

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE MAL

N° d'ordre :
Série :

THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT EN SCIENCES EN CHIMIE

PHOTO ET/OU BIOTRANSFORMATION DE L'IOXYNIL ET
DE QUELQUES DERIVES BENZOTHIAZOLIQUES

OPTION : PHOTOCHEMIE ET ENVIRONNEMENT

PAR

Moulay Abderrahmane MALOUKI

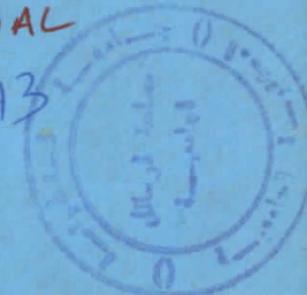
Devant le jury :

Président	: M. T. SEHILI	Professeur	Univ. Mentouri - Constantine
Rapporteur	: M. A. ZERTAL	Maître de Conférences	Univ. Mentouri - Constantine
Examineur	: Mme. A.M. DELORT	Directeur de Recherche	Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand II
Examineur	: Mme. R. DJAZI	Maître de Conférences	Univ. de Skikda
Examineur	: M. P. BOULE	Directeur de Recherche	Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand II
Examineur	: M. A. BOULKAMH	Maître de Conférences	Univ. Mentouri - Constantine

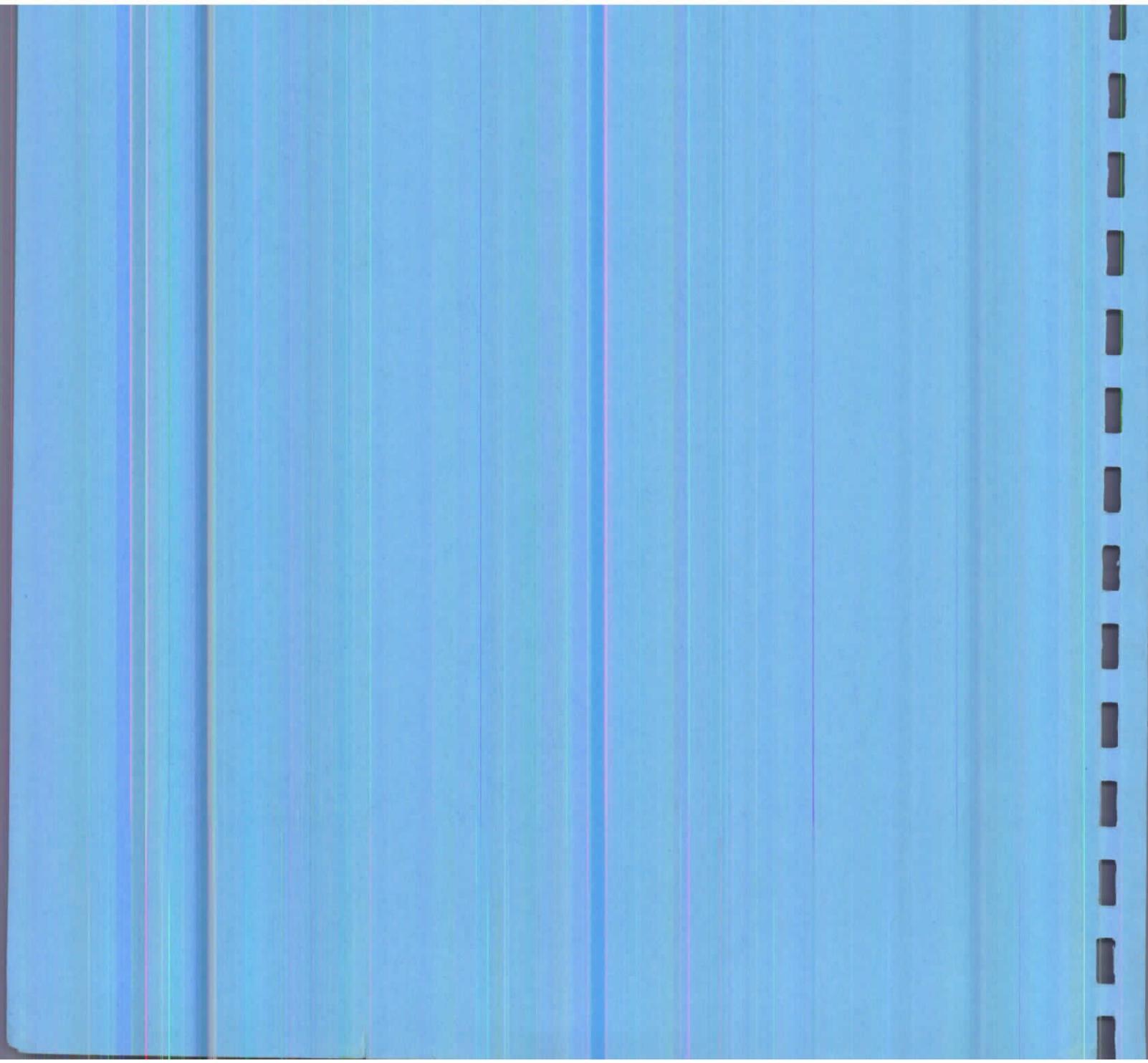
Soutenue publiquement le 14 juin 2004

Scan

4173



10



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :
Série :

THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT ES SCIENCES EN CHIMIE



PHOTO ET/OU BIOTRANSFORMATION DE L'IOXYNIL ET
DES DERIVES BENZOTHIAZOLIQUES

OPTION : PHOTOCHEMIE ET ENVIRONNEMENT

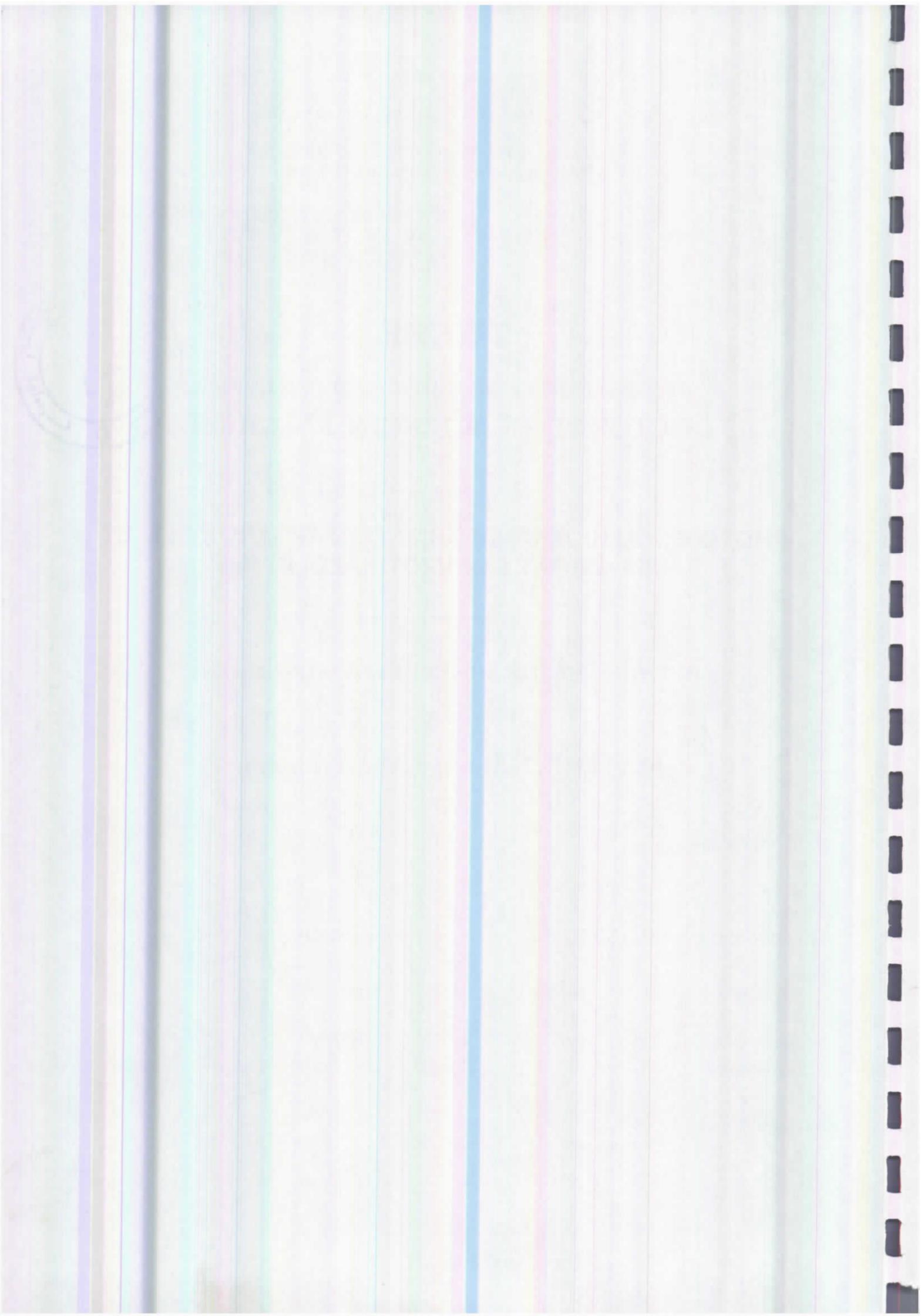
PAR

MALOUKI Moulay Abderrahmane

Devant le jury :

Président	: M. T. SEHILI	Professeur	Univ. Mentouri - Constantine
Rapporteur	: M. A. ZERTAL	Maître de Conférences	Univ. Mentouri - Constantine
Examineur	: Mme. A.M. DELORT	Directeur de Recherche	Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand II
Examineur	: Mme. R. DJAZI	Maître de Conférences	Univ. de Skikda
Examineur	: M. P. BOULE	Directeur de Recherche	Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand II
Examineur	: M. A. BOULKAMH	Maître de Conférences	Univ. Mentouri - Constantine

Soutenance prévue en Juin 2004



Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire des Sciences et Technologie de l'Environnement (LSTE) de l'Université Mentouri de Constantine, Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, UMR CNRS 6505 (LPMM) et au Laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR CNRS 6504 (LSESIB) de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (France).

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le professeur Tahar Sehili, Directeur du LSTE, pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse.

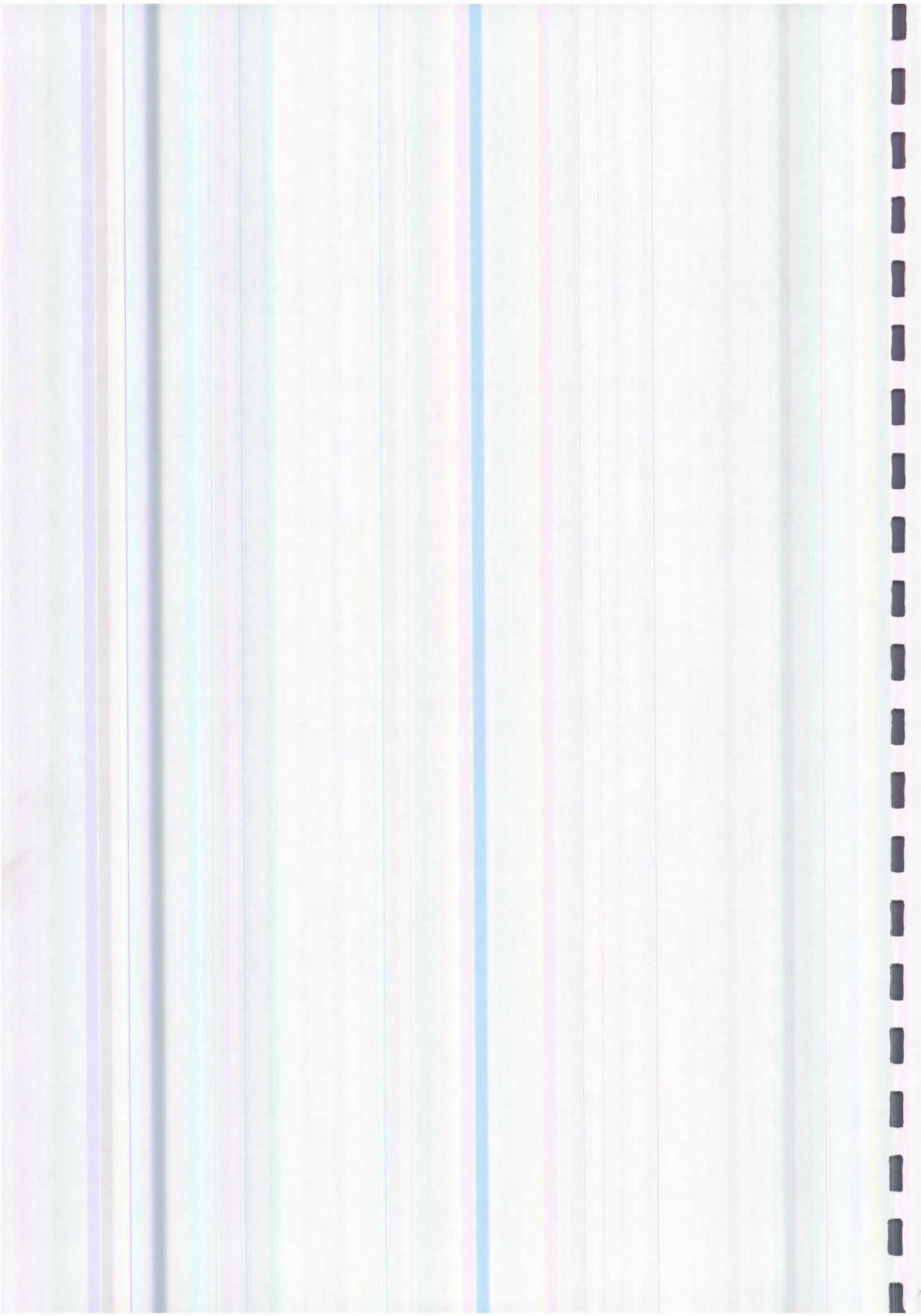
Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Abdennour Zertal, Maître de conférences à l'université de Constantine, que je remercie vivement pour l'aide et les conseils qu'il m'a prodigués.

Je remercie également Madame Anne-Marie Delort et Monsieur Pierre Boule, Directeurs de Recherche à l'Université Blaise Pascal de m'avoir accueilli dans leur équipe à Clermont-Ferrand et d'avoir bien voulu faire partie de ce jury de thèse. Je leur suis également très reconnaissant pour les riches enseignements qu'ils m'ont prodigués, l'intérêt constant et la grande disponibilité qu'ils ont su montrer à mon travail.

Je tiens à remercier Madame R. Djazi, Maître de conférences à l'université de Skikda et Monsieur Abdelaziz Boulkamh, Maître de conférences à l'université de Constantine pour avoir accepté de juger ce mémoire.

J'adresse à Madame Claire Richard, Directeur de Recherche à l'Université Blaise Pascal ma profonde gratitude pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée en photochimie de benzothiazoles en général et en photolyse Laser particulièrement sans toutefois oublier les conseils avisés qu'elle m'a prodigués.

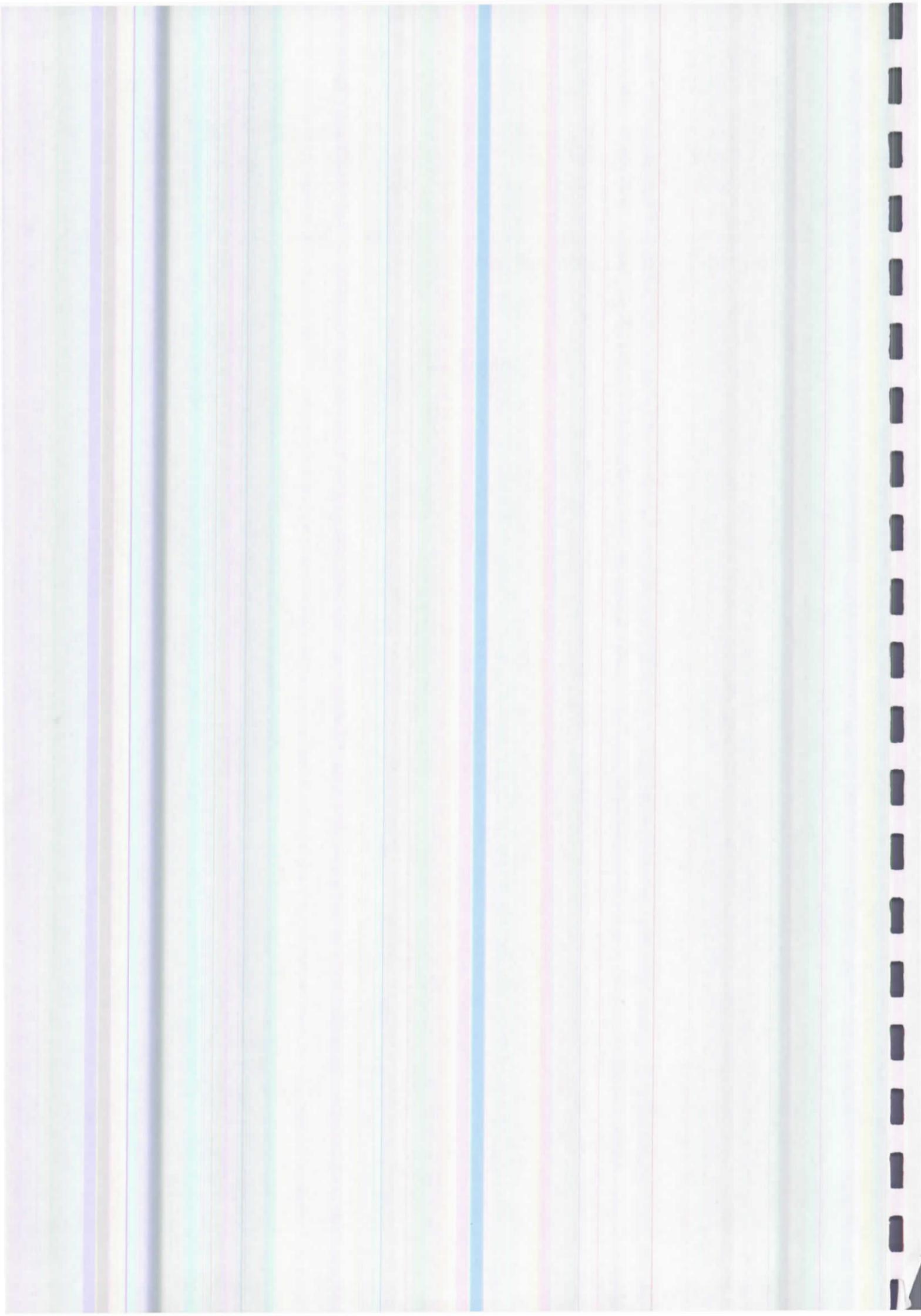
Je remercie également les membres du laboratoire SFH-SB qui m'ont aidé dans ce travail : Pascale Besse et Sandrine Boutevin pour les études de biodégradation et les analyses chromatographiques, Bouchra Combourt pour les études en RMN.



Je salue aussi Nicola Haroune Régis Nouaille, Redouane Affani, Othman Abida, Salah Rafqa, Ouarda Brahmia et Carolle étudiants en thèse qui m'ont témoigné beaucoup de sympathie au cours de mes stages en France.

En fin, je ne saurai oublier mes collègues du laboratoire LSTE pour l'amitié et la sympathie qu'ils m'ont témoignées.



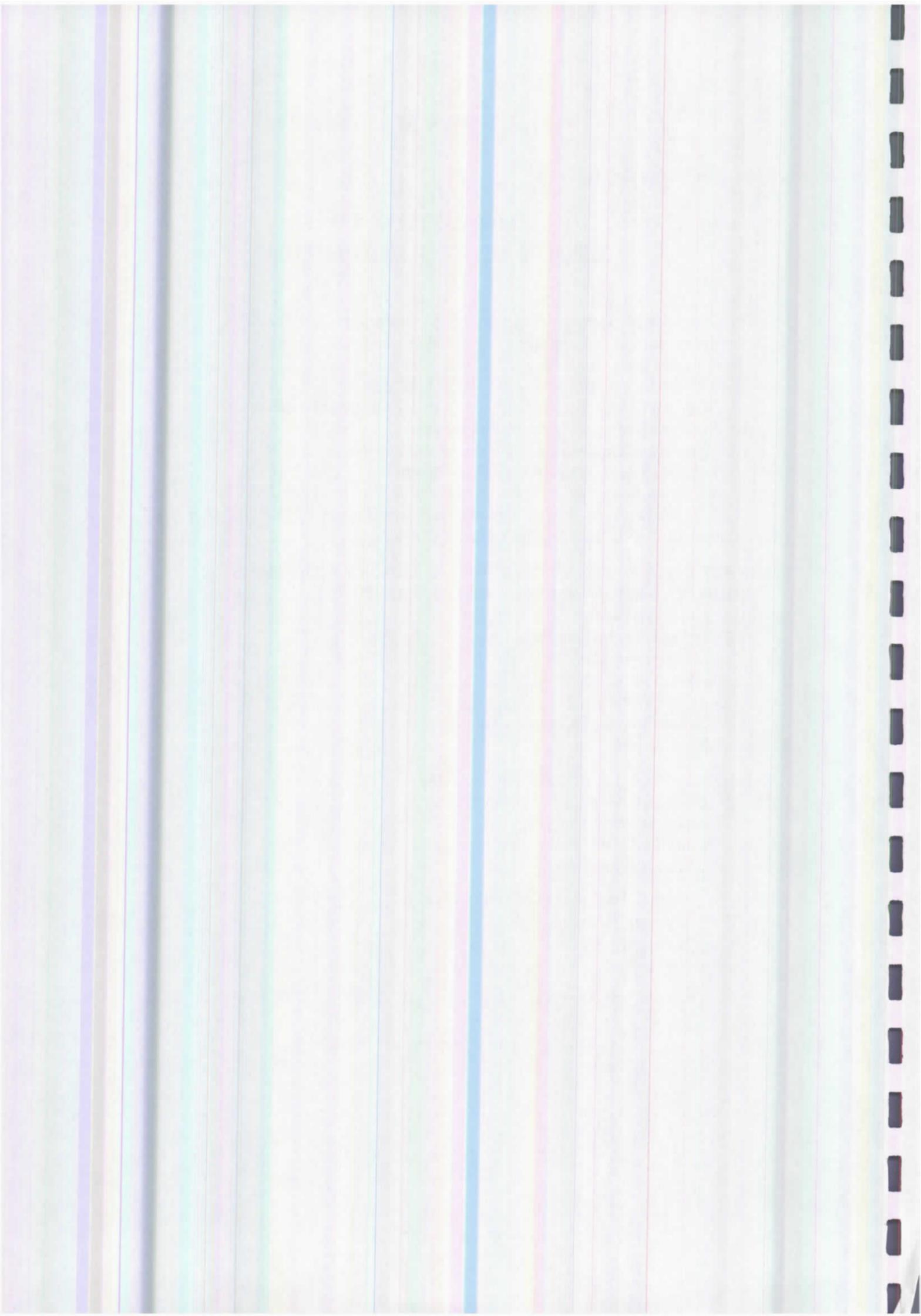


TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

CHAPITRE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- BENZOTHIAZOLES	4
I.1.1- Structure des benzothiazoles et Principales utilisations	4
I.1.2- Comportement photochimique des benzothiazoles	7
I.1.3- Toxicité des benzothiazoles	12
I.1.4- Biodégradations de Bt, OBT, ABT, BT ₂ SO ₃ et MBT	13
a)- Biodégradations par des boues activées ou des cultures mixtes	13
b)- Biodégradations par des souches pures	16
c)- Apport de la RMN dans l'étude des benzothiazoles	19
c1- Suivi de la cinétique par RMN ¹ H in situ	19
c2- Elucidation de la structure du métabolite 1 inconnu par RMN 2D	21
c3- Etude de l'effet des inhibiteurs spécifiques d'enzyme par RMN ¹ H in situ	23
I.1.5- Biotransformation du méthabenzthiazuron	24
I.2- MONOOXYGENASES ET DIOXYGENASES IMPLIQUEES DANS LA BIODEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES	31
I.2.1- Les monooxygénases	31
I.2.1.1- Les Cytochromes P450	31
a)- Mécanisme catalytique	35
b)- Réactions catalysées	36
c)- Nomenclature	38
I.2.1.2- Les monooxygénases flaviniques	39
I.2.2- Les dioxygénases	42
I.3- GENETIQUE DE LA BIODEGRADATION	43
I.3.1- Rôle des plasmides dans la biodégradation	43
a)- Caractéristiques générales	47
I.3.2- Gènes chromosomiques	44
I.3.3- Voies de dégradation mixtes	44
I.4- PHOTOCHEMIE DES HALOBENZONITRILES	45
I.4.1- Composés aromatiques halogénés	45
I.4.2- Composés phénoliques	46
I.4.3- Halobenzonitriles	48
I.5- ESPECES REACTIVES INDUISANTS LA PHOTOTRANSFORMATION DE COMPOSES ORGANIQUES	52
I.5.1- Phototransformation en présence des substances humiques	52
a)- électrons solvatés	52
b)- radicaux OH [•]	52
c)- oxygène singulet	53
d)- espèces oxygénées	53
I.5.2- Phototransformation en présence des ions nitrate et nitrite	53



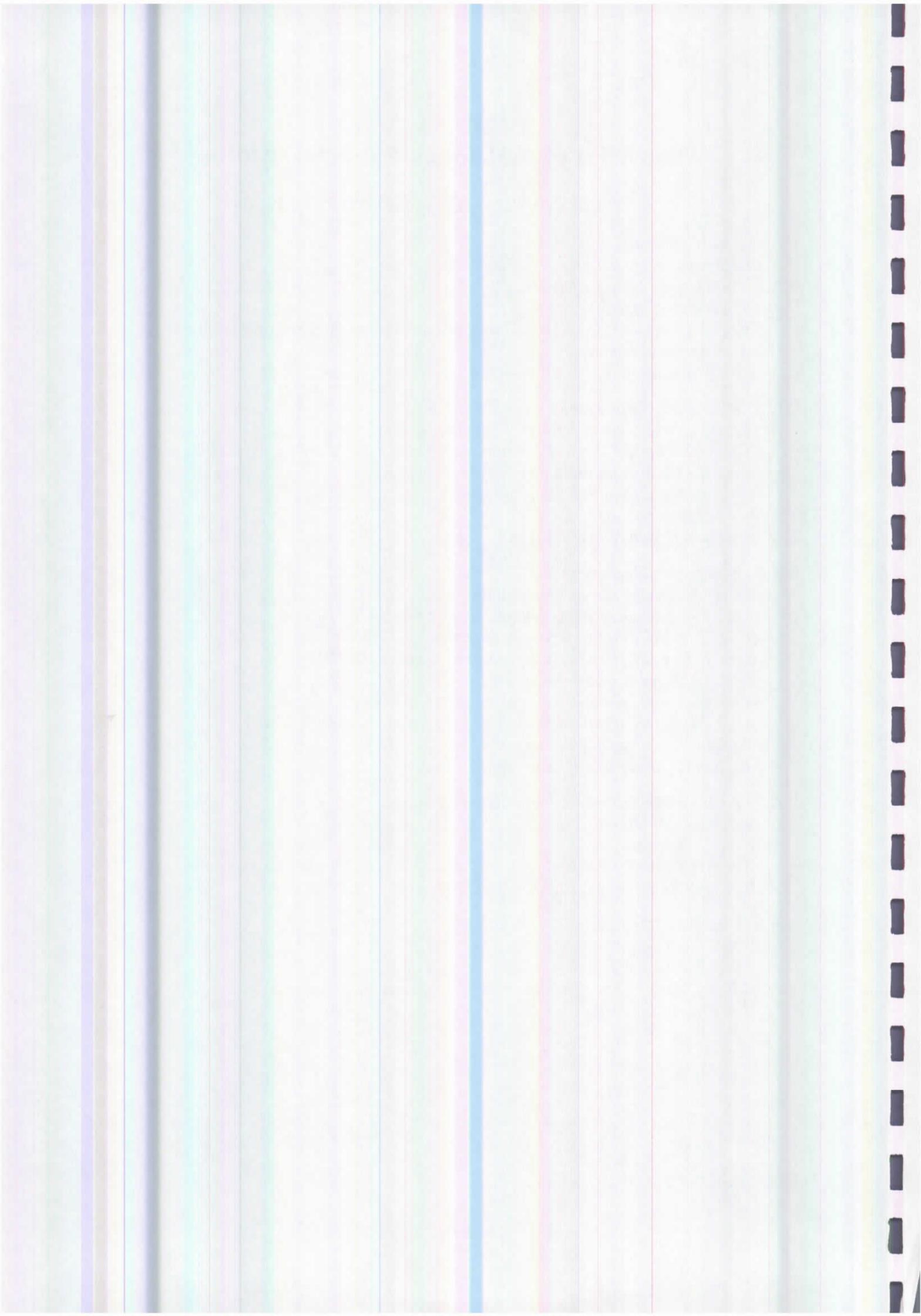
CHAPITRE II

Matériel et Méthodes Expérimentales

PARTIE A : PHOTOTRANSFORMATION	55
II.A.1 - Réactifs utilisés	55
II.A.2 - Préparation des solutions	55
II.A.3 - Techniques de désoxygénation	56
II.A.4 - Techniques expérimentales	56
II.A.4.1 - Caractéristiques des substances humiques et eaux naturelles utilisées	56
a) - <i>Substances humiques</i>	56
b) - <i>Eaux naturelles</i>	57
II.A.5 - Dispositifs d'irradiation	57
II.A.5.1 - Irradiation en lumière monochromatique	57
a) - <i>Irradiation à 313 nm et 296 nm</i>	57
II.A.5.2 - Irradiations en lumière polychromatique	58
a) - <i>Enceinte d'irradiation à 275-350 nm</i>	58
b) - <i>Enceinte 365 nm</i>	58
c) - <i>Lumière naturelle (Soleil)</i>	60
II.A.6 - Techniques d'analyses	60
A.6.1 - Méthodes chromatographiques	60
A.6.1.1 - <i>Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)</i>	60
a) - <i>CLHP à détection spectrophotométrique (CLHP/UV)</i>	60
b) - <i>CLHP à détection par spectrométrie de masse (CLHP/MS)</i>	61
A.6.2 - Méthodes spectrométriques	62
A.6.2.1 - <i>Spectrophotométrie d'absorption UV-visible</i>	62
A.6.2.2 - <i>Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)</i>	62
A.6.2.3 - <i>Spectrométrie de masse</i>	62
a) - <i>Identification des photoproduits</i>	62
II.A.7 - Actinométrie au ferrioxalate de potassium	64
II.A.7.1 - Définition	64
II.A.7.2 - Principe	64
II.A.7.3 - Mode opératoire	65
II.A.7.4 - Rendement quantique de disparition	65
II.A.8 - Photolyse laser	66
II.A.8.1 - Principe	66
II.A.8.2 - Objectifs	67
II.A.8.3 - Dispositif expérimental et principe de fonctionnement	67
II.A.8.4 - Mode opératoire	68
II.A.8.5 - Dispositif expérimental	69
II.A.9 - Dosage des ions iode	69

PARTIE B : BIOTRANSFORMATION 79

II.B.1 - Microorganismes	79
--------------------------------	----

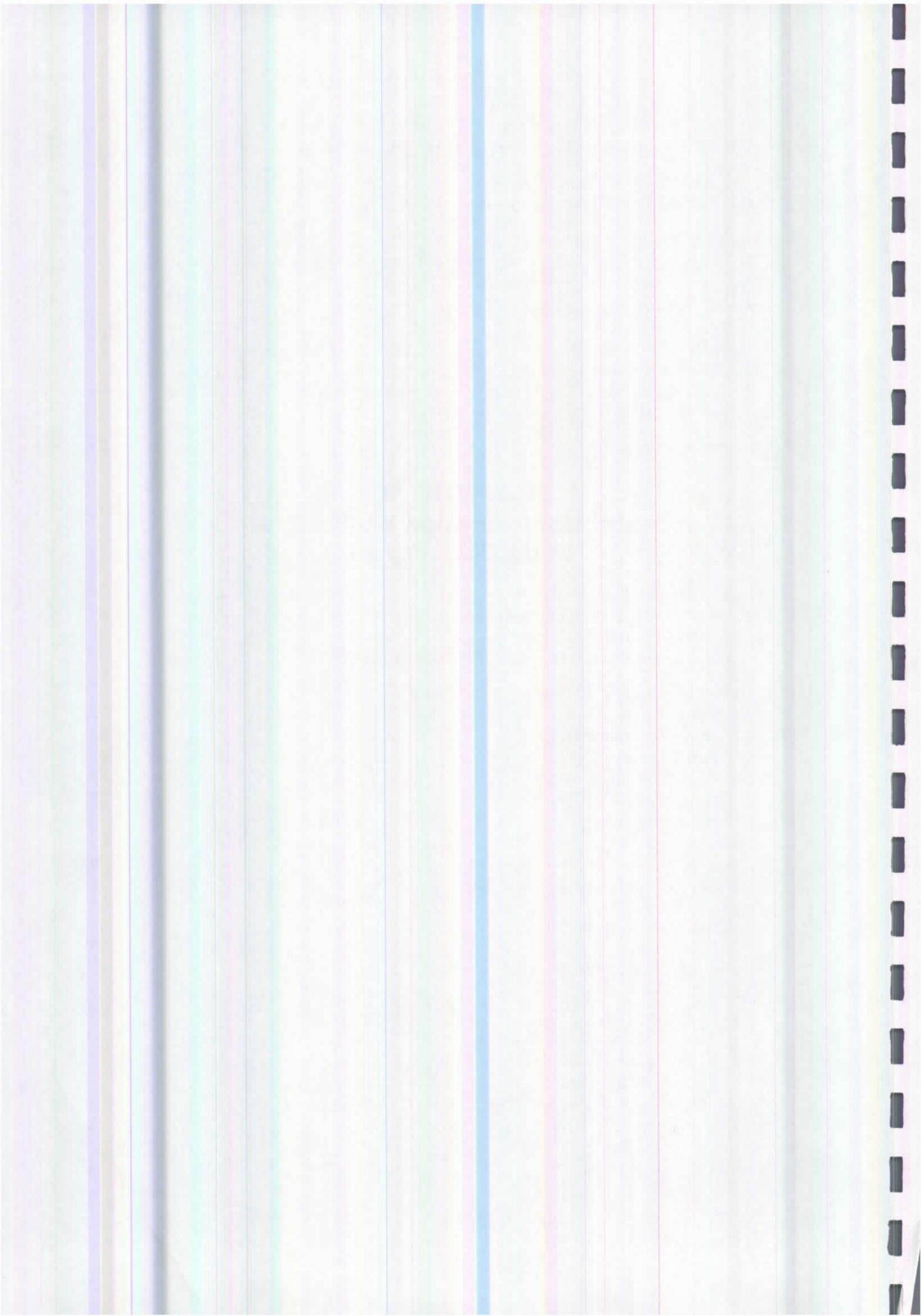


II.B.1.2 - Conditions de culture	71
II.B.1.2 - Composition des milieux (pour un litre)	71
II.B.2 - Conditions de biodegradation	71
B.2.1 - Incubation des xénobiotiques	71
II.B.3 - Identification des métabolites	73
B.3.1 - Production et isolement du métabolite du méthabenzthiazuron	73
B.3.1.1 - <i>Production et extraction</i>	73
B.3.1.2 - <i>Isolement et purification</i>	73
B.3.2 - Identification	74
B.3.2.1 - <i>Spectrométrie de masse</i>	74
B.3.2.2 - <i>Spectrométrie RMN</i>	74
1/ <i>Analyses par RMN du proton à une dimension</i>	74
2/ <i>Analyses par RMN à deux dimensions</i>	76
II.B.4- Test Microtox	78

CHAPITRE III

Phototransformation de l'Ioxynil et du Chloroxynil

III.1- Caractéristiques physico-chimiques	80
III.1.1- Détermination de la solubilité et du pKa	80
III.1.2- Spectre d'absorption UV	81
III.1.3- Spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire	83
III.2- Phototransformation de l'ioxynil et du chloroxynil en solution aqueuse	85
III.2.1- Etude spectrophotométrique	85
a) - <i>Irradiation à 296 nm</i>	85
b) - <i>Irradiation à 313 nm</i>	86
c) - <i>Irradiation entre 275 et 365 nm</i>	87
III.2.2- Etude analytique	87
a)- Ioxynil	87
a.1- <i>Analyse chromatographique</i>	87
a.2- <i>Caractérisation des photoproduits</i>	88
b)- Chloroxynil	94
b.1- <i>Analyse chromatographique</i>	94
III.2.3- Etude cinétique	97
a)- Disparition à 296 ou 313 nm	97
b)- Disparition à $\lambda > 275$ nm	99
b.1- <i>Dans l'eau pure</i>	99
b.2- <i>En présence de l'acide humique</i>	100
c.- <i>Disparition en conditions naturelles</i>	101
c.1- <i>Dans l'eau pure sous irradiation solaire</i>	101
c.2- <i>Dans une eau de barrage sous irradiation solaire</i>	102
a.3- <i>Dosage des ions iodure</i>	102
III.3- Comportement photochimique de l'ioxynil en solution méthanolique	103
en solution aqueuse	103
en solution fonctionnelle	103



CHAPPITRE IV

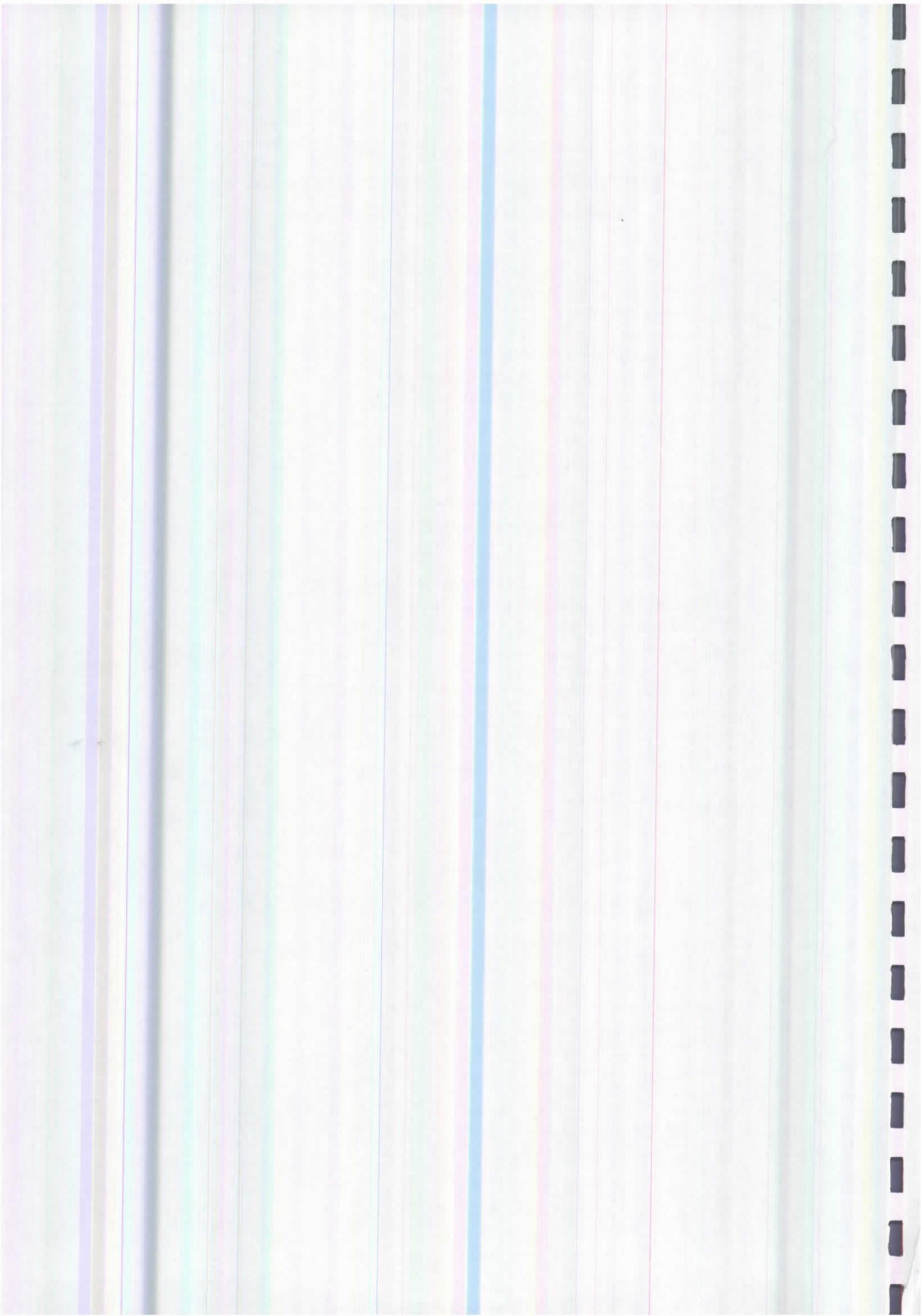
Métabolisme des benzothiazoles par des souches fongiques

IV.A – <i>Aspergillus niger</i>	112
IV.A.1- Biodégradation du méthabenzthiazuron (MBTU)	112
<i>A.1.1- Etude analytique</i>	112
<i>A.1.2 Etude quantitative</i>	113
A.1.2.1- Caractérisation des deux métabolites MET1 et MET2	114
<i>A.1.3 - Cinétique de transformation du MBTU</i>	120
IV.A.2- Biodégradation du 2-hydroxybenzothiazole (OBT)	120
<i>A.2.1- Etude analytique</i>	120
<i>A.2.2- Etude quantitative</i>	122
<i>A.2.3- Caractérisation du métabolite</i>	122
<i>A.2.4- Etude cinétique</i>	125
IV.A.3- Biodégradation du benzothiazole (BT)	126
IV.A.4- Biodégradation du 2-aminobenzothiazole (ABT)	127
IV.B - <i>Cunninghamella elegans</i>	
IV.B.1- Biodégradation du méthabenzthiazuron (MBTU)	129
B.1.1- Etude analytique	129
<i>B.1.2- Etude analytique</i>	130
<i>B1.3- Etudes quantitatives</i>	131
<i>a)- analyse des métabolites obtenus après 8h d'incubation</i>	133
<i>b)- analyse des métabolites obtenus après 46h d'incubation</i>	134
<i>c)- analyse de l'essai quantitatif sorti après 22h d'incubation</i>	136
IV.B.2- Biodégradation de BT, OBT, ABT, MBT et B _{TSO} ₃	137
IV.C- ETUDE D'ECOTOXICITE	140

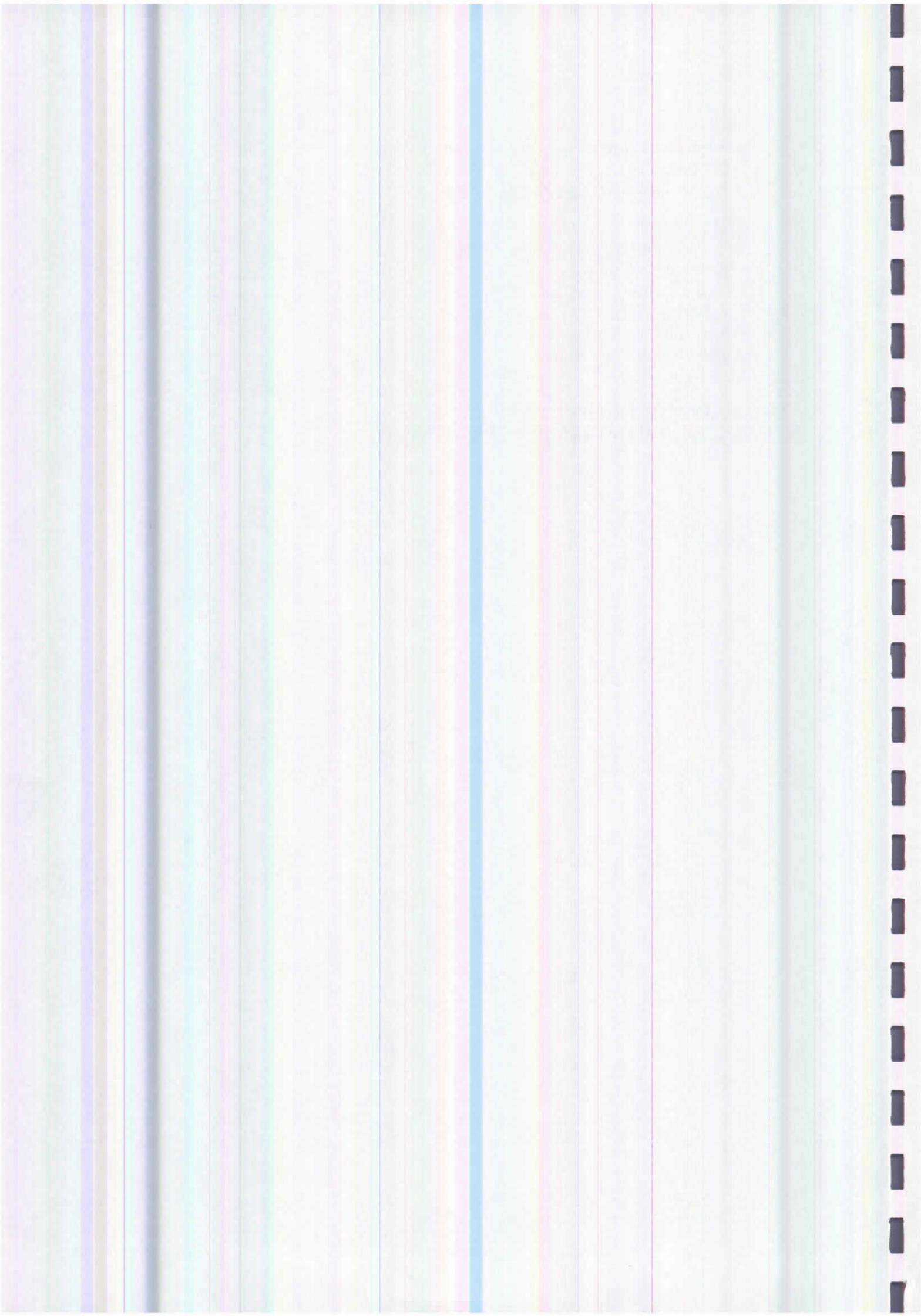
CHAPITRE V

Phototransformation des benzothiazoles

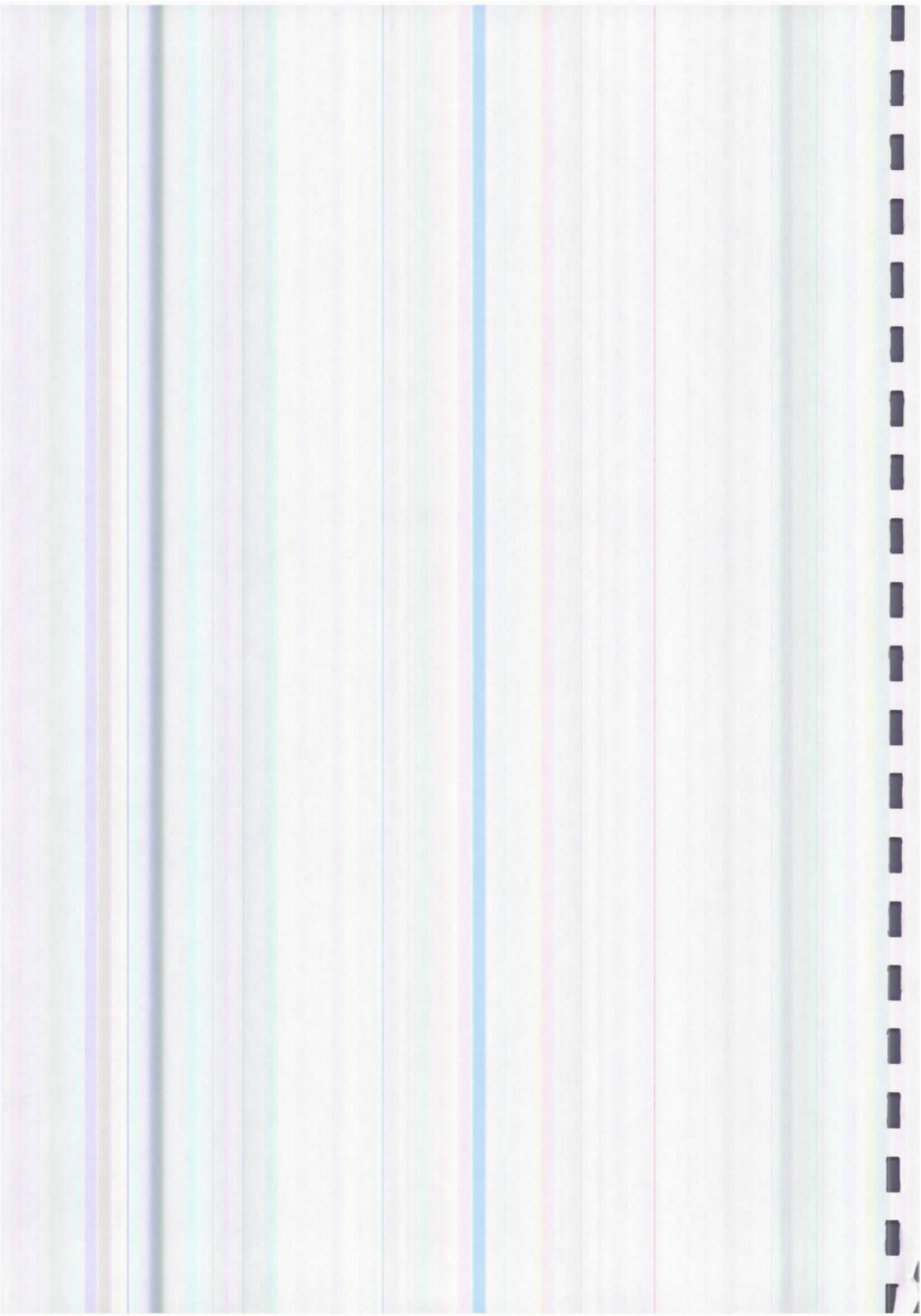
V.1- Phototransformation du méthabenzthiazuron (MBTU)	143
V.1.1- Photolyse direct	143
V.1.2- Photolyse en présence des substances humiques	143
V.1.3- Photolyse en présence des ions nitrate et nitrite	144
V.1.4- Mécanisme de formation du 6-OH-MBTU	147
V.1.5- Mécanisme de formation de produits de nitration	148
V.1.6- Réactions de la chaîne urée	149
V.2- Phototransformation du 6-OH-MBTU	150
V.2.1- Détermination du rendement quantique à 313 nm	151
irradiation - lumière polychromatique à 310 nm	151
<i>Méthode de mesure</i>	151
<i>Calcul</i>	151



<i>c)- Mécanisme réactionnel</i>	155
<i>c.1- Formation des dimères</i>	157
<i>c.2- Formation de P₁ et P₂</i>	158
<i>c.3- Formation d'autres produits de dégradation</i>	159
V.3- Phototransformation du 2-mercaptobenzothiazole (MBT)	160
<i>V.3.1- Caractéristiques physico-chimiques</i>	160
<i>a)- Propriétés spectrales</i>	160
<i>b)- Mesure du pKa</i>	161
<i>V.3.2- Photolyse par éclairs</i>	162
<i>V.3.3- Irradiation en lumière continue</i>	164
<i>V.3.4- Irradiation en lumière solaire</i>	166
<i>V.3.5- Mécanisme</i>	168
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES & ANNEXES	177



INTRODUCTION GENERALE



Depuis la révolution industrielle, la production des composés chimiques à intérêt divers n'a pas cessé de s'accroître au rythme de la croissance exponentielle de la population mondiale ainsi que ses besoins.

Cette intensification de la production industrielle est la cause principale de la dégradation de la qualité des eaux de la surface et des eaux naturelles.

Pendant de nombreuses années, ces produits ont été répandus dans la nature sans se soucier de leur devenir et des conséquences que leur emploi pourrait avoir sur la santé humaine et l'environnement.

La pollution due à ces produits occupe de plus en plus le devant de l'actualité et mobilise de nombreux groupes de personnes utilisatrices accusées d'être à l'origine de la pollution, les spécialistes du traitement et de la distribution des eaux soucieux de fournir une eau de bonne qualité et les consommateurs soucieux de leur santé et des problèmes environnementaux.

Actuellement la législation européenne impose par exemple que tout nouveau pesticide destinés à être épandu dans la nature, fasse l'objet d'études concernant son devenir et les risques encourus par l'environnement.

Lors de leur utilisation, une quantité non négligeable des polluants (pesticides ou autres) se trouve dans l'environnement. Une faible partie se volatilise ou s'adsorbe sur les sols mais une grande partie atteint les eaux de surface et les eaux souterraines par ruissellement ou par lessivage. Ce sont les principales causes de pollution des eaux naturelles. Cette pollution des milieux aquatiques entraîne des déséquilibres importants des écosystèmes et présente un danger réel sur la flore et la faune. La présence de nitrates et de phosphates, par exemple, contribue l'eutrophisation de certains écosystèmes, conduisant ainsi à l'asphyxie des eaux par la prolifération des algues.

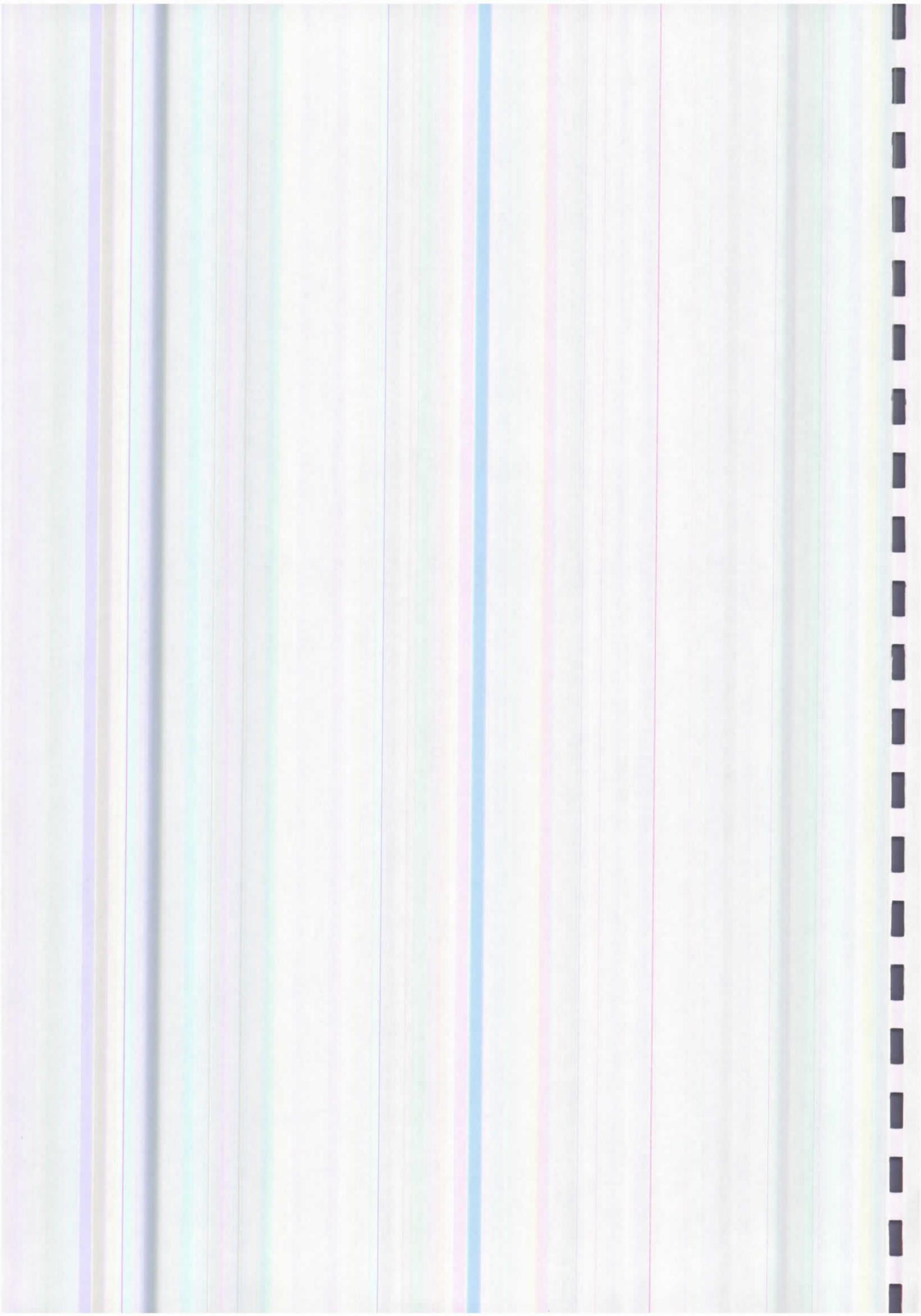
Parmi les polluants organiques retrouvés dans l'environnement nous nous sommes intéressés à la famille des benzonitriles et des benzothiazoles. En effet, les **benzonitriles** particulier les 3,5-dihalogéno-4-phénoxybenzonitriles sont largement utilisés à travers le monde comme herbicides agissant par contact en post-levée en bloquant la photosynthèse de nombreuses adventices dicotylédones (Polygonacées, Composées, Chénopodiacées, Solanacées et certaines Borraginacées).

L'étude du devenir de ces xénobiotiques par voie biotique et/ou voie abiotique a fait l'objet de cette thèse qui comportera 5 grandes parties.

- ✓ Dans une première partie nous avons exposé une étude bibliographique dans laquelle l'accent a été mis sur :
 - le comportement photochimique en solution aqueuse des halophénols en général et les halocyanophénols (ou halogénohydroxybenzonnitriles) en particulier.
 - la toxicité des benzothiazoles et leur biotransformation par des microorganismes (souches microbiennes ou fongiques) ainsi que les enzymes impliquées dans ces transformations (les oxygénases en particulier).
 - la transformation des benzothiazoles que ce soit en photolyse directe dans divers milieux ou photoinduite par différentes espèces réactives.
- ✓ Dans une deuxième partie nous avons donné les différentes techniques ou méthodes expérimentales utilisées dans la bio ou la phototransformation des composés étudiés et les divers matériels impliqués.
- ✓ Dans une troisième partie nous avons présenté d'une part, les résultats obtenus lors de la photolyse directe des halobenzonnitriles (ioxynil et chloroxynil) et d'autre part les résultats de la bio et la phototransformation des benzothiazoles dans les conditions de laboratoire.
- ✓ Finalement, ce travail est achevé par une conclusion générale et quelques perspectives.

CHAPITRE I

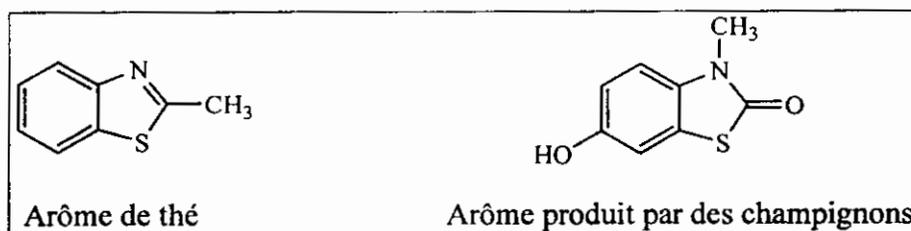
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



I.1- BENZOTHAZOLES

I.1.1- Structure des benzothiazoles et Principales utilisations

La structure benzothiazole n'est que rarement présente dans les produits naturels. On peut simplement citer les arômes de feuilles de thé et d'airelles (Vitzthum *et al.*, 1975), ou le composé odorant produit par les champignons *Polyporus frondosus* et *Aspergillus clavatus* (Seifert et King, 1982).



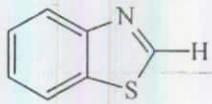
Les benzothiazoles sont surtout synthétisés mondialement à grande échelle en vue d'applications variées :

➤ **fongicide/bactéricide** : le benzothiazole (BT) est utilisé comme fongicide tout comme le 2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMTB) qui entre dans la composition du pesticide Busan® (Brownlee *et al.*, 1992). Ce dernier est également utilisé pour protéger le bois (Fiehn *et al.*, 1994).

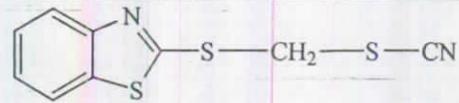
➤ **pesticide/herbicide** : le méthabenzthiazuron (MBTU) est utilisé comme herbicide sur les cultures de blé tendre d'hiver et de pois protéagineux. Il constitue la matière active des deux formulations commerciales Tribunal® et Ormet®. Il présente un spectre d'activités étendu sur graminées et dicotylédones mais il est peu efficace sur les plantes vivaces.

➤ **dans la préparation de colorants** : 2-aminobenzothiazole (ABT) (Gaja et Knapp, 1997).

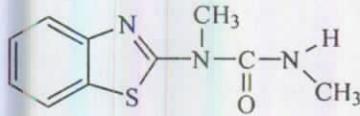
➤ **propriétés pharmacologiques** : le riluzole commercialisé par Rhône-Poulenc (Rilutek®) pour traiter la sclérose amyotrophique latérale (Byson *et al.*, 1996), ou le 2-(4-amino-3-méthylphényl)benzothiazole étudié pour ses propriétés antitumorales (Sato *et al.*, 1999).



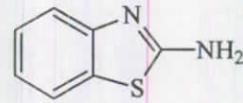
Benzothiazole (BT)
(Fongicide)



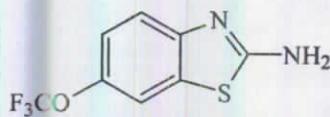
2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMTB)
(Fongicide)



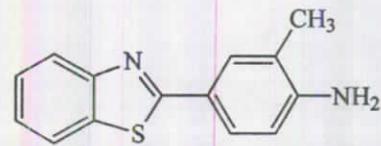
Méthabenzthiazuron (MBTU)
(Herbicide)



2-aminobenzothiazole (ABT)
(Colorant)

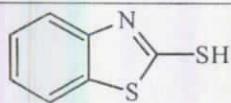


Riluzole
(Activité pharmacologique)



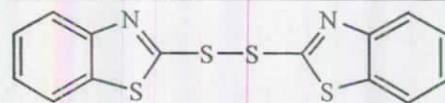
2-(4-amino-3-méthylphényl)benzothiazole
(Activité antitumorale)

Cependant, la principale utilisation des benzothiazoles concerne la fabrication de gommés, en particulier de pneumatiques où ils agissent en tant qu'accélérateurs de vulcanisation. Le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) est un des agents employés dans la fabrication du caoutchouc. Il est notamment utilisé dans la fabrication d'autres accélérateurs de vulcanisation tel que le 2,2'-(dithiobis)benzothiazole (MBTS).



MBT

2-mercaptobenzothiazole



MBTS

2,2'-(dithiobis)mercaptobenzothiazole

Ces deux composés catalysent la formation de ponts disulfure (réticulation) entre des polymères élastomères insaturés, permettant l'obtention d'un matériau flexible et élastique (procédés Goodyear, Hancock, Parkes, Peachy) (Figure I.1).

La vulcanisation permet en effet l'association du latex du caoutchouc avec les atomes de soufre, afin de réduire sa sensibilité aux variations de température et à l'action oxydante de

l'air (Janin, 1999). Dans ce de procédé, le MBTS agit comme réactif tandis que le MBT est retrouvé comme produit secondaire de la réaction.

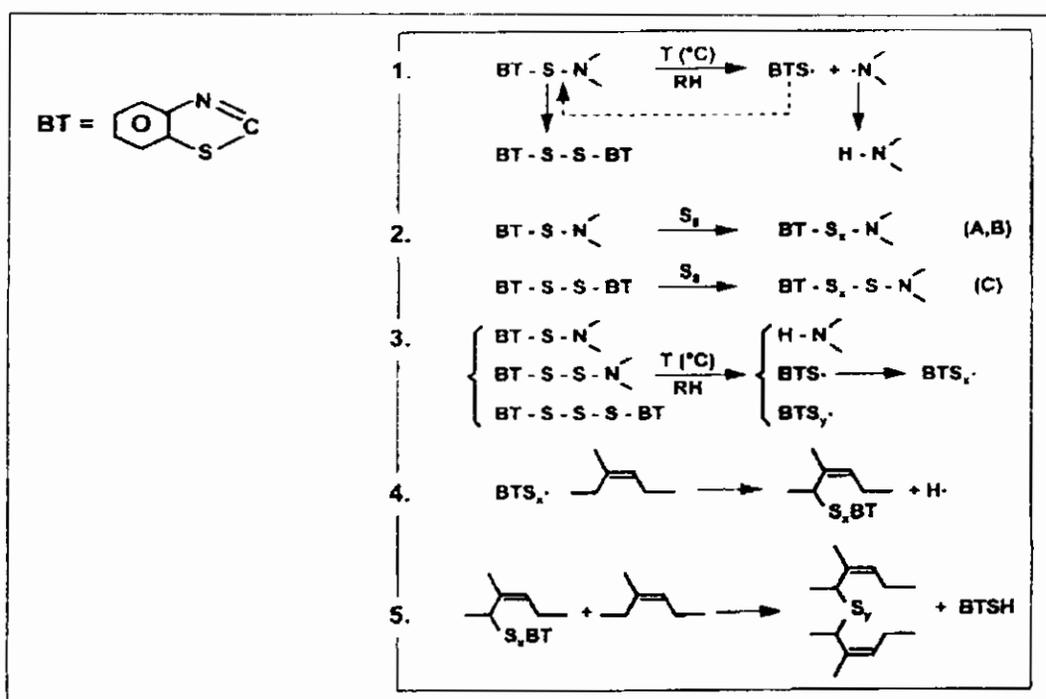


Figure 1.1 : Mécanisme de la vulcanisation (d'après Janin, 1999).

Le MBT entre également dans la composition de liquides de refroidissement comme inhibiteurs de corrosion (Brownlee *et al.*, 1992).

Ce xénobiotique ainsi que ses sous-produits de synthèse, l'acide 2-benzothiazolysulfonique (BTSO₃), le benzothiazole (BT) et le 2-hydroxybenzothiazole (OBT) sont retrouvés dans les eaux de stations d'épuration des usines de production.



En 1985, la production de MBT s'élevait à 25 000 tonnes aux États-Unis et l'Agence Protection de l'Environnement Américain (www.epa.gov) estimait que près de 500 tonnes

étaient relâchées dans l'environnement (Brownlee *et al.*, 1992). Le 16 février

1998, l'Agence Protection de l'Environnement Américain a annoncé que

ont montré que le MBT n'est pas étroitement lié dans la matrice de caoutchouc et peut donc être entraîné par lessivage. C'est ainsi que ce composé a été retrouvé dans du sérum humain ou des préparations médicamenteuses, la fuite provenant dans ce cas du plastique des seringues ou des bouchons. Le MBT peut être également relargué dans l'environnement *via* les stocks de vieux pneus et des voies à grande circulation. Au bout de 5 étapes de lessivage réalisées sur des pneus, il a été montré que près de 50 % de la quantité initiale de MBT est entraînée (De Wever *et al.*, 2001).

I.1.2- Comportement photochimique des benzothiazoles

La photochimie de cette classe des composés a débuté par des études réalisées sur la photolyse directe en solutions organiques et se dirigent actuellement vers l'utilisation des procédés d'oxydation avancées. Nous allons suivre brièvement les principaux travaux cités dans la littérature concernant cette classe à intérêt environnemental croissant.

Párkányi et Abdelhamid (1985) ont étudié la photolyse directe du 2-mercaptobenzothiazole (MBT), visant en premier lieu l'identification des produits intermédiaires formés ou ceux considérés comme produits terminaux stables. Le MBT a été irradié dans des réacteurs en pyrex en présence d'oxygène. Quand le benzène ou le toluène sont utilisés comme milieu de réaction, les auteurs ont observé que le produit principalement formé était le bis-(2-benzothiazolyl)disulfure, alors que la bis-(2-benzothiazolyl)disulfone correspondante a été obtenue comme intermédiaire avec le benzothiazole sulfate comme produit final de la réaction dans des solutions d'acétonitrile, de méthanol ou d'éthanol (Figure I.2).

Les auteurs ont signalé que la présence d'oxygène est indispensable pour que la réaction puisse avoir lieu, alors que l'eau serait nécessaire pour les étapes ultérieures de la séquence réactionnelle.

