified by GC-ECD-MS in the soil extract as a function of the $^{13}\text{C}_{10}$ - or ^{12}C -chlordecone spiked into the Andosol, respectively

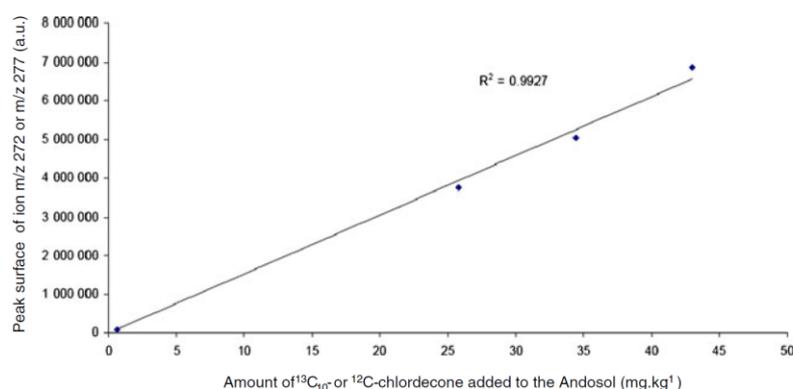


Table 2 Estimation of chlordecone and metabolites β -monohydrochlordecone and dihydrochlordecone in different soil types

Soil type	Andosol	Nitisol	Ferralsol	Gleyic Fluvisol (0–20 cm)	Gleyic Fluvisol (30–50 cm)
Chlordecone (mg kg ⁻¹)	35.4a	1.33b	1.44b	0.10c	0.18c
Coefficient of variation (%)	16.8	2.38	5.40	4.27	4.67
Yield of extraction (%)	21.6	26.9	18.7	16.3	21.5
Coefficient of variation (%)	10.7	15.1	2.68	26.4	11.1
β -monohydrochlordecone (mg kg ⁻¹)	0.649	0.00945	0.0234	nd	nd
Dihydrochlordecone (mg kg ⁻¹)	nd	nd	nd	nd	nd
Detection limit (μ g kg ⁻¹)	8.84	5.89	5.50	7.70	4.77

Significant differences in chlordecone concentrations between soils are indicated by different letters

nd not detected

is similar to the unlabelled chlordecone already present, a necessary condition for the use of isotope dilution analysis. We therefore conclude that ¹³C₁₀-chlordecone is not only an internal standard, but also constitutes a good tracer that could be used to estimate the yield of chlordecone extraction from the soil.

The linearity of our method was evaluated on the Andosol by spiking different amounts of chlordecone. In order to cover a wide concentration range corresponding to the minimal and maximal concentrations previously reported in French West Indies agricultural soils, the soil was spiked with ¹³C₁₀-chlordecone corresponding to 0.69 mg kg⁻¹ and with different amounts of ¹²C-chlordecone (25, 35, and 45 mg kg⁻¹). Analysis of the extracts obtained from spiked Andosol showed that the method had a good linearity, with a calibration curve representing the surface of the *m/z* 272 and *m/z* 277 peaks as a function of ¹³C₁₀-chlordecone, with a correlation coefficient (*r*²) of 0.99 (Fig. 2). To conclude, our method was found to be linear from 0.118 to 43 mg kg⁻¹. Linearity of the method was not checked beyond this range defined with respect to concentrations previously found in contaminated soils.

In order to test the efficiency and the reliability of the method developed here, its performances were tested on four soil types, i.e., Andosol, Nitisol, Ferralsol, and Fluvisol soils, collected in the French West Indies by Dr. YM Cabidoche (INRA, French West Indies). The soil physicochemical properties are shown in Table 1. All these soils are rich in clay and are characterized by different secondary “clay” materials such as allophane for Andosol, halloysite for Nitisol, and halloysite with Fe and Al oxihydroxides for Ferralsol and Fluvisol (Cabidoche et al. 2009) which account for their high sorption ability. Concentrations of chlordecone residues determined by LDA26 at Valence (France), which works under the French accreditation committee COFRAC and standard NF17025, are also shown. For each soil type tested, five replicates were done. These analyses led to the estimation of chlordecone and two of its metabolites (β -monohydrochlordecone and dihydrochlordecone) in these different soil types (Table 2). In addition, detection limit, yield of extraction, and

repeatability were also measured. The detection limit, determined from the signal-to-noise ratio observed for the relevant ion in the GC-MS data, ranged between 4.77 and 8.84 μ g kg⁻¹ of chlordecone. The yield of chlordecone extraction, estimated using ¹³C₁₀-chlordecone, varied from 16 to 26 %, with coefficients of variation between 2.7 and 26 %. This parameter did not seem to be related to soil type. The rather low extractability of chlordecone from these four soil types most likely resulted from the high sorption ability of the four soil types which were rich in clay materials. Nonetheless, chlordecone residues were successfully quantified from the soil extracts. As expected, the highest chlordecone concentration was observed in the Andosol (35.4±5.95 mg kg⁻¹). Nitisol and Ferralsol samples were contaminated with chlordecone to a lesser extent, with 1.33±0.05 and 1.44±0.07 mg kg⁻¹, respectively. The lowest chlordecone concentrations averaged 0.10 mg kg⁻¹. They were quantified in the Gleyic Fluvisol. Traces of β -monohydrochlordecone were detected in the Andosol, Nitisol, and Ferralsol, and the highest concentration was observed in the Andosol (0.649 mg kg⁻¹). Dihydrochlordecone was not detected in any of the four soil types tested here. These results are in agreement with those previously obtained by the LDA 26, given with a 30 % confidence interval (shown in Table 1), except for the Fluvisol samples for which a higher chlordecone concentration was observed with our method (2- and 3-fold for the 0–20- and 30–50-cm horizons, respectively). We noted that the use of the ¹³C₁₀-chlordecone tracer allowed us to improve the confidence interval of chlordecone measurements in the soil samples but to a lesser extent for the Andosol, admittedly the worst case scenario. In addition, with our method, traces of β -monohydrochlordecone were quantified from the Andosol, Nitisol, and Ferralsol samples. It is noteworthy that this metabolite is a known contaminant of the Kepone[®] formulation that was applied to banana plantations in the French West Indies (Cabidoche et al. 2009). Therefore, its detection suggests that chlordecone may not be degraded in the tested soils although the process is thermodynamically possible: chlordecone has redox potentials in the 336–413-mV range

and its E_o' value is similar to that of other organochlorines (Dolfing et al. 2012).

Conclusions

In light of these results, one can conclude that the GC-MS method using $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone as a tracer of extraction is convenient for analyzing chlordecone and its known two metabolites in different soil types representative of the soils found in the French West Indies. This method was shown to have a useful instrumental detection limit and linear ranges for chlordecone. It should be useful for monitoring the fate of chlordecone in soils of the French West Indies in the framework of the National Plan for Chlordecone. It could be applied to conduct a survey of chlordecone soil contamination in order to verify the exposure scenario defined according to land usage considerations.

Acknowledgments The authors would like to thank Dr. Yves-Marie Cabidoche heartily: he was our mentor and, without him, this project would not have existed. This work was funded within the framework of a PTR contract delivered by Synerginov and of the research contract Biodechlorid funded by INRA in the context of the research program Demichlorid, part of the National Plan of Action for Chlordecone in the French West Indies. Chloe Merlin's PhD thesis is funded by ADEME and the Regional Council of Burgundy. Authors would like to thank Marie-Danièle Marignier (Synerginov) for her help to establish the PTR. We also would like to thank Annie Buchwalter for editing the manuscript.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1995) Toxicological profile for mirex and chlordecone. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- Brunet D, Woignier T, Lesueur-Jannoyer M, Achard R, Rangon L, Barthès BG (2009) Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Environ Poll* 157:3120–3125
- Cabidoche YM, Achard R, Cattani 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 Poll* 157:1697–1705
- 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 Tech* 46:8131–8139
- Faroon O, Kueberuwa S, Smith L, De Rosa C (1995) ATSDR evaluation of health effects of chemicals. 2. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate. *Toxicol Indus Health* 11:1–203
- Frenich AG, Vidal JLM, Frias MM, Olea-Serrano F, Olea N (2000) Quantitative determination of endocrine-disrupting polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in human serum using gas chromatography with electron-capture detection and tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35:967–975
- Le Déault JY, Procaccia C (2009) Les impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles: bilan et perspectives d'évolution. Report no. 1778 of French National Assembly, pp 223
- Moriwaki H, Hasegawa A (2004) Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:1243–1244
- PNAC (2008–2010) Plan d'action chlordecone en Martinique et en Guadeloupe: rapport interministériel d'activité (année 2009), pp 24
- Wang B, Fukuya L, Yu G, Huang J, Wei Y, Yamazaki N, Chen J, Chen X, Jiang W, Morita M (2010) HRGC/HRMS analysis of mirex in soil of Liyang and preliminary assessment of mirex pollution in China. *Chemosphere* 79:299–304

Conclusions

L'objectif de cette étude consistait à (i) développer une méthode de détection et de quantification du CLD et de ses deux principaux métabolites (β -monohydro- et dihydro-CLD) dans des extraits de sols basée sur le ratio isotopique $^{13}\text{C-CLD}/^{12}\text{C-CLD}$, et (ii) tenir compte pour la première fois du biais d'extraction du CLD du sol en passant par la détermination du taux d'extraction. Les spectres de masse du CLD, du β -monohydro-CLD et du dihydro-CLD ont été obtenus. Leur analyse a permis d'identifier les ions 277 et 272 m/z, caractéristiques de la $^{13}\text{C-CLD}$ et de $^{12}\text{C-CLD}$, respectivement. Le β -monohydro-CLD et le dihydro-CLD sont détectés et quantifiés grâce aux ions caractéristiques 272 et 238 m/z (nb : $^{12}\text{C-CLD}$ et β -monohydro-CLD sont quantifiés par l'ion 272 m/z mais ne présentent pas le même temps de rétention en GC). La méthodologie d'extraction a été mise au point (choix des extractants, des solvants) et montre qu'en utilisant un tampon phosphate à 100 mM à pH7 additionné de sulfate de sodium anhydre et le dichlorométhane, le $^{13}\text{C-CLD}$ et le $^{12}\text{C-CLD}$ sont extraits de la même manière à partir de sol, montrant que le $^{13}\text{C-CLD}$ constitue un traceur robuste pouvant être utilisé pour estimer le taux d'extraction. La méthode évaluée sur un des sols (andosol) a montrée qu'elle était linéaire pour des concentrations en CLD comprises entre 0,118 et 43 mg.kg⁻¹. Par ailleurs, la limite de détection de la méthode a été évaluée et est comprise entre 4,77 et 8,84 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en fonction du type de sol, la valeur la plus élevée étant observée dans l'andosol. De plus, nous avons montré que le rendement d'extraction, calculé sur la base du rapport entre la quantité de $^{13}\text{C-CLD}$ contenu dans l'extrait de sol et la quantité de $^{13}\text{C-CLD}$ directement injectée dans la GC-MS, était compris entre 16 à 26 % confirmant que le CLD est difficile à extraire des sols. Le rendement d'extraction ne semble pas être relié aux propriétés physicochimiques des quatre sols testés. Malgré ce faible rendement d'extraction, le CLD a pu être quantifié dans les sols. Ainsi, les 4 sols antillais, aux propriétés physicochimiques distinctes, présentent des niveaux de contamination compris entre 0,10 et 35,4 mg.kg⁻¹ (fluvisol, ferralsol, nitisol et andosol par ordre croissant de contamination). Ces teneurs sont en accord avec les données obtenues par le LDA 26. En revanche, le coefficient de variations des données quantitatives varient de 2,38 à 16,8 %, et rend alors la méthode plus précise que celles utilisées par l'ensemble de la communauté scientifique jusqu'à maintenant (coefficient de variation de 30% voire plus). Des traces de β -monohydro-CLD ont pu être également détectées à partir des extraits de l'andosol, du nitisol et du ferralsol, la plus grande quantité étant observée dans l'andosol (0,649 mg.kg⁻¹). Toutefois, il n'est pas certain que ce métabolite se soit formé dans les sols par un processus abiotique ou biotique car il est connu comme étant un contaminant du Képone[®]. Cette méthode pourrait être utilisée pour suivre les teneurs en CLD des sols des Antilles françaises afin de vérifier les scénarios d'exposition définis selon l'historique du mode d'occupation des sols. Elle a été intégrée dans l'essai d'inter-comparaison de l'analyse du CLD

PARTIE 2 : Partie expérimentale _ Chapitre 1 : Mise au point méthodologique _ ARTICLE 1

et de ses métabolites dans les sols' coordonné par L. Amalric (BRGM Orléans) à la demande du Ministère de l'Écologie et du Développement Durable (Amalric 2014).

Chapitre 2
Recherche de souches microbiennes
dégradant le CLD

Article 2 : Caractérisation de populations fongiques tolérantes au CLD isolées d'un sol volcanique des Antilles françaises historiquement contaminé.

Merlin et al. (2014) *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7):4914-4927

Introduction

Le CLD contamine environ 20 000 hectares de terres agricoles aux Antilles. Le CLD étant très récalcitrant à la biodégradation (Cabidoche *et al.* 2009), le principal processus de dissipation du CLD est le lessivage qui conduit non seulement à la contamination des masses d'eau mais également à la dispersion de la contamination. Par l'application d'un simple modèle de lessivage de premier ordre prenant en compte la matière organique des sols et le K_{oc} du CLD, Cabidoche *et al.* (2009) calculèrent que la contamination des sols au CLD durerait encore plusieurs centaines d'années dans l'andosol. Par conséquent, dans ce contexte, il apparaît urgent d'étudier les mécanismes qui pourraient améliorer la dissipation du CLD et diminuer sa persistance. Parmi les approches envisageables, l'amélioration des capacités épuratrices du sol supportées par la communauté microbienne apparaît comme une possibilité d'autant que Dolfig *et al.* (2012) ont montré que, du point de vue thermodynamique, la biodégradation du CLD était possible. Toutefois, à ce jour il n'existe que très peu d'études traitant de la biodégradation du CLD. En condition anaérobie, *Methanosarcina thermophila*, une bactérie méthanogène, transformait par une réaction de déchlorination réductrice jusqu'à 86% de ^{14}C -CLD conduisant à l'accumulation de ^{14}C -métabolites polaires et non polaires (Jablonski *et al.* 1996). En condition aérobie, *Pseudomonas* sp. KO3 transformait le Képone® en monohydroképone (Orndorff et Colwell 1980). Plus tard, trois isolats également affiliés au genre *Pseudomonas* furent rapportés pour dégrader le CLD (George et Claxton 1988). Ces deux études ont été critiquées par Cabidoche *et al.* (2009) en raison de l'absence de la caractérisation de la contamination initiale du CLD avec le mono- et le di- hydroCLD. Il est à noter que les souches microbiennes décrites dans ces articles scientifiques ne sont plus disponibles et qu'aucune d'entre elles n'a été isolée d'un sol des Antilles contaminé avec le CLD. Toutefois, récemment Fernandez-Bayo *et al.* (2013a) ont montré que la microflore d'un andosol contaminé avec 30 mg de CLD par kg de sol était capable de minéraliser faiblement le ^{14}C -CLD, suggérant que l'exposition de la communauté microbienne au CLD a conduit à l'émergence de populations microbiennes capables de le minéraliser, comme il a déjà été rapporté pour d'autres pesticides.

Dans ce contexte, j'ai mis en place des cultures d'enrichissement à partir d'un sol contaminé prélevé à la Guadeloupe. Il s'agissait d'un andosol fortement contaminé par le CLD (environ 35 mg.kg⁻¹). Après avoir perfusé ce sol avec une solution de CLD, des suspensions de sol ont été préparées pour isoler des souches bactériennes et fongiques sur des milieux gélosés spécifiques additionnés de CLD. Les données issues de l'étude des isolats bactériens n'étant pas concluantes, mon intérêt s'est focalisé sur la caractérisation de souches fongiques tolérantes au CLD et plus particulièrement sur *Fusarium oxysporum* MIAE01197. En effet, cette souche est non seulement tolérante au CLD mais aussi capable de le dissiper.

Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies

Chloé Merlin · Marion Devers · Olivier Crouzet ·
Cécile Heraud · Christian Steinberg · Christian Mougin ·
Fabrice Martin-Laurent

Received: 28 February 2013 / Accepted: 1 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The insecticide chlordecone is a contaminant found in most of the banana plantations in the French West Indies. This study aims to search for fungal populations able to grow on it. An Andosol heavily contaminated with chlordecone, perfused for 1 year in a soil–charcoal system, was used to conduct enrichment cultures. A total of 103 fungal strains able to grow on chlordecone-mineral salt medium were isolated, purified, and deposited in the MIAE collection (Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental, UMR Agroécologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France). Internal transcribed spacer sequencing revealed that all isolated strains belonged to the Ascomycota phylum and gathered in 11 genera: *Metacordyceps*, *Cordyceps*, *Pochonia*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Ophiocordyceps*, *Purpureocillium*, *Bionectria*, *Penicillium*, and *Aspergillus*. Among predominant species, only one isolate, *Fusarium oxysporum* MIAE01197, was able to grow in a liquid culture medium that contained chlordecone as sole carbon source. Chlordecone increased *F. oxysporum* MIAE01197 growth rate, attesting for its tolerance to this organochlorine. Moreover, *F. oxysporum* MIAE01197 exhibited a higher EC₅₀ value than the reference strain *F. oxysporum*

MIAE00047. This further suggests its adaptation to chlordecone tolerance up to 29.2 mg l⁻¹. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis revealed that 40 % of chlordecone was dissipated in *F. oxysporum* MIAE01197 suspension culture. No chlordecone metabolite was detected by GC-MS. However, weak amount of ¹⁴CO₂ evolved from ¹⁴C₁₀-chlordecone and ¹⁴C₁₀-metabolites were observed. Sorption of ¹⁴C₁₀-chlordecone onto fungal biomass followed a linear relationship ($r^2=0.99$) suggesting that it may also account for chlordecone dissipation in *F. oxysporum* MIAE01197 culture.

Keywords Chlordecone · Andosol · Ecotoxicology · Biosorption · Biodegradation

Introduction

The cyclodiene insecticide chlordecone (CLD) (1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one) was used in the French West Indies (FWI) to control banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, until recently. It was applied in FWI banana plantations for 18 years over two distinct periods. During the first one, from 1972 to 1978, the trademark product Kepone was applied and during the second one, from 1982 to 1993, the trademark product Curlone was applied. Over that 18-year period, approximately 300 tons of chlordecone was applied to banana plantations in the French West Indies. Pollution monitoring in the context of the National Action Plan for chlordecone revealed the presence of chlordecone in soils, rivers, springs, and drinking water as well as in food crop products such as root vegetables (Le Déault and Procaccia 2009). Cabidoche et al. (2009) showed that in soils used for banana production (i.e., representing 20,000 ha in the FWI) chlordecone concentrations ranged between 0.2 and 37.4 mg kg⁻¹. In addition, due to its environmental persistence, sorption, and biomagnification potential, this organochlorine

Responsible editor: Robert Duran

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-013-1971-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Merlin · M. Devers · F. Martin-Laurent (✉)
INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pole Ecoldur, 17 rue Sully, BP
86510, 21065 Dijon Cedex, France
e-mail: fabrice.martin@dijon.inra.fr

O. Crouzet · C. Mougin
INRA, UR Pessac, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles
Cedex, France

C. Heraud · C. Steinberg
INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pole IPM, 17 rue Sully, BP
86510, 21065 Dijon Cedex, France

Published online: 20 July 2013

 Springer

insecticide was classified as a persistent organic pollutant in May 2009 and added to Annex A of the Stockholm Convention. Recently, Multigner et al. (2010) showed a higher prevalence of prostate cancers in FWI populations exposed to chlordecone. In addition, a recent study reports that cognitive, visual, and motor development of young children exposed to chlordecone is impacted (Dallaire et al. 2012). As expected because of its high potential for biomagnification, chlordecone also contaminated aquatic biota, including fish and giant shrimp called *ouassou* (Coat et al. 2006; Coat et al. 2011), and crops, notably locally produced vegetables (Cabidoche and Lesueur-Jannoyer 2012; Clostre and Lesueur-Jannoyer 2012). Consequently, French authorities regulated fishing and marketing of marine wildlife and forbade the consumption of fish and shrimps produced from rivers. They also forbade the consumption of certain species of game birds potentially contaminated with chlordecone in Guadeloupe and defined recommendations for soil usage to avoid vegetable contamination.

Taking into account the recalcitrance of chlordecone to biodegradation, Cabidoche et al. (2009) suggested that leaching is the major process responsible for chlordecone dissipation from contaminated soils. By applying a simple leaching model based on first-order desorption kinetics, taking into account soil organic carbon content (SOC) and the SOC/water partitioning coefficient (K_{oc}) as input parameters, Cabidoche et al. (2009) suggest that chlordecone contamination will last for several decades in Nitisol, centuries in Ferralsol, and half a millennium in Andosol soils of the French West Indies. Faced with this critical situation, we urgently need to search for possible solutions to treat this widespread pollution. Keeping in mind the large contamination area that rules out any ex situ treatments, any practical strategy for decontaminating chlordecone-polluted soils in the French West Indies will have to employ in situ methods. Among possible cleaning-up strategies, bioremediation strategies based on the use of the purifying capabilities of the soil microflora could be considered. Indeed, recently, Dolfing et al. (2012) studied the Gibbs free energy data of chlordecone and concluded that there are no thermodynamic reasons why chlordecone-respiring or chlordecone-fermenting organisms should not exist. However, despite this thermodynamic consideration, there are only a few numbers of studies about chlordecone biodegradation. Under anaerobic conditions *Methanosarcina thermophila*, a methanogenic bacterium that produces methane, transformed up to 86 % of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone within 10 days, leading to the accumulation of polar and nonpolar ^{14}C -labeled metabolites (Jablonski et al. 1996). Although the mechanisms and metabolites of chlordecone transformation have not been further identified, *M. thermophila* was suggested to perform a reductive dechlorination of chlordecone. *Pseudomonas* sp. KO3, a bacterial strain purified from a mixed culture enriched under aerobic conditions from sewage sludge-collected lagoon water, was

shown to convert Kepone to monohydro-kepone and to a lesser extent to dihydro-kepone. These findings were criticized by Cabidoche et al. (2009), who considered that the authors did not describe the initial contents in mono-hydro- and di-hydro-chlordecone known to contaminate Kepone due to incomplete chlorination during the production process. This lack of information weakens the findings of that study since both metabolites observed here may derive from an incomplete chlorination of the molecule during the manufacturing process, not from a biodegradation process. A former study of George et al. (1986) reported chlordecone degradation by three *Pseudomonas* spp. strains, with apparent degradation ranging between 15 and 25 % with an error of 10 % on chlordecone HPLC concentration measurements after 2 weeks of incubation. But details were missing in this study casting doubt on the conclusion that chlordecone is degradable under aerobic conditions. More recently, *Pseudonocardia* sp. strain KSF27, a soil bacterium isolated from Japanese agricultural soils frequently treated with endosulfan, was tested using a soil-charcoal perfusion method with aldrin *trans*-diol as a structural analog of dieldrin. *Pseudonocardia* sp. strain KSF27 degraded not only dieldrin, but also other persistent organochlorine pesticides, such as endosulfan sulfate, heptachlor, and chlordecone (Sakakibara et al. 2011). Interestingly, although organochlorine pesticides are mainly degraded by bacterial populations in soil habitats (Porto et al. 2011), several studies evidence their biodegradation by fungal populations. Indeed, Ortega et al. (2011) showed that *Penicillium miczynskii*, *Aspergillus sydowii*, and *Trichoderma* sp. could grow on the insecticide dichlorodiphenyldichloroethane (DDD). *Trichoderma* sp. was found able to degrade DDD, and its biodegradation ability was increased with the addition of H_2O_2 . *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, and *Cladosporium oxysporum* can biodegrade endosulfan (Bhalerao and Puranik 2007; Mukherjee and Mittal 2005). Fungal enzymatic activities can also degrade several organophosphates. Indeed, *Fusarium oxysporum* cutinase can be involved in the degradation of malathion (Kim et al. 2005) and *A. sydowii*, *A. flavus*, and *F. oxysporum* phosphatases can hydrolyze several pesticides (Hasan 1999). Li et al. (2006) evidenced that *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Peacilomyces lilacinus*) could degrade phoxim, an organophosphate insecticide. Although fungal isolates are known to harbor an impressive enzymatic toolbox responsible for pesticide degradation, their involvement in chlordecone degradation is not yet described to our knowledge.

In this context, the purpose of our study was to search for the presence of fungal isolates able to grow on mineral salt medium added with chlordecone as the sole carbon source in heavily contaminated French West Indies soils. To do so, Andosol soil samples contaminated with up to 35 mg kg⁻¹ of chlordecone were continuously perfused with a chlordecone solution for 14 months using a soil-charcoal perfusion

system (Takagi and Yoshioka 2000). Enrichment cultures were then initiated using a mineral salt medium added with chlordecone as the sole carbon source. During the time course of the enrichment, aliquots of the enrichment culture were plated onto potato–dextrose–chlordecone solid medium to isolate chlordecone-tolerant fungal species. Fungal isolates were then classified into operational taxonomic units (OTUs) according to their morphological characteristics and further identified using a DNA-based approach. The isolates were then screened for their tolerance to chlordecone and their ability to grow on it. The degrading ability of the fungal isolate able to grow on chlordecone as the sole carbon source was then studied using a radiorespirometry approach and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis.

Materials and methods

Chemicals

[¹²C U]-Chlordecone Pestanal® (1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta [cd]pentalen-2-one) was purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany) (chemical purity 99.7 %). [¹⁴C U]-Chlordecone was purchased from Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) at a specific activity of 1,443 MBq mmol⁻¹ (radiochemical purity 99.9 %). The solubility of chlordecone is 2.7 mg l⁻¹ at 25 °C (Kilzer et al. 1979).

Media

The mineral salt (MS) medium used in the present study contained 1.6 g of K₂HPO₄, 0.4 g of KH₂PO₄, 0.2 g of MgSO₄·7H₂O, 0.1 g of NaCl, 0.02 g of CaCl₂, and 1 ml of trace element solution per liter. The trace element solution contained ZnSO₄·7H₂O (0.2 mg), MnSO₄·H₂O (1.8 mg), H₃BO₃ (2 mg), CuSO₄ (0.1 mg), and Na₂MoO₄ (0.25 mg) in 1 l. To prepare the agar plates, 15 g of agar (Biokar Diagnostics) per liter was added to the medium. The medium was autoclaved and then supplemented with chlordecone (C₁₀Cl₁₀O) as a carbon source using a Bransonic® ultrasonic water bath 221, 10 ml of filter-sterilized (NH₄)₂SO₄ solution (100 g l⁻¹) as the sole nitrogen source, 1 ml of filter-sterilized FeSO₄·6H₂O solution (5 g l⁻¹), and 1 ml of filter-sterilized vitamin solution per liter. The vitamin solution contained 40 mg of biotin and 100 mg of thiamin–HCl per liter. For tolerance tests, the MS medium was supplemented with 20 ml of filter-sterilized glucose solution (250 g l⁻¹) after autoclaving, as the main carbon source.

The phosphate buffer contained K₂HPO₄ (1 g), KH₂PO₄ (1 g), MgSO₄·7H₂O (40 mg), in 1 l adjusted to pH 6.6. The medium was autoclaved and then supplemented with 1 ml of filter-sterilized FeSO₄·6H₂O solution (5 g l⁻¹).

The potato dextrose agar (PDA) medium used in the present study contained 39 g of PDA (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) and 5 g of agar per liter. The medium was autoclaved and then supplemented with 30 mg of chlordecone per liter using an ultrasonic water bath. Throughout the cultivation period, all the agar plates were maintained in plastic bags in order to prevent desiccation.

F. oxysporum strains and storage conditions

The strains used in this study were *F. oxysporum* MIAE 00047 (Collection de Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental, UMR AgroEcologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France) as the reference strain (Alabouvette 1986) and fungal isolates MIAE01197 to 01208 and MIAE01219 to 01309 isolated from a French West Indies Andosol contaminated with chlordecone (this study). To preserve *F. oxysporum* strains, conidia were collected from the sporulation culture 7 days after inoculation by scraping and using 1 ml of chlordecone–potato–dextrose–broth medium. This suspension was mixed with an equal volume of 50 % (v/v) sterilized glycerol, distributed in 1 ml aliquots, and stored at –80 °C.

Soil sampling

The soil was sampled in June 2010 from a banana plantation located in Guadeloupe (French West Indies, 61°37'15"W; 16°03'57"N) by the team of Yves-Marie Cabidoche (INRA, Guadeloupe, France). This plantation was regularly treated with chlordecone at 6 kg ha⁻¹ year⁻¹ from 1982 to 1993. Soil samples were collected in accordance with ISO 10381-6 recommendations (Soil quality–Sampling–Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory). A composite sample of the surface horizon (0–15 cm) made of at least five random samplings (approximately 5 kg) was constituted. The soil sample was then shipped to INRA Dijon at 4 °C. It was then sieved to 2 mm and stored at 4 °C until use.

Soil physicochemical properties

The soil physicochemical properties were determined by the Laboratory of Soil Analysis (INRA, Arras, France) following standardized procedures. Granulometry analyses showed that it was composed of 128 g kg⁻¹ of clay (<2 μm), 99 g kg⁻¹ of fine silt (2–20 μm), 60 g kg⁻¹ of coarse silt (20–50 μm), 37 g kg⁻¹ of fine sand (50–200 μm), and 676 g kg⁻¹ of coarse sand (0.2–2 mm). Physicochemical analyses yielded 79.8 g kg⁻¹ of organic carbon, 6.11 g kg⁻¹ of total nitrogen, a C/N ratio of 13, 138 g kg⁻¹ of organic matter, a pH value of 5.21 measured in water, and a pH value

of 4.53 measured in KCl. It was classified as an Andosol (FAO-WRB, 1998) and was rich in allophane, an amorphous clay resulting from the transformation of andesitic rock (volcanic origin). The structural properties and the spatial arrangement of allophane aggregates constitute a trap for the chlordecone molecule, which is thus mechanically retained (Fernandes et al. 2010). This soil was shown to be contaminated with 35.4 mg kg⁻¹ of chlordecone and with 0.65 mg kg⁻¹ of β -monohydrochlordecone (Martin-Laurent et al. 2013).

Enrichment culture

The enrichment culture was performed using a soil–charcoal perfusion method as initially described by Takagi et al. (2000) and modified later by Takagi et al. (2009). Briefly, 50 g of soil (dry weight equivalent) was mixed with 2.5 g of autoclaved activated charcoal A100 (2 g, grain size 5–10 mm, BET specific surface area of 100 m² g⁻¹, pH 7.8; Toyo Denka Kogyo, Kochi, Japan). The soil–charcoal mixture was placed in the perfusion system and continuously perfused with 50 ml of mineral salt solution containing 2 mg l⁻¹ of chlordecone. The soil–charcoal mixture was perfused for 14 months in the dark at 28 °C. Over this period, the chlordecone mineral salt solution was replaced once a month.

Soil and charcoal were separated manually. They were then suspended in mineral salt buffer (1/100, w/v) using a Waring Blendor®. Microbial cultures were then initiated starting from these suspensions by inoculating fresh chlordecone mineral salt medium (1/100, v/v). Enrichment cultures were conducted over a 4-month period at 28 °C with shaking at 150 rpm. The cultures were renewed once a month by inoculating fresh chlordecone mineral salt medium (1/100, v/v). For each culture, an aliquot was stored at –20 °C in a glass flask for further chemical analysis.

Fungi were selected on chlordecone–MS agar plates.

Isolation of fungal strains

During the time course of the enrichment cultures, microbes were plated onto MS medium added with chlordecone and incubated at 28 °C. Fungal colonies were retrieved and sub-cultivated on chlordecone–potato dextrose agar (chlordecone–PDA) medium. Fungal isolates were purified by repeated cultures on chlordecone–PDA medium. Pure fungal isolates were deposited in the “Collection de Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental” under the accession numbers MIAE01197 to 01208 and MIAE01219 to 01309 (UMR AgroEcologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France). They were classified according to their morphotypes by considering several parameters such as mycelium characteristics, spore color, and shape. On this basis, the fungal isolates with similar morphotypes were

grouped into OTUs. A rarefaction curve was obtained by applying the freeware program aRarefactWin.exe (<http://www.uga.edu/~strata/AnRareReadme.html>). The diversity of the fungal community isolated from the Andosol was assessed using (a) the Shannon–Wiener index calculated as $H' = -\sum p_i \ln p_i$, where $p_i = n_i/N$ and n_i is the number of isolates in each morphotype and N the total number of isolates, and (b) the Simpson Diversity index D calculated as $D = \sum (p_i^2)^{-1}$.

DNA extraction

DNA was extracted from 500 μ l of fungal suspension using the DNeasy Plant Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, France). DNA was extracted using a rapid minipreparation procedure (Edel et al. 2001) when fungal isolates were recalcitrant to DNA extraction. DNA was purified using the Geneclean® Turbo Kit according to the manufacturer's instructions (MPBio). DNA quality was checked by electrophoresis and stored at –20 °C until use.

ITS amplification and sequencing

The internal transcribed spacer (ITS) located between the 18S rRNA and 28S rRNA of the fungal ribosomal gene was amplified by PCR using pure fungal DNA extracts in a final volume of 25 μ l containing 1.5 U of Taq DNA polymerase (Q-biogene, France), 2.5 μ l of Taq Polymerase buffer 10 \times containing 1.5 mM MgCl₂ (Q-biogene, France), 1.6 μ M dNTPs, 1 μ l of 10 μ M ITS1F primer (5'-CTTGGT CATTAGAGGAAGTAA-3' (Gardes and Bruns 1993), and 1 μ l of 10 μ M ITS4 primer (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3' (White 1990). PCR amplification was performed with a MasterCycler (Eppendorf, Germany) under the following conditions: 94 °C for 3 min and then 35 cycles each composed of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, and an elongation step at 72 °C for 1 min. A final elongation at 72 °C for 30 min was performed. ITS amplicon quality was verified by electrophoresis. Each amplicon was then diluted down to 50 to 100 ng μ l⁻¹. ITS amplicons were sequenced by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) using Sanger technology. ITS sequences will be deposited in GenBank database from KC786979 to KC787040 accession numbers. They were aligned with reference sequences retrieved from GenBank using ClustalX software. A neighbor-joining tree was computed using NJPlot software package (<http://pbil.univlyon1.fr/software/njplot.html>).

Chlordecone dissipation ability

One-month-old *F. oxysporum* MIAE01197 cultures grown on chlordecone–MS medium (1.5 mg l⁻¹) were collected. Chlordecone–MS media without fungal inoculums were also analyzed as controls. Three replicates of each treatment

(assay and control) were prepared. *F. oxysporum* MIAE01197 dissipation ability was assessed by GC-MS by modifying the procedure described by Martin-Laurent et al. (2013). Briefly, each culture aliquot was concentrated, and $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone as an isotopic tracer and anthracene- d_{10} as an internal standard were added. This mixture was ultrasound treated for 30 min and then filtered. The filtrate was diluted with a solvent and analyzed by GC-MS with an Agilent 7890 A gas chromatograph equipped with a DMPS column coupled to an Agilent 5975 C mass spectrometer. Ionization was performed by electron impact (70 eV). Chlordecone identification was performed by comparing the results with mass spectra in the literature (WILEY257, NIST, Aromalyse databases). $^{12}\text{C}_{10}$ -chlordecone was quantified against an internal calibration with $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone.

Chlordecone mineralization

The capacity of fungal isolates to mineralize chlordecone was tested by radiorespirometry in liquid cultures. The fungal isolates were grown for 1 week at 25 °C with shaking at 150 rpm, in MS medium with glucose as the main carbon source, supplemented with chlordecone (1.5 mg l^{-1}). They were then collected by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min. The pellets were washed twice in ultra-pure H_2O and resuspended to 0.1 OD_{600} unit in MS medium containing 1 mg l^{-1} of [^{12}C U]-chlordecone and 33.3 Bq ml^{-1} of [^{14}C U]-chlordecone, with and without glucose. Fungal suspensions were incubated for 3 weeks at 20 °C in a sterile glass jar and shaken (150 rpm). Each jar contained a scintillation vial filled with 5 ml of 0.2 M NaOH to trap CO_2 . $^{14}\text{CO}_2$ production was monitored all along the incubation period by measuring radioactivity in the NaOH solution by liquid scintillation counting (Wallac 1409), using 10 ml of Ready Safe™ cocktail (Beckman Coulter Inc., USA). Three replicates were performed. Non-inoculated medium was used as control.

At the end of the incubation period, fungal cultures were centrifuged. The collected supernatants were then extracted with dichloromethane (2:1; v/v). The organic phase was then evaporated and resuspended in 500 μl of hexane/acetone (3:1; v/v) and spotted onto glass-backed silica gel thin-layer chromatography (TLC) plates (10×20 cm) (Merck). Extracted compounds, including radioactive ones, were separated by migration in hexane/acetone (3:1, v/v) according to Jablonski et al. (1996). Radioactive compounds were detected by autoradiography (Carestream® Kodak® BioMax® MR film 20.3×25.4 cm, Sigma-Aldrich, France).

Growth test on chlordecone

The ability of *F. oxysporum* strains MIAE01197 and MIAE00047 to grow on chlordecone was tested. The strains were grown on glucose-MS medium (7 days, 25 °C,

180 rpm) to prepare spore suspensions. They were then filtered to remove the mycelium. The filtrates were centrifuged ($8,000\times g$, 20 min), the pellets were resuspended in 1 ml of sterilized ultrapure water, and spores were counted using a Malassez counting chamber. The spore suspensions were diluted to obtain a final concentration of 5×10^5 spores ml^{-1} .

The turbidity analysis was performed using a Bioscreen C Microbiological Growth Analyser (Labsystems, Helsinki, Finland). One-hundred-well microplates specifically manufactured for that machine were inoculated with *F. oxysporum* MIAE01197 or MIAE00047 spore suspensions (50 μl) previously loaded with MS medium (200 μl) containing chlordecone (3 mg l^{-1}) as the main carbon source. Five replicates of each condition were prepared.

The OD_{600} was recorded every hour over a 7-day period. The experiments were conducted at 25 °C. Data were recorded using Easy Bioscreen Experiment software (EzExperiment) provided by the manufacturer and then exported to a Microsoft Excel Professional 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) sheet for further analysis.

Tolerance to chlordecone

The tolerance of the fungal isolates to chlordecone was tested by studying their growth in liquid culture. The *F. oxysporum* MIAE01197 and MIAE00047 strains grown on glucose-MS medium (7 days, 25 °C, 180 rpm) were used to prepare spore suspensions following the protocol described for growth test except that cultures were carried out on MS media (200 μl) with glucose (5 g l^{-1}) as main carbon source and with a gradient of chlordecone content (0, 0.1, 1, and 10 mg l^{-1}). Five replicates of each condition were done.

Toxicity of chlordecone for fungal strains

Chlordecone toxicity was assessed in liquid culture by monitoring mycelium biomass production by MIAE01197 and MIAE00047, starting from spore inoculum. Spore suspensions were prepared from mycelium mats grown in petri dishes with agar medium (10 mM KH_2PO_4 , 4 mM MgSO_4 , 50 mM NH_4Cl , 1 mM CaCl_2 , 7 mM KCl, 10 g l^{-1} glucose, 5 g l^{-1} yeast extract, 10 g l^{-1} agar) adapted from Abadulla et al. (2000). Briefly, spores were collected with sterile water and counted on a Malassez counting chamber. The spore inoculum was diluted to 3×10^4 spores ml^{-1} . Dose-effect experiments were carried out by inoculating 30 μl of spore suspension (1,000 spores) into 10 ml of liquid medium supplemented with gradual quantities of chlordecone ranging from 0 to 30 mg l^{-1} . Whatever the concentration, chlordecone was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) at 4 % final concentration (v/v). Three replicates were run for each chlordecone concentration tested,

plus two controls consisting of DMSO alone or sterile deionized water instead of DMSO. Incubation was statically run for 5 days in the dark at 25 °C. Then, cultures were filtered (30 µm pore size nylon filters) and the mycelium from each flask was collected, dried at 80 °C, and weighed to calculate biomass production as an endpoint. For each condition, EC₅₀ values (effective concentration of chlordecone that decreases biomass production by 50 % compared to the control) were calculated by performing a nonlinear regression on Hill's model using REGTOX software integrating the optimal EC₅₀ value (version EV7.0.5., E. Vindimian, <http://eric.vindimian.9online.fr>).

Chlordecone adsorption to fungal biomass

F. oxysporum strain MIAE01197 biomass was produced on MS–glucose and spore suspension prepared as described above. Different spore suspensions were prepared in phosphate buffer to reach 0.1, 0.5, and 1 OD₆₀₀. All the fungal suspensions were added with 200 Bq of [¹⁴C U]-chlordecone. For each fungal suspension, three repeats were done and non-inoculated phosphate buffer was used as control ($n_{\text{tot}}=12$). All the suspensions were incubated at 20 °C under 150 rpm agitation for 72 h. At different times (i.e., 0, 2, 24, and 72 h of incubation), 1 ml aliquots were taken from the different samples. Aliquots were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The supernatant was removed and kept to quantify the amount of radioactivity remaining in it. Fungal pellet was resuspended in sterile ultrapure water, transferred in a scintillation flask, and added with 10 ml of Ready Safe™ cocktail (Beckman Coulter Inc., USA). Radioactivity was measured by liquid scintillation counting on both supernatant and fungal pellet.

Statistical analyses

Growth curves of fungal isolates were fitted with the Gompertz model modified by Zwietering et al. (1990) using the SigmaPlot 4.0 software. The equation was $y=A \cdot \exp\{-\exp[1+\mu_m \cdot \exp(1)(\lambda-t)/A]\}$, where y is the OD₆₀₀ value (arbitrary unit), t is time (hour), μ_m is the maximum specific growth rate (hour⁻¹), A is the maximum OD₆₀₀ value reached (arbitrary unit), and λ is the lag time (hour). The parameters thus determined were validated by a Student's t test ($P<0.005$). Tolerance to chlordecone was estimated by comparing the $\mu_{\text{m,CLD}}/\mu_{\text{m,control}}$ ratios.

Results

Isolation and morphological characterization of fungal strains isolated from the Andosol

Aliquots of Andosol historically contaminated with 35.5 mg kg⁻¹ of chlordecone were perfused for a year

with a chlordecone solution (2 mg l⁻¹) in a soil–charcoal system to exert a selection pressure favorable for the development of chlordecone-tolerant microorganisms. Soil samples were then used to perform enrichment cultures. Four successive 1-month long enrichment cultures were performed. For each enrichment culture, the aliquots were plated on chlordecone–PDA solid medium to isolate fungal isolates from the Andosol. A total of 103 fungal isolates were purified. Using the morphological characteristics observed on chlordecone–PDA medium (mycelium shape: form, elevation, border, surface, and spore pigmentation), these isolates were grouped into 18 different morphotypes (Table 1). Rarefaction analysis, which plots the number of fungal strains isolated from the Andosol as a function of the number of morphotypes detected, showed that the curve did not reach the asymptote. This means that the whole diversity of cultivable fungal species was not fully recovered at that sampling effort (Fig. 1). Morphotypes 1, 2, and 3 were dominant and represented up to 76 % of the fungal isolates. The other 15 morphotypes were represented by a few (1 to 4) isolates. The Shannon–Wiener index (H) was equal to 1.94, suggesting a relatively moderate diversity of cultivable fungal isolates retrieved from the contaminated Andosol, as revealed by rarefaction analysis. The Simpson index (D) was equal to 0.22, indicating codominance of several morphotypes within the cultivable fungal community isolated from the chlordecone-contaminated Andosol.