Brownlee *et al.* (1992) ont fait une étude analytique importante concernant la chimie environnementale aquatique du 2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMBT) et des benzothiazoles apparentés (le TCMBT étant le principe actif du fongicide BUSAN[®]). Les auteurs ont ainsi déterminé la solubilité dans l'eau et les coefficients de partage eau/octanol de TCMBT, du benzothiazole (BT), de MBT et du 2-(méthylthio)benzothiazole (MTBT). La solubilité dans l'eau de TCMBT est de 40 mg l⁻¹ à 24°C et le logK_{ow} est de 3,12. A pH 8 et à

24°C, le $t_{1/2}$ (TCMBT) = 750 heures en solution aqueuse tamponnée par le borax-phosphate dilué alors qu'il n'est que 740 heures dans l'eau de mer (pH 7,8-8,0 ; 24°C).

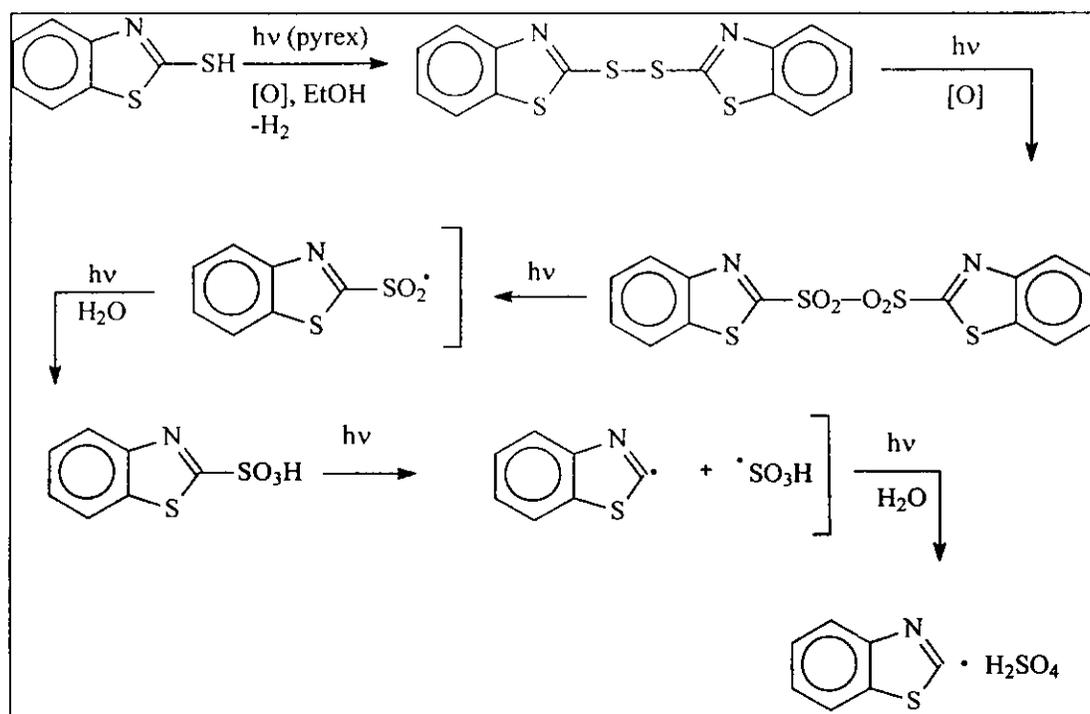
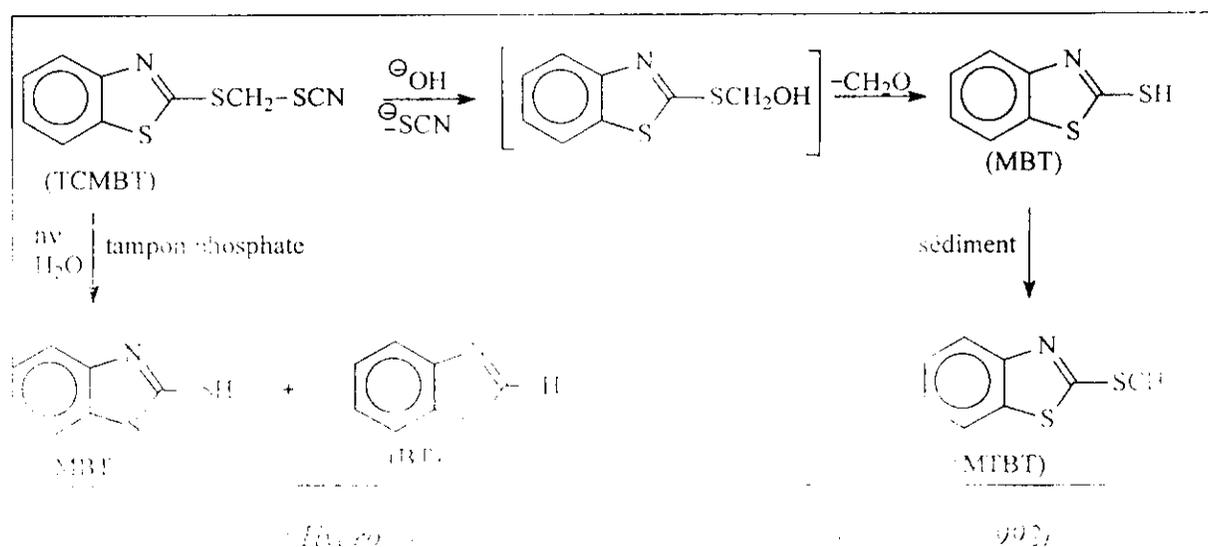


Figure I.2 : Mécanisme de la photolyse directe du 2-mercaptobenzothiazole (MBT) en milieu organique (d'après Párkányi et Abdelhamid 1985).

Les tentatives d'estimer le partage entre les sédiments et l'eau ont conduit à la production des traces d'un nouveau produit : le MTBT (produit présumé résulter de la méthylation biologique du MBT relargué par l'hydrolyse de TCMBT). Ce résultat a été confirmé par la production du MTBT directement à partir du MBT en présence des sédiments (Figure I.3).



En présence de la lumière solaire le TCMBT subit une photolyse directe dans un tampon phosphate produisant ainsi le MBT ($\eta = 0.5$) et des traces de BT. Les auteurs ont ensuite procédé à une étude photochimique de MBT; le produit majoritaire de la photolyse de TCMBT. Les rendements quantiques de transformation solaire de TCMBT et de MBT sont estimés à 0.01 et 0.002 respectivement. La photolyse de MBT a conduit à la formation des trois photoproduits : le BT (28-47 %), le dihydroxybenzothiazole (OBT) (4-5 %) et des trace d'un autre produit non identifié. A l'issue de leur étude les chercheurs ont proposé une voie partielle de la dégradation de cette famille des benzothiazoles dans l'environnements aquatique. Finalement, les auteurs ont conclu une persistance et une bioconcentration faibles de TCMBT et MBT dans ces conditions alors que le BT, MTBT et OBT se présentent comme des produits finaux stables dans le milieu. On remarque que les auteurs n'ont avancé aucun mécanisme explicatif de la transformation du MBT en ces principaux photoproduits en solution aqueuse et ils se sont contentés d'avancer le mécanisme proposé par Parkanyi et Abdelhamid cité plus haut et qui concerne les milieux organiques en particulier.

Devant l'ampleur et la diversité des sources constituant une entrée du MBT et produits de dégradation dans l'environnement, les chercheurs ont eu de plus en plus recours aux procédés d'oxydation avancé (O_3 , H_2O_2 et les semi-conducteurs couplés à l'UV ou non) pour leur élimination voire leur minéralisation.

Dans ce contexte, Fiehn et al. (1998) ont examiné l'ozonolyse du MBT dans l'eau pure ou dans les eaux usées alimentées par des tanneries à différents pH pour évaluer sa destruction oxydative. Tous les tests d'oxydation ont révélé une similitude concernant la séquence d'apparition des produits majoritaires de la transformation. Le MBT ainsi que ses produits de dégradation montrent une affinité élevée en vers l'ozone comme l'indiquent leurs vitesses d'oxydation partielle et de minéralisation.

En utilisant l'HPLC-DAD (Détection à barrettes de diodes) les auteurs ont trouvés que le BT était le premier produit d'ozonation suivi par des basses concentrations de 2(3H)-benzothiazolone. Une infime quantité additionnelle d'hydroxybenzothiazole a été prouvée par CG-MS. Dans toutes les études, le produit majoritaire de la transformation avait une structure proche benzothiazolyl-2-sulfonate ($BTSO_3$) comme l'ont montré les spectres IR, RMN, UV et MS. Cependant, d'autres observations, notamment un temps de rétention différent et une réaction lente d'hydrolyse, ont permis aux auteurs de conclure à la formation de et non de $BTSO_3$.

wey 100

Pour une ozonation plus poussée, sept anions organiques et trois inorganiques ont été dosés par électrophorèse capillaire à détection UV indirecte.

Andreozzi *et al.* (2000) ont essayé de proposer un modèle cinétique de la dégradation de BT en solution aqueuse. C'est ainsi qu'ils ont provoqué une dégradation du BT par une réaction de Fenton photo-assistée dans un réacteur fermé. Le pH varie de 2.0 à 3.2 et les concentrations en Fe(III) et H₂O₂ sont situées dans les fourchettes 1.0×10^{-3} - 1.5×10^{-1} et 1.0×10^{-6} - 4.0×10^{-6} M respectivement. Un modèle cinétique a été alors développé pour prévoir la décroissance du BT dans différentes conditions de réaction. L'utilisation des constantes cinétiques issues de la littérature a permis aux auteurs de simuler le comportement du système en prenant en considération l'influence du pH, des concentrations du peroxyde d'hydrogène, de Fe(III) et des ions sulfate et la force ionique.

Par la suite Andreozzi *et al.* (2001) ont élargi leur étude à d'autres benzothiazoles notamment le MBT et le OBT.

Le modèle établi a permis une meilleure estimation des constantes cinétiques concernant l'attaque des radicaux hydroxyle sur les molécules cibles avec un système H₂O₂/UV. Les auteurs ont montré que les valeurs obtenues avec ce modèle sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour d'autres composés hétérocycliques.

Le métabenzthiazuron (MBTU) est un herbicide reconnu comme étant très photostable en solution aqueuse (pH 4-9) sous la lumière naturelle. Par voie de conséquence très peu d'études concernant sa photolyse directe en solution aqueuse ont été rapportées.

A notre connaissance, la seule étude disponible est celle réalisée par Sakriß *et al.* (1976) en milieu organique à des longueurs d'onde supérieure à 290 nm. Ces auteurs ont obtenu un mélange très complexes de photoproduits dont 14 ont pu être identifiés par différentes méthodes d'analyse (RMN ¹H, SM, UV-visible, IR ...). Lors de cette photooxydation, différents mécanismes ont été impliqués (Figure I.4) : oxydation du méthyl latéral de la chaîne urée (II), déméthylation (III), ouverture du cycle benzénique (X, XIII, XIV) et divers réarrangements conduisant aux différents benzazines (IV, V, VI VII)...

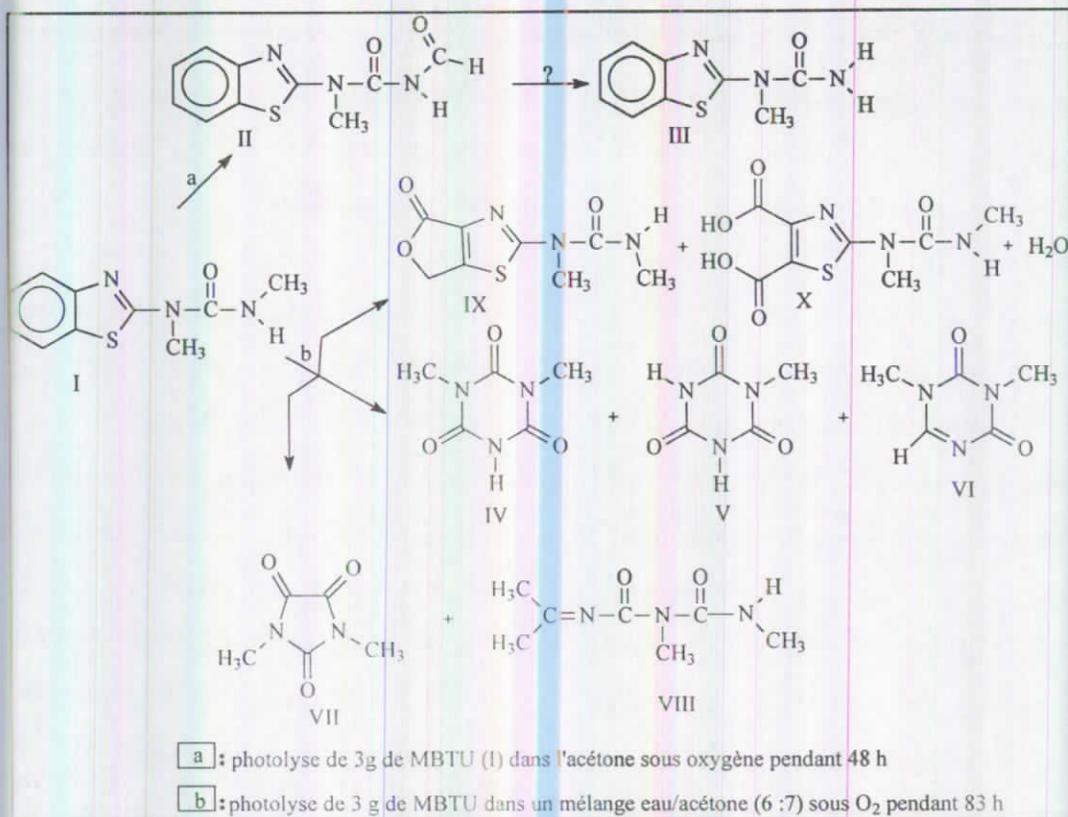
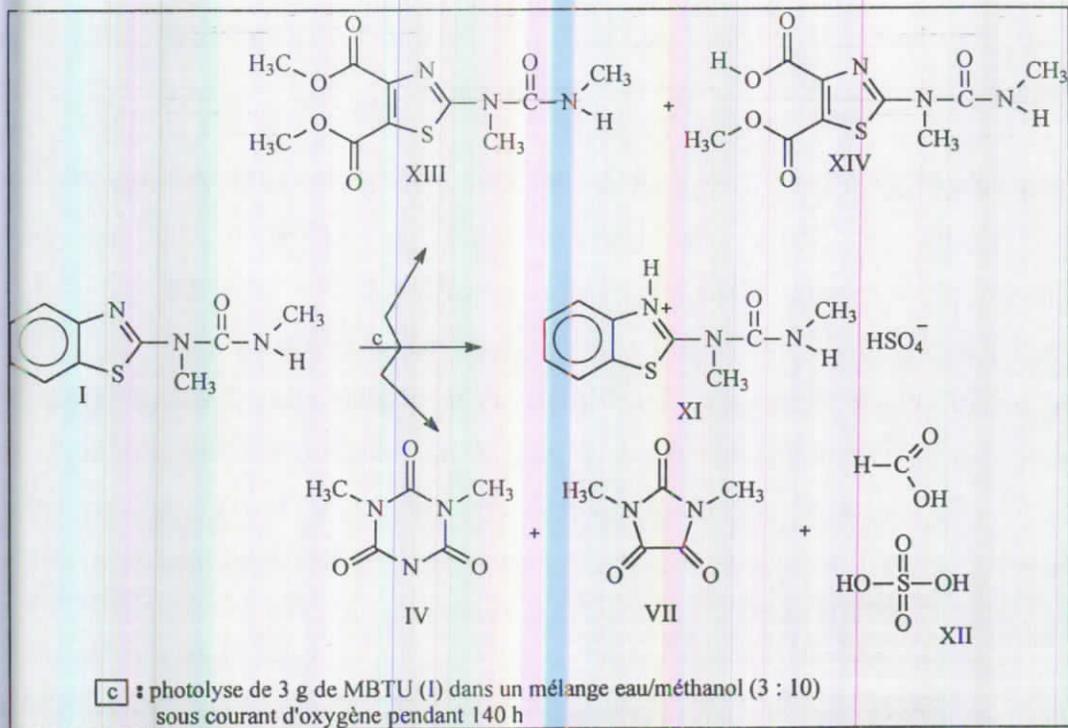


Figure I.4 : Photooxydation du MBTU à $\lambda > 290$ nm (d'après Sakriß et al., 1976)
 a) dans l'acétone, b) mélange eau/acétone, c) mélange eau/méthanol

I.1.3- Toxicité des benzothiazoles

La plupart des composés de la famille des benzothiazoles, et notamment le MBT, présente des propriétés nocives, voire même toxiques. Williams, en 1984 (cité par De Wever, 1995), a montré une activité biocide sur les microorganismes du sol aux concentrations trouvées dans la formulation normale des gommés. Rada *et al.* (1979) ont criblé une série de benzothiazoles en tant qu'inhibiteurs de virus. Ils ont découvert une activité antivirale forte du MBT sur deux des trois virus testés. Plus récemment, Bujdakova *et al.* (1993) se sont intéressés aux propriétés anti-*Candida* et antifongiques de ce composé. Pour les 15 souches de *Candida* testées, l'addition de MBT à une concentration variant de 1 à 78 mg/L de milieu de culture entraîne une inhibition de la croissance de 50 %. La concentration minimale en MBT nécessaire à l'inhibition totale de croissance du champignon *Aspergillus niger* est de 33 mg/L. Ce composé est donc particulièrement efficace. Il semble que la fonction thiol soit indispensable à la toxicité de ce composé (De Wever, 1995).

Le MBT présente une certaine toxicité non seulement sur les virus, les levures et les champignons, mais également sur les bactéries. Il agit en tant qu'inhibiteur du processus de nitrification dans les boues activées et dans les sols. Les fertilisants azotés, se trouvant sous forme d'ammonium ou de composés produisant directement de l'ammonium, peuvent être rapidement oxydés en nitrites puis en nitrates par *Nitrosomonas* spp. et *Nitrobacter* spp. respectivement. La présence de MBT entraîne une inhibition de ce processus liée à sa toxicité vis-à-vis de ces microorganismes (Tomlinson *et al.*, 1966 ; Reemtsma *et al.*, 1995).

De Wever *et al.* (1997a) ont réalisé une étude approfondie de l'impact des benzothiazoles, en particulier du MBT sur les bactéries. Ils ont montré que le MBT était effectivement le plus toxique des composés étudiés. Bactériostatique hydrophobe, le MBT semble pouvoir s'accumuler dans les membranes cellulaires et détériorer leur intégrité, en particulier leur perméabilité : il a ainsi été observé par exemple une fuite importante de potassium lorsque la concentration en MBT atteint 200 mg/L. Une perturbation de la fonction membranaire constituerait un effet primaire, qui entraînerait des effets secondaires tels que l'inhibition des chaînes respiratoires. De Wever *et al.* (1994a, 1997a) ont tenté de démontrer cette intervention au niveau des chaînes respiratoires et de mettre en évidence les sites d'action du MBT. Les résultats sont assez difficiles à interpréter, mais les premières conclusions montrent que le MBT provoque une baisse pas de perturbation de la chaîne de transfert d'électrons et que

sites probables d'action se situent au niveau des médiateurs (flavoprotéines ou quinones et clusters Fe-S).

Le MBT possède donc de nombreuses propriétés néfastes pour les microorganismes. Pour l'homme, il présente des effets allergènes qui rendent sa présence dans les gants en caoutchouc responsable de dermatoses sévères. Le MBT est d'ailleurs répertorié en tant qu'allergène dermatologique. Sa DL_{50} chez le rat est évaluée à 3,8 mg/kg. D'autres études ont montré une activité cancérogène et mutagène chez le rat et la souris pouvant entraîner des tumeurs dans divers organes (Gold *et al.*, 1993). Cependant, une étude grandeur nature réalisée au sein de l'industrie chimique de fabrication du caoutchouc à Nitro dans l'ouest de la Virginie, n'a pas révélé d'activité cancérogène notoire chez l'homme (Strauss *et al.*, 1993). Ainsi, le rejet de benzothiazoles dans les compartiments aquatiques est susceptible de nuire au fonctionnement des écosystèmes, de poser un problème majeur d'environnement et de santé publique. Des équipes de recherches se sont alors intéressées à étudier la biodégradation de ces composés par des microorganismes capables de croître sur ce type de polluant.

I.1.4- Biodégradations de BT, OBT, ABT, B₂SO₃ et MBT

a)- Biodégradations par des boues activées ou des cultures mixtes

Les sources principales de pollution (ou du moins les plus visibles) provenant des usines de production des benzothiazoles ou de fabrication des produits finis, les premières études de biodégradation de ces xénobiotiques ont été réalisées directement avec les boues activées ou les cultures mixtes issues des stations d'épuration situées à la sortie de ces usines. L'objectif est alors de rendre le procédé de traitement des eaux industrielles chargées en benzothiazoles aussi efficace que possible. Pour cela, différents travaux consistant à étudier les conditions optimales de dégradation ont été réalisés, en particulier vis-à-vis de la concentration en polluant ou en combinant biodégradation et traitements physico-chimiques.

Mairprize *et al.* (1976) ont été les premiers à montrer que le B₂SO₃ (100 mg/L) était totalement biodégradable par des boues activées. Le soufre et l'azote du xénobiotique étaient retrouvés sous forme de sulfate et d'ammonium en quantités pratiquement stœchiométriques (dosages colorimétriques). Le taux en carbone organique du milieu, quant à lui, diminue en

même temps que le taux du BTSO_3 : il semble donc qu'il n'existe pas d'intermédiaire qui s'accumule. La cinétique de biodégradation est présentée sur la Figure I.5.

Aux mêmes concentrations initiales en benzothiazole (5 mM), les auteurs observent une consommation d'oxygène comparable en présence du OBT et du BT. Gaja et Knapp (1997) montrent à leur tour une biodégradation du BT, du OBT ainsi que du ABT (à une concentration de 1 mM) avec libération de grandes quantités d'ammonium et de sulfate (par exemple 87 % et 100 % respectivement par rapport aux rendements théoriques dans le cas du ABT). Lors de ces expériences, le MBT n'est que faiblement oxydé.

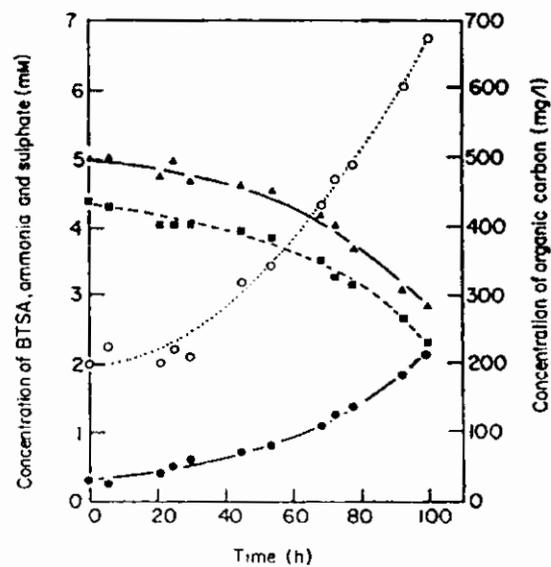


Figure I.5 : Concentration de différents éléments lors de la biodégradation du BTSO_3 par des boues activées : \blacktriangle : BTSO_3 ; \bullet : ammonium ; \circ : sulfate ; \blacksquare : carbone organique, (d'après Mainprize et al., 1976).

Les travaux se sont ensuite portés sur le choix des cultures mixtes utilisées. Partant de boues activées adaptées aux benzothiazoles (MBT^+) et de boues activées n'ayant jamais été en contact avec ce type de composé (MBT^-), De Wever et Verachtert (1994b) ont montré que dans les deux cas, le taux de dégradation du MBT est relativement similaire (50 mg/l en 1 mois) lors de la première mise en contact. Par contre, lorsqu'on fait une seconde addition de 50 mg supplémentaire de MBT , la vitesse de dégradation est fortement accélérée, notamment dans le cas de MBT^- (Figure I.6).

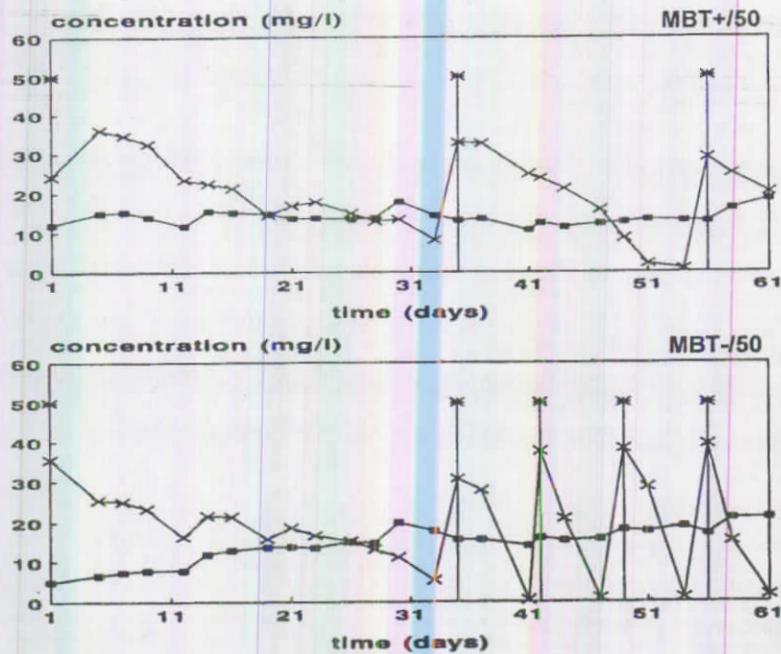


Figure I.6 : Concentration de MBT (x) en fonction du temps de contact avec les boues activées MBT⁺ et MBT⁻ ; * : ajout de 50 mg de MBT ■ : Concentration en BTSO₃ (métabolite du MBT), (d'après De Wever et Verachtert, 1994b).

Un essai réalisé avec un mélange de ces deux boues activées montre une nette accélération de la vitesse de biodégradation dès la première addition (Figure I.7). L'addition d'une source d'azote organique augmente encore cette vitesse.

Cependant, plus la concentration en MBT est élevée, plus la vitesse de dégradation est ralentie, jusqu'à obtenir une inhibition totale lorsque la concentration en MBT atteint 100 mg/L (De Vos *et al.*, 1993a).

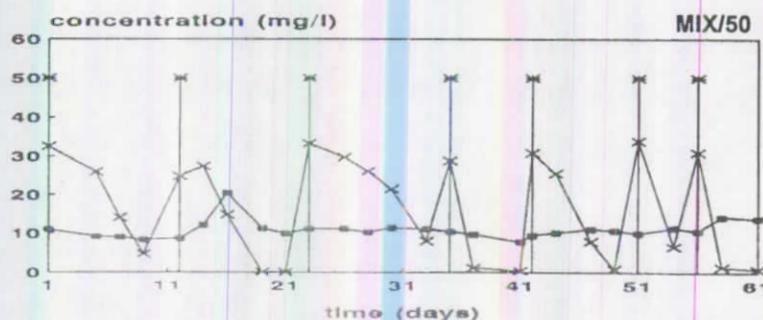


Figure I.7 : Concentration de MBT (x) en fonction du temps dans le mélange de boues activées ; * : ajout de MBT ■ : Concentration en BTSO₃ (d'après De Wever et Verachtert, 1994b).

La réalité de la biodégradation à de fortes concentrations en MBT a été mise en doute par plusieurs auteurs. De Vos *et al.* (1993b) ont ainsi proposé une oxydation chimique en disulfure à pH acide ($\text{pH} < 6$), qui précipite. De même, Gaja et Knapp (1998) ont envisagé un processus non-enzymatique requérant cependant la présence de matériel biologique tel que le FAD, après avoir constaté une disparition totale du MBT avec des boues activées "mortes" (stérilisées à 121°C pendant 15 min).

Le problème se complique lorsque l'effluent est composé d'un mélange de benzothiazoles. Des expériences de biodégradation réalisées dans des réacteurs montrent que la dégradation efficace d'un mélange de BT et MBT n'est possible que si la concentration en BT est inférieure à 300 mg/L et celle de MBT inférieure à 10 mg/L (Repkina *et al.*, 1983, cité par De Wever *et al.*, 2001). A des concentrations plus faibles (de l'ordre du mg/L), Reemtsma *et al.* (1995) observent 10 % de méthylation du MBT en MTBT (2-méthylthiobenzothiazole) et une dégradation complète du BT.

Des expériences réalisées dans des réacteurs par De Wever *et al.* (1994b) montrent que la présence simultanée de MBT et de BT stimule mutuellement leur biodégradation, même à des concentrations allant jusqu'à 150 mg/L. En revanche, le MBT semble inhiber la biodégradation du BTSO_3 . Au cours de ces expériences, des composés plus polaires sont détectés mais leurs structures n'ont pas été identifiées.

Plusieurs stratégies d'élimination ont été testées, notamment au niveau d'un pré-traitement physico-chimique de l'effluent. L'utilisation d'irradiations γ de haute énergie ou d'une adsorption sur charbon activé à pH acide, suivie d'une neutralisation, d'un relargage et d'une dilution (Regula *et al.*, 1983, cité par De Wever *et al.*, 2001) n'ont conduit qu'à une amélioration négligeable du traitement biologique ultérieur. L'addition préalable de divers composés dans l'effluent, tels que des phosphates ou des sources de carbone et d'azote, a également été testée. Seul l'ajout de peptone, comme source d'azote et neutralisation du milieu par NH_4OH ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$, permet l'amélioration de la cinétique de dégradation du MBT (0,25 mg/L/jour contre 0,16 mg/L/jour) (De Wever, 1995).

b)- Biodégradations par des souches pures

Il est intéressant de comprendre les voies métaboliques de dégradation de ces polluants et d'améliorer le processus de biodégradation en utilisant des souches pures.

Différentes études portant sur la biodégradation du MBT par des souches isolées ont été réalisées avec plus ou moins de succès. Karelova et Tomasovicova (1988) ont montré une disparition de 74 % du MBT après cinq semaines d'incubation avec des bactéries sulfato-réductrices dans des conditions anaérobies, la concentration initiale en MBT étant de 5 mg/L. De nombreuses autres souches bactériennes ont été testées. Si la plupart ne sont pas capables de minéraliser MBT, plusieurs peuvent le biotransformer en conduisant généralement au 2-méthylthiobenzothiazole (MTBT). C'est le cas par exemple de *Pseudomonas* sp. ou de *Corynebacterium* sp. (Drotar et al., 1987) (Figure I.8).

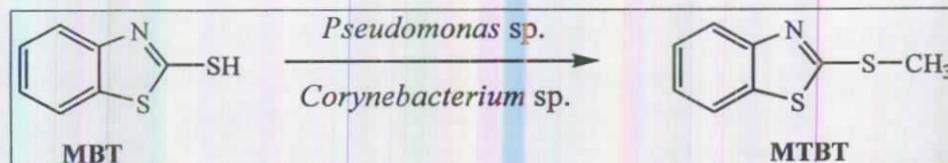


Figure I.8 : Biotransformation du MBT par *Pseudomonas* sp. ou *Corynebacterium* sp.

L'équipe de De Vos (1993b) a elle, tenté d'isoler des souches pures capables de se développer avec OBT comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie, à partir de boues activées. Ce travail est difficile et les auteurs se sont heurtés à un grand nombre de difficultés : soit les souches isolées pouvaient se développer en milieu solide contenant le benzothiazole, mais se lysaient quand on les inoculait en milieu liquide contenant le même composé, soit elles n'étaient plus actives, soit encore elles perdaient très vite leurs capacités dégradatives vis-à-vis de ce composé. L'équipe de De Wever a cependant réussi à isoler deux souches pures : *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 (De Wever et al., 1997b) et *Rhodococcus erythropolis* BTS1 (De Wever et al., 1998). Ces deux souches utilisent BT et OBT comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie. En revanche, seule la souche *Rhodococcus erythropolis* est capable de minéraliser B₂SO₃ : 2,8 mM de B₂SO₃ sont dégradés en 75 h, avec formation de sulfate, sulfite et ammonium avec un rapport molaire B₂SO₃ consommé / ammonium / sulfate produit : 1 / 0,5 / 0,6 au lieu du rapport théorique attendu 1 / 1 / 2. Cependant, aucune de ces souches n'est capable de se développer en présence de MBT comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie. Des incubations avec ce dernier composé ont montré un changement de couleur du milieu qui passe du jaune au rouge, sans que néanmoins ne soit observée une diminution de la concentration en substrat de départ.

Parallèlement à ce travail, l'équipe de Gaja et Knapp (1997) a isolé une autre souche *Rhodococcus pyridinovorans* PA à partir de boues activées de stations d'épuration traitant les

eaux usées d'une usine fabriquant des additifs de caoutchouc. Cette souche est capable d'utiliser BT comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie. Les mesures respirométriques et les dosages d'ammonium et de sulfates produits lors de la biodégradation de ce composé ont montré que la minéralisation totale n'avait pas lieu (rapport molaire BT consommé / ammonium / sulfate produit : 1 / 0,5 / 0,04 au lieu du rapport théorique attendu 1 / 1 / 1). *Rhodococcus pyridinovorans* PA dégrade également OBT dans les mêmes proportions mais ne dégrade pas ABT. Des tests ont également été réalisés avec cette souche en présence de MBT. Les auteurs ont pu constater l'apparition d'une couleur jaune foncé au cours de l'expérience. Cependant, seulement 7,5 % de la quantité d'oxygène théorique nécessaire à la biodégradation totale ont été consommés. Les auteurs concluent de ces expériences que le métabolite résultant de cette transformation, qui n'a pu être identifié, est formé en très faible quantité.

Afin de préciser le schéma métabolique de ces souches, des études plus systématiques sur chacun des dérivés avec les souches *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus erythropolis* ont été réalisées, en utilisant comme technique d'analyse l'HPLC en phase inverse munie d'un détecteur UV (De Wever, 1995). Elles ont montré que le pH (tampon phosphate dans une gamme entre 6 et 8) influençait la vitesse de biodégradation du OBT, avec un ralentissement de celle-ci aux pH 6 et 8 par rapport à celle obtenue à pH 7. La concentration en oxygène est également importante. En effet, une diminution de la concentration en oxygène s'accompagne d'un ralentissement de la dégradation et d'une accumulation de produits colorés. En aérobiose, on constate que OBT est le premier intermédiaire de la dégradation du BT et qu'il y a accumulation d'un composé inconnu (second métabolite du BT). Seul BTSO_3 est dégradé en conditions anoxiques par *Rhodococcus erythropolis*, et est métabolisé en OBT par désulfonation et fixation simultanée d'un groupement hydroxyle.

L'étape suivante a donc été l'identification du second métabolite de BT. La séparation des produits par chromatographie sur couche mince préparative, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, a permis d'identifier partiellement ce métabolite comme étant un dihydroxybenzothiazole. Cependant, la position du groupement hydroxyle supplémentaire ne pu être déterminée, faute de techniques d'analyse performantes.

D'autres méthodes de séparation de produits ont été mises en œuvre pour aller plus loin.

— Anne-Marie Thiebaut, *Hydrobiologie*, 1998, 45, 101-109, 103-104, 107-108, 110-111, 113-114

RMN métabolique a démarré une collaboration, d'une part avec l'équipe d'Heleen De Wever (Université Catholique de Louvain, Belgique) et Jerry Knapp (Université de Leeds, UK) pour identifier les métabolites issus des dégradations de BT, OBT et ABT par des souches de *R. rhodochrous* et *R. erythropolis*, et de BT et OBT par une souche de *R. pyridinovorans* PA.

Dans le paragraphe suivant nous allons illustrer comment la RMN a effectivement permis d'analyser les voies métaboliques impliquées dans la dégradation de ces benzothiazoles.

c)- Apport de la RMN dans l'étude des benzothiazoles

La RMN a connu dans cette dernière décennie plusieurs applications dans l'étude du métabolisme des microorganismes (Grivet *et al.*, 1992, 2003). En dehors du métabolisme intrinsèque des cellules, la RMN a pu être appliquée avec succès à l'étude de la biotransformations de xénobiotiques (Delort et Combourieu, 2000). Dans ce cadre, la RMN du proton ne s'est bien développée que très récemment (Brecker et Ribbons, 2000, Delort et Combourieu, 2001, Combourieu *et al.*, 2003).

Cette approche a permis d'établir les voies de dégradation du benzothiazole (BT), du 2-hydroxybenzothiazole (OBT) (Besse *et al.*, 2001 ; Haroune *et al.*, 2001 et 2002) et du 2-aminobenzothiazole (ABT) (Haroune *et al.*, 2001) par différentes souches microbiennes (*R. erythropolis*, *R. rhodochrous* et *R. pyridinovorans* PA) (Figure I.9). L'hydroxylation des composés benzothiazoliques sur le cycle benzénique en position 6 s'est révélée l'étape commune de la voie de la biodégradation.

c1)- Suivi de la cinétique par RMN ¹H in situ

La RMN ¹H in situ est un moyen puissant et très convenable pour contrôler les cinétiques de la biodégradation. Les auteurs prélèvent des échantillons de 1 mL à des intervalles réguliers, rapidement centrifugé puis le pH est ajusté pour éviter les variations de déplacements chimiques. Le TSPd₄ rajouté dans l'échantillon constitue une référence interne aussi bien pour les déplacements chimiques que pour la quantification des métabolites. Le processus tout entier prend moins de 15 minutes et le seuil de concentration détectée dans ces conditions est voisine de 50 µM.

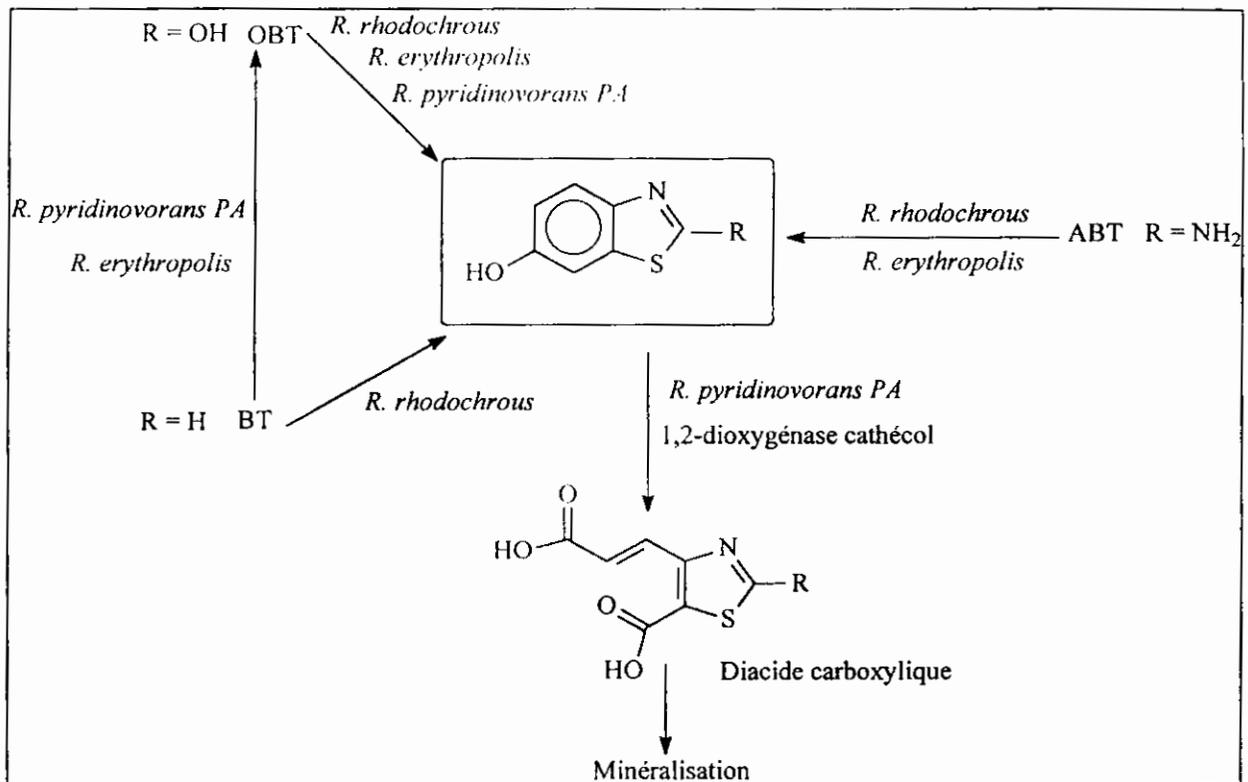


Figure I.9 : voies de dégradation de quelques benzothiazoles par différentes souches microbiennes (Besse et al., 2001 ; Haroune et al., 2001 et 2002)

Un exemple de spectre RMN ¹H *in situ* enregistré durant la biodégradation de BT (3 mM) par des cellules au repos métabolique de *Rhodococcus pyridinovorans PA* est représenté sur la (Figure I.10).

Les signaux RMN ¹H correspondant aux différents composés ont été détectés : le substrat initial BT (δ ppm : 7.57(t), 7.65(t), 8.14(2xd), 9.28(s) et trois nouveaux métabolites correspondant à OBT (2 triplets à 7.24 et 7.38 ppm, et 2 doublets à 7.29 et 7.58 ppm), au dihydroxybenzothiazole (diOBT) (un doublet à 7.08 ppm, un doublet de doublet à 8.86 ppm et un doublet à 7.15 ppm) et un diacide carboxylique (deux doublets à 6.03 et 7.45 ppm). OBT a été identifié par comparaison à un composé commercial. La structure de autres métabolites a été établi en utilisant des expériences de la RMN 2D ¹H-¹⁵N et ¹H-¹³C comme expliqué ci après.

De plus, l'intégration des signaux ¹H - comparée à l'aire du TSPd₁ - a fourni des données quantitatives sur la durée de dégradation des benzothiazoles et la biosynthèse des métabolites.

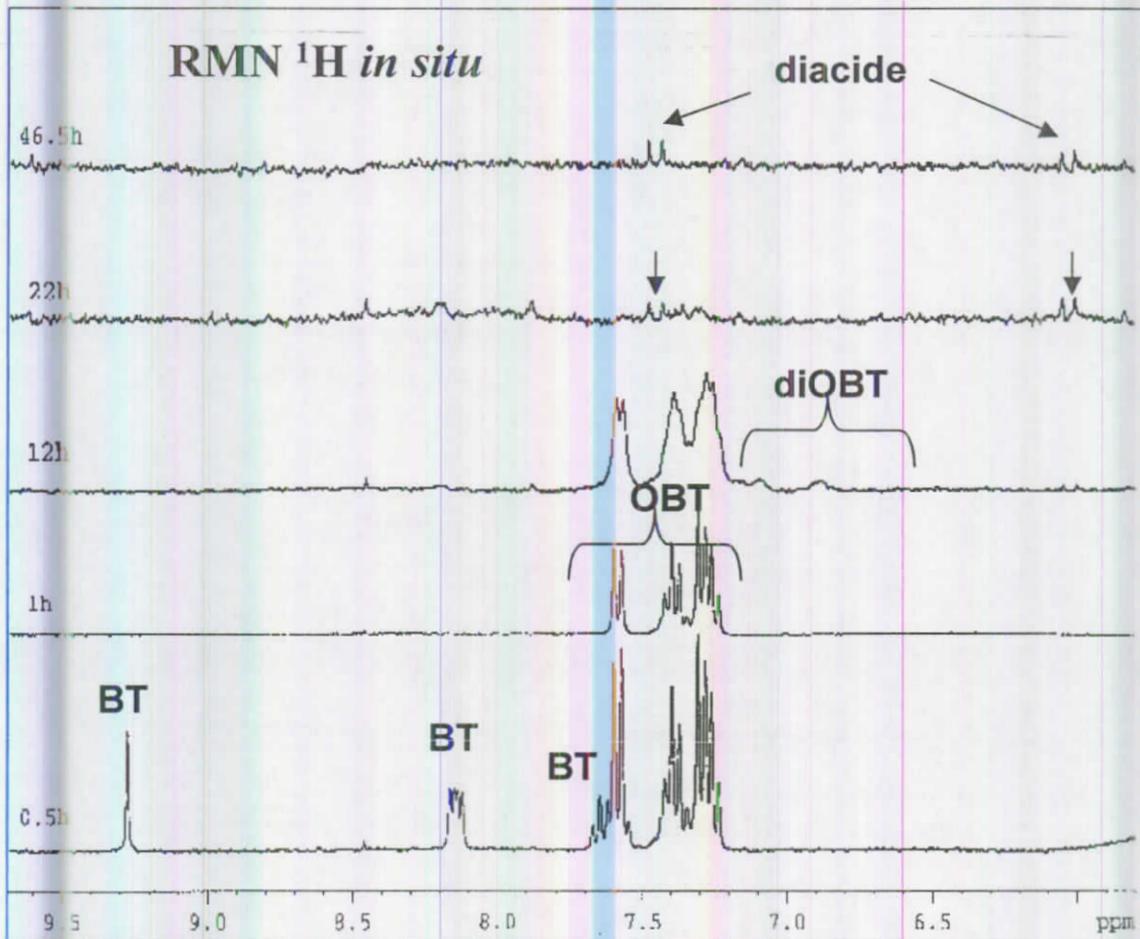


Figure I.10 : Spectre RMN ^1H *in situ* enregistré durant la biodégradation de BT (3 mM)

C2)- Éluclation de la structure du métabolite 1 inconnu par les expériences RMN 2D

Il est très connu que la difficulté majeure rencontrée dans l'étude des xénobiotiques est que les voies métaboliques sont inconnues; et de ce fait la structure des intermédiaires doit être établie en utilisant des expériences plus sophistiquées de RMN 2D.

Cependant, ces expériences demandent des concentrations élevées en produits, ce qui constitue un problème supplémentaire car ces métabolites sont parfois présents en quantités infimes dans le milieu réactionnel. Par conséquent certaines stratégies doivent être utilisées pour avoir des échantillons plus concentrés :

i) une plus grande quantité de biomasse peut produire une quantité plus importante de métabolites dont les plus intéressants seront purifiés sur le gel de silice;

ii) les échantillons sont rassemblés et lyophilisés. Des expériences HSQC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) peuvent être réalisées *in situ*, directement sur ces échantillons pour avoir des informations sur les corrélations directes ^1H - ^{13}C ou longues distance. (Haroune *et al.*, 2001 et 2002).

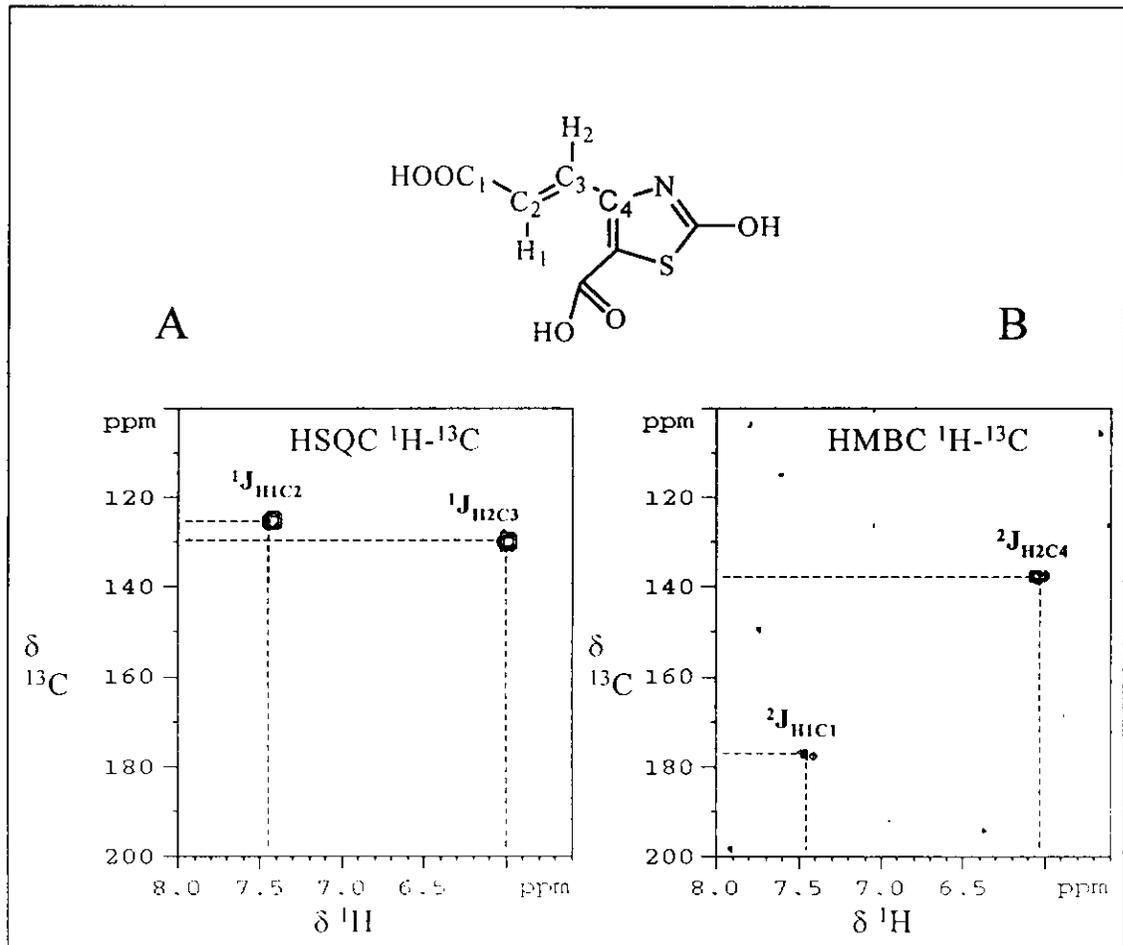


Figure 1.11 : Elucidation de la structure du métabolite inconnu par les expériences RMN 2D

Un exemple est donné ici dans le cas de la détermination de la structure d'un diacide issu de la dégradation de BT et OBT par *Rhodococcus pyridinovorans* PA. Ces expériences ont été réalisées *in situ* sur des échantillons lyophilisés. Sur le spectre HSQC ^1H - ^{13}C présenté sur la figure 1.11A, deux taches sont détectées indiquant des couplages ^1H - ^{13}C entre les protons résonnant à $\delta = 6.03$ et 7.45 ppm et les carbones éthyléniques correspondant résonnant à 129.7 et 125.0 ppm respectivement. Sur la figure 1.11B, les paramètres utilisés lors de l'expérience HMBC ont permis de relier les carbones

protons éthyléniques et les carbones quaternaires ($^2J_{1H-13C}$, $d_6 = 50$ ms). Les corrélations observées sur le spectre RMN 2D ont démontré que le proton résonnant à 7.45 ppm est porté par un groupement carboxylique (C_1 , $\delta_{13C} = 177.2$ ppm) et attribué à H_1 , alors que le proton résonnant à $\delta = 6.03$ ppm est distant de deux liaisons à partir du carbone quaternaire (C_4) résonnant à 137.1 ppm et peut être attribué à H_2 .

Dans le cas des métabolites (issus de OBT et ABT) hydroxylés en position 6 du cycle benzénique, une expérience du type $^1H-^{15}N$ HMBC a été utilisée, elle s'est révélée la seule voie possible pour déterminer la position exacte du groupement hydroxyle. A cause de la sensibilité très faible des noyaux ^{15}N , ces expériences ont été réalisées sur des métabolites purifiés. Il faut noter que ces travaux ont représenté le premier exemple de telles séquences utilisées en abondance naturelle dans le domaine de l'environnement (Besse et al., 2001).

C3) - Étude de l'effet des inhibiteurs spécifiques d'enzyme par RMN in situ

Une fois les métabolites identifiés, des hypothèses peuvent être faites sur la nature des enzymes impliquées dans la voie biodégradative. En plus des essais enzymatiques et des études génétiques, la RMN in situ peut être un moyen efficace pour l'identification de l'effet d'inhibiteurs spécifiques d'enzyme. Par exemple, dans le cas de la souche de *Rhodococcus pyridinovorans* PA l'identification de l'intermédiaire carboxylique issu de la dégradation du BT est compatible avec une ouverture intradiol du cycle benzénique par une catéchol 1,2-dioxygénase. Pour confirmer l'activité de cette enzyme, un inhibiteur spécifique, le 3-fluorocatéchol (3FC, 1 mM), a été rajouté au milieu d'incubation, une inhibition évidente du métabolisme de OBT a été observée par RMN 1H in situ. De plus, il a pu être constaté que le 3FC, qui est un analogue de substrat de la catéchol 1,2-dioxygénase, a été biotransformé en parallèle en 3-F-muconate comme il est montré sur les spectres RMN 1H et ^{19}F (Figure I. 12A et 12B).

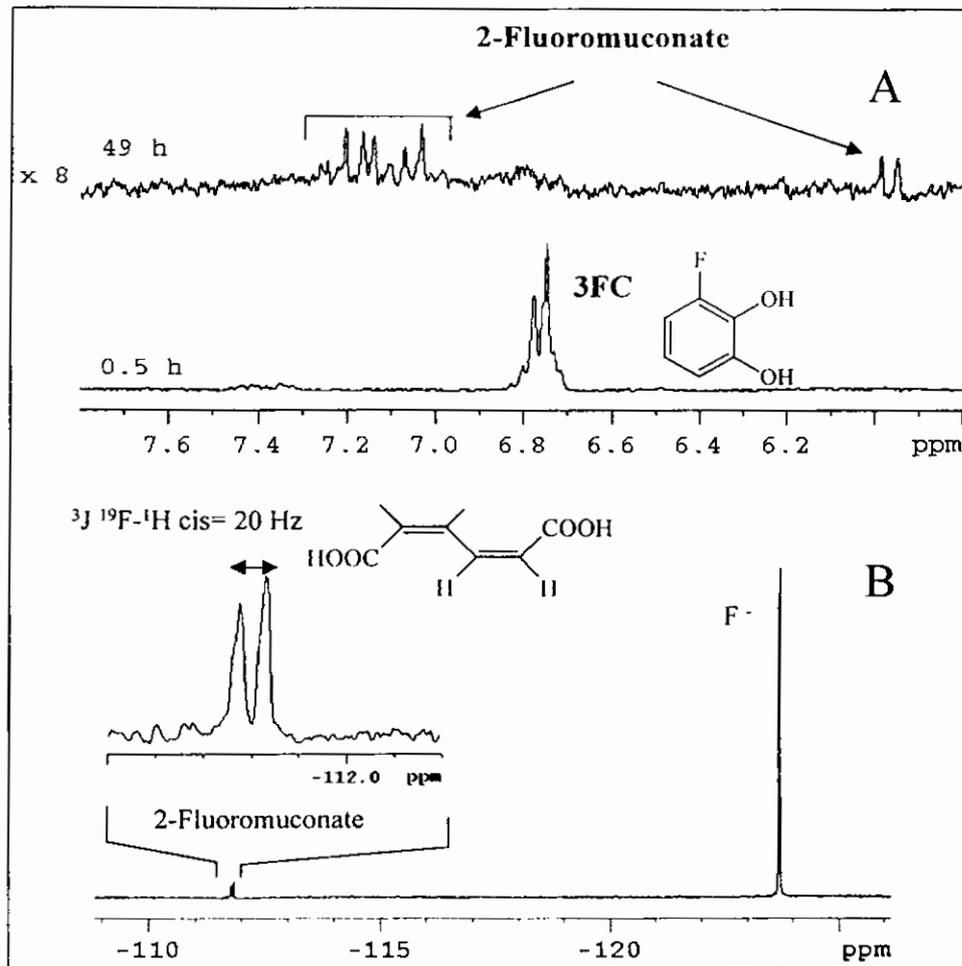


Figure 1.12 : Incubation de 1mM de 3-FC (3-fluorocatéchol) avec les cellules au repos métabolique de *R. pyridinovorans* PA.

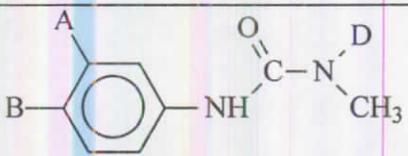
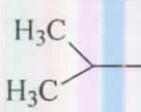
A)- Spectre RMN ^1H in situ à 0,5 et 49 h. B)- Spectre RMN ^{19}F in situ à 49 h.

En conclusion, il a été possible en utilisant l'approche RMN ^1H d'étudier la voie biodégradative de 3 benzothiazoles incluant BT, OBT et ABT par 3 souches bactériennes de *Rhodococcus*. L'hydroxylation des dérivés benzothiazoles sur le cycle aromatique en position 6 se manifeste comme étant l'étape commune de cette voie.

1.1.5- Biotransformation du méthabenthiazuron

Le méthabenthiazuron présente la particularité d'être un benzothiazole avec une chaîne urée comme substituant en position 2. Cet herbicide a été souvent considéré comme une phénylurée et de ce fait nous avons jugé nécessaire de rappeler les principales voies observées pour la dégradation de la phénylurée. L'isoproturon, le métrifluthrin et le métrifluthrin présentent les mêmes caractéristiques que le méthabenthiazuron.

Tableau (I.1) : Structures moléculaires des herbicides type phénylurées communs

			
	A	B	D
Isoproturon		H	CH ₃
Diuron	Cl	Cl	CH ₃
Monuron	Cl	H	CH ₃
Chlorotoluron	CH ₃	Cl	CH ₃
Fénuron	H	H	CH ₃
Fluométuron	H	CF ₃	CH ₃
Metobromuron	Br	H	OCH ₃
Chlorobromuron	Br	Cl	OCH ₃
Linuron	Cl	Cl	OCH ₃

Deux grandes voies sont rapportées en général pour la dégradation de ces composés ; une voie d'hydrolyse directe et une autre voie séquentielle concernant en plus l'hydrolyse en dérivés aniline et des N-désalcoylations (figure I.13). En outre la figure I.14 présente les principales réactions observées pour l'herbicide isoproturon et ses analogues structuraux qui, en plus des réactions d'hydrolyse et de désalkylation, mettent en évidence des réactions de condensation (Sebastian et *al.*, 2003).

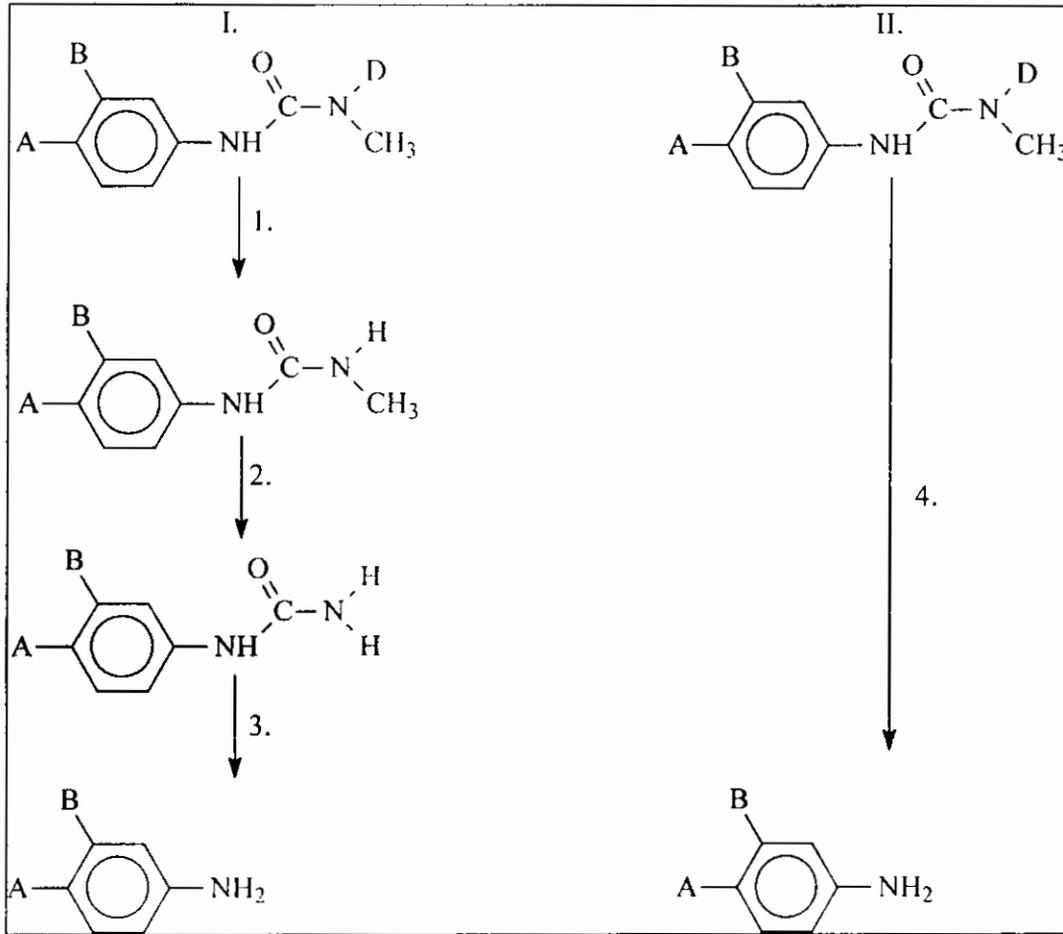


Figure I.13 : Voies de dégradation générale proposées pour les herbicides type phénylurées *N*-méthoxy-*N*-méthyl- et *N,N*-diméthyl-substitués dans le sol agricole.

Voie I : Impliquant des *N*-déacylations séquentielles (étape 1 et 2) et l'hydrolyse en dérivés aniline (étape 3).

Voie II : Hydrolyse directe en dérivés aniline (étape 4). (voir le tableau I.1 pour l'identification des substituants A, B et D pour chacun des herbicides et leurs métabolites)

La biotransformation de l'herbicide méthabenzthiazuron (MBTU) a fait l'objet de plusieurs études en laboratoire avec des échantillons de sol ou des souches isolées des sols traités par cet herbicide ou d'autres herbicides de structure analogue.

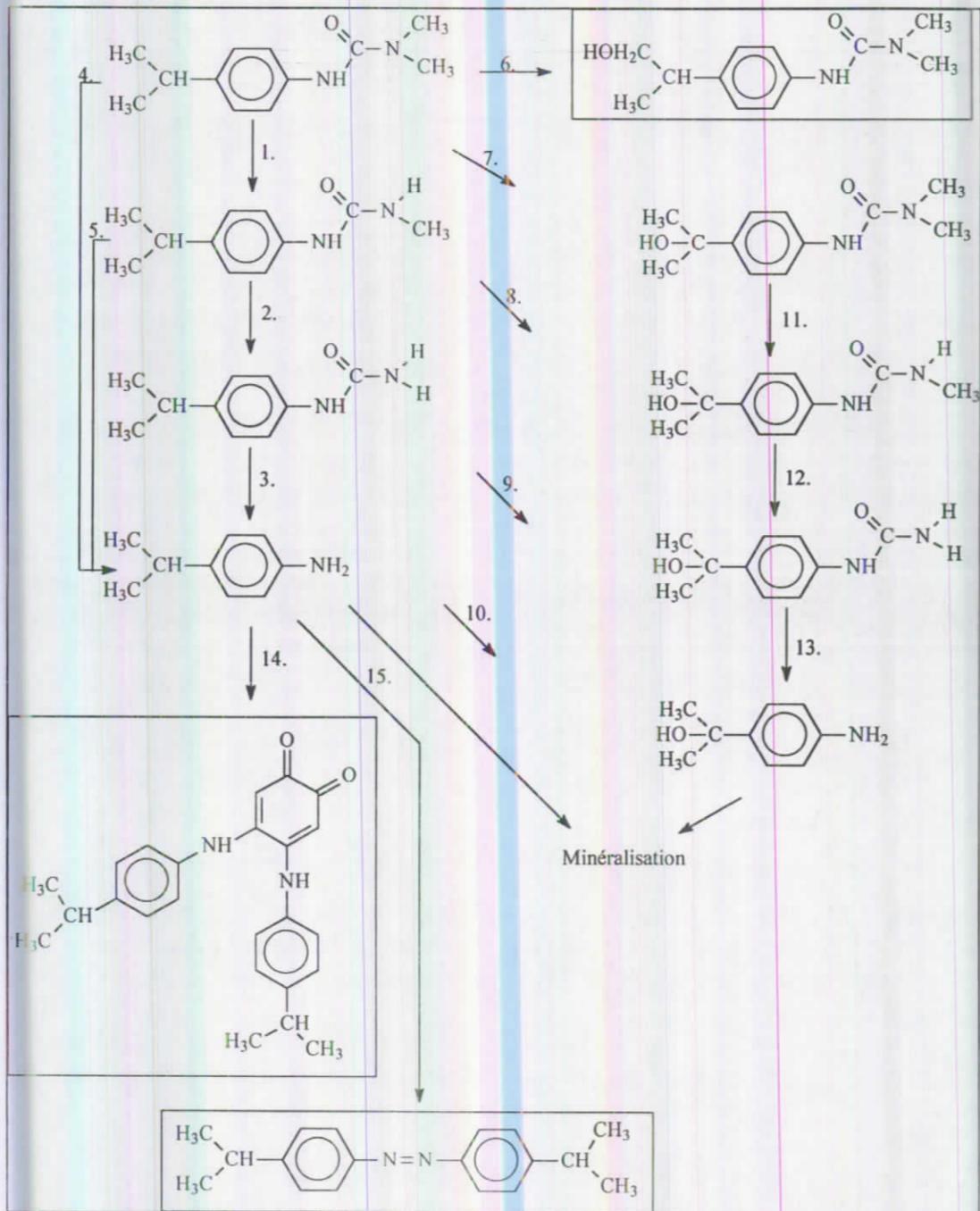


Figure I.14 : Voies de dégradation proposées pour l'isoproturon (IPU) dans le sol agricole et par des microorganismes définis du sol. Les composés encadrés sont des métabolites stables sans dégradation ultérieure.

- C'est ainsi que Wallnöfer et al. (1976), dans une étude de pionnier, ont étudié la biotransformation de MBTU en présence du phycomycète *Cunninghamella echunilata*. Ils ont trouvé que cette souche transformait l'herbicide en deux métabolites M₁ et M₂. M₁ a été identifié par spectrométrie de masse puis la structure a été confirmée par des

nombreuses données physiques : point de fusion, Rf, UV, IR et ¹H-RMN en les comparant avec celles d'un échantillon authentique de benzthiazuron (M₁). De la même façon la spectrométrie de masse et la RMN de proton ont montré que M₂ correspondait à une hydroxylation du cycle benzénique de la molécule avec une ambiguïté sur la position (sur le carbone 6 ou 5) du groupement hydroxyle. Un travail sérieux de synthèse et de dérivation a permis de trancher pour la position 6.

- o Une autre étude réalisée par Goettfert et al. (1978), a porté sur la transformation microbienne du MBTU marqué ¹⁴C par une souche fongique *Hypocrea pilulifera*, isolée du sol. Après 7 semaines d'incubation, la vitesse de dégradation de [¹⁴C] MBTU était de 16 % de [¹⁴C] MBTU recouvrait dans sept semaines. Six métabolites ont pu être isolés à l'aide de la chromatographie sur couche mince et sur colonne, et caractérisés à l'aide des méthodes spectroscopiques et chromatographiques.

Tableau (I.2) : Principaux métabolites isolés après transformation de méthabenzthiazuron par *Hypocrea pilulifera* (Goettfert et al., 1978)

The chemical structure shows a benzothiazole ring system. A benzene ring is fused to a five-membered thiazole ring. The thiazole ring has a nitrogen atom at the top position and a sulfur atom at the bottom position. The carbon atom at the 2-position of the thiazole ring is bonded to a nitrogen atom which is further substituted with R₂ and R₃. The carbon atom at the 4-position of the thiazole ring is bonded to a substituent R₁.

	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	CH ₃	CONHCH ₃
2	H	CH ₃	CONHCH ₂ OH
3	H	CH ₃	CONH ₂
4	H	H	CONHCH ₃
5	H	CH ₃	H
6	OH	CH ₃	CONHCH ₃

- o En 1978, Cheng et al. se sont fixés comme objectif l'élucidation des processus impliqués dans la dégradation dans le sol du MBTU par comparaison des vitesses d'évolution de ¹⁴CO₂ durant l'incubation du sol par cet herbicide et d'autres composés en relation avec lui. Les molécules ont été marquées sur des positions spécifiques et les résultats obtenus par techniques de radioanalyse ont permis d'évaluer la contribution de la dégradation microbienne et chimique à la dégradation globale.

que la partie hétérocycle du MBTU se décompose lentement en $^{14}\text{CO}_2$ et que la chaîne urée fournit une stabilité supplémentaire pour la molécule. Les auteurs ont rapporté aussi que le méthylaminobenzothiazole et le benzothiazole se dégradent plus rapidement que le MBTU, ce qui montre que ces molécules ne peuvent pas être des métabolites intermédiaires stables de la dégradation du MBTU. Aussi, chacun des groupes méthyle de la chaîne urée se déméthylait facilement. Cependant, le carbone du carbonyle de la chaîne urée se dégrade en CO_2 avec des vitesses comparables à celles des carbones de l'hétérocycle indiquant que des métabolites intermédiaires stables du MBTU devraient contenir la chaîne urée partiellement dégradée ainsi que la partie hétérocyclique.

- Une étude plus proche des conditions environnementales a été conduite par Azam et al. (1988) sur un sol d'une région aride pakistanaise. Les auteurs ont étudié le devenir de [carbonyl- ^{14}C]méthabenzthiazuron dans le sol considéré, en particulier l'effet de l'amendement organique par la paille de blé, de la modification du sol et de la fumigation par le chloroforme. A l'issue de cette étude, les auteurs ont pu tirer les 5 conclusions suivantes :
 - 1- MBTU est assez résistant aux transformations microbiennes ;
 - 2- la dégradation de MBTU a eu lieu à travers un co-métabolisme microbien ;
 - 3- la vitesse de dégradation de MBTU peut être différée dans le sol selon les propriétés physico-chimiques du sol. Les sols à faible taux en matière organique vont conduire à une dissipation plus rapide de MBTU appliqué ;
 - 4- l'amendement organique va promouvoir la dégradation de MBTU ainsi que son incorporation dans des formes humiques stables particulièrement dans la fraction humine non extractible ;
 - 5- la technique de fumigation peut être utilisée pour établir si une substance donnée peut être dégradée à travers un métabolisme ou un co-métabolisme.
- Dans la même optique Printz et al. (1995) ont étudié l'effet de l'amendement organique sur la dégradation et la formation des résidus liés du méthabenzthiazuron dans le sol sous des conditions climatiques fixes. Ces auteurs ont conclu, suite à cette étude, que l'amendement par la paille de maïs a conduit à la minéralisation de MBTU et a favorisé la formation des résidus liés dans le sol considéré. En effet, après amendement par la paille de maïs la radioactivité des résidus liés aux acides fulviques

et aux acides humiques était plus importante que celle des résidus liés à l'humine. La paille de maïs radiomarquée a été rapidement minéralisée (environ 45% en 45 jours), stimulant ainsi l'activité microbienne dans le sol. Sans amendement organique aucune incorporation du ^{14}C dans la biomasse n'a été détectée contrairement aux traitements MBTU+paille et MBTU+paille directe (sans incubation préalable avec le sol) où cette incorporation a eu lieu dans la biomasse microbienne du sol avec des vitesses de 1,5 et 1,2 % de la radioactivité appliquée respectivement. Les effets observés de l'amendement organique sur la dégradation du MBTU et la formation des résidus liés ont été similaires à ceux observés par les mêmes auteurs lors d'une étude lysimétrique (1995). La différence réside au niveau du degré des effets mesurés. Ces différences peuvent être dues à la durée du temps d'incubation dans le sol ou aux températures du sol durant les expériences.

- Dans une étude généralisée aux herbicides type phénylurées (y compris le MBTU), Berger en 1999 a mesuré les vitesses de transformation des herbicides dans un sol natif, un sol stérile, un sol en suspension et un sol inoculé avec des cultures pures des microorganismes (*A. niger*, *C. echinulata*.....). Dans le sol natif, la vitesse de transformation augmente généralement avec la diminution de l'adsorption mais l'auteur a trouvé que les corrélations avec les coefficients d'adsorption étaient faibles. Dans le sol stérile, le type de substitution du composé influe sur les vitesses de transformation. Dans le sol en suspension, la vitesse de transformation augmente avec la lipophilicité des herbicides étudiés. Dans le sol stérile inoculé par des microorganismes spécifiques, la transformation était largement marquée par la spécificité des microorganismes aux sites réactifs des herbicides type phénylurée. Dans tous les cas, Berger a trouvé que la N-déméthylation était une voie importante mais pas la seule pour la transformation de ces substrats.

Ces données ont montré que les vitesses de transformation des herbicides type phénylurées dans le sol sont affectées par plusieurs paramètres ayant rapport avec le sol, le composé et le type de transformation. Bien que ces résultats aient été obtenus en laboratoire sous des conditions artificielles, ils forment une base pour établir un rapport quantitatif de la relation structure-réactivité et fournir une explication quantitative et qualitative des produits formés.

L'auteur conclut finalement que la transformation des herbicides type phénylurés influe sur

- la lipophilicité des composés (sol en suspensions). Ce facteur pourrait être assisté par des descripteurs tel que $\log K_{ow}$;
- la disponibilité des composés vis-à-vis des microorganismes du sol (il n'était jamais le seul facteur) -comme cela a été démontré avec les expériences dans le sol natif-. Cette biodisponibilité pourrait être corrélée aux coefficients d'adsorption ;
- la réactivité des éléments structuraux spécifiques -comme c'est démontré dans le sol stérile et inoculé-. Cette réactivité pourrait être assistée par des paramètres chimiques fonctionnels.

I.2- Monoxygénases et dioxygénases impliquées dans la biodégradation de composés aromatiques

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation des xénobiotiques, plusieurs équipes de chercheurs se sont penchées sur l'identification des enzymes qui interviennent dans les voies cataboliques des xénobiotiques aromatiques.

Ces types de réactions cataboliques sont catalysés soit par des monoxygénases, soit par différents types de dioxygénase (Pelmont, 1993 ; Nozaki, 1979 ; Bertini *et al.*, 1996).

I.2.1- Les monoxygénases

Les monoxygénases sont des enzymes catalysant des réactions dont le modèle général est le suivant :



SH étant le substrat, XH_2 une source d'électrons (le plus souvent NADH ou NADPH).

L'unique atome d'oxygène introduit sur le substrat apparaît sous la forme d'un hydroxyle.

L'oxygène diatomique (donneur d'un atome d'oxygène) étant une molécule stable assez peu réactive, son insertion dans une molécule organique nécessite l'intervention d'un mécanisme

enzymatique approprié. De manière générale, la molécule de O₂ est réduite en se fixant à l'enzyme sous la forme d'un peroxyde. Sa rupture hétérolytique engendre une molécule d'eau et un dérivé oxygéné très réactif de l'enzyme qui a pour effet d'apporter un atome d'oxygène sur le substrat. Les enzymes qui catalysent ce type de transformations sont les cytochromes P450 et les monooxygénases flaviniques.

I.2.1.1- Les Cytochromes P450

Les cytochromes P450 constituent une large famille de monooxygénases à hème. Ces enzymes contiennent, comme cofacteur, une protoporphyrine IX identique à celle rencontrée dans l'hémoglobine. L'hème est fixé dans le site actif de la protéine par une liaison fer-soufre entre l'atome de fer de l'hème et l'atome de soufre d'une cystéine de la protéine (Figure I.15). En milieu réducteur, la fixation de monoxyde de carbone sur l'hème engendre un complexe qui possède un spectre d'absorption caractéristique avec un maximum proche de 450 nm. Omura et Sato (1964) ont identifié ces protéines par cette méthode et les ont nommé "cytochrome P-450" : pigment possédant une absorption à 450 nm. Toutefois, les cytochromes P450 ne sont pas de réels "cytochromes" dans la mesure où ils agissent comme oxydase terminale, dans un système de transport d'électrons à plusieurs composantes, et ne transfèrent pas leur électron à un autre accepteur (différent de l'O₂). A ce terme de "cytochrome P450", le comité de nomenclature de l'union internationale de biochimie préfère la dénomination "heme-thiolate protein". Mais comme le terme "cytochrome" a été utilisé depuis l'identification de ces protéines par Sato et Omura, il continue à être employé.

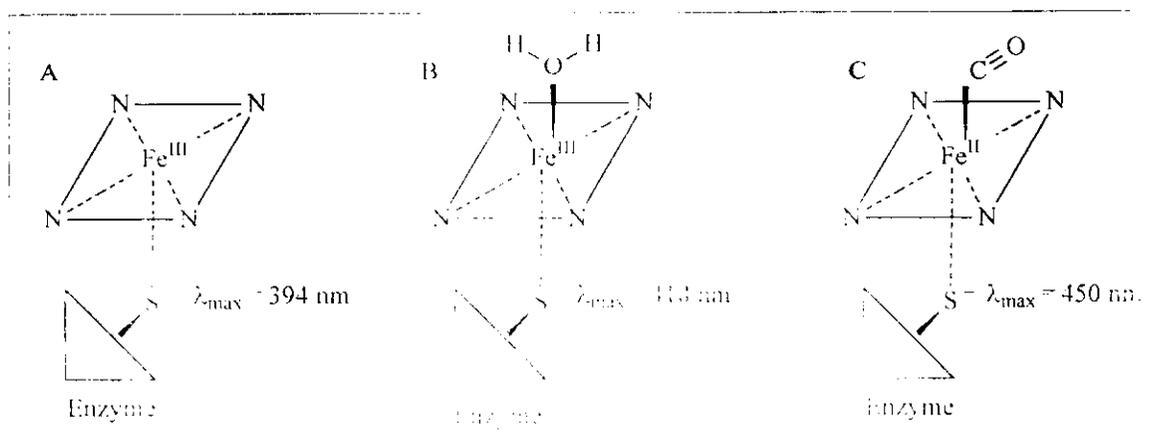


Figure I.15 : Différents états de spin de l'atome de fer du cytochrome P450 : (A) spin haut, (B) spin bas, (C) coordination à un atome de soufre par le carbone monooxyde. Le fer à l'état ferreux.

Les cytochromes P450 sont présents chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. La masse moléculaire des différents cytochromes P450 caractérisés est comprise entre 45 et 60 kDa. Ils jouent un rôle important dans le métabolisme oxydatif et réductif de composés endogènes (stéroïdes, acides biliaires, acides gras, prostaglandines, alcaloïdes,...) et exogènes (médicaments, composés polluants). Chez les eucaryotes, les cytochromes P450 participent activement à l'élimination de composés exogènes, mais dans certains cas la réaction qu'ils catalysent contribue à rendre cancérigènes des composés chimiques (Guergerich, 1990).

Les cytochromes P450 (monooxygénases hémiques) sont répartis en 4 classes (Roberts *et al.*, 2002) selon la nature des protéines auxiliaires (transporteurs d'électrons) qui leur permettent de fonctionner (Figure I.16).

Les cytochromes P450 de classe I, qui ont été identifiés dans les membranes de mitochondries et dans les bactéries, sont constitués de 3 composantes comprenant une flavine-réductase, une ferrédoxine contenant un centre Fer-Soufre et la protéine hémique du P450. Les cytochromes P450 de classe II sont constitués de deux composantes : une réductase diflavinique à FAD et à FMN fonctionnant avec du NADPH et une protéine hémique. Ces systèmes sont typiques des

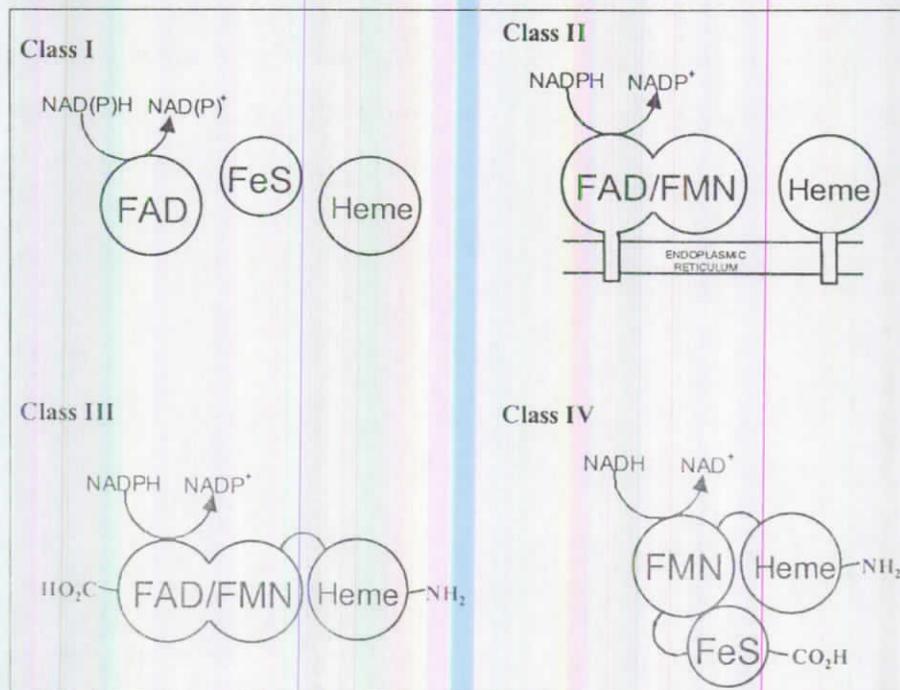


Figure I.16 : Classification des cytochromes P450 (d'après Roberts *et al.*, 2002)

enzymes microsomaux des cellules de mammifères impliquées dans le métabolisme des stéroïdes et dans les voies de détoxification. Parmi les cytochromes P450 d'origine bactérienne, une ω -hydroxylase a été découverte chez *Bacillus megaterium*, et nommée P450BM3. Sa structure ne diffère des cytochromes eucaryotes de classe II que par la présence d'un lien peptidique qui unit les deux composantes, conduisant à un polypeptide unique. En raison d'une structure primaire différente de celle des cytochromes de classe II, elle a été considérée comme le premier exemple de cytochrome P450 de classe III. Par la suite, d'autres enzymes sont venues compléter cette liste (CYP 102 A2 et CYP 102 A3 de *Bacillus subtilis*). Récemment, Roberts *et al.* (2002) ont isolé un nouveau type de cytochrome P450 chez *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, le P450RhF qui est constitué d'un P450 fusionné à une dioxygénase à activité réductase. Douée d'une organisation structurale particulière, cette enzyme a été considérée comme appartenant à une nouvelle classe de cytochrome P450, la classe IV. Dans cette nouvelle classe d'enzyme, les électrons sont acheminés au site actif du P450 par un centre FMN et un composant de type ferredoxine [2Fe-2S].

Le cytochrome P450 le plus connu est le P450_{cam} (classe I) isolé de la souche *Pseudomonas putida* qui catalyse l'hydroxylation du (+)-(1R)-camphre en 5-exo-hydroxy-camphre de manière stéréo et régiospécifique. Sa structure tridimensionnelle a été la première à être déterminée par diffraction des rayons X dans sa forme libre et liée avec le substrat (Poulos *et al.*, 1987). Le fonctionnement de ce cytochrome nécessite une source d'électrons qui est le NADH. Etant incapable d'utiliser ce cofacteur par lui-même, il reçoit les électrons du NADH par l'intermédiaire d'une mini-chaîne de transporteurs d'électrons constituée de deux protéines : une putidarédoxine et une enzyme flavinique fonctionnant à la manière d'une déshydrogénase et appelée putidarédoxine-réductase. L'organisation du complexe protéinique est représentée Figure I.17.

Cette ferredoxine récupère les deux électrons du NADH séparément sur chacun de ses deux centres [2Fe-2S]. Ces électrons sont livrés l'un après l'autre au P450 comme indiqué dans la Figure I.17 qui décrit le cycle catalytique de cette enzyme.

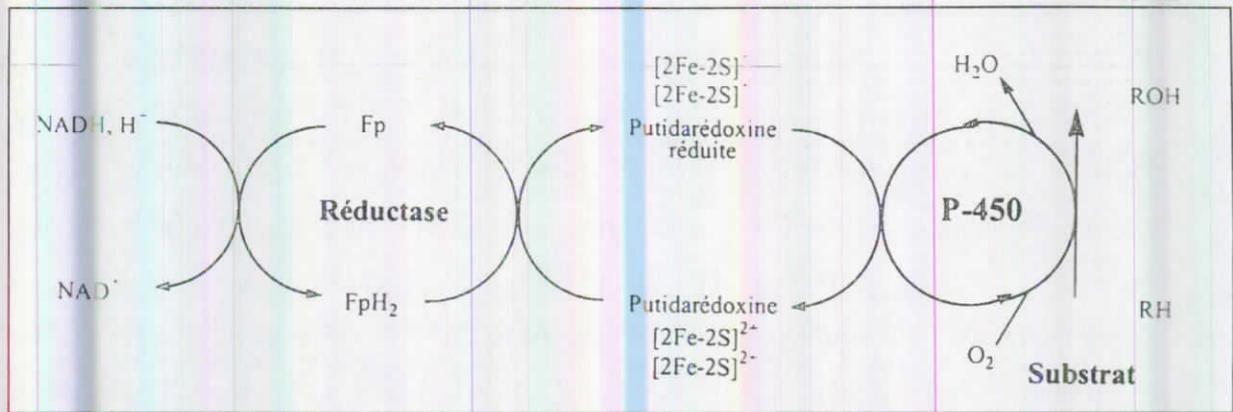


Figure I.17 : Chaîne de transfert des électrons dans le cas du P450_{cam} de *Pseudomonas putida* (d'après Pelmont, 1993).

a)- Mécanisme catalytique

Un mécanisme général de l'activité catalytique des cytochromes P450 a été proposé (Guengerich et MacDonald, 1990). Le cytochrome P450_{cam} *Pseudomonas putida* a largement servi de modèle pour ces études. Au cours de ce mécanisme catalytique, l'oxygène moléculaire est clivé et le substrat est oxydé (Figure I.18).

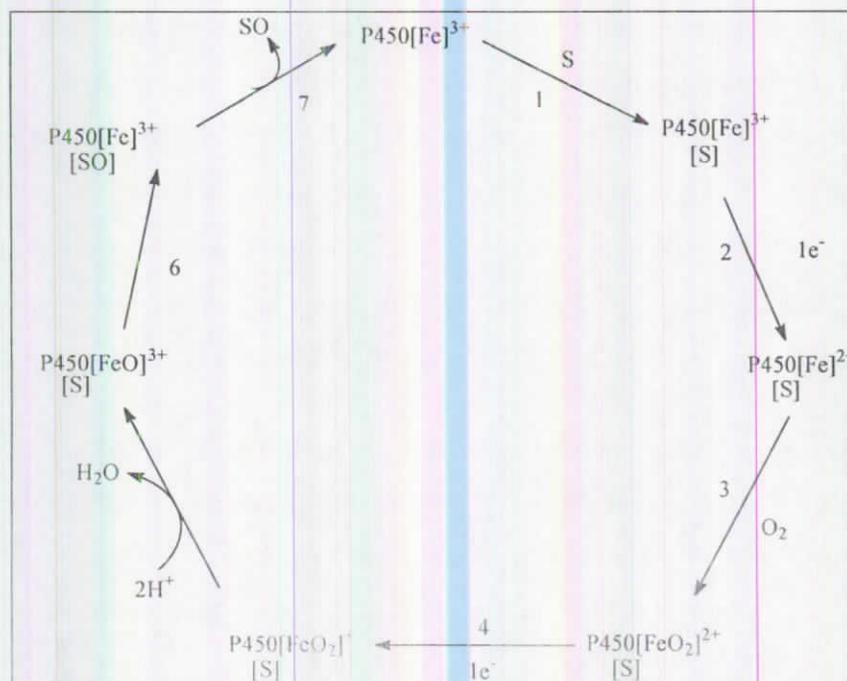


Figure I.18 : mécanisme catalytique de l'action des cytochromes P450 (Guengerich et MacDonald, 1990)

La première étape de ce mécanisme réactionnel est la fixation du substrat. Lors de cette étape, qui est supposée rapide, le spin de l'atome de fer est souvent modifié. Il passe d'un état de bas spin (hexacoordonné, $\lambda_{\max} = 418 \text{ nm}$) à un état de haut spin (pentacoordonné, $\lambda_{\max} = 394 \text{ nm}$). Ce changement de l'état du spin, lors de la fixation du substrat, s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption (spectre de type I) (Figure I.15). Dans une seconde étape, le complexe substrat lié au fer est réduit par l'arrivée d'un électron de la protéine réductase ou de la ferrédoxine. Le spin du fer ferreux passe à un état de haut spin. Au cours de la troisième étape, un complexe instable $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$ est formé par la fixation de l'oxygène moléculaire sur l'ion ferreux. Lors de la quatrième étape, un second électron est transféré au complexe cytochrome P450- $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$ ce qui génère un intermédiaire peroxy $[\text{FeO}_2]^+$. La liaison de l'oxygène moléculaire est ensuite rompue libérant une molécule d'eau et un intermédiaire réactif. Le substrat est alors oxygéné et libéré. Le cytochrome P450 est disponible pour un nouveau cycle.

b)- Réactions catalysées

Les cytochromes P450 sont capables de catalyser différentes réactions (Guengerich, 1990; Guengerich et MacDonald, 1990; Sariaslani, 1991) :

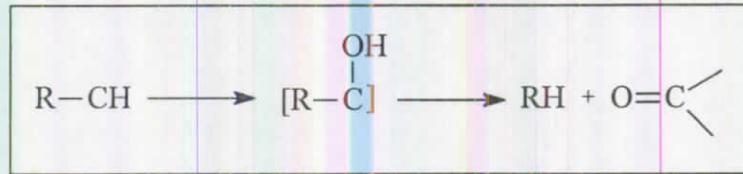
- **Hydroxylation d'un carbone** : un atome d'hydrogène est éliminé et remplacé par un groupement hydroxyle;



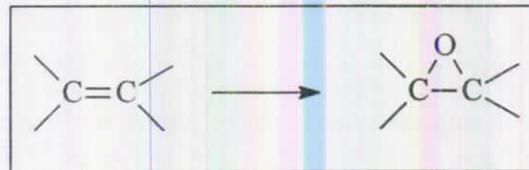
- **Oxygénation d'un hétéroatome** : cette réaction est notée avec des composés contenant de l'azote ou du soufre. Toutefois, une N-oxygénation est rarement observée car les atomes d'hydrogènes sont disponibles en position α à l'atome d'azote. En revanche, un mécanisme de S-oxygénation prédominera sur la S-désalkylation car un radical sulfure est relativement stable;



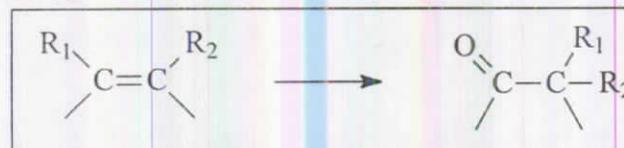
- **Libération d'hétéroatome (désalkylation) :** cette réaction concerne souvent des N-désalkylations, des O-désalkylations et le clivage oxydatif de liaisons esters;



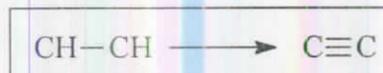
- **Epoxydation d'oléfines et de cycles aromatiques :**



- **Migration oxydative de groupements :** cette réaction peut-être consécutive à une époxydation ou survenir directement par le transfert de substituants;

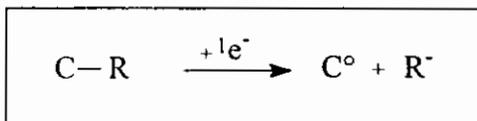


- **Déshydrogénation :** après l'élimination d'un premier atome d'hydrogène, il n'y a pas fixation d'un atome d'oxygène mais élimination d'un second atome d'hydrogène;

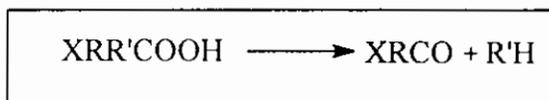


- **Inactivation du cytochrome P450 lors du mécanisme réactionnel :** lors de certaines réactions catalysées par les cytochromes P450, des intermédiaires réactionnels (acétylène) ou des produits finaux (oléfines) peuvent provoquer une N-alkylation de la porphyrine de l'hème. Cette modification de l'hème inactive le cytochrome P450;

- **Réduction** : cette réaction est notée avec les méthanes polyhalogénés, les groupements nitro, les N-oxydes et les époxydes;



- **Clivage d'hydroxypéroxydes** :



c)- Nomenclature

Un comité international s'est mis en place pour nommer les différents gènes codant pour des cytochromes P450 et établir une nomenclature rigoureuse (Nelson et *al.*, 1993). Cette nomenclature est basée sur l'évolution divergente des membres de la famille des cytochromes P450. Le nom d'un gène, ou d'un ADNc, codant pour un cytochrome P450 comprend le symbole "*CYP*" en italique ("Cyp" pour la souris) pour cytochrome P450, un chiffre arabe désignant la famille, une lettre majuscule (minuscule chez la souris) indiquant la sous-famille si l'existence de deux sous-familles ou plus a été démontrée au sein d'une même famille, et un chiffre arabe représentant le gène considéré. Dans le cas des gènes de souris ou des ADNc, le chiffre final est généralement précédé d'un tiret. La présence d'un « P » (« p » pour les gènes de souris) après le chiffre affecté au gène indique qu'il s'agit d'un pseudogène. Les gènes sont nommés dans l'ordre chronologique de soumission donc les familles les plus récentes ont un chiffre plus élevé. Le produit du gène est nommé de la même façon mais sans italique. Par exemple, le nom "*CYP1A2*" ferait référence au second gène codant pour un cytochrome P450 de la sous-famille A de la famille 1. Chez la souris ce gène porterait le nom "*Cyp1a-2*". Cette nomenclature ne tient pas compte de l'activité catalytique des différents cytochromes P450. Avant que cette nomenclature ne soit mise en place, les auteurs attribuaient des noms triviaux aux gènes isolés, qui sont dans bien des cas toujours utilisés. Le cytochrome P450 impliqué dans la dégradation du camphre par *Pseudomonas putida* (CYP101) est appelé P450cam (Hedegaard et Collins, 1965).

Les séquences protéiques qui possèdent plus de 40% d'identité en acides aminés appartiennent à une même famille. Cette limite de 40% d'identité a été fixée arbitrairement. Au sein d'une même famille, tous les gènes eucaryotes étudiés possèdent le même nombre d'exons et les mêmes jonctions intron-exon. Au sein d'une même sous-famille, les séquences présentent plus de 55% d'identité en acides aminés. Les gènes d'une même sous-famille sont localisés dans des régions adjacentes sur le même chromosome (Nebert et Nelson, 1991).

I.2.1.2- Les monooxygénases flaviniques

Contrairement aux cytochromes P450, ces monooxygénases à FAD fonctionnent sans l'intervention d'autres protéines et utilisent directement la source d'électrons qui est toujours le NADH ou le NADPH. Les représentantes les mieux connues du groupe sont la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase et la salicylate hydroxylase observées chez plusieurs genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Azotobacter* et *Acinetobacter*. Ces enzymes catalysent respectivement, la conversion du *p*-hydroxybenzoate en protocatéchuate (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) et du salicylate (*o*-hydroxybenzoate) en catéchol (Pelmont, 1993).

Ces enzymes ont fait l'objet de nombreuses études chez les mammifères. Elles sont présentes dans de nombreux tissus et existent sous de multiples isoformes. Spécialisées dans l'oxydation de xénobiotiques notamment soufrés ou azotés, elles se caractérisent par une spécificité de substrats exceptionnellement large, propriété qui est due à leur cycle catalytique particulier (Figure I.19).

Dans la cellule, cette protéine est apparemment présente sous une forme hydroperoxyde (hydroxyperoxyflavine FAD-OOH) très réactive, formée par une liaison covalente entre la flavine et l'oxygène susceptible d'oxyder n'importe quel composé qui entre en contact avec elle (étape n° 1). Le produit (SO) formé par le transfert de l'oxygène de l'hydroperoxyflavine au substrat, est relargué immédiatement. L'oxygène résiduel généré par la scission du peroxyde est libéré sous forme d'une molécule d'eau (étape n° 2), puis l'enzyme se détache du NADP (étape n° 3) afin de pouvoir accueillir un nouveau cofacteur chargé en électrons (étape n° 4). Une nouvelle molécule d'oxygène va ainsi être activée (réduction par le NADPH) sous forme d'un nouvel hydroperoxyde (étape n° 5). Le substrat n'est pas requis pour que les étapes 2 à 5 se réalisent. Un seul point de contact est nécessaire pour la formation du produit, propriété qui est à l'origine de leur large spécificité de substrats.

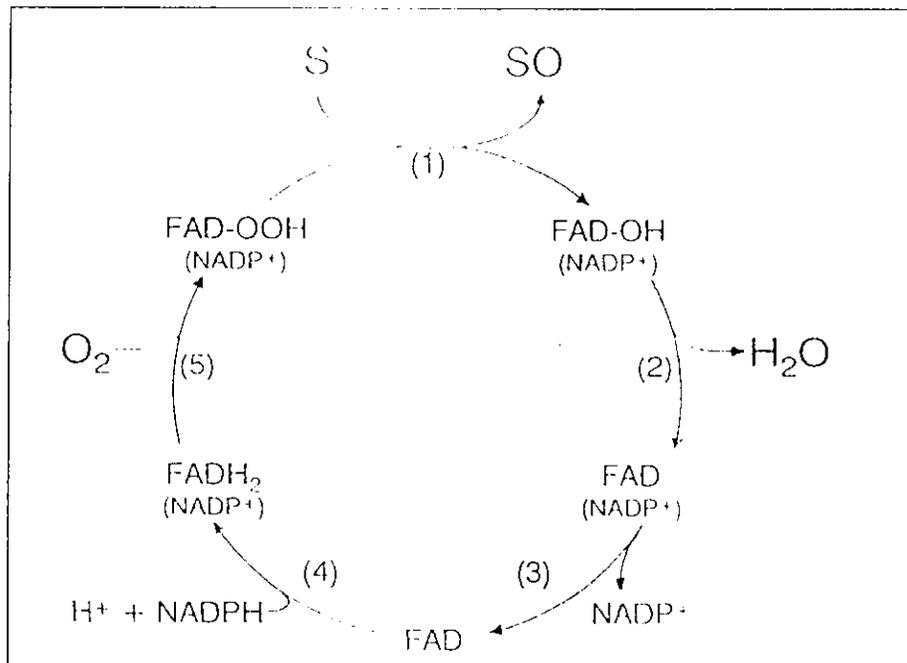


Figure I.19 : Cycle catalytique des monoxygénases flaviniques (d'après Ziegler, 1993).

Dans un premier temps, les monoxygénases flaviniques ont été divisées en 5 classes sur la base de leur structure primaire. Cependant, cette classification basée sur la séquence d'acides aminés ne donnait aucune information précise quant à la spécificité de chacune de ces classes d'enzymes. La nécessité de détecter spécifiquement l'activité des types d'enzymes présents dans des préparations tissulaires brutes, a amené les chercheurs à réaliser des études de relations structure-activité. Des tests d'oxydation de 5 thiocarbamides de taille croissante par des microsomes de tissus et d'espèces différentes ont permis de découvrir que l'accès au site actif des monoxygénases flaviniques était principalement conditionné par la taille du substrat. Ainsi, une classification basée sur la spécificité de substrat a été adoptée. Les différentes isoformes ont été nommées de A à E (Figure I.20).

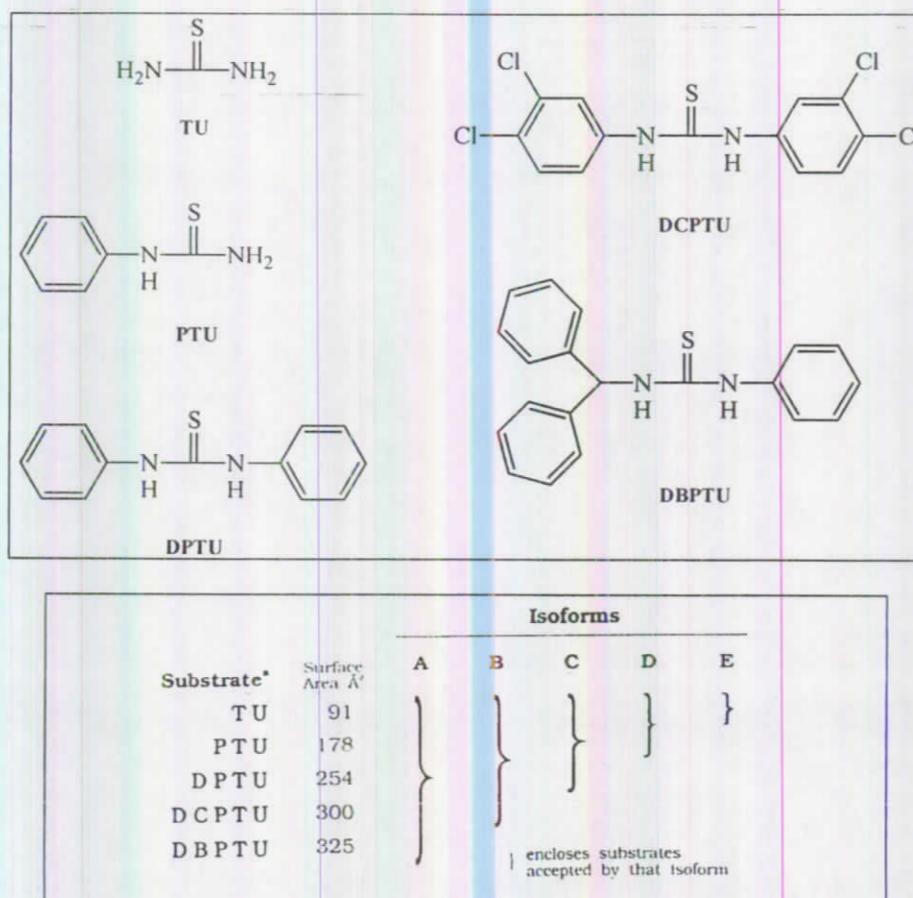
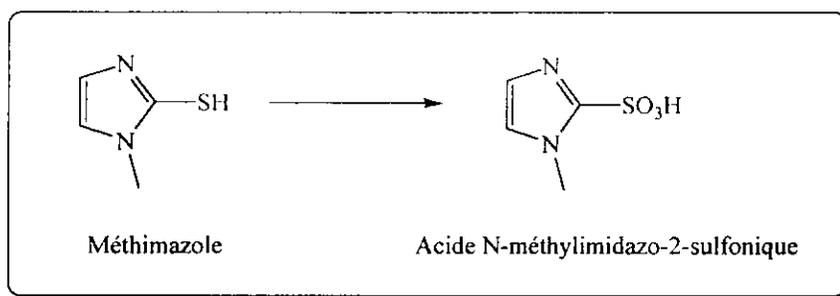


Figure 1.20 : Spécificités des isoformes de monoxygénases flaviniques en fonction de la taille du substrat. TU : thiourée ; PTU : phénylthiourée ; DPTU : 1,3-diphénylthiourée ; DCPTU : 1,3-bis(3,4-dichlorophényl)-2-thiourée ; DBPTU : 1,1dibenzyl-3-phényl-2-thiourée (d'après Ziegler, 1993).

Mais certains problèmes ont été rencontrés pour doser l'activité de ces enzymes, particulièrement pour distinguer les réactions d'oxydation de soufre catalysées par des monoxygénases de celles catalysées par des oxydases, des peroxydases voire même par des oxydations non enzymatiques. Les chercheurs ont alors eu recours à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de monoxygénases flaviniques. L'ensemble des monoxygénases accepte les petits substrats et notamment le 2-mercaptoimidazole ou méthimazole. Oxydé en acide sulfonique, celui-ci se lie de manière covalente aux groupements amino de l'enzyme pour conduire à son inactivation (Ziegler, 1993).

Cet inhibiteur spécifique de monoxygénases flaviniques a permis à Tomasi et al. (1995) de mettre en évidence l'implication d'une flavoprotéine dans la première étape d'hydroxylation de dérivés aromatiques polychlorés par *Pseudomonas cepacia*. En incubant les cellules avec le méthimazole, les chercheurs ont observé une inhibition de la dégradation allant de 50% à 100% selon les dérivés.



I.2.2- Les dioxygénases

Les dioxygénases sont classées en deux catégories en fonction du type de réaction qu'elles catalysent (Bertini *et al.*, 1996). La première catégorie de dioxygénases (type I = dioxygénases hydroxylantes) incorpore deux groupements hydroxyle en position *ortho* l'un de l'autre dans le cycle aromatique du substrat en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons, tel que la benzène dioxygénase (Figure I.21).

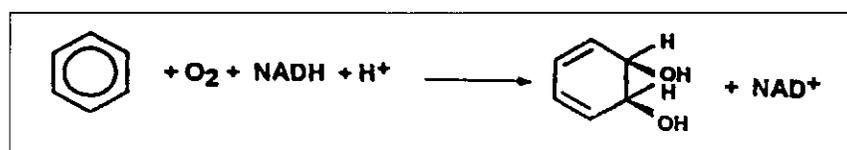
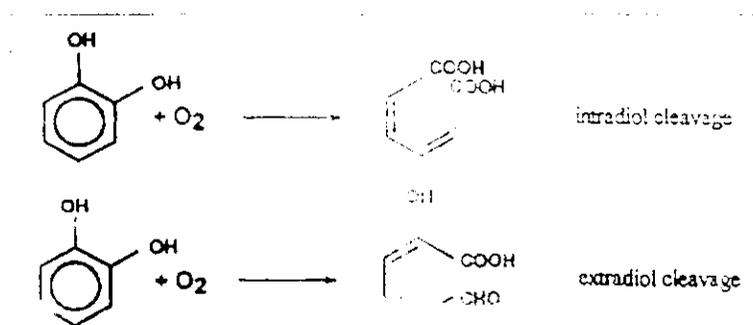


Figure I.21 : Réaction catalysée par une dioxygénase de type I.

Le *cis*-dihydrodiol obtenu est ensuite converti en catéchol par une déshydrogénase. Cet intermédiaire est alors pris en charge par une deuxième catégorie de dioxygénases (type II) qui ouvrent les cycles aromatiques en incorporant deux atomes d'oxygène à des endroits bien spécifiques du substrat, les catéchol 1,2-dioxygénases (coupure intradiol) et les catéchol 2,3-dioxygénases (coupure extradiol) (Figure I.22) :



I.3- GENETIQUE DE LA BIODEGRADATION

I.3.1- Rôle des plasmides dans la biodégradation

Des nombreuses voies de dégradation sont connues comme étant codées par des plasmides. Certains codent pour la totalité de la dégradation incluant ainsi un nombre important d'enzymes, alors que d'autres codent pour un faible nombre d'enzymes. La plupart de ces plasmides ont été isolés de *Pseudomonas*. Pour exemples, sur 190 souches connues dégradant le ϵ -caprolactame, 70 appartiennent au genre *Pseudomonas*. Parmi elles, 90% possèdent les plasmides CAP qui déterminent la dégradation du ϵ -caprolactame (Boronin 1992).

- Caractéristiques générales

- Le plasmide TOL est l'exemple du plasmide qui code pour la voie complète de la dégradation du xylène et du toluène alors que le plasmide NAH ne code que pour quelques étapes de la voie de dégradation du naphthalène.
- Certains gènes de dégradation sont regroupés en opéron (Harayama et Rejik 1990, Shingler, *et al.* 1992) mais il arrive aussi que les gènes soient éparpillés comme c'est le cas pour le plasmide CAM-OCT (William 1981).
- Très souvent ces plasmides sont de grande taille. En effet, le plasmide TOL a une taille de 117 Kb, NAH7 83 Kb, pBS3 197 Kb, pXAU1 200 Kb (Tardif, *et al.* 1991), pWW17 280 Kb (Williams et Worsey 1976).... Cependant, pKB740 (8,2 Kb) code pour les deux premières enzymes de la voie de dégradation du 2-aminobenzoate (Altenschmidt et Fuchs 1992).
- Ces plasmides sont souvent transférables, mobilisables, et conjugatifs et peuvent se répliquer dans différents genres bactériens (de Gram négatif à Gram positif le plus souvent).
- Ils sont parfois le véhicule de transposons et peuvent entraîner des mutations et des délétions modifiant alors les capacités dégradatives de la cellule hôte.

I.3.2- Gènes chromosomiques

Toutes les voies de dégradation ne sont pas, bien évidemment, codées par des plasmides. On retrouve de nombreux exemples comme la voie ortho du catéchol, la dégradation du toluène par *Pseudomonas mendocina* dont les gènes chromosomiques codant pour la toluène-4-monooxygénase sont organisés en opéron (T4MO) (Yen et Gunsalus 1982) ainsi que les gènes *tod* qui eux aussi sont regroupés en opéron (*todABCIC2*, *todD*, *todE* et *todF*) et qui sont responsables de la dégradation du toluène dans *Pseudomonas putida* F1 (Zylstra, et al. 1988). En général ces gènes sont organisés en opéron (Van der Meer, et al. 1992).

I.3.3- Voies de dégradation mixtes

D'autres voies mélangent les gènes plasmidiques et chromosomiques. Ainsi, la chaîne du catéchol, vers laquelle de nombreuses voies convergent (Fewson 1981), est divisée selon deux réactions enzymatiques distinctes (Williams 1981) :

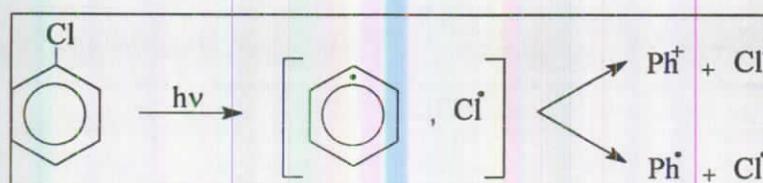
- L'*ortho* clivage : entre deux groupes hydroxyles pour former un acide cis-cis muconique, lequel est ensuite dégradé par la voie β -céto-adipique. Les gènes codant pour les enzymes de cette voie sont souvent portés par le chromosome.
- Le *méta* clivage : entre atomes de carbone dont l'un seulement possède un substituant hydroxyle, pour former le 2-hydroxymuconique semialdéhyde. A l'inverse de la voie de l'ortho clivage, les gènes codant pour la voie du méta clivage sont plutôt d'origine plasmidique. Il semblerait que les grands plasmides, porteurs de gènes responsables de certaines voies de dégradation de composés xénobiotiques, aient un avenir plus prometteur dans le processus de biodégradation que les gènes chromosomiques. En effet, un chercheur sera toujours confronté aux limites de la taille d'un insert dans un vecteur et donc au nombre de gènes qu'il pourra cloner alors que les plasmides de dégradation sont parfois auto-transférables. Ils permettent ainsi à d'autres souches d'acquérir d'autres capacités de dégradation. La seule difficulté réside dans leur trop grande taille entraînant de nombreuses difficultés de visualisation, notamment par cartographie et caractérisation.

I.4- PHOTOCHEMIE DES HALOBENZONITRILES

Afin de mieux comprendre le comportement photochimique des halobenzonitriles, il nous a semblé utile de rappeler les résultats de quelques études bibliographiques concernant la phototransformation de certains composés aromatiques halogénés.

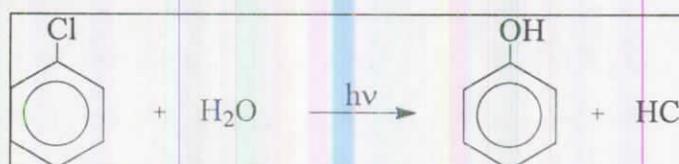
I.4.1- COMPOSES AROMATIQUES HALOGENES

Le chlorobenzène est l'un des composés aromatique les plus simples et absorbe la lumière de façon significative à des longueurs d'onde inférieurs à 300 nm. Tissot *et al.* (1983) ont montré qu'en milieu aqueux le chlorobenzène est photodissocié en radicaux phenyl et Cl^\bullet avant de réagir avec le solvant :



L'étape triplet du chlorobenzène a suffisamment d'énergie (86 kcal mol^{-1}) pour provoquer la coupure de la liaison Ph-Cl (Bunse *et al.*, 1980). En milieu aqueux, le rendement quantique obtenu par Boule *et al.* (1985) est de 0,1 alors que Dulin *et al.* (1986) ont obtenu une valeur proche de celle mesurée dans l'hexane ($\phi = 0,26$).

La photolyse du chlorobenzène en solution aqueuse passe donc par un processus de photohydrolyse conduisant à la formation de phénol quelles que soient les longueurs d'ondes d'irradiation, (253,7 et 300 nm), les conditions de pH, d'oxygénation et de concentration (10^{-4} à $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) (Tissot *et al.*, 1983 ; Dulin *et al.*, 1986) :



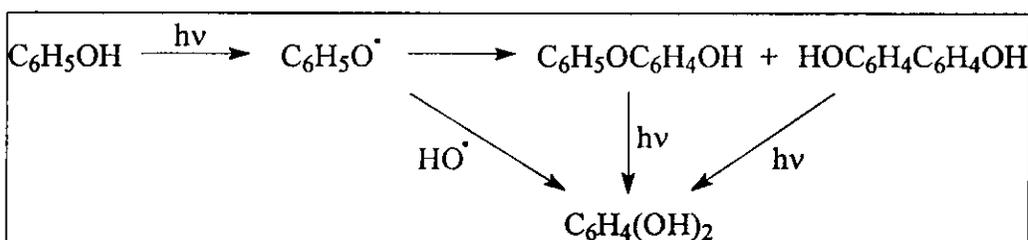
Le monofluoro et le monobromobenzène irradiés en phase aqueuse ont un comportement analogue à celui du monochlorobenzène.

La vitesse de photolyse des chlorobenzènes est très fortement influencée par le degré de chloration. Les rendements quantiques des di et trichlorobenzènes décroissent rapidement

avec le nombre de substituants surtout lorsque ces substituants sont sur les sites conjugués (positions ortho et para) (Boule *et al.*, 1985).

I.4.2- COMPOSES PHENOLIQUES

L'irradiation d'une solution aqueuse de phénol à 253,7 nm conduit à des réactions de dimérisation et à une hydroxylation du noyau aromatique. Suivant le mécanisme proposé par Joschek et Miller (1966), les produits d'hydroxylation proviennent soit d'une hydroxylation directe du noyau aromatique, soit d'une rupture de liaison des dimères formés.



L'irradiation des hydroxyphénols, ainsi formé, peut aussi conduire à des réactions de dimérisation et d'hydroxylation du noyau aromatique et à la formation des composés quinoniques hydroxylés.

Boule *et al.* (1985) ont étudié la phototransformation de différents halogénophénols et ont montré un mécanisme différent de celui des phénols non halogénés suivant la position de l'atome de chlore sur le noyau aromatique.

Sous sa forme moléculaire, le chloro-2 phénol est converti en pyrocatechol. Cependant, sous sa forme anionique, il est réduit en acide cyclopentadiénique qui se dimérise suivant la réaction de Diels-Alder. Cette réaction est également obtenue avec d'autres halogéno-2 phénols diversement substitués (bromo-2 phénol, dichloro-2,4 phénol) (GUYON *et al.*, 1984). L'irradiation du chloro-3-phénol en solution diluée sous sa forme moléculaire ou anionique conduit à la formation de résorcinol (80 %) par un processus dit de photohydrolyse qui implique la rupture homolytique de la liaison C-Cl et de la liaison H-OH d'une molécule d'eau



Dans le cas des dichloro-3,5 et 3,4 phénols, l'irradiation donne lieu aussi à une photohydrolyse spécifique en position 3 (Boule *et al.*, 1985).

La phototransformation du 4-chlorophénol a fait l'objet de nombreux études de recherches. Il a été montré que la réaction, fortement influencé par l'oxygène dissous, conduit à un ensemble de produits complexes polyphénylés. Outre le produit majoritaire, le chloro-5 dihydroxy-2,4 biphenyl, Boule *et al.* (1985) ont montré également la formation de l'hydroquinone et de ses produits d'oxydation (para benzoquinone, trihydroxy-1,2,4, benzène et hydroxy para benzoquinone). Une étude en cinétique rapide (photolyse laser) a permis d'élucider le mécanisme réactionnel (Grabner *et al.*, 1994). Après excitation du substrat et élimination d'une molécule d'HCl, il y a formation du carbène 4-oxo-2,5-cyclohexadiénidène (Figure I.23). Ce dernier réagit selon plusieurs voies. En présence d'un donneur d'hydrogène, le carbène est converti en radical phenoxy, qui donne par la suite le phenol, et en 1,4-benzoquinone-O-oxyde en solution saturée d'oxygène ; addition d'une molécule d'oxygène. En solution désoxygénée, l'hydroquinone est produite par réaction du carbène avec l'eau. Le 5-dichloro-2,4'-dihydroxybiphenyle est produit par couplage du carbène avec le 4-chlorophénol du départ.

Par analogie avec ses résultats, Vialaton *et al.* (2001) ont proposé le même mécanisme pour la phototransformation du 4-chloro-2-méthylphénol. La présence d'un groupement méthyl ne semble donc pas affectée la réactivité du substrat de départ.

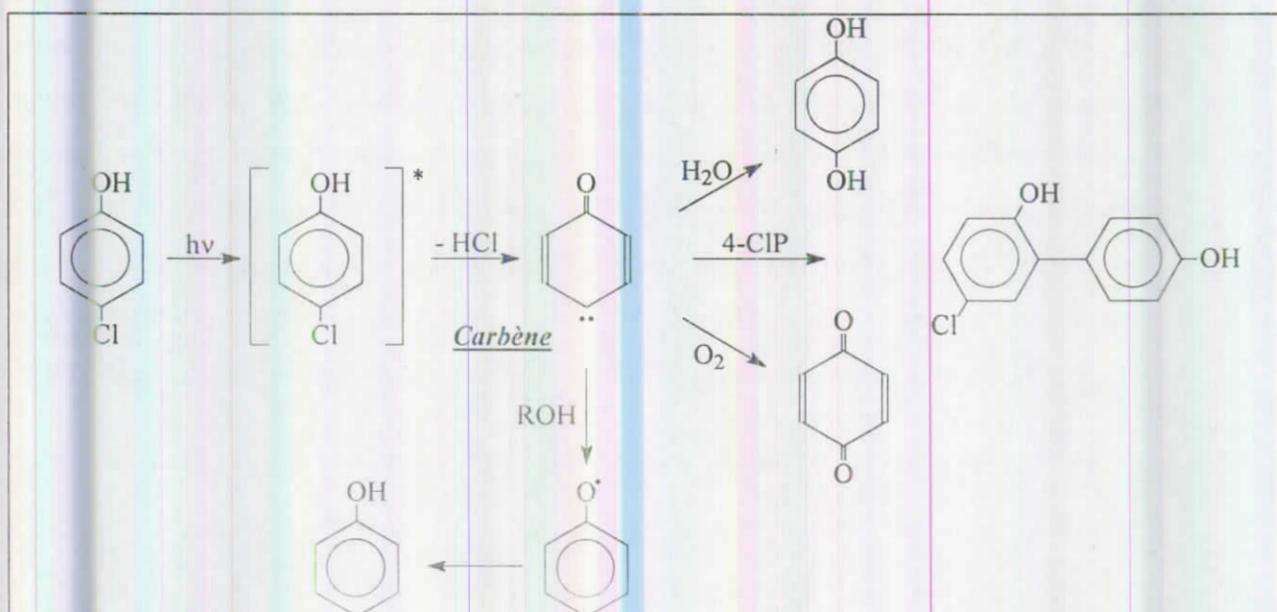


Figure I.23 : Mécanisme de la phototransformation du 4-chlorophénol en solution aqueuse (d'après Grabner *et al.*, 1994)

I.4.3- HALOBENZONITRILES

Kochany et *al.* (1990a) ont étudiés la photochimie de bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile) en utilisant une bande étroite d'une radiation UV à 313 nm. Les photoréactions en phase aqueuse des solutions $(0.078-7.800) \times 10^{-5}M$ du bromoxynil ont été établi à différentes valeurs de pH. Les rendements quantiques de disparition du substrat dans des solutions tamponnées ont été évalués à 0.008, 0.048 et 0.044 à pH 2.6, 7.0 et 11.0 respectivement. Dans des conditions de pH neutre ou basique, le bromoxynil absorbe plus fortement à des longueurs d'onde > 290 nm (région du spectre à intérêt environnemental). La phototransformation a été suivi par CLHP et spectrophotométrie UV-Vis. Les auteurs ont noté que toutes les photoréactions donnent lieu à deux photoproduits : le 3-bromo-4-hydroxybenzonitrile et le 4-hydroxybenzonitrile. Un mécanisme radicalaire impliquant des radicaux libres a été proposé.

Les auteurs (1990b) ont ensuite étudiés l'effet des acides fulviques du sol (AF) sur les photoréactions précédentes. L'investigation a été faite en absence (pH 6-7) et en présence de 5, 10, 15, 20, 40, 45, 60 et 100 mg/L AF (pH 5.5-6.5) à 313 nm. Par exemple, pour une irradiation de 15 minutes les auteurs ont observé que la vitesse de destruction du bromoxynil diminue avec l'augmentation de la quantité des AF. Les constantes de vitesses (k_p , λ) de transformation photolytique de premier ordre apparent de bromoxynil en présence de 5-100 mg/L de FA étaient rangées de $(1.052 \pm 0.11) \times 10^{-3}$ à $(0.08 \pm 0.006) \times 10^{-3} s^{-1}$. L'intensité de la lumière (I_λ) à 313 nm était de 3.7 à 3.8 $\mu EL^{-1}s^{-1}$. Plusieurs formules empiriques ont été utilisé pour aboutir à la détermination des $t_{1/2}$ dans des systèmes aquatiques contenant des AF. Par exemple ce paramètre a été évalué à 2.76 ± 0.04 , 3.48 ± 0.07 , 4.06 ± 0.06 , 5.03 ± 0.09 et 17.60 ± 1.33 minutes correspondant à des concentrations en AF de 5, 10, 15, 20, 40, 45, 60 et 100 mg/L respectivement pour une concentration en bromoxynil de 7.8 μM . Les photoproduits détectés par CG-MS sont le 3-bromo-4-hydroxybenzonitrile et le 4-hydroxybenzonitrile en présence ou en absence de la matière organique dissoute (MOD).

En 1991, les mêmes auteurs ont étudiés la phototransformation du même substrat en présence des différentes concentrations en NaCl à 313 nm. Pour des concentrations en NaCl de $(0.5-25.0) \times 10^{-3}M$, les rendements quantiques de transformations varient de 0.45 ± 0.005 à 0.017 ± 0.001 . En absence de NaCl le rendement quantique était le 0.52 ± 0.004 .

Les rendements quantiques de la photolyse de bromoxynil en présence ou en absence de chlorure de sodium obéissent à l'équation de Stern-Volmer., indiquant que le NaCl exerce apparemment un effet inhibiteur sur la photolyse de l'herbicide. Les vitesses de dégradation du composé dans des solutions aqueuses en NaCl sont plus lentes qu'en absence de chlorure de sodium. La photolyse d'une solution de bromoxynil (I) $7.8 \times 10^{-6}M$ en présence de NaCl ($10.0 \times 10^{-3}M$) a conduit à la formation de 3-bromo-4-hydroxybenzonnitrile (II), le 3-bromo-5-chloro-4-hydroxybenzonnitrile (III), le 3-chloro-4-hydroxybenzonnitrile (IV) et le 4-hydroxybenzonnitrile (V). Les concentrations maximales des photoproduits III, II, IX et V ont été obtenues après 10.5, 20.0, 30.0 et 44.0 minutes d'exposition à la lumière UV respectivement. La disparition du substrat était de 90 % après 44 minutes d'irradiation. Les photoproduits ont été identifiés par CG-SM. Les auteurs ont constaté que la formation du photoproduit (V) décroît avec l'augmentation de la concentration de NaCl. Quand un mélange de 3 mL de bromoxynil ($2 \times 10^{-4}M$) avec 0.5 mL NaCl (0.5M) était exposé pendant 3 heures à la lumière UV, le photoproduit (V) n'était pas observé contrairement aux photoproduits II, III et IV.

Sur la même voie analytique Kochany et al. (1992a) ont évalué les effets des ions carbonate et bicarbonate sur la photochimie de bromoxynil en solution aqueuse. En effet, un effet inhibiteur des ions carbonate plus important que celui des ions bicarbonate a été constaté. Les photoproduits produits majoritaires sont le 3-bromo-4-hydroxybenzonnitrile et le 4-hydroxybenzonnitrile, mais des traces d'autres produits instables non identifiés ont été signalés par CLHP. Le mécanisme de l'inhibition par les ions carbonate et bicarbonate a été discuté en terme des réactions avec des intermédiaires de la photoréaction.

Finalement, Kochany et al. (1992b) ont examiné les effets de certains métaux lourds sur la phototransformation du bromoxynil tels que Fe(III) et Mn(II). L'étude a montré que chacun de deux cations augmente la vitesse de dégradation. L'effet est plus significatif à $pH < 5.0$. Un mélange de deux cation augmente considérablement le rendement de composition. Cet effet dépend apparemment du rapport Fe^{+3}/Mn^{+2} .

Le fait que Kochany et al. (1990 et 1992) ont trouvé que le 3-bromo-4-hydroxybenzonnitrile et le 4-hydroxybenzonnitrile sont des produits majoritaires, a été plus tard controversé par Machado et al. (1995) qui ont affirmé que le produit majoritaire était le produit de la photohydrolyse le 3-bromo-4,5-dihydroxybenzonnitrile ($\eta = 0.65$). Ce produit a été isolé par CLHP et identifié par la RMN et la masse. Un autre produit minoritaire a été aussi isolé par

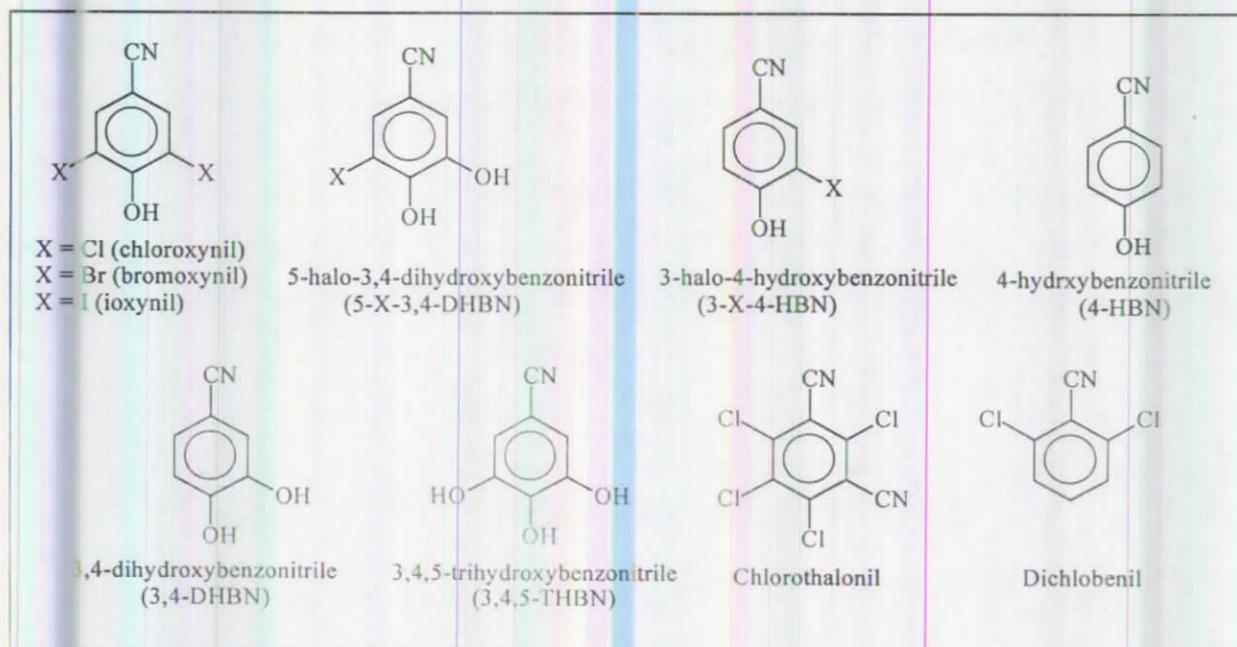
les mêmes auteurs mais qui n'a pas été identifié. Son spectre UV diffère complètement de celui trouvé par Kochany bien qu'ils pratiquement le même temps de rétention (le 4-HBN).

En 1995, Nolte et *al.* se sont intéressés à la disparition du bromofenoxim, le bromoxynil, le bromoxynil octanoate, l'ioxynil, le chloroxynil et le mecoprop. Dans une eau naturelle aérée. Les spectre UV des ces herbicides dissous dans l'eau distillée ou dans l'eau de surface ont été enregistrés sous différentes valeurs de pH et conditions d'irradiation et ce ci en fonction du temps. Les chercheurs ont pu constater que selon leur comportement ces herbicides peuvent être divisés en deux groupe. Le premier groupe constitué du bromoxynil, ioxynil, chloroxynil et le mecoprop, est stable pendant plusieurs semaines tandis que le second groupe formé de bromofenoxim et de bromoxynil octanoate, n'est pas stable et se décompose immédiatement. La vitesse de la décomposition dépend majoritairement de l'irradiation ou de l'activité biologique de l'eau de surface. De leur part Millet et *al.* (1998) ont repris l'étude des trois xynils précédent en plus du chlorothalonil et le dichlobenil en photolyse directe à $\lambda > 290$ nm dans des solutions aqueuses à pH tamponné et dans des solutions organiques. La photolyse du chlorothalonil est faible avec le plus bas rendement quantique de la série considérée ($\Phi = 0.0001$). Le dichlobenil était pratiquement photostable sous les conditions utilisées par les auteurs. Les photoréactivités de bromoxynil et de l'ioxynil était comparables en solution aqueuse et trois fois plus faible relativement à celle du chloroxynil. Les rendements quantiques trouvés pour le chloroxynil, le bromoxynil et l'ioxynil sont $\Phi = 0.0060, 0.0093$ et 0.0024 respectivement. Les temps de demi-vie ont été évalués grâce aux spectres UV et les rendements déterminés au laboratoire pour les trois produits.

Dans un esprit de traitement, une étude comparative a été établi par Guittonneau et *al.* (1995). Cette étude porte sur la comparaison de la dégradation du bromoxynil et le bromoxynil heptanoate ont été étudiées pour différents traitements chimique (O_3, Cl_2) et photochimiques ($H_2O_2/UV, UV (\lambda = 254 \text{ nm})$) en milieu aqueux dilué. Le but fixé par les auteurs était la détermination de la voie de la dégradation du bromoxynil heptanoate et de son produit d'hydrolyse le bromoxynil. Les processus chimiques d'oxydation utilisés sont l'ozonation, la chloration et l'oxydation radicalaire par les radicaux hydroxyle produits par photolyse du peroxyde d'hydrogène.

Le bromoxynil heptanoate est un ester pratiquement instable dans le milieu aquatique. En

concentration. Pour limiter cette réaction d'hydrolyse les chercheurs ont choisi de travailler à pH 7 pour le bromoxynil ($C_0 = 5 \times 10^{-5} M$) et à pH 4 pour l'heptanoate de bromoxynil ($C_0 = 10^{-6} M$). Le fait que les spectres d'absorption UV de deux herbicides ne présentent aucune bande au delà de 320 nm a incité Guittonneau et *al.* à conclure que leur élimination par photolyse directe en lumière solaire est peu efficace (heptanoate de bromoxynil : $\lambda_{max} = 218$ et 290 nm ; bromoxynil : $\lambda_{max} = 222$ et 280 nm). Les rendements quantiques mesurés en UV en lumière mono ou polychromatique (1.48×10^{-8} Einstein/s ; $10^{-2} < \Phi < 10^{-1}$ à 254 et 290 nm respectivement) a signifié aux auteurs que les herbicides sont facilement éliminés par traitement par irradiation UV. Les résultats obtenus montrent une bonne dégradation de ces deux herbicides aussi bien par irradiation UV que par oxydation chimique au chlore ou à l'ozone. L'ajout de peroxyde dans le milieu n'augmente pas de façon significative l'efficacité du traitement par rapport à l'irradiation seule. Parmi tous ces traitements étudiés, l'ozonation est le procédé le plus efficace ont conclu les auteurs. L'analyse par couplage GC-MS des produits de réaction au cours de l'irradiation UV a permis aux auteurs d'identifier 4 produits correspondant à la substitution des atomes de brome soit par un atome d'hydrogène, soit par un groupement OH. Les produits sont le 5-bromo-3,4-dihydroxybenzonitrile, le 3,4,5-trihydroxybenzonitrile, 3,4-dihydroxybenzonitrile et le 4-hydroxybenzonitrile. En fin un schéma réactionnel de photodégradation du bromoxynil heptanoate a été proposé à l'issue de cette étude.



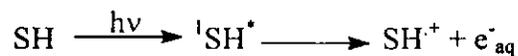
I.5- ESPECES REACTIVES INDUISANT LA PHOTOTRANSFORMATION DE COMPOSES ORGANIQUES

I.5.1- PHOTOTRANSFORMATION EN PRESENCE DES SUBSTANCES HUMIQUES

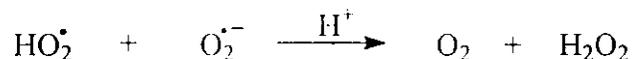
Les substances humiques produisent en général sous irradiation, des espèces chimiques capables de réagir avec un grand nombre des xénobiotiques organiques et les transformer.

Les principales espèces sont les suivantes (Cooper *et al.* 1989 ; Hoigné *et al.* 1989) :

a)- *Les électrons solvatés e^-_{aq}* , produits par photoionisation :



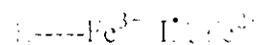
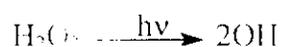
En solution aérée, le dioxygène va réagir avec ces électrons solvatés ($k = 2.10^{10} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Bielski *et al.* 1985) pour donner lieu à la formation de deux espèces peu réactives vis à vis les composés organiques $O_2^{\bullet-}$ ou HO_2^{\bullet} selon le pH ($pK_a = 4.8$). En se dismutant, ces radicaux conduisent à la formation de l'eau oxygénée avec une constante de vitesse égale à $9,7.10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$:



Cette réaction explique bien l'origine de l'eau oxygénée observée par excitation des substances humiques. Le transfert d'électron entre les états excités triplets des substances humiques et de l'oxygène peut conduire également à la production des radicaux $O_2^{\bullet-}$.

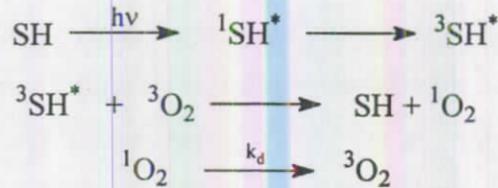


b)- *Les radicaux OH^{\bullet}* , leur mise en évidence concerne uniquement l'excitation à courte longueur d'onde ou le milieu acide (Aguer 1995). La formation de ces espèces semble être liée à la formation intermédiaire de l'eau oxygénée qui va se photolyser ou oxyder des cations métalliques photo-soluits (processus photo-Fenton) :



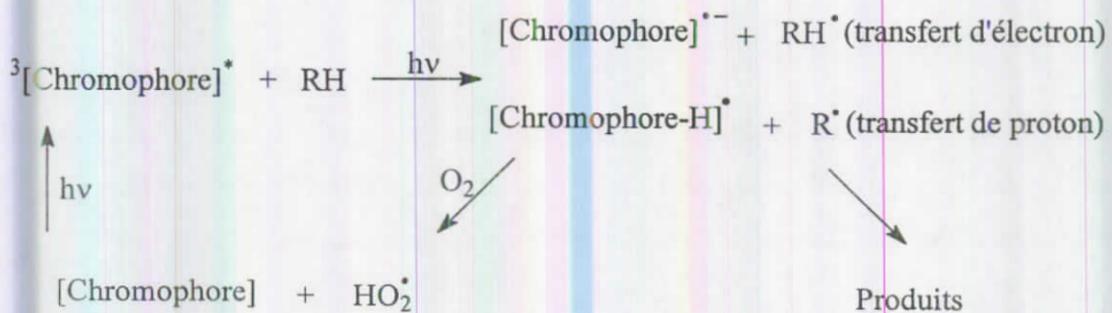
Cette espèce ne concerne pas le présent travail car toutes les excitations étaient réalisées à longueurs d'onde supérieures à 275 nm.

c)- *L'oxygène singulet* : il se produit par un transfert d'énergie entre les états excités triplets des substances humiques et l'oxygène :



Dans l'eau, ${}^1\text{O}_2$ se désactive avec une constante de vitesse k_d égale à $2,5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Rodgers et Snowden 1982), valeur suffisamment faible pour que l'oxygène singulet ait le temps de réagir avec des composés organiques.

d)- *Des espèces oxydantes* qui réagissent sur des composés portant des hydrogènes labiles comme les phénols. Il s'agit probablement d'états excités triplets (Aguer 1995 ; Canonica et al. 1995).