Characterization of the diversity of fungal isolates

In order to estimate the diversity of the fungal isolates, at least one isolate per morphotype was chosen to sequence the 18S–28S ITS of the ribosomal operon. For the three dominant morphotypes, this analysis was performed on several isolates. Altogether 81 ITS sequences were obtained out of which 63 will be deposited in the GenBank database. Comparison of those sequences with known ones available in the database showed similarities ranging from 97 to 100 %. The phylogenetic analysis revealed that all the isolates belonged to the Ascomycota phylum. They were distributed among 11 genera including *Metacordyceps*, *Cordyceps*, *Pochonia*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Ophiocordyceps*, *Purpureocillium*, *Bionectria*, *Penicillium*, and *Aspergillus* (Fig. 2). The three dominant morphotypes were identified as *F. oxysporum* sp. (morphotype 1), *Paecilomyces* sp./*Ophiocordyceps heteropoda*/*P. lilacinum* (morphotype 2), and *Aspergillus* sp. (morphotype 3). Interestingly, the 33 ITS sequences of morphotype 1 were 99 to 100 % similar to *F. oxysporum* isolate 281 (accession no. JN232163.1). Conversely, the 13 ITS sequences of morphotype 2 were 100 % similar to *Paecilomyces* sp. Pa972 (accession no. JQ821350.1), *O. heteropoda* (accession no. AB084157.1), and *P. lilacinum* isolate DF12064 (accession no. JQ863231.1) sequences. The last one was similar to

Table 1 Description of the 103 fungal strains isolated from the Andosol heavily contaminated with chlordecone. The isolates were distributed into 18 morphotypes. Species identification based on ITS analysis is shown. The numbers of isolates for each morphotype observed and for each species are given

Species	Morphotypes																		Total effective per species
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
<i>Fusarium oxysporum</i>	33 ^a																		33
<i>Paecilomyces sp./Ophiocordyceps heteropoda/Purpureocillium lilacinum</i>	11+2 ^a			1 ^a		1	1 ^a												16
<i>Aspergillus flavus</i>				11 ^a							1 ^a								12
<i>Aspergillus nomius</i>			3 ^a							1 ^a								1 ^a	5
<i>Aspergillus terreus</i>			1 ^a										1 ^a	1 ^a			1 ^a		4
<i>Metacordyceps chlamydosporia/Cordyceps chlamydosporia/Pochonia chlamydosporia</i>		1 ^a		2		1			1 ^a										5
<i>Penicillium citrinum</i>					2 ^a														2
<i>Penicillium sp.</i>					1														1
<i>Bionectria sp.</i>											1 ^a								1
<i>Acremonium</i>															1 ^a				1
<i>Pochonia sp.</i>																	1 ^a		1
n.d.	2	9	7			1	1	2											22
Total effective per morphotype	35	23	22	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	103

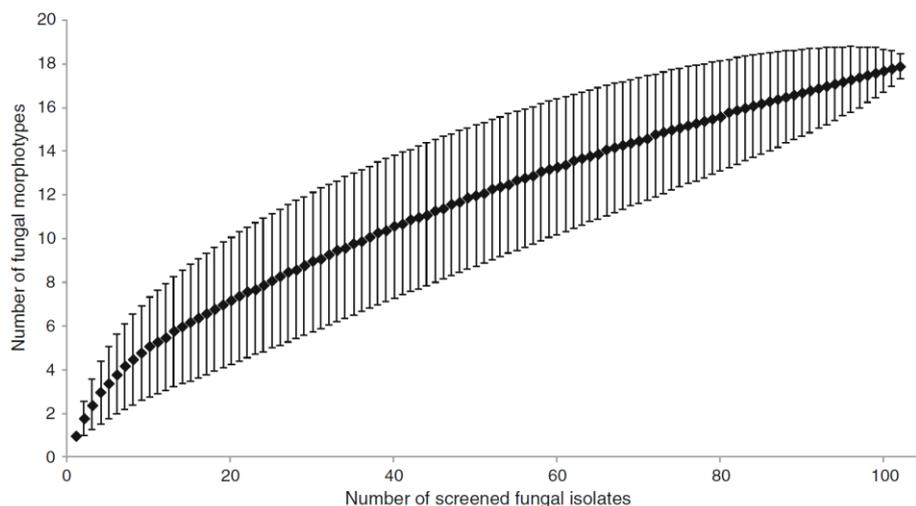
n.d. ITS of morphotype not sequenced

^aITS sequences of isolates deposited in GenBank

Metacordyceps chlamydosporia strain NBAII PC55 (accession no. JX918944.1), *Cordyceps chlamydosporia* isolate ID05-F0165 (accession no. AB378545.1) and *Pochonia chlamydosporia* (EU733637.1) sequences. Furthermore, the 15 ITS sequences of morphotype 3 were all similar to *Aspergillus* ITS sequences, namely *A. flavus* (100 % similarity with *A. flavus* accession no. JX157882.1), *A. nomius* (99 to 100 % similarity with *A. nomius* isolate A15A, accession no. JQ781730.1), and *A. terreus* (100 % similarity with *A. terreus*

strain SHPP01, accession no. JF738047.1). This morphotype was dominated by *A. flavus*, which represented 50 % of the sequenced fungal isolates. It is noteworthy that several other morphotypes represented by a single isolate gathered in the *Aspergillus* genus (*A. flavus* morphotype 11; *A. nomius* morphotypes 10 and 18; and *A. terreus* morphotypes 13, 14, and 17). Similarly, ITS analysis revealed that identical genera could be found in different morphotypes as *Paecilomyces sp./O. heteropoda/P. lilacinum* in morphotypes 2, 4, 6, and 7

Fig. 1 Rarefaction curve of the observed diversity of the fungal morphotypes as a function of the number of fungal strains isolated from enrichment cultures obtained from the Andosol perfused for 1 year with chlordecone-MS medium in a soil-charcoal device. The rarefaction curve was obtained by applying the freeware program aRarefactWin.exe (<http://www.uga.edu/~strata/AnRareReadme.html>). Error bars represent 95 % confidence intervals calculated from the variance of the number of fungal morphotypes



and *M. chlamydosporia*/*C. chlamydosporia*/*P. chlamydosporia* in morphotypes 2, 4, 6, and 9. At this stage, representative of the morphotype 8 has not been sequenced yet.

Screening of the fungal isolates for growth on chlordecone–MS medium

We focused our attention on the three dominant morphotypes, for which isolates able to grow on chlordecone were searched using a test in Bioscreen. Out of all the isolates tested, only *F. oxysporum* MIAE01197 was able to grow on liquid mineral salt medium with 3 mg l⁻¹ of chlordecone added as the sole carbon source (Fig. 3a). As a control, *F. oxysporum* MIAE01197 was unable to grow on liquid mineral salt medium. In addition, the reference strain not previously exposed to chlordecone *F. oxysporum* MIAE00047 grew neither on MS–chlordecone nor on MS medium (Fig. 3b). Further characterization of growth of MIAE01197 and of MIAE00047 addressed by biomass production showed that both of them were able to weakly grow on liquid mineral salt medium (i.e., approximately 2 mg of biomass within 2 weeks of incubation). However, *F. oxysporum* MIAE01197 developed a

significantly higher biomass (i.e., 7±1 mg) than *F. oxysporum* MIAE00047 (i.e., 3±1 mg) when grown on liquid mineral salt medium with 10 mg l⁻¹ of chlordecone added as the sole carbon source.

Characterization of *F. oxysporum* MIAE01197 tolerance to chlordecone

The tolerance of *F. oxysporum* MIAE01197 and MIAE00047 to chlordecone was addressed by assessing the impact of increasing concentrations of chlordecone (0, 0.1, 1, and 10 mg l⁻¹ of chlordecone) on growth parameters. Both strains grew without a lag phase on glucose–MS medium in the presence of chlordecone. However, the growth rate (micrometer) of *F. oxysporum* MIAE01197 was significantly increased in response to chlordecone exposure ($p < 0.01$; $n = 5$). On the contrary, the growth rate of MIAE00047, the reference strain unexposed to chlordecone, was not affected by chlordecone (Fig. 4).

The tolerance of the two strains to chlordecone was also estimated by calculating the EC₅₀, by quantifying fungal biomass after growth in a liquid culture medium. *F. oxysporum*

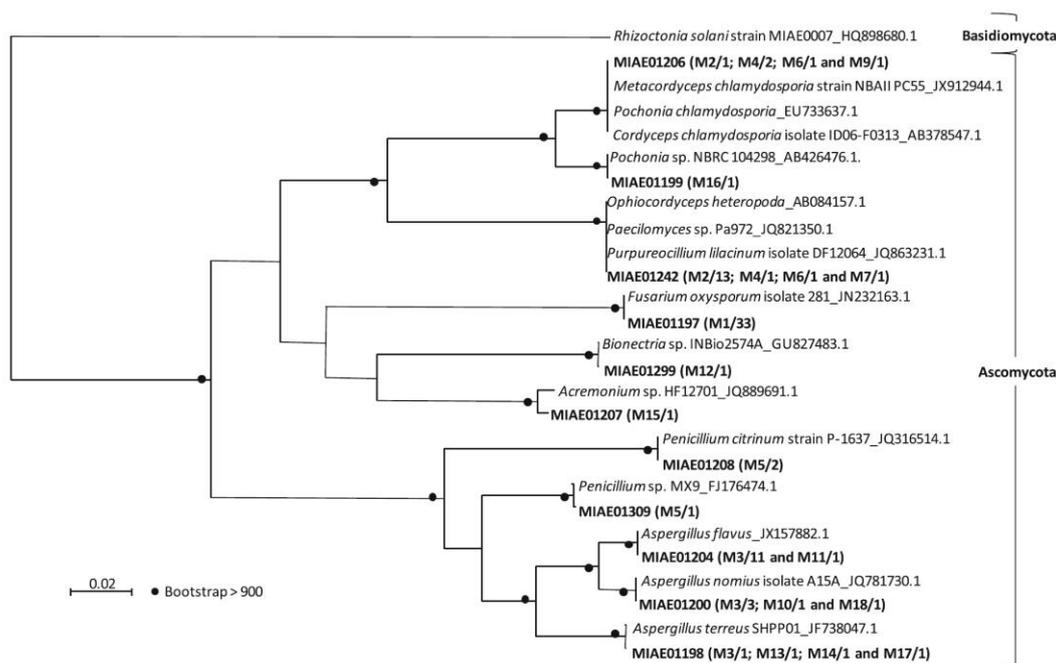


Fig. 2 Phylogenetic neighbor-joining tree of the ITS sequences of the fungal strains isolated from enrichment cultures obtained from the Andosol perfused for 1 year in a soil–charcoal device. The tree was built from the maximum likelihood criteria, using ClustalX software and NJplot program. Branch lengths are proportional to the evolutionary distances between sequences. Dots mean that bootstrap values are above or equal to 900 out of 1,000 iterations. Isolates are noted in *bold* and were registered in the MIAE (Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnementaux) collection from INRA Dijon (France). In brackets,

morphotype number and corresponding abundance are indicated separated by a *dash*. Several ITS sequences were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: KC787016 (MIAE01197); KC786984 (MIAE01198); KC603897 (MIAE01199); KC786992 (MIAE01200); KC787004 (MIAE01204); KC787021 (MIAE01207); KC787023 (MIAE01208); KC787001 (MIAE01242); and KC787036 (MIAE01299). One representative of each fungal species is shown. Reference sequences and corresponding accession numbers retrieved from the GenBank database are separated by a *hyphen*

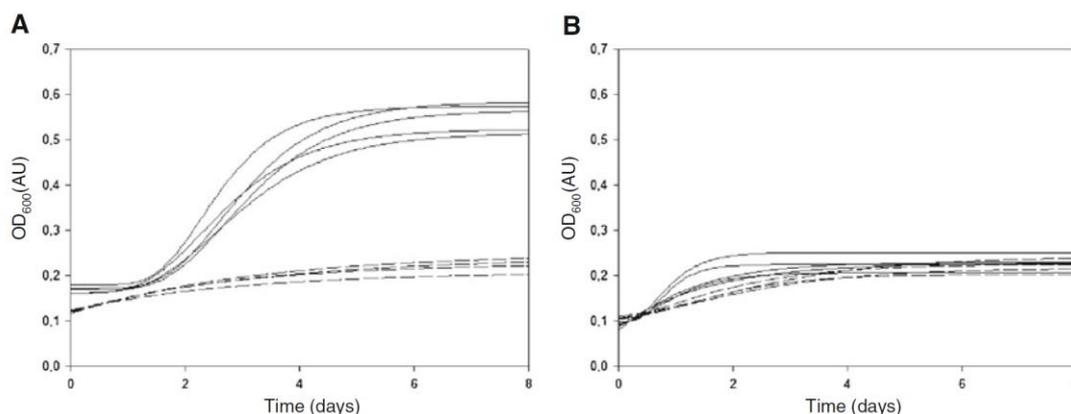


Fig. 3 a Growth curves of *F. oxysporum* MIAE01197 recorded from cultures on chlordecone–MS medium (solid lines). As a control, the growth of *F. oxysporum* MIAE01197 inoculated MS medium was monitored (dashed lines). **b** Growth curves of *F. oxysporum*

MIAE00047 grown on MS medium (solid lines). As a control, the growth of *F. oxysporum* MIAE00047 inoculated MS medium was monitored (dashed lines). For each strain and for each condition tested, five replicates were performed ($n_{\text{tot}}=20$)

MIAE01197 isolated from the chlordecone-contaminated Andosol showed a significantly higher EC_{50} than the reference MIAE00047 strain (i.e., 29.2 and 18.6 mg of chlordecone per liter, respectively, $p<0.01$).

Characterization of *F. oxysporum* MIAE01197 ability to dissipate chlordecone

In order to address *F. oxysporum* MIAE01197 dissipation ability, fungal cultures in liquid MS medium added with chlordecone (1.5 mg l^{-1}) were performed. A control consisting in incubating the chlordecone–MS medium

without fungal inoculation was added. GC-MS quantification of the chlordecone that remained in the culture medium at the end of the incubation period showed that $1.06 \pm 0.26 \text{ mg l}^{-1}$ of chlordecone remained in the control, while $0.60 \pm 0.09 \text{ mg l}^{-1}$ remained in the MIAE01197 culture. As compared to the control, approximately 40 % of chlordecone was dissipated by *F. oxysporum* MIAE01197. Unfortunately, although our GC-MS method allowed us to detect β -monohydro- and dihydro-chlordecone, no chlordecone metabolites could have been observed on MS spectrum.

To further address *F. oxysporum* MIAE01197 dissipation ability, mineralization experiments using radiorespirometry

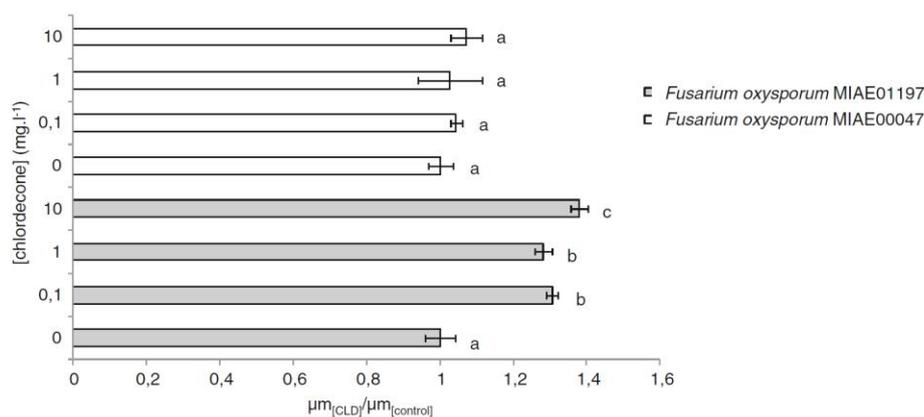


Fig. 4 Tolerance to chlordecone of *F. oxysporum* MIAE01197 isolated from a chlordecone-contaminated Andosol as compared to that of the reference strain *F. oxysporum* MIAE00047 not previously exposed to the insecticide. The growth of the two isolates on glucose–MS medium added with 0.1, 1, and 10 mg l^{-1} of chlordecone or not (control) was monitored over 7 days incubation at 25 °C in the Bioscreen C Microbiological Growth Analyser. For each condition tested, five replicates were performed ($n_{\text{tot}}=40$). Growth rates (micrometer) were estimated

by fitting growth curves with the Gompertz model. Tolerance to chlordecone was estimated by calculating the $\mu\text{m}_{[\text{CLD}]} / \mu\text{m}_{[\text{control}]}$ ratio. Gray bars represent $\mu\text{m}_{[\text{CLD}]} / \mu\text{m}_{[\text{control}]}$ values obtained for *F. oxysporum* MIAE01197 and white bars those obtained for the *F. oxysporum* MIAE00047 reference strain. Values are the means and standard errors of five replicates. Values labeled with the same letter are not significantly different according to the Student's t test at $P<0.005$, $n=5$

were carried out with $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone on cultures grown on chlordecone-MS or glucose-chlordecone-MS liquid media. A rapid but low emission of $^{14}\text{CO}_2$ (i.e., 1.2 % of the initial amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone added) was noted in *F. oxysporum* MIAE01197 cultures carried out in glucose-added MS medium, while hardly any emission of $^{14}\text{CO}_2$ was recorded in *F. oxysporum* MIAE 01197 cultures carried out in chlordecone-MS medium (Fig. 5). At the end of the incubation period, chlordecone residues were extracted using dichloromethane and separated by thin-layer chromatography (Fig. 6). The autoradiographic analysis of the chromatogram showed that $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone was present in the two *F. oxysporum* MIAE01197 cultures. S1 spot was observed close to the deposit line for both cultures and control. S2 and S3/S4 spots were observed below and above the chlordecone spot, respectively. These three spots were detected in both cultures, but not in the control culture medium. In addition, ^{14}C -compounds were weakly present in the migration fronts of the two cultures.

In order to check for the possible adsorption of chlordecone to the fungal biomass, an experiment was carried out by incubating different amounts *F. oxysporum* MIAE01197 in a phosphate buffer presence of ^{14}C -chlordecone. The amount of radioactivity contained in the phosphate buffer and in the

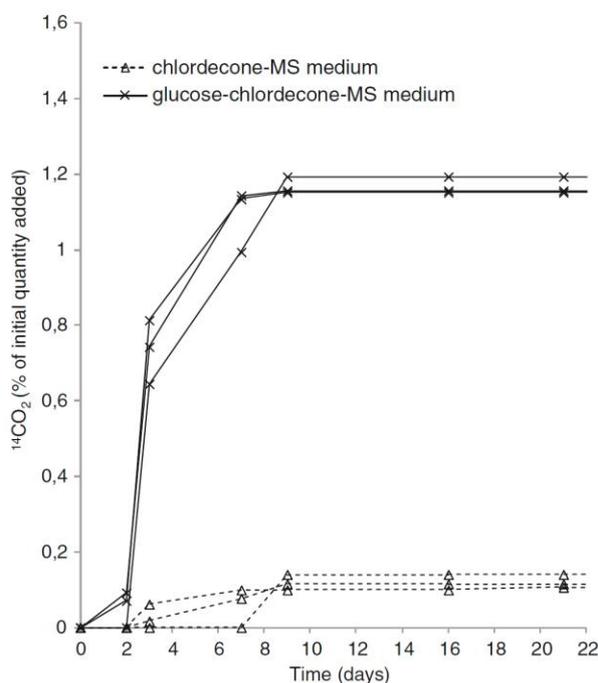


Fig. 5 Kinetics of $^{14}\text{CO}_2$ evolution from $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone over a 3-week incubation period in cultures of *F. oxysporum* MIAE01197 grown on chlordecone-MS medium (triangle, dashed lines) or on glucose-chlordecone-MS medium (cross, solid lines). The amount of accumulated $^{14}\text{CO}_2$ is expressed as a percentage of the initial amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone added to the medium. Three replicates were performed per treatment

fungal biomass was regularly monitored over a 72-h incubation period. A linear relationship was found between the amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone adsorption and fungal biomass ($^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone adsorbed = $32,595 \times [\text{fungal biomass}] + 0,069$, $r^2 = 0.99$) suggesting that biosorption could occur with *F. oxysporum* sp. MIAE01197 (Fig. S1).

Discussion

One hundred and three fungal strains were isolated from Andosol contaminated with 35 mg kg^{-1} of chlordecone. These strains were gathered into 18 morphotypes. Rarefaction analysis showed that the whole diversity of cultivable fungal species was not fully recovered. Shannon-Wiener index suggests a relatively moderate diversity of the isolated cultivable fungal strains. However, this observation should be interpreted keeping in mind that most fungal species are not cultivable (Anderson and Cairney 2004; Bridge and Spooner 2001; Manter and Vivanco 2007; Thorn 1997; Zak

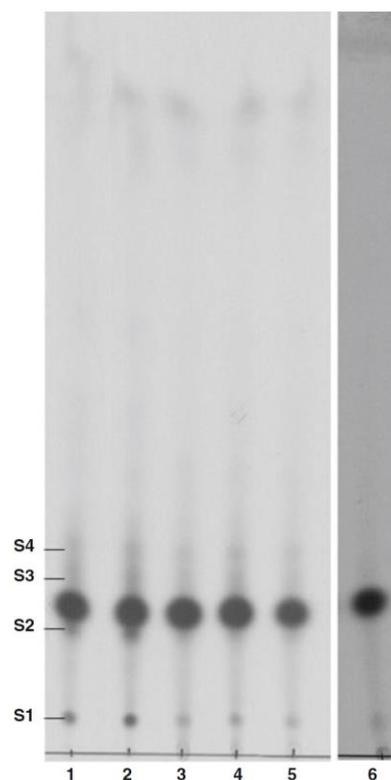


Fig. 6 Search for $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone metabolites in *F. oxysporum* MIAE01197 cultures conducted on glucose-chlordecone-MS medium (lanes 1 and 2) or on chlordecone-MS medium (lanes 3 to 5) using thin-layer chromatography. Non-inoculated chlordecone-MS medium was used as a control (lane 6). ^{14}C -metabolites extracted from the cultures were separated in a glass-backed silica gel layer. Radioactive compounds were detected by autoradiography

and Visser 1996). Consequently, the Andosol may have harbored higher fungal diversity. In addition, incubating the Andosol in a soil–charcoal system and isolating fungal strains under chlordecone selection pressure may also have yielded a moderate diversity of fungal species. As revealed by the Simpson index, several morphotypes (1, 2, and 3) codominated the cultivable fungal community and represented up to 76 % of the total effective. Molecular analysis based on 18S–28S ITS sequencing revealed that morphological classification led to a slight overestimation of the diversity of the fungal strains. Indeed, although the 103 isolates gathered in 18 morphotypes, they were distributed into only 11 genera (*Fusarium*, *Paecilomyces*, *Ophiocordyceps*, *Aspergillus*, *Purpureocillium*, *Metacordyceps*, *Pochonia*, *Cordyceps*, *Penicillium*, *Bionectria*, and *Acremonium*). This discrepancy was mainly due to whitish color isolates clustered in morphotype 4 and morphotypes 6 to 14 which did not display any spore pigmentation. Being classified as a separate morphotype according to mycelium shape, ITS sequencing revealed that some of them belonged to the *Aspergillus* genus explaining why diversity was overestimated. All the fungal strains isolated from the Andosol belonged to the Ascomycota phylum. This observation is in agreement with Rohilla and Salar (2012) who reported that Ascomycota was the dominant phylum (represented by seven genera) among fungal strains isolated from 23 agricultural soils contaminated with different pesticides. In addition, two of our three dominant morphotypes, namely *Fusarium* sp. (morphotype 1) and *Aspergillus* sp. (morphotype 3), were also found as predominant genera in pesticide-contaminated agricultural soils (Rohilla and Salar 2012).

Strains gathered in morphotype 1 belonged to *Fusarium* species which are ubiquitous organisms widely distributed in the environment (Nelson et al. 1994). They are known as plant (Nelson et al. 1994) and occasionally as animal pathogens (Evans et al. 2004) including humans causing broad spectrum of infections (Gorman et al. 2006; Nucci and Anaissie 2002, 2007).

Strains gathered in morphotype 2 belonged to the Hypocreales order including *Paecilomyces*, *Ophiocordyceps*, and *Purpureocillium* genera. Unfortunately, ITS amplification with ITS1F/ITS4 primers failed to distinguish between these genera. To give these strains a clearer affiliation, other molecular markers such as elongation factor or beta-tubuline will have to be investigated. Strains belonging to these genera are known as entomopathogenic fungi infecting emerald ash borers (Johny et al. 2012), whitefly nymphs (Wraight et al. 1998), and cicada larvae (Kobayasi 1938).

Strains gathered in morphotype 3 belonged to the *Aspergillus* genus which is ubiquitous, including saprophytes living in diverse habitats. They are known as a mycotoxin producer (Caira et al. 2012; Hedayati et al. 2007; Lass-Flörl et al. 2005) such as aflatoxin that impacts human health

(Kurtzman et al. 1987). According to a biogeographical study, *A. flavus* and *A. terreus* strains occur at expected frequencies in soil and litter in the tropical latitudes (Guadeloupe latitude is 16°09'00) (Klich 2002).

In order to identify a chlordecone-tolerant fungal strain, the strains gathered in the three dominant morphotypes were screened in liquid cultures by monitoring their growth on chlordecone–MS medium using the Bioscreen. Among all the strains we tested, only *F. oxysporum* MIAE01197 grew on MS medium supplemented with chlordecone as the sole carbon source. *F. oxysporum* MIAE00047, which had never been exposed to chlordecone, did not grow on chlordecone–MS medium at least using a Bioscreen. The measurement of biomass production showed that both reference and MIAE01197 strains were able to weakly grow on MS medium. This discrepancy between the Bioscreen and biomass production experiments is most likely due to technical limitations of Bioscreen not allowing the detection of weak biomass production. However, only MIAE01197 produced a significantly higher biomass in chlordecone MS medium than MIAE00047. In order to further assess the adaptation of *F. oxysporum* MIAE01197 to chlordecone, its tolerance to chlordecone was studied in vitro following a method typically used to assess the impact of different pesticides on organism growth (Bhalerao and Puranik 2007; Dritsa et al. 2007; Ortega et al. 2011). *F. oxysporum* MIAE01197 and MIAE00047 were exposed to a chlordecone gradient in liquid glucose–MS medium. *F. oxysporum* MIAE01197 growth rate (micrometer) was significantly increased in response to exposure to increasing concentrations of chlordecone ($p < 0.01$; $n = 5$), whereas the reference strain growth rate was not affected. *F. oxysporum* MIAE01197 and MIAE00047 tolerance was also assessed by calculating their EC_{50} values following the procedure used by different authors for different pesticides (Dorigo et al. 2007; Pesce et al. 2010). *F. oxysporum* MIAE01197 showed a significantly higher EC_{50} value than the reference strain MIAE00047 (i.e., 29.2 mg Γ^{-1} for MIAE01197 vs 18.6 mg Γ^{-1} for MIAE00047). As compared to the reference strain MIAE00047, it even seems to be stimulated by chlordecone exposure up to 10 mg Γ^{-1} , suggesting its adaptation in response to chlordecone exposure.

To characterize *F. oxysporum* MIAE01197 degrading ability, chlordecone dissipation was monitored by GC-MS. Approximately 40 % of chlordecone was dissipated by *F. oxysporum* MIAE01197. Unfortunately, no known chlordecone metabolites (β -monohydro- and dihydrochlordecone) could have been observed on the MS spectrum. In addition, no trace of intermediary metabolites recently suggested by Dolfing et al. (2012) was detected either. Therefore, at this stage, chlordecone dissipation cannot be clearly related to a degradation process. In order to investigate this possibility, radiorespirometry analyses were conducted. *F. oxysporum* MIAE01197 did not mineralize

$^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone when chlordecone was added as the sole carbon source. However, in the presence of glucose a low amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone evolved to $^{14}\text{CO}_2$ (i.e., 1.2 % of the initial amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone added). Although several radioactive spots were detected in the *F. oxysporum* MIAE01197 culture by TLC analyses, most of the radioactivity remained in the $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone spot, suggesting poor transformation. These last two observations contradict the fact that *F. oxysporum* MIAE01197 was able to grow on chlordecone as the sole carbon source in liquid medium. Indeed, although chlordecone dissipation was observed by GC-MS, hardly any evolution to $^{14}\text{CO}_2$ was recorded by radiorespirometry, except in the presence of glucose. One could not exclude that MIAE01197 could grow on some contaminants of chlordecone, but this hypothesis seems very unlikely because chlordecone pure at 99.7 % was used at low concentration (i.e., not more than 3 mg l^{-1}) not furnishing enough C to fuel its growth. Keeping in mind the poor ability of *F. oxysporum* MIAE01197 to transform $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone, we could explain chlordecone dissipation by biosorption. Indeed, adsorption onto fungal mycelium and/or absorption into the fungal cells has been observed by several authors for different xenobiotics (Aksu 2005; Benoit et al. 1998; Dritsa et al. 2007; Juhasz et al. 2002; Lievrement et al. 1996; Shin et al. 1970; Wu and Yu 2006). Fungal biosorption was even recommended as a water-cleaning strategy to remove heavy metals or organic pollutants by environmental bioremediation (Aksu 2005; Kapoor and Viraraghavan 1995; Yan and Viraraghavan 2003). We evidenced for a linear relationship between the amount of $^{14}\text{C}_{10}$ -chlordecone adsorption and fungal biomass ($r^2=0.99$) suggesting that biosorption could occur with *F. oxysporum* sp. MIAE01197. However, in our dissipation experiment, fungal biomass was too low to account for 40 % chlordecone removal by biosorption alone.

Conclusion

This study led to the isolation and characterization of 103 fungal strains from a historically contaminated Andosol. All these isolates were affiliated to the Ascomycota phylum known to be present in soils frequently exposed to pesticides. Among them, *F. oxysporum* MIAE01197 was the only one able to grow on chlordecone while the reference strain, *F. oxysporum* MIAE00047, not previously exposed to chlordecone did not grow on it. *F. oxysporum* MIAE01197 was shown to not only tolerate high concentration of chlordecone but also growth to be stimulated by chlordecone. This suggests that in response to long-term exposure to chlordecone in contaminated French West Indies soils, fungal species adapted processes involved in their adaptation. Among possible processes, *F. oxysporum* MIAE01197 biosorption and degradation abilities were shown to be

involved in the dissipation of chlordecone. Chlordecone degradation ability was low and further work is needed to improve it. Biosorption may give insight in cleaning water from chlordecone contamination by developing fungal filter.

Acknowledgments Chloé Merlin's PhD work was funded by an ADEME/Région Bourgogne. The work was done within the framework of the Biodechlor project funded by the INRA AIP Demichlor part of PNAC 1. The authors would like to thank Yves-Marie Cabidoche for having offered the possibility to work on this subject. This paper pays homage to Yves-Marie Cabidoche, a brilliant INRA researcher who carried out precursor work on chlordecone fate in the French West Indies. We would like to thank Annie Buchwalter for editing the manuscript.

References

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitza GM (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl Environ Microbiol 66(8):3357–3362
- Aksu Z (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. Process Biochem 40(3–4):997–1026
- Alabouvette C (1986) *Fusarium* -wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: review of a 10-year study. Agronomie 6(3):273–284
- Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. Environ Microbiol 6(8):769–779
- Benoit P, Barriuso E, Calvet R (1998) Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium. Chemosphere 37(7):1271–1282
- Bhalerao TS, Puranik PR (2007) Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. Int Biodeterior Biodegrad 59(4):315–321
- Bridge P, Spooner B (2001) Soil fungi: diversity and detection. Plant Soil 232:147–154
- Cabidoche YM, Achard R, Cattani 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
- Cabidoche YM, Lesueur-Jannoyer M (2012) Contamination of harvested organs in root crops grown on chlordecone-polluted soils. Pedosphere 22(4):562–571
- Caira M, Posteraro B, Sanguinetti M, de Carolis E, Leone G, Pagano L (2012) First case of breakthrough pneumonia due to *Aspergillus nomius* in a patient with acute myeloid leukemia. Med Mycol 50(7):746–750
- Clostre F, Lesueur-Jannoyer M (2012) Transfert de la chlordécone du sol vers les produits cultivés. Document de synthèse Cirad (in French).
- Coat S, Bocquene G, Godard E (2006) Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. Aquat Living Resour 19(2):181–187
- 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):1692–1701
- Dallaire R, Muckle G, Rouget F, Kadhel P, Bataille H, Guldner L, Seurin S, Chajes V, Monfort C, Boucher O, Thome JP, Jacobson SW, Multigner L, Cordier S (2012) Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone. Environ Res 118:79–85

- 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
- Dorigo U, Leboulanger C, Berard A, Bouchez A, Humbert JF, Montuelle B (2007) Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquat Microb Ecol* 50(1):91–102
- Dritsa V, Rigas F, Natsis K, Marchant R (2007) Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresour Technol* 98(9):1741–1747
- Edel V, Steinberg C, Gautheron N, Recorbet G, Alabouvette C (2001) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiol Ecol* 36(1):61–71
- Evans J, Levesque D, De Lahunta A, Jensen HE (2004) Intracranial fusariosis: a novel cause of fungal meningoencephalitis in a dog. *Vet Pathol* 41(5):510–514
- FAO/ISRIC/ISSS (1998) World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Report 84, FAO, Rome
- Fernandes P, Lesueur-Jannoyer M, Soler A, Achard R, Woignier T Effects of clay microstructure and compost quality on chlordecone retention in volcanic tropical soils: consequences on pesticide lability and plant contamination. In: 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for Changing World, Brisbane, Australia., 1–6 August 2010. pp 50–53
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2(2):113–118
- George SE, King LC, Claxton LD (1986) High-performance liquid-chromatography separation of chlordecone and its metabolites. *Chromatographia* 22(1–6):165–167
- Gorman SR, Magiorakos AP, Zimmerman SK, Craven DE (2006) *Fusarium oxysporum* pneumonia in an immunocompetent host. *S Med J* 99(6):613–616
- Hasan HAH (1999) Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. *Folia Microbiol* 44(1):77–84
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153(6):1677–1692
- Jablonski PE, Pheasant DJ, Ferry JG (1996) Conversion of Kepone by *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol Lett* 139(2–3):169–173
- Johny S, Kyei-Poku G, Gauthier D, van Frankenhuyzen K (2012) Isolation and characterisation of *Isaria farinosa* and *Purpureocillium lilacinum* associated with emerald ash borer, *Agrilus planipennis* in Canada. *Biocontrol Sci Technol* 22(6):723–732
- Juhász AL, Smith E, Smith J, Naidu R (2002) Biosorption of organochlorine pesticides using fungal biomass. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(4):163–169
- Kapoor A, Viraraghavan T (1995) Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresour Technol* 53(3):195–206
- Kilzer L, Scheunert I, Geyer H, Klien W, Korte F (1979) Laboratory screening of the volatilization rates of organic chemicals from water and soil. *Chemosphere* 10:751–761
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH, Lee J (2005) Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp *pisi* cutinase. *Chemosphere* 60(10):1349–1355
- Klich MA (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94(1):21–27
- Kobayasi Y (1938) The genus *Cordyceps* and its allies. Science reports of the Tokyo Bunrika Daigaku 5
- Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53(3):147–158
- Lass-Flörl C, Griff K, Mayr A, Petzer A, Gastl G, Bonatti H, Freund M, Kropshofer G, Dierich MP, Nachbaur D (2005) Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 131(2):201–207
- Le Déault JY, Procaccia C (2009) Les impacts de l'utilisation de la chlrodécone et des pesticides aux Antilles: bilan et perspectives d'évolution. Report no. 1778 of French National Assembly (in French).
- Li F, Huang SF, Liu B (2006) Degradation of phoxim by *Paecilomyces lilacinus*. *Chin J Appl Environ Biol* 12:104–107 (in Chinese with English abstract)
- Lievremont D, SeigleMurandi F, BenoitGuyod JL, Steiman R (1996) Biotransformation and biosorption of pentachloronitrobenzene by fungal mycelia. *Mycol Res* 100:948–954
- Manter DK, Vivanco JM (2007) Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *J Microbiol Methods* 71(1):7–14
- Martin-Laurent F, Sahnoun M, Merlin C, Vollmer G, Lübke M (2013) Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using ¹³C₁₀-chlordecone stable isotope as a tracer. *Env Sci Pollut Res*. doi:10.1007/s11356-013-1839-y
- Mukherjee I, Mittal A (2005) Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bull Environ Contam Toxicol* 75(5):1034–1040
- Multigner L, Ndong JR, Giusti A, Romana M, Delacroix-Maillard H, Cordier S, Jegou B, Thome JP, Blanchet P (2010) Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol* 28(21):3457–3462
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ (1994) Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 7(4):479–504
- Nucci M, Anaissie E (2002) Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 35(8):909–920
- Nucci M, Anaissie E (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20(4):695–704
- Ortega SN, Nitschke M, Mouad AM, Landgraf MD, Rezende MOO, Selegim MHR, Sette LD, Porto ALM (2011) Isolation of brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. *Biodegradation* 22(1):43–50
- Pesce S, Margoum C, Montuelle B (2010) In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river. *Water Res* 44(6):1941–1949
- Porto ALM, Melgar GZ, Kasemodel MC, Nitschke M (2011) Biodegradation of pesticides. In: Stoytcheva DM (ed) Pesticides in the modern world—pesticides use and management. InTech, pp 407–438
- Rohilla SK, Salar RK (2012) Isolation and characterization of various fungal strains from agricultural soil contaminated with pesticides. *Res J Rec Sci* 1:297–303
- 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
- Shin YO, Chodan JJ, Wolcott AR (1970) Adsorption of DDT by soils, soil fractions, and biological materials. *J Agric Food Chem* 18(6):1129–1133
- Takagi K, Iwasaki A, Kamei I, Satsuma K, Yoshioka Y, Harada N (2009) Aerobic mineralization of hexachlorobenzene by newly isolated pentachloronitrobenzene-degrading *Nocardioidea* sp strain PD653. *Appl Environ Microbiol* 75(13):4452–4458
- Takagi K, Yoshioka Y (2000) Development of a method for the rapid accumulation and isolation of recalcitrant-pesticide decomposing bacteria in soil using charcoal. In: Pesticides, soil microbiology and sustainable agriculture. Abstracts and Final Program of the 3rd International Symposium on

- Environmental Aspects of Pesticide Microbiology. Leverkusen, Germany, pp 69–70
- Thorn G (1997) The fungi in soil. In: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds) Modern soil microbiology. CRC, Boca Raton, pp 63–197
- White TJ (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315–322
- Wraith SP, Carruthers RI, Bradley CA, Jaronski ST, Lacey LA, Wood P, Galaini-Wraith S (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J Invertebr Pathol* 71(3):217–226
- Wu J, Yu HQ (2006) Biosorption of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution by *Phanerochaete chrysosporium* biomass: isotherms, kinetics and thermodynamics. *J Hazard Mater* 137(1):498–508
- Yan GY, Viraraghavan T (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res* 37(18):4486–4496
- Zak JC, Visser S (1996) An appraisal of soil fungal biodiversity: the crossroads between taxonomic and functional biodiversity. *Biodivers Conserv* 5:169–183
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Vantriet K (1990) Modeling of the bacterial-growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56(6):1875–1881

Conclusions

103 souches, formant 18 morphotypes, distribuées dans 11 genres fongiques ont été isolées d'un andosol contaminé au CLD. La communauté fongique isolée était dominée par trois morphotypes affiliés à *F. oxysporum* sp. (morphotype 1), *Paecilomyces* sp. / *Ophiocordyceps heteropoda* / *Purpureocillium lilacinum* (morphotype 2) et *Aspergillus* sp. (morphotype 3). Le criblage d'isolats fongiques choisis parmi les morphotypes dominants pour leur capacité à croître sur un milieu minéral comportant le CLD comme seule source de carbone a conduit à la sélection d'un seul isolat *F. oxysporum* MIAE01197. Cet isolat s'est montré être plus tolérant au CLD que *F. oxysporum* MIAE00047, une souche de référence n'ayant jamais été exposée au CLD (EC_{50} 29,2 et 18,6 mg.L⁻¹ pour MIAE01197 et MIAE00047, respectivement). Par ailleurs, l'ajout de CLD conduit à l'augmentation de la vitesse de croissance de MIAE01197 (augmentation de 40% à 10 mg.L⁻¹ de CLD) alors que celle de la souche de référence n'est pas été affectée.

Les analyses GC-MS menées sur le milieu de culture montrent que *F. oxysporum* MIAE01197 dissipe 40% du CLD initialement apporté à raison de 1,5 mg.L⁻¹. Toutefois, au cours de la dissipation, les métabolites connus du CLD (β -mono- et di-hydroCLD) n'ont pas été détectés. La capacité dissipatrice de MIAE01197 a également été étudiée en radiorespirométrie, reposant sur l'utilisation de ¹⁴C-CLD, montrant que seulement 1% de la quantité de ¹⁴C-CLD initialement apportée était transformé en ¹⁴CO₂ par les cultures de MIAE01197 additionnées de glucose. Par ailleurs, l'analyse par CCM montre la présence de ¹⁴C-CLD principalement et de quelques ¹⁴C-métabolites accumulés en faible quantité. Ces observations suggérant que MIAE01197 minéraliserait le CLD faiblement selon une voie co-métabolique mais cette très faible activité n'explique pas l'importante capacité dissipatrice observée en GC-MS. L'analyse de la capacité de biosorption du CLD sur la biomasse fongique de MIAE01197 a montré qu'elle suivait une fonction affine ($^{14}C_{10}$ -CLD adsorbé = 32,595 × biomasse fongique + 0,069 ; $r^2=0,99$) suggérant que la biosorption serait le principal mécanisme expliquant la capacité dissipatrice de *F. oxysporum* MIAE01197.

Article 3 : Caractérisation des capacités de populations fongiques à biosorber le CLD.

Article en préparation

Introduction

Cette étude fait suite aux travaux publiés dans la revue Environmental Science and Pollution Research (Merlin *et al.* 2014) qui nous a permis de mettre en évidence que *F.oxysporum* MIAE01197 était tolérante au CLD et était capable de le dissiper principalement par biosorption. L'acquisition de tolérance de *F.oxysporum* MIAE01197 est probablement le résultat d'une adaptation acquise suite à l'exposition pendant plusieurs dizaines d'années à cet insecticide, qui a, par ailleurs, été homologué aux USA comme fongicide. Dans ce contexte, j'ai mené une étude complémentaire visant à vérifier si les autres souches fongiques isolées des sols des Antilles contaminées par le CLD avaient également développé une tolérance à cet insecticide bien qu'elles ne soient pas capables de l'utiliser comme une source de carbone pour leur croissance. Cette étude avait également pour objectif de caractériser les capacités de dissipation de ces souches fongiques en caractérisant en détails leur potentiel de biosorption par rapport à la souche MIAE01197 et au charbon actif qui est utilisé pour traiter l'eau contaminée au CLD aux Antilles.

Pour conduire cette étude, j'ai ciblé trois souches appartenant à l'un des morphotypes dominants (morphotype 3) et affiliées au genre *Aspergillus* (*A. flavus* MIAE01259, *A. terreus* MIAE01220, *A. nomius* MIAE01233). Afin de pouvoir évaluer l'acquisition de tolérance au CLD, je les ai comparées à trois souches fongiques de référence (*A. flavus* LCP3495, *A. terreus* LCP3662, *A. nomius* LCP3558) n'ayant jamais été exposées au CLD, obtenues auprès du Muséum National d'Histoire Naturelle. La tolérance de ces 6 isolats fongiques a été appréciée par la détermination de (i) la concentration effective de CLD pour inhiber la production de biomasse de 10% (EC₁₀) et de (ii) paramètres calculés à partir des cinétiques de croissance obtenues sur des cultures fongiques exposées à différents teneurs en CLD. Le potentiel de minéralisation (production de ¹⁴CO₂) des souches fongiques ainsi que leur potentiel de dégradation (formation de ¹⁴C-métabolites) ont été déterminés par radiorespirométrie. Par ailleurs, pour compléter l'analyse des processus impliqués dans la dissipation du CLD, le potentiel de sorption du CLD sur la biomasse fongique de ces souches a été évalué et comparé aux données acquises pour *F. oxysporum* MIAE01197, *F. oxysporum* MIAE00047 et pour du

charbon actif. Les capacités de sorption des 8 souches fongiques et du charbon actif ont été décrites par la détermination de cinétiques de sorption et d'isothermes de sorption du ¹⁴C-CLD.

Characterization of chlordecone biosorption capacities of fungal species isolated from a long-term polluted soil (French West Indies)

Chloé Merlin¹, Marion Devers¹, Olivier Crouzet², Cécile Heraud³, Christian Steinberg³, Christian Mougin², Fabrice Martin-Laurent¹✉

¹ INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pôle Ecoldur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

² INRA, UR Pessac, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

³ INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pôle IPM, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

✉ e-mail: fabrice.martin@dijon.inra.fr

Abstract

Chlordecone (CLD) is a chlorinated insecticide used during twenty years (1972-1993) and currently contaminating soils, water and food stuff in the French West Indies (FWI) causing a major environmental and public health problematic. This study explored the possibility of an adaptation (tolerance, degradation) to CLD of *Aspergillus* strains isolated from a heavily contaminated soil and their CLD sorption potential compared to the CLD sorption potential of charcoal nowadays used to depollute water in the FWI. Tolerance was assessed by the impact of increasing concentration of CLD on growth rate and by calculating the CLD concentration effective to inhibit 10% of biomass production (EC₁₀). CLD mineralization potential was estimated by radiorespirometry with ¹⁴C₁₀-CLD, and CLD degradation by researching for ¹⁴C-metabolites by thin layer chromatography (TLC). Our *Aspergillus* isolates were not able to transform CLD (no ¹⁴CO₂ measured, no ¹⁴C-metabolites detected) and, comparing to reference strains not pre-exposed to CLD, they seem to be not adapted to CLD. Indeed, no EC₁₀ significant differences were observed between both isolates and references, and even if fungal growth rates were impacted in response to CLD exposure, no particular behavior can be attributed to fungal origin (pre-exposed to CLD or not). Sorption capacities were described by sorption kinetics and sorption isotherms. Although activated charcoal presented better Freundlich parameters ($K_f=5.29E+04 \text{ L.kg}^{-1}$ and $n=2.39$) than fungal strains ($1.17E+03 < K_f < 4.52E+03 \text{ L.kg}^{-1}$ and $1.21 < n < 1.79$) suggesting that it was a better CLD sorbent, the possibility to use dead fungal mycelia as CLD sorbent to depollute water is not to exclude. Indeed, sorption kinetics showed that about 90% of CLD in solution was sorbed by fungal mycelia and more than 90% sorbed by charcoal after one day exposition. Even though dead fungal mycelia are a bit less efficient than charcoal, production of fungal mycelia from local vegetables wastes should be less impacting for the environment than

activated charcoal production and might be an interesting alternative to depollute water contaminated with CLD.

1- Introduction

Chlordecone (CLD) is a chlorinated insecticide used to control banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, in the French West Indies (FWI, Guadeloupe and Martinique) until 1993. Due to its environmental persistence, transfer into others environmental compartments, toxicity and bioaccumulation potential, this organochlorine was classified as a persistent organic pollutant in May 2009 and added to Annex A of the Stockholm convention. Approximately 300 tons of CLD was applied in banana plantations during almost 20 years (1972-1978 under the trademark Kepone[®], and 1981-1993 under the trademark Curlone[®]) (Le Déaut et Procaccia 2009). Martin-Laurent *et al.* (2014) showed that soils used for banana production (representing almost 20,000 ha in the FWI, corresponding to 25 % of the utilized agricultural area) are contaminated with CLD at concentrations ranged between 0.1 and 35.4 mg.kg⁻¹, in accordance with Cabidoche *et al.* (2009) (*i.e.* banana plantation soils contaminated between 0.2 and 37.4 mg.kg⁻¹). Contamination monitoring revealed the presence of CLD in soils obviously, and even in rivers, springs, and drinking water as well as in food crop products such as root vegetables, cucurbits, in food fishing products (shrimps, fishes), and in food breeding products also (ducks and hens) (ATSDR 1995; Le Déaut et Procaccia 2009; Robert 2011; Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012; Joindreuille *et al.* 2013; Joindreuille *et al.* 2014). Consequently, French authorities regulated fishing and marketing of marine wildlife and forbade the consumption of fishes and shrimps as *ouassou* from rivers and certain species of game birds. Recently, Multigner *et al.* (2010) showed a higher prevalence of prostate cancer in FWI populations exposed to CLD. In addition, a recent study reports a delay in cognitive, visual and motor development of young children exposed to CLD (Dallaire *et al.* 2012).