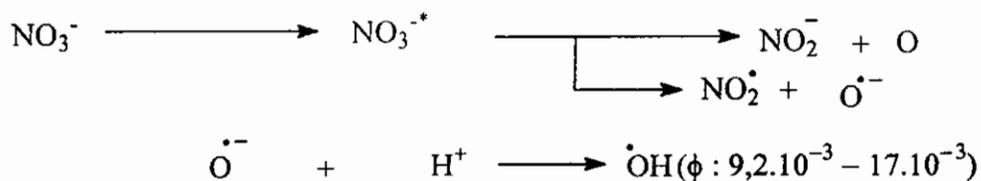
Les mécanismes de transformation photoinduites par les substances humiques apparaissent assez complexes en plus que leur influence s'exerce différemment en fonction du composé en question.

Si le xénobiotique n'absorbe pas la lumière solaire, une transformation photoinduite seulement par les substances humiques peut avoir lieu. En revanche, si le substrat absorbe lui aussi, il peut y avoir lieu une transformation photoinduite en plus de la phototransformation directe. Dans ce cas précis, les substances humiques ont un double rôle ; inhibiteur par effet d'écran et accélérateur par effet photoinducteur.

I.5.2- PHOTOTRANSFORMATION EN PRESENCE DES IONS NITRATE ET NITRITE

Les ions nitrate en solution aqueuse absorbent fortement en UV. Les ions nitrite sont en général en concentration plus faible mais absorbent une part importante du rayonnement solaire. (spectre)

La réactivité des ions nitrate en solution aqueuse induites par les UV résulte de deux processus primaires (Zafiriou, 1974 ; Wagner *et al.*, ; Warneck et Wurzinger, 1988 ; Zepp *et al.*, 1987)

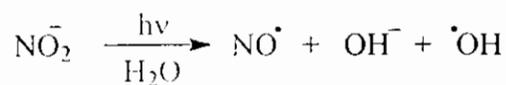


C'est cette dernière réaction qui intervient dans les réactions photoinduites par les ions nitrate. Le dioxyde d'azote formé, disparaît par dismutation :

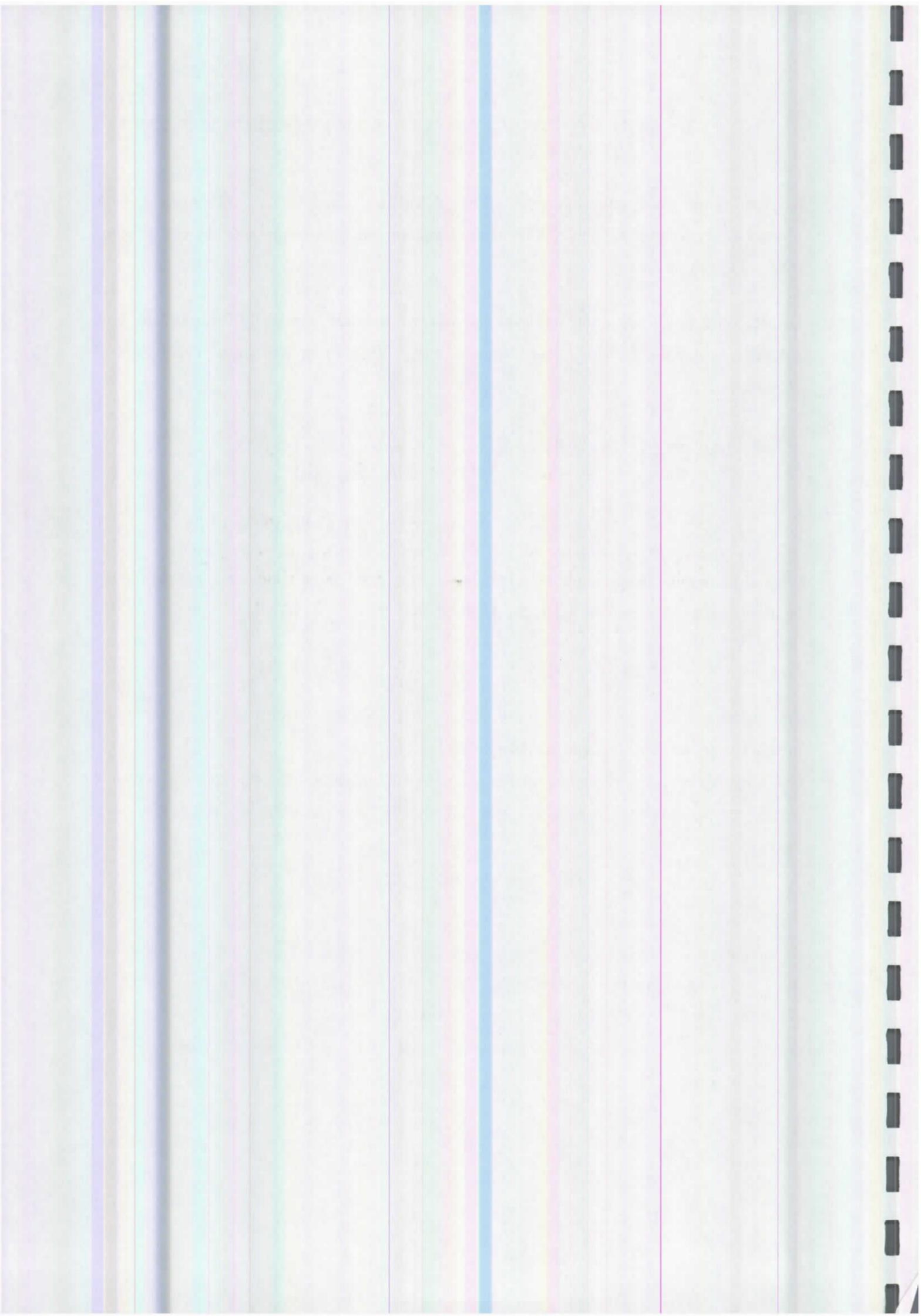


Cette espèce peut aussi donner lieu à des réactions de nitration et nitrosation, en particulier dans le cas des dérivés phénoliques (Machado et Boule, 1994).

Les ions nitrite eux empruntent une seule voie conduisant à la formation des radicaux hydroxyle et le monoxyde d'azote (Treinin et Hayon, 1970 ; Strehlov et Wagner, 1982).

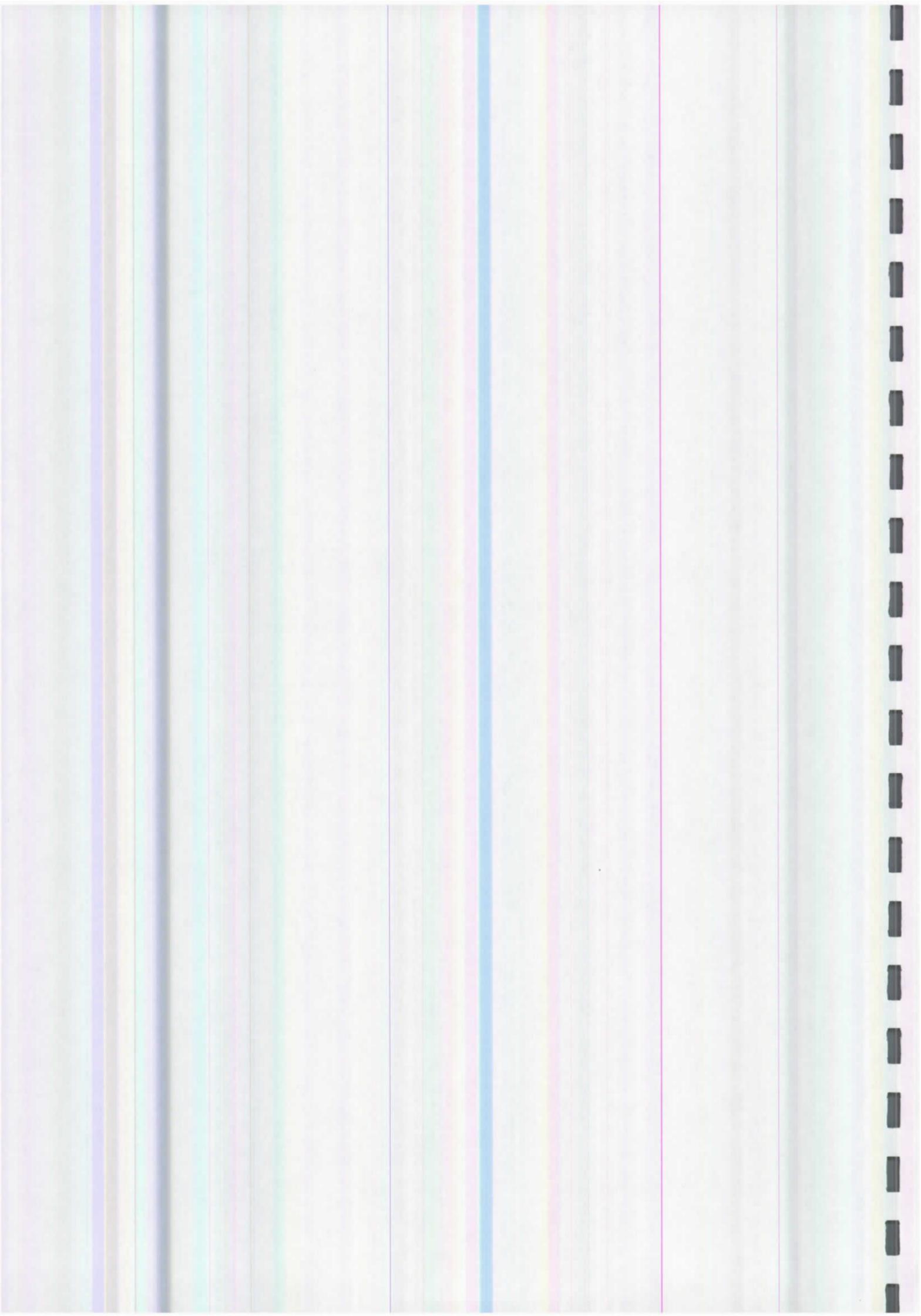


Le rendement quantique de photolyse des ions nitrite est plus élevé que celui des ions nitrate (0.07 à 0.01 selon la longueur d'onde entre 300 et 365 nm) (Zafiriou et Bonneau, 1987 ; Machado et Boule, 1991). Les radicaux hydroxyle ainsi formés sont susceptible d'oxyder et de détruire rapidement la plupart des composés organiques dans les eaux superficielles, mais peuvent également réagir avec les ions nitrite présent dans la solution.



CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES



PARTIE A : PHOTOTRANSFORMATION

II.A.1 - REACTIFS UTILISES

➤ **Herbicides**

- Chloroxynil 98,9 % (Riedel-deHaën)
- Ioxynil haute pureté (Rhône-Poulenc Agrochimie)
- Methabenzthiazuron 99.5 % (Riedel-de Haën)
- Benzthiazuron Aldrich

➤ **Fongicides**

- Benzothiazole Aldrich

➤ **Autres xénobiotiques**

- 2-mercaptobenzothiazole (Aldrich)
- 2-hydroxybenzothiazole (Aldrich)
- 2-aminobenzothiazole (Aldrich)
- acide 2-benzothiazolylsulfonique *fourni par Bayer Anvers N.V. (Belgique)*

➤ **Photoinducteurs et photosensibilisateurs**

- Nitrate de sodium > 99.0 % (Fluka)
- Nitrite de sodium *pur* (Rhône-Poulenc)
- Rose de Bengale
- Acide humique (Aldrich)

➤ **Produits pour analyses**

- Iodure de sodium 99.5 % (Merck)
- Acide perchlorique
- Acide sulfurique
- Hydroxyde de sodium
- Hydroxyde de potassium
- Phosphates
- Carbonate
- Bicarbonate

II.A.2 PREPARATION DES SOLUTIONS

Les solutions dans la composition de la réaction des solutions de réactifs sont préparées avec les produits de référence de la pharmacopée et les produits de référence de la pharmacopée.

(Millipore) et contrôlée par sa résistivité ($\geq 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}^{-1}$). Cette eau est très peu chargée en carbone ($\text{COT} \leq 0.15 \text{ mg.L}^{-1}$) et filtrée sur filtre $0.22 \mu\text{m}$.

Le pH des solutions a été relevé par un pH-mètre Orion ou d'un pH-mètre Jenway 3310, tous deux équipés d'une électrode combinée Orion.

La précision est de l'ordre 0.1 unité. Le pH a été ajusté à des différentes valeurs en utilisant différentes bases, l'acide perchlorique ou des tampons phosphate.

II.A.3 - TECHNIQUES DE DESOXYGENATION

La concentration en oxygène présente en solution aqueuse est estimée à $2.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ à 25°C (Murov, 1973). Pour étudier le rôle de l'oxygène dans la phototransformation, certaines solutions ont été désoxygénées. Pour des irradiations continues réalisées en cellule de quartz au monochromateur, nous avons fait barboter au préalable de l'azote ou de l'argon pendant 30 minutes environ. La cellule était ensuite hermétiquement fermée.

Un flux continu d'azote ou d'argon a également été utilisé pour désoxygéner les solutions lors des expériences réalisées en cinétique rapide. L'argon présente l'avantage par rapport à l'azote d'être plus lourd que l'air, la diffusion de l'oxygène est donc limitée.

II.A.4 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

II.A.4.1 - Caractéristiques des substances humiques et eaux naturelles utilisées

a) - Substances humiques

Les substances humiques utilisées sont des acides humiques commerciaux (Aldrich) leurs caractéristiques sont les suivantes :

*Tableau II.1 : Composition élémentaire des acides humiques commerciaux (Aldrich)
Eaux naturelles*

	C (%)	H (%)	O (%)	N (%)	S (%)	Composés minéraux (dont Fe) (%)
AH _{Al}	41.9	4.1	50.4	0.55	1.8	< 1.3

b) - Eaux naturelles

Deux prélèvements d'eaux naturelles superficielles ont été réalisés à deux périodes différentes, puis stockés à 4°C avant utilisation. Quelques caractéristiques physico-chimiques de ces eaux sont regroupées dans le tableau II.2.

Tableau II.2 : caractéristiques physico-chimiques des eaux utilisées

Origine	Date de prélèvement	pH
Barrage de Villerest	2001	8.5
(Loire, Roanne)	2002	7.2

Un bilan ionique a été réalisé par Vialaton (2000) sur une eau de barrage dont les caractéristiques sont proches de celles de notre échantillon 1. Les résultats sont consignés dans le tableau II.3 suivant :

Tableau II.3 : Bilan ionique réalisé sur un prélèvement de l'eau de Barrage de Villerest

Elément	Carbonates	Chlorure	Nitrate	Sulfate	K ⁺	Na ⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Teneur en mg/L	nd	21.2	10.3	15.5	3.2	16.7	0.5	10.5	3.1

II.A.5 - DISPOSITIFS D'IRRADIATION

La nature de l'étude souhaitée oriente le choix du dispositif approprié. La lumière émise était soit monochromatique soit polychromatique.

II.A.5.1 - Irradiation en lumière monochromatique***α) - Irradiation à 313 nm et 296 nm***

Pour irradier les solutions à ces longueurs d'ondes nous avons utilisé un dispositif optique (313 nm ou 296 nm) équipé d'une lampe à arc à vapeur de mercure haute pression (Osram HBO 200 W) et d'un monochromateur Busch et Lomb (figure II.1).

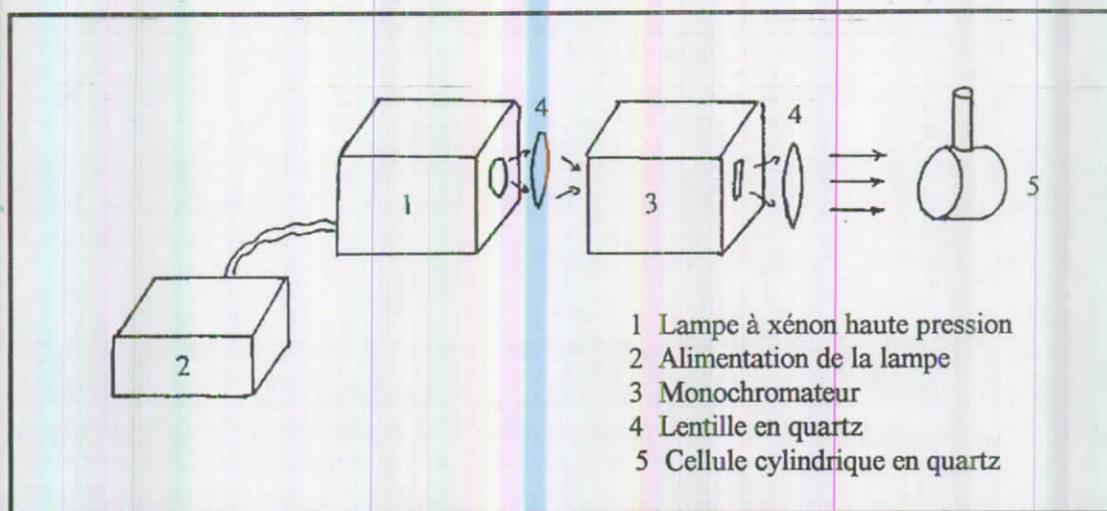


Figure II.1 : Dispositif d'irradiation en lumière monochromatique

II.A.5.2 - Irradiations en lumière polychromatique

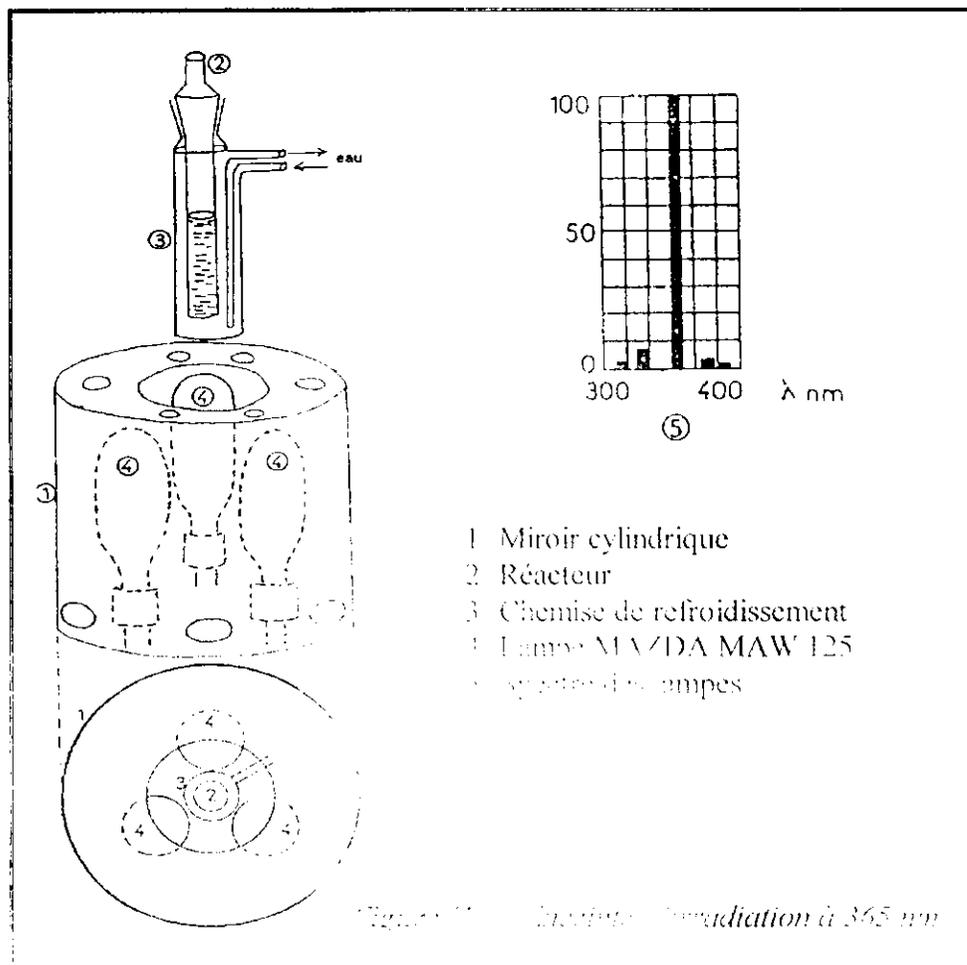
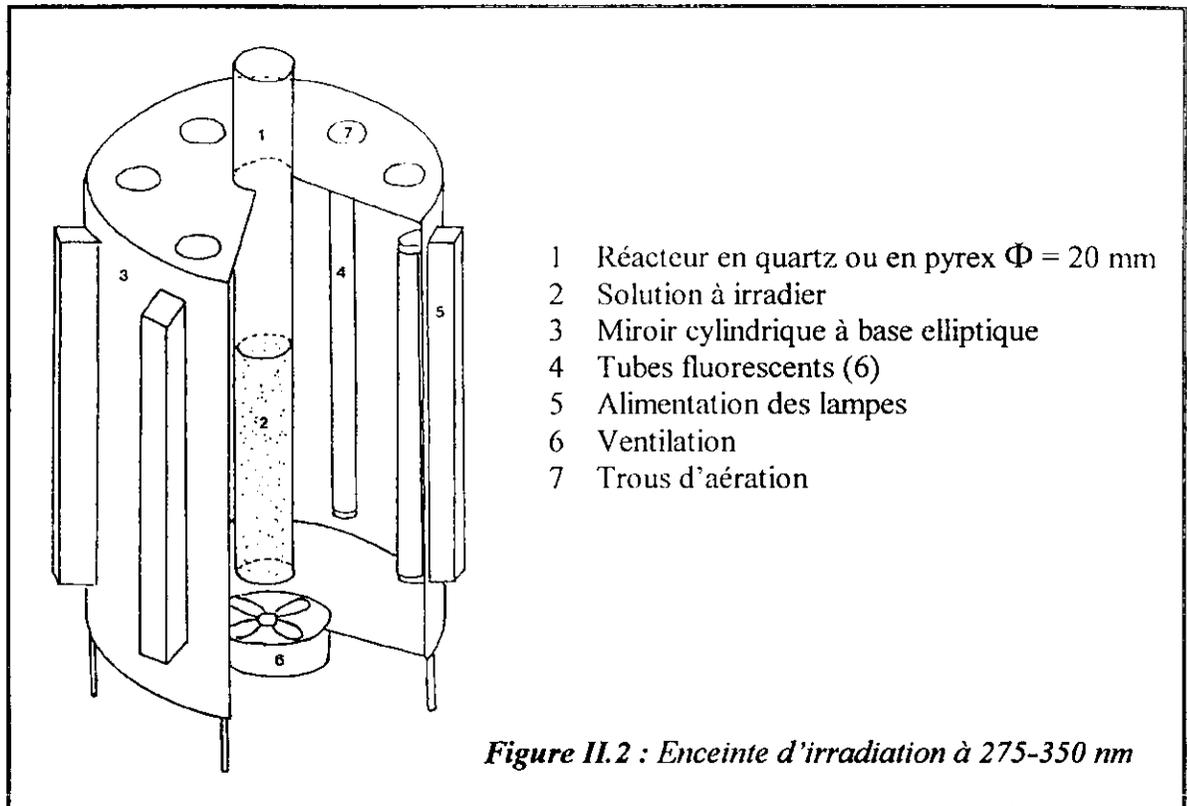
a) - Enceinte d'irradiation à 275-350 nm

Cette enceinte est équipée de six lampes fluorescentes de type Duke Sunlamp 20 W émettant entre 275 et 350 nm avec un maximum d'émission à 310 nm (figure II.2). En réalité, ces lampes présentent aussi des raies à 366, 405, 436 et 546 nm. On peut sélectionner la plage de longueurs d'ondes d'irradiation souhaitée, en faisant varier la nature du réacteur (pyrex ou quartz).

Dans le réacteur en pyrex l'échantillon est irradié entre 290 et 350 nm seulement, alors que dans le réacteur en quartz, l'échantillon est irradié dans la plage 275-350 nm toute entière.

b) - Enceinte 365 nm

Ce dispositif a été utilisé pour irradier le 2-mercaptobenzothiazole en présence des acides humiques. Il est constitué de trois lampes MAZDA MAW 125 entourées d'un miroir cylindrique, (figure II.3). Ces lampes sont des lampes à vapeur de mercure moyenne pression, filtrées par un globe noir qui laisse passer principalement la raie située à 365 nm (environ 85 %). Les émissions à 334 et 313 nm correspondent respectivement à moins de 7 % et 2 % de l'énergie. Les photons émis à plus grandes longueurs d'onde (405 et 434 nm) ne jouent aucun rôle dans la phototransformation des composés étudiés. Une circulation d'eau entoure le réacteur pour éviter l'échauffement du système.



c) - Lumière naturelle (Soleil)

Les irradiations en lumière solaire ont été réalisées à l'extérieur du laboratoire de Photochimie Moléculaire et macromoléculaire à Clermont-Ferrand (latitude 46°N). Des tubes en pyrex dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Diamètre intérieure = 40 cm,
- Diamètre extérieure = 37 cm,
- Section = 10.75 cm²
- Longueur = 38 cm,
- Volume ≈ 408 mL,

étaient remplis environ au tiers de leur volume (soit 100 mL) de façon à présenter une surface libre suffisante, et posées horizontalement sur le sol. Un tube latéral en forme de crochet leur permettait de rester ouverts à l'atmosphère tout en limitant la pollution par des substances étrangères.

Certaines manipulations ont été réalisées dans des petits réacteurs (capacité 20 mL environ) en quartz, remplis de 15 à 10 mL de solution et fermés hermétiquement par un septum.

II.A.6 - TECHNIQUES D'ANALYSES

Ces techniques vont permettre le suivi des cinétiques, l'identification et la quantification de certains photoproduit ou métabolites.

II.A.6.1 - Méthodes chromatographiques

A.6.1.1 - Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)

a) - CLHP à détection spectrophotométrique (CLHP/UV)

Les solutions irradiées sont analysées par CLHP. Différents appareils de CLHP ont été utilisés :

- ❖ CLHP Waters équipée de deux pompes modèle 510, d'un passeur d'échantillons modèle 717, d'une colonne de type phase inverse greffée C₁₈ 4.6 mm x 250 mm Spherisorb S5 ODS2 et d'un détecteur d'absorption UV-visible à barrette de diodes modèle 996.

- ❖ CLHP Waters équipée de deux pompes type 510 et d'un détecteur à barrette de diodes type 990, permettant d'obtenir le spectre UV-visible des composés séparés par la colonne.
- ❖ CLHP Merck équipée d'une pompe type L-6200 avec mélange basse pression, d'un détecteur d'absorption UV-visible type L-3000, d'un détecteur de fluorescence Hitachi de type F-1050 et d'un intégrateur bicanaux type D-2500.
- ❖ CLHP Beckmann type 420 équipée d'un détecteur UV-visible type 163 et d'un intégrateur Shimadzu CR3A.
- ❖ CLHP Millipore Waters 600E équipée d'un détecteur UV-visible Waters 486 couplé à un intégrateur Shimadzu C-R3A

b) - CLHP à détection par spectrométrie de masse (CLHP/MS)

α - Chromatographie liquide

Appareil de Chromatographie Liquide HEWLETT-PACKARD «HP 1100-MSD» comprenant :

- une pompe, un injecteur et un passeur d'échantillon.
- un détecteur à barrette de diodes et un détecteur de masse.
- un système d'acquisition HP Chemstation version A. 08.03

Les conditions chromatographiques utilisées sont les suivantes :

- Colonne CHROMPPACK Inertsil ODS2-5µm-(100*3) mm + précolonne
- Flacon (A) : H₂O + acide formique, pH=2.90
- Flacon (B) :CH₃OH
- Le gradient de phases mobiles est le suivant :

Temps (min)	Débit (ml/min)	% (A)	% (B)
0	0.4	30	70
20	0.4	10	90

car thermostaté à 40°C.

détecteur UV à barrette de diodes (200-400 nm) et un détecteur de masse

à 400 000 en 2.1L.

β - Détection de masse

- Electrospray Négatif ES-MSD1 : (70-500) uma fragmentor = 60V
Post colonne chromatographique : méthanol + ammoniac (0,1% v/v) d = 0.200 ml/min
- Electrospray Positif ES+MSD1 : (70-500) uma fragmentor = 70V

Les autres paramètres de la source Electrospray sont communs aux deux modes, soient :

- Azote : 13 mL/min, à 350°C.
- Pression de nébulisation : 55 psi
- Vcap = 4000 V

Il est à noter que l'interface fonctionnant en mode ion négatif est utilisée de préférence avec les molécules polaires et facilement ionisables comme les phénols et les acides carboxyliques. La valeur m/z correspond à la masse de la molécule diminuée d'une unité (M-1).

L'interface fonctionnant en mode ion positif est celle qui est le plus souvent utilisée car elle permet la détection d'une plus large gamme de molécules. Elle est particulièrement adaptée à l'ionisation des molécules présentant une affinité pour les protons comme les cétones et les aldéhydes. La valeur m/z correspond à la masse de la molécule augmentée d'une unité (M+1).

II.A.6.2 - Méthodes spectrométriques

A.6.2.1 - Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre Varian CARY 13, informatisé pour la mémorisation et le traitement des spectres.

A.6.2.2 - Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN à 300, 400, ou 500 MHz

II.6.2.3 - Spectrométrie de masse

a) - Identification des photoproduits

α - Identification des photoproduits de la photolyse directe de l'ioxynil

1600 mL environ d'une solution $1,078 \times 10^{-4}$ M (37 mg/L) d'ioxynil, tamponnée à pH = 7,5 par des phosphates M/15, ont été irradiés à 310 nm dans un réacteur en quartz pendant 15 minutes jusqu'à environ 90 % de transformation du substrat initial.

Après irradiation le pH était réajusté à 2 par l'acide sulfurique

L'essentiel du mélange réactionnel a été extrait de la solution au moyen d'un extracteur adéquat par l'acétate d'éthyle. L'extraction a été réalisée en continu pendant 48 heures. Le coefficient d'extraction était élevé (vérification par l'injection des deux phases en CLHP).

La phase organique récupérée (~ 1 L) a été séchée sur sulfate de magnésium. Elle est ensuite filtrée et évaporée dans un évaporateur rotatif (~ 35°C) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

L'extrait solide brut a été redissous dans un faible volume de méthanol (~ 1 mL) légèrement dilué avec de l'eau distillée de manière à ce que le mélange eau/méthanol ne soit pas plus riche en méthanol que l'éluant utilisé en CLHP. La séparation est finalement achevée par injections successives de volumes de 55 μ L sur CLHP analytique et le recueil des fractions P₁₀, P'₁₀, P₁₁, P₁₂, P₁₃ et P₁₄ respectivement à leur sortie du détecteur. Chaque fraction est ensuite séchée sous courant d'azote. Une partie de chaque fraction est reprise par de l'acétone deutériée et soumise à une spectrométrie de RMN dans un appareil Bruker RMN DPX 300 MHz. L'autre partie est reprise par un solvant approprié et analysée par spectrométrie de masse en introduction directe et ionisation chimique au méthane (Hewlett-Packard 5989 B).

β - Identification des photoproduits de la photolyse directe du chloroxylinil

1000 mL environ d'une solution $1,0 \times 10^{-4}$ M (18 mg/L) de chloroxylinil ont été irradiés à 310 nm dans un réacteur en pyrex jusqu'au maximum d'accumulation du produit majoritaire (45 minutes dans l'enceinte à six lampes). La solution a ensuite été évaporée à sec à l'évaporateur rotatif à 35°C. Le résidu est ensuite repris par un mélange eau-méthanol (1:1) pour donner un volume final de 2 mL. Les photoproduits ont été isolés de cette solution par injection sur une CLHP Waters de petite taille avec des volumes de 5 μ L et le recueil des fractions à la sortie du détecteur. Le solvant est ensuite éliminé par la passage d'un courant d'azote. Puis, les fractions sont enfin analysées par spectrométrie de masse en introduction directe et ionisation chimique au méthane.

δ - Identification des photoproduits de la photolyse directe du 6-OH-MBTU

Deux portions de 50 mL d'une solution 10^{-4} M de 6-hydroxyméthabenzthiazuron (6-OH-MBTU), ont été irradiées dans l'enceinte polychromatique à 310 nm. La phototransformation a été stoppée au maximum d'accumulation des photoproduits. L'eau a été éliminée par un évaporateur rotatif et le résidu sec a été envoyé dans un tube scellé pour analyse en CHLP-ESI-MS. L'ensemble des photoproduits a été identifié par les deux modes (positif et négatif). De la même façon une portion de 50 mL est irradiée, évaporée et analysée par RMN après dissolution dans un solvant approprié.

II.A.7 - ACTINOMETRIE AU FERRIOXALATE DE POTASSIUM**II.A.7.1 – Définition :**

Un actinomètre est un composé pour lequel le rendement quantique est connu pour différentes longueurs d'ondes.

Nous avons utilisé dans ce travail le ferrioxalate de potassium comme actinomètre.

Cet actinomètre est très sensible et convient pour un nombre de photons absorbés de 10^{14} à 10^{15} photons.cm⁻³. De plus il présente un large spectre d'absorption de 254 à 577 nm .

II.A.7.2 – Principe :

Quand une solution aqueuse de $K_3Fe(C_2O_4)_3$ (acidifiée avec de l'acide sulfurique) est irradiée par la lumière, les ions Fe^{3+} sont réduits en ions Fe^{2+} suivant le schéma réactionnel (Rabek, 1982) :



Le produit de la réaction $K_2Fe(C_2O_4)_2$ n'absorbe pas la lumière incidente et les ions Fe^{2+} peuvent être facilement dosés par réaction avec l'*ortho*-phénanthroline : en effet ces ions

forment avec ce réactif un complexe coloré qui peut être dosé par une méthode spectrophotométrique.

II.A.7.3 - Mode opératoire

Une cellule ronde de 1 cm de trajet optique a été remplie par une solution de ferrioxalate 0,006 M et irradiée 296 nm pendant 5 et 10 minutes respectivement. Un volume V_1 de 2 mL de la solution irradiée a été prélevé et transféré dans une fiole jaugée de 10 mL renfermant 1 mL du tampon acétate (600 ml de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (1 N) + 360 mL de H_2SO_4 (1 N) + eau qsp 1 L) et 0,5 mL de la solution 1,10-phénanthroline à 0,1 %. Le volume a été complété avec de l'eau à $V_2 = 10$ ml.

Un blanc a été préparé de manière identique mais en remplaçant la solution irradiée de ferrioxalate par 2 mL de la solution non irradiée. Après une heure de repos, l'absorbance de la solution a été mesurée à 510 nm. L'intensité I_0 de la lumière incidente est calculée par la relation :

$$I_0 = \frac{6,023 \times 10^{20} \times 10 \times D_{510}}{2 \times l_{510} \times \epsilon_{510} \times \Phi_{\text{Fe(II)}} \times t \times (1 - 10^{-A_{296}})}$$

$$E_{510} = 1,118 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \quad \Phi_{\text{Fe(II)}} = 1,24$$

$$L_{510} = \text{trajet optique à 510 nm} = 1 \text{ cm} \quad 1 - 10^{-A_{296}} \approx 1$$

$$t_1 = 300 \text{ secondes et } t_2 = 600 \text{ secondes}$$

On obtient ainsi : $I_0 = 3.20 \times 10^{14} \text{ photon cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

II.A.7.4 - Rendement quantique de disparition

A.7.4.1 - Définition :

Le rendement quantique de disparition (ou de formation) d'un composé est défini comme étant le rapport de nombre des molécules transformées (ou formées) pendant un temps t au nombre de photons absorbés pendant le même temps.

Les rendements quantiques initiaux de disparition des substrats ont été calculés par la relation :

$$\Phi = \Delta C \cdot V \cdot N / I_a \cdot t$$

$\Delta C = C_0 - C_t$: mol/L déterminée par CHLP

N = nombre d'Avogadro

V = volume de la solution irradiée (L)

t = temps d'irradiation en (secondes)

I_a = nombre des photons absorbés par la solution, avec $I_a = I_0(1 - 10^{-A})$

Le flux de la lumière I_0 absorbé par la réaction a été déterminé par actinométrie chimique en remplaçant le composé utilisé par un actinomètre comme il est décrit précédemment.

L'absorbance des photoproduits générés au cours d'irradiation induit une diminution de l'absorbance du substrat. Lorsque la différence d'absorbance avant et après irradiation est importante, il est nécessaire d'apporter une correction pour tenir compte de l'absorbance des photoproduits.

A $t = 0$, l'intensité absorbé par le substrat est :

$$[I_a]_{t=0} = I_0(1 - 10^{-A_0})$$

à la fin de l'irradiation (correspondant au temps t), l'intensité absorbée par le substrat est :

$$[I_a]_t = I_0(1 - 10^{-A_t}) \times (A_0/A_t) \times (C_t/C_0)$$

où A_t : est l'absorbance totale de la solution

C_t : la concentration finale du substrat

La valeur de I_a utilisée pour calculé Φ_{disp} est la moyenne arithmétique de $[I_a]_{t=0}$ et $[I_a]_t$.

Ce rendement peut également être calculer à partir de la pente à l'origine de la courbe de disparition en fonction du temps.

II.A.8 - PHOTOLYSE LASER

II.A.8.1 - Principe

Cette technique consiste à perturber le système étudié par excitation laser, puis à suivre l'évolution de la réaction. Elle permet ainsi des mesures cinétiques et spectroscopiques dans l'échelle de temps de la réaction primaire.

II.A.8.2 - Objectifs

La photolyse laser sert à caractériser les espèces dites « **transitoires** » intervenant dans la phototransformation d'un substrat.

Un **transitoire** est une espèce de courte durée de vie, de l'ordre de la nano à la microseconde. Ce transitoire peut être une molécule du substrat à l'état excité, un radical, un ion-radical, un électron solvaté ou autre.

II.A.8.3 - Dispositif expérimental et principe de fonctionnement

La solution à analyser est disposée dans une cellule (cuve carrée en quartz de 1 cm d'arrêt) et irradiée par une excitation laser pulsée qui dure quelques nanosecondes (figure II.4).

L'énergie de l'impulsion est estimée par un joulemètre. L'absorbance des espèces excitées est mesurée dans les parties 1', 2', 3, 4, et 5 du système de la figure II.4. Le faisceau lumineux servant à cette analyse spectrométrique provient d'une source UV ou visible. Il traverse la cellule perpendiculairement au faisceau laser excitateur, afin d'éviter toute perturbation par ce dernier. Comme dans un spectrophotomètre classique, un monochromateur permet la sélection de la longueur d'onde des mesures d'absorbance et un photomultiplicateur évalue l'intensité lumineuse transmise par la solution.

Des mesures d'absorbance sont réalisées par intermittence (l'opérateur fixe la fréquence des mesures en choisissant la base de temps, 50 ns à 100 μ s par division) et les variations de l'absorbance au cours du temps (à λ fixe) sont enregistrées sur un oscilloscope. Le signal numérisé est transmis à un système informatique incorporé qui permet de traiter les données et de calculer les constantes cinétiques.

La répétition des mesures à différentes longueurs d'onde permet de tracer, point par point, le spectre d'absorption des transitoires.

II.A.8.4 - Mode opératoire

Dans le but de caractériser les transitoires intervenant dans la phototransformation du 2-mercaptopbenzothiazole, des expériences de photolyse-laser couplée à la mesure des spectres

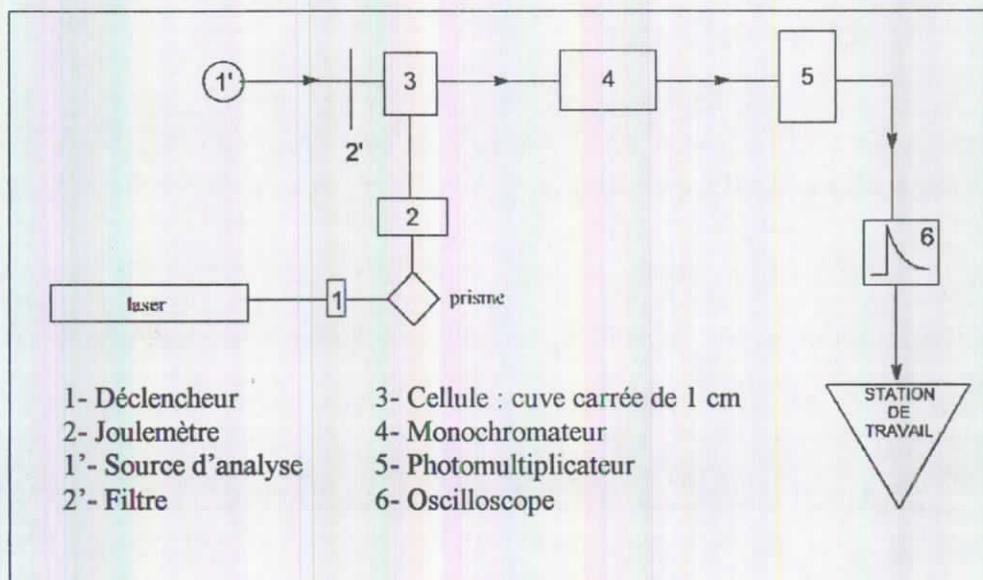


Figure II.4 : Schéma de principe de l'appareillage

d'absorption des espèces transitoires ont été conduites. C'est ainsi que des solutions de 2-mercaptopbenzothiazole (3×10^{-5} M) ont été irradiées par une impulsion lumineuse cohérente, brève (un éclair qui dure 9 ns), intense ($1,6 \text{ mJ} \cdot \text{impulsion}^{-1}$), monochromatique ($\lambda_{\text{excitation}} = 266 \text{ nm}$) et très directive. L'absorption de cette radiation conduit à la formation des plusieurs espèces transitoires. De la forte intensité de l'impulsion découlent des concentrations locales en transitoires suffisamment élevées pour permettre des mesures spectroscopiques. L'absorbance des transitoires est mesurée par spectrophotométrie UV-visible. Pour cela il est nécessaire de mesurer au préalable l'absorbance de l'échantillon avant irradiation. Cette mesure constitue la référence à partir de laquelle sont déterminées les variations d'absorbance après l'impulsion. On mesure une augmentation de l'absorbance lorsque l'on travaille dans une gamme de longueurs d'onde où le transitoire absorbe mais pas le produit de départ ; en revanche, si le produit de départ absorbe, on peut observer une diminution de l'absorbance, malgré l'absorbance des transitoires, suite au dépeuplement de l'état de base.

Le spectre d'absorption est tracé point par point, c'est à dire que l'expérience est répétée dans les mêmes conditions à toutes les longueurs d'onde.

II.A.8.5 - Dispositif expérimental

Les études en cinétique rapide ont été réalisées à l'aide d'un ensemble Applied Photophysics (LKS 60). Le laser était un quanta-Ray GCR 130-1 Nd : YAG (largeur de l'impulsion = 9 ns) muni d'un doubleur, tripleur et quadrupleur de fréquence. On a travaillé avec la raie à 266 nm (raie fondamentale à 1,064 μm quadruplée). Les absorptions transitoires ont été mesurées avec un système de détection constitué d'une lampe xénon pulsée (150 W), d'un monochromateur et d'un photomultiplicateur IP 28 ou R928. Le signal du photomultiplicateur était numérisé par un oscilloscope programmable (HP54522A). le signal numérique était ensuite traité par un logiciel fourni par Applied Photophysics.

II.9 - DOSAGE DES IONS IODURE

Etant donnée que les ions iodure présentent une bande caractéristique en UV à $\lambda_{\text{max}} = 222 \text{ nm}$ et un pic bien résolu à $t_r = 2 \text{ min}$, il a été possible de les doser par CHLP à détection UV par étalonnage de l'appareil avec une série des solutions étalons de NaI et la construction de la courbe d'étalonnage (figure II.5).

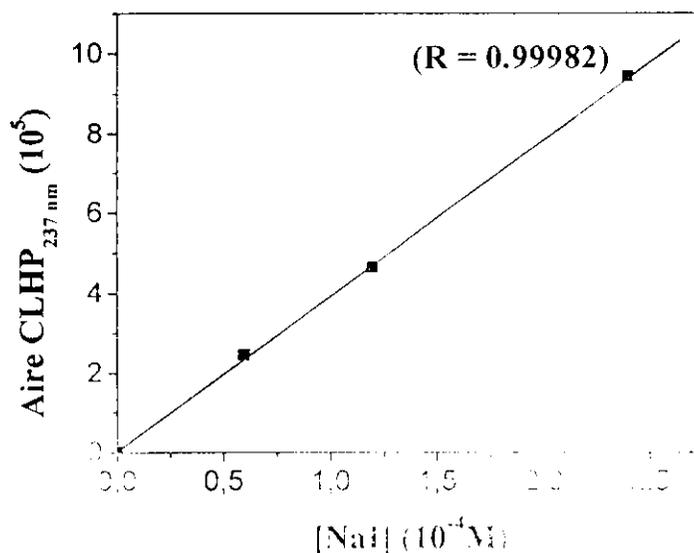


Figure II.5 : Droite d'étalonnage des ions iodure.

PARTIE B : BIOTRANSFORMATION

II.E.1 - MICROORGANISMES

- Deux souches fongiques sont testées : *Aspergillus niger* et *Cunninghamella elegans* sont des souches commerciales isolées de sols traités par des herbicides type phénylurées.
- Deux souches bactériennes de Rhodocoques ont été aussi testées : *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus erythropolis*. Ces souches ont été isolées par DE WEVER et al. (1993) à partir de boues activées de stations d'épuration traitant les effluents d'une usine de production de 2-mercaptobenzothiazole.

Les souches fongiques et bactériennes sont conservées à -80°C en présence de 10 % de glycérol (agent cryoprotecteur). Un tube est décongelé et on ensemence un erlenmeyer de 500 mL contenant le milieu nutritif. Après 20, 24 ou 48 h de préculture, on ensemence à 2 % (4 % pour *C. elegans*) les erlenmeyers de culture (100 mL de milieu nutritif + 2 mL de préculture). Ces erlens sont placés sur table d'agitation (200 rpm) pendant 20, 24 ou 48 h à 27°C ou 30°C selon la souche. La croissance est stoppée en fin de la phase exponentielle.

Un exemple de courbe de croissance obtenu au laboratoire avec *R. rhodochrous* est donnée dans la figure II.6.

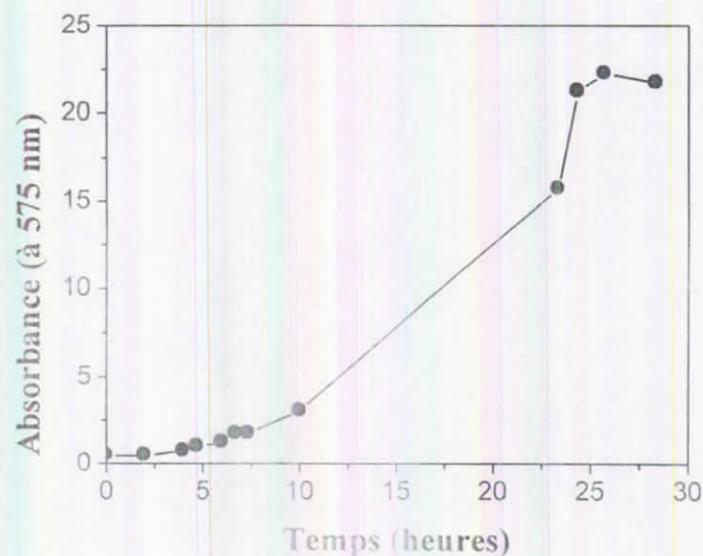


Figure II.6 : Croissance obtenue au laboratoire avec *R. rhodochrous*

PARTIE B : BIOTRANSFORMATION

II.B.1 - MICROORGANISMES

- Deux souches fongiques sont testées : *Aspergillus niger* et *Cunninghamella elegans* sont des souches commerciales isolées de sols traités par des herbicides type phénylurées.

- Deux souches bactériennes de **Rhodocoques** ont été aussi testées : *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus erythropolis*. Ces souches ont été isolées par DE WEVER et *al.* (1998) à partir de boues activées de stations d'épuration traitant les effluents d'une usine de production de 2-mercaptobenzothiazole.

Les souches fongiques et bactériennes sont conservées à -80°C en présence de 10 % de glycérol (agent cryoprotecteur). Un tube est décongelé et on ensemence un erlenmeyer de 500 mL contenant le milieu nutritif. Après 20, 24 ou 48 h de préculture, on ensemence à 2 % (4 % pour *C. elegans*) les erlenmeyers de culture (100 mL de milieu nutritif + 2 mL de préculture). Ces erlens sont placés sur table d'agitation (200 rpm) pendant 20, 24 ou 48 h à 27°C ou 30°C selon la souche. La croissance est stoppée en fin de la phase exponentielle.

Un exemple de courbe de croissance obtenu au laboratoire avec *R. rhodochrous* est donnée dans la figure II.6.

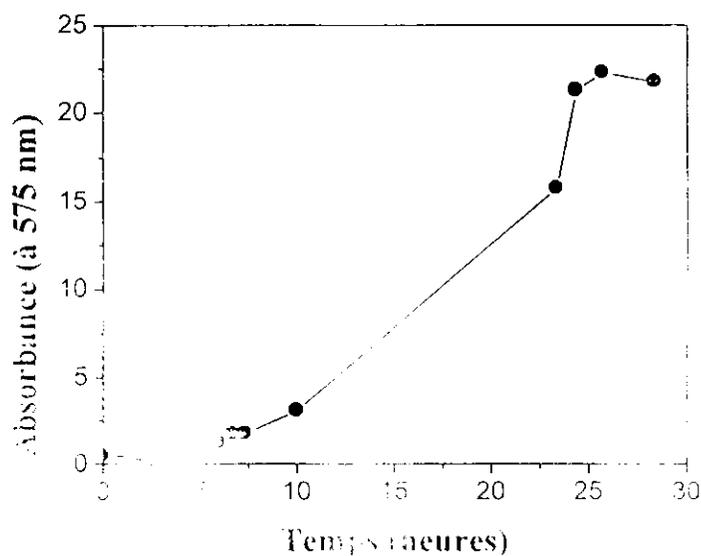


Figure II.6. Courbe de croissance de *Rhodococcus rhodochrous* en fonction du temps.

II.B.1.1 - Conditions de culture

Micro-organismes		Préculture		Préculture	
		milieu	durée	milieu	durée
Champignons					
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9142	1	24 h	1	24 h
<i>Cunninghamella elegans</i>	ATCC 9245	1, 3	48 h	1,3	48 h
Bactéries					
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	OBT18	2	20 h	2	20 h
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	BTS1	2	20 h	2	20 h

II.B.1.2 - Composition des milieux (pour un litre)

- **Milieu 1** : milieu Rosazza glucose : 20 g, farine de soja : 5 g, extrait de levure : 5 g (Difco), NaCl : 5 g, KH_2PO_4 : 5 g.
- **Milieu 2** : milieu Trypcase Soja (bioMérieux) biotrypcase : 17 g, biosoyase : 3 g, NaCl : 5 g, K_2HPO_4 : 2.5 g, glucose : 2.5 g
- **Milieu 3** : milieu Malte extrait de levure : 5 g (Difco), extrait de malte : 10 g (bioMérieux), tryptone : 5 g (Difco), glucose : 20 g

Tous les milieux de culture sont préalablement stérilisés à l'autoclave, pendant 20 minutes à 120°C, sous une pression additionnelle de 1 bar. L'ensemencement s'effectue à l'aide d'une préculture et sous une hotte à flux laminaire.

Les incubations sont réalisées dans des erlenmeyers de 500 mL, contenant 100 mL de milieu nutritif, à 30°C pour les bactéries et à 27°C pour les fongiques, sur table d'agitation à 200 rpm.

II. B.2 - CONDITIONS DE BIODEGRADATION

B.2.1 - Incubation des xénobiotiques

Après 20, 24, ou 48 h de culture, selon la nature de la souche, les cellules au repos métabolique sont lavées et récupérées.

❖ **cas d'*Aspergillus niger* ou *Cunninghamella elegans*** : le contenu des erlenmeyers est filtré sous hotte à flux laminaire sur un verre fritté stérile. Le mycélium récupéré est lavé deux fois dans du tampon milieu minéral de Knap (MMK).

❖ **cas des souches bactériennes** : le contenu des erlenmeyers est centrifugé à 8000 g pendant 15 min à 5°C. Le surnageant est éliminé, les culots sont repris et lavés deux fois dans du tampon minéral MMK (8000 g, 15 min, 5°C).

La biomasse humide récupérée (de 50 à 100 g pour 1 litre de culture suivant la souche testée) est remise en suspension dans le tampon MMK et répartie dans des erlenmeyers de 500 mL à raison de 5 g de cellules humides pour 100 mL de tampon (suspensions à 50 g/L de biomasse humide).

Le xénobiotique est alors ajouté en solution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) dans chaque erlen (ajout de 100 µL) pour obtenir des concentrations variables selon le composé testé (les produits testés étant rapidement et extrêmement solubles dans le DMSO, on peut préparer des solutions mères en substrat de plusieurs mg par litre).

La concentration en produit est établie selon la solubilité de chaque produit :

- Methabenzthiazuron (MBTU) : 0,0625 - 0,25 mM
- 2-Mercaptobenzothiazole (MBT) : 0,07 - 0,13 mM
- 2-Hydroxybenzothiazole (OBT) : 0,13 - 1,5 mM
- 2-Aminobenzothiazole (ABT) : 0,07 mM
- Benzothiazole (BT) : 0,07 - 0,13 mM
- Acide 2-benzothiazolylsulfonique (BTSO₃) : 0,07 - 0,13 mM

Les cellules sont incubées en présence du xénobiotique sur une table d'agitation (200 rpm) à 30 ou 27°C suivant la souche. Les expérimentations sont réalisées en conditions stériles. Dans tous les cas deux erlens témoins sont constitués : un témoin cellules dans lequel les cellules sont mises à incuber dans les mêmes conditions expérimentales mais sans xénobiotique et un témoin xénobiotique dans lequel le xénobiotique est présent dans les mêmes conditions dans le tampon mais sans cellules (vérification de l'absence d'une éventuelle transformation abiotique dans les conditions expérimentales).

Des échantillons (1 mL) sont prélevés à l'espace de 24 heures régulièrement. Les échantillons sont immédiatement centrifugés (12000 g pendant 10 min) et le surnageant est récupéré dans un erlenmeyer stérile. Les cellules sont lavées deux fois dans du tampon milieu minéral de Knap (MMK).

Tampon milieu minéral de Knapp MMK (composition pour 1 L d'eau distillée) :

KH_2PO_4 : 1 g
 K_2HPO_4 : 1 g

$\text{MgSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$: 40 mg
 $\text{FeCl}_3, 7\text{H}_2\text{O}$: 4 mg

II.B.3 - IDENTIFICATION DES METABOLITES

B.3.1 - Production et isolement du métabolite du méthabenzthiazuron

B.3.1.1 - Production et extraction

Afin de pouvoir isoler les métabolites, une série de 15, 20, ou 30 erlenmeyers d'incubation du MBTU est réalisée en conditions stériles, de façon à obtenir la production d'une quantité importante des métabolites. Chaque erlen de 500 mL contient donc 100 mL de tampon MMK, 5 g de biomasse humide et 3,5 mg de MBTU. L'évolution de la concentration en MBTU est suivie par HPLC. En fin de dégradation, les erlenmeyers sont filtrés et 3,5 l de phase aqueuse contenant les métabolites sont récupérés.

Les métabolites sont extraits de la phase aqueuse avec de l'acétate d'éthyle (coefficient d'extraction élevé, vérification par HPLC). L'extraction est réalisée en continu pendant 48 h. La phase organique récupérée (1,5 L) est séchée sur sulfate de magnésium. Elle est ensuite filtrée et évaporée (obtention d'un résidu huileux).

Dans certaines situations les erlens incubés ne sont pas récupérés en même temps dans le but d'avoir une bonne accumulation de certains métabolites qui disparaissent rapidement ou certains autres qui n'apparaissent que tardivement.

B.3.1.2 - Isolement et purification

Afin d'obtenir la meilleure séparation possible entre le métabolite et les autres produits présents dans la phase organique, plusieurs mélanges de solvants ont été testés en Chromatographie sur Couche Mince. Une bonne séparation des produits est obtenue sur CCM (CCM réalisées sur plaque de silice Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)) avec un mélange acétate d'éthyle 60 / cyclohexane 40.

La purification du métabolite majoritaire produit par *A. niger* est ensuite réalisée par

chromatographie sur colonne de gel de silice (silice Kieselgel 60 0,063-0,200 nm Merck) avec comme éluant le mélange acétate d'éthyle 60/cyclohexane 40. Les fractions contenant le métabolite sont récupérées et évaporées. On obtient un composé solide blanc. Tandis que son isomère minoritaire a été purifié sur une seconde colonne de gel de silice avec comme éluant le mélange chloroforme/acétate d'éthyle 70/30 v/v. Une poudre blanche est aussi obtenu dans ce dernier cas.

Dans le cas des métabolites de *C. elegans*, vu leur nombre relativement élevé et l'analogie structurale élevé entre eux, le mélange utilisé a permis d'obtenir plusieurs fractions contenant plusieurs métabolites chacune.

B.3.2 - Identification

B.3.2.1 - Spectrométrie de masse

Les spectres ont été réalisés en ionisation chimique et /ou par impact électronique sur un spectromètre Hewlett Packard MS Engeen 5989B.

Les métabolites produits par *A. niger* ont aussi été identifiés par HPLC/Masse dans les deux modes positif et négatif.

B.3.2.2 - Spectrométrie de RMN

Les spectres de RMN ^1H ont été enregistrés :

- soit à 200,13 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 200
- soit à 300,13 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 300
- soit à 400,13 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400
- soit à 500,13 MHz sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500

avec une sonde inverse triple accord ^1H - ^{13}C - ^{15}N équipée d'une bobine de gradient sur l'axe z, à 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre.

1/ Analyses par RMN du proton à une dimension

a) - Acquisitions sur le spectromètre 300 MHz

La présence massive d'eau dans les échantillons (environ 55M), implique l'utilisation d'une séquence permettant d'éliminer sa résonance (pour ne pas saturer le récepteur).

La séquence choisie sur le spectromètre 300 MHz est la WATERGATE (Water Gradient – Tailored Excitation) qui, par l'utilisation de gradients de champ selon l'axe z, permet une meilleure suppression du pic de l'eau et une augmentation du rapport signal sur bruit, par rapport à une simple présaturation. En fait, on réalise un trou d'excitation de l'eau. Les signaux en dehors de la fréquence de l'eau (off-résonance) sont refocalisés sélectivement par les gradients alors que le pic de l'eau (on-résonance) est défocalisé (« détruit ») par les gradients. L'inconvénient de ce type de séquence est la disparition (partielle) des résonances situées à $\pm 0,4$ ppm de l'eau. Elle n'est donc pas recommandée pour l'analyse d'oligosaccharides ou d'oligonucléotides. En revanche, elle semble parfaitement adaptée au cas des benzothiazoles qui ne présentent pas de résonance directement dans la zone du solvant. Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

- Impulsion ^1H de 90° : $7,5 \mu\text{s}$
- Impulsion utilisée pour la suppression de la résonance de l'eau : $15,5 \mu\text{s}$
- Délai de relaxation : 3 s
- Durée d'acquisition : 3,64 s
- Nombre de points : 32 768
- Nombre de scans : 128-256
- Fenêtre spectrale : 4 496 Hz
- Nombre de Hertz par point : 0,07
- Type de gradient : SINUS
- Nombre de points du gradient : 100
- Nombre de scans factices : 4
- $D19 = 1/2d = 250 \mu\text{s}$ (où d = distance jusqu'au prochain trou d'excitation (en Hz))
- Durée de la séquence : 10-20 min (selon le nombre de scans).

b) - Acquisitions sur le spectromètre 500 MHz

Sur le spectromètre 500 MHz, la séquence choisie est une présaturation utilisant deux impulsions sélectives de phases opposées. Elle permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit.

Les paramètres d'acquisition pour l'analyse d'échantillons liquides sont les suivants :

- Impulsion ^1H de 90° : $6,3 \mu\text{s}$
- Impulsion sélective : 3 s (utilisée pour la suppression de la résonance de l'eau)
- Délai de relaxation : 1 s
- Durée d'acquisition : 4,67 s

- Nombre de points : 65 536
- Nombre de scans : 128
- Fenêtre spectrale : 7 002 Hz
- Nombre de scans factices : 4
- Durée de la séquence : 18 min (pour 128 scans).

2/ Analyses par RMN à deux dimensions

Afin d'élucider la structure des métabolites, nous avons complété notre étude par des expériences de RMN 2D parmi lesquelles : COSY ^1H - ^1H (COrrélation SpectroscopY) et HMBC ^1H - ^{15}N . Toutes ces séquences utilisent les gradients de champs, soit pour la sélection des chemins de cohérence, soit pour la présaturation.

a) - Expérience COSY ^1H - ^1H

La séquence utilisée est une COSY 45°. Cette méthode a pour objet de corrélérer les signaux de protons couplés scalairement ($^n\text{J}_{\text{H}-\text{H}}$ avec $n \leq 3$). Les pics de corrélation indiquent les noyaux qui sont couplés entre eux et permettent donc une attribution directe des protons voisins.

Les paramètres d'acquisition utilisés sont les suivants :

- Nombre de scans : 40
- TD 1 : Nombre d'expériences : 256
- TD 2 : 1 024
- Durée d'acquisition : 136 ms
- Pulse ^1H de 45° : 4 μs
- Pulse ^1H de 90° : 8 μs
- Fenêtre spectrale {F2} = {F1} : 3 754 Hz (7,5 ppm)

Afin d'aller plus loin dans l'analyse structurale des métabolites, des expériences de RMN pour détecter les corrélations hétéronucléaires des protons avec les noyaux carbone et azote ont été réalisées. Compte tenu de la faible sensibilité de ces deux noyaux et de la concentration des métabolites dans les échantillons, nous avons effectué ces expériences en détection inverse. La détection inverse ou indirecte consiste à obtenir les paramètres RMN (déplacement chimique, T_1 ...) d'un noyau X peu sensible en observant le signal RMN d'un noyau beaucoup plus sensible (proton en général). Nous avons donc utilisé une expérience HMBC ^1H - ^{15}N . Cette séquence possède les paramètres très spécifiques, que nous allons présenter.

b) - Expérience HMBC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$

Cette méthode permet de détecter les couplages entre les protons et les atomes d'azote séparés par trois ou quatre liaisons.

L'abondance naturelle de l'azote ^{15}N est de 0,37 % et sa sensibilité relative par rapport au proton est de $1,04 \times 10^{-3}$, ce qui donne une sensibilité absolue de $3,85 \times 10^{-6}$ pour l'azote (pour comparaison : elle est de $1,76 \times 10^{-4}$ pour le carbone 13). Cela signifie que la RMN de l'azote 15 est approximativement un million de fois moins sensible que celle du proton et celle du carbone 13, 10 000 fois moins sensible. La valeur de la constante de couplage doit être connue ou estimable à environ 30 % près puisque cette séquence est modulée par le couplage $^n\text{J}_{\text{H}-^{15}\text{N}}$. De la même manière que dans l'HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, le délai doit être ajusté :

$$d = \frac{1}{2 \times^n \text{J}_{\text{H}-^{15}\text{N}}}$$

Il est de l'ordre de quelques dizaines de ms puisque le couplage longue distance est de l'ordre de quelques Hertz. Pour l'azote 15, le problème est qu'il existe une grande diversité de constantes de couplage longue distance et qu'elles sont peu connues. Différents essais pour des constantes $^n\text{J}_{\text{H}-^{15}\text{N}}$ comprises entre 3 et 6 Hz ont été réalisés ($80 < d < 160$ ms).

Les paramètres d'acquisition de RMN utilisés sur les spectromètres 300 MHz sont regroupés dans le tableau II.4.

Les déplacements chimiques de l'azote sont donnés par rapport au nitrométhane comme référence externe.

Pour connaître la structure de métabolite majoritaire d'*A. niger* avec précision, une RMN 2D inverse $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ a été utilisée.

Tableau II.4 : Paramètres d'acquisition des expériences HMBC ^1H - ^{15}N utilisés sur les spectromètres 300 MHz

Paramètres	Spectromètre 300 MHz
Impulsion ^1H de 90°	7,5 μs
Impulsion ^{15}N de 90°	27 μs
Nombre de scans	32
TD 1 (Nombre d'expériences)	128
TD 2	1 024
Durée d'acquisition	1,24 s
Fenêtre spectrale ^1H	1,4 ppm
Fenêtre spectrale ^{15}N	250 ppm
Délai d'évolution $d\sigma$	80-120 ms (selon le couplage ^3J ou ^4J souhaité)
Durée de la séquence	environ 4 heures

II.B.4 - TEST MICROTOX[®]

De nombreuses méthodes normalisées existent pour évaluer la toxicité de molécules minérales ou organiques. Elles utilisent divers types d'organismes vivants : poissons, crustacés, algues, mais aussi bactéries, levures ou cellules isolées. Les délais de réponse sont souvent longs ; il est parfois nécessaire d'avoir une importante quantité de toxique et la mise en œuvre de ces tests est souvent lourde.

Le système Microtox[®] permet de palier ces inconvénients (Joret *et al.*, 1986). La rapidité et la simplicité de ce test alliées à une bonne corrélation des résultats avec de nombreux autres tests de toxicité, notamment avec le test sur daphnies en font un remarquable outil de mesure (Grange et Pescheux, 1987; Visseur *et al.*, 1986). De nombreux composés chimiques ont été testés par cette méthode. Elle ne permet toutefois pas de mesurer les impacts des métaux lourds. Elle est cependant très utile pour mesurer la toxicité des produits organiques.

Le protocole utilisé est celui prescrit par la société Microbics (1995), fabricant et dépositaire du système. Le principe du test repose sur la mesure de l'inhibition de la luminescence naturelle de la bactérie *Vibrio fischeri* (autrefois appelée *Photobacterium phosphoreum*) en présence de différentes concentrations de toxique.

On utilise une souche bactérienne commercialisée sous forme lyophilisée, stockée à -4 °C, régénérée au moment de l'emploi et maintenue à 5 °C le temps de l'expérimentation. Le test s'effectue en milieu salé à 15 °C, température optimale de croissance de *V. fischeri*. Il consiste à mesurer, grâce à un photomultiplicateur, l'émission lumineuse émise par les bactéries témoins et par les bactéries en présence de différentes concentrations du toxique étudié (tous les milieux et réactifs sont vendus par la société anglaise Azur Environmental).

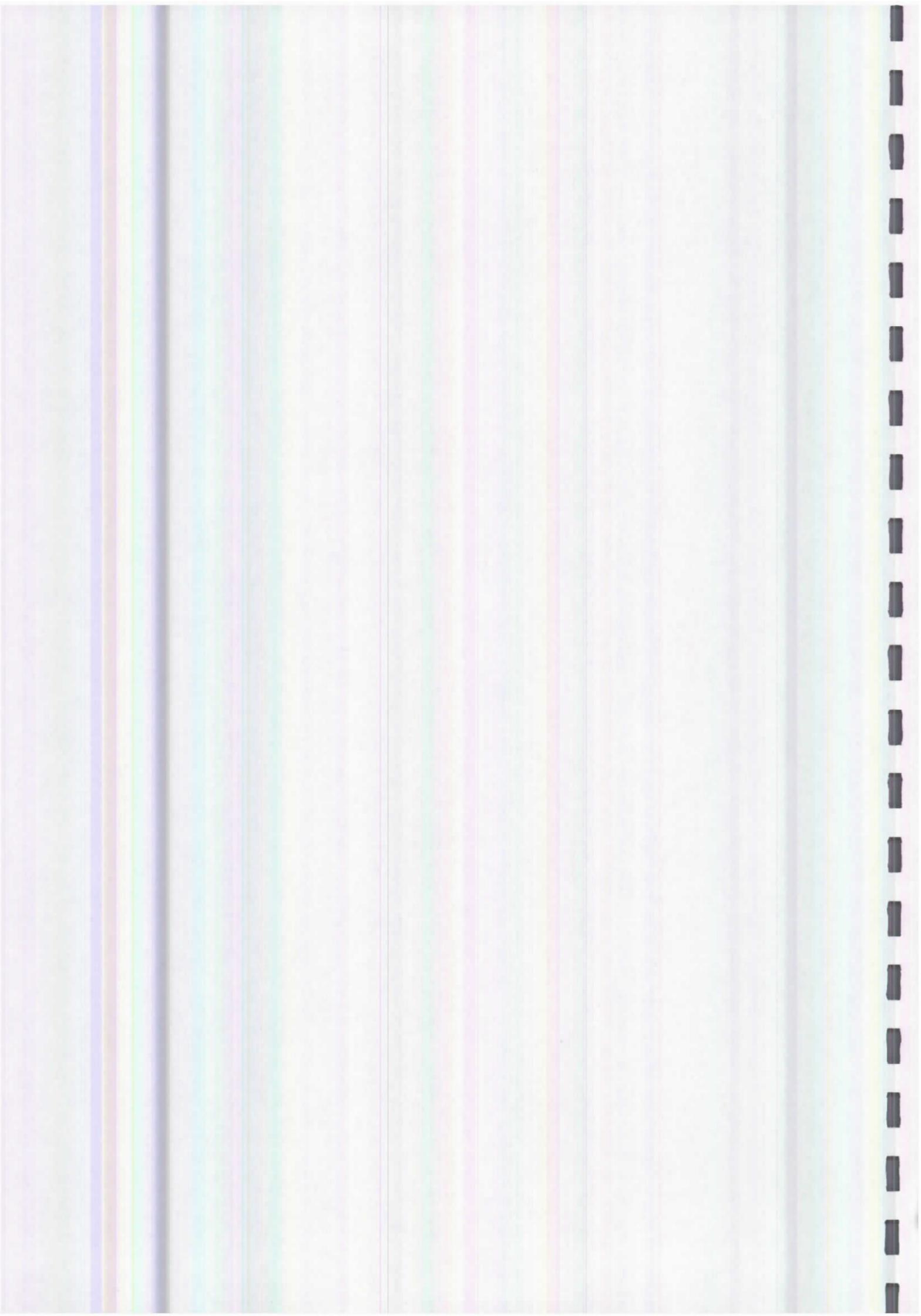
Le logiciel commercialisé par Microbics permet l'enregistrement des données, ainsi que le calcul rapide de la Concentration Efficace qui correspond à un abaissement de 50 % de la bioluminescence naturelle de la bactérie (CE₅₀).

Dans cette étude, les mesures de toxicité ont été effectuées avec la collaboration de Frédérique Bonnemoy du Laboratoire de Biologie des Protistes de l'université Blaise-Pascal, de Clermont Ferrand France) dirigé par le professeur J. Bohatier.

CHAPTER III

PHOTOTRANSFORMATION OF

1. INTRODUCTION



III.1- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

III.1.1- Détermination de la solubilité et du pKa

La solubilité du bromoxynil dans l'eau est de 130 mg.L^{-1} en se référant à Tomlin et *al.*(2000). Cette même référence signale que l'ioxynil est pratiquement insoluble dans l'eau.

Cependant, il était possible d'évaluer sa solubilité à $42,3 \text{ mg.L}^{-1}$ par comparaison du spectre d'absorption UV d'une solution saturée avec celui d'une solution de référence contenant un faible pourcentage de méthanol. La valeur trouvée indique que celle avancée par la référence précédente pour le bromoxynil est surestimée.

Le chloroxynil était suffisamment soluble pour le présent travail et sa solubilité n'a pas été déterminée avec précision.

Les pKa du chloroxynil, du bromoxynil et de l'ioxynil ont été évalués par Nolte et *al.*(1995) à 4,9 ; 4,3 et 4,5 respectivement.

Pour notre part nous avons évalué le pKa de l'état fondamental du chloroxynil en suivant la densité optique au maximum d'absorption de chacune des deux formes (250 et 280 nm), en fonction du pH (Figures III.1 et III.2). Les deux formes donnent pratiquement la même valeur soit 3,78.

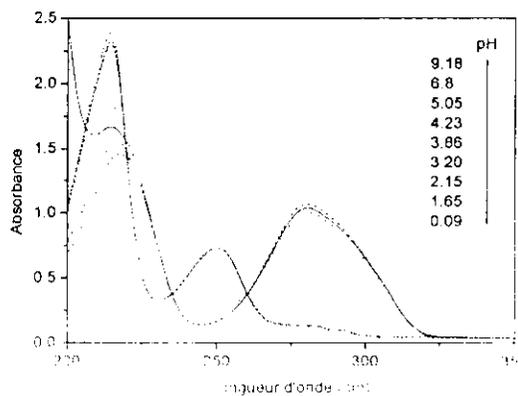


Figure III.1 : Spectre d'absorption de l'ioxynil ($1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$) en fonction du pH

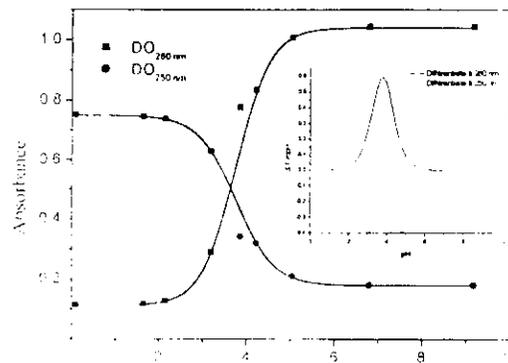
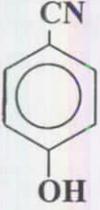
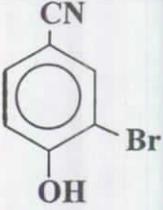
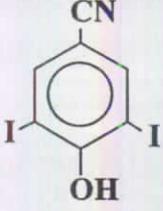
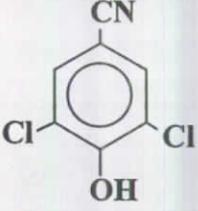


Figure III.2 : Evolution de l'absorbance de l'ioxynil à 280 et 250 nm en fonction du pH

Les pKa obtenus sont en accord avec ceux publiés par Nolte et *al.* (1995) (Tableau I.1)

Tableau III.1 : Valeurs des pKa de quelques dérivés phénoliques

Composé			
	Phénol	4-hydroxybenzonnitrile	3-bromo-4-hydroxybenzonnitrile
pKa	10,0 (Kortüm et al.,1961)	7,6 – 7,74 (Schulman et al.,1981)	5,8 (Bonnichon, 1999)
Composé			
	3, 5-dibromo-4-hydroxybenzonnitrile	3, 5-diiodo-4-hydroxybenzonnitrile	3, 5-dichloro-4-hydroxybenzonnitrile
pKa	3,86 (Tomlin, 2000)	3,96 (Tomlin, 2000)	3,78 travail présent

En effet, le phénol voit son pKa décroître d'environ deux unités par l'introduction d'un groupement cyano, fortement électroattracteur, en position *para* de la fonction phénol. Cette influence sur le pKa s'accroît par l'introduction d'un atome, voire deux atomes d'un halogène dans la position 3 et/ou 5 du cycle benzénique. Il apparaît en toute évidence que cette influence suit l'ordre d'évolution de l'effet inducteur-attracteur des halogènes à savoir :



Par conséquent, la valeur avancée par Nolte et al. (1995) pour le chloroxynil s'écarte nettement de cette régularité constatée pour le groupe.

En conclusion, on peut déduire que dans les conditions environnementales ces composés se trouvent majoritairement sous leurs formes anioniques.

III.1.2- Spectre d'absorption UV

Le spectre UV d'une solution aqueuse de chloroxynil présente deux bandes d'intensités comparables. Leurs maximums d'absorption se trouvent à 217 et 280 nm (Figure III.3a). Les

coefficients d'extinction molaire, ϵ , correspondants sont de l'ordre de 24200 et 15070 mol⁻¹ L cm⁻¹ respectivement.

L'ioxynil présente lui aussi deux bandes l'une centrée à 237 nm et l'autre à 285 nm. Les coefficients d'absorption molaire ont été évalués à 25100 et 17000 mol⁻¹ L cm⁻¹ (Figure III.3b).

Les deux herbicides absorbent d'une manière appréciable la lumière du jour ce qui entraîne une bonne photoréactivité vis à vis de la lumière naturelle.

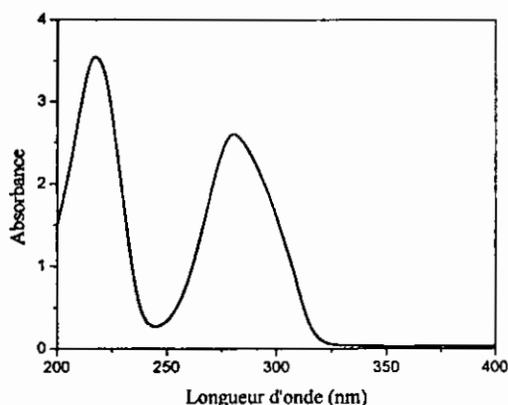


Fig III.3a: Spectre d'absorption UV du chloroxynil en solution aqueuse

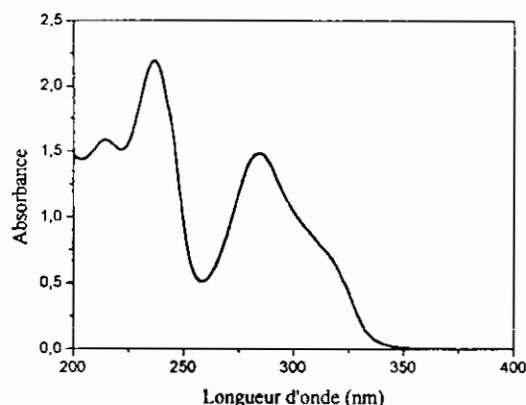


Fig III.3b : Spectre d'absorption UV de l'ioxynil en solution aqueuse

Le tableau III.2 présente quelques caractéristiques spectrophotométriques des trois substrats.

Tableau III.2 : Paramètres Spectrophotométriques du chloroxynil, du bromoxynil et de l'ioxynil

	Forme moléculaire		Forme anionique		Réf. Bibliog.
	λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	
Chloroxynil	215 250	33500 10500	215 280	24200 15070	Travail présent
Chloroxynil	215 250	12500 10500	218 281	26760 19650	Millet et al. 1998
Chloroxynil	215	12500	280		Chen et al.
Bromoxynil	215	12500	283	1820	Chen et Ma
Bromoxynil	215	12500	283		Chen et al.

Ioxynil	235	34100	237 285	25100 17000	Travail présent
Ioxynil	235	32820	237 285	25400 17300	Millet et al., 1998
Ioxynil	258		284		Nolte et al., 1995

III.1.3- Spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire

Le spectre de RMN du proton de l'ioxynil commercial (M=371) dans l'acétone deutériée présente un singulet à 8,19 ppm correspondant aux deux protons aromatiques équivalents et un autre singulet à 9,08 ppm correspondant au proton du groupement hydroxyle (Figure III.4).

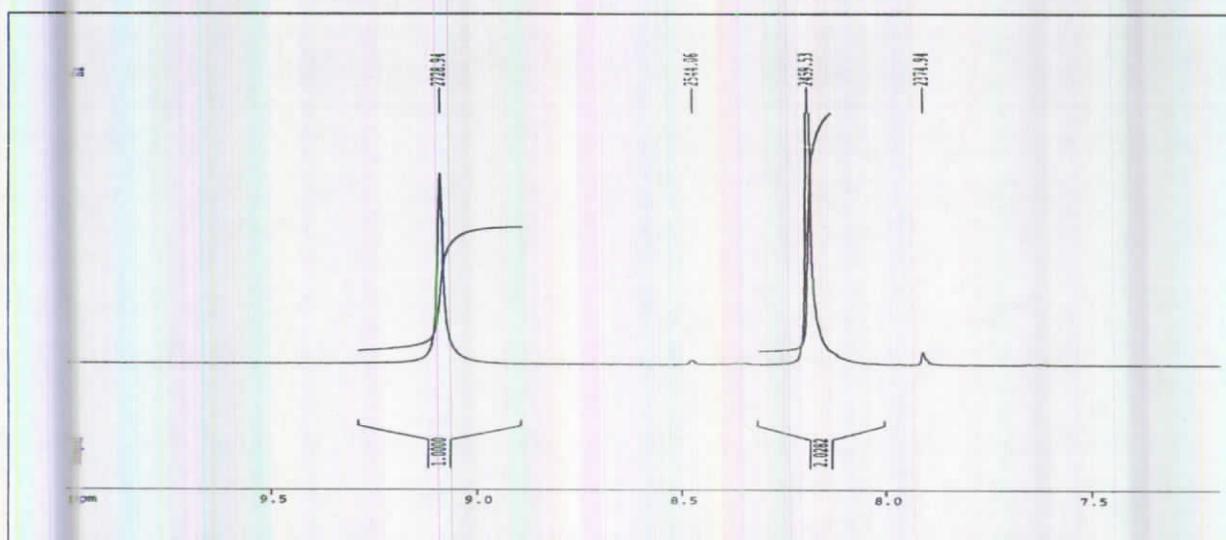


Figure III.4 : Spectre de RMN ^1H de l'ioxynil commercial

En spectrométrie de masse par ionisation chimique (CH_4) on obtient 372 ($m/z+1$), 400 ($m/z+29$) et 412 ($m/z+41$) (Figure III.5).

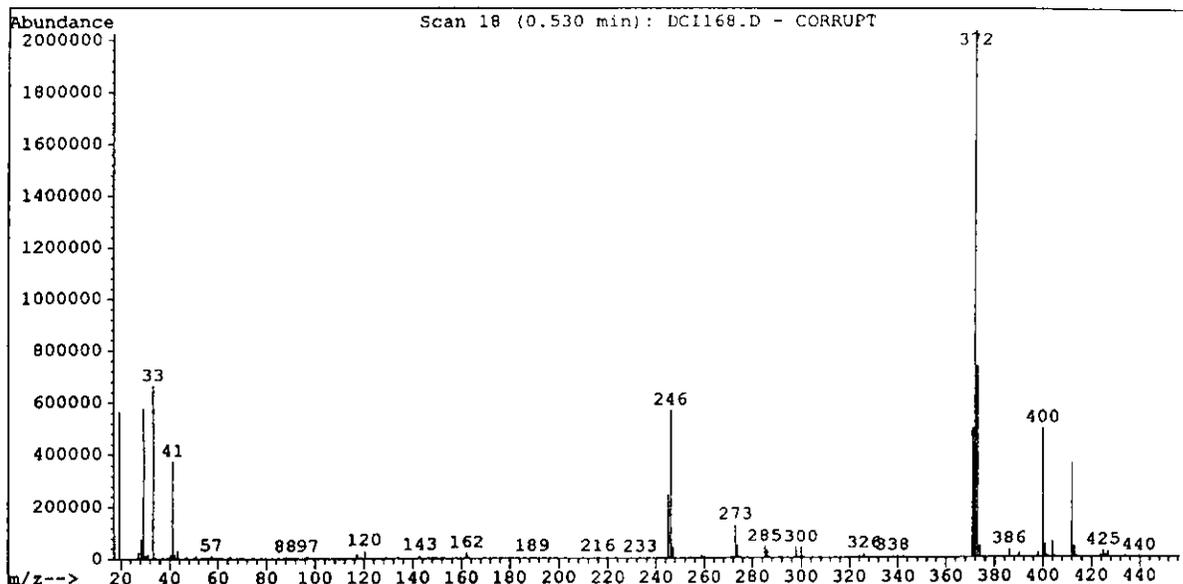
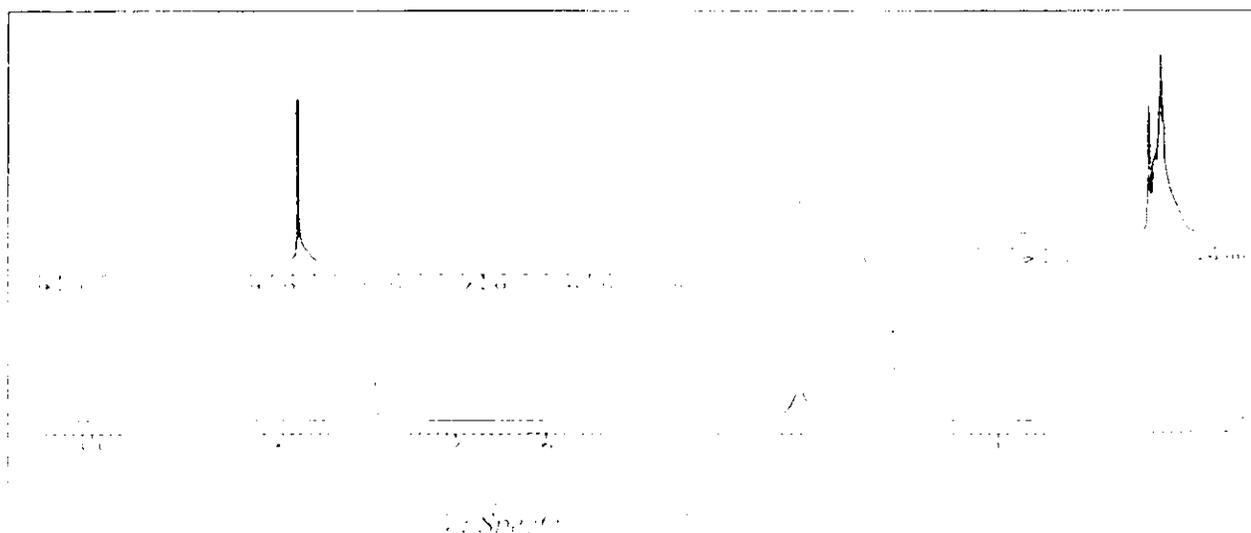


Figure III.5 : Spectre de masse de l'ioxynil commercial

On note aussi sur le même spectre la masse 246 qui correspond au produit de réduction. C'est peut être une impureté du composé de départ ou bien il s'agit d'une décomposition thermique dans l'injecteur, car on ne voit pas d'impureté notable sur le spectre de RMN, néanmoins, ce fait peut être expliqué par la sensibilité de la méthode. En revanche, l'isolement d'une petite quantité de ce produit lors de l'essai préparatif (en absence de tout agent réducteur dans le milieu réactionnel) laisse penser qu'il s'agit bien d'une impureté.

De son côté le spectre de RMN du chloroxynil commercial (M=187) dans l'acétone fait apparaître un singulet à 7,9 ppm correspondant aux protons aromatiques équivalents (Figure III.6).



Le spectre de masse du chloroxynil pur, représenté sur la figure III.7, donne les pics caractéristiques d'un composé dichloré suivants : $m/z+1=188, 190$ et 192 ; $m/z+29=216, 218$ et 220 ; $m/z+41=228, 230$ et 232 dans les rapports $9 : 6 : 1$.

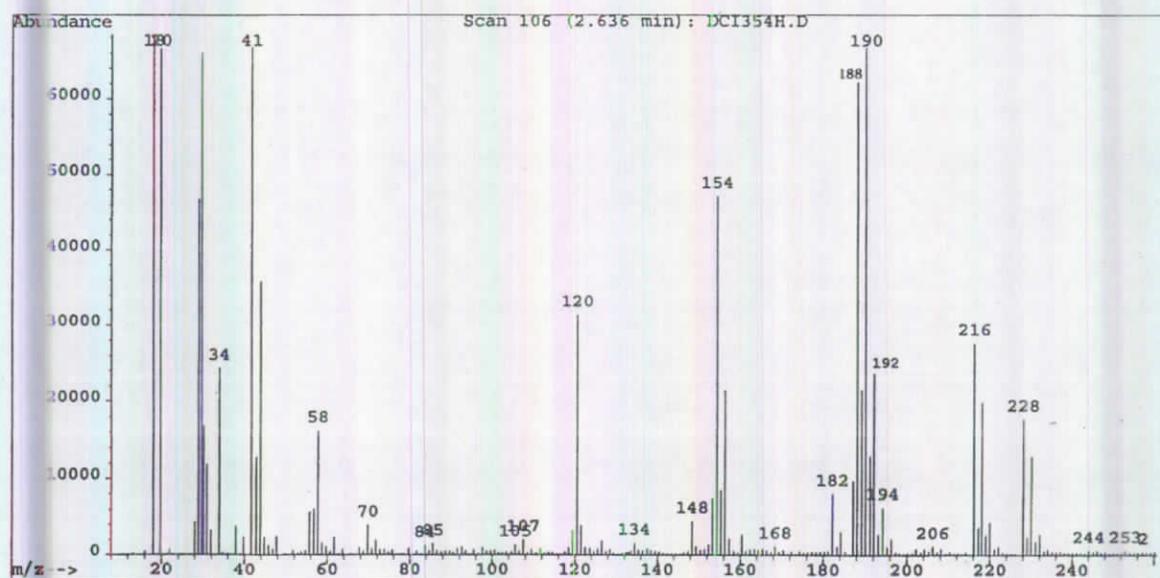


Figure III.7 : Spectre de masse du chloroxynil commercial

III.2- PHOTOTRANSFORMATION DE L'IOXYNIL ET DU CHLOROXYNIL EN SOLUTION AQUEUSE

III.2.1- Etude spectrophotométrique

a) - Irradiation à 296 nm

Le spectre UV-visible d'une solution de chloroxynil (10^{-4} M), à pH légèrement basique, irradiée à 296 nm à l'aide d'un monochromateur, montre une diminution progressive de deux bandes principales entre 200-234 nm et 263.6-313.6 nm respectivement, ainsi qu'une augmentation de l'absorbance entre 234-263.6 nm et la formation d'une nouvelle bande à 250 nm (figure III.8).

Le spectre UV-visible montre aussi une légère augmentation de l'absorbance entre 313-400 nm et l'apparition d'une bande de faible intensité.

Cet aspect du spectre montre bien une évolution de la solution au cours de l'irradiation. On constate, en outre la présence de trois points isobestiques à 234,1; 263,6 et 313,6 nm

respectivement, ce qui signifie bien que la stœchiométrie reste constante pendant les dix heures de la phototransformation et qu'il y a bien accumulation des photoproduits.

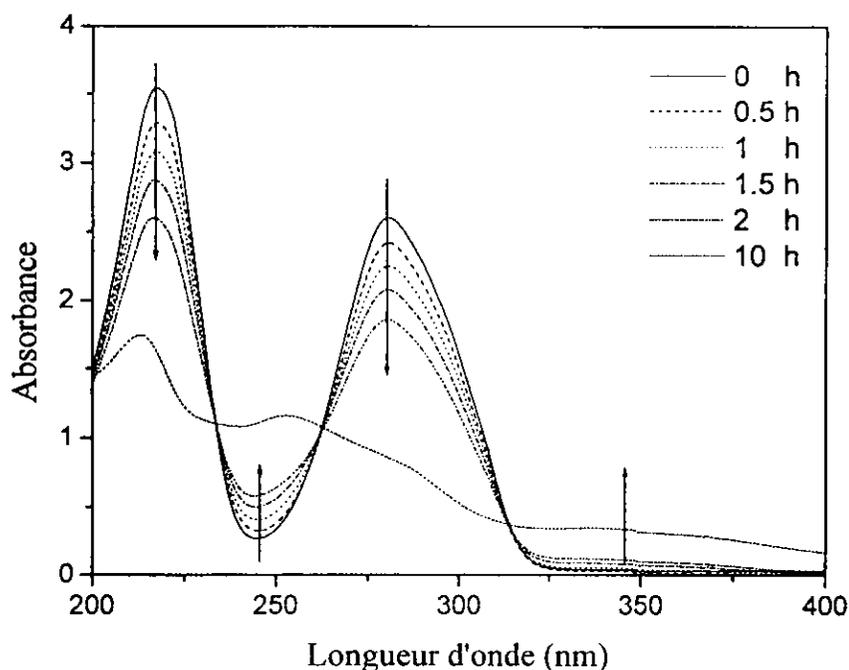


Figure III.8 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible d'une solution aqueuse aérée de chloroxynil (10^{-4} M) irradiée à 296 nm

b) - Irradiation à 313 nm

Le spectre UV de l'ioxynil irradié à 313 nm à l'aide d'un monochromateur montre une diminution de l'intensité de la bande d'absorption située entre 266 et 328 nm centrée à 285 nm alors qu'on observe une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption située entre 250 et 210 nm centrée au début à 236 nm mais qui se déplace vers des courtes longueurs d'onde au cours du temps (figure III.9). Une légère augmentation est aussi notée dans les intervalles 250-266 et 327-400 nm.

En outre le spectre présente trois points isobestiques à 327, 266 et 251 nm respectivement. Ces points isobestiques ont tendance à se déplacer après 7 heures d'irradiation, ce qui traduit la photoréaction des photoproduits formés.

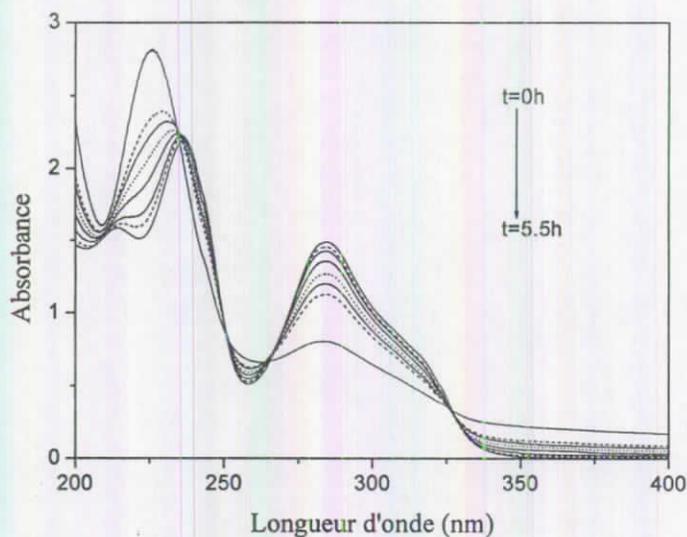


Figure III.9 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible d'une solution aqueuse aérée d'ioxynil ($2,33 \times 10^{-5} M$) irradiée à 313 nm

c) - Irradiation entre 275 et 365 nm

Dans un but préparatif, des solutions ont été irradiées dans un réacteur en quartz entre 275 et 365 nm en utilisant le dispositif à 6 lampes décrit précédemment (§ II.A.5.2.a).

III.2.2- Etude analytique

a)- Ioxynil

a.1- Analyse chromatographique :

Le chromatogramme de la figure III.10 montre bien la formation de plusieurs photoproduits dont le P₁₃ qui semble être le photoproduit majoritaire parmi d'autres. De ce fait il nous a semblé utile de les isoler et de les caractériser.

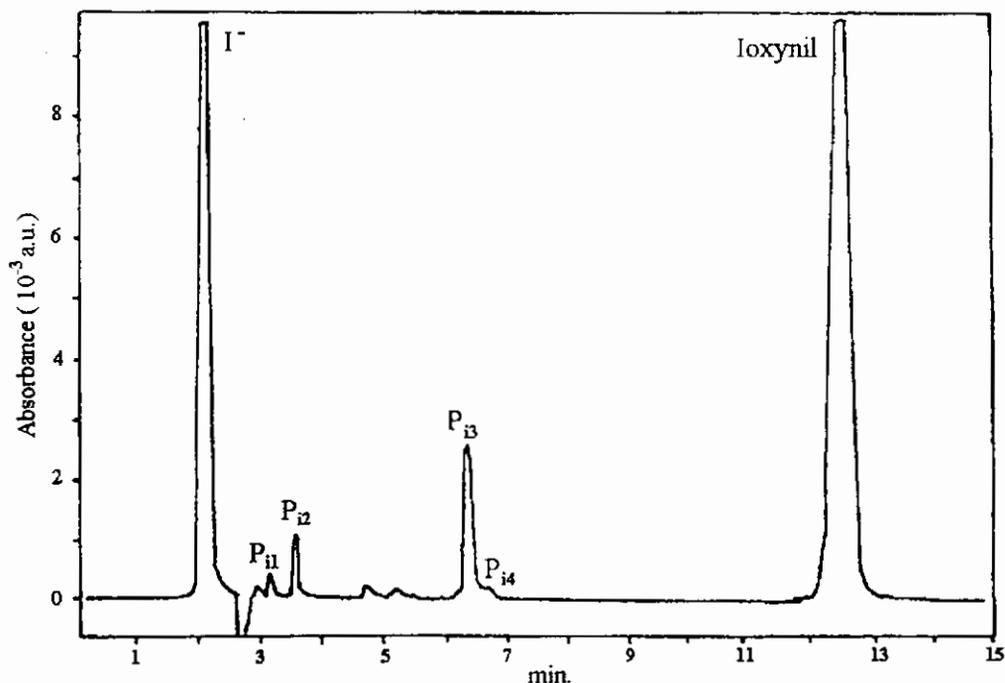


Figure III.10 : Chromatogramme HPLC d'une solution 10^{-4} M d'ioxynil irradiée entre 290 et 365 nm (colonne C_{18} ; éluant : eau acide/méthanol (40/60); $\lambda_{\text{détection}} = 237$ nm)

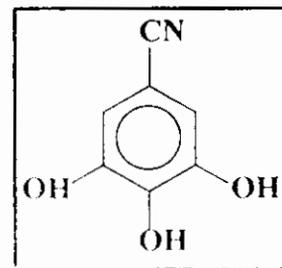
a.2- Caractérisation des photoproduits :

Six fractions ont été séparées par CLHP analytique utilisée à des fins préparatives. Quatre photoproduits ont pu être identifiés par masse ou par RMN.

⇨ Photoproduit P_{11}

Ce photoproduit a été identifié par introduction directe et ionisation chimique (CH_4) et par RMN. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Masse : $m/z=151$, $m/z+1=152$, $m/z+29=180$, $m/z+41=192$, ce qui permet de conclure qu'il s'agit du 3,4,5-tri-hydroxybenzonnitrile.
- RMN : acétone D_6 - singulet à 6,83 ppm



P_{11}

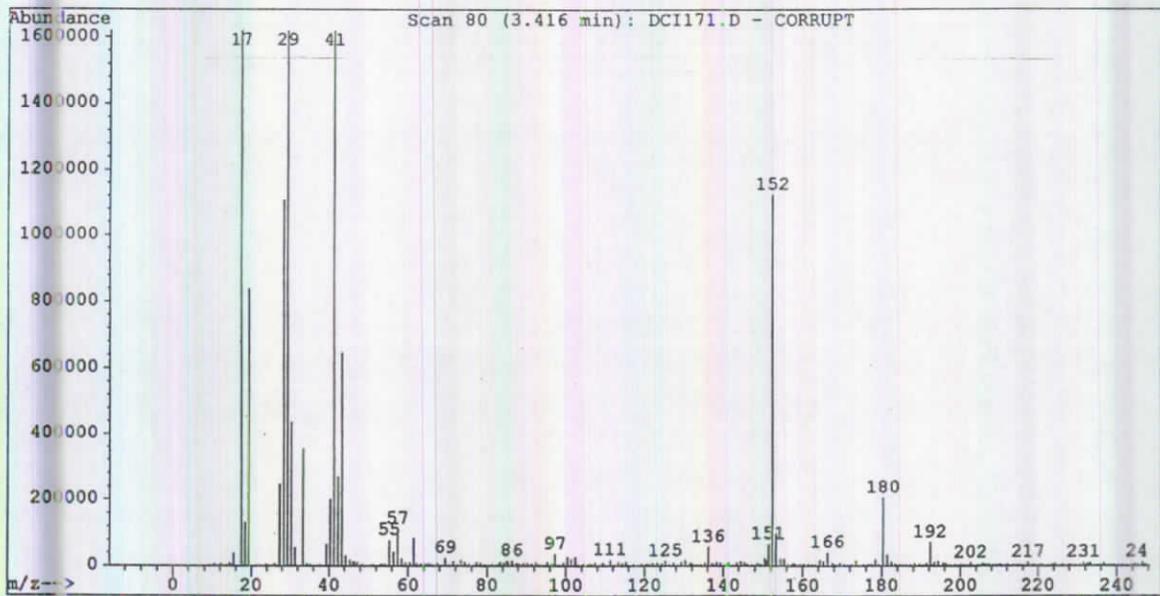


Figure III.11 : Spectre de masse du photoproduit P₁₁

⇒ **Photoproduit P₁₂**

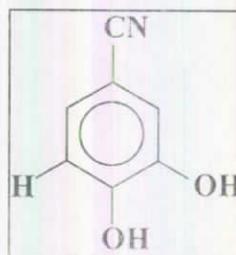
La quantité isolée a suffi pour la masse et la RMN.

- **Ma**sse : m/z=135, m/z+1=136, m/z+29=164, m/z+41=176

- **RMN** : Le signal large vers 9 ppm dans l'acétone D₆, mais qui disparaît par addition de D₂O, correspond aux 2 OH. Les trois protons aromatiques sont situés à 7,15; 7,14 et 6,97 ppm. On voit sur l'agrandissement de la zone aromatique que l'intégrale du massif à 7,14 ppm vaut deux fois plus que ce-lui de l'autre massif.

Le premier proton à 7,15 ppm (couplage 1,8 Hz) correspond à H₂, le 3^{ème} à 6,97 ppm (couplage 8,7 Hz) à H₅ et le proton doublement couplé à 7,14 ppm correspond à H₆.

Le signal à 2,04 ppm correspond à l'acétone D₅ et celui vers 3 ppm à des traces d'eau, inévitables du fait que la réaction a lieu en solution aqueuse. La structure proposée est donc celle du 3,4-dihydroxybenzonitrile.



P₁₂

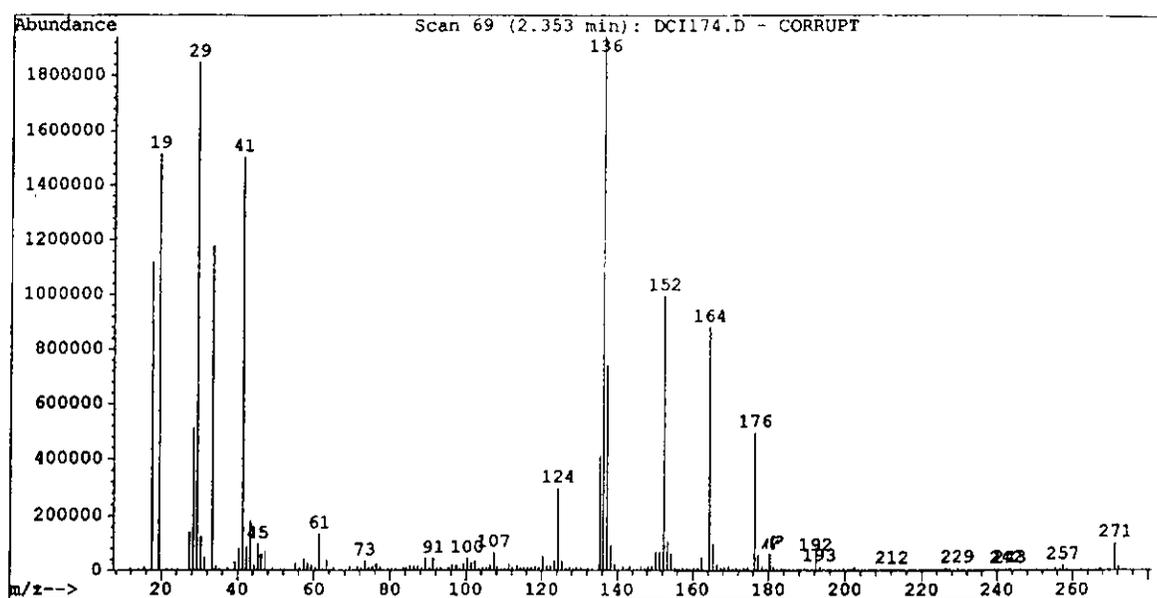


Figure III.12 : Spectre de masse du photodroduct P₁₂

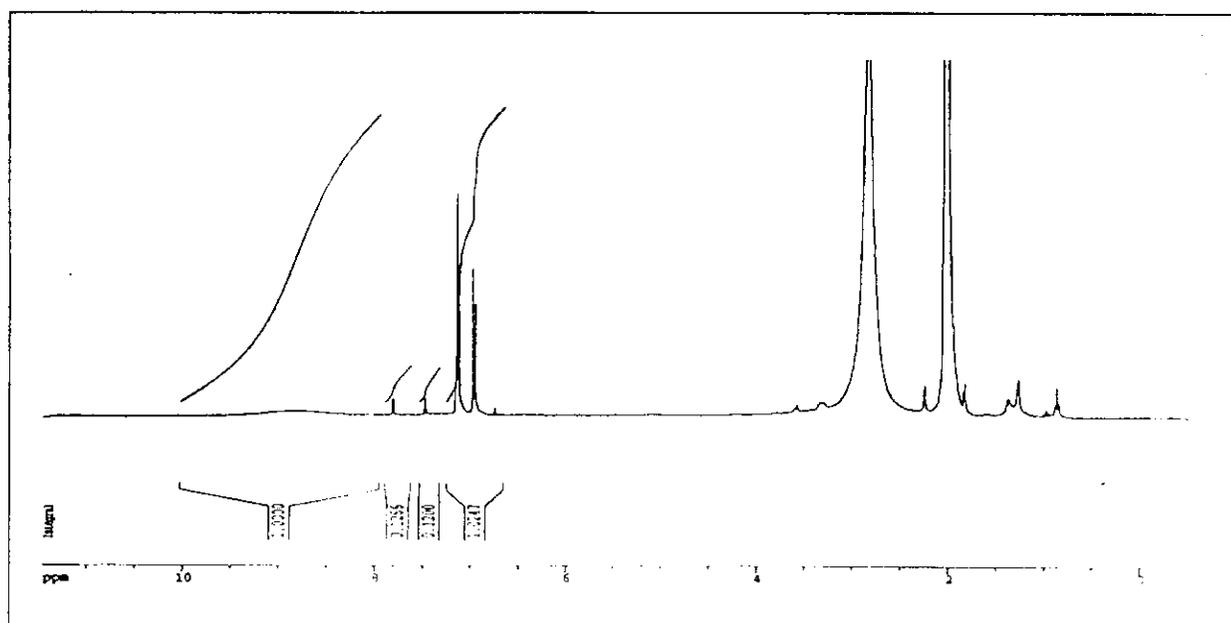


Figure III.13 : Spectre de RMN¹H du photoproduct P₁₂

⇒ *Photoproduct*

En toute vraisemblance, ce produit correspond au produit majoritaire de la transformation.
 Les résultats de la masse molaire calculés sont les suivants :

- Masse molaire (M) = 271 g/mol
- Masse molaire (M) = 271 g/mol

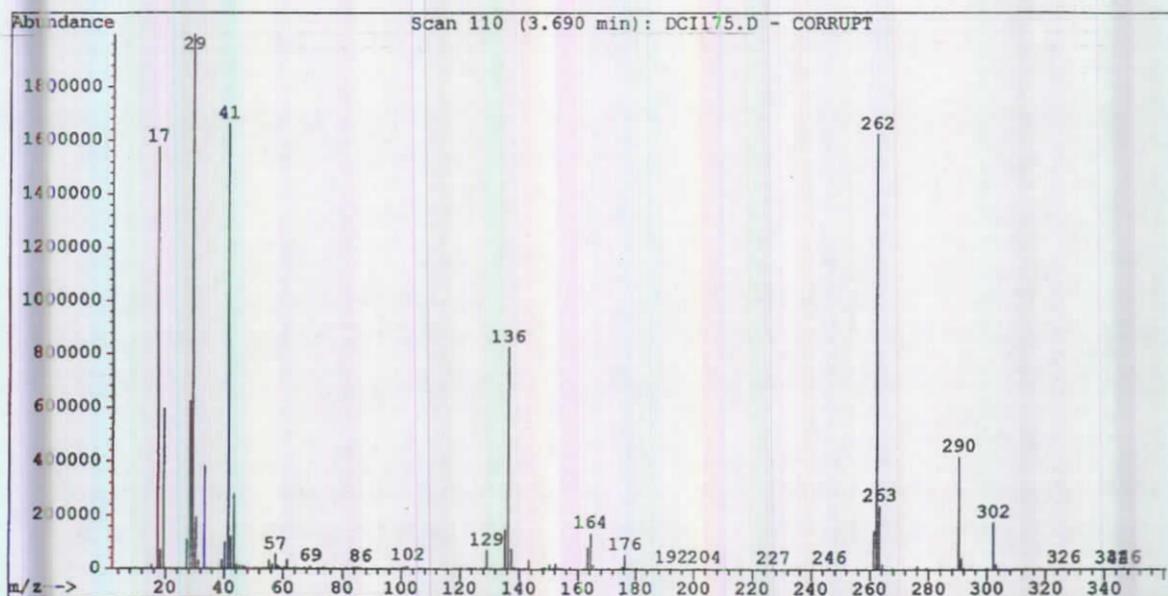
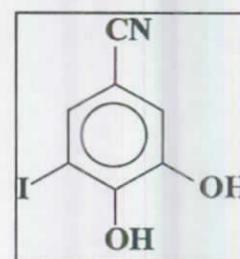


Figure III.14 : Spectre de masse du photoproduit P₁₃

-RMN : Les deux OH résonnent à 9,5 ppm. Ils disparaissent par addition d'un peu de D₂O dans la solution. Les deux protons aromatiques couplés méta sont à 7,63 ppm (H₆) et à 7,18 ppm (H₂). La constante de couplage est de 1,7 Hz.



P₁₃



Figure III.15 : Spectre RMN¹H du photoproduit P₁₃

⇒ Photoproduit P_{14}

La quantité obtenue étant trop faible pour faire un spectre de RMN, le produit a été analysée par spectrométrie de masse, ce qui a donné les résultats suivants :

- Masse : $m/z=245$, $m/z+1=246$, $m/z+29=274$, $m/z+41=286$, valeurs compatibles avec le 4-hydroxy-5-iodobenzonitrile.

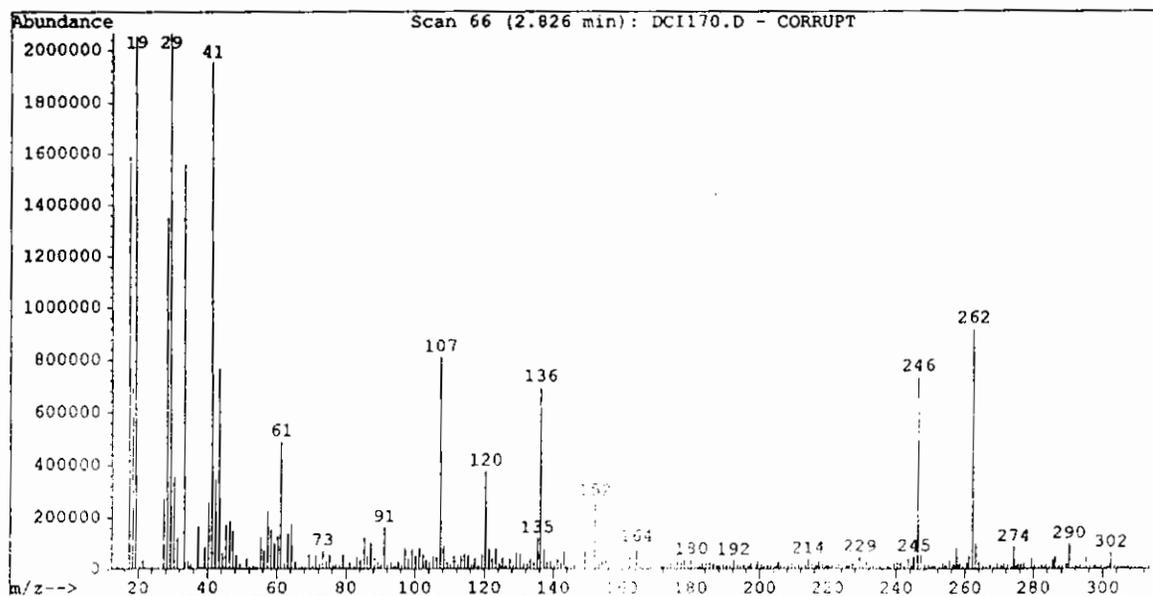
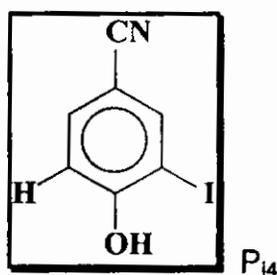


Figure III.16 : Spectre de masse du photoproduit P_{14}

⇒ Photoproduits P_{10}

La spectrométrie de masse a montré qu'il ne s'agit pas d'un produit unique mais d'un mélange de produits qui correspondent principalement aux produits d'ouverture du cycle imidazole. Les pics à $m/z=245$ (hydroxyle) et $m/z=246$ (iodure) sont les plus intenses. Les pics à $m/z=274$ et $m/z=286$ sont les plus faibles.

⇒ **Photoproduit P_{i4}**

La quantité obtenue étant trop faible pour faire un spectre de RMN, le produit a été analysée par spectrométrie de masse, ce qui a donné les résultats suivants :

- **Masse** : $m/z=245$, $m/z+1=246$, $m/z+29=274$, $m/z+41=286$, valeurs compatibles avec le 4-hydroxy-5-iodobenzonitrile.

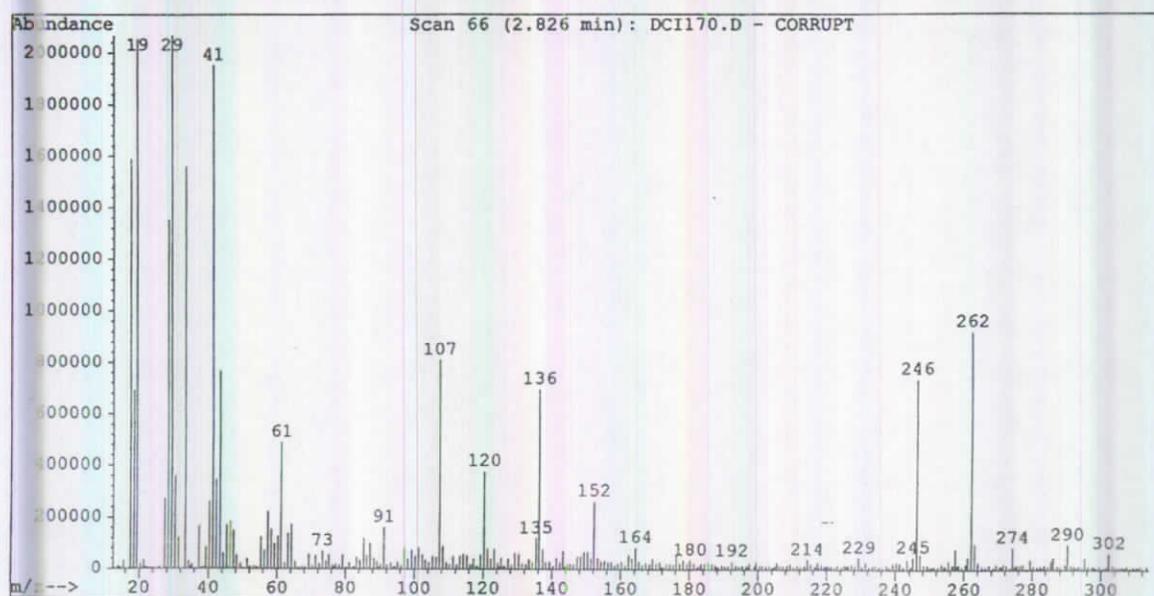
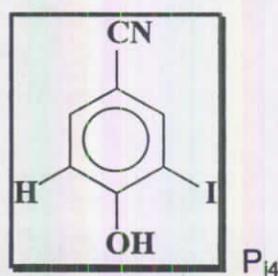


Figure III.16 : Spectre de masse du photoproduit P_{i4}

⇒ **Photoproduits P_{i0}**

- La spectrométrie de masse a montré qu'il ne s'agit pas d'un produit unique mais d'un mélange de produits qui correspondent probablement aux produits d'ouverture du cycle aromatique du composé trihydroxylé. Leurs temps de retentions laisse supposer qu'il s'agit même des produits très polaires voire ionisés (acides carboxylique aliphatiques).

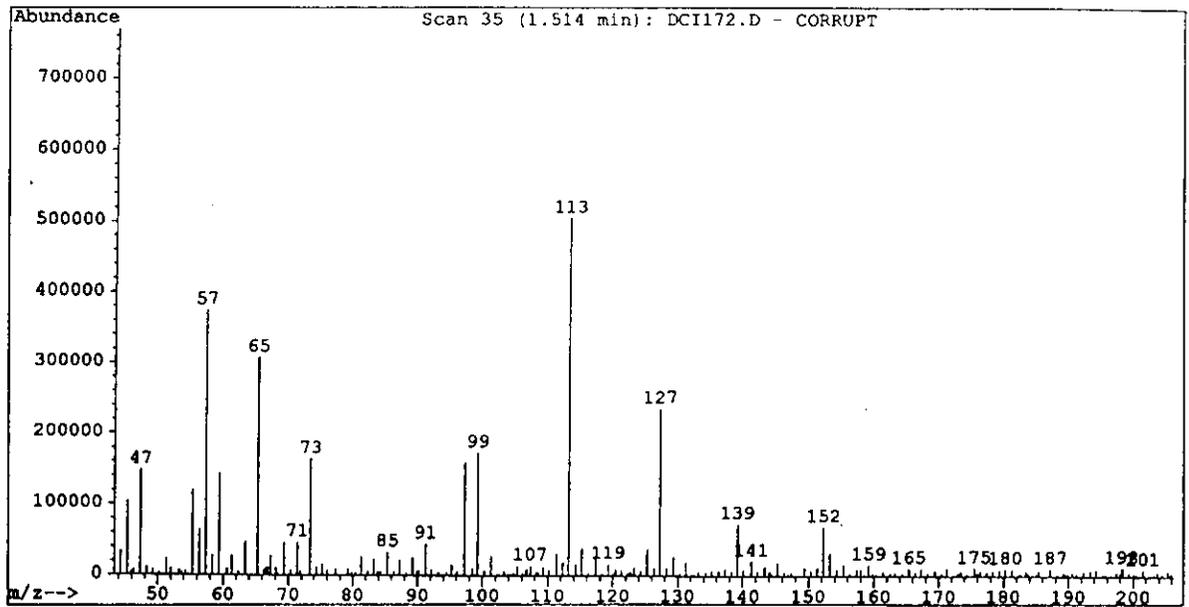


Figure III.17 : Spectre de masse des produits de la fraction P₁₀

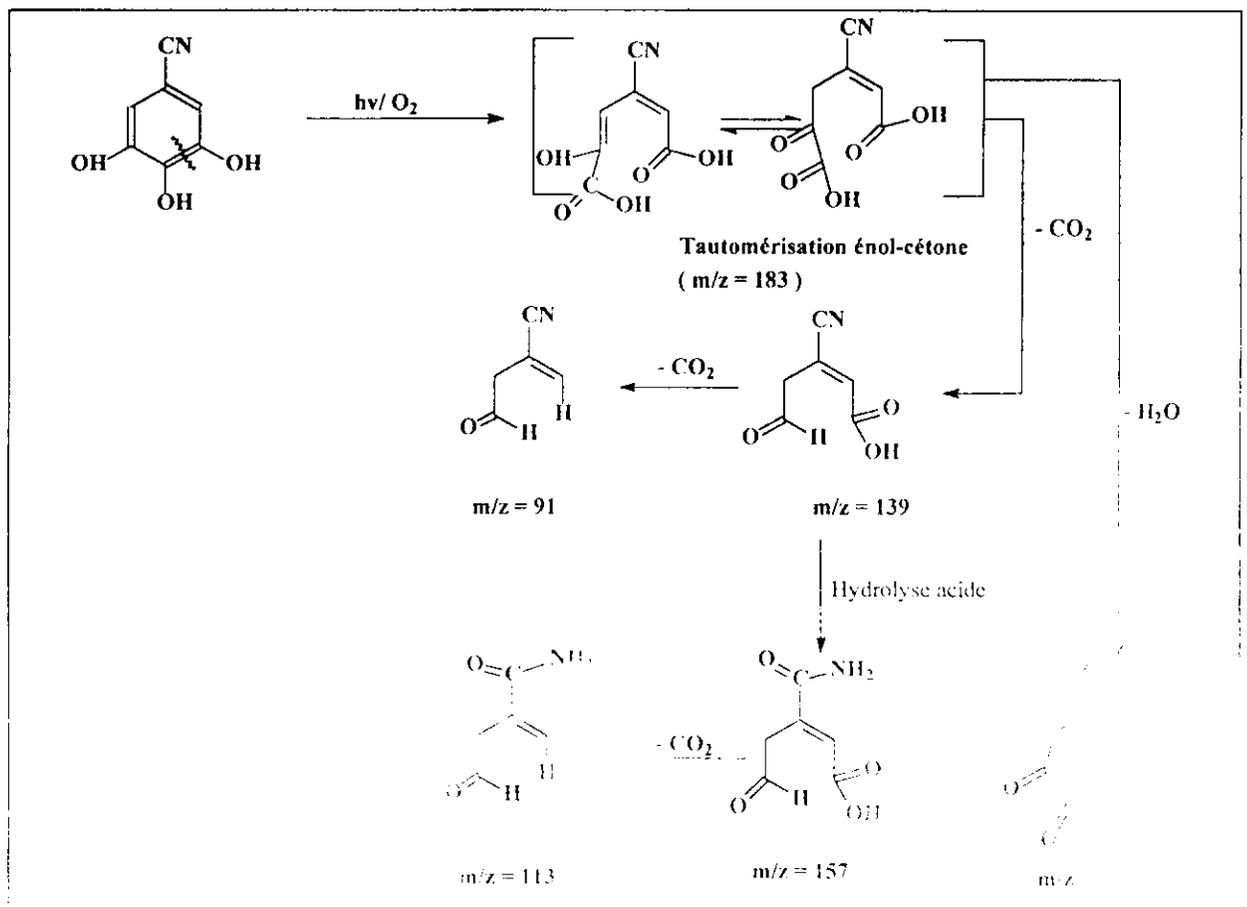


Schéma III.18 : Réaction de phototransformation de l'ioxynil en produits aromatiques de m/z 91, 113, 139 et 157

Nous avons essayé de faire une attribution de certains pics de masse à la lumière de la remarque précédente sans toutefois avoir des preuves très solides (voir mécanisme du schéma III.1).

b)- Chloroxynil

b.1- Analyse chromatographique

Le chromatogramme de la figure III.19 ressemble qualitativement à celui de l'ioxynil, cependant, on remarque une meilleure accumulation du produit de la monophotohydrolyse et que le produit trihydroxylé vient au deuxième rang.

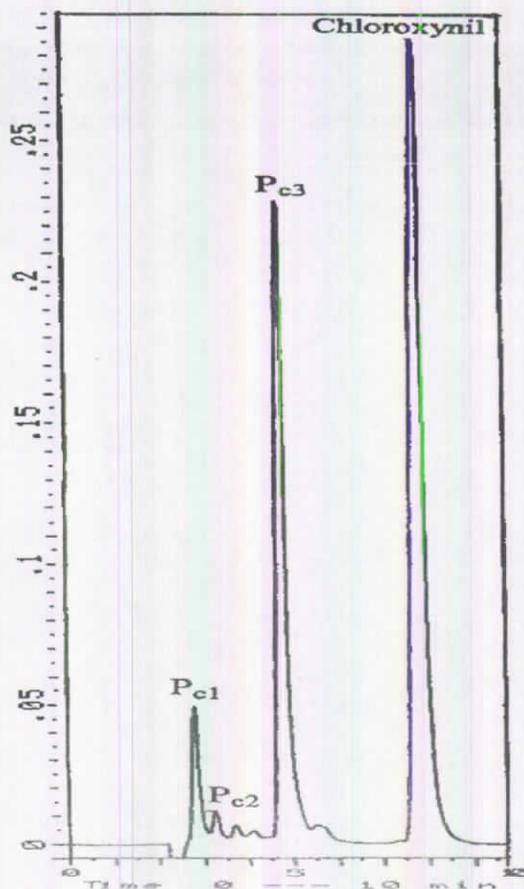


Figure III.19 : Chromatogramme HPLC d'une solution de Chloroxynil (10^{-4} M) sous forme anionique (pH=6.3) irradiée à 296 nm en milieu aéré. Détection à 216 nm.

a.2- Caractérisation des photoproduits :

⇒ Photoproduit P_{c1}

- Masse : $m/z=151$, $m/z+1=152$, $m/z+29=180$, $m/z+41=192$,

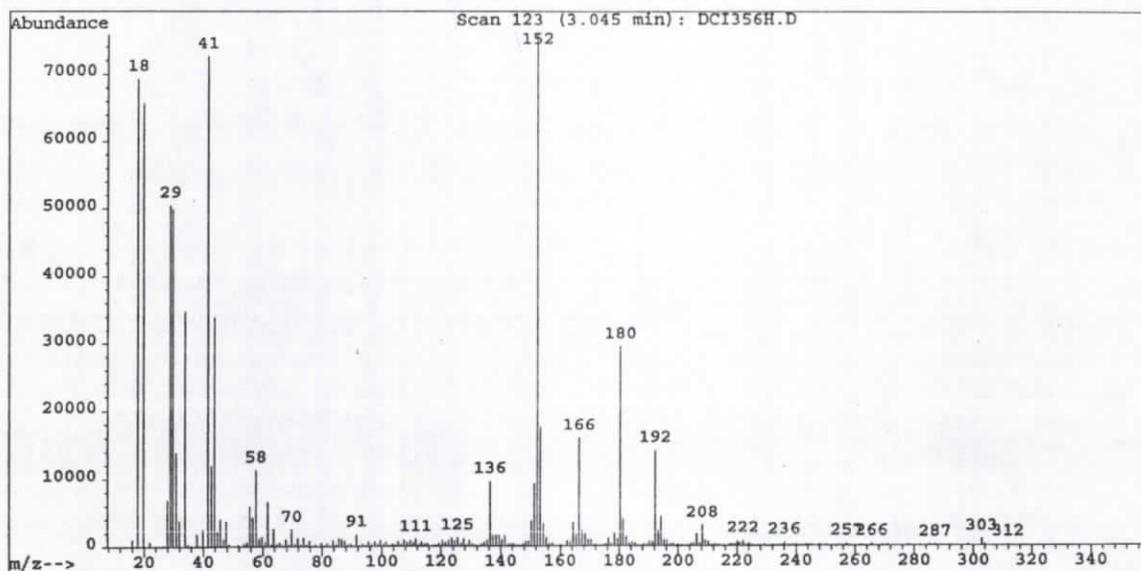


Figure III.20 : Spectre de masse du photoproduit P_{c1}

- RMN : montre un signal à 6,83 ppm correspondant aux deux protons équivalents du cycle benzénique. Ces données sont compatibles avec le 3,4,5-trihydroxybenzonnitrile.

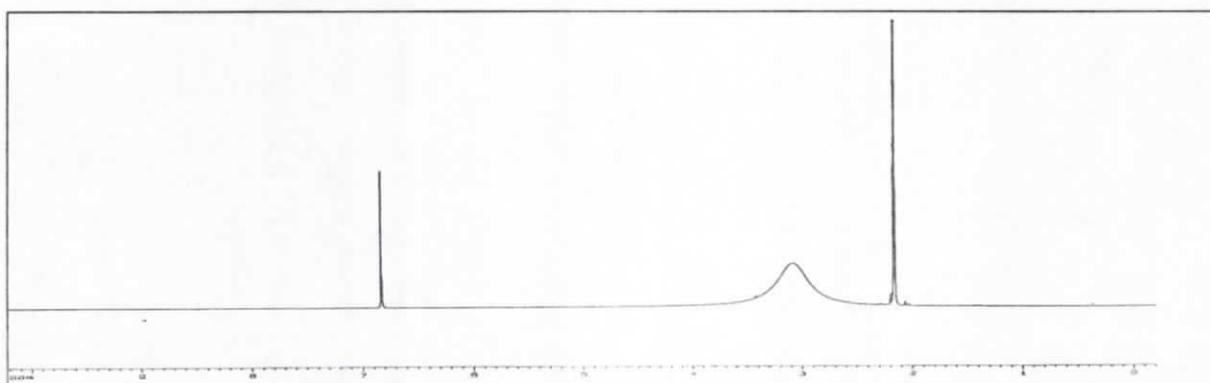


Figure III.21 : Spectre RMN 1H du photoproduit P_{c1}

⇒ Photoproduit P_{c2}

- Masse : $m/z=135$, $m/z+1=136$, $m/z+29=164$, $m/z+41=176$, données compatibles avec la structure de produit mixte d'oxydoréduction : le 3,4-dihydroxybenzonnitrile.

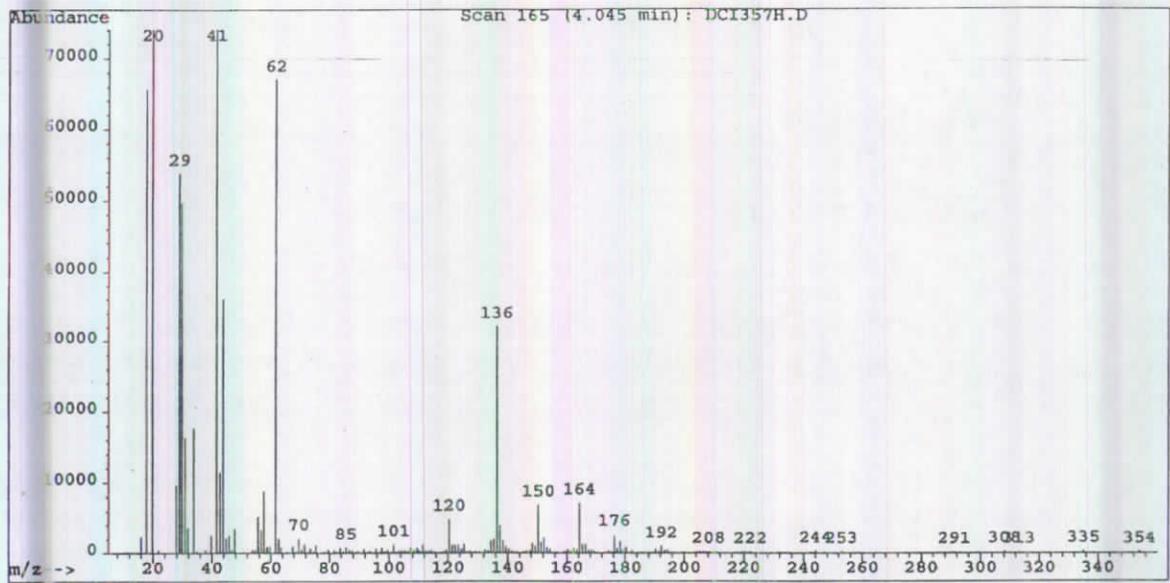


Figure III. 22 : Spectre de masse du photoproduit P₂

⇨ *Photoproduit P₃*

- Masse : $m/z=169$, $m/z+1=170$, $m/z+29=198$, $m/z+41=210$

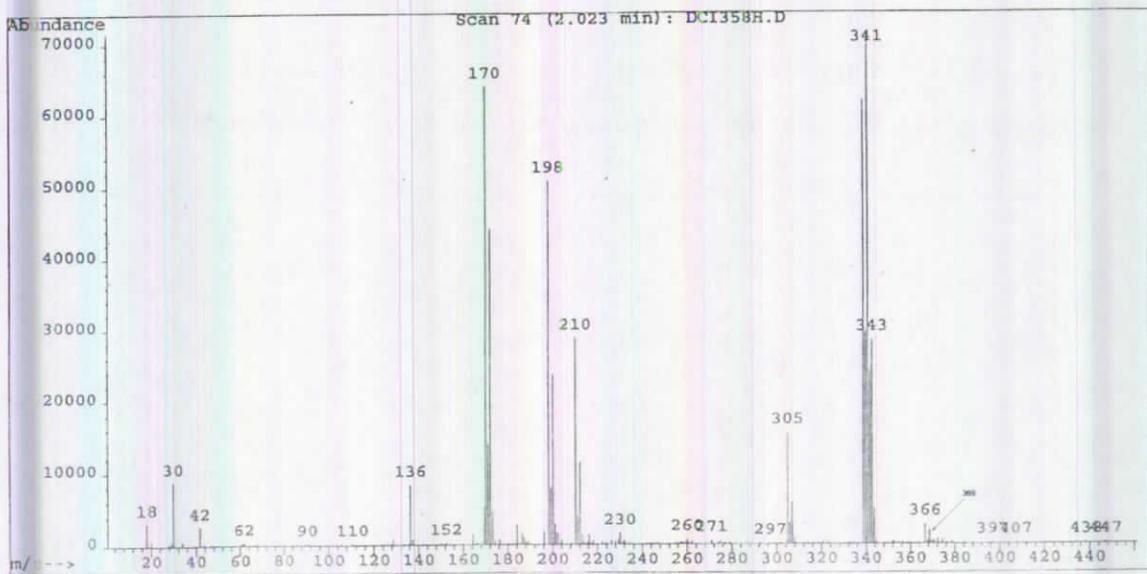


Figure III.23 : Spectre de masse du photoproduit P₃

- RMN : les deux protons aromatiques sont à 7.45 ppm (H6) et à 7.25 ppm (H2).

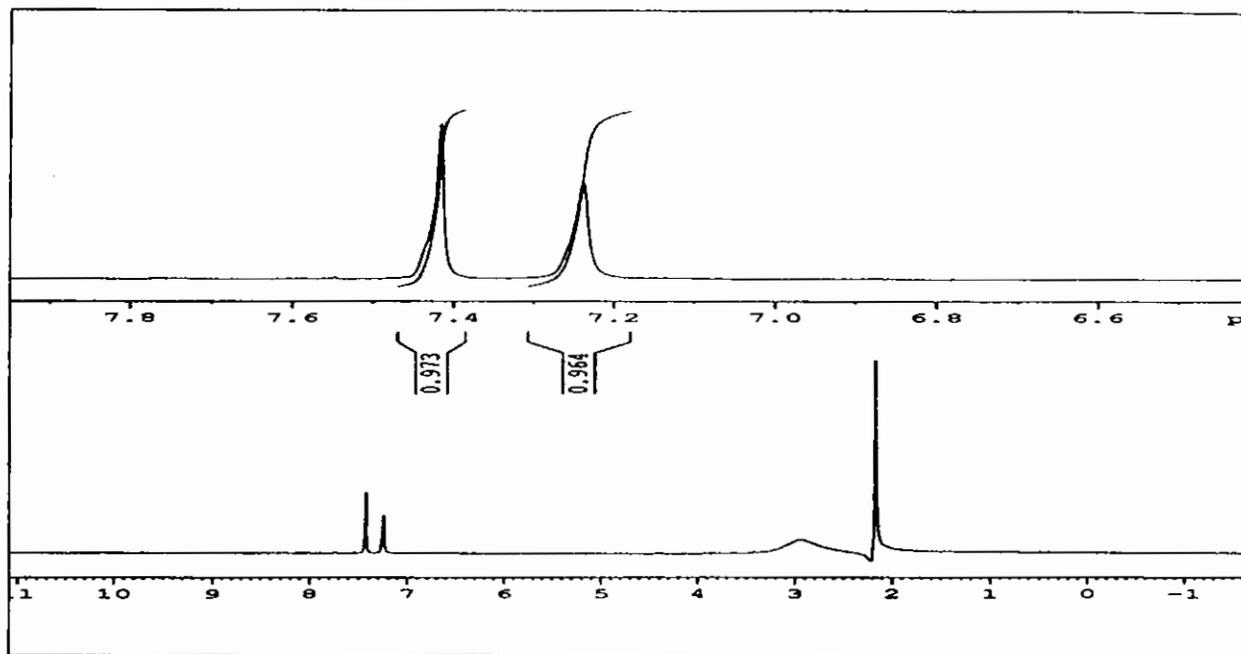
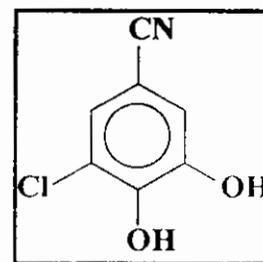


Figure III.24 : Spectre RMN 1H du photoproduit P_{c3}

La présence des pics $m/z = 170/172 ; 198/200 ; 210/212$ dédoublés montre bien qu'il s'agit d'un produit monochloré. Ces valeurs correspondent à $M+1, M+29$ et $M+41$ pour le 5-chloro-3,4-dihydroxybenzonnitrile. La masse 341 correspond au dimère protoné ($2M + 1$), ce qui résulte d'un problème de la technique de mesure.