Today, there is no solution to remediate soils contaminated with CLD. By applying a simple leaching model, Cabidoche *et al.* (2009) suggest that CLD contamination will last for several decades for nitisol, centuries for ferralsol, and more than half a millennium for andosol of the FWI. Faced to this critical situation, we urgently need to search for possible solution to treat this widespread pollution. Among possible cleaning-up strategies, bioremediation could be considered. In the current state of knowledge, although the dasheen has the highest relative contamination, it could not allow CLD extraction in several centuries, in the same order of magnitude as the leaching extraction (Cabidoche *et al.* 2006b). We based our strategy on the use of the soil microflora previously exposed to CLD. Even if CLD has the reputation to be highly recalcitrant to degradation, Dolfig *et al.* (2012) studied the Gibbs free energy data of CLD, and concluded that there are no thermodynamic reasons

why CLD-respiring of CLD-fermentation could not occur. However, despite this thermodynamic consideration, there are only a few numbers of studies about CLD biodegradation. *Pseudomonas* spp. strains apparently degraded CLD in aerobic condition, with a degradation content ranging between 15 and 25 % with an error of 10 % on CLD HPLC concentration measurements after 2 weeks of incubation (George et Claxton 1988). *Pseudomonas aeruginosa* strain KO3, a bacterial strain isolated from sewage sludge-collected lagoon water under aerobic conditions, was shown to convert Kepone® to dechlorinated compounds (monohydro- and dihydro-kepone) (Orndorff and Colwell, 1980). These findings were criticized by Cabidoche *et al.* (2009) who considered that authors did not describe the initial content in monohydro- and dihydro-CLD known to contaminate CLD due to incomplete chlorination during the manufacturing process weakening their conclusions about biodegradation. Another study reported CLD degradation by *Methanosarcina thermophila*, a methanogenic bacterium, who transformed up to 86 % of ¹⁴C₁₀-CLD within 10 days leading the accumulation of ¹⁴C-metabolites by a reductive dechlorination (Jablonski *et al.* 1996). Unfortunately, this bacterium is not available anymore. Regarding fungal world, a study report a CLD dissipation by *Aspergillus* strains isolated from CLD contaminated sludge (Wagner et Dixon 1981). Analysis of fungal cells revealed a high sorption potential, and even presence of CLD-alcool, a dechlorinated compound and an unidentified compound. Moreover, *Fusarium oxysporium* MIAE01197 isolated from a heavily contaminated andosol of FWI dissipated 40 % of CLD in aerobic suspension culture, and showed to be CLD-tolerant (Merlin *et al.* 2014). Even though this strain showed a very weak production of ¹⁴CO₂ and ¹⁴C-metabolites stemming from ¹⁴C₁₀-CLD degradation, dissipation observed is mainly explain by biosorption as in Wagner et Dixon (1981).

Our strategy was to explore CLD tolerance of fungal strains isolated from a soil heavily contaminated with CLD compared to fungal reference strains, and CLD degradation abilities of fungal isolates as first approach. We assume that the strains isolated pre-exposed to CLD would be likely to be adapted to the pressure exerted by CLD, and thus to develop an increased tolerance compared to reference strains not pre-exposed and perhaps a CLD degradation potential. As fungi are known to be involved in pesticide sorption mechanism (Shin *et al.* 1970; Lièvremonet *et al.* 1996; Benoit *et al.* 1998; Juhasz *et al.* 2002; Aksu 2005; Wu et Yu 2006; Dritsa *et al.* 2007), we explore in a second step CLD sorption abilities of our fungal strains. Enrichment cultures were conducted, and fungal strains isolated (MIAE01197 to MIAE01208 and MIAE01219 to MIAE01309). Tolerance to CLD was assessed by evaluating the impact of CLD on growth kinetics (growth rates) and biomass production (EC₁₀) of isolated *Aspergillus* strains (*A. terreus* MIAE01220, *A. nomius* MIAE01233 and *A. flavus* MIAE01259) and reference *Aspergillus* strains (*A. terreus* LCP3662, *A. nomius* LCP3558 and *A. flavus* LCP3495). CLD mineralization potential of isolated *Aspergillus* strains was estimated by radiorespirometry experiment with ¹⁴C₁₀-CLD and CLD degradation potential by searching for ¹⁴C-metabolites by thin

layer chromatography (TLC). CLD sorption abilities of both isolated and reference *Aspergillus* strains were specify by describing their sorption isotherms fitted with Freundlich model and their sorption kinetics. CLD sorption capacity of *Fusarium oxysporum* MIAE01197 know to dissipate CLD by sorption (Merlin *et al.* 2014) was also specify. CLD sorption to mycelia was compared to CLD sorption to activated charcoal nowadays used to depollute drinking water in FWI in the aim to explore the possibility of an alternative sorbent.

2- Materials and methods

2-1- Chemicals

[¹²C U]-Chlordecone Pestanal® (1,1a,3,3a,4,5,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalen-2-one) was purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany) (chemical purity 99.7 %). [¹⁴C U]-Chlordecone was purchased from Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) at a specific activity of 1,443 MBq.mmol⁻¹ (radiochemical purity 99.9 %). The solubility of CLD is 2.7 mg.L⁻¹ at 25°C (Kilzer *et al.* 1979).

2-2- Media

The mineral salt (MS) medium used in the present study contained 1.6 g of K₂HPO₄, 0.4 g of KH₂PO₄, 0.2 g of MgSO₄·7H₂O, 0.1 g of NaCl, 0.02 g of CaCl₂, and 1 ml of trace element solution per liter. The trace element solution contained ZnSO₄·7H₂O (0.2 mg), MnSO₄·H₂O (1.8 mg), H₃BO₃ (2 mg), CuSO₄ (0.1 mg), and Na₂MoO₄ (0.25 mg) in 1 l. To prepare the agar plates, 15 g of agar (Biokar Diagnostics) per liter was added to the medium. The medium was autoclaved and then supplemented with CLD (C₁₀Cl₁₀O) as a carbon source using a Bransonic® ultrasonic water bath 221, 10 ml of filter-sterilized (NH₄)₂SO₄ solution (100 g.l⁻¹) as the sole nitrogen source, 1 ml of filter-sterilized FeSO₄·6H₂O solution (5 g.l⁻¹), and 1 ml of filter-sterilized vitamin solution per liter. The vitamin solution contained 40 mg of biotin and 100 mg of thiamin–HCl per liter. For tolerance tests, the MS medium was supplemented with 20 ml of filter-sterilized glucose solution (250 g l⁻¹) after autoclaving, as the main carbon source. The phosphate buffer contained K₂HPO₄ (1 g), KH₂PO₄ (1 g), MgSO₄, 7H₂O (40 mg), in 1 l adjusted to pH 6.6. The medium was autoclaved and then supplemented with 1 ml of filter-sterilized FeSO₄·6H₂O solution (5 g.l⁻¹).

The potato dextrose agar (PDA) medium used in the present study contained 39 g of PDA (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) and 5 g of agar per liter of distilled water. Throughout the cultivation period, all the agar plates were maintained in plastic bags in order to prevent desiccation.

The potato dextrose broth (PDB) medium used to store fungal species contained 24 g of PDB (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) per liter of distilled water. The medium was autoclaved and then supplemented with 30 mg of CLD per liter using an ultrasonic water bath.

2-3- Fungal strains and storage conditions

Fungal reference strains, which had never been in contact with CLD, used in this study were : *Fusarium oxysporum* MIAE00047 (Collection de Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental, UMR Agroécologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France) (Alabouvette 1986), *Aspergillus flavus* LCP3495, *Aspergillus terreus* LCP3662, *Aspergillus nomius* LCP3558 (from the Muséum national d'Histoire Naturelle).

Isolated fungal strains used in this study were *Fusarium oxysporum* MIAE01197, *Aspergillus flavus* MIAE01259, *Aspergillus terreus* MIAE01220, *Aspergillus nomius* MIAE01233 isolated from a French West Indies andosol contaminated with CLD (Merlin *et al.* 2014).

To preserve fungal strains, conidia were collected from the sporulation culture 7 days after inoculation by scraping and using 1 ml of CLD–PDB medium. This suspension was mixed with an equal volume of 50% (v/v) sterilized glycerol, distributed in 1 ml aliquots, and stored at –80 °C.

2-4- Fungal biosorbents and activated charcoal

The capacity of isolated fungal strains and fungal reference strains to sorb CLD was compared to that of activated charcoal, actually used to depollute water.

Fungal suspension stored at -80°C were cultivated on PDA plates for 1 week at 25°C. Mycelia were then collected and grown for 1 week at 25°C shaking at 150 rpm, on glucose-MS medium in 500 mL flasks. To obtain non-living (dead) mycelia, liquid cultures were filtered, washed twice with ultrapure water (MilliQ, Millipore), and immediately dried for a night at 50°C. Then, dried biomass were collected, crushed with a sterilized mortar and sterilized by autoclaving. Activated charcoal (EtBr Greenbag disposal kit, MP Biomedicals) was also used as sorbent. It was crushed, and sterilized by autoclaving.

2-5- Tolerance to chlordecone (CLD)

The tolerance of the isolated fungal strains and reference fungal strains to CLD was tested by studying their growth in liquid culture.

The strains were cultivated on glucose–MS medium (7 days, 25 °C, 180 rpm) to prepare spore suspensions. They were then filtered to remove the mycelium. The filtrates were centrifuged (8,000×g, 20 min), the pellets were resuspended in 1 ml of sterilized ultrapure water, and spores

were counted using a Malassez counting chamber. The spore suspensions were diluted to obtain a final concentration of 5×10^5 spores.ml⁻¹.

The turbidity analysis was performed using a Bioscreen C Microbiological Growth Analyser (Labsystems, Helsinki, Finland). One-hundred-well microplates specifically manufactured for that machine were inoculated with fungal spore suspensions (50 µl) previously loaded with MS media (200 µl) with glucose (5 g.l⁻¹) as main carbon source and with a gradient of CLD content (0, 0.1, 1, and 10 mg.l⁻¹). Five replicates of each condition were done.

The OD600 was recorded every hour over a 7-day period. The experiments were conducted at 25 °C. Data were recorded using Easy Bioscreen Experiment software (EzExperiment) provided by the manufacturer and then exported to a Microsoft Excel Professional 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) sheet for further analysis.

2-6- Toxicity of CLD for fungal strains

CLD toxicity was assessed in liquid culture by monitoring mycelium biomass production by isolated fungal strains and reference fungal strains, starting from spore inoculum. Spore suspensions were prepared from mycelium mats grown in petri dishes with agar medium (10 mM KH₂PO₄, 4 mM MgSO₄, 50 mM NH₄Cl, 1 mM CaCl₂, 7 mM KCl, 10 g.l⁻¹ glucose, 5 g.l⁻¹ yeast extract, 10 g.l⁻¹ agar) adapted from Abadulla *et al.* (2000). Briefly, spores were collected with sterile water and counted on a Malassez counting chamber. The spore inoculum was diluted to 3×10^4 spores.ml⁻¹. Dose-effect experiments were carried out by inoculating 30 µl of spore suspension (1,000 spores) into 10 ml of liquid medium supplemented with gradual quantities of CLD ranging from 0 to 30 mg.l⁻¹. Whatever the concentration, CLD was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) at 4 % final concentration (v/v). Three replicates were run for each CLD concentration tested, plus two controls consisting of DMSO alone or sterile deionized water instead of DMSO. Incubation was statically run for 5 days in the dark at 25 °C. Then, cultures were filtered (30 µm pore size nylon filters) and the mycelium from each flask was collected, dried at 80 °C, and weighed to calculate biomass production as an endpoint. For each condition, EC₁₀ values (effective concentration of CLD that decreases biomass production by 10 % compared to the control) were calculated by performing a nonlinear regression on Hill's model using REGTOX software integrating the optimal EC₁₀ value (version EV7.0.5., E. Vindimian, <http://eric.vindimian.9online.fr/>).

2-7- CLD mineralization

The capacity of isolated fungal strains to mineralize CLD was tested by radiorespirometry in liquid cultures. The isolated fungal strains were grown for 1 week at 25 °C with shaking at 150 rpm, in MS

medium with glucose as the main carbon source, supplemented with CLD (1.5 mg.l⁻¹). They were then collected by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min. The pellets were washed twice in ultra-pure H₂O and resuspended to 0.1 OD600 unit in MS medium containing 1 mg.l⁻¹ of [¹²C U]-CLD and 33.3 Bq.ml⁻¹ of [¹⁴C U]-CLD, with and without glucose. Fungal suspensions were incubated for 3 weeks at 20 °C in a sterile glass jar and shaken (150 rpm). Each jar contained a scintillation vial filled with 5 ml of 0.2 M NaOH to trap CO₂. ¹⁴CO₂ production was monitored all along the incubation period by measuring radioactivity in the NaOH solution by liquid scintillation counting (Wallac 1409), using 10 ml of Ready Safe™ cocktail (Beckman Coulter Inc., USA). Three replicates were performed. Non-inoculated medium was used as control. At the end of the incubation period, fungal cultures were centrifuged. The collected supernatants were then extracted with dichloromethane (2:1; v/v). The organic phase was then evaporated and resuspended in 500 µl of hexane/acetone (3:1; v/v) and spotted onto glass-backed silica gel thin-layer chromatography (TLC) plates (10×20 cm) (Merck). Extracted compounds, including radioactive ones, were separated by migration in hexane/acetone (3:1, v/v) according to Jablonski *et al.* (1996). Radioactive compounds were detected by autoradiography (Carestream® Kodak® BioMax®MR film 20.3×25.4 cm, Sigma-Aldrich, France).

2-8- CLD sorption to dead (non-living) fungal biomass experiments

Sorption kinetics were obtained by adding 5 mL of sterile phosphate buffer supplemented with ¹²C-CLD at 2.5 µM to 30 mg of sterile dried mycelium (isolated fungal strains and reference fungal strains) or activated charcoal in glass jar previously sterilized by autoclaving. ¹⁴C-CLD was added as a tracer (2133 Bq.ml⁻¹). Jars were shaken in the dark at 20°C during 120 h. Periodically, 1 ml samples were centrifuged (5 min at 14000 rpm), and the radioactivity of the supernatant was measured allowing to calculated sorbed amounts. A similar procedure was used to obtain the sorption isotherms using CLD solutions at 4 different concentrations: 0.2, 0.4, 1 and 2.5 µM (with 266, 533, 1066 and 2133 Bq.ml⁻¹ of ¹⁴C-CLD respectively). All samples were run in triplicate. Sorption isotherms were obtained by plotting CLD sorbed amounts *versus* CLD concentration in solution after equilibration, and were described by the Freundlich equation:

$$x/m = K_F C_e^n$$

x/m is the CLD sorbed amount and C_e the CLD concentration in solution at equilibrium. K_F and n are empirical parameters, K_F represents the sorption capacity (L.kg⁻¹) and n is an index of affinity of the pesticide for the mycelium which gives an indication on the favorability of sorption.

2-9- Statistical analysis

Growth curves of fungal isolates and reference fungal strains (tolerance test) were fitted with the Gompertz model modified by Zwietering *et al.* (1990) using the SigmaPlot 4.0 software. The equation was $y=A \cdot \exp\{-\exp[1+\mu m \cdot \exp(1)(\lambda-t)/A]\}$, where y is the OD600 value (arbitrary unit), t is time (hour), μm is the maximum specific growth rate (hour^{-1}), A is the maximum OD600 value reached (arbitrary unit), and λ is the lag time (hour). The parameters thus determined were validated by a Tukey's test ($P < 0.01$). Tolerance to CLD was estimated by comparing the $\mu m_{\text{CLD}}/\mu m_{\text{control}}$ ratios.

3- Results

3-1- Characterization of isolated fungal strains and reference fungal strains tolerance to CLD

The tolerance of 6 *Aspergillus* sp. isolates and reference strains to CLD was addressed by assessing the impact of increasing concentration of CLD (0, 0.1, 1 and 10 mg.L^{-1}) on growth parameters. Growth rate ratios are presented in figure 1. Only *A. flavus* MIAE01259 was not sensitive to CLD treatment as shown by its growth rate non-affected whereas the 5 others strains were. Indeed, at the highest CLD content, the 5 sensitive strains presented a growth rate significantly higher than the control (without CLD), except for *A. terreus* LCP3662 which presented a lower growth rate ($p < 0.01$, $n=5$). One could observe that 2 of 3 *Aspergillus* strains isolated from FWI soil presented a growth rate higher than their reference (figure 1 A and 1 B), differences were more pronounced for *A. nomius* strains. The growth rate of *A. nomius* MIAE01233 was significantly increased in response to CLD exposure as soon 0.1 mg.L^{-1} until 10 mg.L^{-1} , whereas the growth rate of *A. nomius* LCP3558, reference strain not historically exposed to CLD, was not affected up to 1 mg.L^{-1} and a bit increased at 10 mg.L^{-1} (figure 1 A). Concerning *A. terreus* strains, at the maximal CLD concentration (10 mg.L^{-1}), the growth rate of the isolate (MIAE01220) was significantly increased whereas the growth rate of the reference (LCP3662) was significantly decreased (figure 1 B). This tendency was also observed by Merlin *et al.* (2014) with *Fusarium oxysporum* MIAE01197 isolated from the same soil highly polluted with CLD, and *Fusarium oxysporum* MIAE0047 which has never been in contact with CLD. Focusing on *A. flavus* strains, the tendency was really different than observed before. Indeed, even though growth rate of fungal strains isolated from a long-term polluted soil seems to be significantly increased (as *A. nomius* MIAE01233 and *A. terreus* MIAE01220 in this study and *F. oxysporum* MIAE01197 in Merlin *et al.* 2014), the growth rate of *A. flavus* MIAE01259 was not affected by CLD at concentrations tested. However, the growth rate of *A. flavus* LCP3495, reference strain not historically exposed to CLD, was significantly increased from 1 to 10 mg.L^{-1} (figure 1 C).

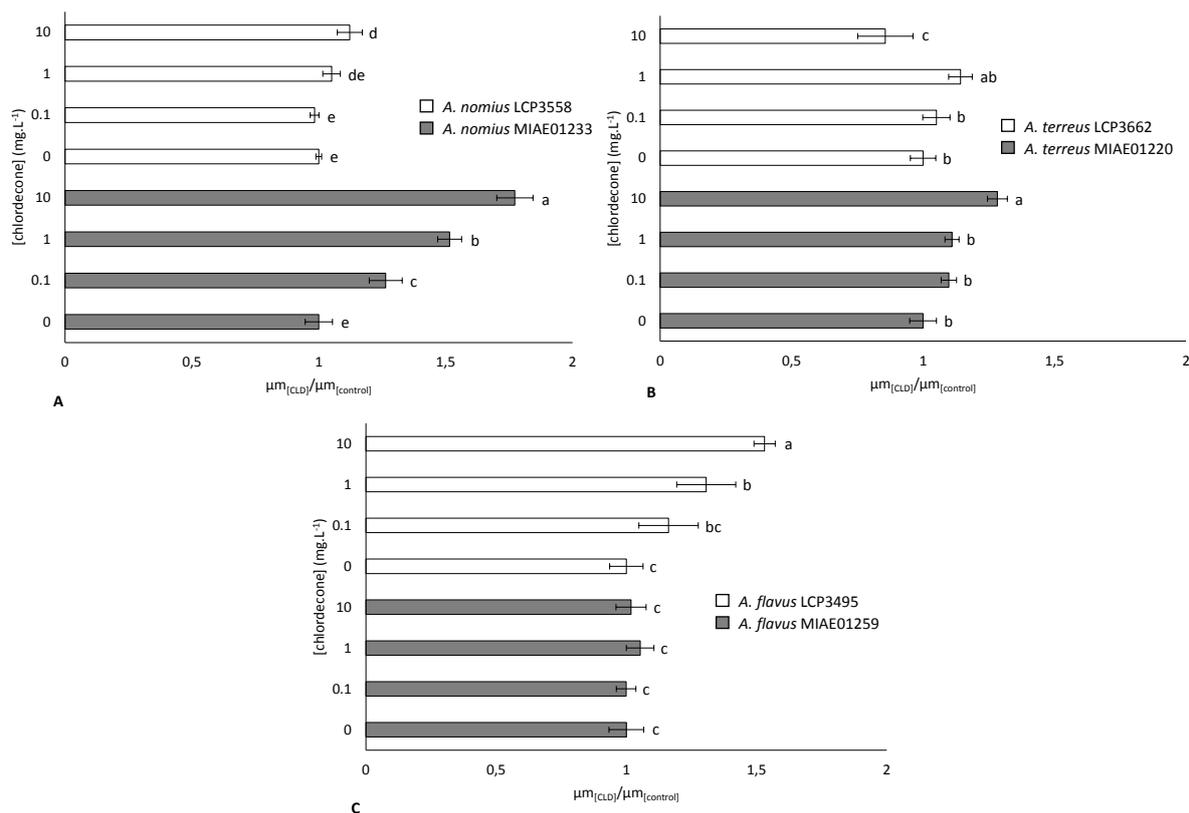


Figure 35. Figure 1. Impact of CLD on growth rates of *Aspergillus* strains isolated from a CLD contaminated andosol as compared of *Aspergillus* reference strains not previously exposed to the insecticide.

A. Growth rates ratios of the isolate *Aspergillus flavus* MIAE01259 compared to the reference *Aspergillus flavus* LCP3495. **B.** Growth rates ratios of the isolate *Aspergillus nomius* MIAE01233 compared to the reference *Aspergillus nomius* LCP3558. **C.** Growth rates ratios of the isolate *Aspergillus terreus* MIAE01220 compared to the reference *Aspergillus terreus* LCP3662. The growth of the strains on glucose-MS medium added with 0.1, 1 and 10 mg.L⁻¹ of CLD or not (control) was monitored over 7 days incubation at 25°C in the Bioscreen C Microbiological Growth Analyser. For each condition tested, five replicated were performed ($n_{\text{tot}}=120$). Growth rates were estimated by fitting growth curves with the Gompertz model. Impact of CLD was estimated by calculating the $\mu\text{m}_{\text{[CLD]}}/\mu\text{m}_{\text{[control]}}$ ratio. *Gray bars* represent $\mu\text{m}_{\text{[CLD]}}/\mu\text{m}_{\text{[control]}}$ values for isolates, and *white bars* those obtained for reference strains. Values are the means and standard errors of five replicates. Values labeled with the *same letter* are not significantly different according to the Tukey's test at $p<0.01$.

The tolerance of these strains to CLD was also estimated by calculating the EC₁₀, by quantifying fungal biomass after growth in liquid culture. Although EC₁₀ of *Aspergillus flavus* LCP3495, *terreus* LCP3662 and *nomius* LCP3558 reference strains (11.3, 20.8 and 9.9 mg.L⁻¹ respectively) seemed to be lower than EC₁₀ of *Aspergillus flavus* MIAE01259, *terreus* MIAE01220 and *nomius* MIAE01233 isolated strains (36.3, 28.8 and 30.0 mg.L⁻¹ respectively), these results were not significantly different (confidence interval 95%) (Supplementary data).

3-2- Characterization of fungal isolates abilities to dissipate CLD

In order to address *Aspergillus* sp. isolates dissipation abilities, mineralization experiments using radiorepirometry were carried out with $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD on cultures grown on CLD-MS or glucose-CLD-MS media. No emission of $^{14}\text{CO}_2$ was recorded (data not shown). At the end of the incubation period, CLD residues were extracted using dichloromethane and separated by thin-layer chromatography. The autoradiographic analysis of the chromatogram revealed that $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD was present in all fungal cultures as in the control. Unfortunately, no ^{14}C -compound was observed (figure 2).

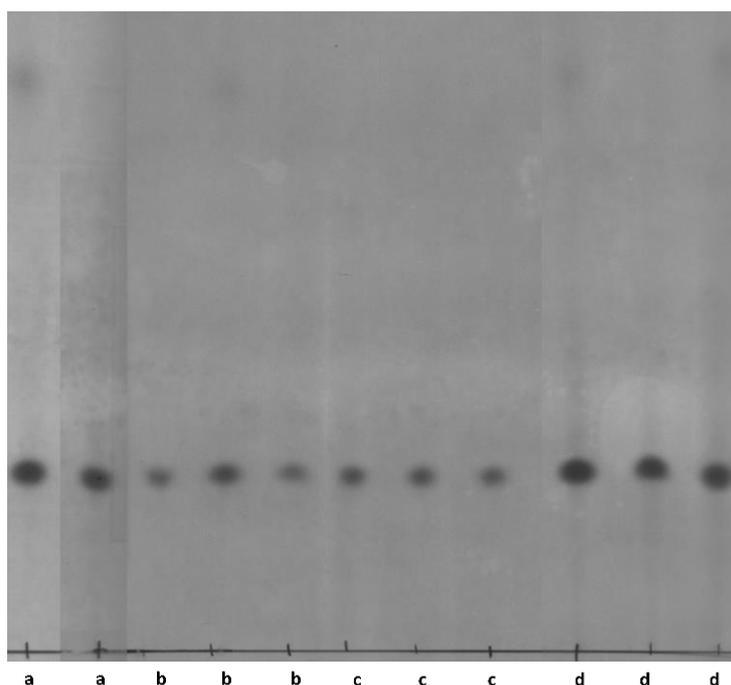


Figure 36. Figure 2. Search for $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD metabolites in *Aspergillus terreus* MIAE01220 (lanes b), *Aspergillus flavus* MIAE01259 (lanes c) and *Aspergillus nomius* MIAE01233 (lanes d) cultures conducted on glucose-CLD-MS medium using thin layer chromatography. Non-inoculated glucose-CLD-MS was used as control (lanes a). $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD and ^{14}C -metabolites extracted from the cultures were separated in a glass-silica gel layer. Radioactive compounds were detected by autoradiography.

3-3- Characterization of fungal strains and charcoal sorption abilities

In order to address fungal sorption abilities, sorption experiment using $^{14}\text{C}_{10}$ -CLD as a tracer were carried out by assessing sorption kinetics and sorption isotherms. Comparison with charcoal sorption ability, nowadays used in FWI as a sorbent to depollute water, allowed us to explore an alternative method by depolluting water with dead mycelia. Sorption kinetics of CLD at a concentration of 2.5 μM were obtained with dead mycelia and with charcoal in phosphate buffer and are shown in figure 3. A control without sorbent was added to verify that precautions taken to avoid physical CLD sorption (on materials) were sufficient. No variation in CLD concentration in solution was observed in

the control indicates that sorption observed with mycelia or charcoal are due to the presence of sorbent themselves. Sorption on both mycelia and charcoal occurred rapidly: majority of sorption occurred in few minutes. Sorption on charcoal was at equilibrium after 30 minutes exposition with CLD with a maximum of 97% of CLD sorbed. However, even if the majority of sorption on mycelia, all confounded, occurred in the first 30 minutes, sorption seems to continue slowly to reach almost 90% of CLD sorbed (closed to CLD sorption on charcoal) after one day (1440 min). We can note that sorption kinetics could be a bit different for *A. terreus* LCP3662 and *F. oxysporum* MIAE01197 than the others fungal strains during the first minutes. However, at the end of the experiment the results obtained with fungal species were the same no matter what are their origins (historically exposed to CLD or not), no matter what are their taxonomy (*Fusarium* genus versus *Aspergillus* genus, and between different *Aspergillus* species).

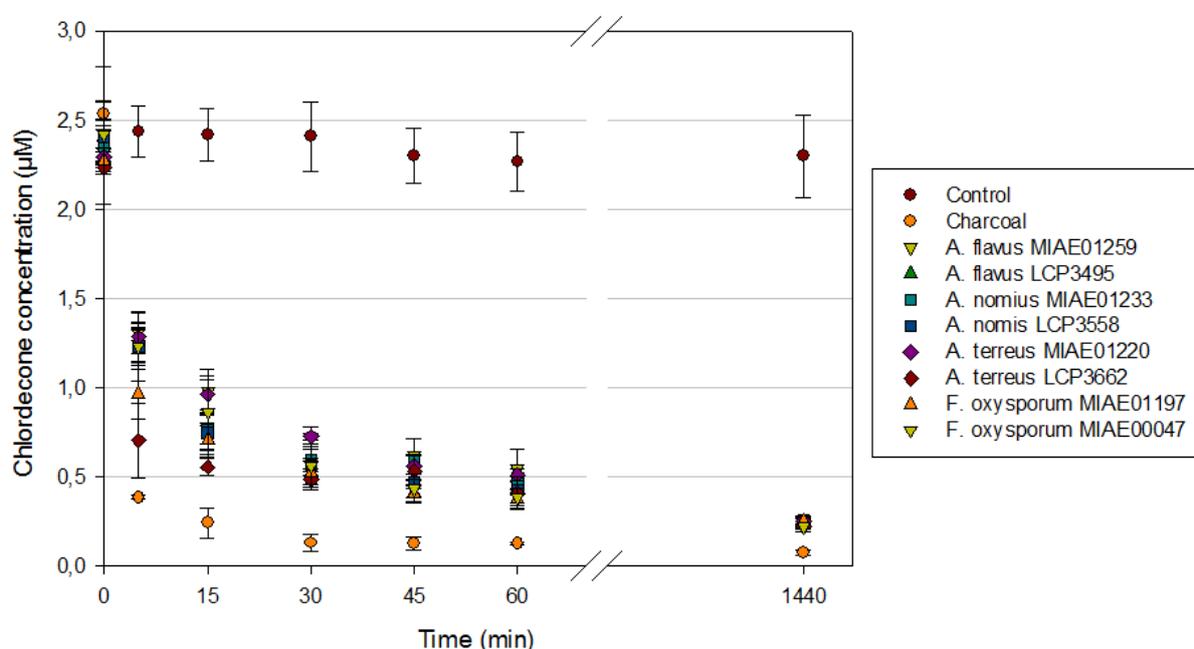


Figure 37. Figure 3. Chlordecone sorption kinetics by dead mycelia and charcoal.

Sorption isotherms of CLD on dead mycelia and charcoal are shown in figure 4. We can already note that, compared to mycelia isotherms, charcoal had a different behavior towards CLD, as expected. Mycelia isotherms were not confounded but seemed to follow a close tendency except for *A. nomius* strains (MIAE01233 and LCP3558) and *A. terreus* MIAE01220.

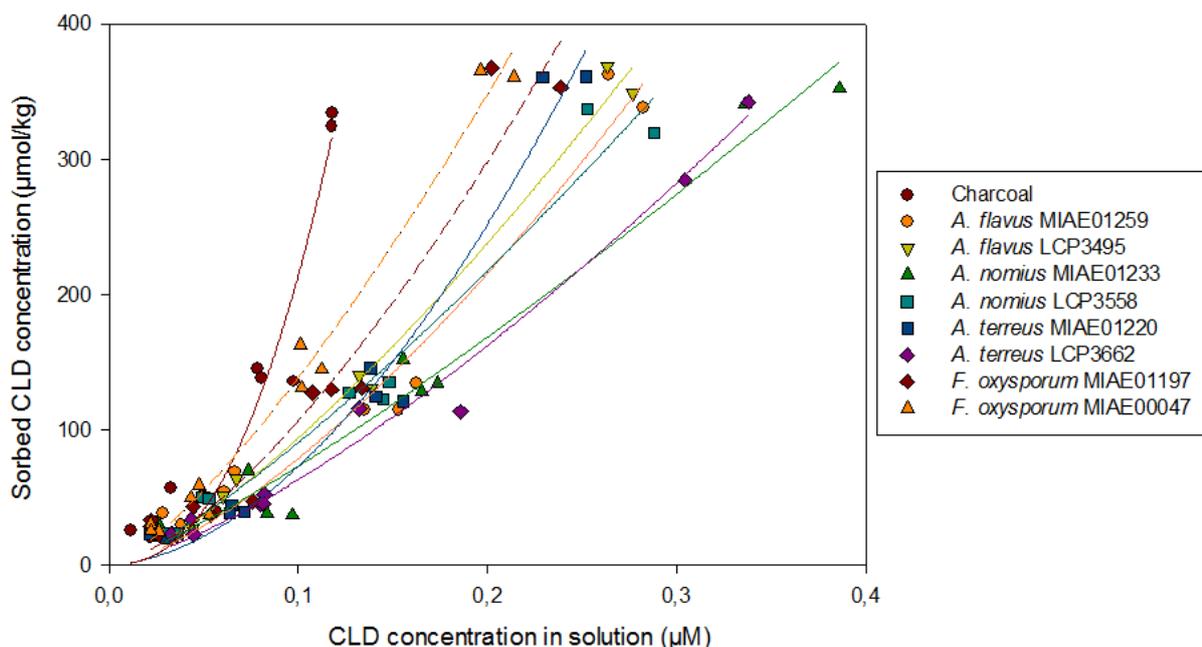


Figure 38. Figure 4. Sorption isotherms of chlordecone on dead mycelia and charcoal.

Freundlich parameters K_F and n are given in table 1 and bring us more information about sorption capacities. For both charcoal and mycelia, regressions of plotted C_e versus x/m were good enough ($r^2 > 0.96$). Isotherms are nonlinear as explained by n parameter beyond 1. K_F estimated values showed that adsorption capacities of both charcoal and mycelia were very important (ranged between $1.17E+03$ and $5.29E+04 \text{ L.kg}^{-1}$). K_F of charcoal ($5.29E+04 \text{ L.kg}^{-1}$) was greater than the K_F of mycelia all confounded (ranged between $1.17E+03$ and $4.52E+03 \text{ L.kg}^{-1}$). This tendency indicates that charcoal have a better CLD sorption capacity than mycelia as observed with sorption kinetics. If we focus on mycelia only, *A. nomius* strains (MIAE01233 and LCP3558) and *A. terreus* MIAE01220, which seemed to show a different behavior comparing to the other fungal strains (concerning the appearance of their CLD adsorption isotherms), presented indeed extreme values of both K_F and n parameters ($1.17E+03$, 1.21 and $1.68E+03$, 1.27 for minimum values; $4.52E+03 \text{ L.kg}^{-1}$, 1.79 for the maximum value, respectively for these three *Aspergillus* strains).

Table 1. Parameters of the Freundlich equation describing the sorption isotherms of chlordecone on dead mycelia and charcoal.

	Kf (L.kg ⁻¹)	n	r ²
Charcoal	5.29E+04	2.39	0.9689
<i>A. flavus</i> MIAE01259	2.25E+03	1.46	0.9801
<i>A. flavus</i> LCP3495	2.07E+03	1.35	0.9951
<i>A. nomius</i> MIAE01233	1.17E+03	1.21	0.9862
<i>A. nomius</i> LCP3558	1.68E+03	1.27	0.9856
<i>A. terreus</i> MIAE01220	4.52E+03	1.79	0.9842
<i>A. terreus</i> LCP3662	1.47E+03	1.37	0.9912
<i>F. oxysporum</i> MIAE01197	3.27E+03	1.49	0.9744
<i>F. oxysporum</i> MIAE00047	2.97E+03	1.33	0.9917

On the other hand, the magnitude of n parameter gives an indication on the favorability of sorption. An n exponent above 2 (up to 10) represents a good favorability, an n ranged between 1 and 2 a moderate favorability and an n below 1 represents a poor favorability (Hamdaoui et Naffrechoux 2007). As well, the n values corroborated our observations: the higher n value was 2.39 for charcoal indicating that it is a better CLD sorbent. Mycelia n values were ranged between 1.21 and 1.79 indicating that mycelia, although their sorption capacity present a few variability, present close tendency *i.e.* mycelia are interesting sorbent not so far from charcoal CLD sorption capacity. Variation of Freundlich parameters (K_F and n values) between fungal species cannot be attributed to their origin (have been or not have been historically exposed to CLD) or taxonomy, but more related to individual variability.

4- Discussion

Our first approach was to explore an eventual adaptation to CLD of *Aspergillus* strains isolated from a heavily contaminated soil by comparing their tolerance to CLD to reference *Aspergillus* strains not pre-exposed and by assessing their CLD degradation potential. In order to evaluate tolerance to CLD of fungal isolates and fungal references, impact of CLD on growth rate and on biomass production was estimated. The impact of CLD on fungal growth was studied *in vitro* following a method typically used to assess impact of different toxics (Dritsa *et al.* 2007; Ortega *et al.* 2011). The 3 *Aspergillus* strains isolated from a long term CLD polluted soil and the 3 *Aspergillus* reference strains not pre-exposed to CLD were exposed to a CLD gradient in liquid glucose-MS medium. First of all, we can note that fungal strains were not indifferent to CLD exposure which affects their growth kinetics. Indeed, growth rates of five fungal strains out of six tested were significantly impacted in response to

CLD exposure at the concentrations tested (0.1 to 10 mg.L⁻¹). The impact of CLD on growth rates of the *A. nomius* strains (MIAE01233 and LCP3558) and of the *A. terreus* strains (MIAE01220 and LCP3662) was similar than the impact observed on growth rate of *F. oxysporum* strains (MIAE01197 and MIAE00047) by Merlin *et al.* (2014): growth rate of *Aspergillus* strains isolated from the andosol was significantly increased with a maximum of 20% increasing for *A. terreus* MIAE01220, 70% for *A. nomius* MIAE01233 at 10 mg.L⁻¹ comparing to their control, as observed for *F. oxysporum* MIAE01197 (which about 40% increasing). On the other hand, growth rate of references was decreased, a bit increased (less than 10%) or even affected (for *A. terreus* LCP3662, *A. nomius* LCP3558, *F. oxysporum* MIAE00047 respectively) but always lower than the strains isolated from the andosol. However, this tendency cannot be extrapolated to every fungal strains isolated from a high CLD polluted soil and every fungal strains not historically exposed. Indeed, the growth rate of the *A. flavus* strains was differently impacted in response to CLD exposure: the growth rate of the reference strain (LCP3495) was significantly increased, and the *A. flavus* strain isolated from the andosol (MIAE01259) was insensitive (growth rate non-affected). Unfortunately, specific behavior cannot be attributed to fungal strains isolated from the andosol against fungal reference strains. Indeed, the origin of this tolerance could result from historical exposure but also from expression of genetic diversity of fungal strains.

Impact of CLD on fungal species was also evaluated by assessing the effective concentration of CLD that inhibit 10% of biomass production, EC₁₀, following the procedure used by different authors for different pesticides (Dorigo *et al.* 2007; Pesce *et al.* 2010). Comparing our results with those from literature, with EC₁₀ ranged between 9.9 and 36.6 mg.L⁻¹, *Aspergillus* sp. strains seem to be more tolerant than *Fusarium oxysporum* strains with an EC₅₀ ranged between 18.6 and 29.2 mg.L⁻¹ (Merlin *et al.* 2014). Otherwise, EC₁₀ of fungal isolates and fungal references were not significantly different despite a value systematically lower for the references.

Degradation capacities of fungal isolates were assessing by conducting ¹⁴C₁₀-CLD liquid culture experiments, a method commonly used for other pesticides by different authors to detect ¹⁴CO₂ by radiorespirometry (Mandelbaum *et al.* 1993; Sørensen *et al.* 2008) and ¹⁴C-metabolites by thin layer chromatography (Jablonski *et al.* 1996). No ¹⁴CO₂ and no ¹⁴C-metabolites were detected in fungal culture indicating that these three *Aspergillus* sp. isolated strains were not able to transform CLD. All of these results (tolerance and degradation) suggest that isolated *Aspergillus* strains seem to be not adapted to CLD exposure.

In a second step, we explore CLD sorption potential of both isolated and reference *Aspergillus* strains. Indeed, several authors observed adsorption onto mycelia and/or absorption into fungal cells for different xenobiotics (Lièvreumont *et al.* 1996; Benoit *et al.* 1998; Juhasz *et al.* 2002; Aksu 2005; Dritsa *et al.* 2007) among them CLD (Wagner et Dixon 1981; Merlin *et al.* 2014). The

Fusarium oxysporum MIAE01197 strain isolated from the same heavily contaminated soil and known to be adapted to CLD exposure and to dissipate CLD by sorption was also studied.

In order to investigate this possibility, sorption experiments were conducted on dead fungal biomass according to a method used by Benoit *et al.* (1998). Freundlich model was applied to experimental data set as commonly used to describe pesticide sorption isotherm (Benoit *et al.* 1998; Hamdaoui et Naffrechoux 2007). CLD sorption isotherms were adequately described by the Freundlich equation with an r^2 values above 0.96. CLD sorption isotherms were not linear as explained by the value of the n parameter of the fitted Freundlich equation above 1. As expected, K_F empirical parameters of the fitted Freundlich equation were very high (*i.e.* ranged between 1.17E+03 and 4.52E+03 L.kg⁻¹ corresponding to a logarithm form ranged between 3.07 and 3.66) for all mycelia confounded indicating a high affinity of CLD to fungal cells. Indeed, CLD is known to be hydrophobic (solubility at ambient temperature and at pH7 is ranged between 1 to 3 mg.L⁻¹ according to Cabidoche *et al.* 2006b, Bonvallot and Dor 2004, Epstein 1978, ATSDR 1995) and lipophilic with a high octanol-water partition coefficient, K_{OW} ($\log K_{OW}$ ranged between 4.5 and 5 according to Cabidoche 2009 and 2012, Bonvallot and Dor 2004, Sheringer *et al.* 2006). Moreover, CLD is also known to be accumulated in fatty tissues of living organisms (adipose tissue, liver and central nervous system) (Cohn *et al.* 1978; Bonvalot and Dor 2004). In humans, CLD interaction with transmembrane protein is known to disorganize cellular function of central nervous system, liver and brain (Fujimori *et al.* 1982; Squibb et Tilson 1982; Linder *et al.* 1983; Desai 1985; Herr *et al.* 1987; Swartz *et al.* 1988; Kodavanti *et al.* 1990; Kodavanti *et al.* 1993; Vaccari et Saba 1995). Affinity of CLD to biological membrane (lipidic bilayer) could explain the disturbance observed on growth kinetics of fungal strains analyzed in this study. Despite the action mode of CLD is not completely elucidated nowadays, we could think that CLD interaction with biological membrane, in our case with fungal membrane, altered cellular functions resulting on oxidative burst and cellular death. Anyway, dead fungal mycelia showed a high capacity to sorb CLD. However, we are not able to say if it is adsorption and/or absorption mechanisms involved.

Any differences observed on fungal growth kinetics in response to CLD exposure and any variations of K_F values obtained by fitting fungal sorption isotherms cannot be attributed to the origin (pre-exposed to CLD or not) or the taxonomy of fungal strains tested, but more related to their individual properties.

Comparison of estimated Freundlich parameters of our dead fungal strains with those of charcoal, nowadays used to depollute water in the FWI, allows us to explore the possibility to use dead fungal biomass as effective CLD sorbent. First of all, we note that K_F value was higher for charcoal (5.29E+04 L.kg⁻¹ against 1.17 to 4.52E+03 L.kg⁻¹ for dead fungal biomass) suggesting a better potential to sorbe CLD. Moreover, the n exponent of Freundlich parameters describes the favorability of sorption. An n

exponent below 1 represents a poor favorability, an n ranged between 1 and 2 a moderate favorability and an n ranged between 2 and 10 a good favorability (Hamdaoui et Naffrechoux 2007). So, charcoal with an n value of 2.39 is a better sorbent than fungal mycelia with n values ranged between 1.21 and 1.79. However, sorption kinetics showed that after one day CLD exposure, fungal mycelia sorbed up to 90% of CLD added in the medium whereas charcoal sorbed more than 90% of CLD (*i.e.* 97%). This finding corroborates that charcoal is a better CLD sorbent. Nevertheless, sorption kinetics showed that fungal mycelia presented a CLD sorption potential not so far from the sorption potential of charcoal and thus, an interesting ability to depollute water. Conclusions of the workshop “Remediation to CLD pollution in the Caribbean” (INRA/CIRAD 2010) suggested to explore new sorbent with a very low impact on the environment as a charcoal alternative. Indeed, charcoal production is energy consuming (high temperature carbonization), responsible for the production of highly polluting by-product (pyroligneous acid derived from the condensation of the wood pyrolysis by-products) and is conditioned by tree felling, which can induce a significant environmental impact. Production of fungal mycelia mix from local vegetables wastes followed by a sterilization step to kill mycelia should be less impacting for the environment. Unfortunately, this alternative method does not solve the issue of contaminated waste generation.

Conclusion

This study explored (i) the possibility of an adaptation to CLD of *Aspergillus* strains isolated from a heavily contaminated soil and (ii) the CLD sorption potential of these fungal strains and of *Fusarium oxysporum* MIAE01197, known to be adapted to CLD and to dissipate CLD by sorption, compared to the CLD sorption potential of charcoal actually used to depollute water in the FWI. Growth rates of both reference *Aspergillus* strains ($n=3$) not pre-exposed to CLD and isolated *Aspergillus* strains ($n=3$) were impacted (increased or decreased) in response to increasing CLD concentration, except for *A. flavus* MIAE01259 which was insensitive. Unfortunately, the variability of impact of CLD on growth rate cannot be attributed to fungal origin (pre-exposed or not) or fungal taxonomy, but it could be explain by individual behavior. Although EC_{10} of isolated *Aspergillus* strains seemed to be higher than EC_{10} of reference *Aspergillus* strains, these results were not significantly different. Moreover, *Aspergillus* isolated from the andosol were not able to mineralize and even degrade CLD. All fungal strains tested showed an interestingly CLD sorption ability with a K_F ranged between $1.17E+03$ and $4.52E+03$ L.kg⁻¹ and an n exponent between 1.21 and 1.79. Although activated charcoal, actually used to depollute water in the FWI, presented better Freundlich parameters ($K_F=5.29E+04$ L.kg⁻¹ and $n=2.39$) suggesting that it was a better CLD sorbent than fungal strains, the possibility to use dead fungal mycelia as CLD sorbent to depollute water is not to exclude. Indeed, sorption kinetics showed that up to 90% of CLD in solution was sorbed by fungal mycelia and 97% sorbed by charcoal after one

day exposition. Production of fungal mycelia from local vegetables wastes should be less impacting for the environment than activated charcoal production. Unfortunately, this alternative method does not solve the issue of contaminated waste generation.

Acknowledgments

Chloé Merlin's PhD work was funded by ADEME and Région Bourgogne. The authors would like to thank Yves-Marie Cabidoche for having offered the possibility to work on this subject. This paper pays homage to Yves-Marie Cabidoche, a brilliant researcher who carried out precursor work on CLD fate in the French West Indies. We would like to thank the 'Muséum national d'Histoire Naturelle' from Paris for giving us *Aspergillus* strains from LCP collection which allows us to have *Aspergillus* reference strains not pre-exposed to CLD. We would like to thank Annie Buchwalter for editing the manuscript.