P_{c3}

III.2.3- Etude cinétique

a)- Disparition à 296 ou 313 nm

Sur les courbes de disparition de chloroxynil (figure III.25) et de l'ioxynil (figure III.26) on constate une transformation voisine de 100% pour les deux substrats en moins de 200 s. La décroissance est bien exponentielle et correspond à une réaction du premier ordre. Les constantes de vitesse sont évaluées à $0,005$ et $0,004 \text{ min}^{-1}$ respectivement.

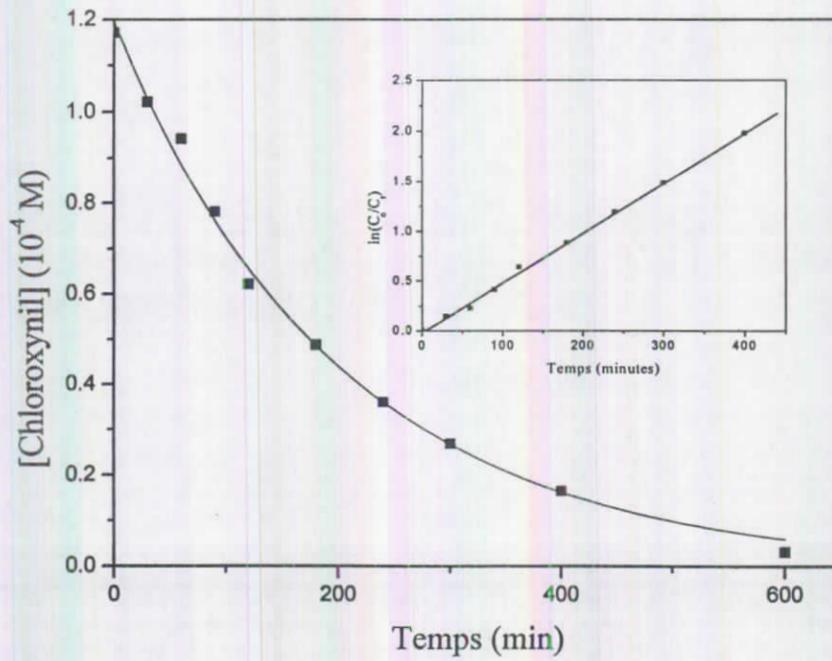


Figure III.25 : Evolution du chloroxynil irradié à 296 nm (insertion : détermination de l'ordre de la réaction)

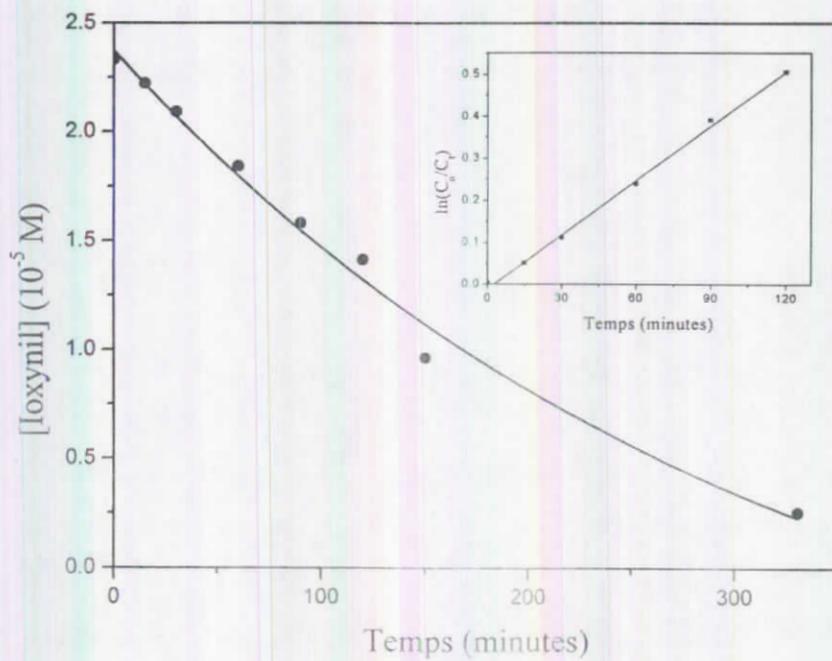


Figure III.26 : Evolution de l'Ioxynil à 313 nm (insertion : détermination de l'ordre de la réaction)

b)- Disparition à $\lambda > 275 \text{ nm}$

b.1- Dans l'eau pure

Dans des concentrations comparables, le chloroxynil disparaît plus vite que l'ioxynil avec une décroissance typique d'une cinétique du 1^{er} ordre ($k_i = 0.037$ et $k_c = 0.056 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2} = 19$ et $t_{c1/2} = 12 \text{ min}$) (figures III.27 et III.28).

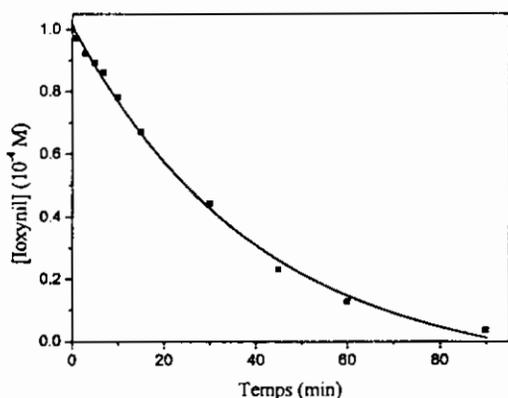


Figure III.27 : Evolution de l'ioxynil irradié en UV artificiel (275-265 nm)

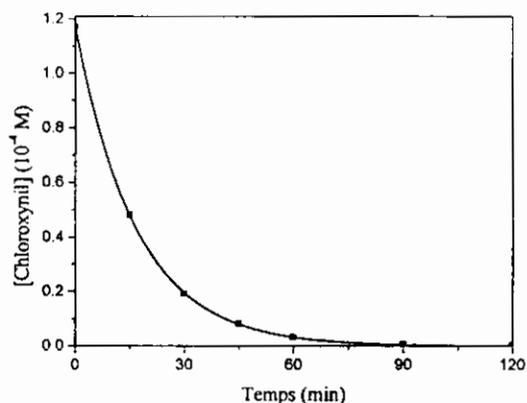


Figure III.28 : Evolution du chloroxynil irradié en UV artificiel (275-265 nm)

Ces résultats expérimentaux montrent que bien que la réaction de la photohydrolyse (réaction prédominante au début de la réaction) soit bimoléculaire, l'ordre global est égal à un, ce qui se justifie de la manière suivante : l'eau à la fois réactif et solvant du système, est en grand excès par rapport au chloroxynil (par exemple, $[\text{chloroxynil}] = 1,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ et $[\text{H}_2\text{O}] = 55,56 \text{ M}$ lorsque la réaction complète est terminée ; $[\text{chloroxynil}] \approx 0$ et $[\text{H}_2\text{O}] = 55,56 - 1,2 \times 10^{-4} = 55,559 \text{ M}$. Ainsi la diminution de l'eau apparaît très négligeable et l'on peut considérer que $[\text{H}_2\text{O}] = \text{Cte}$. La relation de Van't Hoff devient :

$$d[\text{chloroxynil}]/dt = k[\text{chloroxynil}] \times [\text{H}_2\text{O}] = k'[\text{chloroxynil}],$$

avec $k' = k \times [\text{H}_2\text{O}]$ = pseudo-constante d'ordre 1. On dit que la réaction a dégénérescence de l'ordre 1.

En ce qui concerne les produits de la transformation de l'ioxynil, il apparaît clairement sur la figure III.29 que le produit de la monoprotolyse est le produit photoprédominant au début de la réaction. Les autres produits, à savoir, le diacide, le monoacide et l'acide, sont des produits de transformation ultérieure.



Contrairement à l'ioxynil, le photoproduit de la double hydrolyse du chloroxynil (P_{c1}) est plus important que celui de la réduction (P_{c2}) (figure III.29).

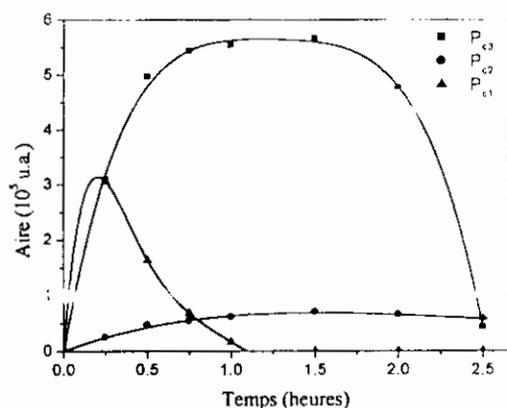


Figure III.29 : Evolution des photoproduits du chloroxynil irradié à $\lambda > 275$ nm.

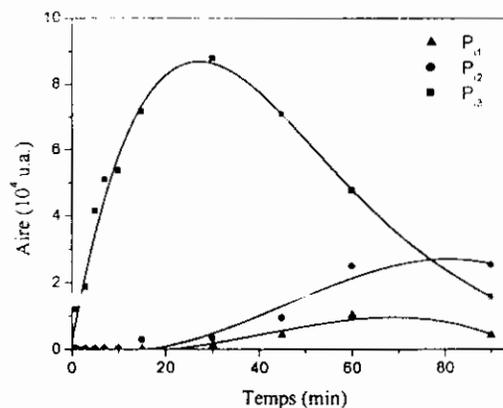


Figure III.30 : Evolution des photoproduits de l'ioxynil irradié à $\lambda > 275$ nm.

b.2- En présence des acides humiques

Une solutions $1,17 \times 10^{-4}$ M de chloroxynil a été irradiée en présence des acides humiques Aldrich (26 mg L^{-1}). Il peut être noter à partir de la figure III.31 que les acides humiques ont un effet inhibiteur sur la dégradation. Ce qui signifie qu'à cette concentration, leur effet écran l'emporte sur leur effet inducteur. Le même effet a été signalé par Kochany et *al.* (1991) sur la disparition du bromoxynil en présence des acides fulviques.

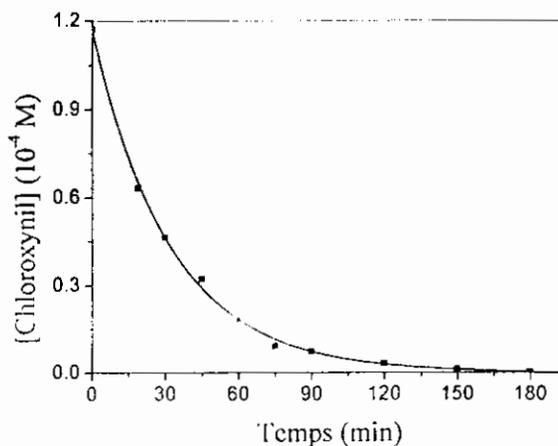


Figure III.31 : Evolution de la concentration du chloroxynil irradié en UV artificiel (275-265 nm) en présence des acides humiques Aldrich (26 mg/L)

Comme prévu, la présence des acides humiques induit une meilleure production du photoproduit de la réduction (P_{c2}) (figure III.32).

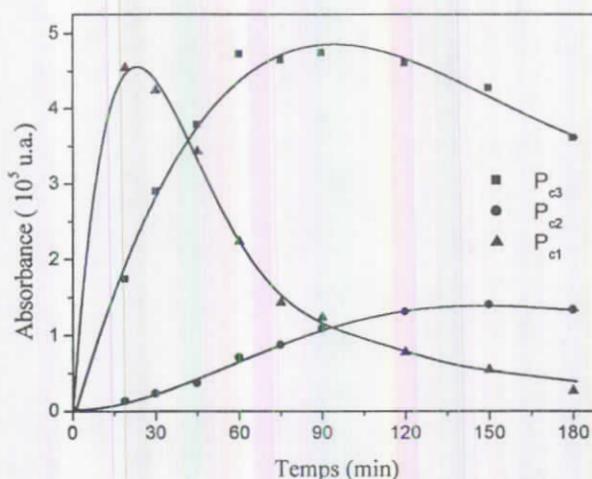


Figure III.32 : Evolution des photoproduits du chloroxynil irradié à $\lambda > 290 \text{ nm}$ en présence des acides humiques

c)- Disparition en conditions naturelles

c.1- Dans l'eau pure sous irradiation solaire

Des solutions de chloroxynil $1,17 \times 10^{-4} \text{ M}$ et d'ioxynil $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ont été exposées au soleil dans des tubes horizontaux, comme décrit dans le chapitre II (§ II.5.2.c) au mois d'avril (ioxynil) ou juillet (chloroxynil) entre 10 h et 15 h GMT pendant des journées à ciel dégagé. Des prélèvements ont été effectués toutes les demi-heures et les échantillons ont été analysés par CLHP. Les résultats apparaissent sur les figures III.33-III.36. Dans les deux cas, la décroissance de l'herbicide correspond à une cinétique apparente d'ordre 1 avec $k_c = 0.0056$ et $k_i = 0.012 \text{ min}^{-1}$). Les cinétiques d'apparition des deux photoproduits P_1 et P_2 sont clairement celles d'une formation secondaire alors que le produit majoritaire de la monophotohydrolyse est un photoproduit primaire pour les deux composés (figures III.34-III.35).

Par ailleurs, la succession qualitative des photoproduits est identique à celle observée dans les conditions d'irradiation artificielle. La disparition en lumière artificielle est beaucoup plus rapide que celle en irradiation solaire: à titre d'exemple il faut environ plus de deux heures d'exposition à lumière solaire pour produire les mêmes effets que les six lampes à 310 nm ont produits en 19 minutes. Cette différence est probablement due, d'une part à la nature

diffuse de l'énergie solaire et d'autre part à la distribution spectrale plus favorable à la réaction dans le cas des 6 lampes.

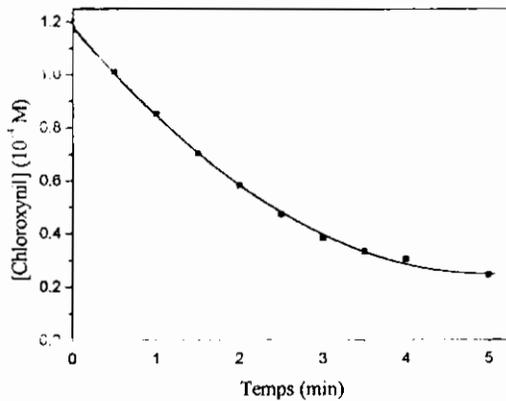


Figure III.33 : Evolution de la concentration du chloroxynil en solution aqueuse sous irradiation naturelle

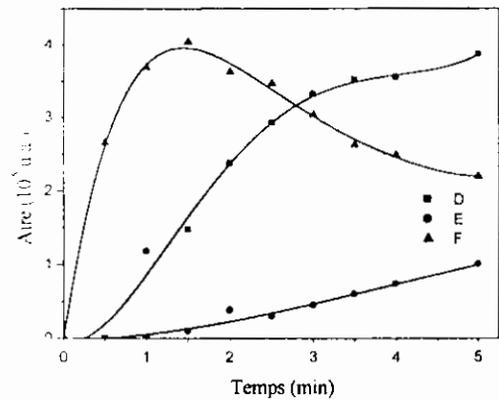


Figure III.34 : Evolution des photoproduits du chloroxynil irradié en lumière naturelle

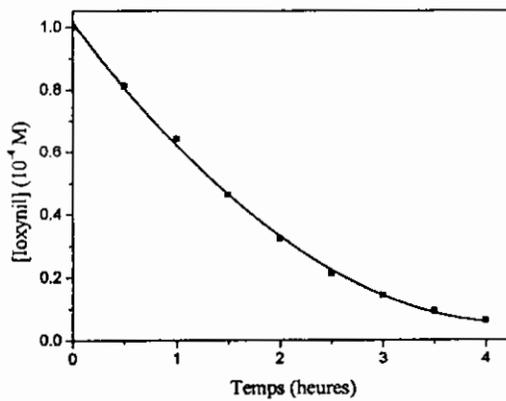


Figure III.35 : Evolution de la concentration de l'ioxynil en solution aqueuse sous irradiation naturelle

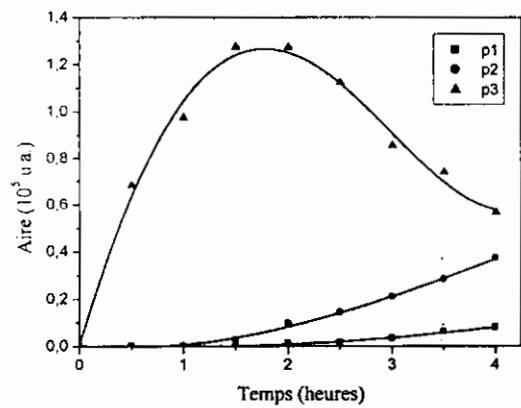


Figure III.36 : Evolution des photoproduits de l'ioxynil irradié en lumière naturelle au mois de juin

c.2- Dans une eau de barrage sous irradiation solaire

Des solutions de chloroxynil $1,17 \times 10^{-4}$ M et de l'ioxynil $9,7 \times 10^{-5}$ M ont été exposées à l'irradiation solaire cette fois-ci dans une eau naturelle (pH = 7,2). Dans toutes les expériences, l'exposition a été faite de 10 heures GMT à 15 heures GMT pendant des journées à ciel dégagé. On constate donc que les substances contenues dans l'eau naturelle n'ont qu'une très faible influence sur la transformation photochimique du chloroxynil et de l'ioxynil.

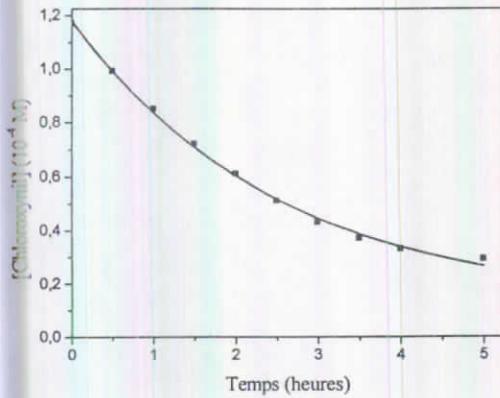


Figure III.35 : Disparition du chloroxynil dans une eau de barrage sous irradiation naturelle au mois de juin

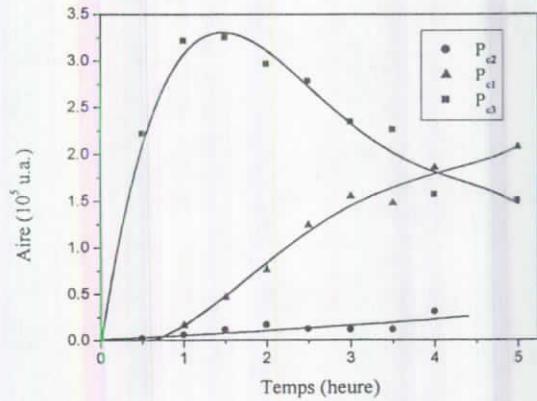


Figure III.36 : Evolution des photoproduits du chloroxynil dans une eau de barrage sous irradiation solaire

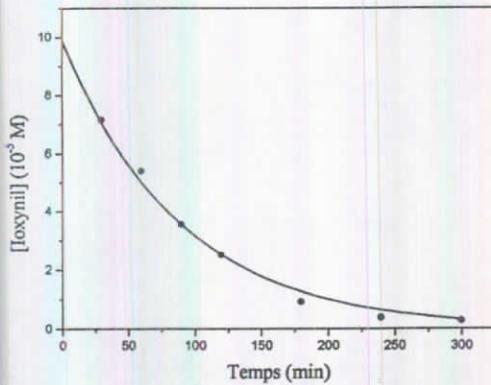


Figure III.37 : Disparition de l'ioxynil dans une eau de barrage (pH=7.2) sous irradiation naturelle au mois de juin

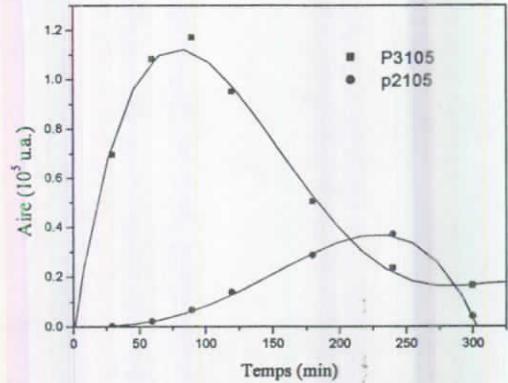


Figure III.38 : Evolution des photoproduits de l'ioxynil dans une eau de barrage sous irradiation solaire

a.3- Dosage des ions iodure :

Après équilibrage de l'appareil avec des solutions étalons de NaI, un dosage par CLHP à détection UV-visible des ions iodure libérés au cours de la transformation de l'ioxynil, a été effectué à partir des solutions $1,1 \times 10^{-4}$ M d'ioxynil irradiées dans l'enceinte à 6 lampes à 310 nm ou sous irradiation en lumière naturelle. Les courbes de la figure (III.39) donnent le rapport des concentrations des ions iodure formés à la concentration en ioxynil disparu au cours du temps.

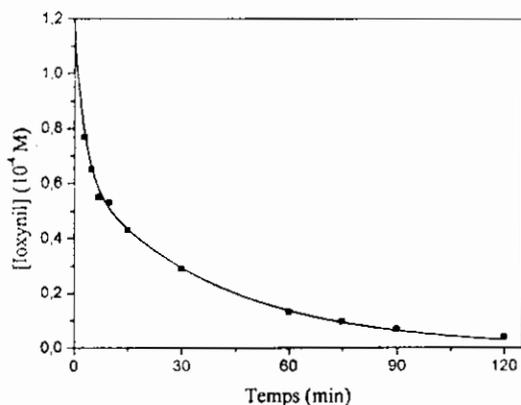


Figure III.40 : Evolution de la concentration de l'ioxynil (10^{-4} M) irradié à $\lambda > 290$ nm en solution aqueuse à 5 % de méthanol

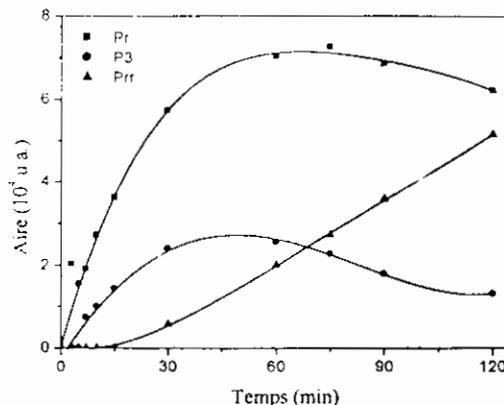


Figure III.41 : Evolution des photoproduits d'une solution 10^{-4} M d'ioxynil à 5 % de méthanol

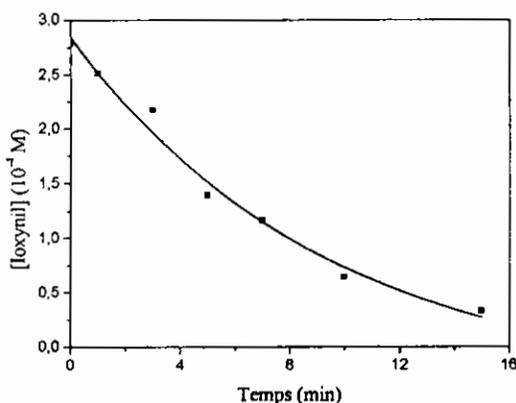


Figure III.42 : Evolution de la concentration de l'ioxynil (10^{-4} M) irradié à $\lambda > 290$ nm en solution méthanolique

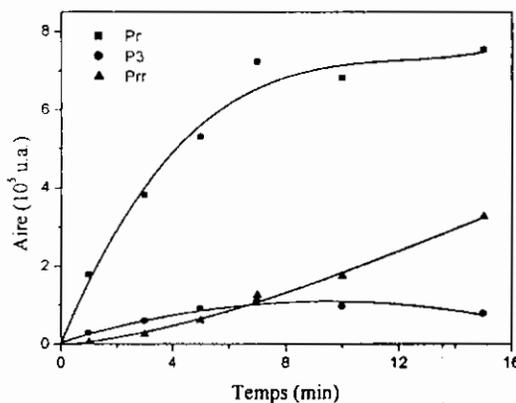


Figure III.43 : Evolution des photoproduits d'une solution 10^{-4} M d'ioxynil dans le méthanol pure

III.4- MECANISME REACTIONNEL ET DISCUSSION

Il peut être supposé à partir de l'analyse par HPLC que la monophotohydrolyse est la voie majoritaire de la phototransformation de l'ioxynil et du chloroxyynil en solution aqueuse. Ceci est confirmé par le fait que les produits P₁₃ et P₆₃ ont été isolés en plus grandes quantités que les autres photoproduits. Le même phénomène a déjà été signalé dans le cas du bromoxyynil (Machado et al., 1995). Cette réaction est expliquée par un mécanisme hétérolytique impliquant les scissions, probablement concertées, d'une liaison C-halogène et d'une molécule d'eau comme cela a été suggéré auparavant avec les 3-chlorophénol (Boule et al.,

III.3- COMPORTEMENT PHOTOCHEMIQUE DE L'IOXYNIL EN SOLUTION METHANOLIQUE

Dans le but de mettre en évidence l'effet de solvant sur le comportement photochimique de l'ioxynil, nous avons irradié une solution de 10^{-4} M dans du méthanol pur ou dans un mélange (eau + 5 % méthanol) dans le dispositif à 6 lampes.

L'analyse par HPLC montre un changement qualitatif dans le chromatogramme comparé à celui d'une solution aqueuse irradiée dans les mêmes conditions.

Quatre photoproduits ont pu être identifiés par leur temps de rétention, leurs spectres UV et leurs spectres de masse par ionisation chimique au méthane sur un mélange brut. L'identification de P₅ a été faite grâce à sa masse et le spectre UV de sa forme moléculaire par comparaison à un spectre du produit authentique (Tableau III.3).

Tableau III.3 : caractéristiques chromatographiques des quatre photoproduits

Composé	Pi ₂	Pi ₅	Pi ₃	Pi ₄
Temps de rétention t _R (min)	3,66	4,31	6,74	7,72
λ _{max} (nm)	208,7	247,4	226,2	225,1
(Forme moléculaire)	253,3		259,2	252,1
	289,9		épaulement (vers 300 nm)	287,5

A 5 % de méthanol la réaction de la photohydrolyse et celle de la photoréduction sont comparables.

Dans le cas du méthanol pur, la photoréduction devient quasiment prédominante et P₁₄ devient nettement le produit majoritaire suivi de P₅.

Le fait de trouver de faibles quantités de produit d'hydrolyse dans le méthanol pur peut être attribué à des traces d'eau dans ce solvant.

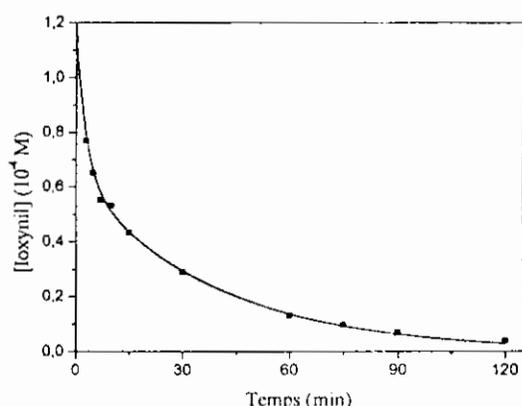


Figure III.40 : Evolution de la concentration de l'ioxynil (10^{-4} M) irradié à $\lambda > 290$ nm en solution aqueuse à 5 % de méthanol

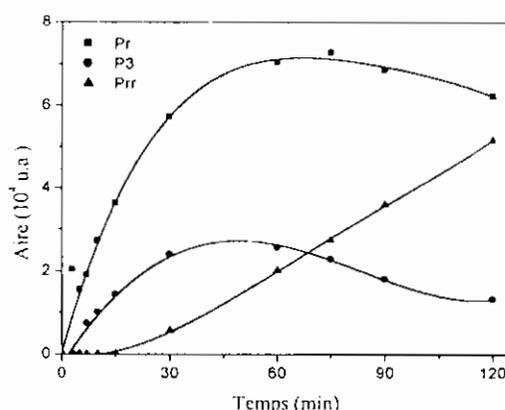


Figure III.41 : Evolution des photoproduits d'une solution 10^{-4} M d'ioxynil à 5 % de méthanol

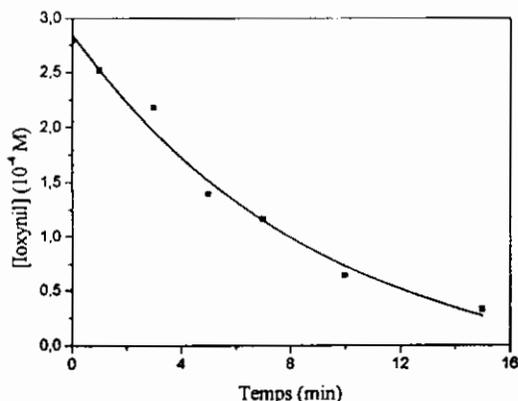


Figure III.42 : Evolution de la concentration de l'ioxynil (10^{-4} M) irradié à $\lambda > 290$ nm en solution méthanolique

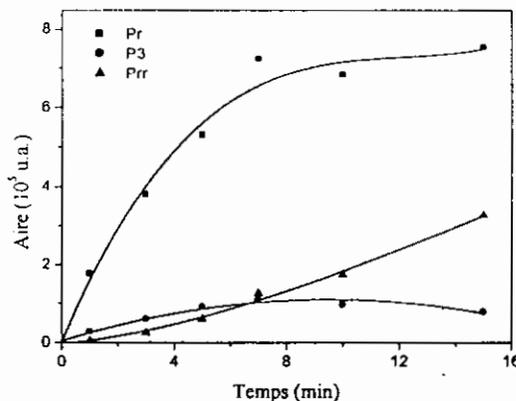


Figure III.43 : Evolution des photoproduits d'une solution 10^{-4} M d'ioxynil dans le méthanol pure

III.4- MECANISME REACTIONNEL ET DISCUSSION

Il peut être supposé à partir de l'analyse par HPLC que la monophotohydrolyse est la voie majoritaire de la phototransformation de l'ioxynil et du chloroxynil en solution aqueuse. Ceci est confirmé par le fait que les produits P_{13} et P_{c3} ont été isolés en plus grandes quantités que les autres photoproduits. Le même phénomène a déjà été signalé dans le cas du bromoxynil (Machado et *al.*, 1995). Cette réaction est expliquée par un mécanisme hétérolytique impliquant les scissions, probablement concertées, d'une liaison C-halogène et d'une molécule d'eau comme cela a été suggéré auparavant avec les 3-chlorophénol (Boule et *al.*,

1982), 3,4- et 3,5-dichlorophénols (Boule et *al.*, 1984). Il est digne d'être remarqué que les 2-halophénols, en particulier les 2-chlorophénols, réagissent différemment et conduisent à la photocontraction du cycle aromatique, particulièrement quand ils sont sous forme anionique (Boule et *al.*, 1982, 1984 et 2002 ; Guyon et *al.*, 1984). Ceci est probablement dû à l'effet électro-attracteur du groupement cyano qui inhibe la libération d'un ion halogénure quand elle n'est pas assistée par une scission hétérolytique d'une molécule d'eau.

La formation du 3,4,5-trihydroxybenzonnitrile à partir du 5-halogéno-3,4-dihydroxybenzonnitrile résulte du même mécanisme (schéma III.2).

► Formation de P_{13} (P_{e3}) et P_{11} (P_{e1})

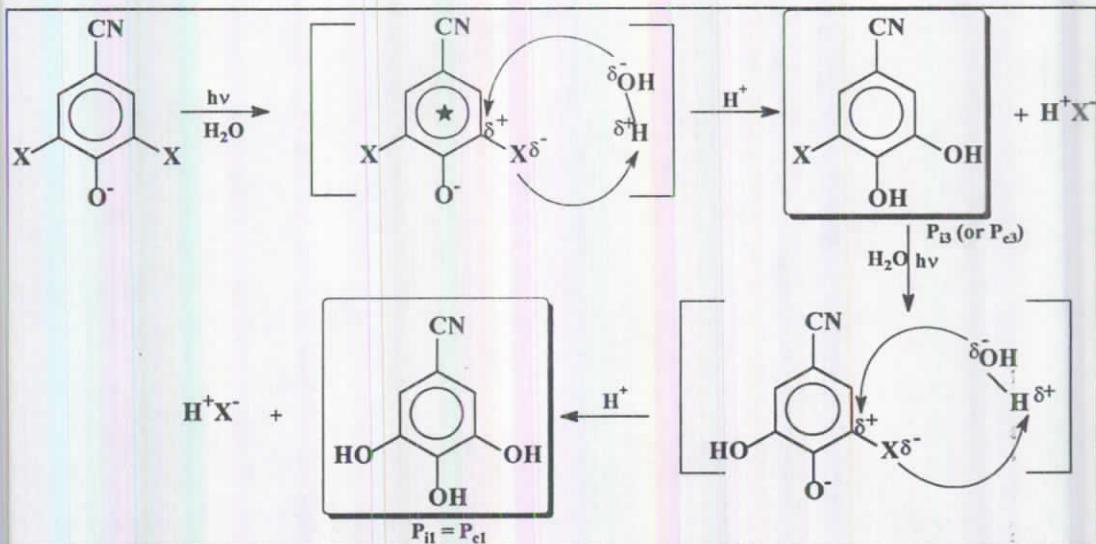


Schéma III.2 : Mécanisme de formation de P_1 et P_3

La photoréduction de l'ioxynil dans le méthanol est attribuée à un transfert d'électron du méthanol vers l'ioxynil à son état excité (schéma III.3). Une réaction similaire est prévisible avec le bromoxynil et le chloroxynil. La photoréduction en monohalogéno-4-hydroxybenzonnitrile est une voie minoritaire. En absence de toute matière organique ajoutée, le 5-halo-3,4-dihydroxybenzonnitrile est supposé jouer le rôle d'agent réducteur. Il est actuellement connu que la propriété réductrice des aromatiques hydroxylés augmente avec le nombre des groupements hydroxyle sur le cycle.

► Formation de $P_{i4}(P_{c4})$ et $P_{i2}(P_{c2})$

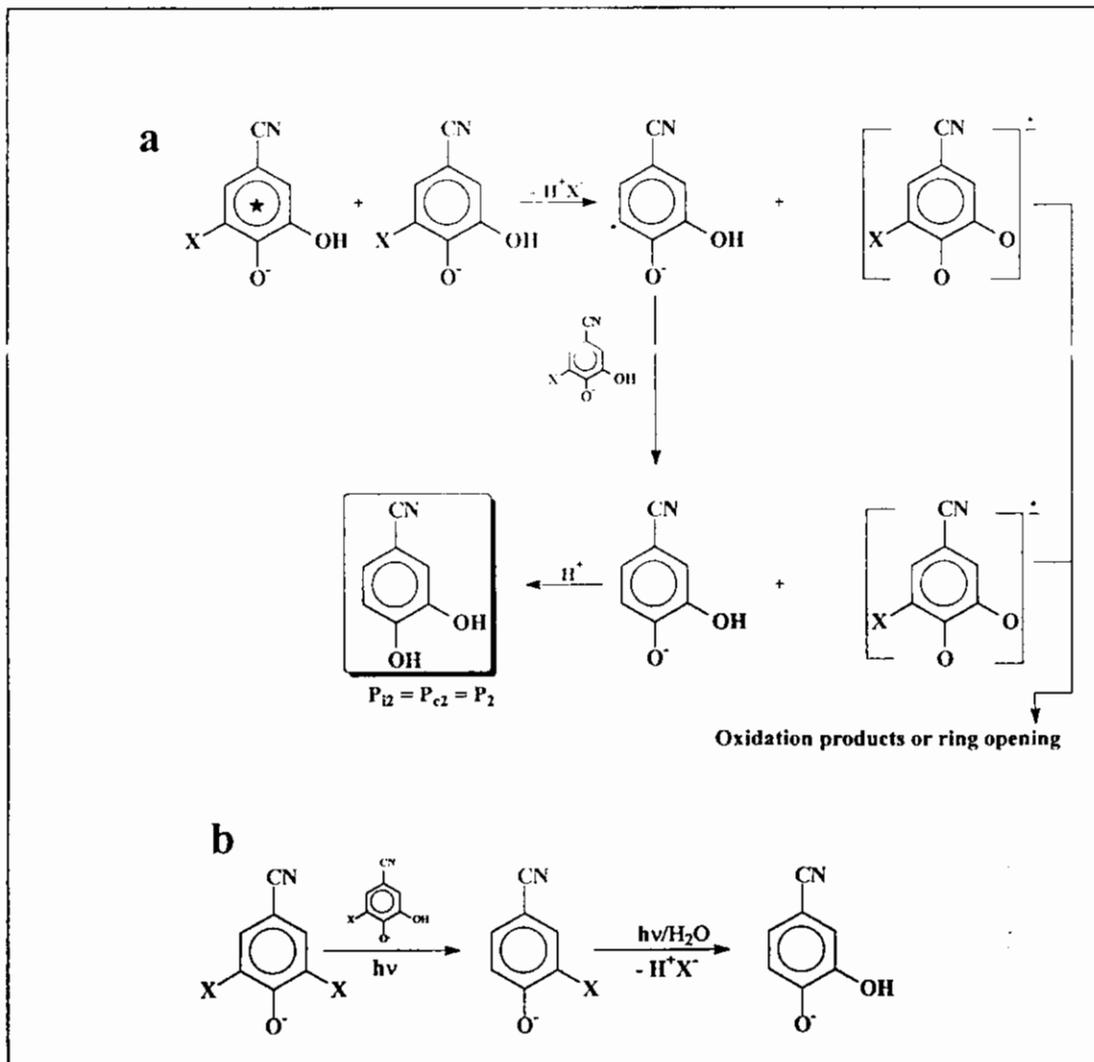


Schéma III.3 : Mécanisme de formation de P_{x4} et P_{x2}

a) voie a de la réduction

b) voie b de la réduction

Le 3,4-dihydroxybenzonnitrile peut se former aussi bien par la réduction de 5-iodo-3,4-dihydroxybenzonnitrile et de 5-chloro-3,4-dihydroxybenzonnitrile (schéma III.4) ou par la photohydrolyse du 3-halo-4-hydroxybenzonnitrile (schéma). La voie a nous a semblé la plus probable du moment où le 3-iodo-4-hydroxybenzonnitrile (P_{i4}) et le 3-chloro-4-hydroxybenzonnitrile (P_{c4}) ne sont que des intermédiaires très minoritaires dans le milieu réactionnel.

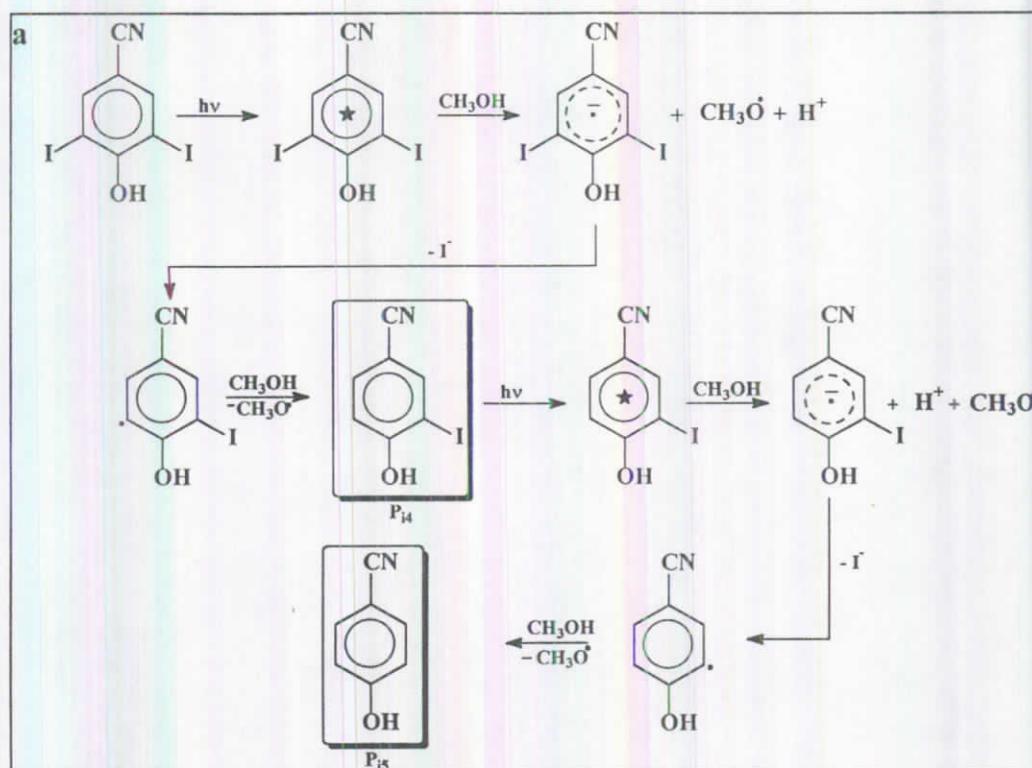
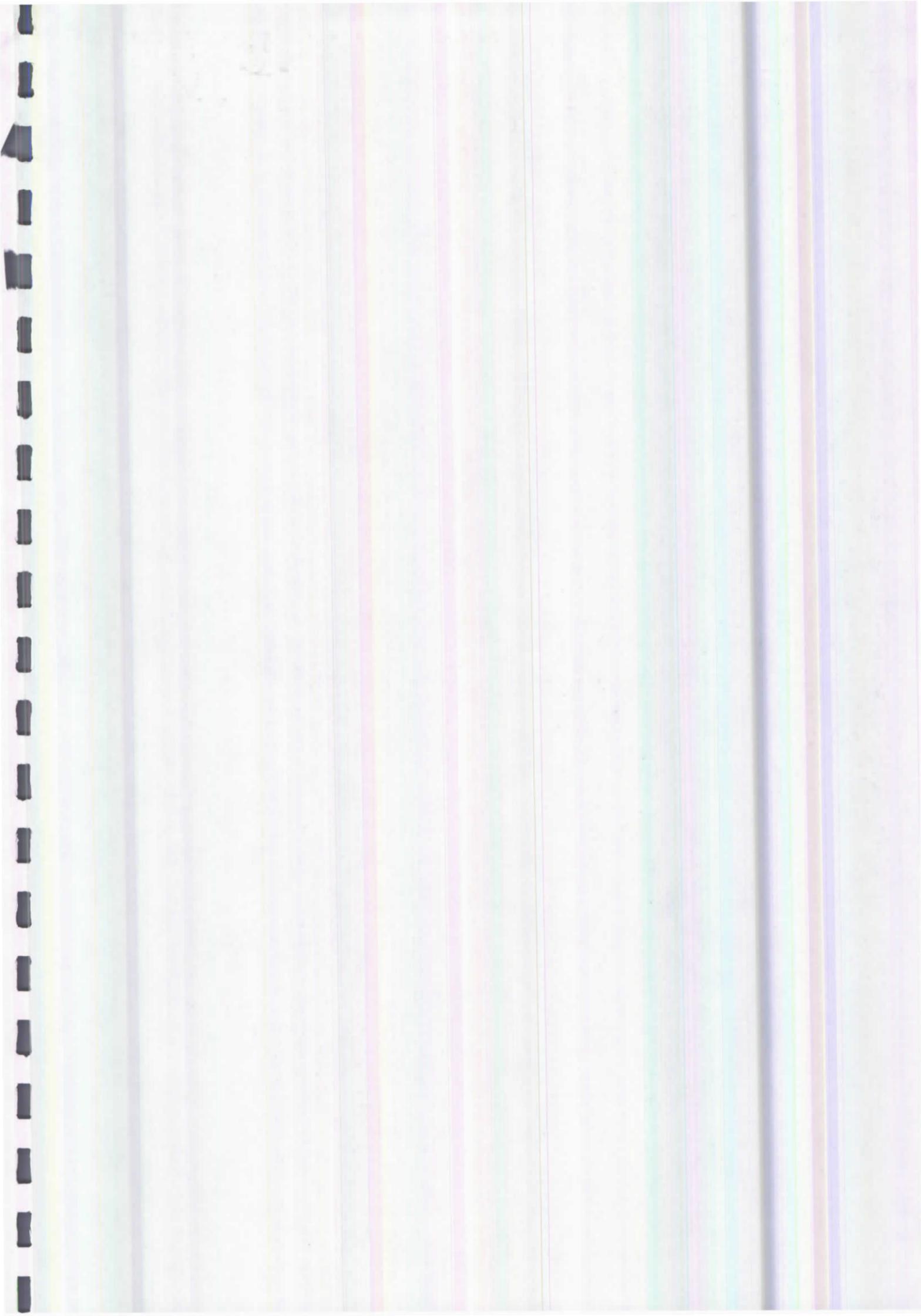


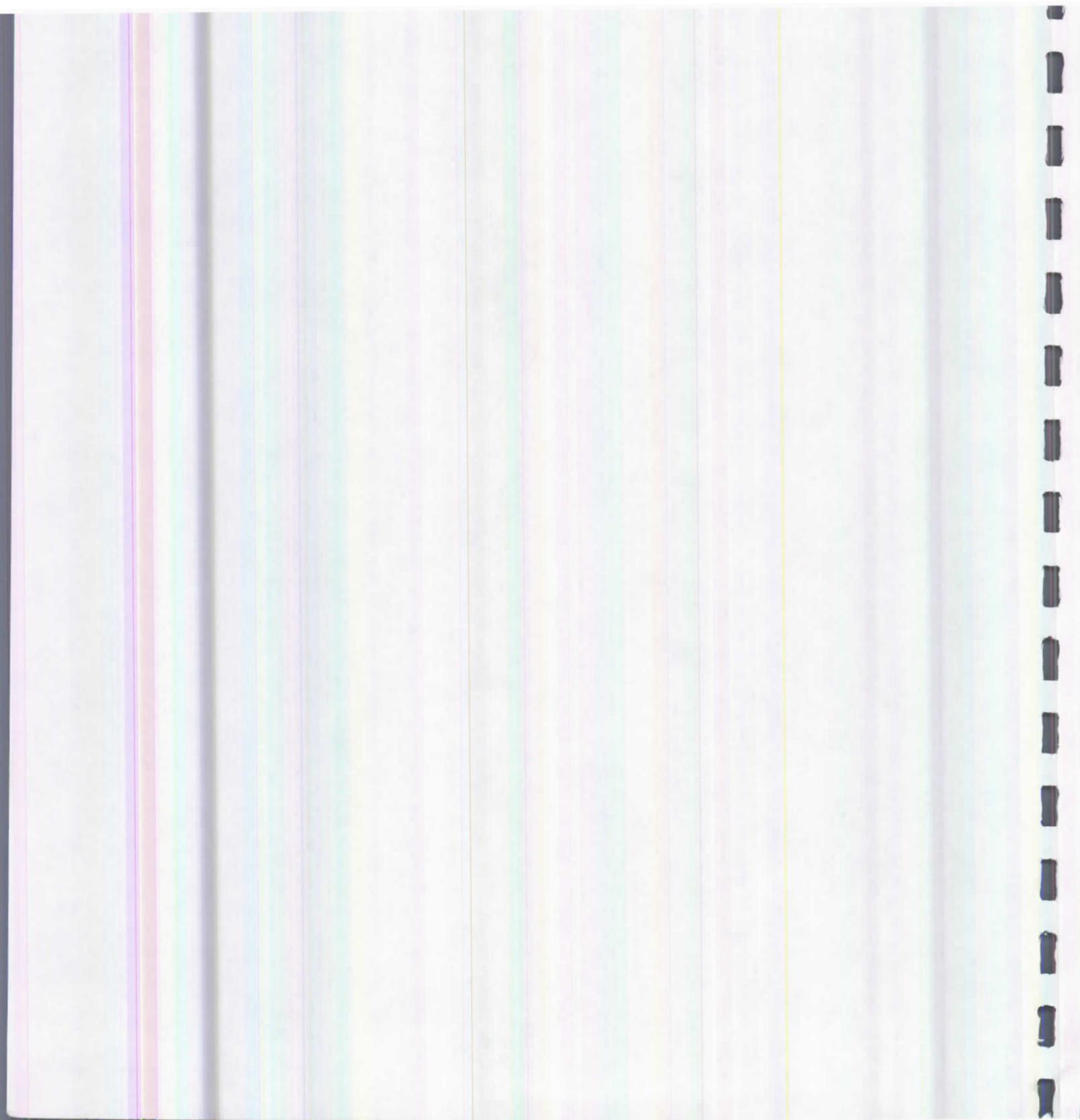
Schéma III.4 : Mécanisme de formation de P_{14} et P_5 en solution alcoolique

Le fait que la formation du 3,4-dihydroxybenzonitrile (P_2) soit plus facile avec le 5-iodo-3,4-dihydroxybenzonitrile qu'avec le 5-chloro-3,4-dihydroxybenzonitrile pourrait être attribué à la polarité plus basse de la liaison C-I comparée à celle de la liaison C-Cl. Par contre le 5-chloro-3,4-dihydroxybenzonitrile est plus particulièrement photohydrolysé que photoréduit. Le comportement photochimique global des 3,5-dihalogéno-4-hydroxybenzonitrile en présence d'eau ou d'alcool est résumé sur le schéma III.5.



CHAPITRE IV

LES AZOLES PAR LES
BOUCHES FONGIQUES



Des études réalisées au laboratoire ont montré la capacité des souches de Rhodocoques, en particulier *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus erythropolis* de métaboliser avec succès plusieurs benzothiazoles (BT, OBT, MBT, ABT, BT_{SO}₃).

Des incubations tests en conditions stériles ont été réalisées avec chacune de ces deux souches en présence des concentrations croissantes en MBTU (0,07; 0,13 et 0,25 mM). L'évolution de la biotransformation du composé a été suivie par CLHP. Les courbes de la figure IV.0 ne montrent pas des variations significatives dans le cas de l'une ou l'autre des deux souches bactériennes testées. Il semble donc que la chaîne urée confère au méthabenzthiazuron une plus grande résistance à l'attaque par ces bactéries.

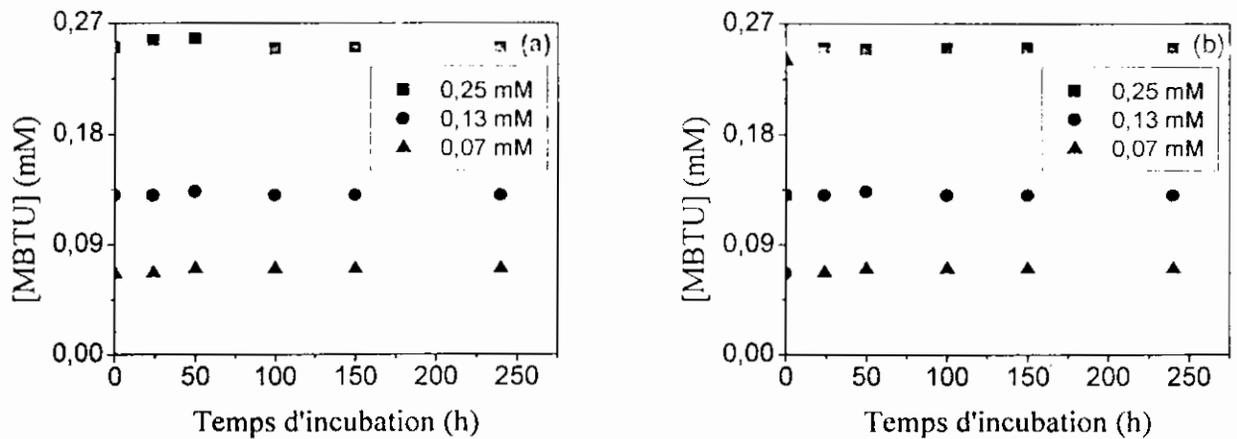


Figure IV.0 : Suivi de la biodégradation du méthabenzthiazuron en présence de 50 g.L⁻¹ de :
a) *Rhodococcus rhodochrous*
b) *Rhodococcus erythropolis*

De ce fait, nous avons décidé par la suite d'attaquer notre herbicide par des souches fongiques à savoir *Aspergillus niger* et *Cunninghamella elegans*.

IV.A – *Aspergillus niger*

IV.A.1- Biodégradation du méthabenzthiazuron (MBTU)

A.1.1- Etude analytique :

Les cellules au repos métabolique d'*Aspergillus niger* (5 g de biomasse humide) sont incubées avec des solutions de concentration croissantes de MBTU (0,07, 0,13 et 0,25 mM) dans le tampon MMK dans des conditions stériles à 30°C et 200 rpm. Le suivi cinétique de disparition du MBTU est analysé par CLHP inverse (figure IV.1).

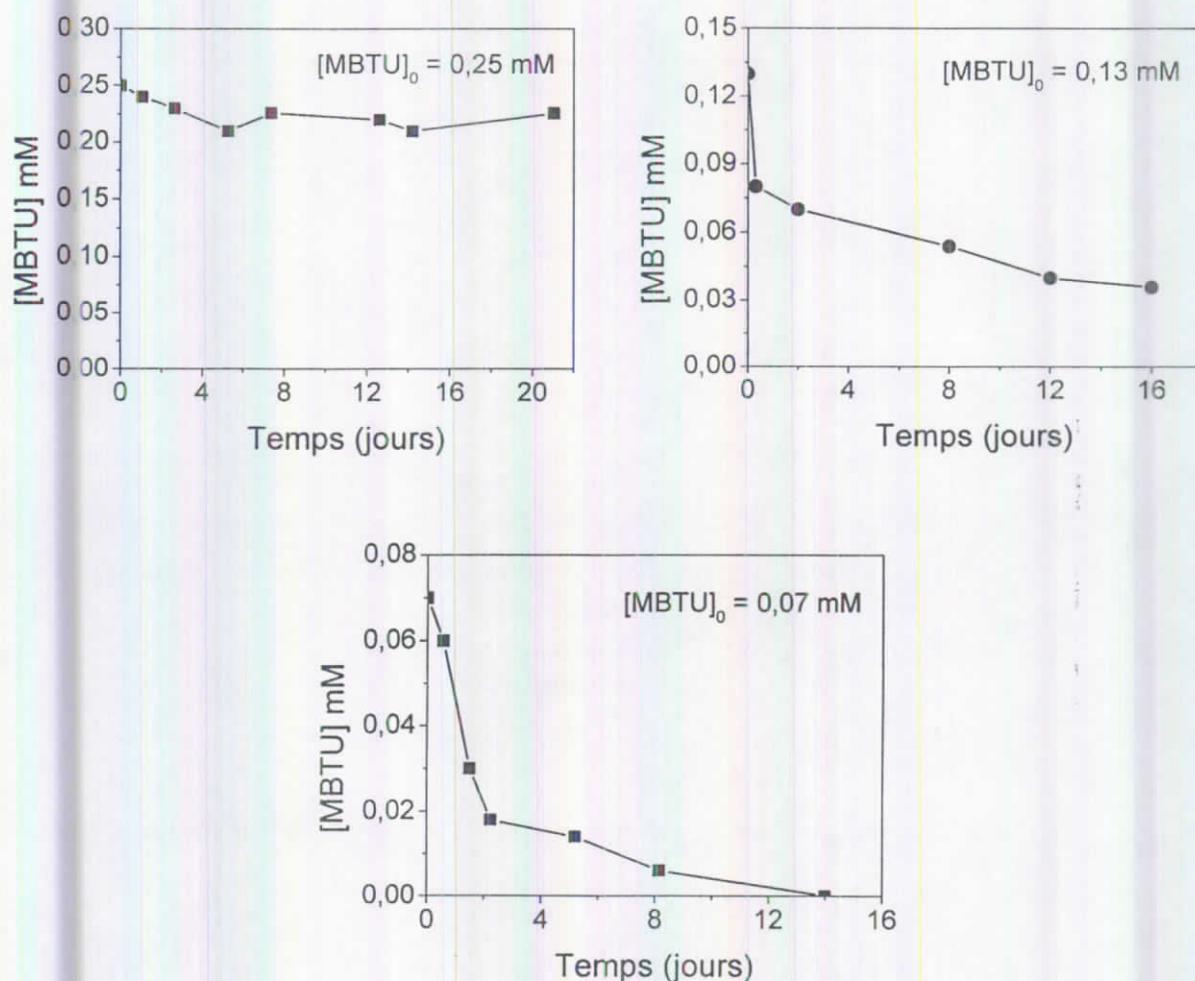


Figure IV.1 : Cinétiques de dégradation de MBTU avec *A. niger* (50 g/L) en fonction de la concentration

La vitesse de dégradation dépend de la concentration en MBTU. Plus la concentration est élevée plus la vitesse de biotransformation est faible. Ainsi, il faut deux semaines pour une

disparition totale du MBTU à 0,07 mM alors que la dégradation est quasi-nulle pour la concentration 0,25 mM. Cette transformation est donc bien dose-dépendante. On constate également que la concentration en xénobiotique influence considérablement le temps de latence. Celui-ci est supérieur à 24 heures lorsque la concentration en MBTU atteint 0,25 mM, alors qu'il est presque nul lorsque la concentration est de 0,07 mM (apparition d'une très faible quantité de métabolites après seulement une heure d'incubation).

Sur les chromatogrammes CLHP (figure IV.2), on peut noter l'apparition de deux nouveaux pics : un très grand à 3,4 min et un dont l'aire reste très faible à 4,1 min.

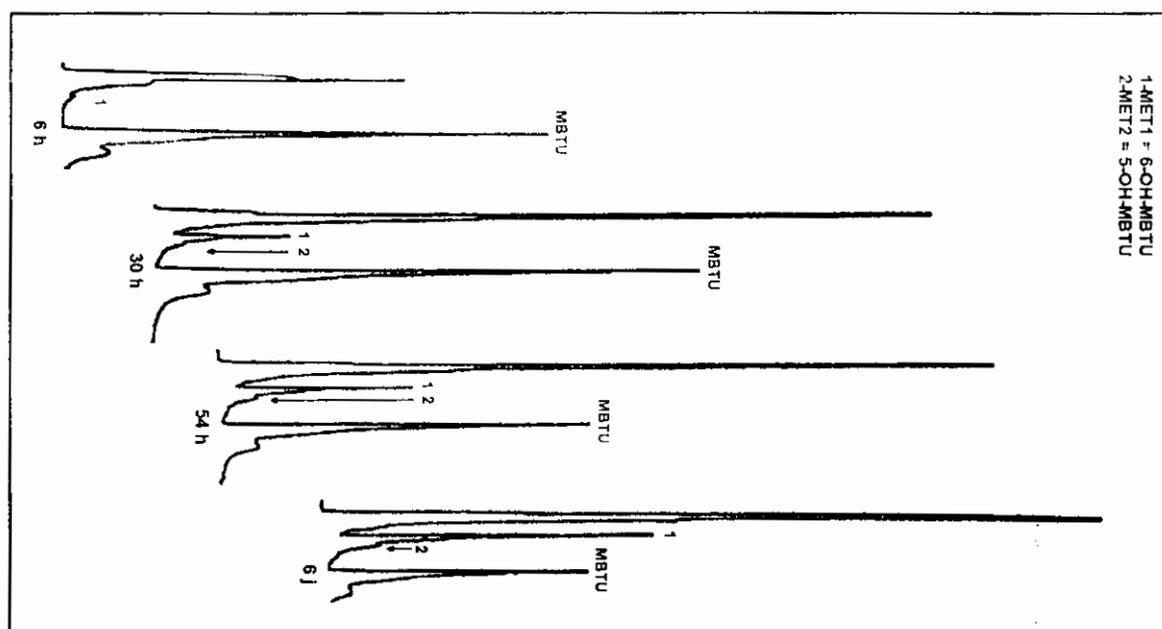


Figure IV.2 : Suivi par CLHP de la dégradation de MBTU par A. niger

Ces pics sont absents des chromatogrammes des échantillons prélevés dans les deux erlens témoins réalisés en parallèle (témoins « cellules sans xénobiotique » et témoins « xénobiotique sans cellules »). Ils correspondent donc à des métabolites du MBTU. Au vu de leur temps de rétention plus court que celui du produit de départ MBTU, nous pouvons supposer que ces métabolites ont une plus grande polarité que le MBTU. Ces métabolites ne sont pas dégradés ultérieurement au cours de l'expérience.

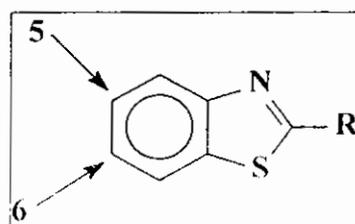
A.1.2 Etude quantitative

Pour déterminer la structure chimique des métabolites nous avons réalisé un essai quantitatif : nous avons utilisé un grand nombre d'erlens (15 erlens) afin d'obtenir une concentration

Dans la zone correspondant à la chaîne urée, on observe plusieurs signaux parasites. En effet, les signaux à 4,0 ; 2,0 et 1,1 ppm correspondent à des traces d'acétate d'éthyle (utilisée lors de l'extraction). Le pic à 3,35 ppm correspond au pic de l'eau et le pic à 2,5 ppm au DMSO.

Le doublet à 2,70 ppm est attribué au méthyle en bout de chaîne urée CH₃ (3) ; le doublet à 3,42 ppm correspond au deuxième méthyle CH₃ (1). La présence de ces deux signaux prouve bien que la souche fongique n'a pas attaquée la chaîne urée contrairement à ce qui a été observé par plusieurs auteurs (Tixier et al., 2000 ; Tixier, 1999) pour la déméthylation de la chaîne urée d'autres phénylurées par la même souche ou d'autres souches fongiques et bactériennes. D'autres auteurs ont aussi signalé l'hydrolyse de la liaison amide donnant lieu à la formation des dérivés aniline (Nimmo et al., 1984 ; Wallnöfer, 1969 ; Wallnöfer et Bader, 1970).

Par ailleurs, dans la zone des protons aromatiques, seuls trois signaux sont observés, résonnant à 7,46 ; 7,16 et 6,82 ppm, indiquant qu'un substituant est présent sur le noyau aromatique. Une analyse fine des constantes de couplage montre que le substituant est soit en position 5, soit en position 6. En effet, le doublet à 7,46 ppm présente une constante de couplage de 8,5 Hz. Cette constante correspond à ³J. Ce proton est couplé à un autre proton éloigné de trois liaisons. Le doublet à 7,16 ppm présente une constante de couplage de 2,5 Hz. Cette constante correspond à une ⁴J. Ce proton est couplé à un autre éloigné de quatre liaisons. Le doublet de doublets résonne à 6,81 ppm. Le premier doublet (δ = 6,82 ppm) possède une constante de couplage de 2,5 Hz. La constante de couplage entre les doublets est de 8,5 Hz. Le proton est donc couplé avec les deux protons précédents selon une ⁴J et une ³J. En toute évidence, un proton a disparu du cycle aromatique et son substituant se trouve donc en position 5 ou 6 sur le cycle.



Le spectre RMN montre un proton sévèrement déblindé sous forme d'un singulet à 9,45 ppm. Il peut s'agir a priori d'un aldéhyde, d'un acide carboxylique ou d'un alcool. Étant donné que le DMSO est un solvant non protique, les protons du métabolite ne peuvent pas s'échanger avec le solvant. Par contre le méthanol deutérié est un solvant protique et le deutérium du

méthanol peut s'échanger avec les protons échangeables du composé, et ils deviennent comme ça invisibles en RMN du proton. Les résultats du tableau IV.1 confirment bien l'absence du signal à 9,45 ppm dans le méthanol deutérié. Le même phénomène est observé quand on ajoute de l'eau dans le DMSO. Ces faits sont donc en faveur d'un proton échangeable et l'hypothèse de l'aldéhyde est éliminée de soi.

Tableau IV.1 : Analyse des spectres RMN (400,14 MHz) de MET₁ et MET₂

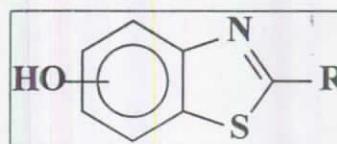
	MET ₁	MET ₂
δ (ppm) (CD ₃ OD)	2.7 (s, 3H)	2.79 (s, 3H)
	3.42 (s, 3H)	3.48 (s, 3H)
	6.76 (dd, 1H, J = 2.6 Hz et J = 8.8 Hz)	6.67 (dd, 1H, J = 2.4 Hz et J = 8.6 Hz)
	7.05 (d, 1H, J = 2.6 Hz)	7.04 (d, 1H, J = 2.4 Hz)
	7.42 (d, 1H, J = 8.8 Hz)	7.45 (d, 1H, J = 8.6 Hz)
δ (ppm) (DMSO-d ₆)	2.7 (s, 3H)	
	3.42 (s, 3H)	
	6.82 (dd, 1H, J = 2.5 Hz et J = 8.5 Hz)	
	7.16 (d, 1H, J = 2.5 Hz)	
	7.46 (d, 1H, J = 8.5 Hz)	
	9.45 (s, 1H)	

L'analyse par spectrométrie de masse montre une différence de 16 uma par rapport à celle du produit de départ, indiquant que MET1 possède un groupement **-OH**.

En effet, l'ionisation chimique au méthane a donné les résultats suivants :

238 [M+H]⁺, 266[M+29]⁺ et 278[M+41]⁺. Ce résultat a été confirmé par CLHP couplée à la masse réalisé par les deux modes :

- ❖ **Mode négatif** : 236[M-H]⁻
- ❖ **Mode positif** : 238[M+H]⁺, 260[M+Na]⁺.



Pour enlever l'ambiguïté sur la position exacte du groupement hydroxyle sur le cycle, on a eu recours à la RMN 2D.

La structure de MET1 a été établie définitivement grâce à la RMN 2D inverse ¹H - ¹⁵N.

Une expérience en RMN 2D inverse ¹H-¹⁵N a permis d'établir les couplages longue distance entre l'azote de l'hétérocycle et les protons de la partie aromatique. La séquence utilisée est une expérience GHMBC (Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Il est bien

connu que l'azote est un élément peu sensible en RMN. Le Tableau IV.2 regroupe quelques caractéristiques des noyaux utilisés pour l'étude du métabolisme microbien.

Tableau IV.2 : Caractéristiques des noyaux utilisés pour l'étude du métabolisme microbien

Isotope	Rapport gyromagnétique γ ($10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Abondance naturelle (%)	Sensibilité relative
^1H	26,75	99,98	100
^{13}C	6,73	1,11	1,59
^{15}N	10,84	100	0,23
^2D	4,11	1,50	0,96
^{19}F	-2,71	100	83
^{15}N	4,31	0,37	0,10

On réalise grâce à cette technique une détection indirecte de l'azote par l'intermédiaire des protons.

Le temps d'évolution laissé à l'expérience permet de déterminer les constantes de couplage entre azote et proton. Ce temps d'évolution est inversement proportionnel à la constante de couplage :

$$d\delta = \frac{1}{2 \times^n J_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}}$$

les valeurs de constantes de couplage $^2J_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}$ ou $^3J_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}$ varient de 5 à 10 Hz, celles des constantes de couplage $^4J_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}$ sont de l'ordre de 1 à 2,5 / 3 Hz. Le couplage longue distance étant de quelques Hz, ce délai $d\delta$ est de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes. Ainsi un temps d'évolution de 80 ms permet de visualiser les constantes de couplage 3J ; un temps d'évolution de 115 ms permet de visualiser les constantes de couplage 4J (couplages plus longue distance).

Pour chaque spectre le signal de l'azote est représenté dans la dimension verticale du spectre alors que les signaux des protons du métabolite sont représentés dans la dimension horizontale du spectre. Les taches centrales sont des taches de corrélation entre les protons et l'azote.

La GHMBC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ enregistrée sur la zone aromatique de la molécule avec une période d'évolution de 80 ms montre une corrélation entre l'azote endocyclique $^{15}\text{N}(3)$ et le doublet

temps d'évolution fixé à 115 ms permet de voir les couplages 4J entre l'azote N(3) endocyclique et le doublet des doublets résonnant à 6.82 ppm. Ce dernier proton est attribué à H5. Par conséquence, le substituant est clairement sur le cycle benzénique à la position 6.