Conclusions

L'analyse de la tolérance des six isolats d'*Aspergillus* été réalisé en estimant (i) la concentration en CLD effective pour inhiber la production de biomasse fongique de 10% (EC₁₀) et (ii) le taux de croissance de cultures fongiques exposées à différentes concentrations de CLD (0, 0,1, 1, 10 mg.L⁻¹). (i) Nous avons observé que les trois souches d'*Aspergillus* isolées du sol contaminé au CLD présentaient des EC₁₀ plus élevées que celles des souches de référence sans toutefois différer de manière significative. Nous avons pu observer la même tendance que celle observée pour les souches de *Fusarium* (Merlin *et al.* 2014) et montrer que les souches d'*Aspergillus* (EC₁₀ avoisinant 30 mg.L⁻¹) isolées de l'andosol présentaient des EC₁₀ 10 fois plus importantes que celles de *Fusarium*. (ii) Par ailleurs, l'analyse des paramètres estimés à partir des cinétiques de croissance des souches fongiques (taux de croissance) a montré que seul *A. flavus* MIAE01259 était insensible au CLD quel que soit la concentration testée. A la concentration la plus élevée de CLD (10 mg.L⁻¹), tous les autres isolats présentaient un taux croissance significativement plus élevé que celui de leur contrôle respectif à l'exception de la souche *A. terreus* LCP3662 dont le taux de croissance était significativement plus faible. De plus, l'analyse de ces résultats montre que deux des trois isolats d'*Aspergillus* provenant du sol des Antilles présentaient des taux de croissance supérieurs à la référence (*A. nomius* MIAE01233>*A. nomius* LCP 3558 et *A. terreus* MIAE01220>*A. terreus* LCP 3662), la différence la plus marquée étant observée pour les souches d'*A. nomius*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les souches de *F. oxysporum* (Merlin *et al.* 2014). Toutefois, nous avons pu observer que l'historique d'exposition au CLD n'était pas le seul paramètre expliquant la réponse des isolats au CLD. En effet, la référence non exposée d'*A. flavus* (LCP3495) répond à l'exposition au CLD de la même manière que les souches isolées des sols contaminées. Ces résultats montrent que la croissance des souches d'*Aspergillus* isolées de l'andosol est non affectée (MIAE01259) ou améliorée (MIAE01233 et MIAE01220) par l'exposition à des doses croissantes de CLD confirmant leur tolérance à cet insecticide. Toutefois l'origine de cette tolérance reste incertaine ; elle pourrait résulter de l'historique d'exposition mais également de l'expression de la diversité génétique des isolats fongiques.

L'analyse radiorespirométrique des isolats d'*Aspergillus* dont on savait qu'ils n'utilisaient pas le CLD comme source de carbone (Merlin *et al.* 2014) a confirmé qu'ils ne présentaient pas de capacité de minéralisation de ¹⁴C-CLD étant donné qu'aucune formation de ¹⁴CO₂ ni même de ¹⁴C-métabolites n'a pu être détectée dans les cultures fongiques.

Les cinétiques et les isothermes de sorption du CLD sur la biomasse fongique morte de 8 souches (6 *Aspergillus* et 2 *Fusarium*) ont été comparées à celles obtenues avec du charbon actif. En une journée, environ 90% du ¹⁴C-CLD était sorbé sur la biomasse fongique tandis que la même quantité

était sorbée sur le charbon actif en 15 min. La valeur des paramètres de Freundlich estimée à partir des isothermes de sorption du CLD sur le charbon actif ($K_F=5,29.10^4 \text{ L.kg}^{-1}$; $n=2,39$) est plus élevée que celle obtenue avec les souches fongiques ($1,17.10^3 < K_F < 4,52.10^3 \text{ L.kg}^{-1}$; $1,21 < n < 1,79$). Ceci suggère que le charbon actif a un pouvoir sorbant supérieur à celui de la biomasse fongique. On observe également que la nature de la biomasse fongique affecte sa capacité de sorption, *A. terreus* MIAE01220 et *F. oxysporum* MIAE01197 présentant les paramètres de Freundlich les plus élevés, sans toutefois modifier après 24h d'incubation la quantité de CLD sorbée. Bien que le charbon actif présente un meilleur pouvoir sorbant, la possibilité d'utiliser la biomasse fongique morte comme biosorbant pour dépolluer les eaux est envisageable compte-tenu du coût élevé du charbon actif. En effet, la production de biomasse fongique à partir de déchets végétaux locaux permettrait la mise en place d'une filière d'économie circulaire permettant la production locale d'un biosorbant offrant une alternative intéressante au charbon actif pour approvisionner les usines de traitement des Antilles assurant la dépollution des eaux contaminées au CLD. Malheureusement, cette alternative ne résoudra pas la problématique de gestion des boues (charbon actif ou biomasse fongique contaminé avec le CLD) générées par le traitement des eaux polluées.

Chapitre 3

***Impact du CLD sur la structure, l'abondance
et l'activité de la communauté microbienne
des sols***

Article 4 : Impact du CLD sur les communautés microbiennes de sols non pré-exposées

Article accepté (avec révision mineure) dans la revue *Environmental Science and Pollution Research*

Introduction

Il est aujourd'hui admis que le CLD est transféré du sol vers les organismes qui le peuplent (animaux et végétaux) ainsi que vers le compartiment aqueux et son biote (algues, poissons, crustacés) posant ainsi la problématique de l'impact du CLD sur les organismes vivants. Le mode d'action du CLD n'est pas décrit précisément mais son caractère hydrophobe et lipophile (solubilité comprise entre 1 et 3 mg.L⁻¹ à pH7 et K_{ow} compris entre 4,5 et 5) lui confère une forte affinité pour les membranes biologiques expliquant pour partie sa toxicité (ATSDR 1995; Faroon *et al.* 1995; Bonvallot et Dor 2004). En effet, l'interaction du CLD avec les membranes biologiques cause des dysfonctionnements cellulaires (détérioration des protéines transmembranaires et rupture du gradient de protons entraînant la déstabilisation de l'homéostasie cellulaire) altérant les fonctions cellulaires de différents organes (foie, cerveau), du système nerveux central et du système reproducteur (Fujimori *et al.* 1982; Squibb et Tilson 1982; Linder *et al.* 1983; Desaiyah 1985; Herr *et al.* 1987; Swartz *et al.* 1988; Kodavanti *et al.* 1990; Kodavanti *et al.* 1993; Vaccari et Saba 1995). L'interaction du CLD avec les membranes biologiques étant un processus très conservé dans tous les règnes du vivant, il est probable que le CLD produise un effet toxique sur de nombreux organismes vivants. Cette hypothèse a récemment été vérifiée chez les végétaux, où le CLD provoque une cascade de signaux entraînant la mise en route du programme de mort cellulaire (Blondel *et al.* 2014). Bien que le CLD pollue près de 20 000 ha de sols agricoles aux Antilles où il a été appliqué pendant une vingtaine d'années, il n'existe pas à notre connaissance d'étude qui évalue l'impact de cet insecticide sur la communauté microbienne des sols qui supporte de nombreux services écosystémiques.

Dans ce contexte, j'ai mis en place une expérimentation visant à évaluer l'impact écotoxicologique du CLD sur la structure, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne. Pour mener à bien cette étude, j'ai fait le choix de travailler sur deux sols de la métropole présentant des propriétés physicochimiques contrastées et n'ayant jamais été traités avec le CLD. Ces sols ont été prélevés dans des prairies qui n'avaient pas reçu de pesticides au cours des dix dernières années. Pour chaque sol, des microcosmes ont été préparés et traités ou non avec du CLD (contrôle, dose agronomique et

10 fois la dose agronomique). Des échantillons de sol, prélevés à différents temps d'incubation (T0, T3, T7 et T32), ont été analysés par des techniques de (i) traçage isotopique permettant de décrire le devenir du ^{14}C -CLD dans les sols et de définir le scénario d'exposition de la communauté microbienne, de (ii) biologie moléculaire basées sur l'extraction des acides nucléiques du sol, permettant l'analyse de la structure et de l'abondance globale de la communauté bactérienne ainsi que l'analyse de la composition bactérienne, et de (iii) radiorespirométrie permettant l'évaluation de l'activité de dégradation de la communauté microbienne des sols (fonction filtre des sols).

Environmental Science and Pollution Research
Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance and function
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ESPR-D-15-00893R1	
Full Title:	Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance and function	
Article Type:	SI: EcoMicrobio	
Section/Category:	Research Article	
Keywords:	soil; organochlorine; chlordecone; microbial ecotoxicology	
Corresponding Author:	Fabrice Martin-Laurent FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:		
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Chloé Merlin, PhD	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Chloé Merlin, PhD	
	Marion Devers, PhD	
	Jérémie Beguet, Master	
	Baptiste Boggio	
	Nadine Rouard	
	Fabrice Martin-Laurent	
Order of Authors Secondary Information:		
Manuscript Region of Origin:	FRANCE	
Funding Information:	INRA, AIP Demichlord (INRA-11-AAP DEMICHLORD-01-01)	Dr Fabrice Martin-Laurent
Abstract:	<p>The insecticide chlordecone applied for decades in banana plantations currently contaminates 20,000 ha of arable land in the French West Indies. Although the impact of various pesticides on soil microorganisms has been studied, chlordecone toxicity to the soil microbial community has never been assessed. We investigated in two different soils (sandy loam and silty loam) exposed to different concentrations of CLD (D0, control; D1 and D10, 1- and 10-times the agronomical dose) over different periods of time (3, 7 and 32 days) i) the fate of chlordecone by measuring ¹⁴C-chlordecone mass balance, and ii) the impact of chlordecone on microbial community structure, abundance and function, using standardized methods (-A-RISA, taxon-specific qPCR, and ¹⁴C-compounds mineralizing activity). Mineralization of ¹⁴C-chlordecone was inferior below 1% of initial ¹⁴C-activity. Less than 2% of ¹⁴C-activity was retrieved from the water-soluble fraction, while most of it remained in the organic-solvent-extractable fraction (75 % of initial ¹⁴C-activity). Only 23 % of the remaining ¹⁴C-activity was measured in non extractable fraction. The fate of chlordecone significantly differed between the two soils. The soluble and non-extractable fractions were significantly higher in sandy loam soil than in silty loam soil. All the measured microbiological parameters allowed discriminating statistically the two soils and showed a variation over time. The genetic structure of the bacterial community remained insensitive to chlordecone exposure in silty loam soil. In response to chlordecone exposure the</p>	

	<p>abundance of Gram-negative bacterial groups (β-, γ-proteobacteria, Planctomycetes and Bacteroidetes) was significantly modified only in sandy loam soil. The mineralization of ^{14}C-sodium acetate and ^{14}C-2,4-D was insensitive to chlordecone exposure in silty loam soil. However mineralization of ^{14}C-sodium acetate was significantly reduced in soil microcosms of sandy loam soil exposed to chlordecone as compared to the control (D0). These data show that chlordecone exposure induced changes in microbial community taxonomic composition and function in one of the two soils, suggesting microbial toxicity of this organochlorine.</p>
<p>Response to Reviewers:</p>	<p>Response to reviewers' comments:</p> <p>Reviewer #2: The article supposes a new insight in the ecotoxicological impact of chlordecone on soil microbial community community. The soil response is different depending on the soils properties. Thus comparison of the response of these soils with other soils with different composition texture and historical exposure such as the andosol from FWI is difficult. Over all, if there is not a characterization of the clay fractions, organic matter and oxides and hydroxides contents. However, these properties are closely related to the soil response and must be taking into account not only by the amount of these soil components but by their nature. The statistic analysis of the data is enough to support the discussion. The numbers of references given in the manuscript is very abundant. In general, the manuscript is well organized and its quality is adequate to be published after several considerations.</p> <p>Response to general comments We thank the reviewer for its valuable comments. The aim of our study was to evaluate the short term impact of chlordecone on the microbial community of arable soils never exposed to this insecticide. We agree that this study cannot answer the question of possible impact of chlordecone on the microbial community of the soils of French West Indies historically contaminated with this organochlorine. Further studies need to be done to reach this objective.</p> <p>Specific comments: 1-The abstract is too long The abstract was shortened</p> <p>2-The authors selected for this study two soils located at different sampling site, Corcelles-lès-Cîteaux and Varenne-Saint-Germain. Instead of the location of the soils, I suggest to give a soil characteristic or to make reference to its textural class in the text of this manuscript, i.e. sandy loam soil or silty loam soil. According to reviewer suggestion's the reference to the different sampling sites was replaced its textural class. 'Samples were collected in April 2014 from a sandy loam soil (Varenne-Saint-Germain, France, N 46° 25' 35", E 4° 1' 35") and a silty loam soil (Corcelles-lès-Cîteaux, France (N 47° 10' 29", E 5° 4' 32")) cropped with grasslands and unexposed to pesticides.' In the text of the manuscript the sampling location was replaced by the textural class of the soil.</p> <p>3-Keywords: Insert some words such as, soil.... Two keywords were added in the list: soil, microbial ecotoxicology</p> <p>4-Introduction. Define the abbreviation "POP" in the text. The definition of the abbreviation POP was added as 'persistent organic pollutant'</p> <p>5-Material and methods. Change along the manuscript "g.kg-1" by "g kg-1" This was done thoroughly the manuscript.</p> <p>6-The discussion is also too long. I could be possible to summarize it by introducing some paragraphs in the material and method section. The discussion was shortened as explained below (responses to questions 7 and 8)</p> <p>7-Page 17, line 3, To monitor changes of ten bacteria..... This was done. The reference to Janssen 2006 was moved to Material and Methods and the text of the discussion modified as follows 'Monitoring of the taxonomic composition of microbial communities showed that Actinobacteria, Acidobacteria and Bacteroidetes co-dominated the total bacterial community of both sandy loam and silty loam soils'.</p>

	<p>8-Page 18, Line 10 , To further asses the impact..... This was also done. Part of the text was moved to the Material and methods and the text of the discussion was modified as follows. 'The impact of chlordecone on soil microorganisms activity was estimated by monitoring microbial degrading activity as a proxy for soil filter function. The two soils rapidly mineralized ¹⁴C-sodium acetate and ¹⁴C-2,4-D.'</p> <p>Figures</p> <p>9-The figure caption must be concise, try to avoid some detailed that are not necessaries. Such as "Analyses were performed at 3, 7 and 32 days after chlordecone spiking", etc.... Accordingly the figure captions were shortened.</p> <p>10-The quality of the figures (axes numbers and scale can be reduced to clarify the differences between soils and treatment dosages).Figure 4, the quality must be improved. This figure was modified accordingly.</p>
--	---

Manuscript

[Click here to download Manuscript: Article _ Impact of chlordecone on soil microbial community_REVISION.doc](#)
[Click here to view linked References](#)

Evaluation of the ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance and function

Chloé Merlin¹, Marion Devers¹, Jérémie Béguet¹, Baptiste Boggio¹, Nadine Rouard¹, Fabrice Martin-Laurent^{1,*}

¹ INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pôle Ecoldur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

*Corresponding author : F Martin-Laurent, INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pôle Ecoldur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France. Email : fabrice.martin@dijon.inra.fr

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2 The insecticide chlordecone applied for decades in banana plantations currently
3 contaminates 20,000 ha of arable land in the French West Indies. Although the impact of various
4 pesticides on soil microorganisms has been studied, chlordecone toxicity to the soil microbial
5 community has never been assessed. We investigated in two different soils (sandy loam and silty
6 loam) exposed to different concentrations of CLD (D0, control; D1 and D10, 1- and 10-times the
7 agronomical dose) over different periods of time (3, 7 and 32 days) i) the fate of chlordecone by
8 measuring ¹⁴C-chlordecone mass balance, and ii) the impact of chlordecone on microbial community
9 structure, abundance and function, using standardized methods (-A-RISA, taxon-specific qPCR, and
10 ¹⁴C-compounds mineralizing activity). Mineralization of ¹⁴C-chlordecone was inferior below 1% of
11 initial ¹⁴C-activity. Less than 2% of ¹⁴C-activity was retrieved from the water-soluble fraction, while
12 most of it remained in the organic-solvent-extractable fraction (75 % of initial ¹⁴C-activity). Only 23 %
13 of the remaining ¹⁴C-activity was measured in non extractable fraction. The fate of chlordecone
14 significantly differed between the two soils. The soluble and non-extractable fractions were
15 significantly higher in sandy loam soil than in silty loam soil. All the measured microbiological
16 parameters allowed discriminating statistically the two soils and showed a variation over time. The
17 genetic structure of the bacterial community remained insensitive to chlordecone exposure in silty
18 loam soil. In response to chlordecone exposure the abundance of Gram-negative bacterial groups (β -
19 , γ -proteobacteria, Planctomycetes and Bacteroidetes) was significantly modified only in sandy loam
20 soil. The mineralization of ¹⁴C-sodium acetate and ¹⁴C-2,4-D was insensitive to chlordecone exposure
21 in silty loam soil . However mineralization of ¹⁴C-sodium acetate was significantly reduced in soil
22 microcosms of sandy loam soil exposed to chlordecone as compared to the control (D0). These data
23 show that chlordecone exposure induced changes in microbial community taxonomic composition
24 and function in one of the two soils, suggesting microbial toxicity of this organochlorine.

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Keywords: soil, organochlorine, chlordecone, microbial ecotoxicology

1
2 **Introduction**
3

4 The cyclodiene insecticide chlordecone (CLD) (1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-
5 metheno-2Hcyclobuta[cd]pentalen-2-one) is one of the persistent organic pollutants (POPs) listed on
6 Annex A of the Stockholm convention. It was classified as a persistent organic pollutant (POP) in
7 2009, but unfortunately it had been used for two decades to control the development of the banana
8 weevil, *Cosmopolites sordidus*, in banana plantations of the French West Indies (FWI, Guadeloupe
9 and Martinique). Over that period (1972-1978 under the trademark Kepone®, and 1981-1993 under
10 the trademark Curlone®), approximately 300 tons of CLD were applied in banana plantations and
11 contaminated approximately 20,000 ha representing 25 % of agricultural soils in the FWI (Le Déaut and
12 Procaccia 2009). Soils of banana plantations directly exposed to this insecticide are contaminated
13 with CLD concentrations ranging between 0.1 and 37.4 mg kg⁻¹ (Cabidoche et al. 2009; Martin-
14 Laurent et al. 2014). In addition, although CLD displays high affinity for soil organic matter, its
15 residues leach from agricultural soils to water resources and pollute drinking water in the FWI, but
16 also contaminate aquatic biota, including fish and giant shrimp locally called ouassou (Coat et al.
17 2006; Coat et al. 2011). Moreover, due to its biomagnification potential, CLD can be transferred to
18 crops (tuber vegetables; cucurbits) and accumulate in poultry or cattle fed with CLD-contaminated
19 resources (Faroon et al. 1995; Le Déaut and Procaccia 2009; Robert 2011; Cabidoche and Lesueur-
20 Jannoyer 2012; Joindreuille et al. 2013; Joindreuille et al. 2014). Monitoring contamination revealed
21 the presence of CLD not only in soils, but also in rivers, springs, drinking water as well as in food crop
22 products such as tuber vegetables, cucurbits, food fishing products (shrimp, fish), and food breeding
23 products too (ducks, hens). Consequently, contamination of the environment and of the food chain
24 by CLD chronically exposes FWI populations, with consequences on human health such as higher
25 prevalence of prostate cancer in FWI populations exposed to CLD (Multigner et al. 2010), or delays in
26 cognitive, visual and motor development in young children exposed to CLD (Dallaire et al. 2012).

27 A number of studies about CLD toxicity assessment have been published, notably by US scientists at
28 the request of US Environmental Protection Agency after the Hopewell (Virginia, USA) incident in a
29 CLD-manufacturing plant of Allied Chemical group. Yet, little is known on the mode of action of this
30 insecticide. CLD toxicity is thought to mainly result from its hydrophobic nature (CLD solubility is 1 to
31 3 mg.L⁻¹ at pH7, and log K_{OW} is between 4.5 and 5), hence high affinity for the lipid bilayer of cell-
32 membranes (Faroon et al. 1995; Bonvallot and Dor 2004). Interaction of CLD with the lipid bilayer
33 disorganizes animal cell membranes. This in turn alters transmembrane proteins such as calcium-
34 dependent ATPases, and causes the proton gradient to break down (Desaiah 1981). Interaction with
35 cell membranes partly explains the action of CLD, which is known to alter cellular functions of the
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 central nervous system. In addition, low CLD concentrations interact with hormone receptors
2 (estrogenic receptors and other endocrine receptors) and induce a hormone-like effect that explains
3 CLD toxicity on animal reproduction (Fujimori et al. 1982; Squibb and Tilson 1982; Linder et al. 1983;
4 Desaiiah 1985; Swartz et al. 1988; Kodavanti et al. 1990; Kodavanti et al. 1993; Vaccari and Saba
5 1995). These studies were mainly carried out on animals. They reveal that the main mechanism
6 involved in CLD toxicity relies on its interaction with the lipid bilayer of the cell membrane of any
7 living organism, suggesting that CLD can be toxic to a wide range of organisms. This hypothesis was
8 recently verified on plants: CLD triggered a cascade of mechanisms, notably an increase in cytosolic
9 Ca^{2+} and caspase-3-like activity, causing cell cycle disruption and apoptosis (Blondel et al. 2014).
10 Although CLD contamination currently affects 20,000 ha of arable soils in the FWI and pesticides in
11 general are known to impact soil microorganisms in various ways, to our best knowledge only one
12 study has assessed the ecotoxicological impact of CLD on the soil microbial community to date
13 (Mercier et al. 2013). This study showed that three CLD-contaminated soils from FWI (andosol,
14 ferralsol and nitisol) had different bacterial community structures mainly attributable to soil
15 physicochemical properties, but could not be exclusively attributed to the CLD contamination level.
16 However, further studies are still needed to evaluate the ecotoxicological impact of CLD on the soil
17 microbial community and on supported ecosystemic functions.

18 Using a microcosm study, we investigated the impact of CLD on the soil microbial community, which
19 plays a pivotal role in soil ecosystemic services. We chose to work with two soils differing in their
20 physicochemical properties, which had not been exposed to chlordecone and to any pesticide for at
21 least ten years. Soil microcosms were exposed to different doses of CLD (D0, control; D1,
22 agronomical dose; D10, 10 times the agronomical dose) within the contamination range recorded in
23 the FWI. To define the scenario of exposure of the microbial community, we monitored the fate of
24 chlordecone in these two soils by establishing a mass-balance of ^{14}C -chlordecone. To monitor the
25 impact of CLD on soil microbial community genetic structure, abundance and function (degradation
26 capability) we applied a range of standardized methods with different resolution levels. Overall, this
27 approach provided a more accurate assessment of the ecotoxicity of this insecticide to the soil
28 microbial community.

29 **Materials and methods**

30 **Chemicals**

31 [^{12}C U]-Chlordecone Pestanal® (1,1a,3,3a,4,5,5a,5b,6-decachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-
32 cyclobuta[cd]pentalen-2-one) was purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany) (chemical
33 purity 99.7 %). [^{14}C U]-Chlordecone was purchased from Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) at a
34

1 specific activity of 1,443 MBq.mmol⁻¹ (radiochemical purity 99.9 %). CLD solubility ranged between 1
2 and 3 mg.L⁻¹ at ambient temperature (ATSDR 1995). [¹⁴C U]-2,4-D (analytical grade purity >99%,
3 specific activity 4,600 MBq.mmol⁻¹) was purchased from Sigma-Aldrich (France). [¹⁴C U]-sodium
4 acetate (radiochemical purity 98.9%, specific activity 1,924 MBq.mmol⁻¹) was kindly provided by CEA
5 (Commissariat à l'Énergie Atomique).
6
7
8

9 Soil sampling and soil physico-chemical properties

10
11 Samples were collected in April 2014 from a sandy loam soil (Varenne-Saint-Germain, France, N 46°
12 25' 35'', E 4° 1' 35'') and a silty loam soil (Corcelles-lès-Citeaux, France (N 47° 10' 29'', E 5° 4' 32'')
13 cropped with grasslands and unexposed to pesticides. Samples were collected in accordance with ISO
14 10381-6 recommendations (Soil quality-Sampling-Part 6: Guidance on the collection, handling and
15 storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory). Soil samples
16 were sieved to 4 mm and stored at 4°C until use. Soil physico-chemical properties were determined
17 by the Laboratory of Soil Analysis (INRA, Arras, France) following standardized procedures. They are
18 presented in Table 1. The sandy loam soil was rich in coarse sand (84.5 %), whereas the silty loam soil
19 was rich in silt and clay (54.9 and 21.1 %, respectively). The first was richer in organic C (2.87 %) and
20 organic matter (4.96 %) than the later (1.52 %, and 2.62 %, respectively).
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 Microcosm experiment

31
32 Each soil was submitted to three different treatments: in D1, chlordecone was prepared in
33 dichloromethane and applied at 3 mg kg⁻¹, a dose corresponding to 3 kg.ha⁻¹.yr⁻¹ in the field according
34 to Le Déaut and Procaccia (2009); in D10, chlordecone was prepared the same way, but applied at 30
35 mg kg⁻¹, i.e. ten times the agronomic dose; D0 was the control, with only dichloromethane added.
36 Each microcosm contained 80 g of soil dry weight equivalent. Under a laboratory hood, chlordecone
37 solution (D1 or D10) or dichloromethane (D0) was added to 8 g of soil. Dichloromethane was
38 evaporated, and then thoroughly mixed with the rest of the sample and added with sterilized water
39 to reach 60% of soil water-holding capacity. All microcosms were incubated in airtight jars at 20°C in
40 the dark. At each sampling date (3, 7 and 32 days of incubation), soil samples were collected from
41 each microcosm as follows: (i) 1 g of soil was kept at -20°C for DNA-based analyses (q-PCR and A-
42 RISA); (ii) 20 g of soil were directly used for biochemical analyses (radiorespirometry). For each
43 condition, microcosms were made in triplicate (n_{tot}=18). A second series of microcosms (10 g of soil
44 dry weight equivalent) was prepared as described above except that ¹⁴C₁₀-chlordecone was added as
45 a tracer (73.3 Bq.g⁻¹ and 126.6 Bq.g⁻¹ for the D1 and D10 treatments, respectively), to study the fate
46 of ¹⁴C-labelled chlordecone in the two soils.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fate of chlordecone in soil microcosms

We defined the scenario of exposure of soil microorganisms by monitoring the fate of ^{14}C -chlordecone in the two soils: we estimated the distribution of ^{14}C -residues in $^{14}\text{CO}_2$ resulting from ^{14}C -chlordecone mineralization in the water-soluble and extractable fractions as well as in the non-extractable ^{14}C -residue (NER).

The amount of $^{14}\text{CO}_2$ evolved from ^{14}C -chlordecone as a result of degradation by microorganisms was estimated by measuring radioactivity levels in NaOH traps by liquid scintillation as previously described (Merlin et al. 2014).

Water-soluble ^{14}C residues were quantified for each microcosm at each sampling time by suspending 10 g of soil (dry weigh equivalent) in 20 mL of distilled water in a clean glass flask shaken at 150 rpm for 24 h. Soil suspensions were then centrifuged in corex tubes at 5,000 x g for 5 minutes, and the supernatant was collected. ^{14}C -activity in 5 mL of supernatant mixed to 10 mL of Ready Safe™ cocktail (Beckman Coulter Inc., USA) was measured in a liquid scintillation counter (Beckman Coulter) for 5 minutes. The remaining supernatant was discarded, and soil samples were dried and kept for further analyses.

The extractable fraction of ^{14}C -residues was determined from soil samples after extraction of the water-soluble fraction. Each sample was added with 20 mL of methanol, thoroughly mixed and placed on a rotary shaker at 150 rpm for 24 hours. After centrifugation, the supernatant was recovered, and ^{14}C -activity was measured from 5-mL aliquots as described above. Soil samples were dried at ambient temperature under a chemical hood and kept for further analyses.

NER (the non-extractable fraction) was the fraction of ^{14}C -residues remaining in the soil after water and methanol extractions. It was obtained by combustion of 0.5 g of dried soil under O_2 flow at 900°C for 4 min, using a Biological Oxidiser OX-500 (EG&G Instruments, France) as previously described by El-Sebai et al. (2005).

Mass balance in ^{14}C -residues was calculated as a percentage of the total amount of ^{14}C radioactivity retrieved from the different fractions. Differences in ^{14}C -residue mass balances were analyzed by ANOVA (Tukey's test), using R 3.1.0 software.

Soil DNA extraction, purification and quantification

DNA was extracted from each soil microcosm at each sampling time according to the ISO 11063 method derived from the protocol initially reported by Martin-Laurent et al. (2001). Shortly, 250-mg aliquots of each soil were mixed with 1 mL of extraction buffer containing 0.1 M Tris (pH 8), 1 M EDTA (pH 8), 0.1 M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone and 2 % SDS, together with 0.5 g of acid-washed 106- μm diameter glass beads and two 2-mm glass beads. Then, samples were shaken for 30 s at

1,600 rpm in a mini-bead beater (Mikro-Dismembrator©, Sartorius AG, Germany) and incubated at 70°C for 15 minutes. After centrifugation at 14,000 x g for 1 min at 4°C, the supernatant was recovered. Proteins were removed by centrifugation at 14 000 x g for 10 min after sodium acetate precipitation. DNA was precipitated from the supernatant with ice-cold isopropanol (V/V), and washed twice with ice-cold 70% ethanol. DNA pellets were resuspended in 100 µL of molecular grade water, and purified through polyvinyl-polyrrolidone (PVPP, Sigma-Aldrich) and Sepharose 4B (Sigma-Aldrich) separation columns (Bio-Rad Micro-Spin chromatography columns).

Soil DNA was quantified using a Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies). Briefly, for each sample a 2-µL DNA aliquot was added with 100 µL of provided buffer and 0.5 µL of Picogreen® in a 96-well qPCR plate. DNA concentration was obtained by reading the plate in a Step One Plus™ thermocycler (Applied Biosystems). Purified DNA samples were stored at -20°C until use.

Inhibition test

The absence of PCR inhibitors was verified as previously described (Henry et al. 2006) by carrying out an SP6-T7 qPCR assay on DNA templates prepared by mixing water (control) or soil DNA extract with a known copy number of the plasmid pGEM®-T Easy vector (Promega, France). Ct values of the control were not significantly different from those of DNA extracts diluted at 0.1 ng.µl⁻¹, indicating no inhibition.

Abundance of the total group and of phylum-specific groups

The abundance levels of total bacteria, phylum-specific groups and crenarchaea were quantified by quantitative PCR (qPCR) targeting 16S rRNA sequences, as previously described (Petrić et al. 2011). Taxon-specific primer pairs were used to quantify *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, and *Archaea – Crenarchaeota* (Muyzer et al. 1993; Ochsenreiter et al. 2003; Fierer et al. 2005; Mühling et al. 2008; Philippot et al. 2009) known to represent up to 90 % of the soil bacterial community (Janssen 2006).. Each qPCR assay was conducted in a ViiA7™ thermocycler (Life Technologies) in a 15-µL final reaction volume containing: 1 x SYBR green PCR Master Mix (Absolute™ Sybr®Green Rox, Thermo Scientific, France), 0.25 µg of T4 gp 32 (MP Biomedicals, France), 2 µM of each primer (Table 2), 2 µL of sterilized ultrapure water, and 0,2 ng of soil DNA. qPCR runs were as follows: an initial denaturation step for 15 minutes at 95°C, then 35 cycles of 15 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at the appropriate temperature depending on the primer pair, 30 seconds elongation at 72°C, and 30 seconds data acquisition at 80°C, plus a melting curve stage with 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 78°C and 15 seconds at 95°C. For each

16S rRNA target, a specific standard curve was drawn using 10-times dilutions (10^7 to 10^2 copies) of appropriate cloned 16S rRNA standard. At least two non-template controls (NTC) were included in the qPCR assays. Melting curves were checked for qPCR amplification specificity. Differences in the abundance levels of microbial groups were analyzed by ANOVA (Tukey's test), using R 3.1.0 software.

2.5.4 Genetic structure of the total bacterial community

The genetic structure of the bacterial community was estimated by automated ribosomal intergenic spacer analysis (A-RISA). The intergenic space (IGS) located between the 16S rRNA and 23S rRNA genes of the bacterial operon was amplified with primers 1552F_IRD800 (5'- TCG GGC TGG ATC ACC TCC TT-3') and 132R (5'- GCC GGT TTC CCC ATT CGG-3'). Each PCR mix was prepared in a 25- μ L final volume containing 1 X Taq DNA polymerase buffer, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ g of T4 gp 32 (MP Biomedicals), 0.5 μ M of each primer, 3.75 U of Taq DNA polymerase (MP Biomedicals, France) and 1 to 2 ng of DNA. PCRs were performed in a thermocycler (PTC 200 gradient cyler, MJ Research, Waltham, Mass., USA) under the following conditions: 1 cycle at 94°C for 3 min, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C, and one final cycle of 7 min at 72°C. The quality of the PCR products was verified by 2%-agarose electrophoresis and quantified by comparing band intensity with the Smart Ladder (Eurogentec) and by using ImageQuant TL v.7.0 (GE Healthcare) software. PCR products were then diluted at 2.5 ng. μ L⁻¹ in a final volume of 5 μ L, and 1 μ L of loading dye (Li-Cor Biosciences) *per* sample was added. PCR products were denaturated at 92°C for 2 minutes, loaded on 3.7%-acrylamide gels (ScienceTec, Li-Cor Biosciences, USA) and run for 15 hours at 2500 V/80 W on a Li-Cor 4300 DNA Analysis System (ScienceTec, Li-Cor Biosciences, USA). A-RISA fingerprints were analyzed using 1D-Scan software (ScienceTec) to determine (i) the length of each fragment in bp as compared to a size marker made of 15 bands ranging between 207 and 1,149 bp, and (ii) the relative proportion of each fragment among total products. Data were converted into a table summarizing band presence and intensity using PrepRISA program (Ranjard et al. 2001). Then they were analyzed by non-metric multidimensional scaling (NMDS) using R 3.1.0 software, and differences were searched for by ANOSIM using Primer 5 software.

Mineralization of 2,4-D and sodium acetate by the soil microbial community

Microbial degrading activity was monitored as a proxy for soil filter function. The capacity of soil microorganisms to mineralize: i) ¹⁴C-sodium acetate, which is easily degradable and reflects the activity of the overall microbial biomass (used as a substrate in the modified Stürm test recommended by OECD 301 to test the impact of chemicals on soil respiration), and ii) ¹⁴C-2,4-D, which is degraded only by a subset of the overall microbial community, made of populations harboring the *tfd* degradation pathway (Soulas 1993), was monitored by radiorespirometry. 10 g of

soil sampled from the different microcosms at different times were independently treated either with ^{12}C -2,4-D at 1.5 mg kg^{-1} or with ^{12}C -sodium acetate at 2.2 mg kg^{-1} . ^{14}C -2,4-D (126.7 Bq.g^{-1}) and ^{14}C -ethyl acetate (103.3 Bq.g^{-1}) were added as radioactive tracers. $^{14}\text{CO}_2$ production was monitored throughout the incubation period (50 days) by liquid scintillation counting (Beckman Coulter Inc., USA).

Mineralization time-courses were fitted using SigmaPlot 4.0 software to the hyperbola model:

$$y = \frac{ax}{b+x} + cx$$

where y is the percentage of mineralization and x is time (days). Constants a , b and c were determined by the model for each mineralization curve.

The time required to reach 20% (t_{20}) of mineralization was determined according to the following equation:

$$t_{20} = \frac{-(a+bc-y) + \sqrt{(a+bc-y)^2 - 4c*(-yb)}}{2c}$$

where, a , b and c are constants known for each mineralization curve, and y is fixed at 20% mineralization.

The mineralization percentage reached after 50 days (A_{50}) was determined from experimental data.

The impact of chlordecone on the mineralization ability of the soil microbial community was estimated by comparing A_{50} s and by calculating t_{20} s. These parameters were validated by a Tukey's t test ($P < 0.05$).

Results

Fate of ^{14}C -Chlordecone in the sandy loam and silty loam soils

Regardless of the initially applied chlordecone dose or of sampling time, we retrieved similar amounts of ^{14}C -residues from the sandy loam ($70.64 \pm 13.37 \%$) and silty loam ($68.76 \pm 12.25 \%$). However, we retrieved significantly less ^{14}C -residues from the microcosms treated with the highest chlordecone dose (Tukey's test, $p < 0.05$) (sandy loam: D10, $63.12 \pm 7.49 \%$; D1, $78.7 \pm 14.02 \%$ ($p = 0.0125$); silty loam: D10, $62.35 \pm 12.48 \%$; D1, $75.18 \pm 8.39 \%$ ($p = 0.0234$)).

In both soils, less than 1% of initially added ^{14}C -chlordecone evolved to $^{14}\text{CO}_2$ (Figure 1, panel A). We recorded significantly higher mineralization levels in silty loam soil ($0.17 \pm 0.09 \%$) than in sandy loam soil ($0.09 \pm 0.07 \%$) (Tukey's test, $p < 0.01$) at all three sampling times. We found a significant dose effect in both soils at T32, and recorded the highest mineralization level at the lowest dose (D1) ($p < 0.01$). Time had no effect on chlordecone mineralization, except for D1 sandy loam soil in which a

1 significantly higher mineralization level was recorded at T32 than at the two other sampling times
2 (p<0.01).

3 The water-soluble fraction of ¹⁴C-chlordecone was low: it averaged 2% of initially added ¹⁴C-
4 chlordecone (Figure 1, panel B). This fraction was significantly higher in sandy loam soil (2.10 ± 0.54
5 %) than in silty loam soil (1.78 ± 0.48 %) (p<0.01). We retrieved significantly more ¹⁴C-residues from
6 each soil type at each sampling time in the soluble fraction of D10 soils than in that of D1 soils
7 (p<0.01). The amount of ¹⁴C-residues detected in the soluble fraction significantly decreased over
8 time (T32<T3 and T7) regardless of soil or dose.
9

10 Most of the ¹⁴C-residues were in the extractable fraction, which averaged 74.29 % of initially
11 added ¹⁴C-chlordecone (Figure 1, panel C). At T3, the amount of ¹⁴C-residues retrieved from the
12 extractable fraction of silty loam soil (80.98 ± 7.89 %) was significantly higher than that of sandy loam
13 soil (63.42 ± 3.03 %) (p>0.01). Statistical analyses did not reveal any significant differences in the
14 amount of extractable ¹⁴C-residues in response to dose or exposure time.
15

16 We retrieved a fairly large amount of initially added ¹⁴C-chlordecone (23.64% on average)
17 from the NER fraction (Figure 1, panel D). At T3, the amount of ¹⁴C-residues retrieved from the NER
18 fraction of sandy loam soil (34.22 ± 3.14 %) was significantly higher than that of silty loam soil (17.02
19 ± 8.16 %) (p<0.01). Statistical analyses did not reveal any significant differences in the amount of ¹⁴C-
20 residues detected in the NER fraction in response to dose or exposure time.
21

22 Impact of chlordecone on the abundance levels of the total bacterial community and on 11 phyla
23

24 We monitored the impact of chlordecone on total bacterial community abundance in the two soils
25 after 3, 7 and 32 days of exposure to this insecticide. Total 16S rRNA gene copy numbers ranged from
26 4.08 × 10⁵ to 9.35 × 10⁶ sequences *per* ng of DNA extracted from the different soil microcosms
27 (Figure 2). Although the two soils had different physicochemical properties (Table 1), the abundance
28 levels of their total bacterial community did not differ significantly, except at T32 when 16S rRNA
29 abundance was higher in sandy loam soil than in silty loam soil (p=0.0028). Total bacterial community
30 abundance was rather stable over the incubation period in the two soils, but we noted a significant
31 effect of time in sandy loam soil. In that soil, total bacterial community abundance was higher at T32
32 than at T3 and T7 (p=0,006). Interestingly, total bacterial community abundance in the control (D0)
33 soil did not differ significantly from abundance in the D1 and D10 chlordecone-exposed microcosms,
34 whatever the soil or the sampling time.
35

36 To get a better view of a possible impact of chlordecone on the soil microbial community, we
37 monitored the abundance levels of 11 phyla (*Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*,
38 *Crenarchaea*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, α-, β-, and γ-*Proteobacteria*,
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

1 *Verrucomicrobia*) in the two soils after 3, 7 and 32 days of exposure to the insecticide, using taxon-
2 specific genes. To minimize the possible bias related to the DNA extraction yield, we expressed qPCR
3 values for each phylum as a percentage of total microbial community abundance estimated by
4 summing up the abundance levels of the eleven phyla. All targeted phyla were successfully amplified
5 from all soil DNA extracts with good qPCR efficiency levels ranging between 82% and 107%, except
6 *Crenarchaea* (70%) (Figure 3). The bacterial community of the two soils was dominated by 3 phyla
7 (*Actinobacteria*, *Acidobacteria*, and *Bacteroidetes*) representing 23.41 ± 7.72 %, 31.40 ± 8.25 %, and
8 24.87 ± 11.17 % of the total bacterial community, respectively (Figure 3). Out of the 11 phyla we
9 targeted, 7 (α -, β -, and γ -*proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Crenarchaea*)
10 accounted for less than 8% of the total bacterial community, and *Crenarchaea* were the least
11 represented bacteria regardless of soil type, chlordecone treatment or sampling time. Whatever the
12 soil or the chlordecone treatment, the relative abundances of all the targeted phyla did not
13 significantly vary over time, except for β -*proteobacteria*. They were detected in higher abundance at
14 T3 than at T32 in sandy loam soil ($p=0.025$). Statistical analyses revealed that the relative abundance
15 levels of *Actinobacteria* ($p=0.008$), *Verrucomicrobia* ($p<10^{-16}$), α - ($p=0.0023$) and γ -*proteobacteria*
16 ($p=0.0303$) were significantly higher in sandy loam soil than in silty loam soil (supplementary file).
17 Moreover, the relative abundance levels of *Acidobacteria* ($p<10^{-5}$), *Gemmatimonadetes* ($p=0.006$),
18 *Planctomycetes* ($p=0.015$) and *Crenarchaea* ($p<10^{-16}$) were significantly lower in sandy loam soil than
19 in silty loam soil. Soil had no effect on the relative abundance levels of β -*proteobacteria*, *Firmicutes*
20 and *Bacteroidetes*. Chlordecone did not significantly affect the relative abundance of any of the 11
21 phyla in silty loam soil. Similarly, in sandy loam soil, the relative abundance levels of *Verrucomicrobia*,
22 *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, α -*Procteobacteria* and *Crenarchaea*
23 were not significantly affected by chlordecone. However, as compared to the control (D0), the
24 relative abundance of β -*proteobacteria* significantly decreased ($p=0.042$), while that of
25 *Planctomycetes* increased ($p=0.0043$) in D1. Chlordecone had a significant dose effect on a few phyla:
26 for instance, the relative abundance levels of β - and γ -*proteobacteria* were higher in D10 microcosms
27 than in D1 microcosms ($p=0,027$ and $p=0,039$, respectively), while the relative abundance level of
28 *Bacteroidetes* was lower in D10 microcosms than in D1 microcosms ($p=0,018$) (supplementary file).
29

30 Impact of chlordecone on the genetic structure of bacterial communities

31 We estimated the impact of chlordecone on the genetic structure of bacterial communities by A-RISA
32 fingerprinting carried out on DNA extracted from sandy loam and silty loam soils collected at T3, T7,
33 and T32. We obtained relatively complex A-RISA fingerprints made of 100 bands from all soil
34 samples. Visually, A-RISA fingerprints differentiated the two soils (data not shown). We converted
35 them into a matrix allowing pair-wise comparisons of phylotype numbers and relative intensity,
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 represented in an NMDS plan and statistically analyzed by ANOSIM (Figure 4). The ANOSIM
2 performed on the NMDS representation confirmed the visual observation of A-RISA fingerprints,
3 suggesting that the two soils harbored bacterial communities that differed in their genetic structure
4 (data not shown). In addition, as shown in Fig. 4, the genetic structure of each soil bacterial
5 community significantly diverged with time (ANOSIM, $p < 0.05$), regardless of the chlordecone
6 treatment. This was particularly obvious in sandy loam soil, for which T0, T3, T7 and T32 samples
7 were dispersed from the left to the right of NMDS-1 axis (Figure 4, panel A). This time-dependent
8 shift of the genetic structure of the bacterial community also occurred to a lesser extent in silty loam
9 soil (Figure 4, panel B). However, ANOSIM revealed that the genetic structure of the bacterial
10 community in the soil microcosms exposed to chlordecone treatment did not differ from that of the
11 control (D0), whatever the soil or the sampling time.

19 Impact of chlordecone on the mineralization of 2,4-D and sodium acetate

20 We assessed the impact of chlordecone on the activity of soil microorganisms by monitoring
21 mineralization of sodium acetate and 2,4-D by radiorespirometry in the two soils after 3, 7, and 32
22 days of exposure to the insecticide. Variability of the two parameters over time as deduced from
23 sodium acetate or 2,4-D mineralization kinetics (t_{20} , the time required to reach 20% of
24 mineralization, and A50, the maximum mineralization percentage reached after 50 days of
25 incubation) is shown in Figure 5. Microorganisms in sandy loam and silty loam soils were able to
26 mineralize sodium acetate. Mean A50 values reached 40.99 ± 2.76 and 47.86 ± 3.13 % of initially
27 added ^{14}C -sodium acetate, respectively (Fig. 5, panel A-1). Mineralization of this compound was
28 rapid: the time required to reach 20 % of its mineralization (t_{20}) averaged 2.31 ± 0.93 and 1.28 ± 0.35
29 days in the sandy loam and silty loam soils, respectively (Fig. 5, panel B-1). Statistical analysis
30 revealed that at T3 and T7, A50 values in silty loam soil were significantly higher than in sandy loam
31 soil, while t_{20} values in silty loam soil were lower than in sandy loam soil ($p < 0.05$). Sodium acetate
32 mineralization decreased over time in silty loam soil, while it increased in sandy loam soil. Statistical
33 analyses confirmed these observations : in silty loam soil, A50 values at T32 were significantly lower
34 than at T3 and T7, whereas in sandy loam soil, A50 values at T32 were significantly higher than at T3
35 ($p < 0.05$). In sandy loam soil, t_{20} was significantly lower at T32 than at T3 and T7 ($p < 0.05$).
36 Chlordecone treatment had no effect on the amount of sodium acetate mineralized after 50 days in
37 silty loam soil. However, at the highest dose (D10), chlordecone treatment significantly decreased
38 the amount of sodium acetate mineralized after 50 days (A50) as compared to D1 (agronomical dose
39 of chlordecone) and D0 (control) (at T3 and T32, $p < 0.05$) in sandy loam soil. In addition, chlordecone
40 at the highest dose (D10), significantly increased t_{20} values as compared to D0 at T3 ($p < 0.05$) in both
41 soils.