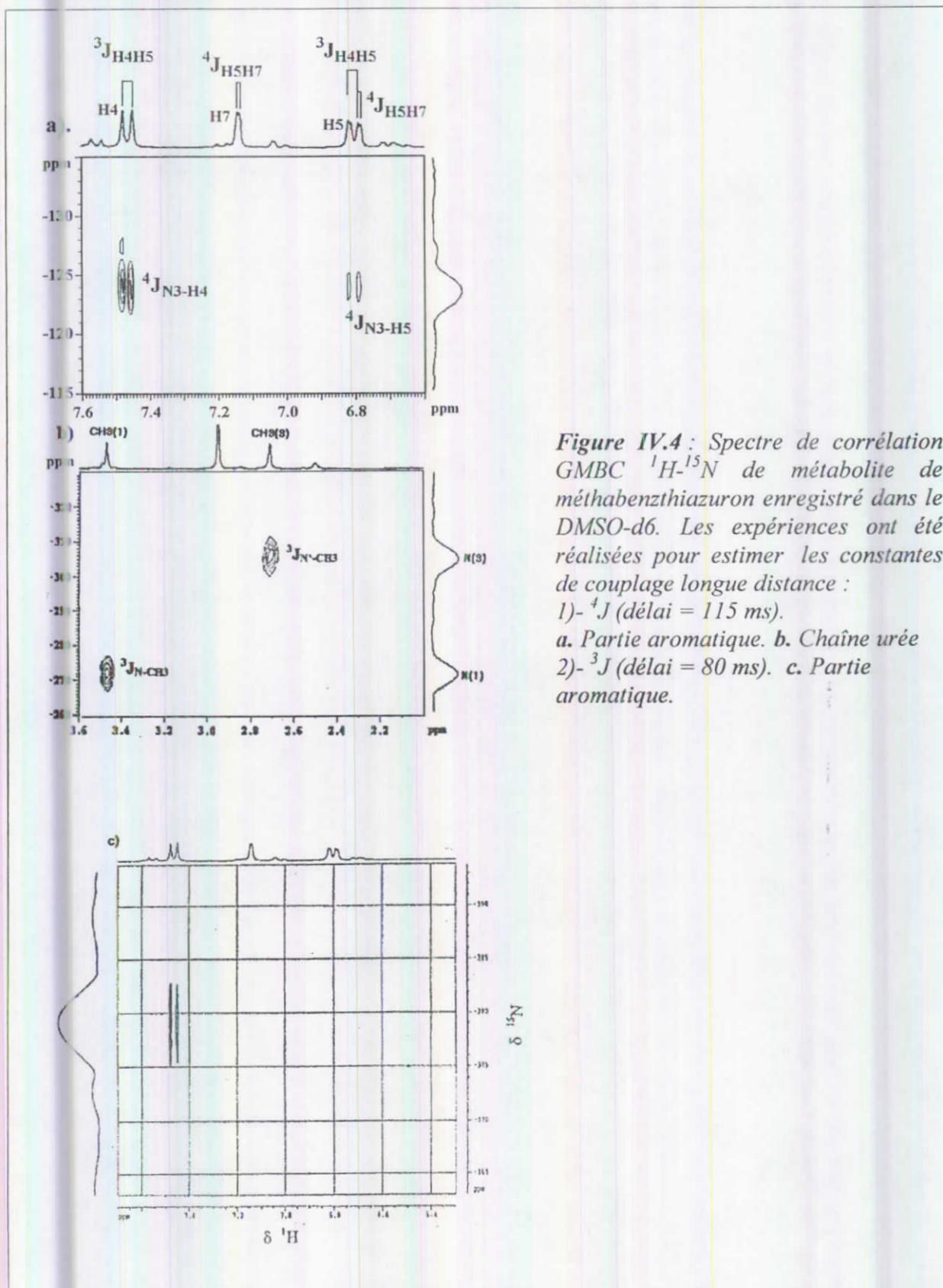
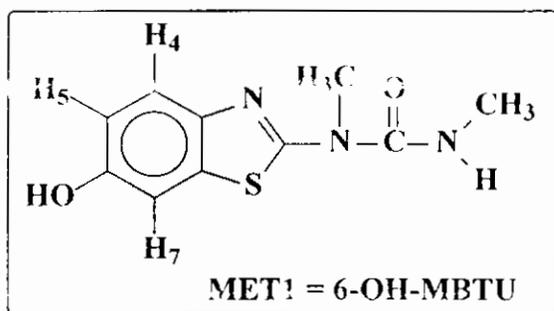


Figure IV.4 : Spectre de corrélation GMBC ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ de métabolite de méthabenzthiazuron enregistré dans le DMSO- d_6 . Les expériences ont été réalisées pour estimer les constantes de couplage longue distance :
 1)- 4J (délai = 115 ms).
 a. Partie aromatique. b. Chaîne urée
 2)- 3J (délai = 80 ms). c. Partie aromatique.

Sur la figure IV.4b est représentée une séquence GHMBC enregistrée pour la chaîne urée à un délai de 115 ms. Deux taches ont été clairement détectées correspondant aux corrélations entre $\text{CH}_3(\text{N})$ et $\text{N}(\delta = -273 \text{ ppm})$, et $\text{CH}_3(\text{N}')$ ($\delta = -306 \text{ ppm}$). Cette dernière expérience confirme que la chaîne urée n'était pas modifiée par *A. niger*.

Toutes ces données montrent que le métabolite MET1 est le 6-hydroxyméthabenzthiazuron (6-OH-MBTU).

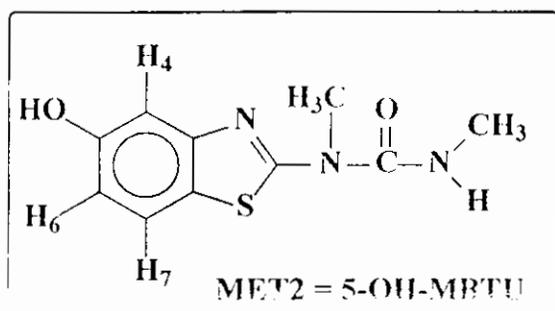


b-MET2 :

Le second métabolite minoritaire (MET2) qui était obtenu en très faible quantité a été premièrement analysé par RMN ^1H dans le CD_3OD (tableau IV.1). La présence de deux singulet à 2,79 et 3,48 ppm prouve que les groupements méthyle de la fonction urée sont encore présents. Dans la région aromatique, trois signaux sont visibles à 7,45 ; 7,04 et 6,67 ppm. Leurs formes et les constantes de couplage sont exactement identiques à celles observées avec le 6-OH-MBTU, annonçant une forte analogie structurale avec ce métabolite.

La spectrométrie de masse a donné les mêmes résultats que pour le métabolite MET₁.

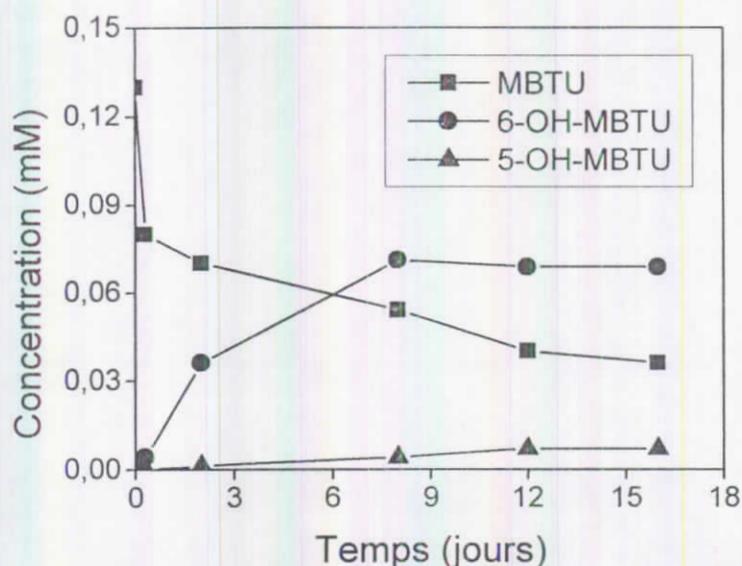
Ces résultats suggèrent fortement que le MET₂ n'est autre qu'un isomère de position du



MET₁ : c'est le 5-OH-MBTU.

A.1.3 - Cinétique de biotransformation du MBTU

Disposant de l'herbicide MBTU et des métabolites en quantité suffisante, des courbes d'étalonnage avec chacun des produits ont été réalisées par CLHP afin de quantifier la dégradation du MBTU et l'apparition de ses métabolites.



*Figure IV.4bis : Suivi de la variation de la concentration du MBTU et de ces métabolites durant l'incubation avec des cellules d'*A. niger* au repos métabolique*

La biotransformation commence après un temps de latence, de six heures environ (figure IV.4bis). Enfin de l'expérience 72,3 % du substrat sont disparus, mais les métabolites identifiés n'en représentent que 92,7 %. Près de 27 % du MBTU restent inchangés après 2 semaines d'incubation. Parallèlement à cette diminution du substrat initial on note l'augmentation progressive de la quantité des deux métabolites pour se stabiliser après huit jours d'incubation, ce qui montre que ces métabolites ne sont pas utilisés par cette souche fongique. L'accumulation de ces deux métabolites dans le milieu extracellulaire peut s'expliquer par l'absence de systèmes enzymatiques chez *A. niger* capables de les intégrer dans des voies du métabolisme central, ou par le fait que les métabolites présentent eux-mêmes une certaine toxicité vis à vis de la souche considérée.

IV.A.2- Biodégradation du 2-hydroxybenzothiazole (OBT)

A.2.1- Etude analytique

L'expérience de biodégradation est réalisée en présence de 50 g/L de biomasse humide dans 100 mL d'une solution tampon MMK (Mineral Medium Knapp), en conditions stériles, contenant 0,13 mM de OBT. La cinétique est suivie par analyse des surnageants (obtenus après centrifugation des prélèvements) par CLHP phase inverse. Les chromatogrammes CLHP enregistrés aux temps 0 min, 2 h, 4 h, 6 h et 8 h sont présentés sur la figure IV.5.

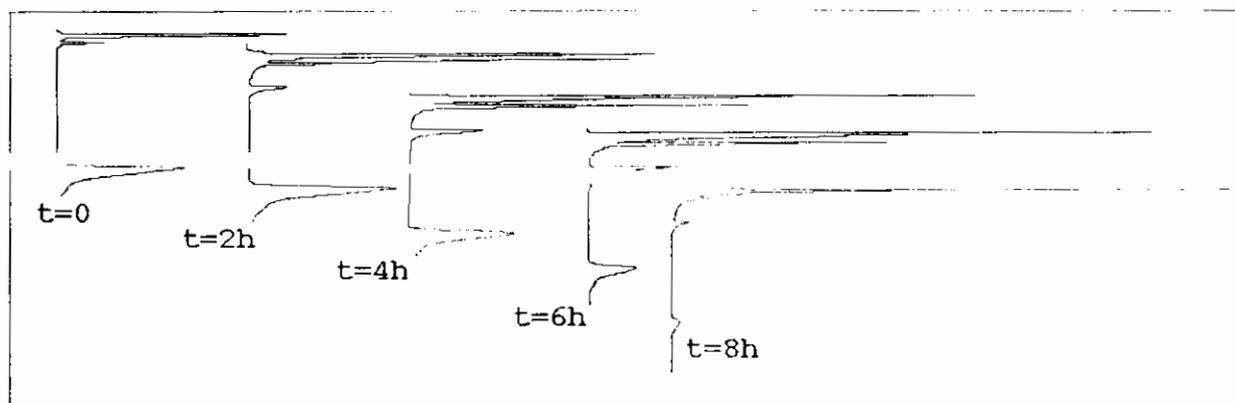


Figure IV.5 : Suivi par CLHP de la dégradation de OBT en présence d'*A. niger*

On observe que l'aire du pic du OBT ($t_R = 28$ min) diminue lentement au cours du temps et qu'un nouveau pic apparaît avec un temps de rétention plus court ($t_R = 5,8$ min), ce qui indique qu'il s'agit d'un composé plus polaire que OBT.

Trois concentrations en substrat ont été testées. La figure IV.6 montre que la dégradation est importante pour $[OBT] = 0.12$ mM (plus de 36 % en 2 semaines d'incubation) tandis qu'elle est non significative pour des concentrations supérieures (1 et 1.5 mM).

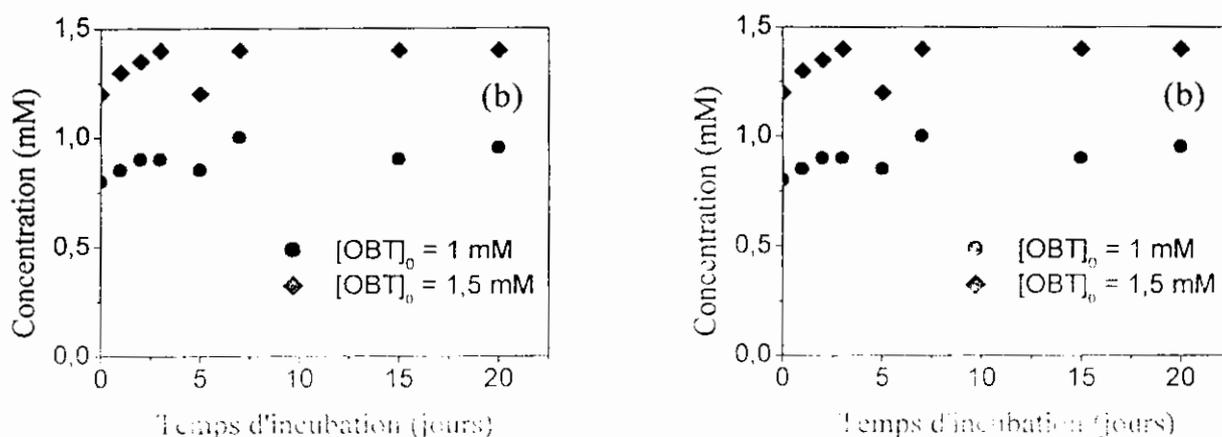


Figure IV.6 : Cinétique de dégradation de OBT : effet de la concentration. a) $[OBT]_0 = 0,12$ mM, b) $[OBT]_0 = 1$ et 1,5 mM

A.2.2- Etude quantitative

Afin d'élucider la structure de ce métabolite, nous avons réalisé un essai quantitatif de biodegradation sur 29 erlenmeyers (115 g de biomasse) avec une concentration de OBT de 0,13 mM. La formation du métabolite est suivie par CLHP afin d'arrêter la biodegradation lorsque sa concentration maximale est atteinte. Après 6 jours d'incubation, le milieu réactionnel est centrifugé à 8000 rpm pendant 15 min à 5°C. Le surnageant est ensuite extrait en continu à l'acétate d'éthyle pendant 48 h. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Nous contrôlons par chromatographie sur couche mince la présence d'un nouveau composé plus polaire que OBT et visible en UV. Le résidu est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (chloroforme/acétate d'éthyle : 70/30).

A.2.3- Caractérisation du métabolite

Le spectre RMN ^1H de ce composé est présenté sur la figure IV.7. Le spectre a été enregistré dans le CD_3OD .

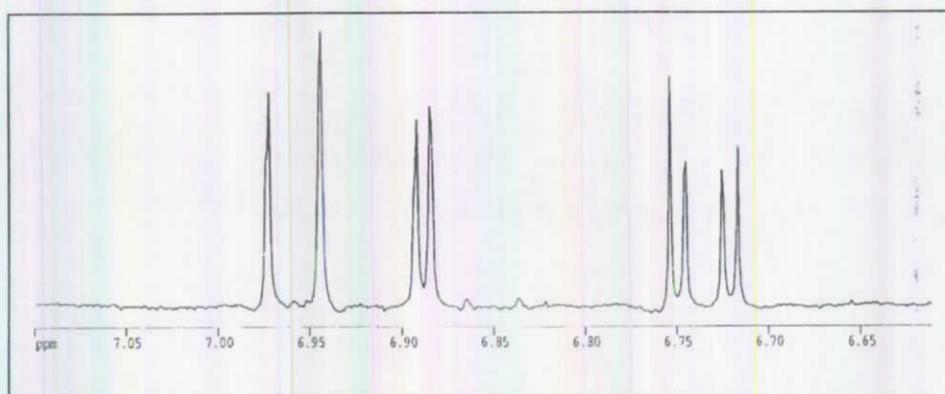


Figure IV.7 : Spectre RMN ^1H du métabolite de OBT enregistré dans CD_3OD
(Agrandissement correspondant à la zone des protons du cycle aromatique)

Seulement 3 signaux sont visibles dans la région des protons aromatiques, chacun correspondant à un proton, ce qui indique qu'une "substitution" a eu lieu sur le cycle benzénique. Le doublet à 6,97 ppm présente une constante de couplage de 8,5 Hz ce qui correspond à une constante de couplage ^3J .

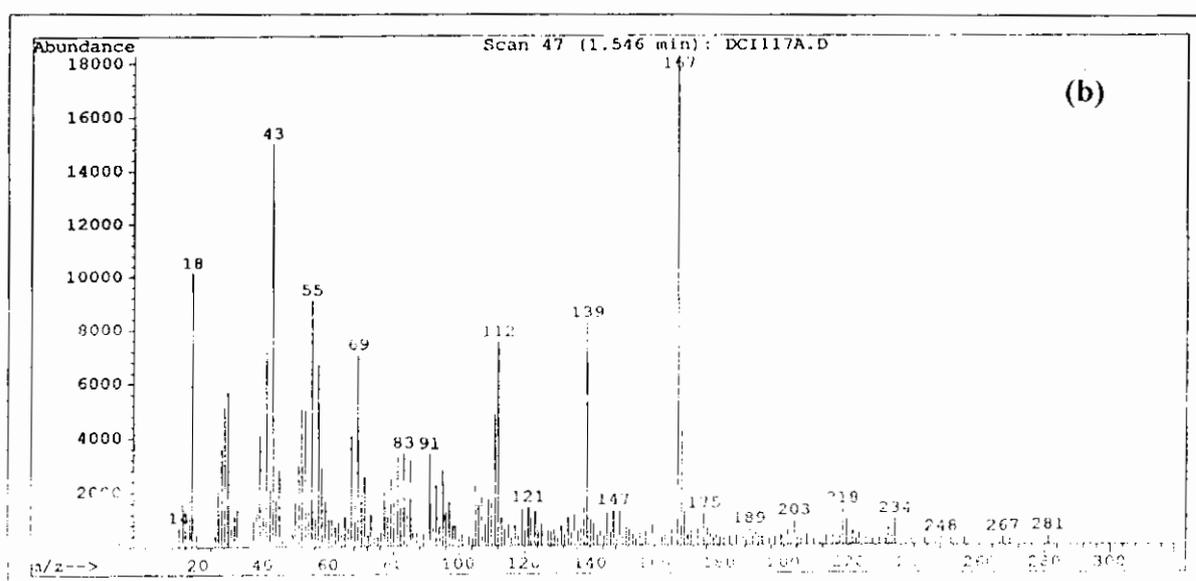
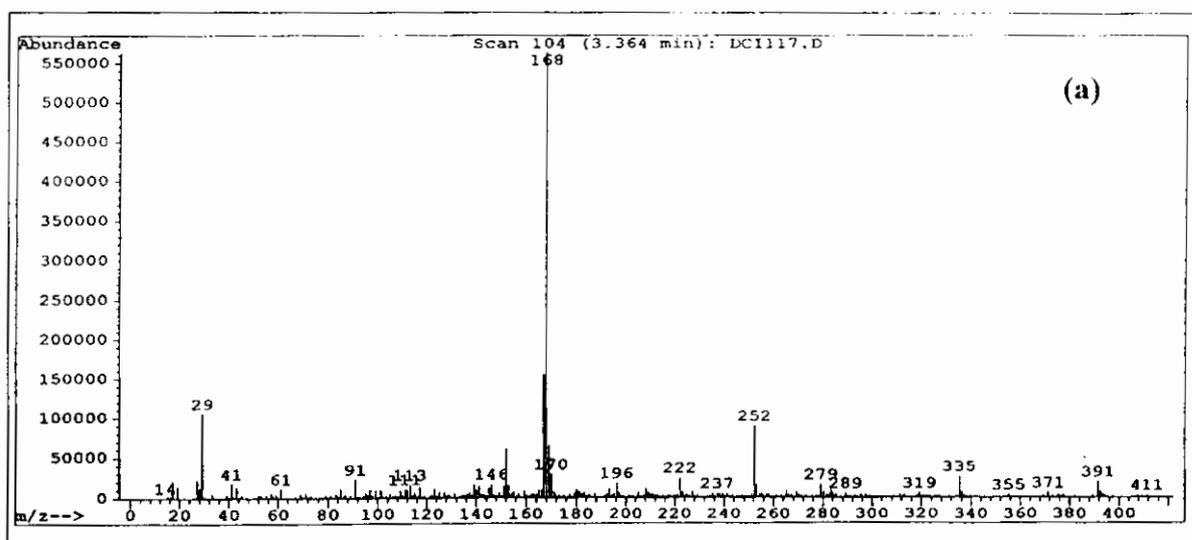
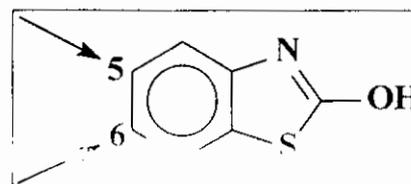
Nous retrouvons ce couplage sur le signal à 6,74 ppm (doublet dédoublé). Ce proton est couplé d'une part avec le signal à 6,97 ppm (constante de couplage = 8,6 Hz) et d'autre part

avec le proton à 6,89 ppm par une petite constante de couplage ($^4J = 2.6$ Hz) ce qui signifie que ces protons sont distants de 4 liaisons.

En revanche, il n'est pas possible d'attribuer les doublets (6,97 et 6,89 ppm) aux protons situés en position 4 ou 7 car les effets électroniques du soufre et de l'azote sont difficilement prévisibles par une approche empirique.

Le substituant est donc obligatoirement en position 5 ou 6. Ce composé a également été analysé par spectrométrie de masse en ionisation chimique (IC) (méthode).

Le spectre est présenté figure IV.8.



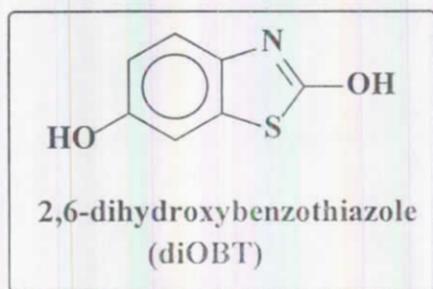
*Figure IV.8 : Spectre de masse du métabolite de OBT
a) Ionisation chimique au méthane ; b) Impact électronique*

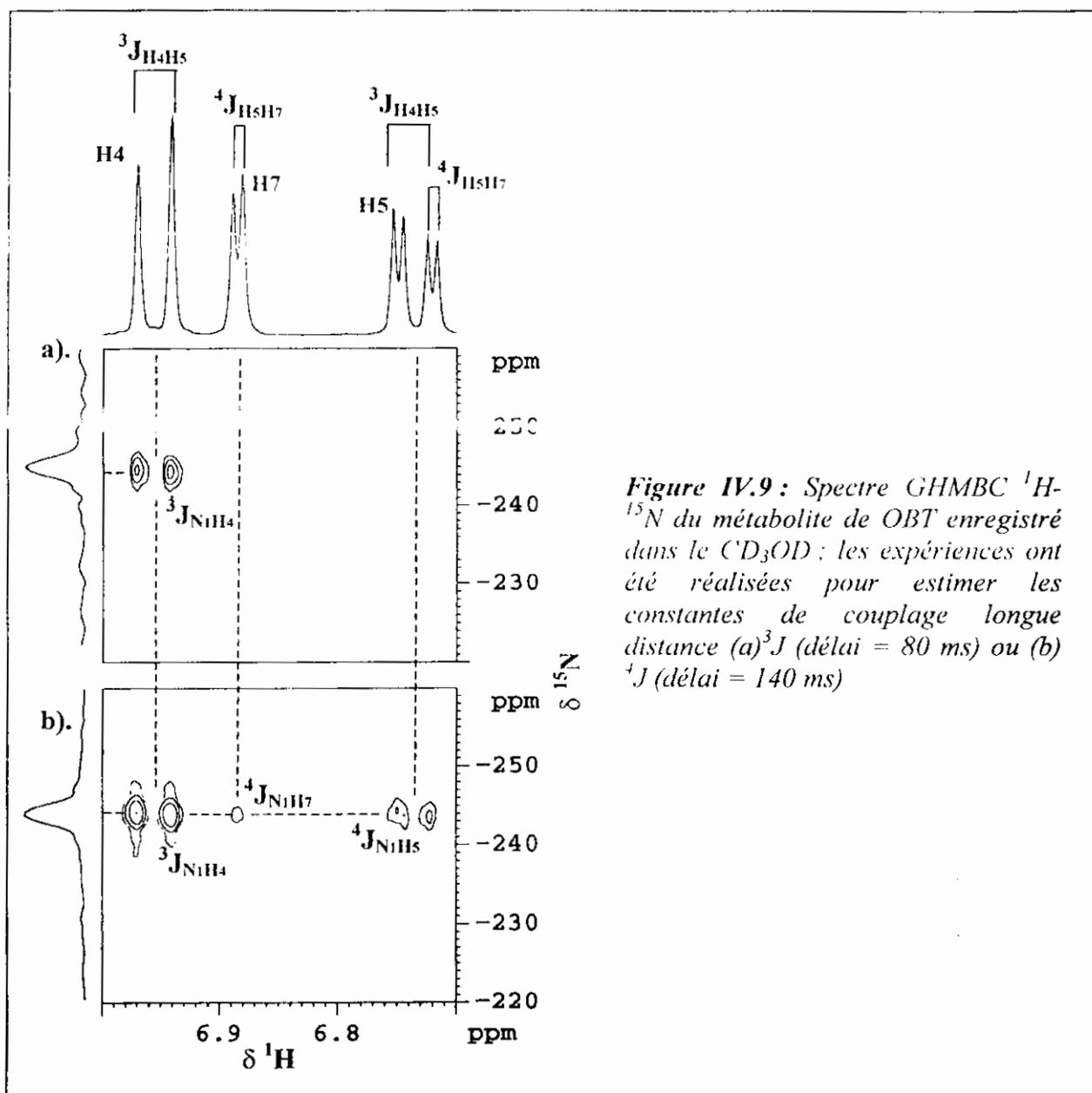
On observe un pic moléculaire à $m/z = 168$ correspondant à l'adduit $[M+H]^+$, soit une augmentation de 16 u.m.a. (unité de masse atomique) par rapport au pic moléculaire de OBT ($m/z = 151$), ce qui indique l'introduction d'un atome d'oxygène.

D'après les données de RMN et de spectrométrie de masse, on peut conclure que ce métabolite possède une fonction $-OH$ sur le cycle aromatique en position 5 ou 6.

Afin de déterminer sans ambiguïté la position de ce groupement hydroxyle, une expérience 2D inverse HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) $^1H-^{15}N$ en abondance naturelle a été réalisée. Dans ce type d'expérience, il est nécessaire d'estimer la valeur de la constante de couplage proton - azote afin de préciser le délai d'évolution dans la séquence. En effet, ce délai d'évolution est inversement proportionnel à la valeur de la constante de couplage. Un temps d'évolution élevé permettra donc de visualiser des couplages plus petits (distance plus importante) entre l'azote et les protons. Comme il existe peu de références sur ce type de molécule dans la littérature, il faut réaliser différentes expériences afin d'ajuster ce temps d'évolution.

Le spectre présenté sur la figure IV.9 a été obtenu avec un délai d'évolution de 115 ms. Avec un temps d'évolution faible (80 ms), qui correspond à un couplage $^3J_{H-^{15}N}$ de l'ordre de 6,5 Hz (c'est-à-dire que l'azote et le proton observé sont distants de 3 liaisons), une seule tache de corrélation a été observée entre l'azote et le proton résonant à 6,97 ppm. Il semble donc que ce doublet puisse être attribué à H_4 . En augmentant le temps d'évolution (115 ms / $J_{H-^{15}N} \approx 4,5$ Hz), une tache de corrélation supplémentaire apparaît entre l'azote et le doublet dédoublé résonant à 6,74 ppm. Il apparaît donc que ce dernier est distant de 4 liaisons de l'atome d'azote. De plus, comme ce proton est couplé par un $^3J_{H-H}$ (8,5 Hz) avec le proton H_4 , il se situe nécessairement en position 5 : nous en déduisons donc que le substituant ne peut être qu'en position 6. De plus, les déplacements chimiques de l'azote du métabolite et du OBT (- 153,1 et - 153,5 ppm respectivement) sont très proches ce qui signifie que l'atome d'azote n'a pas été oxydé. La structure du métabolite est donc la suivante :





A.2.4- Etude cinétique

La cinétique de dégradation du OBT (0.13 mM) et d'apparition du métabolite établies par CLHP sont présentées sur la figure IV.10 la dégradation est de 54 % en 14 jours d'incubation. Ce métabolite s'accumule jusqu'à atteindre un palier en six jours d'incubation mais il n'est pas dégradé ultérieurement d'une manière significative. L'analyse des différents témoins a montré que ce métabolite ne provenait pas d'une dégradation abiotique et n'était pas d'origine endogène.

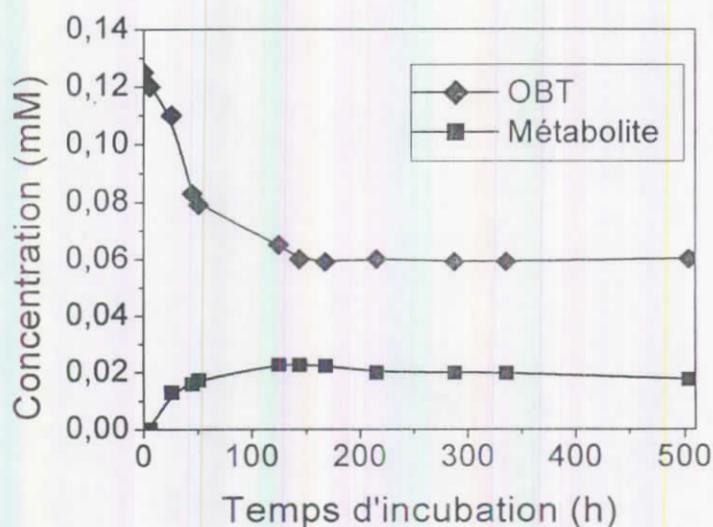


Figure IV.10 : Biodégradation de OBT (0,13 mM) par Aspergillus niger

IV.A.3- Biodégradation du benzothiazole (BT)

L'expérience de la biodégradation du benzothiazole a été réalisée en présence de 50 g/L de biomasse humide dans 100 mL d'une solution tampon MMK (Mineral Medium Knapp), en conditions stériles, contenant 0,13 mM de BT. La cinétique est suivie par CLHP phase inverse des surnageants (obtenus après centrifugation des prélèvements). Les chromatogrammes CLHP enregistrés aux différents temps d'incubation n'ont pas révélé la formation des nouveaux produits au cours du temps, alors qu'on note bien la diminution de la concentration du benzothiazole introduit initialement. En effet, on observe un pourcentage de dégradation de 54 % en 14 jours d'incubation (Figure IV.11). Ce résultat n'est pas facile à expliquer à la lumière des résultats du paragraphe précédent (OBT est bien métabolisé en diOBT).

Deux hypothèses peuvent être émises : 1) soit il s'agit d'un problème cinétique, les produits formés sont aussitôt transformés et ne s'accumulent pas, 2) soit il existe une voie de dégradation qui ne passe pas par la formation du OBT puis diOBT comme première étape de métabolisation. On pourrait envisager la formation d'un dihydrodiol sur le cycle benzenique qui conduit ensuite à un catéchol qui s'ouvre rapidement. Ce type de réaction a été montrée pour le mercaptobenzothiazole lors de la dégradation par une souche de *Rhodococcus* par N. Haroune lors de sa thèse (2003). Ce résultat est différent de celui observé dans le cas de la souche *Cunninghamella elegans* utilisée avec le même substrat qui a été métabolisé en diOBT (§ IV.B.2). On note par ailleurs que la solubilisation du BT n'était que partielle.

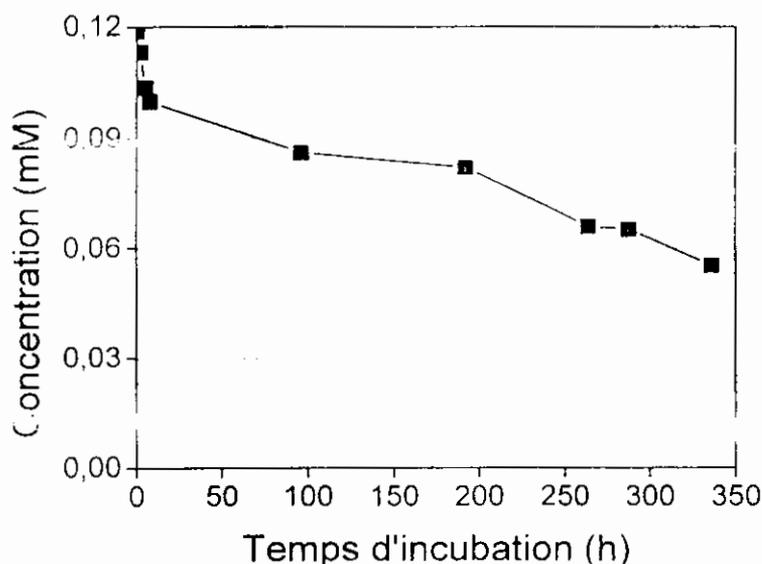


Figure IV.11 : Biodégradation de BT (0,13 mM) par Aspergillus niger

IV.A.4- Biodégradation du 2-aminobenzothiazole (ABT), de 2-mercaptobenzothiazole (MBT) et de l'acide benzothiazolyl sulfonique (BTSO3)

Dans les mêmes conditions que pour les substrats précédents, une incubation de ABT (0,13 mM) et MBT (0,13 mM) a été réalisée avec *A. niger* (50 g/L). Les chromatogrammes CLHP ont montré la formation d'un seul métabolite dans chaque cas. Ce métabolite a été identifié comme étant le 6-OH-ABT par co-injection de ce standard, produit isolé et purifié par l'équipe de Anne-Marie Delort par incubation de ABT avec des souches bactériennes. La dégradation a été de 46 % au bout de 14 jours d'incubation. Le métabolite formé atteint son maximum en 50 heures avec une concentration de 0,03 mM pour diminuer ensuite et se stabiliser sur un palier vers 5 jours (Figure IV.12).

En outre une co-injection du 6-OH-MBT isolé auparavant au laboratoire (thèse de N. Haroune, 2003), a permis de confirmer la nature du métabolite produit par *A. niger* lors de son incubation avec MBT. L'évolution qualitative du substrat ainsi que de son métabolite est présentée sur la figure IV.13. On note la dégradation totale de MBT en 45 heures ainsi que la formation progressive de 6-OH-MBT à l'état de traces pour atteindre son maximum d'accumulation en 21 heures.

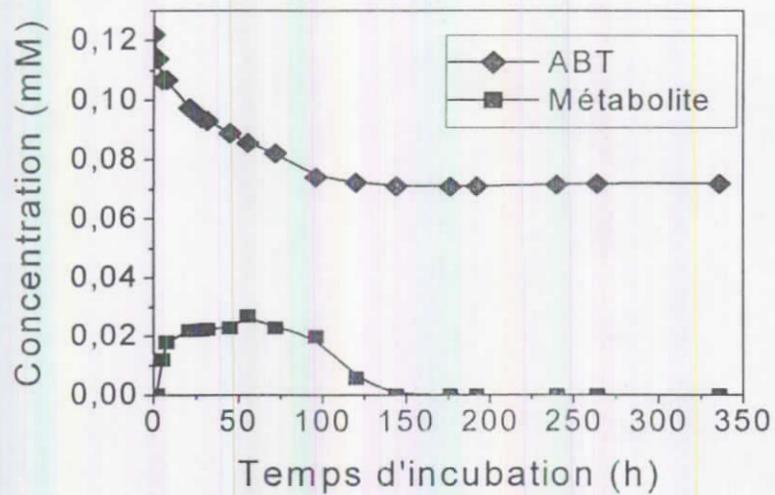


Figure IV.12 : Biodégradation de ABT (0,13 mM) par *Aspergillus niger* (50 g/L)

Finalement, l'incubation de l'acide benzothiazolyl sulfonique avec la souche *A. niger* a montré son incapacité de le métaboliser et de l'utiliser comme seule source de carbone et d'azote pour toutes les concentrations testées.

Excepté pour le BTSO₃ (qui n'est métabolisé) ou le BT (qui est dégradé mais aucun métabolite intermédiaire n'a pu être mis en évidence), il semble que l'étape initiale commune à la biotransformation de tous les benzothiazoles étudiés par *A. niger*, est l'hydroxylation du cycle benzénique en position 6.

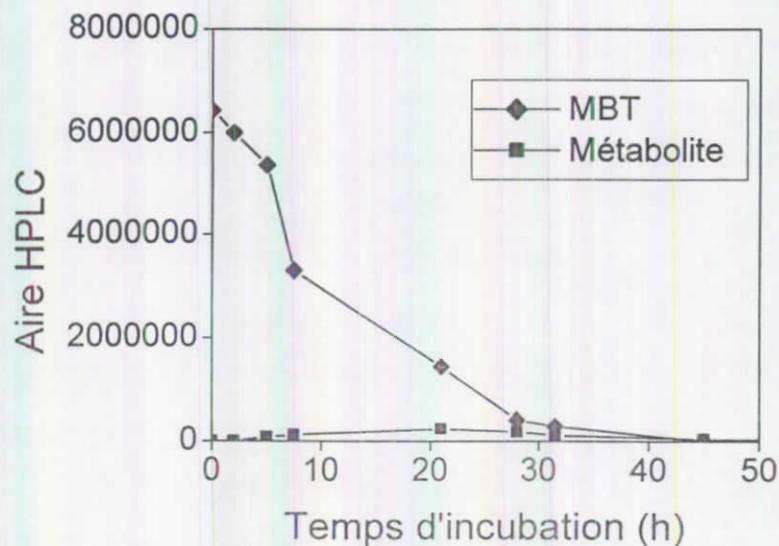


Figure IV.13 : Biodégradation de MBT (0,13 mM) par *Aspergillus niger*

IV.B- *Cunninghamella elegans*

IV.B.1- Biodégradation du méthabenzthiazuron (MBTU)

B.1.1- Etude analytique

- Test du milieu de culture

Au début de cette étude de métabolisme du MBTU par la souche *C. elegans*, deux milieux de culture ont été testés avec différentes concentrations en substrat. Il s'agit ici du milieu Malt et du milieu Rosazza dont les compositions ont été données au chap II. L'évolution de la concentration de MBTU au cours du temps a été suivie par CLHP. La courbe de la figure IV.14 montre qu'effectivement le MBTU est bien dégradé au cours du temps dans les deux milieux testés quelque soit la concentration initiale en substrat. Parallèlement à cette dégradation on constate la formation de plusieurs métabolites au cours du temps. L'effet du milieu de culture sur la vitesse initiale de la biodégradation ainsi que sur la métabolisation globale en plus de la quantité de la biomasse récupérée par erlen (10 g avec le milieu Malt au lieu de 8 g avec le milieu Rosazza) nous a laissé conclure que le milieu Malt est le milieu le plus efficace et ce milieu a été retenu pour la réalisation de suite des expériences de la biotransformation du MBTU par *C. elegans*.

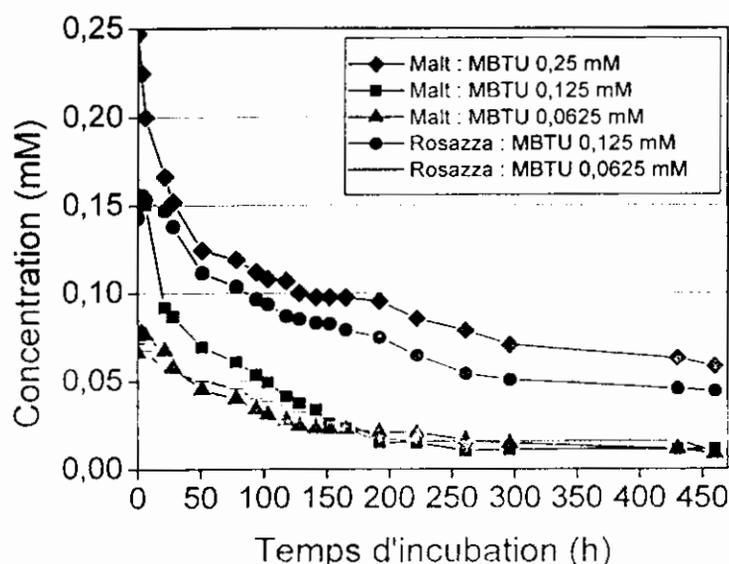


Figure IV.14 : Comparaison de l'effet de deux milieux de culture (Malt et Rosazza)

B.1.2- Etude analytique

Des solutions à concentrations variables en MBTU (0,0625, 0,125 et 0,25 mM) ont été incubées avec des cellules au repos métabolique de la souche *Cunninghamella elegans* (50 g/L de biomasse humide) dans le tampon MMK sous des conditions stériles à 30°C et sous agitation (200 rpm). Le suivi cinétique de la disparition du MBTU ainsi que celui de l'apparition de l'un de ces principaux métabolites a été établi par CLHP inverse (Figure IV.15).

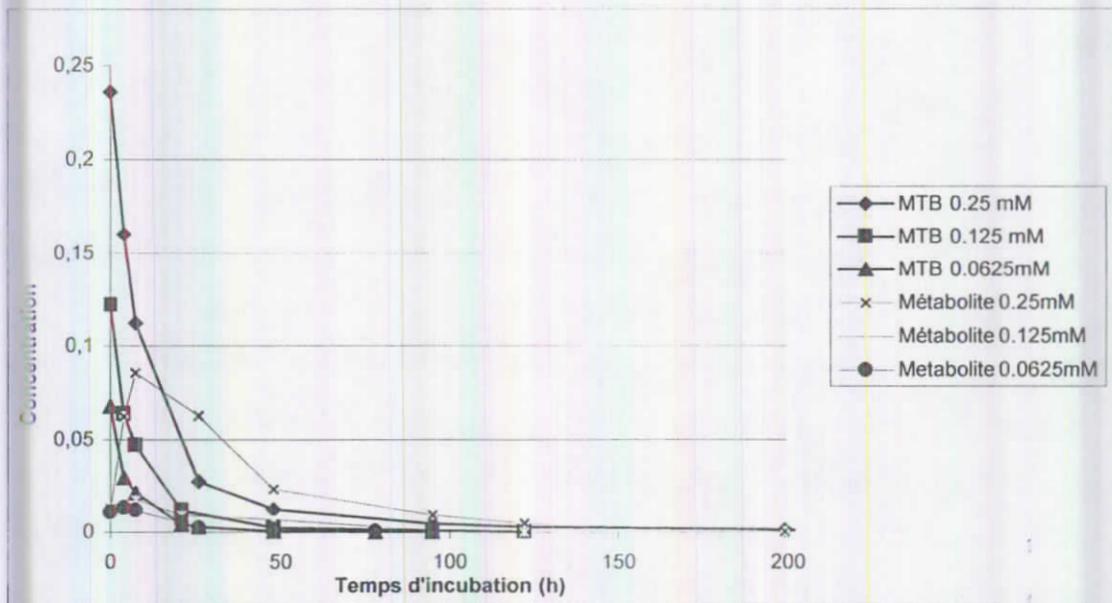


Figure IV.15 : Biodégradation de MTBU par *Cunninghamella elegans*

Les vitesses initiales de la biotransformation sont comparables pour les trois concentrations testées. Il faut noter par ailleurs que la dégradation est totale au bout de 12 jours pour la concentration la plus élevée. Pour les concentrations 0,125 et 0,0625 mM, la disparition totale est observée en 5 et 4 jours respectivement. Le métabolite 6-OH-MBTU atteint son maximum d'accumulation dans tous les cas en moins de dix heures d'incubation pour diminuer ensuite de la même façon que la molécule mère. En plus de ce métabolite majoritairement produit par cette souche, on note la formation des nombreux autres métabolites qui apparaissent et disparaissent au cours de l'incubation. Leur suivi qualitatif par CHLP est donné sur la figure IV.16.

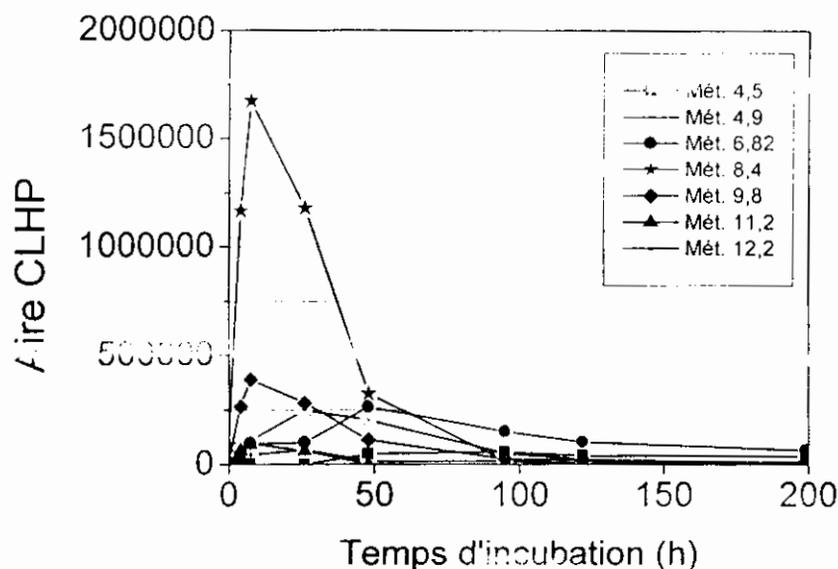


Figure IV.16 : Formation des métabolites (MBTU 0,25 mM + C. elegans) ; suivi qualitatif par CLHP

B1.3- Etudes quantitatives

Des essais préliminaires nous ont montré que la formation des métabolites n'était pas synchrone au cours du temps ; des produits apparaissent et disparaissent assez rapidement tandis que d'autres apparaissent tardivement.

Afin d'essayer d'identifier la structure des différents métabolites formés, nous avons réalisé trois essais quantitatifs que nous avons stoppés à différents temps d'incubation :

- dix erlenmeyers (7 g des cellules dans 140 mL de MMK) sortis au bout de 8 heures,
- 26 erlenmeyers (7 g des cellules dans 140 mL de MMK) sortis au bout de 46 heures,
- 13 erlenmeyers (7 g des cellules dans 140 mL de MMK) sortis au bout de 22 heures.

Après centrifugation, extraction du surnageant à l'acétate d'éthyle pendant 48 heures en continu, une séparation sur colonne de silice (AcOEt/CHCl₃ : 60/40) a été effectuée et différentes fractions ont été récupérées. On a procédé par la suite à l'analyse de ces fractions par RMN et spectrométrie de masse.

La méthodologie adoptée en général pour la détermination des différentes structures est la suivante :

1)- L'analyse du spectre RMN : nous nous sommes intéressés particulièrement aux 3 paramètres caractéristiques d'un spectre RMN à savoir, le déplacement chimique δ (ppm), la forme du signal (couplages scalaires) et l'intensité relative des pics ou intégrale.

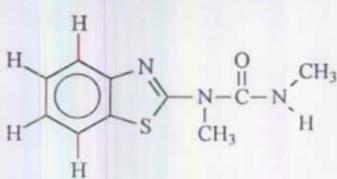
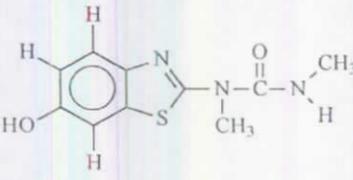
La première étape consiste donc à repérer les déplacements chimiques des différents types des protons et à mesurer les intégrales des signaux. On examine d'abord les déplacements chimiques les plus élevés car ils sont les plus caractéristiques (protons du cycle benzénique), ensuite on repère les massifs couplés et on tente les attributions. La comparaison avec des spectres de références, quand ils sont disponibles, permettent d'affiner la recherche de la structure. La correspondance entre les protons aromatiques et leur homologues aliphatiques a été établie grâce à leurs intégrales relatives surtout quand les concentrations en métabolites sont différentes.

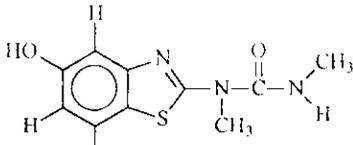
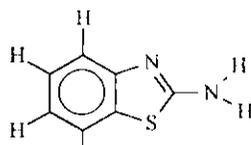
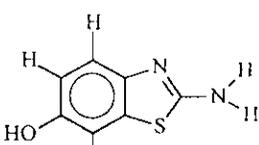
2)- L'analyse du spectre de masse : les pics caractéristiques de l'ionisation chimique au méthane sont relevés en premier lieu ($M+1$, $M+29$ et $M+41$) puis la masse du pic de base sera confirmée par impact électronique (M^+).

3)- En dernier lieu nous avons eu recours aux temps de rétention sur les chromatogrammes CLHP et aux spectres UV donnés par la barrette des diodes dans certains cas.

Le tableau IV.3 ci-dessous donne les déplacements chimiques ^1H en ppm de quelques produits authentiques qui ont servi pour l'analyse des spectres RMN ^1H des métabolites obtenus.

Tableau IV.3 : Déplacements chimiques ^1H de quelques produits de référence dans le CD_3OD

Composé	Déplacement chimique ^1H (ppm)
 (P ₀)	-2,85 (s, 3H) -3,49 (s, 3H) -7,17 (t, 1H) -7,32 (t, 1H) -7,63 (d, 1H) -7,70 (d, 1H)
 (P ₁)	-3,05 (s, 3H) -3,72 (s, 3H) -6,76 (dd, 1H) $^3\text{J} = 8,5 \text{ Hz}$ et $^4\text{J} = 2,5 \text{ Hz}$ -7,05 (d, 1H) $^4\text{J} = 2,5 \text{ Hz}$ -7,42 (d, 1H) $^3\text{J} = 8,5 \text{ Hz}$

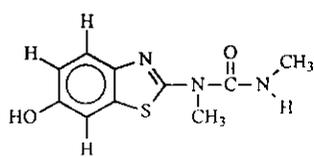
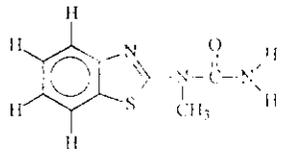
 <p>(P₆)</p>	<p>-2.79 (s, 3H) -3.48 (s, 3H) -6.67 (dd, 1H) ³J = 8,6 Hz et ⁴J = 2,4 Hz -7,04 (d, 1H) ⁴J = 2,4 Hz -7.45 (d, 1H) ³J = 8,6 Hz</p>
 <p>(P₃)</p>	<p>-7.01 (d, 1H) H6 -7.21 (d, 1H) H5 -7.39 (t, 1H) H4 -7.52 (t, 1H) H7</p>
 <p>(P₄)</p>	<p>-6.76 (dd, 1H) ³J = 8,6 Hz et ⁴J = 2,5 Hz -7.02 (d, 1H) ⁴J = 2,5 Hz -7,22 (d, 1H) ³J = 8,6 Hz</p>

a)- analyse des métabolites obtenus après 8h d'incubation

Après rassemblement des différents tubes issus de la colonne, trois fractions chromatographiques ont été obtenues (tableau IV.4) :

☛ La fraction F₀ qui contient le produit de départ le méthabenzthiazuron.

Tableau IV.4 : Caractéristiques des métabolites obtenus après 8 heures d'incubation
(Annexe A)

Structure	Déplacement chimique (ppm)	Spectre de masse	Autres données (CLHP)
 <p>(P₁) : F₁ et F₂ (traces)</p>	<p>- 2,88 - 3,55 - 6,86 (dd, 1H) J³ = 8,73 Hz et J⁴ = 2,47 Hz - 7,15 (d, 1H) J⁴ = 2,47 Hz - 7,52 (d, 1H) J³ = 8,73 Hz</p>	<p>M+1 M+29 M+41 238 266 278 M^{o+} = 237</p>	<p>λ_{max} = 221 et 277 nm avec tr = 4,82 min (eau/MeOH)(40/60)</p>
 <p>(P₂) : F₂ et F₁ (traces)</p>	<p>- 3,03 (s, 3H) - 7,25 (t, 1H) - 7,40 (t, 1H) - 7,73 (d, 1H) - 7,8 (d, 1H)</p>	<p>M+1 M+29 M+41 208 236 248 M^{o+} = 207</p>	

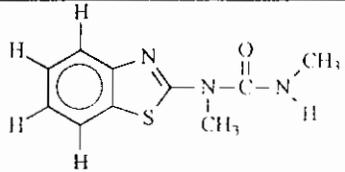
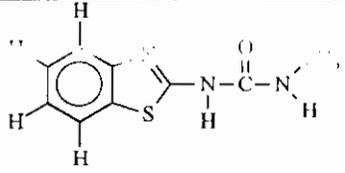
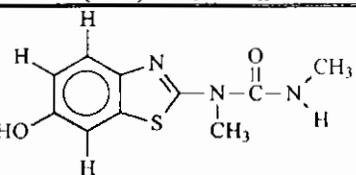
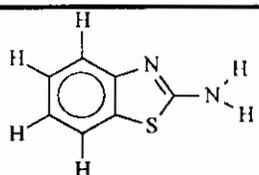
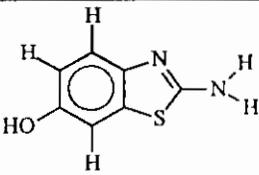
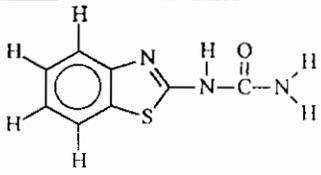
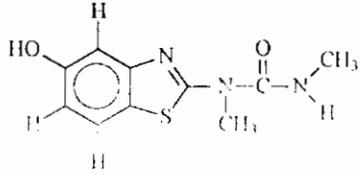
La fraction F_1 contient majoritairement le 6-OH-MBTU (P_1) (structure confirmée aussi bien par RMN que par la spectrométrie de masse en impact électronique et ionisation chimique au méthane). La spectrométrie de masse révèle quelques traces du produit de départ. On détecte également des signaux de faible intensité correspondant au métabolite déméthylé ($M = 107$ g/mol). La fraction F_2 en plus des traces du 6-OH-MBTU, contient principalement un produit monodéméthylé. Il est difficile de savoir s'il s'agit du benzthiazuron (BTU) (P'_2) ou de son isomère déméthylé en bout de chaîne (P_2) ou de deux isomères ensemble. Néanmoins, le spectre de masse du BTU pur présente, en plus des pics caractéristiques à $M+1$, $M+29$ et $M+41$, d'autres pics importants à 177 (isocyanate protonné), à 151 (coupure de la liaison amide N1-C2 de la chaîne urée) à 42 (pic intense avec la même intensité que le $M+1$ (208))....Or, on note sur le spectre de masse de la fraction F_2 que l'intensité du pic à 177 est atténuée (mais le pic à 43 correspondant au fragment de l'isocyanate $OCNH^{2+}$ est très intense en impact électronique), le 151 n'est plus que d'une faible intensité (par contre on note l'apparition du 165 intense correspondant à la rupture de la liaison CH_3N1-C2). Toute ces dissemblances avec le spectre de BTU nous ont laissé croire qu'il pourrait bien s'agir de l'isomère déméthylé en bout de chaîne.

b)- analyse des métabolites obtenus après 46h d'incubation

A l'issue de cette manipulation, cinq fractions ont été retenues (tableau IV.5). Le spectre de RMN de la fraction I, montre qu'elle contient, en plus du produit de départ (P_0), un produit à cycle benzénique non substitué avec 4 protons aromatiques. La correspondance avec les protons aliphatiques a montré l'existence d'un groupement méthyle qui pourrait, sur la base de son intégrale, être lié à cette structure dont les déplacements chimiques sont proches de ceux du benzthiazuron (BTU) (P'_2).

En plus des traces de MBTU et des restes du BTU, la fraction II contient très probablement le 6-OH-MBTU (P_1) (masse + RMN).

Tableau IV.5 : Caractéristiques des métabolites obtenus après 46 heures d'incubation
(Annexe B)

Structure proposée	Déplacement chimique (ppm)	Spectre de masse
 <p>(P₀) : F_I et F_{II}</p>	-2,92 (s, 3H) -3,61 (s, 3H) -7,23 (t, 1H) -7,38 (t, 1H) -7,72 (d, 1H) -7,80 (d, 1H)	
 <p>(P'₂) : F_I et F_{II}</p>	-3,046 (s, 3H) -7,001 (t, 1H) -7,261 (t, 1H) -7,44 (d, 1H) -7,59 (d, 1H)	M+1M+29 M+41 208 236 248 M ⁺ = 207
 <p>(P₁) : F_{II} et F_{III}</p>	-2,9 (s, 3H) -3,56 (s, 3H) -6,89 (dd, 1H, ⁴ J = 2,46 Hz et ³ J = 8,72 Hz) -7,17 (d, 1H, ⁴ J = 2,46 Hz) -7,56 (d, 1H, ³ J = 8,72 Hz)	M+1M+29 M+41 238 266 278 M ⁺ = 237
 <p>(P₃) : F_{III} et F_{IV}</p>	-7,125 (t, 1H) -7,25 (t, 1H) -7,38 (d, 1H) -7,525 (d, 1H)	M+1 M+29M+41 151 179 191 M ⁺ = 150
 <p>(P₄) : F_V</p>	-6,75 (dd, 1H, ⁴ J = 2,46 Hz et ³ J = 8,72 Hz) -7,02 (d, 1H, ⁴ J = 2,46 Hz)	M+1 M+29M+41 167 195 207 M ⁺ = 166
 <p>(P₅) : F_V</p>	-7,28 (t, 1H) -7,41 (t, 1H) -7,74 (d, 1H) -7,81 (d, 1H)	
 <p>(P₆) : F_V</p>	-3,03 -3,48 -6,60 -6,93 -7,35	

c)- analyse de l'essai quantitatif sorti après 22h d'incubation

Après production et extraction, quatre fractions (X₀, X₁, X₂ et X₃) ont pu être rassemblées et analysées par CLHP, RMN et spectrométrie de masse (tableau IV.6) :

Tableau IV.6 : Caractéristiques des métabolites obtenus après 22 heures d'incubation (Annexe C)

Structure proposée	Fraction correspondante
	P ₂ X ₀ , X ₁ , X ₂ et X ₃
	P ₁ X ₀ , X ₁ , X ₂ et X ₃
	P ₇ X ₂ et X ₃
	P ₅ X ₂ et X ₃

☞ La fraction X₀ contient plusieurs produits dont le produit de départ (t_r = 12,7 min, M^{o+} = 221 et λ_{max} = 223,9 ; 268,6 et 295 nm en plus d'un épaulement à 275 nm). En outre on note que le spectre RMN est d'une qualité médiocre (décalé) et par conséquent les déplacements chimiques ne sont plus significatifs. Malgré tout, ce spectre nous donne des renseignements sur le nombre approximatif des produits importants présents et sur la multiplicité qui informe sur la substitution ou non du cycle benzénique.

Un autre produit non substitué sur le cycle benzénique est également présent dans cette fraction. Le pic de masse à 208, 236 et 248 (IC au méthane) et le pic moléculaire à 207 en impact sont des données compatibles avec un produit issu de la déméthylation du produit de départ. Le pic à 165 en IC et celui à 43 très intense en impact sont en faveur d'une

déméthylation en bout de chaîne (P_2) ($t_r = 8,62$ min $\lambda_{max} = 222,4$ et $268,6$ et 295 nm en plus d'un épaulement à 275 nm). Le pic important en CLHP à $t_r = 4,7$ min avec $\lambda_{max} = 219,6$ et $279,8$ nm en plus du $M^{o+} = 237$ en impact font penser au 6-OH-MBT (P_1).

☞ Dans la fraction X_1 on note l'existence du 6-OH-MBTU (masse, CLHP et RMN) comme métabolite important avec MBTU déméthylé (208 , 236 et 248 en IC au méthane, pic moléculaire à 207 en impact électronique, $t_r = 8,68$ min en CLHP avec $\lambda_{max} = 222,4$; 270 et 295 nm et un épaulement vers 280 nm). Le spectre RMN montre aussi une autre structure a noyau monosubstitué. Le spectre de masse montre un pic moléculaire à 181 , 209 et 221 en IC (méthane) et $M^{o+} = 180$ en impact électronique. Le 6-OH-(2-méthylamino)-benzothiazole est une structure qui pourrait être compatible avec ces données spectroscopiques (P_7).

☞ La fraction X_2 ressemble qualitativement à la fraction précédente. En effet, l'analyse par RMN montre au moins trois structures différentes dont deux au moins sont monosubstituées et une avec un cycle benzénique à quatre protons. La masse montre des pics à $M^{o+}=237$, 207 et 180 . Le pic à $M^{o+}=193$ pourrait correspondre au produit de départ didéméthylé (P_5).

☞ La fraction X_3 est assez complexe mais on reconnaît le $M^{o+} = 207$, 237 et 193 .

En conclusion, tous ces résultats obtenus lors de la biodégradation de MBTU par *A. niger* et *C. elegans* permettent d'avancer les voies de métabolisation présentées dans la figure IV.17.

IV.B.2- Biodégradation de BT, OBT, ABT, MBT et BT_{SO}₃

La co-injection en CLHP, des métabolites hydroxylés au position 6 du cycle benzénique de BT, OBT, ABT et MBT produit par d'autres souches bactériennes ou fongiques a permis l'identification de ces intermédiaires chez *C. elegans* et le suivi cinétique quantitatif de bioconversion des différents substrats (Figure IV.18. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.7.

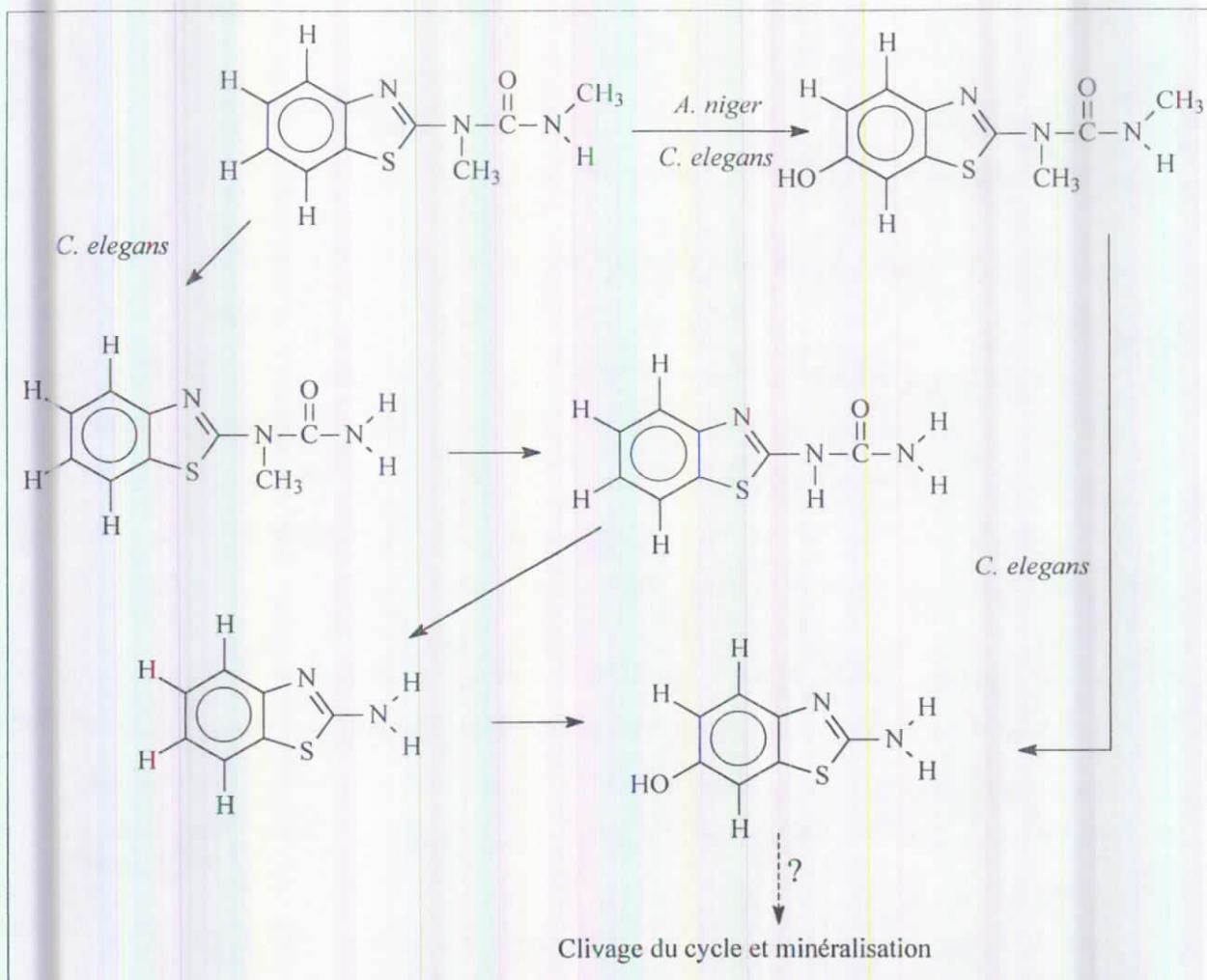


Figure IV.17 : Voies métaboliques impliquées dans la biodégradation de MBTU par *C. elegans* et *A. niger*.

Tableau IV.7 : quelques paramètres de la dégradation de benzothiazoles par *C. elegans*

Substrat	BT		OBT	MBT		ABT
[Substrat] mM	0,07	0,13	0,13	0,07	0,13	0,07
k (nM.h ⁻¹ .g ⁻¹)	2,7.10 ⁻⁵	4,8.10 ⁻⁵	5,2.10 ⁻⁵	1,4.10 ⁻³	1,9.10 ⁻³	8,6.10 ⁻⁶
Taux de bio-conversion (%)	66,7 (275 h)	41,7 (50 h)	100 (260 h)	100 (150 h)	91,7 (250 h)	43 (280 h)
C _{max} (mM) en métabolite	0,01 (400 h)	0,01 (250 h)	0,02 (100 h)			0,02 (100 h)

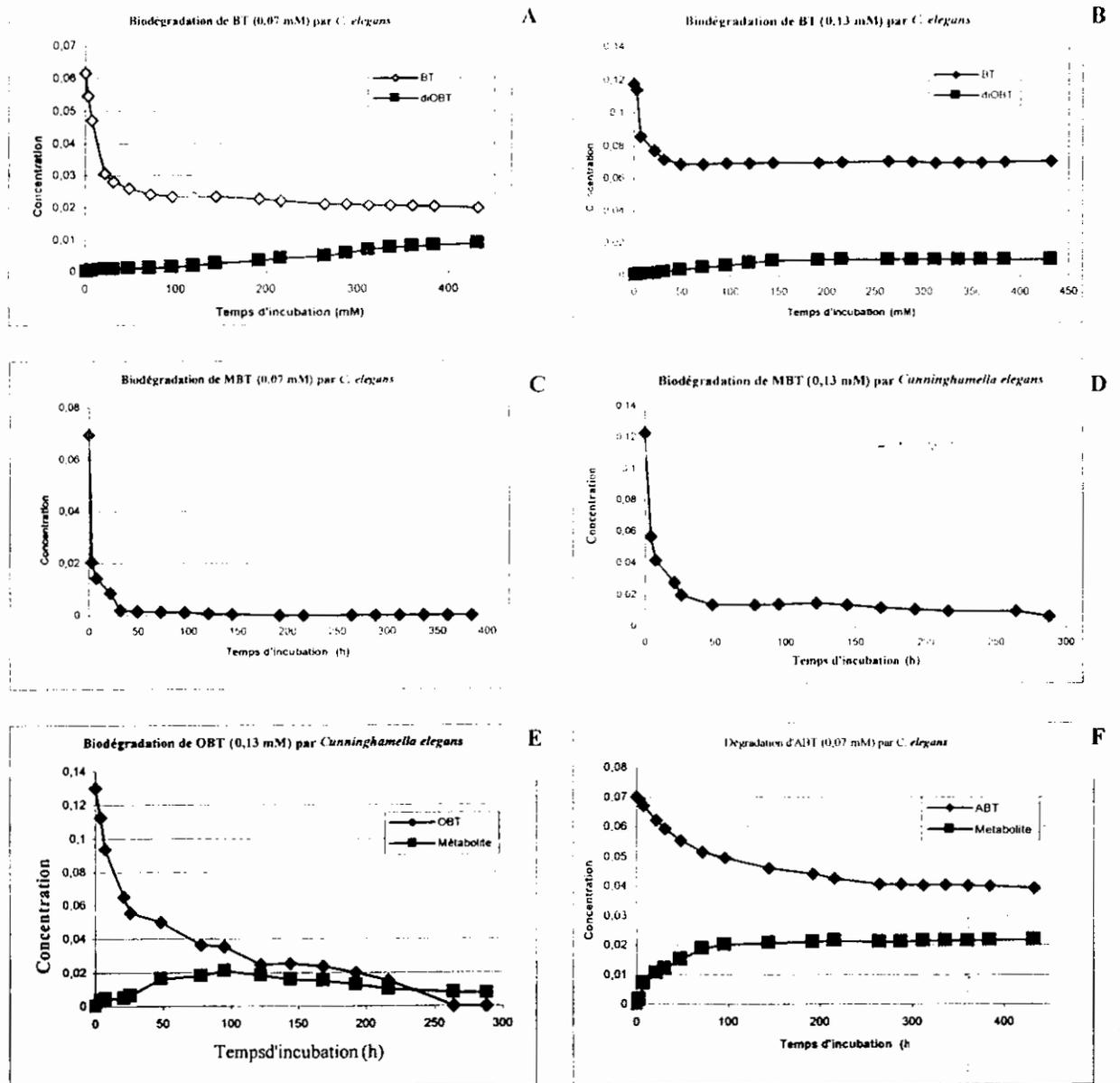


Figure IV.18 : Cinétiques de biodegradation de benzothiazoles par *C. elegans* :

A : BT (0,07 mM) ; **B :** BT (0,13 mM) ; **C :** MBT (0,07 mM)

D : MBT (0,13 mM) ; **E :** OBT (0,13 mM) ; **F :** ABT (0,13 mM)

On remarque que l'accumulation des métabolites est assez importante dans cas de BT, OBT et ABT alors qu'aucun intermédiaire n'est détecté pendant la biotransformation du MBT bien que ce dernier disparaît très rapidement avec une courbe typique d'une décroissance exponentielle (premier ordre). La est totale au bout de 100 heures pour une concentration initiale de 0.07 mM et de 91.7 % pour une concentration initiale de 0.13 mM. Pour le MBT, il faudrait cependant vérifier que la biodegradation est bien effective et que ce composé ne s'adsorbe pas sur le mycellium de *C. elegans*.