1 Microorganisms of sandy loam and silty loam soils were also able to mineralize 2,4-D. Average A50
2 values reached 46.55 ± 1.72 and 42.56 ± 1.16 % of initially added ^{14}C -2,4-D, respectively (Figure 5,
3 panel A-2). Mineralization was rapid: the time required to reach 20 % of ^{14}C -2,4-D mineralization (t20)
4 averaged 2.46 ± 0.44 and 3.86 ± 0.53 days in the sandy loam and silty loam soils, respectively (Figure
5 5, panel B-2). Statistical analysis revealed that at all sampling times, A50 values in sandy loam soil
6 were significantly higher than in silty loam soil, and t20 values in sandy loam soil were lower than in
7 silty loam soil ($p < 0.05$). In both soils, the amount of mineralized 2,4-D (A50) was stable over time
8 and insensitive to chlordecone. The time required to mineralize 20 % of initially added ^{14}C -2,4-D (t20)
9 significantly decreased over time (t20 higher at T3 and T7 than at T32, in both soils, $p < 0.05$), but it
10 was insensitive to chlordecone application.
11
12
13
14
15
16
17

18 Discussion

19 Fate of chlordecone in the soils

20
21 We estimated chlordecone distribution among the different compartments of the two soils by
22 establishing a mass balance of ^{14}C -residues deriving from initially applied ^{14}C -chlordecone. Mass
23 balances were similar in both soils but incomplete, with mean values of 70.64 ± 13.37 % and $68.76 \pm$
24 12.25 % of initially applied ^{14}C -chlordecone for sandy loam and silty loam soils, respectively. For both
25 soils, ^{14}C mass balances were significantly lower at D10 than at D1 but did not vary over time. In a
26 recent study carried out on Andosol microcosms spiked with ^{14}C -chlordecone, up to 93 ± 2 % of total
27 applied ^{14}C was recovered, and the total amount of ^{14}C -residues was stable throughout the 215-day
28 incubation period (Fernandez-Bayo et al. 2013a). Although the physicochemical properties of our two
29 soils strongly differed from those of an Andosol, the amount of ^{14}C -residues we recovered was in the
30 same range as in that Andosol. However, our experiment yielded higher standard deviations.
31 Different experimental conditions might explain this discrepancy, especially the amounts of ^{12}C - and
32 ^{14}C -chlordecone initially applied to the soil microcosms. These were much higher in the experiment
33 of Fernandez-Bayo et al. (2013a) than in ours (^{12}C -chlordecone: 0.178 (Andosol), 0.003 (D1) and 0.03
34 (D10) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; ^{14}C -chlordecone 15,983 (Andosol), 73.3 (D1) and 126.6 (D10) $\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$). Sorption of ^{14}C -
35 chlordecone to materials may explain this incomplete mass balance, even if we took care to avoid
36 plastics (Fernandez-Bayo et al. 2013a).
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 Chlordecone is known for its recalcitrance to microbial degradation (Cabidoche et al. 2009).
53 Accordingly, it was barely mineralized by the soil microflora of either soil (less than 0.5% of initially
54 added ^{14}C -chlordecone). This is an agreement with Fernandez-Bayo et al. (2013a), who showed that
55 even the microflora of a tropical soil exposed to chlordecone (up to 35 mg kg^{-1}) for decades was not
56 able to mineralize more than 5% of the initially added ^{14}C -chlordecone after 220 days of incubation
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 under laboratory conditions. These findings suggest that chlordecone-degrading microorganisms do
2 exist in historically exposed tropical soils, but their activity is probably restricted because of limiting
3 factors such as chlordecone bioavailability. Chlordecone is poorly soluble (between 1 and 3 mg.L⁻¹ in
4 water at pH 7 according to Faroon et al. (1995)) and displays high affinity for organic matter (Koc
5 values between 1,218 and 24,000 L.kg⁻¹ according to Fernandez-Bayo et al. (2013b), RAIS (2006) and
6 Cabidoche et al. (2009)), so it is poorly bioavailable to soil microorganisms. This was verified in the
7 sandy loam and silty loam soils, as only less than 3 % of initially applied ¹⁴C-chlordecone was
8 quantified in their soluble fraction. This is also in agreement with previous results showing that less
9 than 2% of chlordecone were found in the soluble fraction of an Andosol (Fernandez-Bayo et al.
10 2013a). Additionally, we found most of the ¹⁴C-residues (*i.e.* 74 % of the total amount of recovered
11 ¹⁴C-residues) in the extractable fractions of the two soils, as reported about the same Andosol where
12 it averaged 80% (Fernandez-Bayo et al. 2013a). In both our soils, non-extractable residues (NER)
13 were in fairly large amounts: they averaged 24 %, twice as much as in the Andosol. This was
14 unexpected because the Andosol was richer in organic matter (140 g kg⁻¹ according to Merlin et al.
15 (2014)) than our two soils (50 and 25 g kg⁻¹ in sandy loam and silty loam soils, respectively), so it
16 should have formed more NER. This discrepancy might be due to the smooth methanol extraction
17 applied to our samples as compared to Accelerated Solvent Extraction used by Fernandez-Bayo et al.
18 (2013a), which may have overestimated the NER fraction in our soils. However, as compared to many
19 other pesticides (see Barriuso et al. (2008) for a review), the amount of NER formed by chlordecone
20 was relatively small. This was probably due to the presence of electronegatively charged halogen
21 substituents that confer several pesticides steric hindrance and thus impede NER formation
22 (Scheunert and Korte 1985). Interestingly, we measured significantly more NER in sandy loam soil
23 than in silty loam soil at T3. The sandy loam soil was rich in organic matter, and therefore provided
24 numerous binding sites for chlordecone that has high affinity for organic matter. This favored rapid
25 NER formation and acted as a chlordecone sink. The clay-rich silty loam soil contained less organic
26 matter and had a more complex structure, less favorable to NER formation. Similarly, the complex
27 structure of allophane, a specific Andosol clay, was associated with low accessibility governing the
28 fate of chlordecone (Woignier et al. 2013). At the end of the incubation period, NERs were in similar
29 amounts in both soils. Therefore NER formation probably occurred progressively with time in the clay
30 soil, as a result of chlordecone slowly diffusing to soil micropores, as suggested for other pesticides
31 (Mamy and Barriuso 2007). Interestingly, at T3 the extractable and the mineralizable fractions of silty
32 loam soil were significantly higher than those of sandy loam soil, further reinforcing the hypotheses
33 expressed above.

34 Studying the fate of ¹⁴C-chlordecone in soil microcosms allowed us to determine the scenario of
35 exposure of soil microorganisms to chlordecone. Overall we can conclude that this scenario differed
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 between the two soils. It was time-dependent, and also dose-dependent to a lesser extent. At the
2 beginning of the incubation period (T3), we found significantly more ¹⁴C-residues in the
3 extractable/mineralizable fractions of silty loam soil than in those of sandy loam soil. Concomitantly,
4 we retrieved significantly lower amounts of ¹⁴C-residues from the soluble/NER fractions of silty loam
5 soil than from those of sandy loam soil. We clearly evidenced a dose effect characterized by
6 significantly higher amounts of ¹⁴C-residues in D10 soluble fractions than in D1 fractions at all
7 sampling times in silty loam soil, and at T7 and T32 sandy loam soil.
8
9
10
11
12
13

14 Estimation of the ecotoxicological impact of chlordecone

15 We estimated the impact of chlordecone on soil microbial communities with molecular tools based
16 on direct soil DNA extraction (A-RISA for bacterial community structure and qPCR for microbial
17 abundance) and biochemical tools (radiorespirometry for biodegradation ability). Insights into total
18 bacterial community structure assessed by A-RISA discriminated the two soils, which had different
19 physicochemical properties. This is in accordance with Dequiedt et al. (2009), who used A-RISA
20 profiles to reveal the variability of bacterial community structure among soils collected at a regional
21 scale or on a broader spatial scale (Fierer and Jackson 2009). In both our soils, the genetic structure
22 of the bacterial community as well as the abundance of the overall bacterial community estimated by
23 qPCR targeting 16S rRNA evolved over time whatever the treatment. Microcosm experiments are
24 often used to gain insight into microbial ecotoxicology of different toxicants. One of the hurdles that
25 we met in our experiments is the drift of bacterial community structure, abundance and activity over
26 time, even under controlled conditions. This can be due to a range of causes including nutrient
27 shortage, or the effect of soil sieving on the distribution of microbes in soil aggregates (Vos et al.
28 2013). This drift can generally be handled by comparing treated samples to corresponding control
29 samples at each sampling time, and by performing analysis of variance considering time and its
30 interaction with other parameters. By doing so, we found that neither genetic structure nor total
31 bacterial community abundance of our soils was affected by chlordecone treatment, even at the
32 highest dose (D10). Keeping in mind that fingerprinting approaches such as A-RISA, DGGE or T-RFLP
33 discriminate dominant phylotypes among the overall bacterial community (Niepceon et al. 2014),
34 we probably had only a partial view of the genetic structure of the bacterial community. Therefore
35 possible changes in rare phylotypes in response to chlordecone exposure might have gone
36 unnoticed. This flaw has already been suggested about estimations of the impact of s-triazine or
37 substituted urea pesticides, which remained unperceived when monitoring changes in total bacterial
38 community structure (Piutti et al. 2002; Hussain et al. 2013).
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 A-RISA gave us a first insight into the impact of chlordecone on bacterial community structure.
59 Monitoring of the taxonomic composition of microbial communities showed that *Actinobacteria*,
60
61
62
63
64
65

1 *Acidobacteria* and *Bacteroidetes* co-dominated the total bacterial community of both sandy loam and
2 silty loam soils. This is in agreement with a number of recent studies that found these three taxa
3 dominant in a range of other soils (Janssen 2006; Acosta-Martinez et al. 2008; Lauber et al. 2009;
4 Wessén et al. 2010; Petrić et al. 2011). Unlike bacterial community structure, which varied over time,
5 the abundance levels of the 11 microbial groups remained stable over time. In addition, the
6 taxonomic composition of the microbial communities discriminated the two soils and thus confirmed
7 the results of our bacterial community structure analysis. Exposure to chlordecone did not affect the
8 abundance of the 11 microbial groups in silty loam soil. However, it induced significant changes for
9 two groups (fewer β -*proteobacteria*, more *Planctomycetes*) in sandy loam soil. Moreover, the
10 relative abundance levels of a few groups were significantly affected by the chlordecone dose
11 ($D1 < D10$ for β - and γ -*proteobacteria*; $D1 > D10$ for *Bacteroidetes*). Interestingly, the taxonomic
12 composition of the bacterial community of the clay-rich silty loam soil, which contained less
13 chlordecone in the soluble and NER fractions than sandy loam soil, was not altered by chlordecone
14 exposure. Clay-rich soils are known to form a highly complex environment of aggregated particles
15 (Oades 1984), among which microaggregates made of clay particles and humus are key elements of
16 the soil structure (Vos et al. 2013). These microaggregates, into which chlordecone slowly diffuses
17 through micropores, provide a protected environment to microorganisms that can explain why the
18 taxonomic composition of the microbial community was not affected. Conversely, the taxonomic
19 composition of the bacterial community of the sandy loam, organic matter-rich soil, which contained
20 higher chlordecone amounts in its soluble and NER fractions than Corcelle-lès-Citeaux soil, was
21 altered by chlordecone exposure. In this type of soil, fewer microaggregates are formed, and
22 microorganisms are mainly associated with macroaggregates made of sand, silt and organic matter.
23 Organic matter is the sole nutrient source for microorganisms and acts as a chlordecone sink, as
24 shown by the rapid formation of NER in this soil. As organic matter can be easily assimilated by
25 microorganisms, chlordecone sorbed to organic matter can act as a vector for soil microorganism
26 exposure (Gourlay-Francé, 2010). Therefore, in Corcelle-lès-Citeaux soil, microorganisms were
27 exposed to chlordecone, and this might explain why the taxonomic composition of the microbial
28 community was altered. It is noteworthy that changes in the taxonomic composition of the bacterial
29 community in response to chlordecone exposure only affected a small number of microbial groups in
30 one of the two soils. The biological significance of the ecotoxicological impact of chlordecone
31 remains difficult to evaluate in the absence of a normal operating range (NOR) for our parameters,
32 required to assess resilience in response to various disturbances, including pesticide exposure
33 (Pereira e Silva et al. 2013).

34 The impact of chlordecone on soil microorganisms activity was estimated by monitoring microbial
35 degrading activity as a proxy for soil filter function. The two soils rapidly mineralized ¹⁴C-sodium
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 acetate and ¹⁴C-2,4-D. As observed for the other parameters, the two soils exhibited significantly
2 different mineralizing capabilities for the two substrates, which varied over time. While 2,4-D
3 mineralizing activity was not affected by chlordecone in either soil, sodium acetate mineralization
4 (A50) significantly decreased in sandy loam soil exposed to the highest chlordecone dose (D10) as
5 compared to the other two treatments (D0 and D1). These results confirm that chlordecone, even at
6 a high concentration, did not affect bacterial community genetic structure, taxonomic composition or
7 activity in silty loam soil. Conversely, chlordecone induced changes not only in the taxonomic
8 composition but also in the activity of the microbial community in sandy loam soil. However,
9 although these modifications lasted for at least 32 days in our soil microcosms maintained under
10 controlled conditions in laboratory, their biological significance is difficult to interpret in the absence
11 of NOR. To our best knowledge, even if chlordecone has extensively contaminated agricultural soils
12 of the FWI, this is the first study reporting an ecotoxicological impact of this insecticide on soil
13 microbial community composition and function. Further work will have to be done on a wider range
14 of soils differing in their physicochemical properties and on a range of microbial parameters to better
15 understand the ecotoxicological impact of chlordecone on soil living organisms and its consequences
16 on soil ecosystemic functions.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Conclusion**

31
32 The environmental fate of the persistent organochlorine chlordecone in soils and its toxicity to soil
33 microorganisms has scarcely been studied up to now. For the first time, this study i) characterizes the
34 fate of chlordecone in two temperate soils unexposed to CLD in the past, and ii) provides a
35 comprehensive estimation of the effect of chlordecone on soil microbial community structure,
36 taxonomic composition and function. It shows that soil physicochemical properties, especially
37 organic matter and clay content, are key parameters of chlordecone bioavailability and NER formation,
38 while the NER fraction is pivotal to exposure of soil microorganisms. Taxonomic composition and
39 microbial community mineralizing activity in the soil with the highest soluble and NER fractions were
40 both modified in response to chlordecone exposure under a realistic exposure scheme. This study
41 only examined the fate and impact of chlordecone in two temperate soils never exposed to
42 chlordecone before. Therefore further studies are required on FWI chlordecone-polluted soils
43 displaying specific biological and physicochemical properties to test if long-term exposure of soil
44 microorganisms to chlordecone can bring about microbial tolerance to this toxicant.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

1
2 Chloé Merlin's PhD work was funded by an ADEME/Région Bourgogne grant. This work was
3 supported by the 'Biodechlorde project' funded by the INRA AIP Demichlorde part of PNAC 1. This
4 paper pays homage to Yves-Marie Cabidoche, a brilliant INRA researcher who carried out precursor
5 work on chlordecone fate in the French West Indies and who convinced the authors to work on the
6 fate and toxicity of this persistent organochlorine. We would like to thank Annie Buchwalter for
7 editing English language.
8
9
10
11
12

Figure legends

13
14
15 **Figure 1.** Evolution of ¹⁴C-chlordecone mass balance in the sandy loam and silty loam soils. Quantified
16 ¹⁴C-residues (mineralized, soluble, extractable and non-extractable fractions presented in panels A, B,
17 C and D respectively) were expressed as a percentage of the overall ¹⁴C-residues retrieved in
18 microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) spiked with two different
19 concentrations of chlordecone (D1, the agronomic dose and D10, ten times the agronomic dose) and
20 analyzed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Data were subjected to
21 ANOVA test (Tukey's test, p<0.05). Significant dose effect is designated by different letters.
22
23

24
25
26 **Figure 2.** Estimation of the impact of chlordecone on the abundance of the total bacterial community
27 determined by qPCR. 16S rRNA copy number was quantified from DNA extracted from the soil
28 microcosms of each soil type (sandy loam and silty loam soils) spiked at three different doses (D0,
29 control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose) and analyzed after 3, 7 and 32 days of
30 exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Each value is the mean of three replicates ± standard
31 error. Data were subjected to ANOVA test (Tukey's test, p<0.01).
32
33

34
35
36 **Figure 3.** Estimation of the impact of chlordecone on the relative abundance of selected bacterial
37 taxa determined by qPCR carried out on DNA extracted from soil microcosms of each soil type (sandy
38 loam and silty loam soils) spiked at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten
39 times agronomic dose) and analyzed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and
40 T32). The relative abundance of each selected group was calculated as the ratio of the abundance of
41 a specific taxa over the sum of the abundances of all quantified taxa. Each value is the mean of three
42 replicates ± standard error. Data were subjected to ANOVA analysis (Tukey's test, p<0.01). * indicates
43 significant dose effect on the abundance of the microbial group.
44
45

46
47
48 **Figure 4.** Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) ordination of the A-RISA profiles revealing the
49 evolution of the bacterial genetic structure in the microcosms of sandy loam (panel A) and silty loam
50 (panel B) soils spiked at three different doses (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 agronomic dose). A-RISA analyses were performed after 3, 7 and 32 days of exposure to chlordecone
2 (T3, T7 and T32). Data were subjected to ANOSIM statistical test (ANOSIM, $p < 0.05$).
3

4 **Figure 5.** Impact of chlordecone on the parameters of mineralization kinetics of ^{14}C -sodium acetate
5 and ^{14}C -2,4-D by soil microorganisms. Percentages of mineralization reached at 50 days (A50) are
6 presented on panel A-1 for sodium acetate and A2 for 2,4-D; number of days required to reach 20%
7 mineralization (t20) is presented on panel B-1 for sodium acetate and B-2 for 2,4-D. Microcosms of
8 each soil type (sandy loam and silty loam soils) were spiked with chlordecone at three different doses
9 (D0, control; D1, agronomic dose; D10, ten times agronomic dose) and collected after 3, 7 and 32
10 days of exposure to chlordecone (T3, T7 and T32). Data were subjected to ANOVA statistical analysis
11 (Tukey's test, $p < 0.05$). Significant dose effect is indicated by different letters
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 **Compliance with ethical standards**

22
23 All authors agreed to be listed and have approved of the manuscript, its content and its submission
24 to Environmental Science and Pollution Research. It has not been submitted or published elsewhere,
25 whether partly or fully. All authors are in agreement with the ethical rules of ESPR.
26
27
28
29

30 **References**

- 31
32 Acosta-Martinez, V, Dowd, S, Sun, Y and Allen, V (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of
33 bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol*
34 *Biochem* 40:2762-2770
35
36 ATSDR (1995). Toxicological profile for mirex and chlordecone (Final Report), U.S. Department of
37 health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: 18 pages.
38
39 Barriuso, E, Benoit, P and Dubus, IG (2008) Formation of pesticide nonextractable (bound) residues in
40 soil: magnitude, controlling factors and reversibility. *Environment Science Technology*
41 42:1845-1854
42
43 Blondel, C, Melesana, M, San Miguela, A, Veyrenca, S, Meresseb, P, Pezetd, M, Reynauda, S and
44 Raveton, M (2014) Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of
45 organochlorines in *Zea mays* roots. *J Hazard Mater* 276:312-322
46
47 Bonvallot, N and Dor, F (2004). Insecticides organochlorés aux Antilles : identification des dangers et
48 valeurs toxicologiques de référence, Institut de Veille Sanitaire: 52 pages.
49
50 Cabidoche, YM, Achard, R, Cattan, P, Clermont-Dauphin, C, Massat, F and Sansoulet, J (2009) Long-
51 term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple
52 leaching model accounts for current residue. *Environ Pollut* 157(5):1697-1705
53
54 Cabidoche, YM and Lesueur-Jannoyer, M (2012) Contamination of harvested organs in root crops
55 grown on chlordecone-polluted soils. *Pedosphere* 22(4):562-571
56
57 Coat, S, Bocquéné, G and Godard, E (2006) Contamination of some aquatic species with the
58 organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. *Aquat Living Resour* 19(2):181-187
59
60 Coat, S, Monti, D, Legendre, P, Bouchon, C, Massat, F and Lepoint, G (2011) Organochlorine pollution
61 in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web accumulation. *Environ*
62 *Pollut* 159:1692-1701
63
64
65

- 1 Dallaire, R, Muckle, G, Rouget, F, Kadhel, P, Bataille, H, Guldner, L, Seurin, S, Chajes, V, Monfort, C,
2 Boucher, O, Thome, JP, Jacobson, SW, Multigner, L and Cordier, S (2012) Cognitive, visual,
3 and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordecone.
4 Environ Res 118:79-85
- 5 Dequiedt, S, Thioulouse, J, Jolivet, C, Saby, NPA, Lelievre, M, Maron, P-A, Martin, MP, Chemidlin
6 Prévost-Bouré, N, Toutain, B, Arrouays, D, Lemanceau, P and Ranjard, L (2009)
7 Biogeographical patterns of soil bacterial communities. Environmental Microbiology Reports
8 1 4:251-255
- 9 Desaiah, D (1981) Interaction of chlordecone with biological membranes. Journal of Toxicology and
10 Environmental Health, Part A Current Issues 8(5-6):719-730
- 11 Desaiah, D (1985) Chlordecone interaction with catecholamine binding and uptake in rat brain
12 synaptosomes. Neurotoxicology 6(1):159-165
- 13 El-Sebai, T, Lagacherie, B, Cooper, JF, Soulas, G and Martin-Laurent, F (2005) Enhanced isoproturon
14 mineralisation in a clay silt loam agricultural soil. Agronomy for Sustainable Development
15 25(2):271-277
- 16 Faroon, O, Kueberuwa, S, Smith, L and DeRosa, C (1995) ATSDR evaluation of health effects of
17 chemicals. II. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and
18 environmental fate. Toxicol Ind Health 11(6):1-203
- 19 Fernandez-Bayo, JD, Saison, C, Geniez, C, Voltz, M, Vereecken, H and Berns, AE (2013b) Sorption
20 characteristics of chlordecone and cadusafos in tropical agricultural soils. Current Organic
21 Chemistry 17(24):2976-2984
- 22 Fernandez-Bayo, JD, Saison, C, Voltz, M, Disko, U, Hofmann, D and Berns, AE (2013a) Chlordecone
23 fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions. Sci
24 Total Environ 463:395-403
- 25 Fierer, N, Jackson, JA, Vilgalys, R and Jackson, RB (2005) Assessment of soil microbial community
26 structure by use of taxon-specific quantitative PCR assay. Appl Environ Microbiol 71:4117-
27 4120
- 28 Fierer, N and Jackson, RB (2009) The diversity and biogeography of soil bacterial communities.
29 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103:626-631
- 30 Fujimori, K, Nabeshima, T, Ho, IK and Mehendale, HM (1982) Effect of oral administration of
31 chlordecone and mirex on brain biogenic amines in mice. Neurotoxicology 3(2):143-148
- 32 Henry, S, Bru, D, Stres, B, Hallet, S and Philippot, L (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene,
33 encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*,
34 *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Appl Environ Microbiol 72(8):5181-5189
- 35 Hussain, S, Devers-Lamrani, M, Spor, A, Rouard, N, Porcherot, M, Béguet, J and Martin-Laurent, F
36 (2013) Mapping field spatial distribution patterns of isoproturon-mineralizing activity over a
37 three-year winter wheat/rape seed/barley rotation. Chemosphere 90(10):2499-2511
- 38 Janssen, PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA
39 genes. Appl Environ Microbiol 72(3):1719-1728
- 40 Joindreville, C, Bouveret, C, Lesueur-Jannoyer, M, Rychen, G and Feidt, C (2013) Relative
41 bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in laying hens (*Gallus domesticus*).
42 Environmental Science and Pollution Research 20:292-299
- 43 Joindreville, C, Lavigne, A, Jurjan, S, Dalibard, C, Liabeuf, JM, Clostre, F and Lesueur-Jannoyer, M
44 (2014) Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West
45 Indies): A field. Sci Total Environ 493:336-341
- 46 Kodavanti, PR, Cameroun, JA, P.R., Y and Desaiah, D (1990) Effect of chlordecone (Kepone) on
47 calcium transport mechanisms in rat heart sarcoplasmic reticulum. Pharmacology and
48 Toxicology 67(3):227-234
- 49 Kodavanti, PR, Rao, VC and Mehendale, HM (1993) Loss of calcium homeostasis leads to progressive
50 phase of chlordecone-potentiated carbon tetrachloride hepatotoxicity. Toxicol Appl
51 Pharmacol 122:77-87
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Lauber, CL, Hamady, M, Knight, R and Fierer, N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH
2 as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl Environ*
3 *Microbiol* 75(15):5111-5120
- 4 Le Déaut, J-Y and Procaccia, C (2009). Impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux
5 Antilles : bilan et perspectives d'évolution, Sénat (rapport n°487) - Assemblée Nationale
6 (rapport n°1778): 223 pages.
- 7 Linder, RE, Scotti, TM, McElroy, WK, Laskey, JW, Strader, LF and Powell, K (1983) Spermotoxicity and
8 tissue accumulation of chlordecone (Kepone) in male rats. *J Toxicol Environ Health* 12:183-
9 192
- 10 Mamy, L and Barriuso, E (2007) Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. *Eur J*
11 *Soil Sci* 58:175-187
- 12 Martin-Laurent, F, Philippot, L, Hallet, S, R., C, Germon, J-C, Soulas, G and Catroux, G (2001) DNA
13 extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ*
14 *Microbiol* 67:2354-2359
- 15 Martin-Laurent, F, Sahnoun, MM, Merlin, C, Vollmer, G and Lübke, M (2014) Detection and
16 quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS
17 using the ¹³C₁₀-chlordecone stable isotope as a tracer. *Environmental Science and Pollution*
18 *Research* 21(7):4928-4933
- 19 Mercier, A, Dictor, M-C, Harris-Hellal, J, Breeze, D and Mouvet, C (2013) Distinct bacterial community
20 structure of 3 tropical volcanic soils from banana plantations contaminated with chlordecone
21 in Guadeloupe (French West Indies). *Chemosphere* 92(7):787-794
- 22 Merlin, C, Devers, M, Crouzet, O, Heraud, C, Steinberg, C, Mougou, C and Martin-Laurent, F (2014)
23 Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted
24 tropical volcanic soil in the French West Indies. *Environmental Science and Pollution*
25 *Research* 21(7):4914-4927
- 26 Mühling, M, Woolven-Allen, J, Murrell, JC and Joint, I (2008) Improved group-specific PCR primers for
27 denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial
28 communities. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 2:379-392
- 29 Multigner, L, Ndong, JR, Giusti, A, Romana, M, Delacroix-Maillard, H, Cordier, S, Jegou, B, Thome, JP
30 and Blanchet, P (2010) Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *Journal of Clinical*
31 *Oncology* 28(21):3457-3462
- 32 Muyzer, G, De Waal, EC and Uiterlinden, AG (1993) Profiling of complex microbial population by
33 denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified
34 genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
- 35 Niepceron, M, Beguet, J, Portet-Koltalo, F, Martin-Laurent, F, Quillet, L and Bodilis, J (2014) Low
36 impact of phenanthrene dissipation on the bacterial community in grassland soil.
37 *Environmental Science and Pollution Research* 21(4):2977-2987
- 38 Oades, JM (1984) Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for
39 management. *Plant Soil* 76:319-337
- 40 Ochsenreiter, T, Selezi, D, Quaiser, A, Bonch-Osmolovskaya, L and Schleper, C (2003) Diversity and
41 abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time
42 PCR. *Environmental Microbiology Reports* 1 5:787-797
- 43 Pereira e Silva, MC, Semenov, A, Schmitt, H, Dirk van Elsas, J and Falcão Salles, J (2013) Microbe-
44 mediating processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning.
45 *Soil Biol Biochem* 57:995-1002
- 46 Petrić, I, Bru, D, Udiković-Kolić, N, Hršak, D, Philippot, L and Martin-Laurent, F (2011) Evidence for
47 shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-
48 contaminated soil under bioremediation. *J Hazard Mater* 195:254-260
- 49 Philippot, L, Bru, D, Saby, N, Čuhel, J, Arrouays, D, Šimek, M and Hallin, S (2009) Spatial patterns of
50 bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial
51 tree. *Environ Microbiol* 11(12):3096-3104
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Piutti, S, Hallet, S, Rousseaux, S, Philippot, L, Soulas, G and Martin-Laurent, F (2002) Accelerated
2 mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biol Fertility Soils* 36(6):434-441
3 RAIS (2006). Toxicity and chemical-specific factors data base (Kepone), Risk Assessment Information
4 System.
5 Ranjard, L, Poly, F, Lata, JC, Mougél, C, Thioulouse, J and Nazaret, S (2001) Characterization of
6 bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis
7 fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* 67(10):4479-
8 4487
9 Robert, S (2011). Historique de la contamination de sédiments littoraux des Antilles françaises par la
10 chlordécone (ChloSed), Convention MAAP-Ifremer: 92 pages.
11 Scheunert, I and Korte, F (1985) Comparative laboratory and outdoor studies on the behavior of ¹⁴C-
12 labelled chlorinated benzenes in soil. *Contaminated Soil* 141-143
13 Soulas, G (1993) Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial
14 community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biol Biochem* 25(4):443-449
15 Squibb, RE and Tilson, HA (1982) Effects of gestational and perinatal exposure to chlordecone
16 (Kepone) on the neurobehavioral development of Fischer-344 rats. *Neurotoxicology* 3(2):17-
17 26
18 Swartz, WJ, Eroschenko, VP and Schutzmann, RL (1988) Ovulatory response of chlordecone (Kepone)-
19 exposed mice to exogenous gonadotropins. *Toxicol Appl Pharmacol* 51(2-3):147-153
20 Vaccari, A and Saba, P (1995) The tyramine-labelled vesicular transporter for dopamine: a putative
21 target of pesticides and neurotoxins. *European Journal of Pharmacology: Environmental*
22 *Toxicology and Pharmacology* 292(3):309-314
23 Vos, M, Wolf, AB, Jennings, SJ and Kowalchuk, GA (2013) Micro-scale determinants of bacterial
24 diversity in soil. *FEMS Microbiol Rev* 37(6):936-954
25 Wessén, E, Nyberg, K, Jansson, JK and Hallin, S (2010) Differential responses of bacterial and archaeal
26 at high taxonomical ranks to soil management. *Soil Biol Biochem* 42:1759-1765
27 Woignier, T, Fernandes, P, Soler, A, Clostre, F, Carles, C, Rangon, L and Lesueur-Jannoyer, M (2013)
28 Soil microstructure and organic matter: keys for chlordecone sequestration. *J Hazard Mater*
29 262:357-364
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

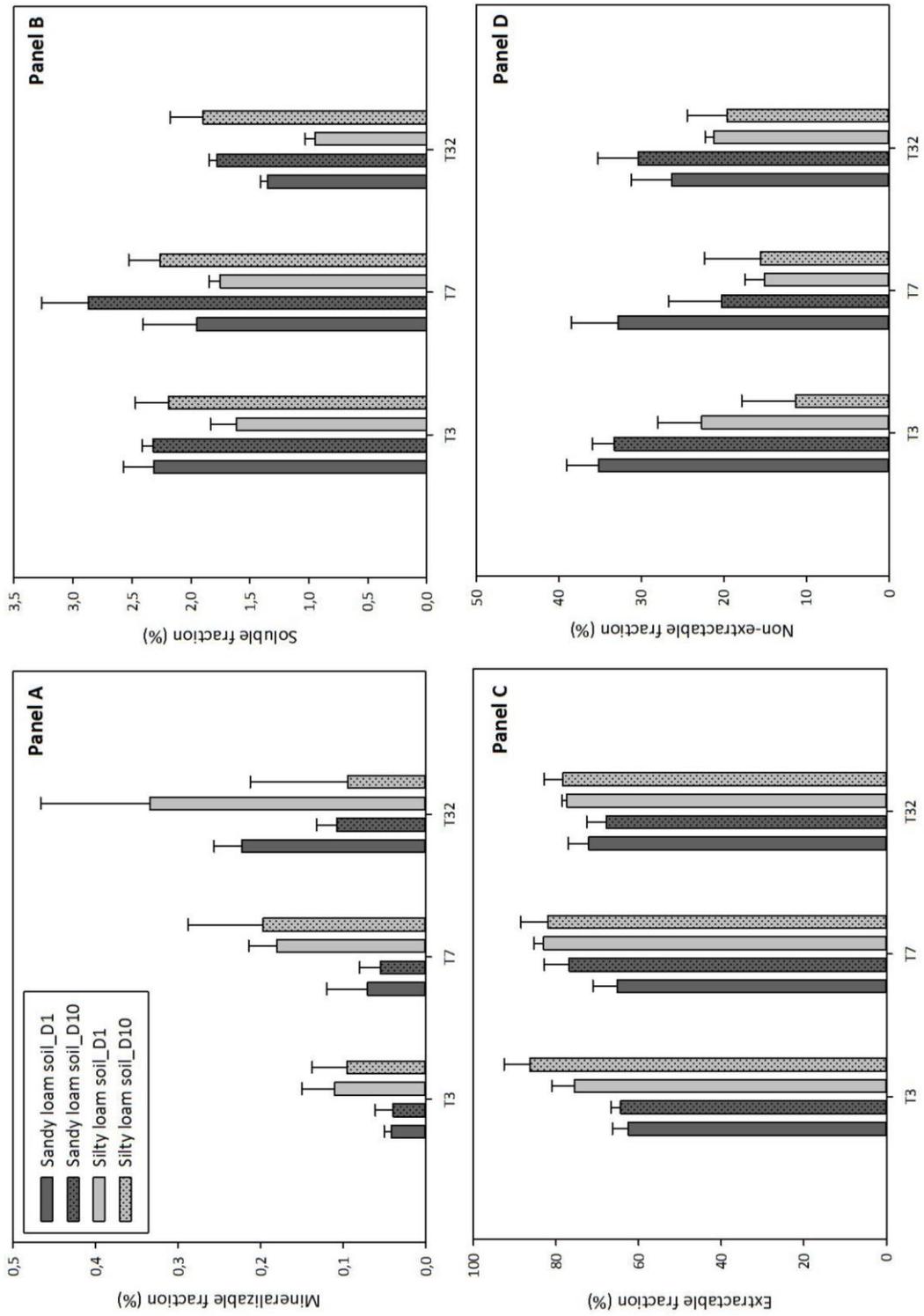


Figure 1

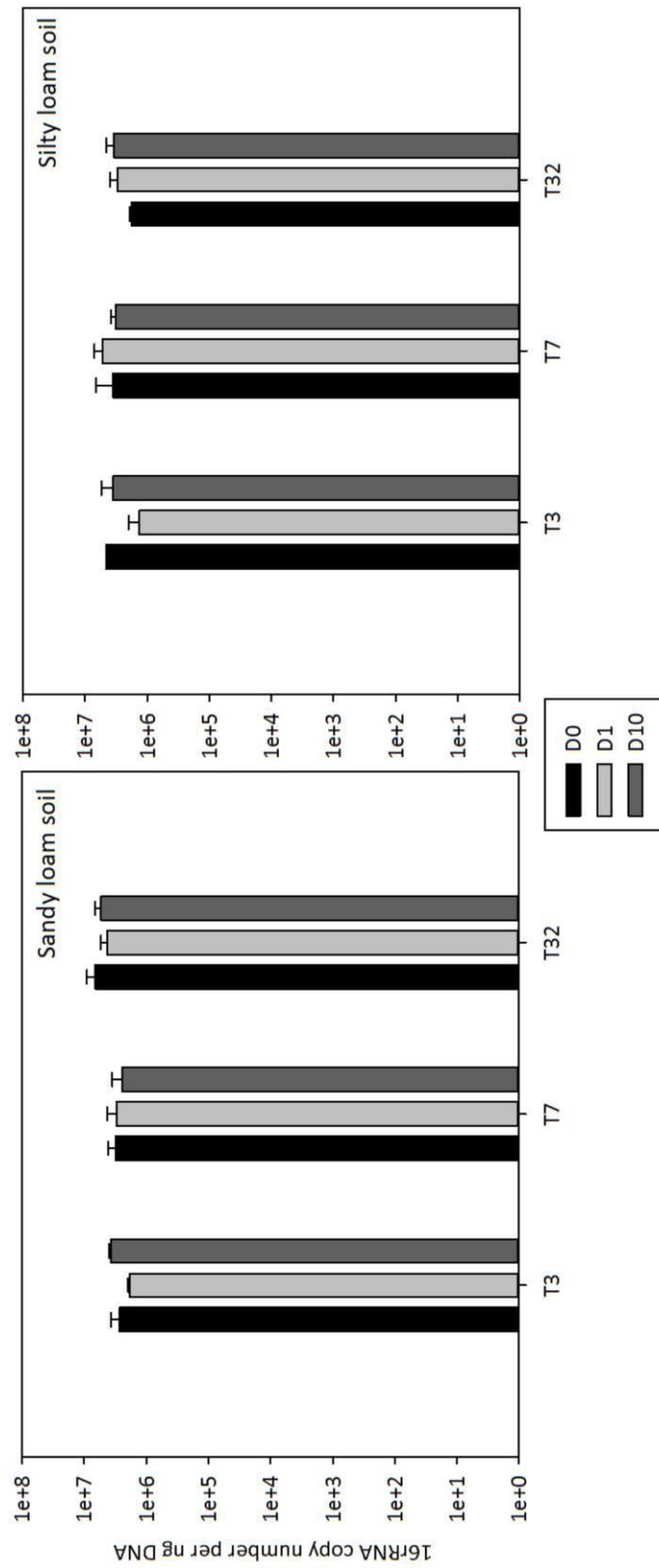
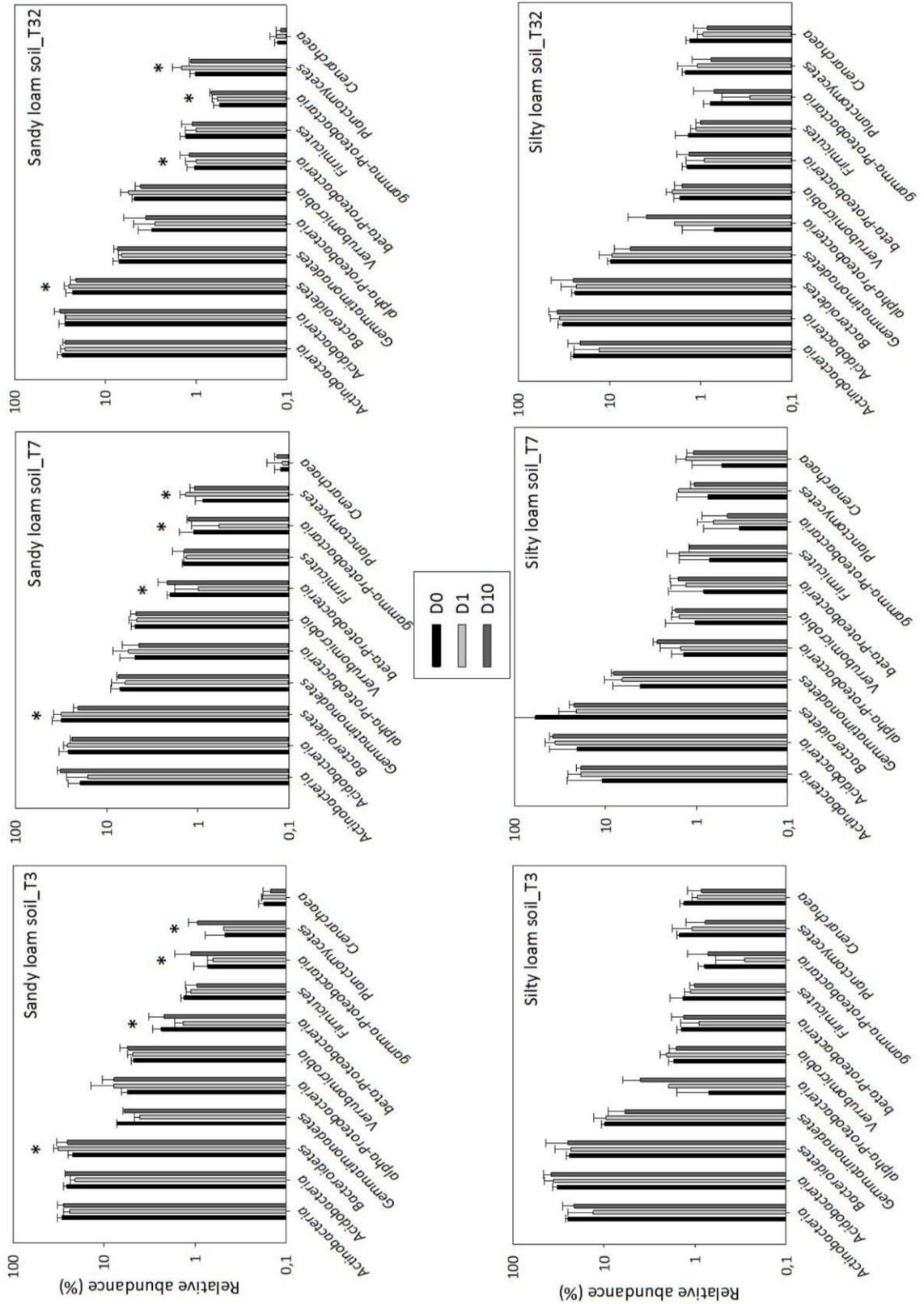


Figure 2

Figure 3



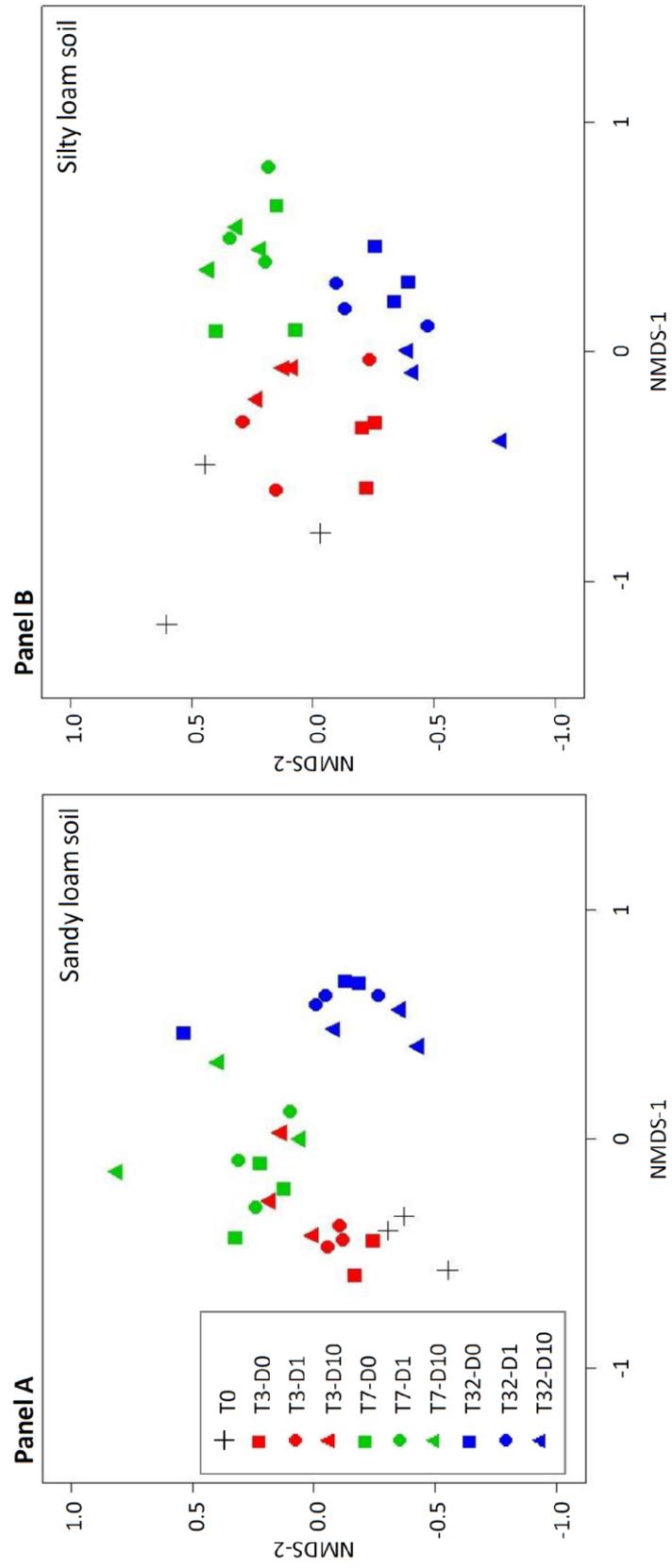


Figure 4

Figure 5

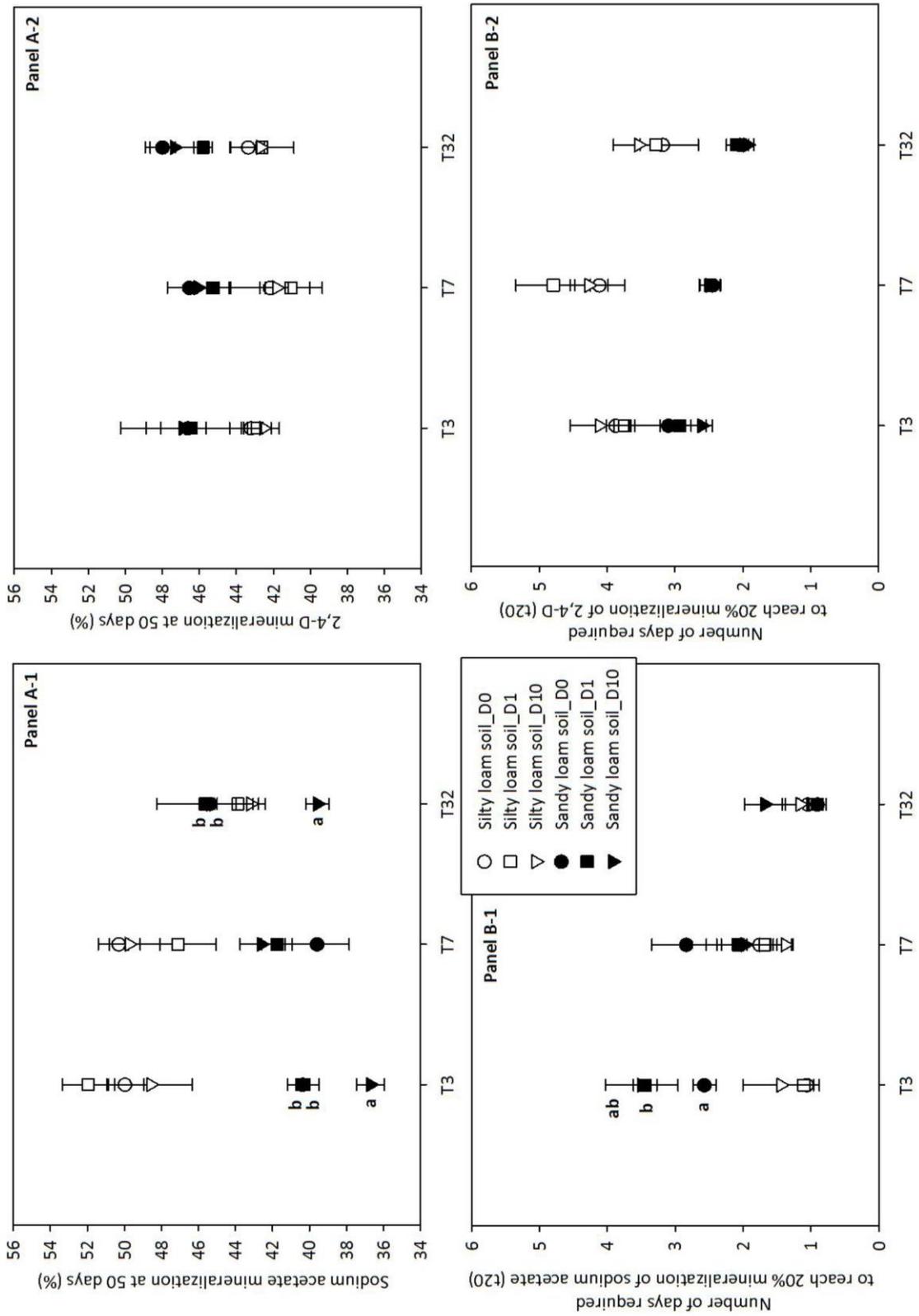


Table 1 Soil physicochemical properties

Sampling site	Varenne-Saint-Germain Horizon 0-20 cm Sandy loam soil	Corcelles-lès-Citeaux Horizon 0-20 cm Silty loam soil
Clay (<2µm, g.kg ⁻¹)	60	211
Fine silt (2/20µm, g.kg ⁻¹)	36	276
Coarse silt (20/50µm, g.kg ⁻¹)	24	273
Fine sand (50/100µm, g.kg ⁻¹)	31	118
Coarse sand (200/2,000µm, g.kg ⁻¹)	845	111
Organic C (g.kg ⁻¹)	28.7	15.2
Total N (g.kg ⁻¹)	1.89	1.3
C/N	15.2	11.7
Organic matter (g.kg ⁻¹)	49.6	26.2
pH water (a.u.*)	6.59	8.1
pH KCl (a.u.*)	5.62	7.51
CaCO ₃ (g.kg ⁻¹)	<1	11
P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹)	0.021	0.079
CEC Metson (cmol+.kg ⁻¹)	7.48	12

* a.u. means arbitrary unit.

Table 2 Description of taxa-specific primers used in the qPCR assays for each targeted taxonomic groups.

Taxonomic group	Primers	Annealing Tm	Reference
<i>Bacteria</i>	341F_5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' 534R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'	60°C	Muyzer et al. 1993
<i>Acidobacteria</i>	Acid31F_5'-GATCCTGGCTCAGAATC-3' Eub518R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	55°C	Fierer et al. 2005
<i>Actinobacteria</i>	Actino235F_5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTG-3' Eub518R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	60°C	Fierer et al. 2005
<i>α-proteobacteria</i>	Eub338F_5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' Alf685R_5'-TCTACGRATTTACCCTAC-3'	60°C	Fierer et al. 2005
<i>β-proteobacteria</i>	Eub338F_5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' Bet680R_5'-TCACTGCTACACGYG-3'	55°C	Fierer et al. 2005
<i>γ-proteobacteria</i>	Gamma395F_5'-CMATGCCGCGTGTGTGAA-3' Gamma 871R_5'-ACTCCCAGGCGGCTDACTTA-3'	56°C	Mühling et al. 2008
<i>Bacteroidetes</i>	Cfb319F_5'-GTACTGAGACACGGACCA-3' Eub518R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	60°C	Fierer et al. 2005
<i>Firmicutes</i>	Lgc353F_5'-GCAGTAGGGAATCTTCCG-3' Eub518R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	55°C	Fierer et al. 2005
<i>Gemmatimonadetes</i>	Gem440F_5'-TTCGGRKTGTAAACCACTGT-3' 534R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'	55°C	Philippot et al. 2009
<i>Verrucomicrobia</i>	Ver349F_5'-GYGGCASCAGKCGMGAAW-3' Eub518R_5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	60°C	Philippot et al. 2009
<i>Planctomycetes</i>	Plancto352F_5'-GGCTGCAGTCGAGRATCT-3' Plancto920R_5'-TGTGTGAGCCCCGTCAA-3'	60°C	Mühling et al. 2008
<i>Crenarchaea</i>	Cre771F_5'-ACGGTGAGGGATGAAAGCT-3' Cre975R_5'-CGGCGTTGACTCCAATTG-3'	55°C	Ochsenreiter et al. 2003

Conclusions

Deux sols non contaminés au CLD, l'un sableux et riche en matière organique (sol de Varenne-Saint-Germain), l'autre limono-argileux (sol de Corcelles-lès-Citeaux), ont été traités ou non par le CLD (D0, contrôle ; D1, dose agronomique ; D10, dix fois la dose agronomique). L'étude du devenir du CLD révèle que, quel que soit le sol considéré (i) la fraction de ^{14}C -CLD minéralisée est négligeable (<0,5%) confirmant la récalcitrance à la dégradation microbienne du CLD, (ii) la fraction soluble dans l'eau est faible avoisinant 2% du bilan de masse, (iii) la fraction extractible par le solvant organique est la plus importante (comprise entre 68 et 80%) et (iv) la fraction non-extractible (liée aux composants du sol) est relativement importante (comprise entre 18 à 30%). L'analyse du devenir du CLD suggère que le scénario d'exposition au CLD variait, le sol de Corcelles-lès-Citeaux présentant significativement plus de résidus de ^{14}C -CLD dans les fractions minéralisées et extractibles au solvant organique et moins de ^{14}C -CLD dans les fractions solubles dans l'eau et non extractibles que le sol de Varenne-Saint-Germain.

L'analyse de la structure globale de la communauté bactérienne (A-RISA) a permis de discriminer les deux sols et de montrer une dérive au cours du temps. Toutefois, quel que soit le sol considéré, le traitement avec le CLD ne modifie ni l'abondance totale (qPCR 16S rRNA) ni la structure génétique de la communauté bactérienne (A-RISA). La quantification de l'abondance de 11 groupes microbiens par PCR quantitative a montré que la composition de la communauté microbienne des deux sols étudiés était semblable à celle rapportée dans la littérature mais qu'elle divergeait toutefois de manière suffisante pour permettre de discriminer les deux sols. Nous avons pu mettre en évidence que la composition microbienne du sol de Corcelles-lès-Citeaux n'était pas été affectée par le traitement avec le CLD. Toutefois, celle du sol de Varenne-Saint-Germain était significativement modifiée par l'exposition au CLD. En effet, même si l'abondance de la plupart des groupes microbiens restait stable, celles des β -protéobactéries et *Planctomycetes* étaient significativement modifiées. De plus, un effet dose était observé pour β -, γ -protéobactéries et *Bacteroidetes*. Toutefois, la significativité biologique de ces modifications significatives du point de vue statistique reste difficile à interpréter en l'absence de valeur de référence (NOR, normal operating range).

Afin de comprendre plus précisément l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne, nous avons mesuré son activité de dégradation en utilisant deux substrats différents, l'un dégradé par la plupart des microorganismes (^{14}C -acétate de sodium) et l'autre permettant de cibler une population spécifique capable de dégrader le ^{14}C -2,4-D. Comme observé précédemment avec les indicateurs de biologie moléculaire, l'activité dégradante a permis de distinguer les deux sols. Nous avons pu montrer que le CLD n'affectait pas l'activité de dégradation du 2,4-D alors qu'a

priori cette fonction est portée par une communauté microbienne spécifique moins abondante et moins diverse que celle dégradant l'acétate de sodium. Toutefois, il est probable que la stabilité de l'activité de cette communauté résulte de la résistance des populations microbiennes dégradant le 2,4-D. De plus, nous avons mis en évidence que l'activité de minéralisation de l'acétate de sodium était significativement diminuée dans les microcosmes de sol de Varenne-Saint-Germain traités avec la plus forte dose en CLD.

L'ensemble de ces données indique que le traitement avec le CLD du sol argileux de Corcelles-lès-Citeaux n'affectait ni la structure, ni l'abondance, ni la composition, ni l'activité de la communauté microbienne. En revanche, le traitement avec le CLD du sol sableux et riche en matière organique de Varenne-Saint-Germain altérait la composition et l'activité de la communauté microbienne. La différence de la réponse de la communauté microbienne au CLD observée dans ces deux sols, résulte probablement du scénario d'exposition au CLD qui différait en raison de propriétés physicochimiques distinctes. A notre connaissance, cette étude rapporte pour la première fois l'effet écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne des sols.

PARTIE 3

Discussion générale et conclusion

Discussion générale

Le CLD est un insecticide organochloré très récalcitrant à la dégradation et classé POP selon la convention de Stockholm, dont l'usage sur une période 20 ans (1972-1993) en Guadeloupe et en Martinique pour lutter contre le développement du charançon noir du bananier, a conduit à la pollution généralisée des Antilles. Ainsi des résidus de CLD sont détectés dans les différents compartiments de l'environnement (sol, eau⁹⁸) et du biote (plantes, poissons, animaux, homme). Les propriétés physicochimiques du CLD (structure chimique stable, radicaux Cl, faible solubilité, hydrophobie, lipophilie) sont responsables de sa récalcitrance à la dégradation abiotique (photolyse, hydrolyse) et/ou biotique (dégradation microbienne, phytodégradation) et expliquent sa persistance dans les sols qui a été estimée à plusieurs centaines d'années dans le cas des sols volcaniques (andosol) des Antilles (Cabidoche *et al.* 2009). A ce jour, la lente dissipation du CLD des sols pollués des Antilles est expliquée uniquement par son transfert par ruissellement et/ou infiltration vers les ressources en eaux, et non pas par sa dégradation ou son transfert vers d'autres organismes vivants (plantes et animaux) (Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2012; Clostre et Lesueur-Jannoyer 2012; Joindreville *et al.* 2013; Joindreville *et al.* 2014). L'exportation du CLD depuis les sols agricoles vers les ressources en eau cause non seulement la dispersion de la pollution qui est maintenant détectée jusque dans les estuaires des Antilles, mais également l'exposition de la population Antillaise par différentes voies, notamment alimentaire (Le Déaut et Procaccia 2009). D'un problème agronomique consistant à traiter l'invasion des bananeraies avec le charançon, l'application répétée de CLD longtemps vu comme le remède miracle pour la filière bananière a causé un problème environnemental sévère qui est à l'origine d'un problème de santé majeure. En effet, toutes les dernières études menées dans les Antilles confirment l'exposition chronique de la population avec des répercussions avérées sur leur santé (Multigner *et al.* 2010; Dallaire *et al.* 2012). Face à cette situation environnementale et sanitaire critique, l'enjeu pour l'état français consiste à poursuivre l'état des lieux de la contamination des Antilles françaises par le CLD afin de proposer un plan d'action visant à atténuer l'exposition des populations et à diminuer le risque sanitaire. Les actions possibles pour atténuer l'exposition au CLD sont multiples, et l'une d'entre elles, située en amont, consiste à diminuer la persistance du CLD dans les sols et les sédiments par des procédés de remédiation chimique et/ou biologique. L'étendue de la contamination exclut *de facto* les technologies de remédiation classiques (procédés chimiques et thermiques) généralement employées pour traiter les sites et sols pollués. Dans ce contexte, l'atténuation naturelle reposant sur

⁹⁸ La contamination de l'air n'est pas démontrée.

différents procédés biologiques (bioremédiation microbienne et phytoremédiation) apparaît comme une solution appropriée au contexte antillais.

Dans cette perspective, le projet BIODÉCHLORD de l'APR Demichlord de l'INRA (inscrit comme une des actions du PNAC 2) visait à rechercher des traces de la dégradation du CLD dans les sols des Antilles. Mes travaux de thèse financés par l'ADEME et le Conseil Régional de Bourgogne, s'inscrivaient dans ce contexte et visaient à (i) estimer l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne du sol et (ii) explorer l'existence possible de la biodégradation en conditions aérobies du CLD dans les sols des Antilles en recherchant des populations microbiennes capables de l'altérer. L'hypothèse sur laquelle repose mes travaux est que, comme il a déjà été montré pour d'autres composés organochlorés récalcitrants à la biodégradation, l'exposition sur le long terme au CLD de la communauté microbienne a exercé une pression de sélection qui pourrait être favorable à l'émergence de populations microbiennes capables de le transformer afin de le détoxifier (voie co-métabolique) voir même de le minéraliser (voie métabolique) et de l'utiliser comme une source de carbone pour sa croissance et son développement (Fenner *et al.* 2013)). Bien que dans la littérature, la dégradation de composés organochlorés est décrite comme étant le résultat d'une déchlorination réductive catalysée par des monooxygénases du type cytochrome P450 en conditions anaérobies (Li and Wackett 1993) conduisant à la génération de métabolites moins chlorés et moins toxiques pouvant à leur tour être dégradés en conditions aérobies, j'ai travaillé sur des microorganismes cultivés en conditions aérobies. En effet, la tâche qui incombait à l'UMR Agroécologie était la recherche de microorganismes dégradant en conditions aérobies, la recherche de microorganismes dégradant en conditions anaérobies étant confiée aux équipes de D. Le Paslier (Génoscope, Evry) et du Pr. S. Vuilleumier (Université de Strasbourg). Par ailleurs, bien qu'ayant connaissance des limites liées à la cultivabilité des microorganismes (0,1 à 10 % des microorganismes cultivables), j'ai fait le choix d'appliquer un approche de microbiologie pasteurienne parce que d'une part nous recherchions des microorganismes pouvant être éventuellement utilisés à des fins de bioremédiation (bioaugmentation) et parce que d'autre part, dans le cadre du projet Biodechlord, les approches de génomiques sur les sols contaminés des Antilles étaient menées par les équipes de Pr T. Vogel (Ecole Centrale de Lyon) et W. Achouack (CEA Cadarache), pour partie sur des échantillons issus des enrichissements microbiens que j'ai mis en place dans ma thèse.

Un des défis qui était à relever concernait le dosage du CLD dans le sol et dans les cultures microbiennes. La littérature scientifique américaine rapporte plusieurs méthodes basées sur la séparation en chromatographie gazeuse (GC) équipée d'un détecteur ECD ou couplée à un spectromètre de masse (MS) d'extrait de sol ayant des seuils de détection compris entre 10 et 20 ppb de CLD (ATSDR 1995). Plus récemment, ces méthodes ont été revisitées en prenant en compte les

dernières évolutions (i) de la chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS, Frenich *et al.*, 2000; Bristeau *et al.* 2014) et (ii) de la chromatographie haute performance liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, Moriwaki *et al.* 2004) qui reste toutefois moins sensible que la GC-MS. Malgré ces innovations, l'une des difficultés majeures rencontrées par les scientifiques reste l'évaluation du rendement d'extraction du CLD du sol qui conditionne l'estimation de la concentration du polluant dans le sol. Les laboratoires de référence pour l'analyse du CLD dans les sols (LDA 26 et 972) estiment ce rendement d'extraction par des ajouts dosés de ^{12}C -CLD. Cette méthode est fastidieuse car elle doit être réalisée sur une gamme de concentration, pour chaque type de sol analysé. Dans ce contexte, nous avons développé une méthode reposant sur l'utilisation du ^{13}C -CLD comme traceur isotopique pour estimer le taux d'extraction du CLD des sols mais également pour le quantifier dans des extraits de sols sur la base du ratio isotopique ^{13}C -CLD/ ^{12}C -CLD par analyse conduite en GC-MS. Nous avons pu mettre en évidence une relation linéaire obtenue entre la quantité de ^{13}C -CLD et la quantité de ^{12}C -CLD présentes dans l'extrait de sol (estimée respectivement par l'aire des pics spécifiques des ions m/z 277 et m/z 272) suggérant qu'ils étaient extraits de la même manière. Dès lors, il est possible d'estimer le taux d'extraction du ^{12}C -CLD, en théorie identique à celui du ^{13}C -CLD, en calculant le ratio entre la teneur en ^{13}C -CLD de la solution standard et la teneur en ^{13}C -CLD dans l'extrait de sol. Ainsi calculé, le taux d'extraction est compris entre 16 et 26%, avec un coefficient de variation compris entre 2,7 et 26,4%. Ces résultats confirment qu'il est difficile d'extraire du sol le CLD qui présente de forte affinité pour la matière organique et pour les argiles (K_D et K_{OC} élevés). Les sols volcaniques des Antilles sont particulièrement riches en matière organique (jusqu'à 15% de carbone organique dans un andosol), riches en argiles (dont les allophanes dans les andosols : des argiles particulières qui présentent de larges infractuosités piégeant le CLD, Woignier *et al.* 2012) et sont ainsi connus pour retenir le CLD pendant plusieurs dizaines voire centaines d'années (Cabidoche *et al.* 2009). Etonnement, dans notre étude, le taux d'extraction du CLD évalué par l'ajout dosé du traceur isotopique, n'a pas pu être lié au type de sol et, au regard des informations disponibles dans la littérature, on aurait pu s'attendre à ce que le taux d'extraction du CLD soit plus faible pour l'andosol que pour le nitisol et le fluvisol. Il est probable que cela soit lié au fait que l'extraction a été réalisée assez rapidement après l'ajout du traceur isotopique sans lui laisser le temps de diffuser dans la porosité du sol. En effet, plusieurs études ont rapporté que le vieillissement d'un pesticide dans un sol diminue son extractabilité en raison de la formation en plus grande importance de résidus liés (Sharer *et al.* 2003). Quoiqu'il en soit, on mesure pleinement l'importance de l'estimation du rendement d'extraction qui permet de quantifier la concentration de CLD présent dans les sols à partir d'un extrait de sol.

La méthode de GC-MS que nous proposons présente une linéarité de 0,118 à 43 mg.kg⁻¹ suggérant l'applicabilité de la méthode à des niveaux de contamination environnementale. En effet, les teneurs de CLD quantifiées dans les sols des Antilles oscillent autour de 35 mg.kg⁻¹ pour les plus contaminés (Cabidoche *et al.* 2009). Par le biais de cette nouvelle méthode, nous avons quantifié respectivement 35,4 mg, 1,33 mg, 1,44 mg et 0,1 mg de CLD par kg de sol dans un andosol, un nitisol, un ferralsol et un fluvisol de la Guadeloupe. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par le LDA 26 (33,6, 1,61, 1,79 et 0,06 mg.kg⁻¹, respectivement). On notera que les coefficients de variations enregistrés avec notre méthode (de 2,38 à 16,8%) sont inférieurs à ceux communiqués par le LDA 26 (avoisinant 30%). Par ailleurs, notre méthode a également permis de détecter et quantifier le β -monohydro-CLD dans trois des quatre sols. Toutefois, en l'absence de standard analytique des différents métabolites du CLD (484 intermédiaires métaboliques selon Dolfig *et al.*, 2012), il n'est toujours pas possible de rechercher des traces de la transformation du CLD dans des matrices environnementales. Cela représente un frein aux recherches visant à mettre en évidence des processus de transformation du CLD, qui, le cas échéant, nécessitera la purification et la caractérisation par RMN de métabolite du CLD.

Dans un deuxième volet, nous nous sommes concentrés sur la question de l'évaluation de l'impact écotoxicologique du CLD sur les communautés microbiennes des sols. En effet, l'interaction du CLD avec les membranes biologiques étant un processus très conservé dans tous les règnes du vivant, causant des dysfonctionnements cellulaires expliquant la toxicité de cet insecticide, il est probable que le CLD produise un effet toxique sur de nombreux organismes vivants (Blondel *et al.* 2014). Bien que le CLD pollue près de 20 000 ha de sols agricoles aux Antilles, il n'existe pas d'étude décrivant l'impact de cet insecticide sur la communauté microbienne des sols et les conséquences engendrées sur les services écosystémiques qu'elle supporte. Dans ce contexte, nous avons suivi les recommandations émises par Martin-Laurent *et al.* (2013) en appliquant un bouquet de méthodes standardisées (ISO 11063 extraction directe des acides nucléiques du sol, ISO 17601 quantification de l'abondance de groupes microbiens, ISO14239 mesure de l'activité dégradante) pour évaluer l'impact écotoxicologique du CLD sur la structure, l'abondance et l'activité de la communauté microbienne. Nous avons mené cette étude sur des sols n'ayant jamais été exposés au CLD afin de s'assurer que les communautés microbiennes ne soient pas pré-adaptées au stress engendré par le CLD, puisque de nombreuses études rapportent l'acquisition de tolérance de la communauté microbienne (PICT, pollutant induced community tolerance) à différents pesticides (Blanck et Wängberg 1988; Nyström *et al.* 1999). De plus, nous avons choisi deux sols présentant des propriétés physicochimiques contrastées, l'un étant sableux et riche en matière organique (Varenne-Saint-Germain) et l'autre étant limono-argileux (Corcelles-lès-Citeaux), de manière à disposer de différents scénarii

d'exposition des communautés microbiennes au CLD. Cette hypothèse de travail semble confirmée par l'étude du devenir du CLD qui a montré que le sol de Corcelles-lès-Citeaux présentait significativement moins de ^{14}C -CLD dans les fractions solubles et non extractibles que le sol de Varenne-Saint-Germain. Notre étude montre que pour le sol de Corcelles-lès-Citeaux, le traitement avec le CLD n'affecte pas la structure, l'abondance, la composition et l'activité des communautés microbiennes. En revanche, pour le sol de Varenne-Saint-Germain, nous avons pu observer que la composition taxonomique et l'activité de minéralisation de l'acétate de sodium étaient modifiées par le traitement au CLD alors que tous les autres paramètres mesurés demeuraient stables. L'analyse de ces résultats montre toutefois que les modifications engendrées par le CLD, bien qu'elles soient significatives statistiquement, restent faibles. Ainsi la composition taxonomique de la communauté microbienne du sol Varennes-Saint-Germain variait significativement en réponse au CLD pour seulement 4 des 11 taxons quantifiés (β -, γ -protéobactéries, *Planctomycetes* et *Bacteroidetes*), l'abondance des 7 autres n'étant pas affectée. De plus, parmi ces taxons, trois sont faiblement représentés au sein de la communauté microbienne totale (1 à 3% de la communauté globale), seul *Bacteroidetes* étant un des trois taxons dominants. En gardant en tête que la structure génétique (évaluée par RISA) et l'abondance globale de la communauté bactérienne n'étaient pas atteintes par l'exposition au CLD, la signification biologique de la composition taxonomique de la communauté microbienne significative du point de vue statistique reste difficile à interpréter en l'absence de valeur de référence (NOR, normal operating range). Récemment, van Gestel (2012) soulignait que les écotoxicologues des sols manquaient cruellement de connaissances sur l'écologie des organismes qu'ils étudient et qui pourtant sont nécessaires pour définir des valeurs de références pour différents traits mesurés afin de comprendre et prédire l'effet de polluants sur les organismes vivants et les services écosystémiques qu'ils supportent. La même remarque s'applique à l'effet produit par le CLD sur l'activité microbienne d'autant que seule la minéralisation de l'acétate de sodium est perturbée avec la diminution transitoire de la vitesse de minéralisation appréciée par l'estimation du temps nécessaire pour atteindre 20% de minéralisation (diminution observée à T3 pour $t_{20_{\text{contrôle}}}=3,5$ jours ; $t_{20_{\text{D10}}}=2,5$ jours) et la diminution inférieure à 10% de la quantité d'acétate de sodium minéralisée après 50 jours comparativement au contrôle ($A_{50_{\text{contrôle}}}=39\%$ et 45% à T3 et T32 respectivement ; $A_{50_{\text{D10}}}=35\%$ et 39% à T3 et T32 respectivement). Par conséquent, l'effet du CLD même à la plus forte dose reste faible. Toutefois, l'acétate de sodium étant un composé dégradé par la plupart des microorganismes, l'OCDE recommande son utilisation comme substrat dans le test de Stürm modifié pour évaluer la biodégradabilité de composé organique (dont les pesticides) en mesurant la production de CO_2 (OCDE301B 2013). Bien que ce test ait été critiqué (Srinivasan et Viraraghavan 2000), notamment à propos des processus responsables de l'émission de CO_2 , notre observation suggère que l'activité respiratoire de la communauté microbienne du sol de Varenne-

Saint-Germain était diminuée suite à l'ajout de CLD. Cependant, la minéralisation du 2,4-D catalysée par des populations microbiennes génétiquement aptes formant une communauté *a priori* plus restreinte et moins diversifiée que la communauté globale, n'est pas perturbée par l'exposition au CLD. On peut supposer que la communauté dégradant le 2,4-D, un pesticide organochloré, est constituée de populations microbiennes plus résistantes au stress induit par un organochloré tel que le CLD que la communauté globale. Toutefois, cette hypothèse est difficile à soutenir car d'une part nous manquons de données estimant la résistance de la communauté microbienne dégradant le 2,4-D à différents organochlorés et d'autre part, la redondance fonctionnelle au sein de la communauté globale devrait permettre de recouvrir le stress induit par le CLD pour l'activité de minéralisation de l'acétate de sodium. Il est d'ailleurs probable que la résilience de l'impact du CLD observée dans le sol de Varenne-Saint-Germain n'a pas été observée dans notre étude en raison d'un pas de temps trop court (point final, T32).

Au final nous avons montré par l'application d'une approche pluridisciplinaire que le CLD semble avoir un impact nul ou faible sur les paramètres microbiens mesurés des sols de Corcelles-lès-Citeaux et de Varenne-Saint-Germain, respectivement. Toutefois, cette première étude ne nous permet pas d'affirmer que le fonctionnement des sols est intégralement maintenu, étant donné que la communauté microbienne n'a pas été décrite de manière exhaustive, et qu'elle n'est qu'un élément de la composante biologique des sols. Considérant le caractère toxique du CLD lié à son interaction avec les membranes biologiques, on peut se demander pourquoi le CLD semble perturber si peu la microflore tellurique ? Comment expliquer que les communautés microbiennes du sol de Varenne-Saint-Germain sont plus sensibles à l'exposition au CLD que celles du sol de Corcelles-les-Citeaux ?

Le sol étant un milieu complexe, on a coutume de penser qu'il constitue un milieu très tamponné présentant une grande inertie. Le corollaire de cette assumption est que la biodisponibilité d'un toxique, qui conditionne le scénario d'exposition des organismes vivants peuplant le sol, est un paramètre difficile à évaluer qui est grandement conditionné par les propriétés intrinsèques du polluant mais également par les propriétés physico-chimiques du sol. Ainsi selon les conditions pédoclimatiques, un polluant prendra des formes différentes dans le sol (libre, lié aux particules du sol) conditionnant sa biodisponibilité et sa toxicité (Gourlay-Francé *et al.* 2000). L'évaluation de la biodisponibilité d'un polluant est une question de recherche qui suit les évolutions des biotechnologies, mais la méthode la plus classique, que nous avons employé, pour évaluer la biodisponibilité d'un polluant est l'extraction séquentielle. Dans cette méthodologie, les termes de résidus libres et liés désignent, respectivement, des résidus pouvant être extraits du sol avec différents types d'extractants (CaCl₂, eau, méthanol) sans que leurs structures ne soient altérées, et des résidus liés aux particules de sol ne pouvant être arrachés par les extractions séquentielles (Gevao *et al.* 2000). Ainsi, la fraction libre, dite extractible, est communément considérée comme

potentiellement biodisponible. Dans notre étude de cas, la fraction libre résultait de l'extraction séquentielle à l'eau (fraction soluble) et au méthanol (fraction extractible) des échantillons de sols de Varenne-Saint-Germain et Corcelles-lès-Citeaux. Dans nos conditions expérimentales, la fraction soluble du ^{14}C -CLD était semblable dans les deux sols (environ 2% du bilan de masse) et similaire à celle observée par Fernandez-Bayo *et al.* (2013a) dans l'andosol, en accord avec la faible solubilité du CLD. En revanche, la fraction extractible obtenue du sol de Corcelles-lès-Citeaux est significativement supérieure à celle de Varenne-Saint-Germain (80% *versus* 68% du bilan de masse). Sur la base de cette observation, le scénario d'exposition de la communauté microbienne du sol de Corcelles-lès-Citeaux serait plus sévère que celui de Varenne-Saint-Germain, hors l'impact du CLD n'est observé que pour ce dernier. Par conséquent, l'estimation de la biodisponibilité d'une substance par extraction séquentielle est un proxy intéressant mais qui seul ne permet pas de conclure sur un impact écotoxicologique éventuel. Elle permet d'estimer un risque d'exposition mais elle ne permet pas de définir la fraction d'une substance « disponible pour l'action biologique » (Semple *et al.* 2004), et « susceptible d'exercer son action toxique sur les organismes vivants voire de s'accumuler dans l'édifice trophique » (Gourlay-Francé *et al.* 2010). En effet, le caractère toxique d'un polluant dépend non seulement de sa biodisponibilité mais également de son interaction (colocalisation) avec l'organisme. L'interaction organisme-polluant peut être estimée par la réponse biologique (bioaccumulation, toxicité, dégradation, minéralisation) et ainsi renseigner sur la biodisponibilité « effective » de la substance (Gourlay-Francé *et al.* 2010). Obtenir une image de l'accessibilité d'une substance (biodisponibilité « potentielle ») la plus proche possible de la réalité reste une tâche difficile compte-tenu de la complexité des interactions sol-contaminants-organismes. Gevao *et al.* (2000) rappellent que les interactions sol-contaminant sont des mécanismes dynamiques et que la distinction entre résidus libres et résidus liés n'est pas si évidente : les résidus libres ou extractibles ne sont pas totalement libres de toutes formes de liaisons, et peuvent, à un instant donné, être sorbés sur des particules de sol réduisant ainsi leur biodisponibilité ; inversement, selon la nature des liaisons, un résidu lié peut être à tout moment libéré. La force des liaisons conditionne en effet la part de substances extractibles par méthodes chimiques : les liaisons covalentes, plus stables que des liaisons non-covalentes (force de van der Waals), augmentent la persistance des résidus dans le sol (Gevao *et al.* 2000). La rétention du CLD dans les sols est régie d'une part par son piégeage par les argiles, mais également par une interaction chimique, donc *a priori* stable, avec le carbone organique du sol (Cabidoche *et al.* 2006b; Cabidoche *et al.* 2009; Fernandes *et al.* 2010; Cabidoche et Lesueur-Jannoyer 2011; Woignier *et al.* 2012). Ainsi, ce facteur pris en compte, on peut suggérer que la teneur en matière organique, plus importante dans le sol de Varenne-Saint-Germain, expliquerait la difficulté à en extraire le CLD et donc le bilan de masse réduit. De manière générale, les matières organiques ont une grande capacité d'adsorption des contaminants organiques hydrophobes, les

rendant alors *a priori* moins biodisponibles et pouvant ainsi jouer un rôle protecteur pour les organismes du sol (Gourlay-Francé *et al.* 2010; Akkanen *et al.* 2012). Toutefois, si la matière organique peut être facilement assimilée par les organismes vivants, alors sa capacité à fixer les contaminants, dans notre cas, le CLD, deviendrait au contraire un vecteur de biodisponibilité et non une protection (Gourlay-Francé *et al.* 2010). Ainsi, on peut suggérer que cette même matière organique qui retient chimiquement le CLD et le rend difficile à extraire, constituerait un lieu d'interaction entre le CLD et les microorganismes expliquant pourquoi la communauté microbienne du sol de Varenne-Saint-Germain aurait été impacté. *A contrario*, on peut suggérer que dans le sol de Corcelles-lès-Citeaux, les microorganismes auraient été protégés par le complexe argilo-humique.

Un autre volet de l'évaluation de l'impact du CLD sur la communauté microbienne a consisté à évaluer la possible adaptation à la biodégradation de cet insecticide dans les sols contaminés des Antilles. Pour mener à bien cette étude nous avons développé une stratégie basée sur la mise en place de cultures d'enrichissement à partir de sols contaminés de Guadeloupe dont l'objectif était de favoriser la croissance de micro-organismes adaptés au CLD pour les isoler et étudier leur tolérance et leur potentiel de dégradation.

En appliquant cette approche, j'ai pu isoler plus de 100 souches fongiques et 200 souches bactériennes capables de se développer sur un milieu gélosé additionné de CLD. Les résultats obtenus sur les souches bactériennes n'ont pas été présentés dans ce manuscrit car ils n'étaient à ce stade pas suffisamment consistants pour être valorisés sous forme d'une publication scientifique. J'ai toutefois identifié une dizaine de souches bactériennes pour la plupart affiliées au genre *Hyphomicrobium* capables de former sur milieu gélosé un halo de dissipation du CLD. Malgré l'application de diverses méthodes pour évaluer le potentiel de dégradation des isolats microbiens (GC-MS, radiorespirométrie, détection des ions Cl⁻ en HPLC), je n'ai pas pu mettre en évidence de façon certaine la dégradation du CLD. En effet, même si j'ai pu observer des traces d'ions chlorure dans les cultures bactériennes, je n'ai pas pu observer ni l'accumulation de métabolites du CLD en GC-MS, ni le dégagement de ¹⁴CO₂ en radiorespirométrie, ni même détecter de ¹⁴C-métabolites en CCM. Ces observations sont frustrantes car bien que nous ayons pu observer des souches formant un halo de dissipation du CLD (technique couramment employée pour isolés des microorganismes dégradant différents pesticides (Udiković-Kolić *et al.* 2012)), nous n'avons pas pu prouver qu'ils transformaient le CLD probablement en raison de difficultés analytiques nous permettant de rechercher des métabolites du CLD ou de quantifier à l'état de traces des ions Cl⁻ dans le milieu de culture. Il est également possible que ces isolats ne le dégradent pas mais le solubilisent et le transforment en un composé biogénique non-extractible comme le suggérait récemment Kästner *et al.* (2014).

Cette possibilité n'a pas été explorée au cours de ma thèse faute de temps et en raison de freins méthodologiques, et nous avons concentré notre attention sur les isolats fongiques et notamment, *Fusarium oxysporum* MIAE01197, qui était le seul isolat capable de croître (atteignant une densité optique à 600 nm de 0,5 UA) sur un milieu minéral additionné de CLD comme seule source de carbone. Par ailleurs, cet isolat était capable de dissiper 40% de la quantité initiale de CLD sans que des métabolites puissent être détectés. L'analyse radiorespirométrique montre qu'en présence de glucose, MIAE01197 est capable de minéraliser faiblement le CLD (1,2% de la quantité initialement apportée), suggérant une dégradation de type co-métabolique. L'analyse en CCM des résidus de ¹⁴C-CLD en fin d'expérimentation a permis de mettre en évidence de spots radioactifs de très faible intensité pouvant être des ¹⁴C-métabolites, mais le ¹⁴C-CLD restait le spot majoritaire. Nous avons montré par des expériences de sorption réalisées avec du ¹⁴C-CLD que la dissipation observée en GC-MS était principalement le fait de la sorption du CLD sur la biomasse fongique. Ces résultats sont contradictoires car bien que MIAE01197 soit capable de croître sur le CLD comme seule source de carbone, il ne le minéralise que très faiblement et en présence de glucose, il ne forme que très peu de métabolites. Une possibilité est que MIAE01197 se serait développé sur une impureté contenue dans le CLD mais cela reste peu probable car le CLD (pureté 99,7%) était apporté à faible concentration (3 mg.L⁻¹). Malgré tout, la croissance de MIAE01197 avec CLD comme unique source de carbone a été obtenue lors de deux expériences indépendantes (ayant 5 répétitions chacune) et un faible dégagement de ¹⁴CO₂ a été enregistré laissant à penser que *Fusarium oxysporum* MIAE01197 est capable de transformer faiblement le CLD.

Initialement, nous avons fait le choix de conduire des enrichissements, de suivre par GC-MS la dissipation du CLD au cours des enrichissements et d'isoler des souches pures capables de croître sur un milieu gélosé additionné de CLD. Ce faisant, nous avons éliminé les interactions biotiques pouvant exister entre les différentes populations formant la communauté sélectionnée au cours de l'enrichissement par la pression de sélection exercée par le CLD. En effet, même si de nombreuses souches pures sont capables de dégrader différents pesticides (*Pseudomonas* sp. ADP l'atrazine (Mandelbaum *et al.* 1995), *Pseudonocardia* sp. KSF27 la dieldrine et l'heptachlor (Sakakibara *et al.* 2011), *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* et *Cladosporium oxysporum* l'endosulfan (Mukherjee et Mittal 2005; Bhalerao et Puranik 2007)), des consortia microbiens développant des relations de coopération métabolique ont été caractérisés pour dégrader différents xénobiotiques (2,4-D (Marrón-Montiel *et al.* 2006), atrazine (Smith *et al.* 2005; Kolić *et al.* 2007), lindane (Pesce et Wunderlin 2004; Murthy et Manonmani 2007)). Dans l'avenir la recherche de consortium dégradant le CLD pourrait ouvrir de nouvelles perspectives.

Excepté MIAE01197, les autres souches fongiques isolées des sols contaminés des Antilles n'étaient pas adaptées à la biodégradation du CLD. Nous avons toutefois voulu évaluer si la pression de

sélection exercée par le CLD avait contribué à l'acquisition de tolérance à cet insecticide. Dans cette perspective, nous avons comparé la réponse biologique (EC_{50} et taux de croissance) de souches isolées des sols contaminés à des souches de référence proches taxonomiquement n'ayant jamais été exposées au CLD. La tolérance de *F. oxysporum* MIAE01197 est supérieure à celle de *F. oxysporum* MIAE00047 (EC_{50} -MIAE01197 29.2 et EC_{50} - MIAE00047 18.6 mg de CLD par litre, $p < 0.01$) suggérant que l'exposition au CLD dans le sol contaminé ait contribué à l'acquisition de la tolérance à cet insecticide (Merlin *et al.* 2014). Cette tendance a également été observée chez *A. terreus* MIAE01220, *A. flavus* MIAE01259 et *A. nomius* MIAE01233 qui ont montré un EC_{10} toujours plus élevé que celui de la référence sans toutefois différer de manière significative. Par ailleurs, l'analyse du taux de croissance a permis de montrer que deux des trois isolats d'*Aspergillus* provenant du sol des Antilles présentaient un taux de croissance supérieur à la référence (*A. nomius* MIAE01233 > *A. nomius* LCP3558 et *A. terreus* MIAE01220 > *A. terreus* LCP3662). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les souches de *F. oxysporum* (Merlin *et al.* 2014). Toutefois, nous avons pu observer que l'historique d'exposition au CLD n'était pas le seul paramètre expliquant la réponse des isolats au CLD. En effet, la référence non exposée d'*A. flavus* (LCP3495) répond à l'exposition au CLD de la même manière que les souches isolées des sols contaminées. Ces résultats montrent que la croissance des souches d'*Aspergillus* isolées de l'andosol est non affectée (MIAE01259) ou améliorée (MIAE01233 et MIAE01220) par l'exposition à des doses croissantes de CLD confirmant leur tolérance à cet insecticide. Toutefois l'origine de cette tolérance reste incertaine ; elle pourrait résulter de l'historique d'exposition mais également de l'expression de la diversité génétique des isolats fongiques. En effet le genre *Aspergillus* comprend 185 espèces (Galagan *et al.* 2005) laissant planer un doute sur le choix de la proximité taxonomique et donc génétique de la souche de référence avec la souche isolée du sol contaminée. Nous avons constaté pour quelques souches l'acquisition de la tolérance des souches isolées du sol contaminé mais le(s) processus ayant contribué à l'acquisition de cette tolérance reste inconnu.

Comme nous avons montré que la sorption sur la biomasse fongique semblait être le mécanisme principal expliquant la dissipation du CLD dans les cultures de *F. oxysporum* MIAE01197, nous avons étudié plus en détails la capacité de sorption du CLD sur la biomasse fongique produite à partir de huit isolats, dont quatre isolés de sols contaminés de Guadeloupe (*F. oxysporum* MIAE01197, *A. nomius* MIAE01233, *A. terreus* MIAE01220, *A. flavus* MIAE01259) et quatre souches de référence (*F. oxysporum* MIAE00047, *A. nomius* LCP3558, *A. terreus* LCP3662, *A. flavus* LCP3495). La capacité de sorption de la biomasse fongique (isotherme et cinétique de sorption) a été comparée à celle du charbon actif utilisé pour éliminer le CLD contaminant l'eau potable aux Antilles. Les isothermes de sorption décrits par l'équation de Freundlich ont permis de déterminer les paramètres K_F et n révélant que sur l'ensemble des sorbants testés, le charbon actif présentait le K_F ($5,29 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$) et la

valeur de la puissance n (2,39) les plus élevés ; le K_f et n des biomasses fongiques étant compris entre $1,17.10^3 \text{ L.kg}^{-1}$ et $4,52.10^3 \text{ L.kg}^{-1}$, et entre 1,21 et 1,79 respectivement.

Même si intrinsèquement le charbon actif a un pouvoir sorbant supérieur à celui de la biomasse fongique, les cinétiques de sorption obtenues à $2,5 \mu\text{M}$ montrent que 97% du CLD en solution était sorbés sur le charbon actif tandis que la biomasse fongique permet tout de même d'en sorber 90%. Bien que le charbon actif présente un meilleur pouvoir sorbant, la possibilité d'utiliser la biomasse fongique morte comme biosorbant pour dépolluer les eaux est envisageable compte-tenu du coût élevé du charbon actif. En effet, la production de biomasse fongique à partir de déchets végétaux locaux permettrait la mise en place d'une filière d'économie circulaire permettant la production locale d'un biosorbant offrant une alternative intéressante au charbon actif pour approvisionner les usines de traitement des Antilles assurant la dépollution des eaux contaminées au CLD. Malheureusement, cette alternative ne résoudra pas la problématique de gestion des boues (charbon actif ou biomasse fongique contaminé avec le CLD) générées par le traitement des eaux polluées.

Conclusions et perspectives

Malgré les nombreux travaux menés dans le cadre de l'APR Demichloré et dans ma thèse, il reste encore de nombreuses questions et défis à élucider pour envisager de proposer une méthode permettant de remédier à la pollution des sols Antillais au CLD. Les chercheurs qui travaillent sur cette problématique se heurtent à des problèmes logistiques et analytiques. La manipulation du CLD est fastidieuse car non seulement elle est peu soluble (difficile de la mettre en solution) et très hydrophobe ce qui lui confère la capacité à s'adsorber sur le matériel de laboratoire (plastiques et verres), demandant de travailler principalement avec de la verrerie adaptée (verrerie silanisée, verrerie en téflon) et des appareils de mesures dédiés (pré-colonne, colonne,...) afin d'éviter la contamination des autres expérimentations avec le CLD. Au-delà de ces problèmes rencontrés avec la plupart des organochlorés, aujourd'hui il devient même difficile de trouver un fournisseur vendant le CLD (Sigma ayant arrêté son approvisionnement) et le coût du marquage de la molécule est prohibitif (1 mCi de ^{14}C -CLD, 37 k€). Mis à part le β -monohydro- et le dihydro-CLD, aucun des métabolites du CLD n'est disponible rendant impossible la détection et la quantification des métabolites du CLD dans des matrices environnementales et compliquant l'identification de métabolites du CLD formés par des procédés abiotiques ou biotiques. Ces défis limitent les travaux des biologistes, toxicologues, écologues et autres collègues impliqués qui souhaitent évaluer la toxicité, la dégradabilité et l'écodynamique du CLD. De plus, ils rendent impossible l'évaluation de la toxicité et de l'écodynamique des métabolites du CLD. En conséquence, il n'est pas impossible qu'aujourd'hui nous n'ayons connaissance que de la partie émergée du problème causée par le CLD, la partie immergée causée par les métabolites du CLD restant inconnue.

D'autre part, le défi de décrire l'impact du CLD sur les organismes vivants telluriques reste encore à préciser. Certes, l'ensemble des résultats obtenus suggère un impact écotoxicologique nul ou faible du CLD sur la structure globale (RISA), l'abondance et l'activité de la communauté microbienne. Toutefois, la modification de la composition taxonomique et de l'activité de minéralisation de l'acétate de sodium de la communauté microbienne en réponse à l'exposition au CLD pose question et demanderait à être approfondie. Pour répondre à la question de l'écotoxicité du CLD et de sa conséquence sur des fonctions écosystémiques du sol, il pourrait être intéressant d'évaluer pour différents types de sols (dont des sols exposés au CLD) l'impact du CLD sur un bouquet de fonctions microbiennes (cycle biogéochimiques C, N, P et S) mais également sur la faune du sol (ver de terre, collemboles...) qui joue un rôle important dans la dynamique de la matière organique et dans la structure du sol.

Au-delà de la caractérisation de l'impact écotoxicologique du CLD à l'échelle des communautés dans différents environnements, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes qui engendrent la toxicité du CLD dans différents organismes afin d'envisager des parades pour éviter la toxicité de ce polluant. De ce point de vue l'acquisition de tolérance au CLD suite à la pression de sélection exercée par cet insecticide dans les sols pollués mériterait d'être étudiée plus en détails de manière à identifier les mécanismes qui y ont contribué.

Malgré nos nombreuses tentatives, nous n'avons pas mis en évidence de souches microbiennes capables de dégrader efficacement le CLD. Nos travaux ont permis de confirmer les observations de Fernandez-Bayo *et al.* (2013a) montrant pour la première fois que la microflore de sols des Antilles était capable de minéraliser le ¹⁴C-CLD (données non présentées). Par ailleurs des travaux menés par l'équipe de D. Le Paslier (Génoscope) dans le cadre du projet Biodechlord de l'APR Demichlord rapporte la transformation du CLD par un consortium microbien en conditions anaérobies en un composé constitué de 9 carbones (Saaidi *et al.* 2014) semblant confirmer comme l'avait indiqué Dolfig *et al.* (2012) que du point thermodynamique le CLD est biodégradable. Par ailleurs les travaux menés par l'équipe de C. Mouvet (BRGM Orléans) ont permis de montrer que des procédés abiotiques pouvaient conduire à la déchloration du CLD (moins 5 chlores) (Belghit *et al.* 2015). Par conséquent, même si le CLD est récalcitrant à la dégradation, les travaux récents semblent indiquer que la dégradation du CLD est possible mais pose également la question de l'écotoxicité des métabolites formés. La combinaison de différentes approches mêlant de la dégradation abiotique à la dégradation biotique (cycle anaérobie/aérobie) pourrait être envisagée. Pour le futur, peut être devrions-nous mener nos travaux sur : (i) une diversité de sols contaminés au CLD dans le monde (Cameroun, Côte d'Ivoire, Etats-Unis ?), (ii) la capacité de consortia microbiens isolés de sols contaminés à dégrader le CLD, plutôt que de cibler des souches pures, et (iii) l'exploration des voies métabolique et co-métabolique de dégradation (selon si le CLD est utilisé comme source d'énergie ou de carbone).

Pour terminer, les capacités de sorption du CLD par la biomasse fongique démontrées au cours de cette thèse suggèrent l'éventualité de développer une méthode de dépollution de l'eau plus écologique (valorisation de déchets végétaux locaux, production de filtre fongique locale et moins impactante...). Toutefois, seule une preuve de concept a été mise en évidence et le défi aujourd'hui est de passer à une échelle industrielle de production de biomasse fongique et de formulation de filtre fongique, et enfin de tester ces capacités de sorption sur de grands volumes d'eau. De plus, le problème de gestion des filtres contaminés est encore à résoudre.

Références

Bibliographie

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., et Gubotz, G. M. **2000**. "Decolorization and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsute*", *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3357-3362.
- Abera-Kalibata, A. M., Hasyim, A., Gold, C. S., et Van Driesche, R. **2006**. "Field survey in Indonesia for natural enemies of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germa).", *Biological Control* 37:16-24.
- Achard, R., Cabidoche, Y. M., Caron, A., Nelson, R., Duféal, D., Lafont, A., et Lesueur-Jannoyer, M. **2007**. "Contamination des racines et tubercules cultivés sur sol pollué par la chlordécone aux Antilles", dans: "*Les cahiers du PRAM n°7, Pollution des sols par la chlordécone : impact sur la qualité des milieux et des produits agricoles*", pages 46-50.
- Achard, R., et Chabrier, C. **2004**. "Cartographie du risque de pollution des sols par les organochlorés; Fiche technique de mode opératoire : prélèvement d'un échantillon de sol", 2 pages. *CIRAD*.
- Acosta-Martinez, V., Dowd, S., Sun, Y., et Allen, V. **2008**. "Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use", *Soil Biology and Biochemistry* 40:2762-2770.
- Afssa **2003**. "Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques liés à la consommation de denrées alimentaires contaminées par le chlordécone en Martinique et en Guadeloupe", 8 pages. *Maisons-Alfort : Agence française de sécurité sanitaire des aliments*.
- Afssa **2007**. "Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des données scientifiques sur la toxicité du chlordécone en vue d'une éventuelle révision des limites tolérables d'exposition proposées par l'Afssa en 2003", 6 pages. *Maisons-Alfort : Agence française de sécurité sanitaire des aliments*.
- Ahmad, R., Kookana, R. S., Alston, A. M., et Skjemstad, J. O. **2001**. "The nature of soil organic matter affects sorption of pesticides. 1. Relationships with carbon chemistry as determined by C-13 CPMAS NMR spectroscopy", *Environmental Science & Technology* 35(5):878-884.
- Akkanen, J., Sloomweg, T., Mäenpää, K., Leppänen, M. T., Agbo, S., Gallampo, C., et Kukkonen, J. V. **2012**. "Bioavailability of organic contaminants in freshwater environments", dans: "*Emerging and Priority Pollutants in Rivers*", pages 25-53. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Aksu, Z. **2005**. "Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review", *Process Biochemistry* 40(3-4):997-1026.
- Alexander, M. **1999**. "Biodegradation and Bioremediation, 2nd Edition", 453 pages. *Academic Press: New York*.
- Allard, G. B., Nankinga, C., et Ogenta-Latigo, M. **1991**. "The potential of indigenous fungal pathogens as a component of integrated management of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* in Uganda : A new research project", *Biological and integrated control of highland bananas and plantain pests and diseases; Proceedings of a research coordination meeting*, Cotonou, Bénin.
- Amalric, L., avec la collaboration de Bristeau, S. **2014**. "Essai d'intercomparaison de l'analyse de la chlordécone et de ses métabolites dans les sols; Rapport final", 87 pages. *BRGM/RP-63113-FR*.
- Andreu, V., et Pico, Y. **2004**. "Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods", *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23(10-11):772-789.
- ATSDR **1995**. "Toxicological profile for mirex and chlordecone (Final Report)", 18 pages. *U.S. Department of health and human services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*.
- Bahner, L. H., Wilson, A. J., Sheppard, J. M., Patrick, J. M., Goodman, L. R., et Walsh, G. E. **1977**. "Kepone Bioconcentration, Accumulation, Loss and Transfer through Estuarine Food Chains", *Chesapeake Science* 18(3):299-308.

- Barriuso, E., Benoit, P., et Dubus, I. G. **2008**. "Formation of pesticide nonextractable (bound) residues in soil: magnitude, controlling factors and reversibility", *Environment Science Technology* 42:1845-1854.
- Beaugendre, J. **2005**. "Rapport d'information sur l'utilisation du chlordécone et des autres pesticides dans l'agriculture martiniquaise et guadeloupéenne", 169 pages. *Assemblée Nationale - Rapport d'information n°2430*.
- Beauhaire, J., Ducrot, P. H., Malosse, C., Rochat, D., Ndiege, I. O., et Otieno, D. O. **1995**. "Identification and synthesis of sordinin, a male pheromone emitted by *Cosmopolites sordidus*", *Tetrahedron Letters* 36(7):1043-1046.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., et Barriuso, E. **2002b**. "Occurrence of pesticides in the atmosphere in France", *Agronomie* 22:35-49.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., et Gabrielle, B. **2002a**. "Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview", *Agronomie* 22(1):21-33.
- Belghit, H., Colas, C., Bristeau, S., Mouvet, C., et 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.
- Belpomme, D. **2007**. "Rapport d'expertise et d'audit externe concernant la pollution par les pesticides en Martinique; Conséquences agrobiologiques, alimentaires et sanitaires et proposition d'un plan de sauvegarde en cinq points", 54 pages. *Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse*.
- Benoit, P., Barriuso, E., et Calvet, R. **1998**. "Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium", *Chemosphere* 37(7):1271-1282.
- Bertrand, J.-A., Abarnou, A., Bocquene, G., Chiffolleau, J. F., et Reynal, L. **2009**. "Diagnostic de la contamination chimique de la faune halieutique des littoraux des Antilles françaises : Campagnes 2008 en Martinique et Guadeloupe", 136 pages. *IFREMER, Martinique*.
- Bhalerao, T. S., et Puranik, P. R. **2007**. "Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*", *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(4):315-321.
- Bidleman, T. F. **1999**. "Atmospheric transport and air-surface exchange of pesticides", *Water Air and Soil Pollution* 115(1-4):115-166.
- Bidleman, T. F., et Leone, A. D. **2004**. "Soil-air exchange of organochlorine pesticides in the Southern United States", *Environmental Pollution* 128(1-2):49-57.
- Biliotti, E., et Brader, L. **1975**. "Informations internes sur l'agriculture, n°149 - Méthodes de lutte intégrée et de lutte biologique en agriculture", 148 pages. *Commission des communautés européennes*.
- Blanck, H., et Wängberg, S. Å. **1988**. "Induced community tolerance in marine periphyton established under arsenate stress", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45(10):1816-1819.
- Blondel, C., Melesana, M., San Miguela, A., Veyrenca, S., Meresseb, P., Pezeta, M., Reynauda, S., et Raveton, M. **2014**. "Cell cycle disruption and apoptosis as mechanisms of toxicity of organochlorines in *Zea mays* roots", *Journal of Hazardous Materials* 276:312-322.
- Bocquené, G., et Franco, A. **2005**. "Pesticide contamination of the coastline of Martinique", *Marine Pollution Bulletin* 51(5-7):612-619.
- Bodiguel, X., Bertrand, J.-A., et Fremery, J. **2011**. "Devenir de la chlordécone dans les réseaux trophiques des espèces marines consommées aux Antilles (CHLORETRO). Rapport final de Convention Ifremer, ODE Martinique et DSV Martinique. Ifremer, Martinique, 46 pages".
- Bonan, H., et Prime, J.-L. **2001**. "Rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de consommation humaine en Guadeloupe", 86 pages. *Inspection générale des affaires sociales et Inspection générale de l'environnement*.
- Bonvallot, N., et Dor, F. **2004**. "Insecticides organochlorés aux Antilles : identification des dangers et valeurs toxicologiques de référence", 52 pages. *Institut de Veille Sanitaire*.

- Borthwick, P. W., Cook, G. H., et Patrick, J. M. **1974**. "Mirex residues in selected estuaries of South Carolina - June 1972", *Pesticides Monitoring Journal* 7:144-145.
- Botta, F., Dulio, V., Lestremau, F., Ghestem, J.-P., Cren-Olivé, C., Cruz, J., Devier, M.-H., Budzinski, H., et Lopez, B. **2014**. "Etude prospective 2012 : pesticides émergents dans les eaux de Métropole et des Départements d'Outre-Mer (DOM)", *44^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides*, Université Antilles-Guyane, Schœlcher, Martinique (France). Vidéo disponible sur <http://www.manioc.org/fichiers/V14168>
- Boucher, O., Simard, M. N., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Chajes, V., Dallaire, R., Monfort, C., Thome, J. P., Multigner, L., et Cordier, S. **2013**. "Exposure to an organochlorine pesticide (chlordecone) and development of 18-month-old infants", *Neurotoxicology* 35:162-168.
- Boutrin, L., et Confiant, R. **2007**. "Chronique d'un empoisonnement annoncé. Le scandale du chlordécone aux Antilles françaises 1972-2002", 240 pages. *L'Harmattan*.
- Bristeau, S., Amalric, L., et Mouvet, C. **2014**. "Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content", *Analytical and bioanalytical chemistry* 406(4):1073-1080.
- Brugneaux, S., Pierret, L., et Mazataud, V. **2004**. "Les agressions d'origine anthropique sur le milieu marin côtier et leurs effets sur les écosystèmes coralliens et associés de la Martinique", 97 pages. *Observatoire du Milieu Marin Martiniquais*.
- Brunet, D., Woignier, T., Lesueur-Jannoyer, M., Achard, R., Rangon, L., et Barthes, B. G. **2009**. "Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)", *Environmental pollution* 157(11):3120-3125.
- Budenberg, W. J., Ndiege, I. O., et Karago, F. W. **1993**. "Evidence for volatile male-produced pheromone in banana weevil *Cosmopolites sordidus*", *Journal of Chemical Ecology* 19(9):1905-1916.
- Bumpus, J. A., et Aust, S. D. **1987**. "Biodegradation of DDT [1,1 1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*.", *Applied and Environmental Microbiology* 53:2000-2008.
- Cabidoche, Y. M. **1997**. "Carte schématique des sols de la Guadeloupe", *INRA-CRAG-APC*.
- Cabidoche, Y. M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., et 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", *Environmental Pollution* 157(5):1697-1705.
- Cabidoche, Y. M., Benoît, M., Blanchart, E., Fournet, J., Lhoste, P., Gautronneau, Y., Langlais, C., Taupier-Letage, B., et Toribio, A. **2005**. "Faisabilité technique de l'agriculture biologique en Martinique : aspects généraux", dans: "*Agriculture biologique en Martinique*", pages 81-147. *IRD éditions*.
- Cabidoche, Y. M., Clermont-Dauphin, C., Lafont, A., Sansoulet, J., Cattan, P., Achard, R., Caron, A., et Chabrier, C. **2006a**. "Stockage dans les sols à charges variables et dissipation dans les eaux de zoocides organochlorés autrefois appliqués en bananeraies aux Antilles : relation avec les systèmes de culture", 101 pages. *Contributions INRA/CIRAD*.
- Cabidoche, Y. M., Jannoyer, M., et Vannière, H. **2006b**. "Conclusions du groupe d'étude et de prospective : Pollution par les organochlorés aux Antilles", 66 pages. *Contributions INRA/CIRAD*
- Cabidoche, Y. M., et Lesueur-Jannoyer, M. **2011**. "Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles : comment la gérer ?", *Innovations agronomiques* 16:117-133.
- Cabidoche, Y. M., et Lesueur-Jannoyer, M. **2012**. "Contamination of harvested organs in root crops grown on chlordecone-polluted soils", *Pedosphere* 22(4):562-571.
- Campanella, B. F., et Paul, R. **2000**. "Presence in the rhizosphere and leaf extracts of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.), of molecules capable of increasing the apparent aqueous solubility of hydrophobic pollutants", *International Journal of Phytoremediation* 2:145-158.

- Cannon, S. B., Veazey, J. M., Jackson, R. S., Burse, V. W., Hayes, C., Straub, W. E., Landrigan, P. J., et Liddle, J. A. **1978**. "Epidemic Kepone poisoning in chemical workers", *American Journal of Epidemiology* 107(6):529-537.
- Carver, R. A., et Griffith, F. D. **1979**. "Determination of Kepone dechlorination products in finfish, oysters, and crustaceans", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27(5):1035-1037.
- Castiñeiras, A., Cabrera, T., Calderon, A., Lopez, M., et Lujan, M. **1991**. "Lucha biologica contra *Cosmopolites sordidus* (Germar)", *Proceeding Caribbean Meetings on Biological Control, Guadeloupe (French West Indies)*.
- Cattan, P., Barriuso, E., Cabidoche, Y. M., Charlier, J. B., et Voltz, M. **2007**. "Quelques éléments clés sur l'origine et le mode de pollution des eaux par les produits phytosanitaires utilisés en agriculture.", dans: "*Les cahiers du PRAM n°7, Pollution des sols par la chlordécone : impact sur la qualité des milieux et des produits agricoles*", pages 13-20.
- Cattan, P., Cabidoche, Y. M., Lacas, J. G., et Voltz, M. **2006**. "Effects of tillage and mulching on runoff under banana (*Musa* spp.) on a tropical Andosol", *Soil & Tillage Research* 86(1):38-51.
- Chabrier, C., Mauléon, H., Bertrand, P., Lassoudière, A., et Quénéhervé, P. **2005**. "Banane antillaise, les systèmes de culture évoluent. En martinique, méthodes alternatives pour réduire l'utilisation des nématicides et insecticides en bananeraies.", *Phytoma - La défense des végétaux* 584:12-16.
- Charlier, J. B., Moussa, R., Cattan, P., Cabidoche, Y. M., et Voltz, M. **2009**. "Modelling runoff at the plot scale taking into account rainfall partitioning by vegetation: application to stemflow of banana (*Musa* spp.) plant", *Hydrology and Earth System Sciences* 13(11):2151-2168.
- Chernoff, N., et Rogers, E. H. **1976**. "Fetal toxicity of Kepone in rats and mice", *Toxicology and Applied Pharmacology* 38(1):189-194.
- CIRAD **2012**. "Les bananes : Producteurs et scientifiques se mobilisent pour une culture durable en Guadeloupe et en Martinique".
- Clostre, F., Lavigne, A., Jurjanz, S., Joindreville, C., Dalibard, C., Liabeuf, J. M., et Lesueur-Jannoyer, M. **2013b**. "Cinétiques de contamination et de décontamination de canards par la chlordécone pendant le contrôle biologique des adventices dans un verger de goyaviers", 37 pages. *Document de synthèse CIRAD-INRA-Université de Lorraine*.
- Clostre, F., et Lesueur-Jannoyer, M. **2011**. "Biodisponibilité de la chlordécone pour les poules pondeuses pour deux types de sol", 25 pages. *Document de synthèse CIRAD-INPL*.
- Clostre, F., et Lesueur-Jannoyer, M. **2012**. "Transfert de la chlordécone du sol vers les produits cultivés", 19 pages. *Document de synthèse CIRAD*.
- Clostre, F., Lesueur-Jannoyer, M., Achard, R., Letourmy, P., Cabidoche, Y. M., et Cattan, P. **2013a**. "Decision support tool for soil sampling of heterogeneous pesticide (chlordecone) pollution", *Environmental Science and Pollution Research* 21(3):1980-1992.
- Coat, S., Bocquené, G., et Godard, E. **2006**. "Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique", *Aquatic Living Resources* 19(2):181-187.
- Coat, S., Monti, D., Legendre, P., Bouchon, C., Massat, F., et Lepoint, G. **2011**. "Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web accumulation.", *Environmental Pollution* 159:1692-1701.
- Coats, J. R., et Anderson, T. A. **1997**. "The use of vegetation to enhance bioremediation of surface soils contaminated with pesticide wastes". *Iowa State University*.
- Cohn, W. J., Boylan, J. J., Blanke, R. V., Fariss, M. W., Howell, J. R., et Guzelian, P. S. **1978**. "Treatment of chlordecone (Kepone) toxicity with cholestyramine - results of a controlled clinical-trial", *New England Journal of Medicine* 298(5):243-248.
- Collet, F., Arconte, U., Justin, P., Moulin, J., et Sarrazin, C. **2002**. "Aide mémoire juridique sur la réglementation relative aux produits antiparasitaires à usage agricole", fiches 1 à 7. *Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et de la pêche*.
- Colombano, S. **2011**. "Chlordécone. Atelier de prospective sur les recherches à mener concernant la remédiation des sols, des sédiments et des produits chlorés. Propositions d'axes de

- recherche dans le cadre des Antilles", dans: *"Les cahiers de PRAM n°9-10, Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles"*, pages 65-71.
- Cuillé, J. **1950**. "Recherches sur le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, Germar : Monographie de l'insecte et recherche de ses chimiotropismes", *IFAC Série Technique* 4.
- Dallaire, R., Muckle, G., Rouget, F., Kadhel, P., Bataille, H., Guldner, L., Seurin, S., Chajes, V., Monfort, C., Boucher, O., Thome, J. P., Jacobson, S. W., Multigner, L., et Cordier, S. **2012**. "Cognitive, visual, and motor development of 7-month-old Guadeloupean infants exposed to chlordécone", *Environmental Research* 118:79-85.
- Dawson, G. W., Weimer, W. C., et Shupe, S. J. **1979**. "Kepone - a case study of a persistent material.", *Water - American Institute of Chemical Engineers* 75(190):366-374.
- Dequiedt, S., Thioulouse, J., Jolivet, C., Saby, N. P. A., Lelievre, M., Maron, P.-A., Martin, M. P., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Toutain, B., Arrouays, D., Lemanceau, P., et Ranjard, L. **2009**. "Biogeographical patterns of soil bacterial communities", *Environmental Microbiology Reports* 1 4:251-255.
- Desaiah, D. **1981**. "Interaction of chlordécone with biological membranes", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 8(5-6):719-730.
- Desaiah, D. **1985**. "Chlordécone interaction with catecholamine binding and uptake in rat brain synaptosomes", *Neurotoxicology* 6(1):159-165.
- Desprat, J.-F., Comte, J.-P., et Chabrier, C. **2004**. "Cartography of soil pollution risk through organochlorine in Martinique". *BRGM/RP53262-FR*.
- DHHS **2011**. "The twelfth Edition of the report on carcinogens: Kepone", 2 pages. *National Toxicology Program of the U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)*.
- Dieye, M., Veronique-Baudin, J., Draganescu, C., et Azaloux, H. **2007**. "Cancer incidence in Martinique: a model of epidemiological transition", *European Journal of Cancer Prevention* 16(2):95-101.
- Dolfing, J., Novak, I., Archelas, A., et Macarie, H. **2012**. "Gibbs Free Energy of Chlordecone and Potential Degradation Products: Implications for Remediation Strategies and Environmental Fate", *Environmental Science & Technology* 46(15):8131-8139.
- Domange, N. **2005**. "Etude de transfert des produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole (Rouffach, Haut-Rhin)", *Université Louis-Pasteur Strasbourg I*.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Berard, A., Bouchez, A., Humbert, J. F., et Montuelle, B. **2007**. "Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area", *Aquatic Microbial Ecology* 50(1):91-102.
- Dritsa, V., Rigas, F., Natsis, K., et Marchant, R. **2007**. "Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site", *Bioresource Technology* 98(9):1741-1747.
- Dubuisson, C., Heraud, F., Leblanc, J. C., Gallotti, S., Flamand, C., Blateau, A., Quenel, P., et Volatier, J. L. **2007**. "Impact of subsistence production on the management options to reduce the food exposure of the Martinican population to Chlordecone", *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49(1):5-16.
- Dulcire, M., et Cattan, P. **2002**. "Monoculture d'exportation et développement agricole durable : cas de la banane en Guadeloupe", *Cahiers Agricultures* 11(5):313-321.
- Eaton, P. E., et Cole, T. W. **1964**. "The cubane system", *Journal of the American Chemical Society* 86(5):962-964.
- El-Sebai, T., Lagacherie, B., Cooper, J. F., Soulas, G., et Martin-Laurent, F. **2005**. "Enhanced isoproturon mineralisation in a clay silt loam agricultural soil", *Agronomy for Sustainable Development* 25(2):271-277.
- Engelke, R., et Stine, J. R. **1990**. "Is N8 cubane stable ?", *Journal of Physical Chemistry* 94(15):5689-5694.
- EPA **1978**. "Reviews of the environmental effects of pollutants: I. Mirex and Kepone", 252 pages. *Environmental Protection Agency (EPA-600/1-78-013)*.
- EPA **1994**. "Contaminants and remedial options at pesticide sites", 130 pages. *Environmental Protection Agency, EPA/600/R-94/202*.

- EPA **2009**. "Toxicological review of chlordecone (kepone)", 183 pages. *Environmental Protection Agency, EPA/635/R-07/004F*.
- Epstein, S. S. **1978**. "Kepone - Hazard evaluation", *The Science of Total Environment* 9:1-62.
- Eroschenko, V. P. **1981**. "Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) in the reproductive tract of birds and mammals", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 8(5-6):731-742.
- Faroon, O., Kueberuwa, S., Smith, L., et DeRosa, C. **1995**. "ATSDR evaluation of health effects of chemicals. II. Mirex and chlordecone: health effects, toxicokinetics, human exposure, and environmental fate.", *Toxicology and Industrial Health* 11(6):1-203.
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., et Elsner, M. **2013**. "Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities", *Science* 341(6147):752-758.
- Fernandes, P., Jannoyer-Lesueur, M., Soler, A., Achard, R., et Woignier, T. **2010**. "Effects of clay microstructure and compost quality on chlordecone retention in volcanic tropical soils: consequences on pesticide lability and plant contamination", *19th World Congress of Soil Science, Soil Solution for a Changing World*, Brisbane, Australia.
- Fernandez-Bayo, J. D., Saison, C., Geniez, C., Voltz, M., Vereecken, H., et Berns, A. E. **2013b**. "Sorption characteristics of chlordecone and cadusafos in tropical agricultural soils", *Current Organic Chemistry* 17(24):2976-2984.
- Fernandez-Bayo, J. D., Saison, C., Voltz, M., Disko, U., Hofmann, D., et Berns, A. E. **2013a**. "Chlordecone fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions", *Science of the Total Environment* 463:395-403.
- Field, J. A., et Sierra-Alvarez, R. **2008**. "Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls", *Environmental Pollution* 155(1):1-12.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., et Jackson, R. B. **2005**. "Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assay", *Applied and Environmental Microbiology* 71:4117-4120.
- Fintz, M. **2009**. "L'autorisation du chlordécone en France 1968-1981", 21 pages. *AFSSET - Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail*.
- Fintz, M. **2010**. "De la "crise" du chlordécone à la biographie d'un pesticide", *Colloque "La réduction des pesticides agricoles, enjeux, modalités et conséquences"*, Ecole Normale Supérieure Lettres et Sciences Humaines, Lyon, France.
- Fintz, M. **2011**. "De quelles crises chlordécone est-il le nom ? / The different names of "chlordecone crisis" in the French West Indies", *Congrès de l'Association Française des Sciences Politiques*, Strasbourg, France.
- François, M., Moreau, R., et Sylvander, B. **2005**. "Agriculture biologique en Martinique", 304 pages. *IRD éditions*.
- Frazar, C. **2000**. "The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites", 55 pages. *U.S. Environmental Protection Agency*.
- Frenich, A. G., Vidal, J. M. L., Frias, M. M., Olea-Serrano, F., et Olea, N. **2000**. "Quantitative determination of endocrine-disrupting polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in human serum using gas chromatography with electron-capture detection and tandem mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry* 35:967-975.
- Fujimori, K., Nabeshima, T., Ho, I. K., et Mehendale, H. M. **1982**. "Effect of oral administration of chlordecone and mirex on brain biogenic amines in mice", *Neurotoxicology* 3(2):143-148.
- Furukawa, K., et Fujihara, H. **2008**. "Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105(5):433-449.
- Galagan, J. E., Henn, M. R., Ma, L. J., Cuomo, C. A., et Birren, B. **2005**. "Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology", *Genome research* 15(12):1620-1630.
- Gent, M. P. N., Parrish, Z. D., et White, J. C. **2005**. "Nutrient uptake among subspecies of *Cucurbita pepo* L. is related to exudation of citric acid", *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(5):782-788.

- George, S. E., et Claxton, L. D. **1988**. "Biotransformation of chlordecone by *Pseudomonas* species", *Xenobiotica* 18(4):407-416.
- Gevao, B., Semple, K. T., et Jones, K. C. **2000**. "Bound pesticide residues in soils: a review", *Environmental pollution* 108(1):3-14.
- Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., et Tusseau-Vuillemin, M.-H. **2010**. "Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique ?", *Revue Sciences Eaux et Territoires* 1:6-11.
- Griffin, G. W., et Marchand, A. P. **1989**. "Synthesis and chemistry of cubanes", *Chemical reviews* 89(5):997-1010.
- Guimont, S. **2006**. "Synthèse bibliographique sur la pollution des sols par la chlordécone aux Antilles françaises", 33 pages. *CIRAD*.
- Guldner, L. **2011**. "Exposition de la population antillaise au chlordécone", *Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut de Veille Sanitaire* 3-4-5:25-28.
- Guldner, L., Multigner, L., Heraud, F., Monfort, C., Thome, J. P., Giusti, A., Kadhel, P., et Cordier, S. **2010**. "Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: Ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone", *Environmental Research* 110(2):146-151.
- Guldner, L., Multigner, L., Torny, D., Rogel, A., et Elbaz, A. **2009**. "Etat des lieux des études réalisées ou en cours aux Antilles", dans: "*Impact sanitaire de l'utilisation du chlordécone aux Antilles françaises. Recommandations pour les recherches et les actions de santé publiques*", pages 28-42. *InVS INSERM*.
- Guzelian, P. S. **1982**. "Comparative toxicology of chlordecone (Kepone) in humans and experimental animals", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22:89-113.
- Guzelian, P. S. **1992**. "The clinical toxicology of chlordecone as an example of toxicological risk assessment for man", *Toxicology Letters* 64-5:589-596.
- Hamdaoui, O., et Naffrechoux, E. **2007**. "Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters", *Journal of Hazardous Materials* 147:381-394.
- Hammond, B., Katzenellenbogen, B. S., Krauthammer, N., et McConnell, J. **1979**. "Estrogenic activity of the insecticide chlordecone (Kepone) and interaction with uterine estrogen-receptors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(12):6641-6645.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., et Philippot, L. **2006**. "Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils", *Applied and Environmental Microbiology* 72(8):5181-5189.
- Herr, D. W., Gallus, J. A., et Tilson, H. A. **1987**. "Pharmacological modification of tremor and enhanced acoustic startle by chlordecone and p,p'-DDT", *Psychopharmacology* 91:320-325.
- Howard, P. H., Michalenko, E. M., et Sage, G. W. **1981**. "Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals."
- Huelster, A., Mueller, J. F., et Marschner, H. **1994**. "Soil-plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (cucurbitaceae)", *Environmental Science & Technology* 28(6):1110-1115.
- Huggett, R. J., et Bender, M. E. **1980**. "Kepone in the James River", *Environmental Science & Technology* 14(8):918-923.
- Hussain, S., Devers-Lamrani, M., Spor, A., Rouard, N., Porcherot, M., Béguet, J., et Martin-Laurent, F. **2013**. "Mapping field spatial distribution patterns of isotopuron-mineralizing activity over a three-year winter wheat/rape seed/barley rotation", *Chemosphere* 90(10):2499-2511.
- IARC **1979**. "Some halogenated hydrocarbons; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans", 609 pages. *International Agency for Research on Cancer*.
- IFEN **2006**. "Les pesticides dans les eaux - Données 2003 et 2004", 40 pages. *Institut Français de l'Environnement*.

- INERIS **2012**. "INERIS : Valeur guide environnementale ; Chlordecone - n°CAS : 143-50-0 ", 19 pages. *Institut national de l'environnement industriel et des risques*.
- INRA **1999**. "Evaluation des possibilités de lutte biologique à l'aide de Nématodes entomopathogènes pour le contrôle du charançon du bananier en Guadeloupe", 90 pages. *Contributions INRA/ANVAR*.
- INRA/CIRAD **2010**. "Conclusions de l'atelier Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles", 32 pages. *Contributions INRA/CIRAD*.
- Jablonski, P. E., Pheasant, D. J., et Ferry, J. G. **1996**. "Conversion of Kepone by *Methanosarcina thermophila*", *Fems Microbiology Letters* 139(2-3):169-173.
- Janssen, P. H. **2006**. "Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes", *Applied and Environmental Microbiology* 72(3):1719-1728.
- Joindreville, C., Bouveret, C., Lesueur-Jannoyer, M., Rychen, G., et Feidt, C. **2013**. "Relative bioavailability of tropical volcanic soil-bound chlordecone in laying hens (*Gallus domesticus*)", *Environmental Science and Pollution Research* 20:292-299.
- Joindreville, C., Lavigne, A., Jurjanz, S., Dalibard, C., Liabeuf, J. M., Clostre, F., et Lesueur-Jannoyer, M. **2014**. "Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): A field", *Science of the Total Environment* 493:336-341.
- Joly, P.-B. **2010**. "La saga du chlordécone aux Antilles françaises : Reconstruction chronologique 1968-2008", 82 pages. *Contributions INRA/AFSSET*.
- Juhasz, A. L., Smith, E., Smith, J., et Naidu, R. **2002**. "Biosorption of organochlorine pesticides using fungal biomass", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 29(4):163-169.
- Kästner, M., Nowak, K. M., Miltner, A., Trapp, S., et Schaeffer, A. **2014**. "Classification and modelling of nonextractable residue (NER) formation of xenobiotics in soil—a synthesis", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44(19):2107-2171.
- Kenaga, E. E. **1980**. "Predicted bioconcentration factors and soil sorption coefficients of pesticides and other chemicals.", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 4:122-131.
- Kermarrec, A. **1980**. "Niveau actuel de la contamination des chaînes biologiques en Guadeloupe : Pesticides et métaux lourds 1979-1980", 72 pages. *INRA - Ministère de l'agriculture*.
- Kilzer, L., Scheunert, I., Geyer, H., Klien, W., et Korte, F. **1979**. "Laboratory screening of the volatilization rates of organic chemicals from water and soil", *Chemosphere* 10:751-761.
- Kodavanti, P. R., Cameroun, J. A., P.R., Y., et Desaiyah, D. **1990**. "Effect of chlordecone (Kepone) on calcium transport mechanisms in rat heart sarcoplasmic reticulum.", *Pharmacology and Toxicology* 67(3):227-234.
- Kodavanti, P. R., Rao, V. C., et Mehendale, H. M. **1993**. "Loss of calcium homeostasis leads to progressive phase of chlordecone-potentiated carbon tetrachloride hepatotoxicity.", *Toxicology and Applied Pharmacology* 122:77-87.
- Kolić, N. U., Hršak, D., Kolar, A. B., Petrić, I., Stipičević, S., Soulas, G., et Martin-Laurent, F. **2007**. "Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil", *International Biodeterioration & Biodegradation* 60(4):299-307.
- Koppenhöfer, A. M. **1991**. "Search and evaluation of natural enemies of the banana weevil", *Biological and integrated control of highland bananas and plantain pests and diseases; Proceedings of a research coordination meeting*, Cotonou, Bénin.
- Lassois, L., Busogoro, J.-P., et Jijakli, H. **2009**. "La banane : de son origine à sa commercialisation", *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13(4):575-586.
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., et Fierer, N. **2009**. "Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale", *Applied and Environmental Microbiology* 75(15):5111-5120.
- Le Déaut, J.-Y., et Procaccia, C. **2009**. "Impacts de l'utilisation de la chlordécone et des pesticides aux Antilles : bilan et perspectives d'évolution", 223 pages. *Sénat (rapport n°487) - Assemblée Nationale (rapport n°1778)*.
- Leonard, R. A. **1990**. "Movement of pesticides into surface waters", dans: "*Pesticides in the soil environment*", pages 303-349. *Madison Soil Science Society of America Book Series, WI, USA*.

- Lesueur-Jannoyer, M., Cabidoche, Y. M., et Vannière, H. **2007**. "Synthèse des conclusions du groupe d'étude et de prospective "pollution par les organochlorés aux Antilles". Aspects agronomiques", dans: "*Les cahiers du PRAM n°7, Pollution des sols par la chlordécone : impact sur la qualité des milieux et des produits agricoles*", pages 7-13.
- Lesueur-Jannoyer, M., Cattan, P., Monti, D., Saison, C., Voltz, M., Woignier, T., et Cabidoche, Y. M. **2012**. "Chlordécone aux Antilles : évolution des systèmes de culture et leurs incidence sur la dispersion de la pollution", *Agronomie, Environnement et Société* 2(1):45-58.
- Lièvremon, D., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J. L., et Steiman, R. **1996**. "Biotransformation and biosorption of pentachloronitrobenzene by fungal mycelia", *Mycological Research* 100:948-954.
- Linder, R. E., Scotti, T. M., McElroy, W. K., Laskey, J. W., Strader, L. F., et Powell, K. **1983**. "Spermotoxicity and tissue accumulation of chlordecone (Kepone) in male rats. ", *Journal of Toxicology and Environmental Health* 12:183-192.
- Luellen, D. R., Vadas, G. G., et Unger, M. A. **2006**. "Kepone in James River fish: 1976-2002", *Science of the Total Environment* 358(1-3):286-297.
- Macarie, H., et Dolfing, J. **2011**. "La chlordécone (CLD) est-elle véritablement réfractaire à une dégradation microbienne ?", dans: "*Les cahiers du PRAM n°9-10, Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles*", pages 25-30.
- Mackay, D., Shiu, W. Y., et Ma, K. C. **1997**. "Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume 5 : pesticides chemicals". *CRC press*.
- Mactutus, C. F., et Tilson, H. A. **1985**. "Evaluation of long-term consequences in behavioral and/or neural function following neonatal chlordecone exposure", *Teratology* 31(2):177-186.
- Mahieu, M., Archimède, H., Cabidoche, Y. M., et Iotti, J. **2012**. "Possibilités de décontamination de bovins contaminés par la chlordécone", *9^{ème} Journées Techniques de l'Association Martiniquaise pour le Développement des Productions Agricoles*, Schoelcher, Martinique (France).
- Mahon, J. F., et Kelley, P. C. **1987**. "Managing toxic wastes - After Bhopal and Sandoz", *Long Range Planning* 20(4):50-59.
- Majewski, M., Desjardins, R., Rochette, P., Pattey, E., Seiber, J., et Glotfelty, D. **1993**. "Field comparison of an eddy accumulation and an aerodynamic-gradient system for measuring pesticide volatilization fluxes", *Environmental Science & Technology* 27(1):121-128.
- Mallick, S., Blanchet, P., et Multigner, L. **2005**. "Prostate cancer incidence in Guadeloupe, a French Caribbean archipelago", *European Urology* 47(6):769-772.
- Mamy, L., et Barriuso, E. **2007**. "Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils", *European Journal of Soil Science* 58:175-187.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., et Wackett, L. P. **1995**. "Isolation and characterization of a Pseudomonas sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine", *Applied and Environmental Microbiology* 61(4):1451-1457.
- Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., et Allan, D. L. **1993**. "Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures", *Applied and Environmental Microbiology* 59(6):1696-1701.
- Marie, P., Nivet, A.-C., Pinte, K., et Gresser, J. **2007**. "Mise en place d'un dispositif expérimental pour comprendre les modalités de transport de la chlordécone dans les cours d'eau", dans: "*Les cahiers du PRAM n°7, Pollution des sols par la chlordécone : impact sur la qualité des milieux et des produits agricoles*", pages 21-28.
- Marrón-Montiel, E., Ruiz-Ordaz, N., Rubio-Granados, C., Juárez-Ramírez, C., et Galíndez-Mayer, C. J. **2006**. "2, 4-D-degrading bacterial consortium: Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community", *Process Biochemistry* 41(7):1521-1528.
- Martin-Laurent, F., Kandeler, E., Petrić, I., Djuric, S., et Karpouzias, D. G. **2013**. "ECOFUN-MICROBIODIV: an FP7 European project for developing and evaluating innovative tools for assessing the impact of pesticides on soil functional microbial diversity-towards new

- pesticide registration regulation?", *Environmental Science and Pollution Research* 20(2):1203-1205.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., R., C., Germon, J.-C., Soulas, G., et Catroux, G. **2001**. "DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods", *Applied and Environmental Microbiology* 67:2354-2359.
- Martin-Laurent, F., Sahnoun, M. M., Merlin, C., Vollmer, G., et Lübke, M. **2014**. "Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone stable isotope as a tracer", *Environmental Science and Pollution Research* 21(7):4928-4933.
- Mehendale, H. M. F., L., Fields, M., et Matthews, H. **1972**. "Fate of mirex- ^{14}C in the rat and plants.", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 8:200-207.
- Meijer, S. N., Shoeib, M., Jantunen, L. M. M., Jones, K. C., et Harner, T. **2003a**. "Air-soil exchange of organochlorine pesticides in agricultural soils. 1. Field measurements using a novel in situ sampling device", *Environmental Science & Technology* 37(7):1292-1299.
- Meijer, S. N., Shoeib, M., Jones, K. C., et Harner, T. **2003b**. "Air-soil exchange of organochlorine pesticides in agricultural soils. 2. Laboratory measurements of the soil-air partition coefficient", *Environmental Science & Technology* 37(7):1300-1305.
- Mercier, A., Dictor, M.-C., Harris-Hellal, J., Breeze, D., et Mouvet, C. **2013**. "Distinct bacterial community structure of 3 tropical volcanic soils from banana plantations contaminated with chlordecone in Guadeloupe (French West Indies).", *Chemosphere* 92(7):787-794.
- Merlin, C., Devers, M., Crouzet, O., Heraud, C., Steinberg, C., Mougine, C., et Martin-Laurent, F. **2014**. "Characterization of chlordecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the French West Indies", *Environmental Science and Pollution Research* 21(7):4914-4927.
- Molowa, D. T., Shayne, A. G., et Guzelian, P. S. **1986a**. "Purification and characterization of chlordecone reductase from human liver.", *Journal of Biological Chemistry* 261:12624-12627.
- Molowa, D. T., Wrighton, S. A., Blanke, R. V., et Guzelian, P. S. **1986b**. "Characterization of a unique aldo-keto reductase responsible for the reduction of chlordecone in the liver of the gerbil and man.", *Journal of Toxicology and Environmental Health* 17(4):375-384.
- Monti, D., et Coat, S. **2007**. "La contamination des espèces d'eau douce", dans: *Les cahiers du PRAM n°7, Pollution des sols par la chlordécone : impact sur la qualité des milieux et des produits agricoles*, pages 29-34.
- Moriwaki, H., et Hasegawa, A. **2004**. "Detection of chlordecone by liquid chromatography with tandem mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18:1243-1244.
- Mouvet, C., Bristeau, S., Amalric, L., Dictor, M.-C., Mercier, A., Thannberger, L., Mueller, J., Valkenburg, J., Seech, A., et Przepiora, A. **2011**. "In Situ Chemical Reduction (ISCR) for removal of persistent pesticides; focus on kepone in tropical soil", *International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies*, Reno, Nevada.
- Mouvet, C., Bristeau, S., et Roques, C. **2010**. "Décontamination de sols pollués à la chlordécone : validation de procédés de dépollution physico-chimique et biologique, étude des produits de dégradation et amélioration de la sensibilité analytique", 26 pages. *BRGM/RP-58704-FR*.
- Mouvet, C., Collet, B., Senergues, M., Bristeau, S., Belghit, H., Maunit, B., et Rangon, L. **2014**. "Décontamination *in situ* de sols de bananeraie contenant de la chlordécone : résultats sur nitisol de la plaine du Lamentin", *44^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides*, Université Antilles-Guyane, Schœlcher, Martinique (France). Vidéo disponible sur <http://www.manioc.org/fichiers/V14185>
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J. C., et Joint, I. **2008**. "Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities", *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 2:379-392.
- Mukherjee, I., et Mittal, A. **2005**. "Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75(5):1034-1040.

- Multigner, L., Cordier, S., Kadhel, P., Huc-Terki, F., Blanchet, P., Bataille, H., et Janky, E. **2007**. "Pollution par le chlordécone aux Antilles. Quel impact sur la santé de la population ?", *Environnement, Risques & Santé* 6(6):405-407.
- Multigner, L., et Kadhel, P. **2004**. "Exposition à des polluants environnementaux chez la femme enceinte et son enfant en Guadeloupe : Niveaux de chlordécone dans le sang maternel et études des déterminants de l'imprégnation". *Inserm U625 & Service Gynécologie-obstétrique CHU Point-à-Pitre*.
- Multigner, L., Kadhel, P., Huc-Terki, F., Thome, J., Janky, E., et Auger, J. **2006**. "Exposure to chlordecone and male fertility in Guadeloupe (French West Indies)", *Epidemiology* 17(6):S372-S372.
- Multigner, L., Ndong, J. R., Giusti, A., Romana, M., Delacroix-Maillard, H., Cordier, S., Jegou, B., Thome, J. P., et Blanchet, P. **2010**. "Chlordecone exposure and risk of prostate cancer", *Journal of Clinical Oncology* 28(21):3457-3462.
- Murthy, H. R., et Manonmani, H. K. **2007**. "Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium", *Journal of hazardous materials* 149(1):18-25.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., et Uitierlinden, A. G. **1993**. "Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", *Applied and Environmental Microbiology* 59:695-700.
- Neuenschwander, P. **1988**. "Prospects and proposals for biological control of *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) in Africa", *Proceedings of a workshop in Bujumbura, Burundi*.
- Nichols, M. M. **1990**. "Sedimentologic fate and cycling of Kepone in an estuarine system: exemple from the James River estuary", *Science of the Total Environment* 97/98:407-440.
- Niepceron, M., Beguet, J., Portet-Koltalo, F., Martin-Laurent, F., Quillet, L., et Bodilis, J. **2014**. "Low impact of phenanthrene dissipation on the bacterial community in grassland soil", *Environmental Science and Pollution Research* 21(4):2977-2987.
- Nyström, B., Björnsäter, B., et Blanck, H. **1999**. "Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms: growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities", *Aquatic toxicology* 47(1):9-22.
- Oades, J. M. **1984**. "Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management", *Plant and Soil* 76:319-337.
- OCDE301B **2013**. "Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques; Essai n°301 : Biodégradabilité facile", 63 pages. *Organisation de coopération et de développement économiques*.
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., et Schleper, C. **2003**. "Diversity and abundance of *Crenarchaeota* in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR", *Environmental Microbiology Reports* 1 5:787-797.
- Orndorff, S. A., et Colwell, R. R. **1980**. "Microbial transformation of Kepone", *Applied and Environmental Microbiology* 39(2):398-406.
- Ortega, S. N., Nitschke, M., Mouad, A. M., Landgraf, M. D., Rezende, M. O. O., Selegim, M. H. R., Sette, L. D., et Porto, A. L. M. **2011**. "Isolation of brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide", *Biodegradation* 22(1):43-50.
- Palmiter, R. D., et Mulvihill, E. R. **1978**. "Estrogenic activity of the insecticide kepone on the chicken oviduct.", *Science* 201:356-358.
- Patriarca, E. **2006**. "Une terre gorgée de poison", *Libération*. http://www.liberation.fr/grand-angle/2006/01/06/une-terre-gorgee-de-poison_25611
- Pereira e Silva, M. C., Semenov, A., Schmitt, H., Dirk van Elsas, J., et Falcão Salles, J. **2013**. "Microbe-mediated processes as indicators to establish the normal operating range of soil functioning", *Soil Biology and Biochemistry* 57:995-1002.

- Pesce, S., Margoum, C., et Montuelle, B. **2010**. "In situ relationships between spatio-temporal variations in diuron concentrations and phototrophic biofilm tolerance in a contaminated river", *Water Research* 44(6):1941-1949.
- Pesce, S. F., et Wunderlin, D. A. **2004**. "Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment", *International biodeterioration & biodegradation* 54(4):255-260.
- Petersen, G., Rasmussen, D., et Gustavson, K. **2007**. "Study on enhancing the endocrine disrupter priority list with a focus on low production volume chemicals. ", *DHI water & environment for European Commission Directorate-General for the Environment*:1-249.
- Petrić, I., Bru, D., Udiković-Kolić, N., Hršak, D., Philippot, L., et Martin-Laurent, F. **2011**. "Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation", *Journal of Hazardous Materials* 195:254-260.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N., Čuhel, J., Arrouays, D., Šimek, M., et Hallin, S. **2009**. "Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree", *Environmental Microbiology* 11(12):3096-3104.
- Picot, A., et Rabache, M. **2005**. "Fiche toxico écotoxicologique n°3 : chlordécone (Képone)", 7 pages. *Association Toxicologie - Chimie / Conservatoire National des Arts et Métiers*.
- Piro, P. **2014**. "Chlordécone aux Antilles : la contamination est massive, la justice prend son temps", *Reporterre*. <http://www.reporterre.net/spip.php?article5297>
- Piutti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G., et Martin-Laurent, F. **2002**. "Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil", *Biology and fertility of soils* 36(6):434-441.
- Poly, J. **1978**. "Pour une agriculture plus économe et plus autonome", 65 pages. *Paris INRA*.
- Pons, F. **2002**. "En Martinique, patates douces et toxiques durs", *Libération*. http://www.liberation.fr/societe/2002/10/12/en-martinique-patates-douces-et-toxiques-durs_418298
- RAIS **2006**. "Toxicity and chemical-specific factors data base (Kepone)". *Risk Assessment Information System*.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J. C., Mougel, C., Thioulouse, J., et Nazaret, S. **2001**. "Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability", *Applied and Environmental Microbiology* 67(10):4479-4487.
- Rateau, F. **2013**. "Les produits phytosanitaires dans les cours d'eau de Martinique", 48 pages. *Office De l'Eau de Martinique*.
- Reuber, M. D. **1979**. "The carcinogenicity kepone", *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 2(3):671-686.
- Robert, S. **2011**. "Historique de la contamination de sédiments littoraux des Antilles françaises par la chlordécone (ChloSed)", 92 pages. *Convention MAAP-Ifremer*.
- Roche, R., et Abreu, S. **1983**. "Control del picudo negro del platano (*Cosmopolites sordidus*) por la hormiga *Tetramorium guineense*", *Ciencias de la Agricultura* 17:41-49.
- Rocle, N., Abarnou, A., Achard, R., Arimone, A., Bertrand, J.-A., Bocquene, G., Catlow, A., Dao, J.-C., De la Foye, F.-X., Edmond, S., Gresser, J., Marie, P., Nivet, A.-C., Pinte, K., Tixier, P., Jannoyer, M., Devault, D., et Bodiguel, X. **2009**. "Modalités de transfert de la chlordécone dans les eaux superficielles et évaluation de la contamination des ressources halieutiques : Site atelier de la baie du Robert", 140 pages. *IFREMER - PRAM*.
- Rodan, B. D., Pennington, D. W., Eckley, N., et Boethling, R. S. **1999**. "Screening for persistent organic pollutants: Techniques to provide a scientific basis for POPs criteria in international negotiations", *Environmental Science & Technology* 33(20):3482-3488.
- Saaidi, P.-L., Ugarte, E., Chaussonerie, S., Barbance, A., Marie, L., Fossey, A., Bröls, T., Barbe, V., Gyapay, G., Fonknecht, N., Salanoubat, M., Weissenbach, J., et Le Paslier, D. **2014**. "La chlordécone est-elle biodégradable ?", *44^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides*,

- Université Antilles-Guyane, Schœlcher, Martinique (France). Vidéo disponible sur <http://www.manioc.org/fichiers/V14183>
- Saffache, P., Blanchart, E., Cabidoche, Y. M., Josien, E., Michalon, T., Saudubray, F., et Scherer, C. **2005**. "Contexte de l'agriculture martiniquaise : atouts et contraintes pour l'agriculture biologique", dans: "*Agriculture biologique en Martinique*", pages 40-80. IRD éditions 2005.
- Safferman, S. I., Lamar, R. T., Vonderhaar, S., Neogy, R., Hought, R. C., et Krishnan, E. R. **1995**. "Treatability study using *Phanerochaete sordida* for the bioremediation of DDT contaminated soil.", *Toxicology and Environmental Chemistry* 50:237-251.
- Sakakibara, F., Takagi, K., Kataoka, R., Kiyota, H., Sato, Y., et 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", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411(1):76-81.
- Scheringer, M. **2009**. "Long-range transport of organic chemicals in the environment", *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(4):677-690.
- Scheringer, M., MacLeod, M., et Wegmann, F. **2006**. "Analysis of four current POP candidates with the OECD P_{ov} nad LRTP screening tool".
- Scheunert, I., et Korte, F. **1985**. "Comparative laboratory and outdoor studies on the behavior of ¹⁴C-labelled chlorinated benzenes in soil", *Contaminated Soil* 141-143.
- Schrauzer, G. N., et Katz, R. N. **1978**. "Reductive dechlorination and degradation of mirex and kepone with vitamin-B-12s", *Bioinorganic Chemistry* 9(2):123-143.
- Semple, K. T., Doick, K. J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., et Harms, H. **2004**. "Peer reviewed: defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated", *Environmental Science & Technology* 38(12):228A-231A.
- Sharer, M., Park, J. H., Voice, T. C., et Boyd, S. A. **2003**. "Aging effects on the sorption-desorption characteristics of anthropogenic organic compounds in soil", *Journal of environmental quality* 32(4):1385-1392.
- Shin, Y. O., Chodan, J. J., et Wolcott, A. R. **1970**. "Adsorption of DDT by soils, soil fractions, and biological materials", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18(6):1129-1133.
- Sirjusingh, C., Kermarrec, A., Mauléon, H., Pavis, C., et Etienne, J. **1992**. "Biological control of weevils and whitegrubs on bananas and sugarcane in the caribbean", *Florida Entomologist* 75(4):548-562.
- Smith, D., Alvey, S., et Crowley, D. E. **2005**. "Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil", *Fems Microbiology Ecology* 53(2):265-273.
- 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.
- Soileau, S. D., et Moreland, D. E. **1983**. "Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat-liver mitochondria", *Toxicology and Applied Pharmacology* 67(1):89-99.
- Sørensen, S. R., Albers, C. N., et Aamand, J. **2008**. "Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. strain SRS16 in pure culture and within a two-member consortium", *Applied and Environmental Microbiology* 74(8):2332-2340.
- Soulas, G. **1993**. "Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil", *Soil Biology and Biochemistry* 25(4):443-449.
- Squibb, R. E., et Tilson, H. A. **1982**. "Effects of gestational and perinatal exposure to chlordecone (Kepone) on the neurobehavioral development of Fischer-344 rats.", *Neurotoxicology* 3(2):17-26.
- Srinivasan, P. T., et Viraraghavan, T. **2000**. "An analysis of the Modified Sturm Test data", *Chemosphere* 40(1):99-102.
- Sterrett, F. S., et Boss, C. A. **1977**. "Careless Kepone". *Scientists' Institute for Public Information*.
- Strobel, C. J., Croonenberghs, R. E., et Huggett, R. J. **1981**. "The suspended sediment-water partitioning coefficient for Kepone in the James River, Virginia", *Environmental Pollution Series B-Chemical and Physical* 2(5):367-372.

- Susarla, S., Medina, V. F., et McCutcheon, S. C. **2002**. "Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination.", *Ecological Engineering* 18:647-658.
- Swartz, W. J., Eroschenko, V. P., et Schutzmann, R. L. **1988**. "Ovulatory response of chlordecone (Kepone)-exposed mice to exogenous gonadotropins", *Toxicology and Applied Pharmacology* 51(2-3):147-153.
- Taylor, J. R., Selhorst, J. B., Houff, S. A., et Martinez, A. J. **1978**. "Chlordecone intoxication in man. 1. Clinical observations", *Neurology* 28(7):626-630.
- Tillieut, O., et Cabidoche, Y.-M. **2006**. "Cartography of soils CLD pollution in Guadeloupe". *DAAF-SA et INRA-ASTRO*.
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Gossel, H., James, A., et Marchand, M. **2005**. "Les substances prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau", 92 pages. *IFREMER*.
- Topp, E. M., Van Daele, P., De Saeyer, N., et Forney, L. J. **1998**. "Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids", *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73(1):87-94.
- Torny, D. **2010**. "Gérer une pollution durable. Le cas du chlordécone aux Antilles françaises.", *Courrier de l'environnement de l'INRA* 59:61-71.
- Torny, D. **2011**. "D'une pollution des eaux à une contamination alimentaire : la gestion sanitaire du chlordécone aux Antilles.", *Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut de Veille Sanitaire* 3-4-5:22-24.
- Traoré, L., Boivin, G., Gold, C., et Pilon, J.-G. **1991**. "Evaluation de l'efficacité des parasitoïdes indigènes des oeufs et des "nouvelles associations" pour la lutte biologique contre le charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus* en Afrique de l'Ouest : Protocole de recherches", *Biological and integrated control of highland banana and plantain pests and diseases; Proceedings of a research coordination meeting*, Cotonou, Bénin.
- Tsai, W. T. **2010**. "Current Status and Regulatory Aspects of Pesticides Considered to be Persistent Organic Pollutants (POPs) in Taiwan", *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(10):3615-3627.
- Udiković-Kolić, N., Scott, C., et Martin-Laurent, F. **2012**. "Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment", *Applied microbiology and biotechnology* 96(5):1175-1189.
- UNEP **2006**. "Rapport du comité d'étude des polluants organiques persistants sur les travaux de la deuxième réunion : Descriptifs des risques liés au chlordécone", 32 pages. *United Nations Environment Programme (UNEP)*.
- Vaccari, A., et Saba, P. **1995**. "The tyramine-labelled vesicular transporter for dopamine: a putative target of pesticides and neurotoxins", *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* 292(3):309-314.
- Van Aken, B. **2011**. "La phytoremédiation des pesticides Mirex et Chlordécone", dans: "*Les cahiers du PRAM n°9-10, Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles*", pages 54-59.
- van Gestel, C. A. **2012**. "Soil ecotoxicology: state of the art and future directions", *ZooKeys* 176:275.
- Vilardebo, A. **1984**. "Problèmes scientifiques posés par *Radopholus similis* et *Cosmopolites sordidus* en cultures bananières des zones francophones de production", *Fruits* 39(4):227-233.
- Vilardebo, A., Beugnon, M., Melin, P., Lecoq, J., et Aubert, B. **1974**. "Chlordécone et autres insecticides dans la lutte contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus* GERM", *Fruits* 29(4):267-278.
- Vos, M., Wolf, A. B., Jennings, S. J., et Kowalchuk, G. A. **2013**. "Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil", *FEMS microbiology reviews* 37(6):936-954.
- Vulykh, N., Dutchak, S., Mantseva, E., et Shalatov, V. **2006**. "EMEP contribution to the preparatory work for the review of the Convention on Long-range Transboundary Air Pollution protocol on persistent organic pollutants", 21 pages. *United Nations Environment Programme (UNEP)*.
- Wagner, G. E., et Dixon, D. M. **1981**. "Isolation of fungi from organochlorine pesticide waste", *Mycopathologia* 75(1):61-63.

- Wang, K., Weida, T., Goodwin, T. E., Perkins, R., Sheehan, D. M., et Compadre, C. M. **2001**. "Does kepone really exist ?", In *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (Vol. 221, pp. U475-U476)*. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC.
- Weatherford, C. **1997**. "Continuum State Calculations in Atmospheric Physics", *Florida agricultural and mechanical, univ Tallahassee*.
- Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, J. K., et Hallin, S. **2010**. "Differential responses of bacterial and archaeal at high taxonomical ranks to soil management", *Soil Biology and Biochemistry* 42:1759-1765.
- White, J. **2011**. "Phyto-extraction de polluants organiques persistants altérés", dans: "*Les cahiers du PRAM n°9-10, Remédiation à la pollution par la chlordécone aux Antilles*", pages 61-63.
- White, J. C., Parrish, Z. D., Isleyen, M., Gent, M. P. N., Iannucci-Berger, W., Eitzer, B. D., et Mattina, M. J. I. **2005**. "Uptake of weathered p,p'-DDE by plant species effective at accumulating soil elements", *Microchemical Journal* 81(1):148-155.
- WHO **1984**. "Environmental health criteria for chlordecone n°43". *World Health Organization*.
- Willis, G. H., McDowell, L. L., Harper, L. A., Southwick, L. M., et Smith, S. **1983**. "Seasonal disappearance and volatilization of toxaphene and DDT from a cotton field", *Journal of Environmental Quality* 12(1):80-85.
- Wilson, S. S. **2011**. "Kepone's legacy", *The Hopewell News*. <http://www.hopewellnews.com/news/exec/view.pl?archive=2&num=3468>
- Woignier, T., Clostre, F., Macarie, H., et Jannoyer, M. **2012**. "Chlordecone retention in the fractal structure of volcanic clay", *Journal of Hazardous Materials* 241:224-230.
- Woignier, T., Fernandes, P., Soler, A., Clostre, F., Carles, C., Rangon, L., et Lesueur-Jannoyer, M. **2013**. "Soil microstructure and organic matter: keys for chlordecone sequestration.", *Journal of Hazardous Materials* 262:357-364.
- Woignier, T., Pochet, G., Doumenc, H., Dieudonne, P., et Duffours, L. **2007**. "Allophane: a natural gel in volcanic soils with interesting environmental properties", *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 41(1):25-30.
- Wong, F., Alegria, H. A., et Bidleman, T. F. **2010**. "Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil-air exchange.", *Environmental Pollution* 158(3):749-755.
- Wu, J., et Yu, H. Q. **2006**. "Biosorption of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution by *Phanerochaete chrysosporium* biomass: Isotherms, kinetics and thermodynamics", *Journal of Hazardous Materials* 137(1):498-508.
- Xing, B. S. **2001**. "Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids", *Environmental Pollution* 111(2):303-309.
- Zhang, M. X., Eaton, P. E., et Gilardi, R. **2000**. "Hepta- and octa-nitrocubanes", *Angewandte Chemie International Edition* 39(2):401-404.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., et Vantriet, K. **1990**. "Modeling of the bacterial-growth curve", *Applied and Environmental Microbiology* 56(6):1875-1881.

Règlementation

Règlementation européenne

Directive européenne 67/548/CEE du 27 juin **1967** concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:31967L0548&from=FR>

Directive européenne 79/117/CEE du 21 décembre **1978** concernant l'interdiction de la mise sur le marché et d'utilisation des produits phytopharmaceutiques contenant certaines substances actives.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31979L0117:FR:HTML>

Directive cadre européenne 91/414/CEE du 15 juillet **1991** concernant la mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques.

http://www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/296176850536017815303394166950/directive_91_414_CEE_fr.pdf

Règlement européen (CE) n°850/2004 du 29 avril **2004** concernant les polluants organiques persistants et modifiant la directive 79/117/CEE

http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/447/version_pdf

Règlement européen (CE) n°396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février **2005** concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=FR>

Règlement européen (CE) n°1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre **2008** relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CEE, et modifiant le règlement (CE) n°1907/2006. (chlordécone page 519 et mirex page 473)

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:fr:PDF>

Règlement européen (CE) n°1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre **2009** concernant la mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:FR:PDF>

Règlementation nationale

Arrêté ministériel du 5 juillet **1982** relatif aux conditions de délivrance et d'emploi en agriculture de substances vénéneuses (version en vigueur).

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000292978>

Arrêté préfectoral de Martinique n°030725 du 20 mars **2003** instituant des analyses préventives de sols pour la recherche d'organochlorés avant mise en culture.

http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/792687255649702413124252241714/arrete-analyse-sols_Martinique-mars03.pdf

Arrêté préfectoral de Guadeloupe n°1496-2003 du 20 octobre **2003** instituant des analyses préventives de sols pour la recherche d'organochlorés avant mise en culture.

<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/486920174118839665775919767592/arrete-analyse-sols-Guadeloupe-octobre03.pdf>

Arrêté ministériel du 5 octobre **2005** fixant la teneur maximale en chlordécone tolérée dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine

<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/890950301230666866433863582907/arrete-teneur-maximale-chlordecone-5oct05.pdf>

Arrêté ministériel du 10 octobre **2005** fixant la teneur maximale en chlordécone tolérée dans les denrées d'origine végétale destinées à la consommation humaine

<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/311331321502878440670400867961/arrete-teneur-maximale-chlordecone-10oct05.pdf>

Arrêté ministériel du 30 juin **2008** relatif aux limites maximales applicables aux résidus de chlordécone que ne doivent pas dépasser certaines denrées alimentaires d'origine animale et végétale pour être reconnue propres à la consommation humaine.

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000019117823>

Arrêté préfectoral de Martinique n°2012191-0013 du 9 juillet **2012** portant interdiction de la pêche dans la baie du François.

<http://www.martinique.territorial.gouv.fr/actes3/files/fichieracte1572.pdf>

Arrêté préfectoral de Martinique n°2012191-0014 du 9 juillet **2012** portant interdiction de la pêche dans la baie du Robert.

<http://www.martinique.territorial.gouv.fr/actes3/files/fichieracte1573.pdf>

Arrêté préfectoral de Martinique n°2012191-0015 du 9 juillet **2012** portant interdiction de la pêche dans la baie de la Trinité/Sainte-Marie.

<http://www.martinique.territorial.gouv.fr/actes3/files/fichieracte1574.pdf>

Arrêté préfectoral de Guadeloupe PREF/DAAF n°2012-747 du 30 juin **2012** portant interdiction de consommer certaines espèces de gibier à plumes potentiellement contaminées par la chlordécone.

http://www.guadeloupe.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Arr_interdiction_consommation_oiseaux_2012.pdf

Arrêté préfectoral de Martinique n°2012335-0003 du 30 novembre **2012** réglementant la pêche et la mise sur le marché des espèces de la faune marine dans certaines zones maritimes de la Martinique en lien avec les bassins versants contaminés par la chlordécone.

<http://www.martinique.territorial.gouv.fr/actes3/files/fichieracte3085.pdf>

Arrêté préfectoral de Guadeloupe n°2013177-0012 du 26 juin **2013** réglementant la pêche et la commercialisation des espèces de la faune marine dans certaines zones maritimes de la Guadeloupe.

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000292978>

Arrêté préfectoral de Martinique n°2013198-0013 du 17 juillet **2013** portant interdiction de la pêche dans la baie de Case-Pilote.

<http://www.martinique.territorial.gouv.fr/actes3/files/fichieracte5427.pdf>

Sites internet

Carte Martinique d'interdiction de pêche

http://cartes.observatoire-eau-martinique.fr/interdiction_peche_plaisance/flash/

Chimie des cubanes

Département de chimie de l'Imperial College London

<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/wang/index.html>

http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/b_muir/Cubane/Cubanepro/Applications.html

Page de Philip Eaton de l'Université de Chicago

<https://chemistry.uchicago.edu/faculty/faculty/person/member/philip-e-eaton.html>

Page de Anthony Melvin Crasto (PhD)

<http://fr.slideshare.net/anthonycrasto64/the-magic-of-cubane>

Convention de Stockholm

<http://www.cancer->

[environnement.fr/LinkClick.aspx?fileticket=rnJl3Zu4Cvo%3d&tabid=179&mid=901](http://www.cancer-environnement.fr/LinkClick.aspx?fileticket=rnJl3Zu4Cvo%3d&tabid=179&mid=901)

<http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>

E-phy : le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France

<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>

Etude KANNARI : Santé, nutrition, et exposition au chlordécone aux Antilles – volet exposition. Robert, M., Guldner, L., Rosine, J., Merlo, M., Castetbon, C., Merle, S., Neller, N., Colard, M., Cornely, V., Pitot, S., Petit-Sinturel, M., Cassadou, S., Ledrans, M., Blateau, A.

<http://www.invs.sante.fr/content/download/52381/220254/version/1/file/2+-+Etude+Kannari.pdf>

INRA Trans-FAIRE Antilles-Guyane : lutte contre le charançon du bananier.

<http://transfaire.antilles.inra.fr/spip.php?article8>

Plaquettes CIRAD

« Du bassin versant à l'assiette : le transfert de la chlordécone »

http://antilles-guyane.cirad.fr/content/download/5153/36512/version/1/file/obj_8581_file_Transfert-de-la-chlordecone.pdf

« La chlordécone et les végétaux »

<http://www.caec-carib.org/actualite/2014-fiche-chd-vegetaux.pdf>

« La chlordécone et les volailles »

<http://www.caec-carib.org/actualite/2014-fiche-chd-volailles.pdf>

« Élevage et chlordécone : préconisations »

http://daaf971.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Plaqueette-Chlordecone-Elevage-2013_cle8cf6d4.pdf

« Transfert de la chlordécone du sol vers les cultures »

<http://ur-hortsys.cirad.fr/content/download/4815/34365/version/1/file/fichesCLDcirad.pdf>

Pluviométrie en Basse-Normandie (IFREMER)

http://envlit.ifremer.fr/region/basse_normandie/milieu/climatologie/la_pluviometrie

Site internet du programme Jafa

<http://jafa.ireps.gp/>

Protocole d'Aarhus

<http://www.unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/full%20text/1998.Pops.f.pdf>

http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.html

<http://www.unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/full%20text/ece.eb.air.104.f.pdf>

Vue dorsale d'un charançon noir adulte du bananier, Cosmopolites sordidus

http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/borers/banana_root_borer.htm

Wikipédia

logK_{ow} de l'atrazine

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Atrazine>

logK_{ow} du saccharose

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Saccharose>

Annexes

ANNEXE 1 : 'Supplementary files' de l'article 1

Figures supplémentaires de l'article 'Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the FWI by GC-MS using the $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone as a tracer' (Martin-Laurent *et al.* 2014).

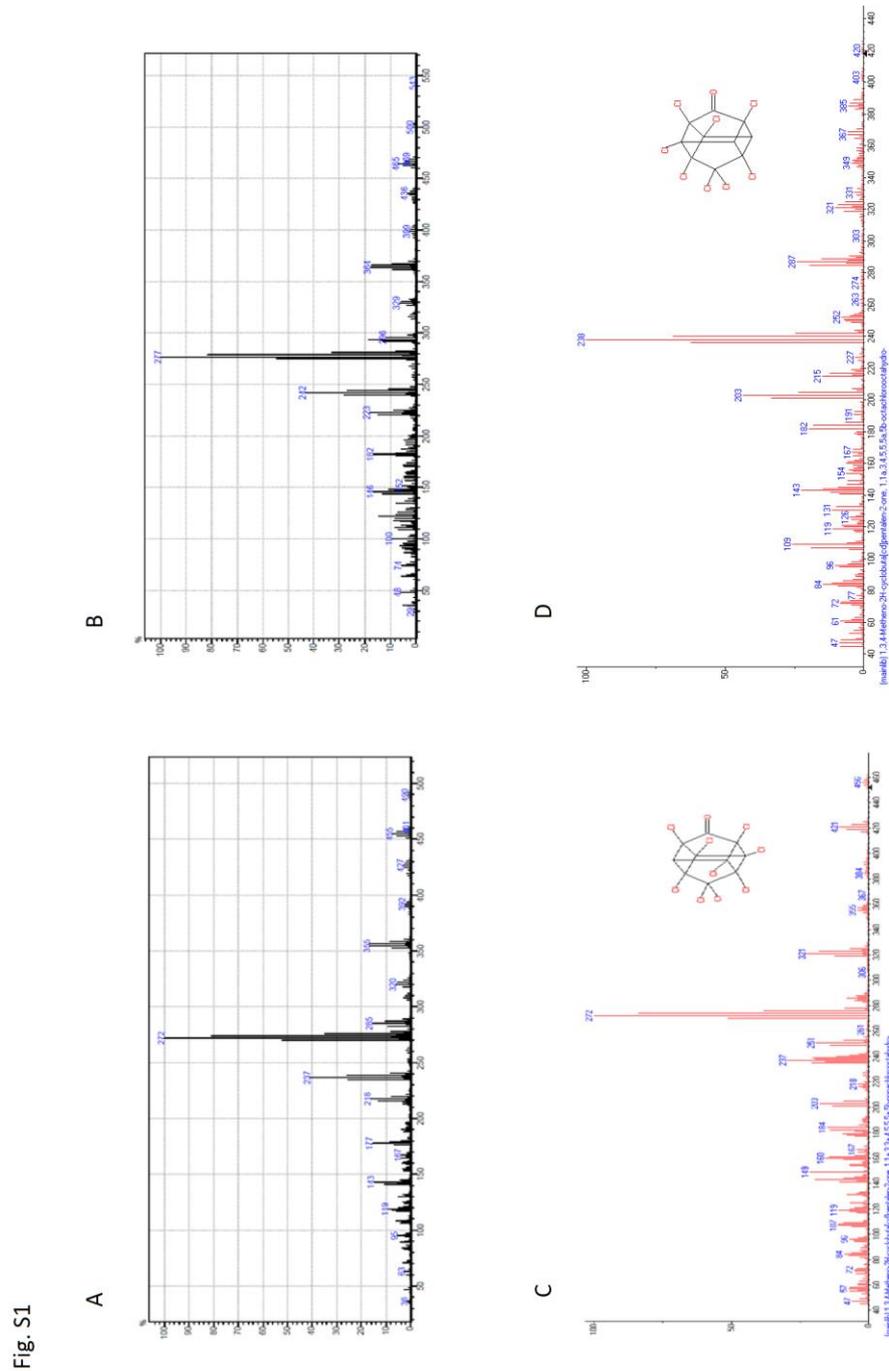


Figure S1. Panel A. Mass spectrum of ^{12}C -chlordecone. Panel B. Mass spectrum of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone. Panel C. Mass spectrum of β -monohydrochlordecone. Panel D. Mass spectrum of dihydrochlordecone.

Fig. S2

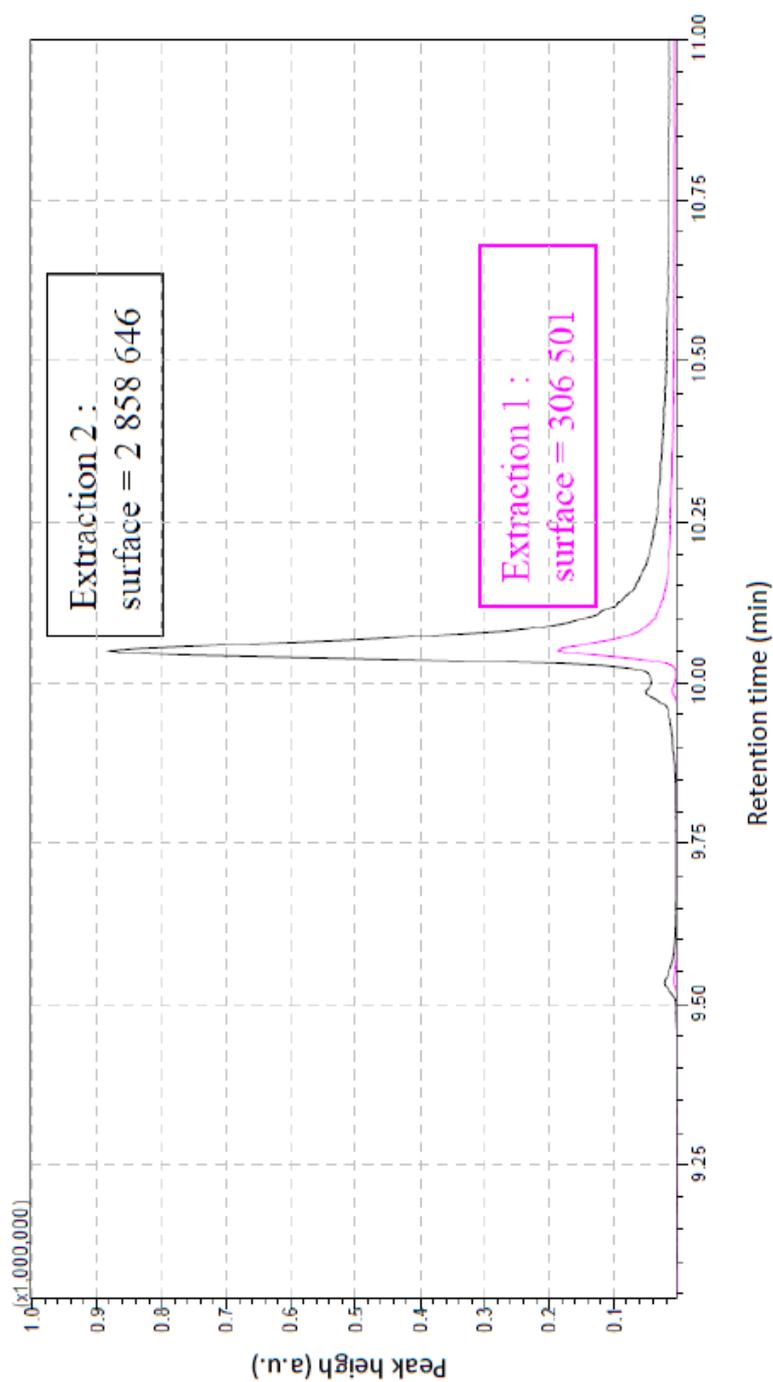


Figure S2. Influence of the homogenization buffer on the amount of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone extracted and quantified by GC-ECD/MS from the Andosol. Extraction 1: homogenization in phosphate buffer. Extraction 2: homogenization in phosphate buffer plus anhydrous sodium sulfate.

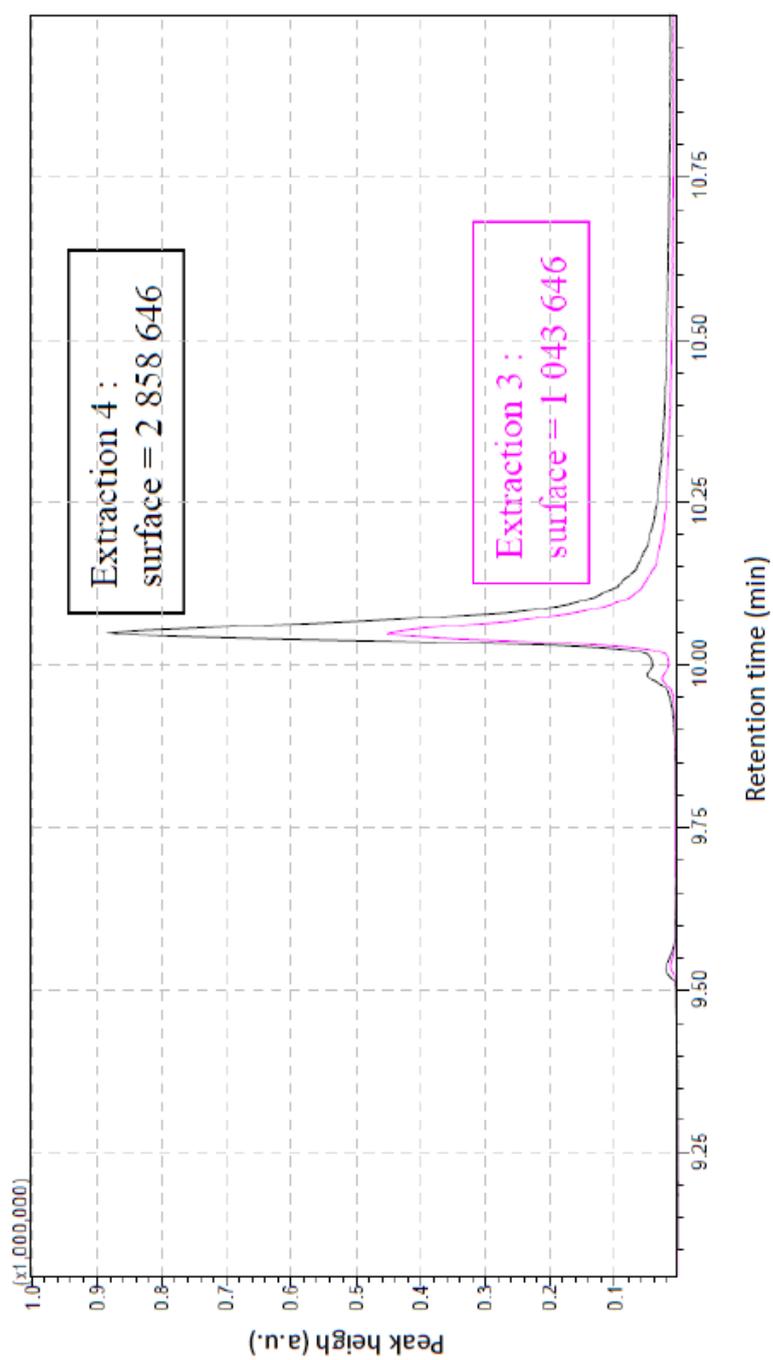


Fig. S3

Figure S3: Influence of the solvent on the amount of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlordecone extracted and quantified by GC-ECD/MS from the Andosol. Extraction 3: pentane/acetone (v/v). Extraction 4: dichloromethane.

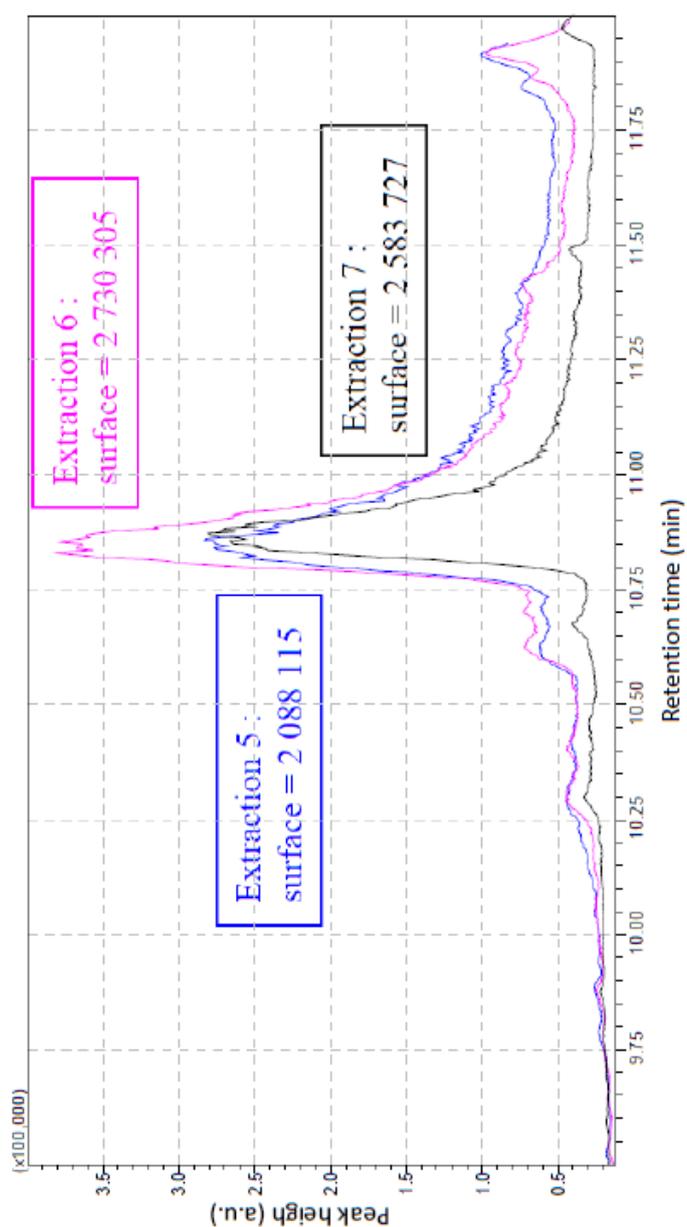


Fig. S4

Figure S4. Influence of the pH of the homogenization buffer on the amount of $^{13}\text{C}_{10}$ -chlorodecane extracted and quantified by GC-ECD/MS from the Andosol. Extraction 5: 100 mM phosphate buffer at pH = 3. Extraction 6: 100 mM phosphate buffer at pH = 7. Extraction 7: 100 mM phosphate buffer at pH = 11.

ANNEXE 2 : 'Supplementary file' de l'article 2

Figure supplémentaire de l'article 'Characterization of chlodecone-tolerant fungal populations isolated from long-term polluted tropical volcanic soil in the FWI' (Merlin *et al.* 2014).

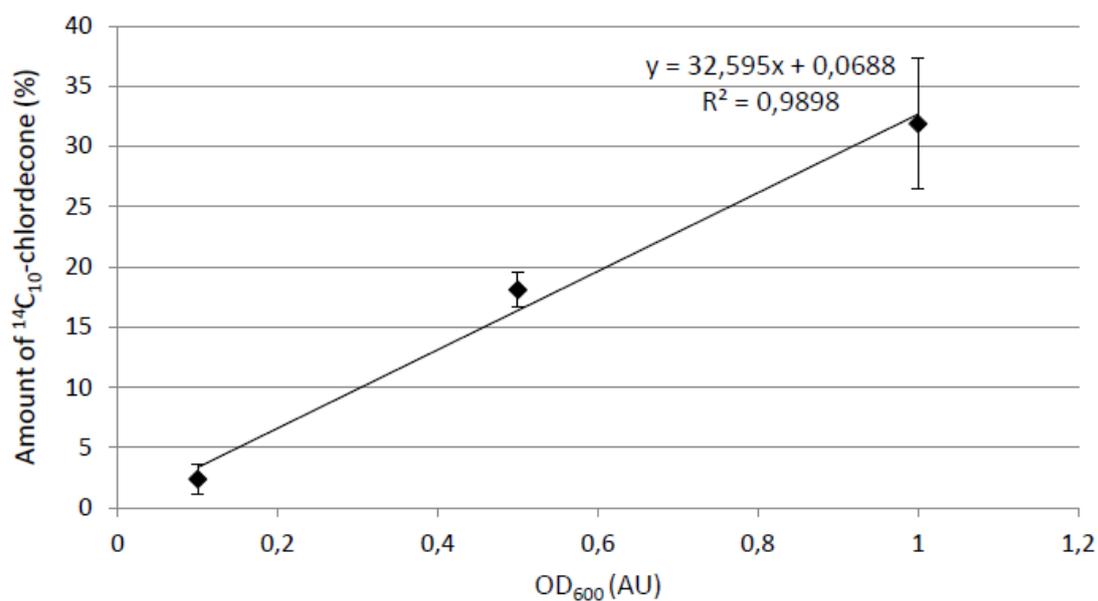
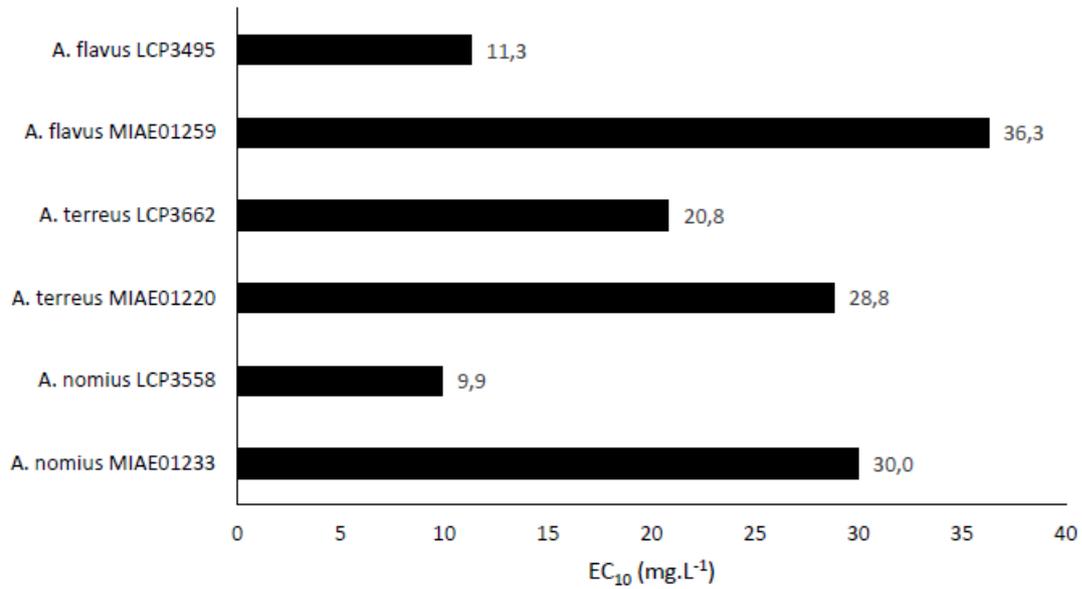


Figure S1. Amount of ¹⁴C₁₀-chlordecone adsorbed to fungal biomass measured in 0.1, 0.5 and 1 OD₆₀₀ *F. oxysporum* MIAE01197 suspension cultures. Linear relationship calculated between the amount of ¹⁴C₁₀-chlordecone adsorption and fungal biomass.

ANNEXE 3 : 'Supplementary file' de l'article 3

Figure supplémentaire de l'article 'Characterization of chlordecone biosorption capacities of fungal species isolated from a long term polluted soil' (Merlin *et al.* in preparation).



Supplementary data. Effective concentrations of chlordecone that decrease biomass production by 10% compared to the control.

ANNEXE 4 : 'Supplementary file' de l'article 4

Figure supplémentaire de l'article 'Evaluation of ecotoxicological impact of the organochlorine chlordecone on soil microbial community structure, abundance and function' (Merlin *et al.*, accepted with minor revision).

Degradating activity of soil microorganisms		Abundance of total bacterial community	Relative abundances of 11 microbial groups	Genetic structure of global bacterial community
Substrat ¹⁴ C-sodium acetate	A50	t20	qPCR 16S	ARISA
	-Soil effect (p< 0.05): At T3 and T7, CIC > VSG -Time effect (p< 0.05): For CIC, T3 and T7 > T32 For VSG, T3 < T32 -Dose effect (p< 0.05): For VSG, at T3, D0 < D10 D0 and D1 > D10	-Soil effect (p< 0.05): At T3 and T7, VSG > CIC -Time effect (p< 0.05): For CIC, T7 > T32 For VSG, T3 and T7 > T32 -Dose effect (p< 0.05): For VSG, at T3, D0 < D10 D0 and D1 > D10	-Soil effect (p < 0.01) : For <i>Actinobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , α - and γ - <i>proteobacteria</i> , VSG > CIC For <i>Acidobacteria</i> , <i>Gemmatimonadetes</i> , <i>Planctomycetes</i> and <i>Crenarchaea</i> , CIC > VSG -Time effect (p < 0.01): For VSG, β - <i>proteobacteria</i> , T3 > T32 -Dose effect (p < 0.01): For VSG, whatever the time: <i>Planctomycetes</i> , D0 < D1 β - <i>proteobacteria</i> , D1 < D0 and D10 <i>γ-proteobacteria</i> , D1 < D10 <i>Bacteroidetes</i> , D1 > D10	-Soil effect: Yes
¹⁴ C-2,4-D	-Soil effect (p< 0.05): Whatever the time, VSG > CIC -Time effect: No -Dose effect: No	-Time effect (p < 0.05): For VSG, T3 and T7 < T32 -Dose effect: No	-Time effect (p < 0.05): For VSG, T3 and T7 < T32 -Dose effect: No	-Time effect: Yes -Dose effect: No

Supplementary file. Summary of statistical analysis for each

CIC : Corcelles-lès-Cîteaux soil (Silty loam soil)

VSG : Varenne-Saint-Germain soil (Sandy loam soil)

Recherche de la signature biologique de la dégradation du chlordécone dans le sol des Antilles françaises

Résumé

L'utilisation du chlordécone (CLD) pour éradiquer les populations de charançon noir dans les bananeraies des Antilles françaises (Guadeloupe et Martinique) entre 1972 et 1993 a conduit à la contamination des sols et de l'environnement. Cet insecticide organochloré très hydrophobe persiste dans les sols d'où il transfère lentement vers les ressources en eau et vers les biotes terrestre et aquatique (plantes, animaux, poissons, crustacées). Réputé « indégradable », le CLD résiste à la photolyse, à l'hydrolyse et à la biodégradation. A ce jour, il n'existe pas de méthode pour remédier les 20 000 hectares de sols pollués avec cet insecticide. Compte-tenu de l'étendue de la pollution avec le CLD, les procédés biologiques de décontamination paraissent appropriés au contexte antillais. Les objectifs de mon travail de thèse étaient d'explorer les possibilités de transformation microbienne du CLD et l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne des sols. Mes travaux reposent sur l'hypothèse selon laquelle des populations microbiennes exposées de manière chronique au CLD se seraient adaptées à sa dégradation pour détoxifier leur environnement ou éventuellement pour l'utiliser comme source d'énergie pour leur croissance.

Pour cela, j'ai développé une méthode d'analyse du CLD dans les sols et les cultures microbiennes basée sur l'isotopie stable. J'ai conduit des expériences d'enrichissement à partir de sols de Guadeloupe pollués avec le CLD. Une centaine de souches fongiques et près de 200 souches bactériennes ont été isolées. Aucune souche bactérienne dégradante n'ont pu être mises en évidence bien que certaines formaient un halo de dissolution du CLD sur milieu gélosé. Parmi les isolats fongiques, seul *F. oxysporum* sp. MIAE01197 se développait sur un milieu minéral contenant le CLD comme seule source de carbone et dissipait 40% du CLD. Cet isolat était deux fois plus tolérant au CLD qu'un isolat de référence jamais exposé au CLD. Cet isolat minéralisait très peu le ¹⁴C-CLD, formait très peu de ¹⁴C-métabolites, mais le ¹⁴C-CLD s'adsorbait sur les parois fongiques, suggérant que l'adsorption était le principal mécanisme impliqué dans la dissipation du CLD. L'analyse de trois autres isolats appartenant au genre *Aspergillus* a confirmé que l'exposition au CLD était un des paramètres améliorant la tolérance des souches fongiques au CLD et que la biomasse fongique était capable d'adsorber le CLD dans des proportions proches de celles obtenues avec du charbon actif utilisé pour traiter l'eau potable aux Antilles.

L'évaluation de l'impact écotoxicologique du CLD sur la communauté microbienne et les fonctions qu'elle supporte a été menée sur deux sols aux propriétés physicochimiques contrastées n'ayant jamais été exposés au CLD. L'analyse de la structure globale (évaluée par RISA), de l'abondance et de l'activité de la communauté microbienne du sol argilo-limoneux n'étaient pas affectées par le CLD. En revanche, la composition taxonomique (qPCR) et l'activité respiratoire de la communauté microbienne étaient affectées par le CLD dans le sol sableux. Ces résultats montrent que la toxicité du CLD pour la communauté microbienne dépend des propriétés physicochimiques du sol qui conditionne sa biodisponibilité. Des études complémentaires devront être menées pour évaluer la toxicité possible du CLD sur des fonctions écosystémiques des sols des Antilles.

Mots-clefs : sols agricoles pollués, chlordécone, insecticide organochloré, communauté microbienne, dégradation, tolérance, sorption, écotoxicologie.

Directeur et co-encadrant de thèse : Fabrice Martin-Laurent et Marion Devers

Laboratoire d'accueil : INRA, UMR1347 Agroécologie, Pôle Ecoldur, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Financeurs : ADEME et Conseil Régional de Bourgogne.