IV.C- Etude d'Ecotoxicité

En collaboration avec le Laboratoire de Biologie des Protistes de l'université Blaise Pascal de Clermont Ferrand (France), des études d'écotoxicité ont été entamées au niveau de ce laboratoire en utilisant un micro-biotest : le Microtox[®], sur tous les benzothiazoles étudiés ainsi que sur leurs métabolites hydroxylés.

Le test Microtox[®] est en fait un test de toxicité aiguë sur la bactérie marine, *Vibrio fischeri*, qui est en conditions normales de la lumière bleu-vert. Il s'agit alors de déterminer la concentration (CE₅₀) en toxique qui entraîne une inhibition de 50% de la luminescence naturelle de cette bactérie. Le tableau IV.8 présente les valeurs moyennes de CE₅₀ obtenues pour les différents xénobiotiques et leurs produits de biodégradation après 5, 10 et 30 minutes d'exposition au toxique.

Tableau IV.8 : Résultats du test Microtox[®] pour différents benzothiazoles à différents temps d'exposition (5, 15 et 30 min) au toxique ainsi que les écart types (σ) correspondants (U = NCH₂CONCH₃).

		CE ₅₀ (mg/L)			σ		
H	BT	0,349	0,357	0,364	0,020	0,029	0,028
OH	OBT	1,656	1,697	1,801	0,047	0,081	0,005
OH	diOBT	6,017	6,322	6,382	0,349	0,105	0,465
SH	MBT	0,410	0,410	0,212	0,015	0,017	0,018
SH	MBT(OH)	3,982	1,734	1,318	0,333	0,121	0,133
NH ₂	ABT	5,924	6,112	6,347	0,513	0,529	0,713
NH ₂	ABT(OH)	14,824	15,649	16,017	0,863	1,655	1,442
U	MBTU	27,263	24,235	22,665	2,875	2,206	2,385
U	MBTU(OH)	112,123	123,768	132,335	13,338	13,695	12,546
SO ₂ H	BTSO ₃	320,165	294,923	294,870	23,92	35,51	58,26

Dans l'ensemble, on constate qu'il n'y a pas d'écarts significatifs, entre les valeurs aux divers temps d'exposition ; ce qui implique que les effets toxiques de ces composés sont de type aigu.

Parmi tous les benzothiazoles testés le BT et le MBT présentent la toxicité la plus importante : $CE_{50} = 0,356$ et $0,292$ mg/L respectivement, alors que le BT SO_3 présente la toxicité la plus faible soit $303,32$ mg/L.

La présence d'un substituant en position 2 par le benzothiazole semble avoir une grande influence sur les effets toxiques de ces substrats. Tous les dérivés de benzothiazole ont une toxicité plus faible que celle du benzothiazole lui-même.

En ce qui concerne le MBTU, il semblerait que la dégradation de la chaîne urée conduit à des intermédiaires plus toxiques que la molécule de départ. En effet, l'hydrolyse de la liaison amide du MBTU ($CE_{50} = 27,263$ mg/L) donne lieu à un produit plus toxique l'ABT ($CE_{50} = 5,924$ mg/L), et il n'est pas exclu par analogie aux phénylurées que la mono- et la di-déméthylation (Tixier et al., 2000) conduisent au même phénomène.

Les réactions d'hydroxylation sur le noyau benzénique en position 6 ont donné lieu, dans tous les cas, à la formation des produits à plus faible toxicité que les molécules parents.

Le test choisi pour évaluer la toxicité de ces molécules est très intéressant car il est standardisé et permet une comparaison avec la toxicité d'autres xénobiotiques dans la littérature. Cependant, il doit être noté que ce test met en jeu une seule espèce de micro-organismes. Or, il est bien connu en toxicologie, que toutes les espèces ne présentent pas la même sensibilité à l'égard d'un même produit, d'où la nécessité d'étendre l'étude aux organismes pluricellulaires plus complexes (protozoaires par exemple).

Des approches couramment utilisées pour expliquer les effets toxiques observés consistent à établir une corrélation entre le caractère lipophile et la toxicité des molécules testées.

Les coefficients de partage K_{ow} (octanol /eau) ne sont pas connus pour l'ensemble des benzothiazoles étudiés, le tableau IV.9 donne à titre d'exemple les paramètres concernant trois composés.

*Tableau IV.9 : Quelques paramètres concernant BT, MBT et MBTU
a) (Brownlee et al., 1995) ; b) (Tomlin, 2000)*

Composé	Solubilité (mg/L) (24°C)	$\log_{10}K_{ow}$	CE_{50} (mg/L)
BT	3000^a	$1,99^a$	$0,349$
MBT	120^a	$2,41^a$	$0,410$
MBTU	59^b	$2,64^b$	$27,263$

BT est le moins hydrophobe et son K_{ow} est le plus bas, MBT est intermédiaire alors que MBTU est le plus lipophile comme prévu. La toxicité évolue apparemment dans le sens contraire de l'évolution de la lipophilicité.

CHAPITRE V

PHOTOTRANSFORMATION DES BENZOTHIAZOLES



V.1 Phototransformation du méthabenzthiazuron (MBTU)

V.1.1- Photolyse direct

Le méthabenzthiazuron (MBTU) est connu comme étant un herbicide peu voire pas photodégradable à $\lambda > 290$ nm (Jensen-Korte et *al.*, 1987). Cependant dans nos conditions de laboratoire on a trouvé qu'il se photolyse lentement dans l'enceinte à six lampes émettant entre 275 et 365 nm. En effet une solution de MBTU (10^{-4} M) irradiée pendant cinq heures conduit à une disparition de 15 % environ de substrat (figure V.1), ce qui est en accord avec un faible recouvrement entre le spectre solaire et celui de l'absorption UV-Visible de l'herbicide. Le temps de demi-vie calculé pour une réaction de pseudo-ordre un, est évalué à 15,7 heures.

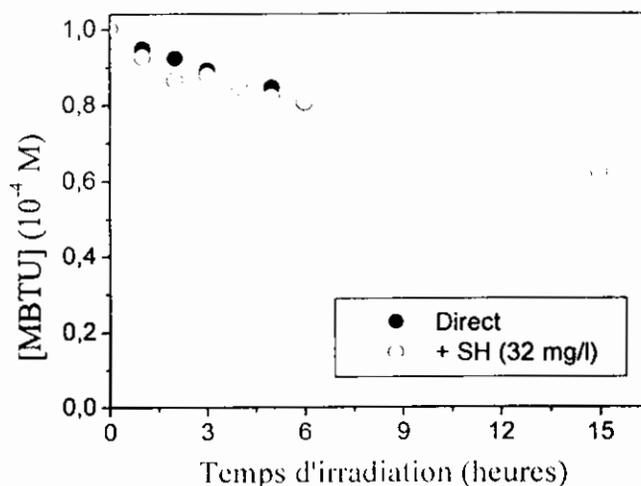


Figure V.1 : Photolyse du MBTU entre 275 et 365 nm

V.1.2- Photolyse en présence des substances humiques

Une solution aqueuse de l'herbicide MBTU (10^{-4} M) tamponnée à pH égal à 6,5 et contenant 25 mg/L d'acides humiques (AH) a été irradiée dans un réacteur en pyrex coupant les longueurs plus courtes que 290 nm, car seules les longueurs d'onde au-dessus de celles-ci atteignent la surface de la terre.

La courbe de disparition du substrat au cours du temps d'irradiation montre une légère accélération due probablement à l'effet photoinducteur des acides humiques. Le $t_{1/2}$ était de 17

% plus faible que celui de la photolyse directe en absence des acides humiques soit environ 13 heures. Ce résultat est dans l'ensemble en désaccord avec les résultats d'une étude ancienne concernant la photodégradation de l'herbicide méthabenzthiazuron en présence des substances humiques [Jensen-Korte et al., 1987]. En effet ces auteurs ont trouvé que le substrat ne se photolyse pas directement et que les substances humiques provoquent une accélération considérable sur la phototransformation pour aboutir à un temps de demi-vie de 21,9 heures avec une concentration de 100 mg/L en HA.

Cependant les auteurs n'ont pas précisé s'il s'agissait d'une transformation mono ou polychromatique et la concentration en substrat était environ vingt fois plus faible que celle utilisée dans notre étude.

Tableau V.1 : Temps de demi-vie (h) de la photodégradation du méthabenzthiazuron

Conc. HA (mg/L)	0	0	25	100
Jensen-Korte et al., 1987	Non dégradé	91.2	-	21.9
Présent travail	15.72	-	13.03	-

* Temps de demi-vie calculés pour un pseudo ordre-1

V.1.3- Photolyse en présence des ions nitrate et nitrite

La présence des ions nitrate dans le milieu naturel (chapitre I), en particulier les eaux naturelles, nous a incité à essayer de voir s'ils jouent un rôle dans la diminution de la concentration en herbicide dans l'environnement aquatique. Nous avons procédé à l'irradiation de solutions de 10^{-4} M du composé au voisinage de 310 nm et en présence des ions nitrate et nitrite dans différentes conditions de concentration et de pH.

Comme prévu, l'effet est net sur les vitesses initiales de disparition et les temps de demi-vie (tableau V.1).

L'effet des ions nitrate augmente avec leur concentration. Pour une concentration de 10^{-3} M en nitrate la vitesse initiale de disparition du substrat a pratiquement doublé par rapport à celle de la photolyse directe. En affectant cette concentration d'un facteur de deux, la disparition quant à elle, est affectée d'un facteur de trois (figure V.2).

Tableau V.2 : Effet des ions nitrate et nitrite sur les cinétiques de photodégradation du MBTU

	MBTU seul	Nitrate		Nitrite	
Con. (mol/L)	10^{-1}	10^{-3}	2.10^{-3}	10^{-4} (pH=5)	10^{-4} (pH=2)
k (10^4 mM.s ⁻¹)	0.64	1.23	1.97	2.06	5.00

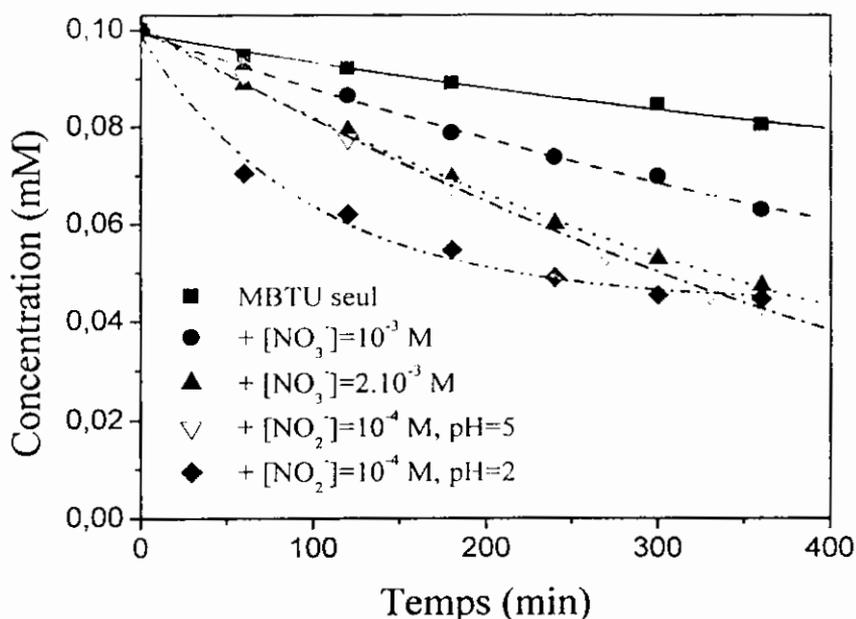


Figure V.2 : Photolyse du MBTU en présence des ions nitrate et nitrite

Les ions nitrite en solution non tamponnée (pH=5), sont plus efficace que les ions ^{nitrate} nitrite. En effet avec une concentration en nitrite vingt fois plus faible on aboutit à une disparition légèrement supérieure (figure V.2).

En tamponnant la solution à un pH au-dessous du pK_a de l'acide nitreux, le résultat obtenu est meilleur et la disparition est 8 fois plus importante avec une concentration égale à celle du substrat par rapport à la photolyse directe. Le t_{1/2} n'est que de quatre heures environ.



En plus de leur absorption à plus grandes longueurs d'onde ($\lambda_{\max} = 352 \text{ nm}$), les ions nitrite présentent l'avantage d'avoir un coefficient d'absorption molaire et un rendement quantique légèrement plus élevé que les ions nitrate.

Toutefois, à concentration élevée, les ions nitrite présentent l'inconvénient d'être de très bon capteurs de radicaux hydroxyle et donc leur pouvoir de dégradation vis à vis des composés organiques n'est efficace que pour les faibles concentrations en solution.

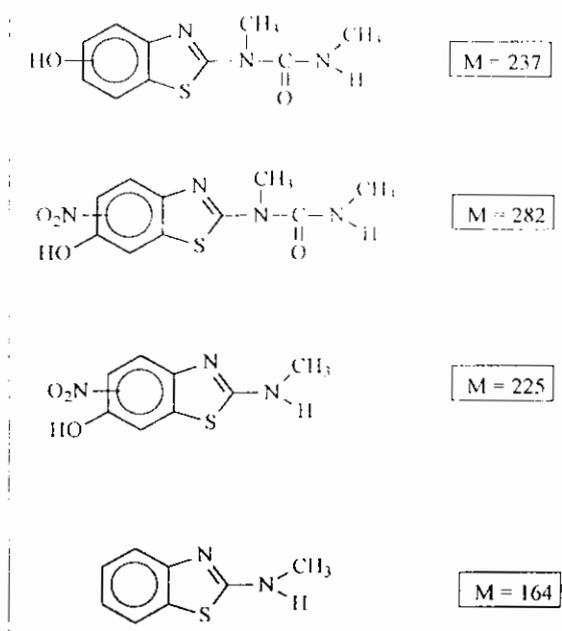
La chromatographie liquide haute performance a révélé la formation de quelques photoproduits qui ne s'accumulent pas d'une manière appréciable dans le milieu réactionnel rendant ainsi l'étude analytique plus difficile. Ceci est probablement dû au fait que les photoproduits formés ont une réactivité beaucoup plus importante que le produit de départ.

Dans le but d'avoir une idée sur les photoproduits formés au cours de ces réactions photo-induites par les ions nitrite ou nitrate, des solutions de MBTU (23 mg.L^{-1}) en présence de nitrate de sodium ($217,5 \text{ mg/L}$) et nitrite de potassium ($34,8 \text{ mg/L}$) ont été irradiées, dans des réacteurs en pyrex dans l'enceinte à six lampes, pendant 7,5 h (74% de disparition) et 5,5 h (47 % de disparition) respectivement. Le solvant est ensuite chassé grâce à un évaporateur rotatif sous pression réduite à température modérée. Le résidu sec est repris ensuite par de l'éther ou du méthanol. Le surnageant est analysé par spectrométrie de masse (APCI⁺).

Les résultats de l'analyse des fractions extraites sont les suivants :

- $M/z+1 = 226, 238, 283$ et 165 , ce qui correspond aux masses molaires $225, 237, 282$ et 164 respectivement. Les structures proposées sont mentionnées ci-après.
- On remarque que le 2-méthylaminobenzothiazole formé ($M=164$) résulte très probablement de la pyrolyse dans le spectromètre de masse du produit de départ vu la présence de ce fragment sur le spectre de masse MBTU pure.
- A priori la masse $M = 237$ correspond à un produit d'hydroxylation sur l'un des 4 sommets libres du cycle benzénique.

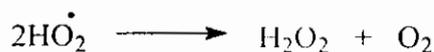
Néanmoins une co-injection du 6-OH-MBTU, produit précédemment par *A. niger*, dans la solution a permis de conclure que l'hydroxylation se produit également en position 6 par cette voie photochimique.



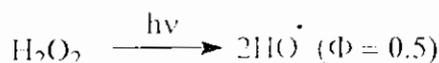
Nous proposons dans le paragraphe suivant les mécanismes radicalaires primaires et secondaires résultant de la photoinduction par les ions nitrate ou nitrite.

V.1.4- Mécanisme de formation du 6-OH-MBTU

La formation de ce produit a été déjà observé par action des microorganismes sur l'herbicide (voie enzymatique). Le mécanisme de sa formation par voie photocatalytique suit en toute vraisemblance un mécanisme radicalaire consistant en une attaque électrophile du radical hydroxyle sur la position 6 du cycle benzénique suivi de l'intervention du dioxygène pour éliminer un radical H de la position 5 pour former le 6-OH-MBTU et le radical HO₂[•]. Ce radical, peu réactif, peut se dismuter, en oxygène et peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le peroxyde produit peut à son tour photoinduire une nouvelle hydroxylation (Baxendale et Wilson, 1957) même si sa contribution reste faible vu sa concentration non importante et surtout du fait qu'il absorbe très peu aux longueurs d'onde d'irradiation :



La formation du 6-OH-MBTU est aussi envisageable par la dismutation de deux adduits radicalaires MBTU...[•]OH avec élimination d'une molécule d'eau et régénération du MBTU du départ (Schéma V.1).

Une fois formé, le 6-OH-MBTU peut donner lieu à des réactions décrites au § V.2.2.c.2 à savoir des réactions d'ouverture du cycle et de couplage.

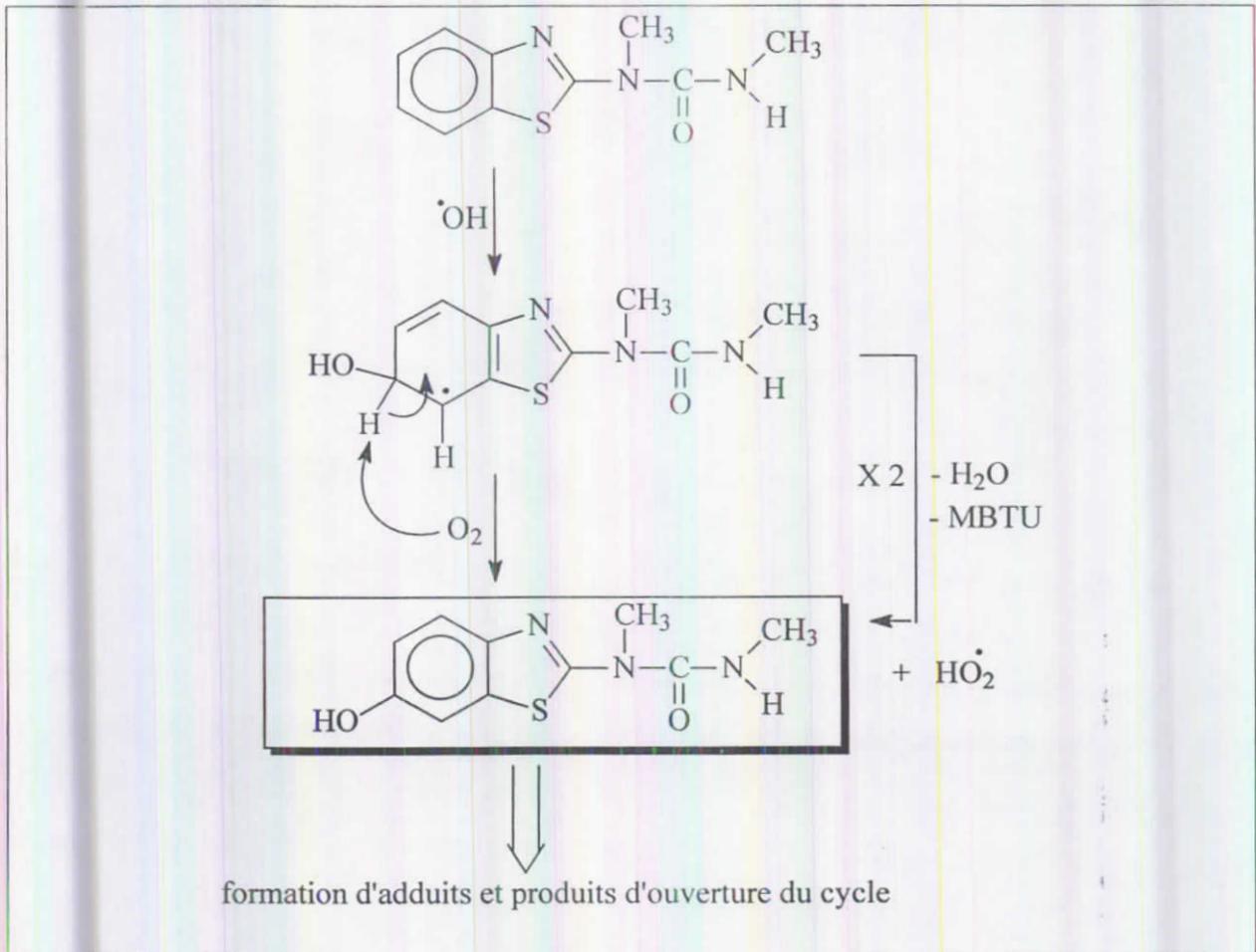


Schéma V.1 : Mécanisme de formation de 6-OH-MBTU

V.1.5- Mécanisme de formation de produits de nitration

En présence des espèces azotés issues de l'excitation des ions nitrite ou nitrate, le composé hydroxylé formé précédemment, peut réagir avec eux pour produire des composés nitrés (Schéma V.2).

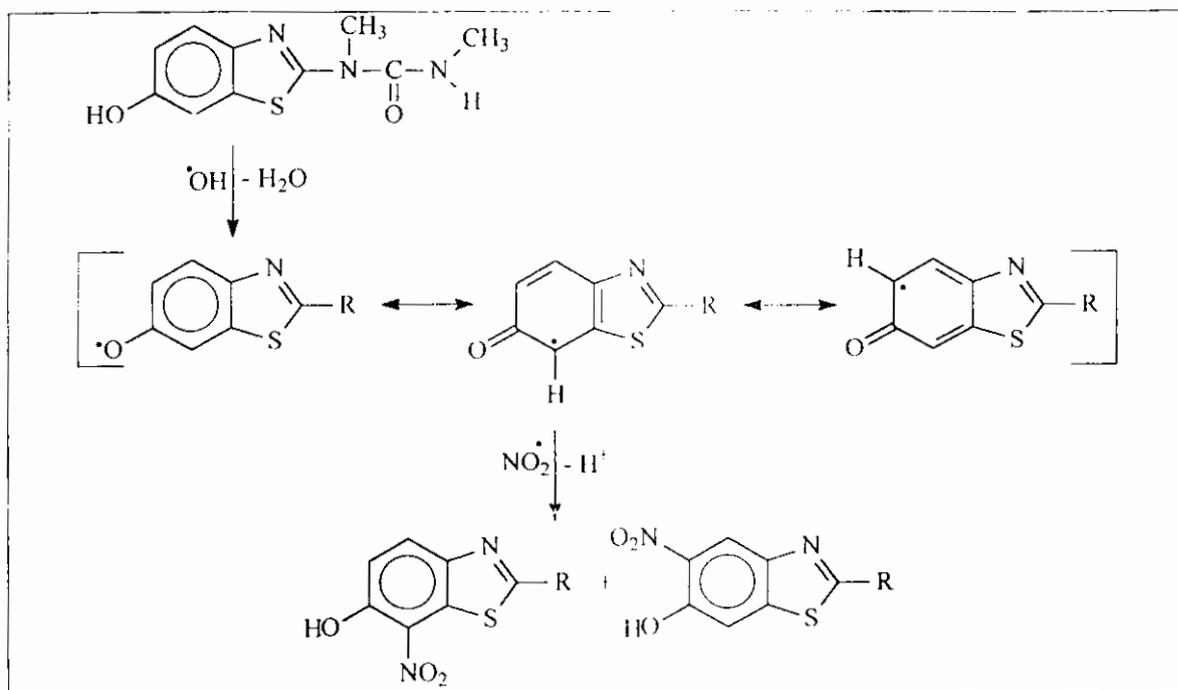


Schéma V.2 : Mécanisme de nitration de 6-OH-MBTU

V.1.6- Réactions de la chaîne urée

La réaction de la chaîne urée la plus fréquemment rencontrée est la N-déméthylation. Plusieurs fragments détectés en masse semblent être en relation avec cette désalkylation, notamment les fragments 193, 207, 209, 223 et 225. Ce dernier fragment pourrait correspondre à un produit d'hydrolyse d'une liaison amide d'un composé nitré (5 ou 7-nitro-6-OH-MBTU) (schéma V.3).

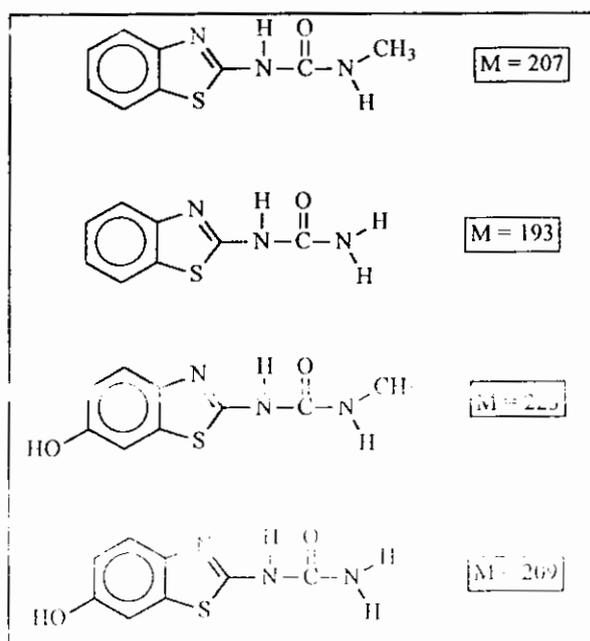


Schéma V.3 : Structures de quelques produits de déméthylation issus de la photoinduction de MBTU par les ions nitrate ou nitrite

Il est fort probable que ces réactions soient débutées par une oxydation progressive du groupement méthyle (hydroxylation, formylation...).

L'hydroxylation et la formylation du groupement méthyle ont été aussi proposées pour expliquer la N-déméthylation par voie biotique.

V.2 Phototransformation du 6-OH-MBTU

Le spectre UV du 6-OH-MBTU (10^{-4} M) en solution aqueuse est représenté sur la figure V.3. Le MBTU présente un maximum à 280 nm mais la bande d'absorption s'étend jusqu'à 320 nm par l'introduction du groupement fonctionnel OH sur le cycle benzénique.

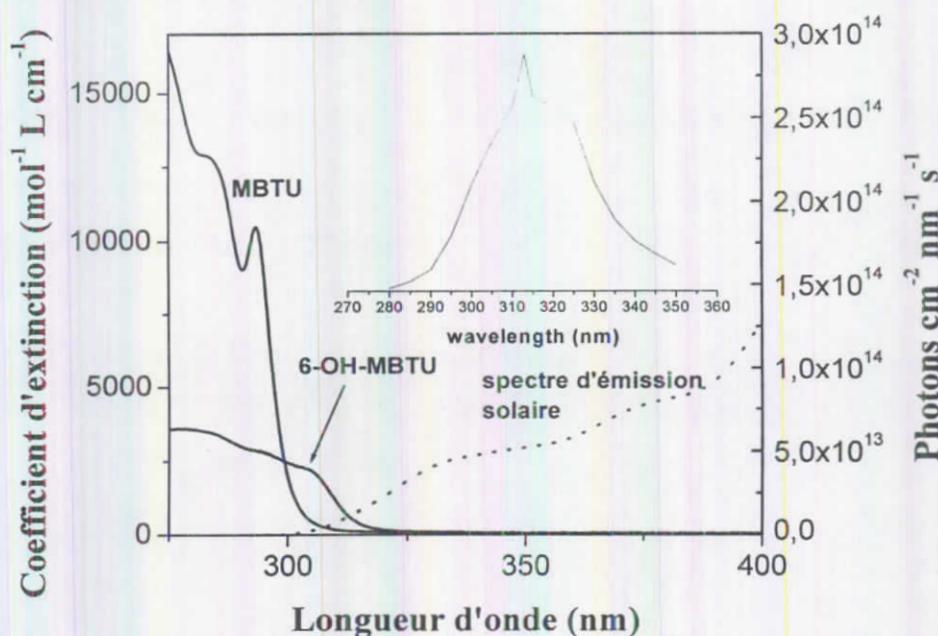


Figure V.3 : Spectre UV-visible du 6-OH-MBTU 10^{-4} M en solution aqueuse

Dans l'optique de déterminer le pKa du substrat, l'absorbance en fonction du pH a été suivie grâce au spectrophotomètre UV-Visible pour une concentration constante en substrat.

Le pKa a été déterminé en traçant la densité optique à une longueur d'onde (280 nm par exemple) en fonction du pH de la solution (figure V.3bis). La valeur trouvée est voisine de 10 et rappelle celle du phénol non substitué. Le 6-OH-MBTU a en effet une analogie réactionnelle avec celle-ci (formation du radical phénoxy, formation des dimères...).

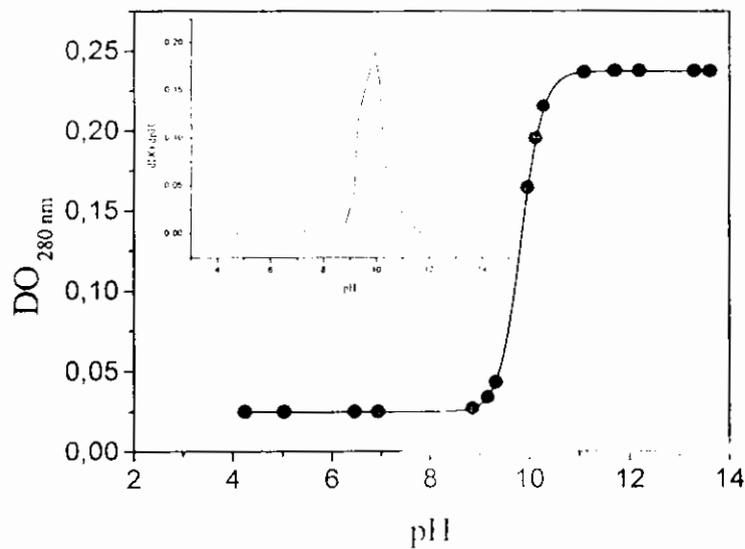


Figure V.3 bis : Détermination du pKa de 6-OH-MBTU

V.2.1- Détermination du rendement quantique à 313 nm

Le rendement quantique de disparition du 6-OH-MBTU a été mesuré par actinométrie au ferrioxalate de potassium. Le flux incident correspond à $I_0 = 1.1 \pm 0.1 \times 10^{15}$ photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ en irradiant à 313 nm. En considérant une disparition de 6 % en 7 heures en milieu aéré, le rendement quantique de disparition était évalué à $\Phi = 0.001 \pm 0.0002$ à 313 nm pour la forme moléculaire. Vu la valeur du pKa déterminée précédemment, seule cette forme peut jouer un rôle important dans les conditions environnementales. Néanmoins le rendement quantique de la forme anionique a été évalué aussi à $\Phi = 0.001 \pm 0.0002$ à 313 nm pour la forme anionique pour une disparition voisine de 17 % au bout de 3 heures d'irradiation.

Par contre dans un milieu désoxygéné, le rendement quantique de la photolyse est presque nul ($< 10^{-4}$). Ce résultat montre en toute évidence que l'oxygène est bien nécessaire pour que la phototransformation puisse avoir lieu.

V.2.2- Irradiation en lumière polychromatique à 310 nm

a)- Etude analytique

Une solution 10^{-4} M a été irradiée en lumière polychromatique à $\lambda > 310$ nm. Un chromatogramme typique est donné sur la figure V.4.

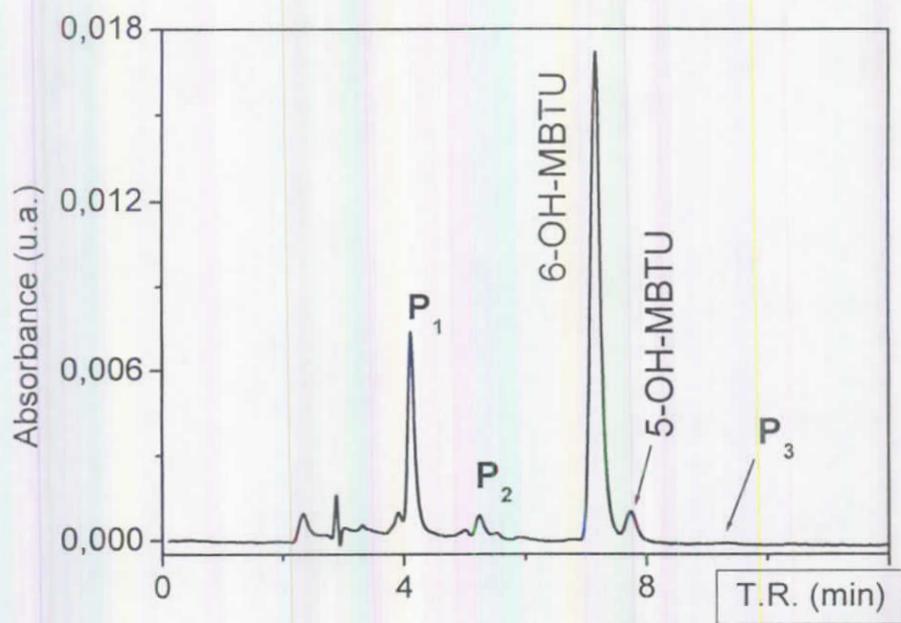


Figure V.4 : Chromatogramme CLHP d'une solution 10^{-4} M de 6-OH-MBTU Irradiée à 310 nm.

Plusieurs photoproduits sont observés sur ce chromatogramme, en particulier P_1 , P_2 et P_3 , qui représentent les produits majoritaires.

- Dans une phase mobile acidifiée, P_1 et P_2 sont élués avant le produit de départ et P_3 est élué après.
- Quand la phase mobile était un mélange eau pure/méthanol, P_1 a été élué très rapidement (au bout de 3 minutes), alors que les temps de rétention de P_2 et P_3 sont restés pratiquement constants.

Chacun de P_1 et P_2 montre une large bande d'absorption avec un maximum à 305 nm (figure V.5). Leurs spectres UV-Visible diffèrent significativement de celui du produit de départ, ce qui suggère d'importantes différences structurales.

Dans le but d'identifier ces photoproduits, 2 portions de 50 mL ont été irradiés dans l'enceinte de six lampes dites "310 nm". L'eau est évaporée dans le but de réduire le volume de la solution à 1 mL et ensuite ce concentré est analysé par HPLC-ESI-MS (voir matériels et techniques expérimentales : chapitre II, § A.6.2.1 et § A.6.2.2).

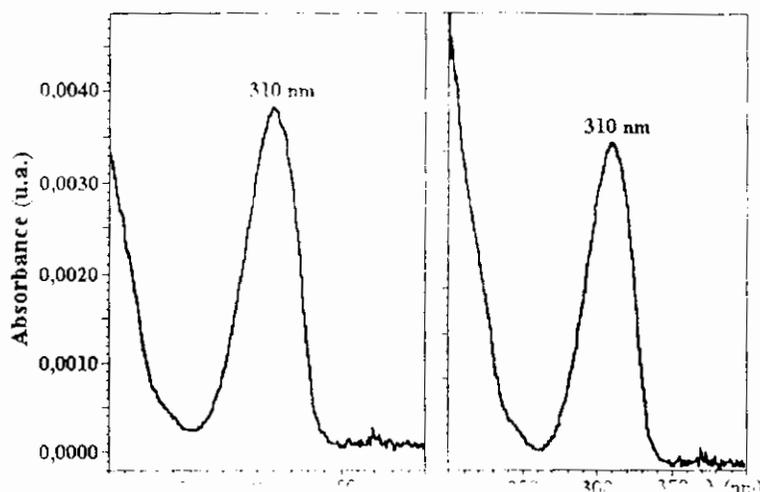


Figure V.5 : Spectres UV-Visible de P₁ et P₂

Les ions moléculaires obtenus pour P₁ correspondent à l'addition de O₂. La présence du fragment à [M-44] dans la HPLC-ESI-MS et l'ionisation dans une solution modérément acide indiquent que P₁ porte une fonction acide carboxylique (tableau V.3)

Tableau V.3 : Analyse HPLC-ESI-MS de 6-OH-MBTU et ses principaux photoproduits P₁, P₂ et P₃

Composé	Ions moléculaires m/z (ions minoritaire)
6-OH-MBTU	236 [M-H] ⁺ , 238 [M+H] ⁺ et 260 [M+Na] ⁺ (180)
P₁	268 [M-H] ⁺ , (224) 270 [M+H] ⁺ et 292 [M+Na] ⁺ (226)
P₂	226 [M+H] ⁺ et 248 [M+Na] ⁺ (169)
P₃	471 [M-H] ⁺ , 473 [M+H] ⁺ et 495 [M+Na] ⁺

L'analyse par RMN-¹H de 50 mL irradiés à λ > 290 nm et concentrés à l'évaporateur rotatif, est en accord avec la présence d'un proton sévèrement déblindé dans la zone des aldéhydes. L'ion moléculaire obtenu pour P₂ correspond à [M+32-44], c'est à dire l'addition de O₂ et la perte de CO₂. P₂ semble cependant être la forme décarboxylée du P₁.

En fin, les ions moléculaires observés pour P₃ correspondent à [2M-2H]⁺: il s'agit certainement des composés de couplage.

b)- Etude cinétique

La cinétique de disparition de la forme moléculaire de 6-OH-MBTU (10^{-4} M) irradié à 310 nm est représentée sur la figure V.6. Le temps de demi-vie est voisin de deux heures et demi.

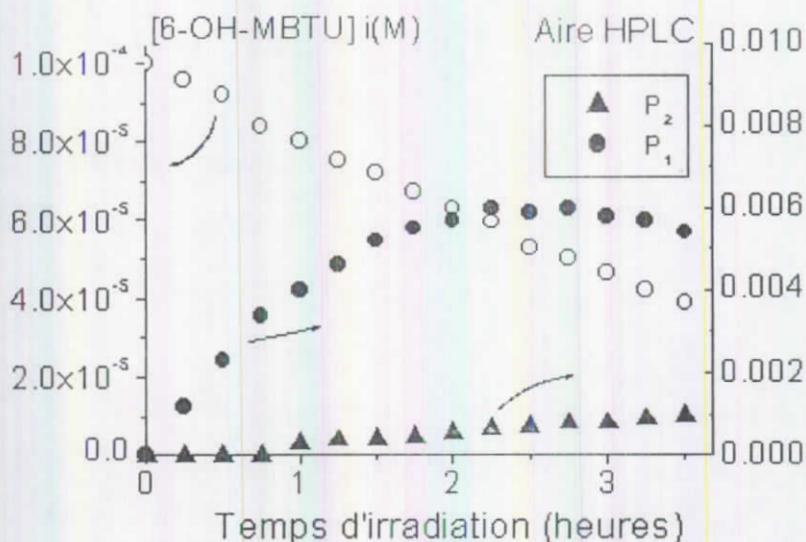


Figure V.6 : Cinétique de disparition de 6-OH-MBTU (10^{-4} M) irradié à 310 nm (pH=6,5)

Les cinétiques de formation de P_1 et P_2 ont aussi été suivies qualitativement au cours du temps d'irradiation. La forme des courbes obtenues indique que P_1 est un produit primaire alors que P_2 lui est un produit secondaire. La formation de P_1 atteint un maximum vers 160 minutes, au moment où la disparition du 6-OH-MBTU est de 50 % (figure V.7).

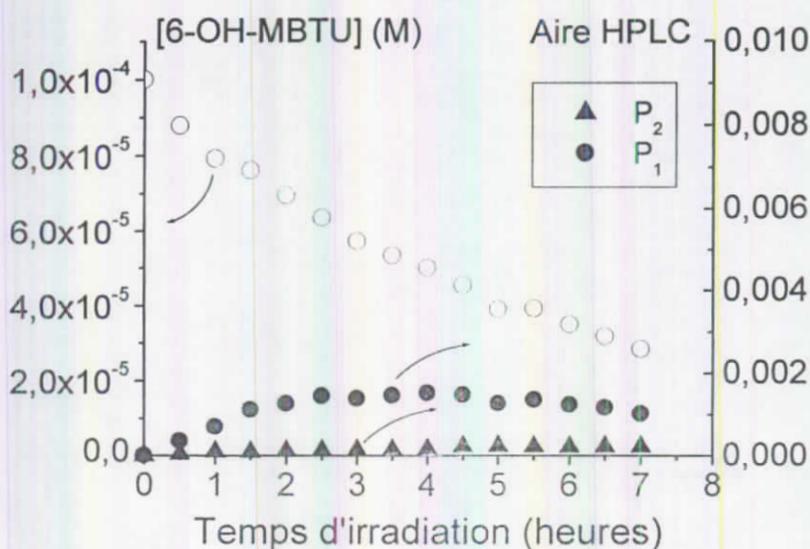


Figure V.7 : Cinétique de disparition de 6-OH-MBTU (10^{-4} M) irradié vers 310 nm en présence des acides humiques

La figure V.7 montre que le substrat se transforme plus lentement en présence des acides humiques (25 mg/L) qu'en leur absence.

Le temps de demi-vie était en effet de quatre heures dans le premier cas et de 2.5 heures uniquement dans le dernier cas.

A pH 12 la forme anionique disparaît beaucoup plus vite que la forme moléculaire. Le temps $t_{1/2}$ n'est que de 45 minutes pour la première forme soit 3 fois plus faible que celui de la seconde forme (Figure V.8). On note par ailleurs que le substrat n'est apparemment pas stable en milieu basique. On a constaté qu'au bout d'un moment la solution prend une coloration jaunâtre et que le spectre UV correspondant d'absorption présente une modification visible de la structure du substrat. En effet le spectre n'est constitué que d'une seule bande centrée à 305 nm.

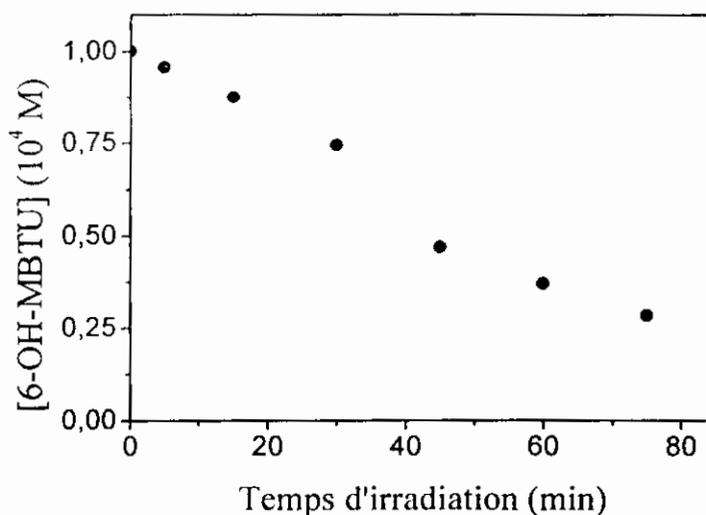


Figure V.8 : Cinétique de disparition de la forme anionique de 6-OH-MBTU (10^{-4} M) irradié à 310 nm (pH = 12)

L'accumulation des photoproduits est réduite d'une manière drastique en présence des acides humiques. Pour P_1 , le maximum de concentration est le tiers de celui mesuré en absence des acides humiques.

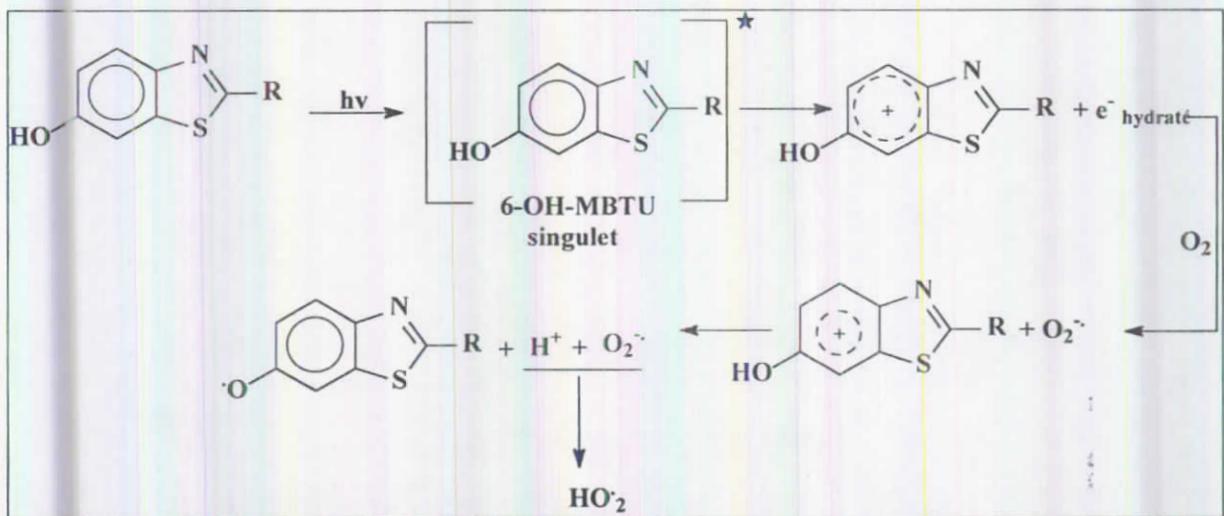
c)- Mécanisme réactionnel

La présence du groupement hydroxyle sur le cycle benzénique est un facteur très important à l'égard de la photodégradabilité. En effet, les composés phénoliques sont connus à pouvoir se photoioniser à partir de leur premier état singulet excité (Richard et Grabner, 1999). Cette réaction génère des électrons solvatés et des radicaux cations qui peuvent se déprotonner

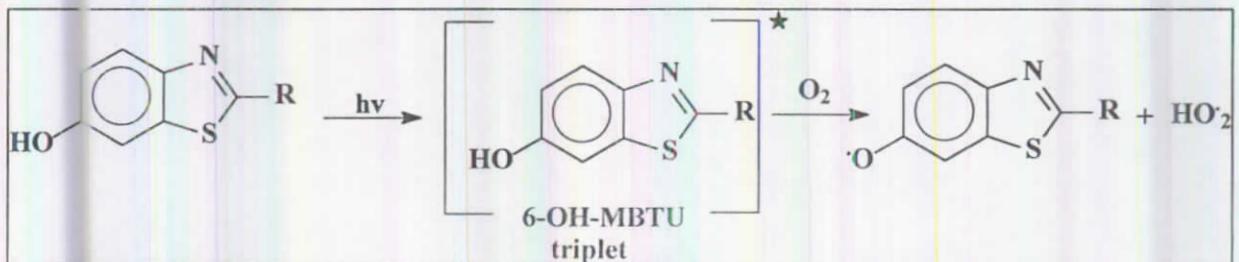
ultérieurement pour donner les radicaux phénoxy. Les électrons solvatés sont captés par l'oxygène et conduisent à la formation d'ion superoxyde.

Dans une deuxième étape, les radicaux phénoxy peuvent réagir aussi bien avec l'anion superoxyde pour donner naissance à des produits d'oxydation ou s'additionner au composé phénolique de départ pour former des dimères.

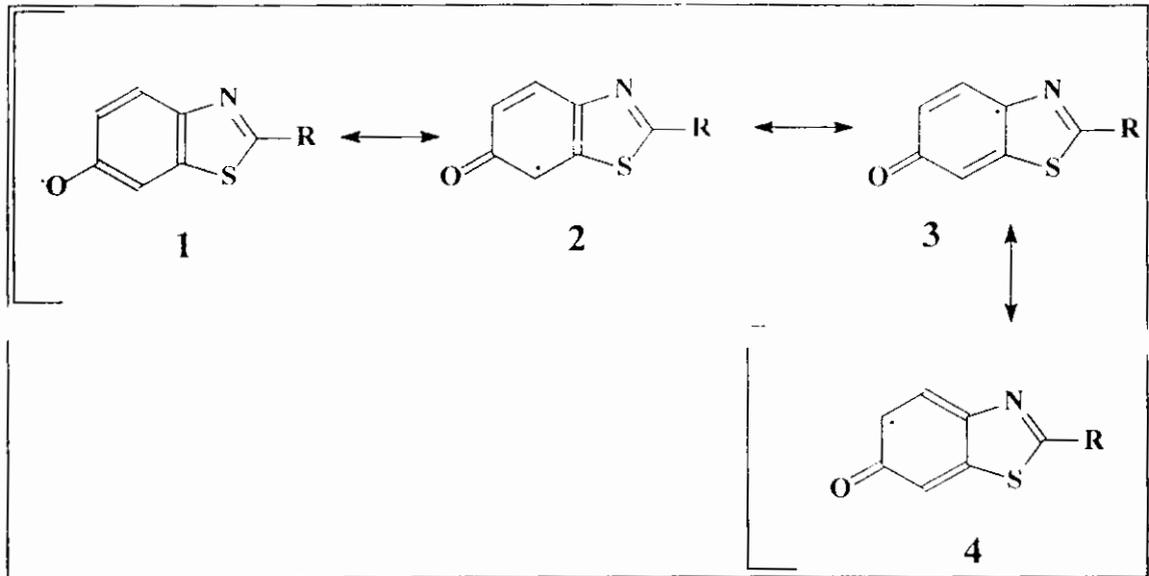
Les types de réaction observés avec le composé de départ (6-OH-MBTU) (effet de l'oxygène sur le rendement quantique de la photolyse, formation de produits d'oxydation et de dimères), sont compatibles avec la photoionisation comme étape initiale.



Il est possible aussi d'obtenir le radical benzothiazolyloxy à partir de l'état triplet du substrat, par arrachement d'un atome d'hydrogène par l'oxygène.



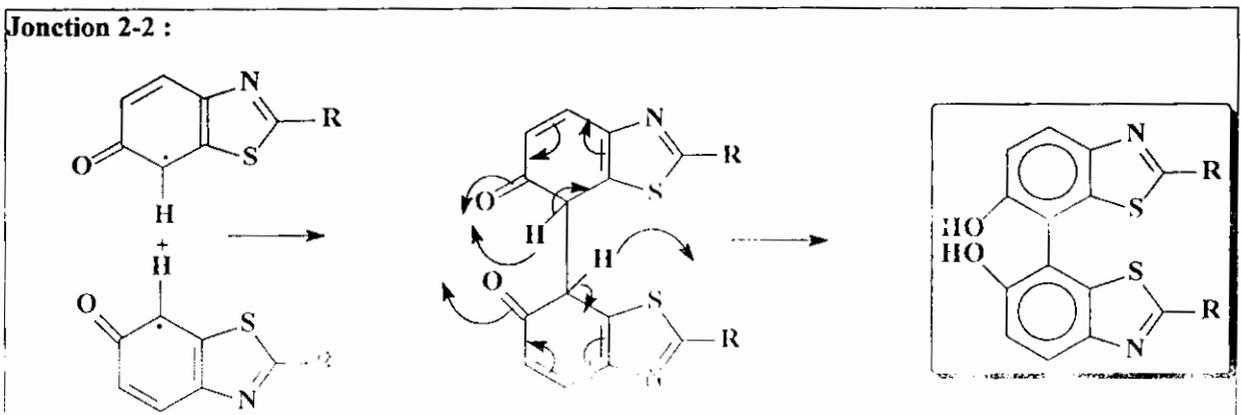
Le radical formé est en équilibre avec d'autres formes limites mésomères, dans lesquelles l'électron est porté par le carbone en position *ortho* ou *para* de l'oxygène.



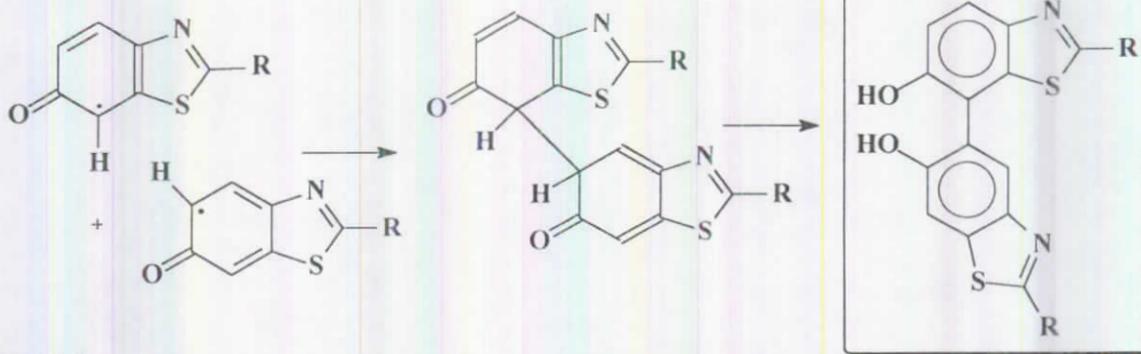
La contribution de la forme 3 (position *para* par rapport à l'oxygène) est peu probable en raison de son instabilité majeure (radical tertiaire).

c.1- Formation des dimères

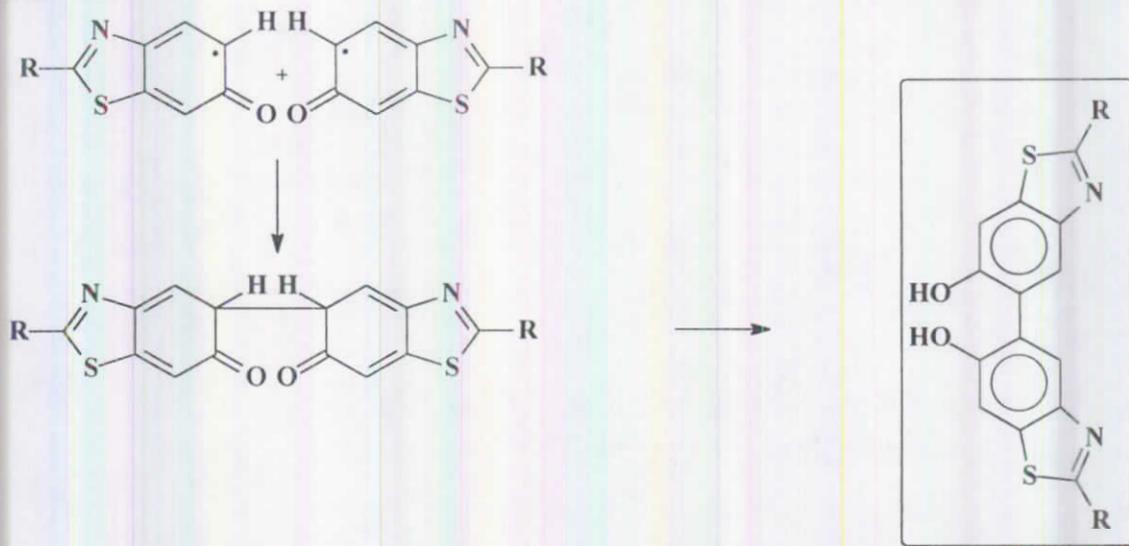
Ils se forment par la jonction 2-2, 2-4 ou 4-4. Cependant la chromatographie liquide haute performance et la spectrométrie de masse montrent la formation d'au moins deux dimères de masse 472, mais de polarité différente. Le choix de deux jonctions correspondantes ainsi que l'attribution des pics correspondant sur le chromatogramme CLHP n'est pas aisé.



Jonction 2-4:



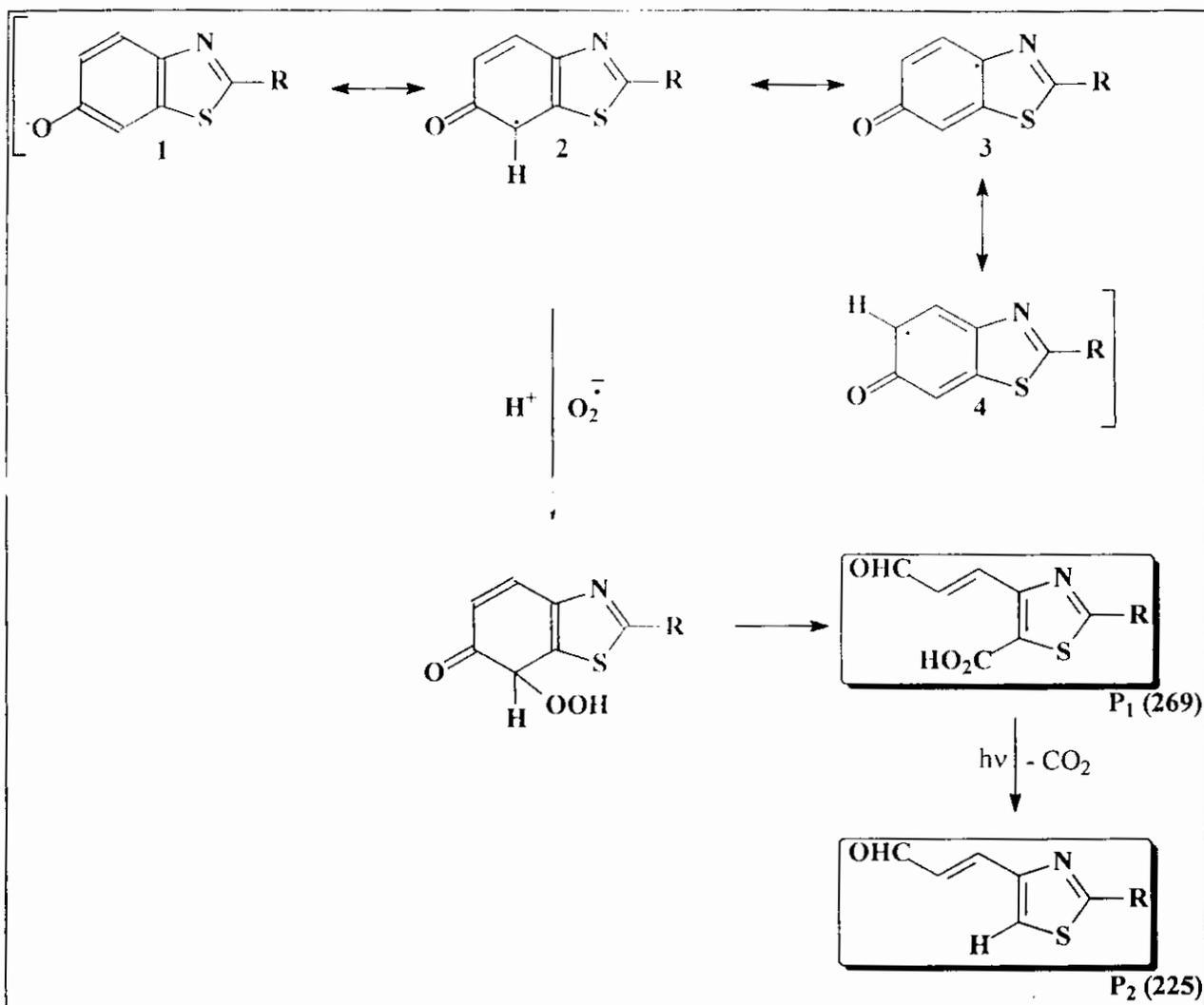
Jonction 4-4:



c.2- Formation de P₁ et P₂:

Il est fort probable que P₁ se forme à partir de la forme mésomère 2. P₁ en se décarboxylant donnera naissance à P₂. Néanmoins, la formation de P₂ est aussi envisageable a priori à partir de la forme 4 mais cette éventualité semble non souhaitable de point de vue énergétique.

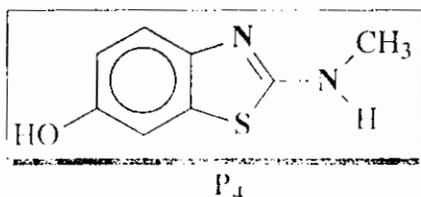
En effet, P₁ formé à partir de la forme 2 possède un hétérocycle aromatique (satisfait la règle de Hückel) cependant si P₁ était formé à partir de la forme 4 il donne lieu à un système sans aromaticité.



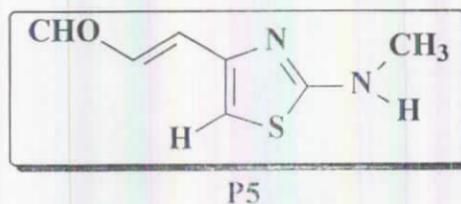
c.3- Formation d'autres produits de dégradation

La spectrométrie de masse couplée à la CLHP laisse penser qu'il se forme d'autres produits que les trois cités ci-dessus. Nous ne savons pas par ailleurs avec certitude s'il s'agit des produits issus de la phototransformation ou s'ils sont simplement formés par thermolyse dans le spectromètre de masse. Nous citons quelques uns ci-après :

✓ P₄ (180) : [M+H]=181 [M-1]=179 qui correspond au [6-OH-MBTU-CONHCH₃]



✓ P₂ (168) : il s'agit probablement de P₂-CONHCH₃



✓ P₆ (169) = [P₅+H]⁺ : c'est à dire qu'il n'est autre probablement que le produit P₅ protonné

✓ P₇ (287) = [P₁+H₂O]. Il pourrait s'agir de l'addition d'une molécule d'eau à la double liaison exocyclique.

✓ P₈ (294)

✓ P₉ (227)

✓ P₁₀ (209) = produit di-déméthylé

V.3 Phototransformation du 2-mercaptobenzothiazole (MBT)

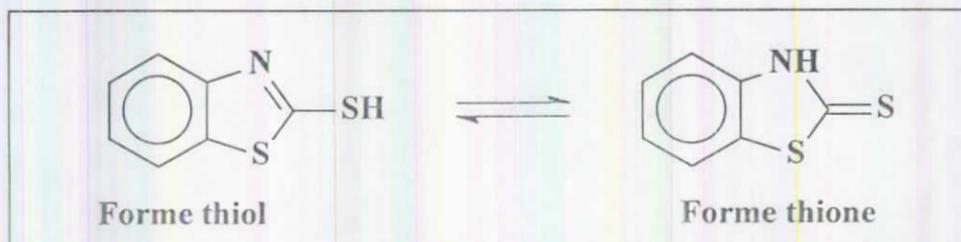
V.3.1- Caractéristiques physico-chimiques

a)- Propriétés spectrales

Les spectres d'absorption UV des deux formes du 2-mercaptobenzothiazole (MBT) sont données sur la figure V.9.

La forme moléculaire présente un maximum d'absorption à 321 nm, le coefficient d'extinction molaire étant égal à 22800 M⁻¹ cm⁻¹. La forme anionique a un maximum à 305 nm et le coefficient d'extinction molaire est égal à 17900 M⁻¹ cm⁻¹. La forme moléculaire peut se trouver sous deux formes tautomères.

D'après la littérature (Ellis et Griffiths, 1966) la forme thione serait largement prépondérante.



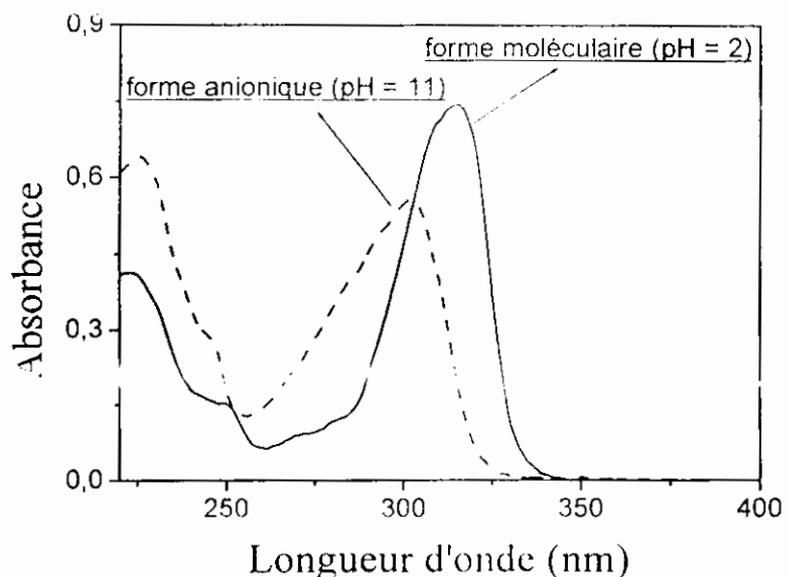


Figure V.9 : Spectres UV-visible des deux formes du MBT en solution aqueuse

b)- Mesure du pKa

Pour déterminer le pKa de MBT, nous avons enregistré le spectre d'une solution de concentration fixe à plusieurs pH compris entre 2 et 11. Puis, nous avons relevé les absorbances à une longueur d'onde où la forme moléculaire absorbe beaucoup plus que la forme anionique.

Nous avons ainsi obtenu le tracé donné figure V.9 qui permet une détermination graphique du pKa. On obtient $pK_a = 6,94 \pm 0,05$.

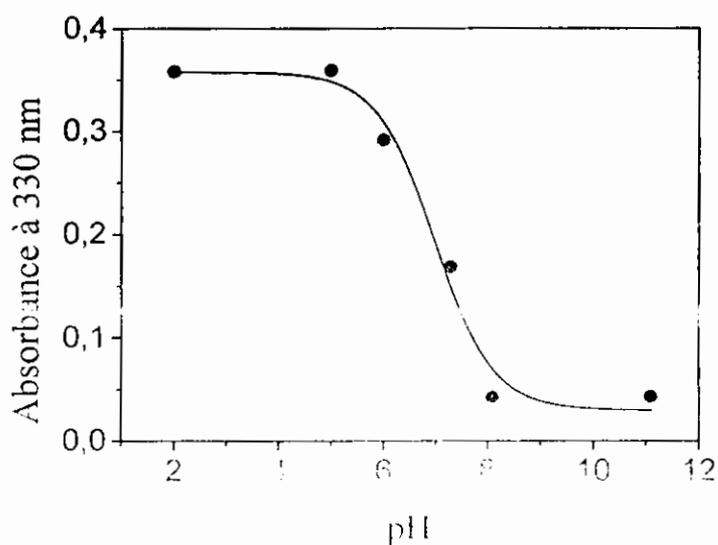


Figure V.9 : Variation de l'absorbance à 330 nm d'une solution de MBT en fonction du pH

V.3.2- Photolyse par éclairs

La photolyse laser d'une solution moléculaire de MBT (3×10^{-5} M), pH=5,0 n'a pas permis d'observer d'espèces transitoires. En revanche, la même expérience sur une solution tamponnée à pH= 8,3 a donné lieu à l'observation de trois transitoires.

- Le premier, de très courte durée de vie ($\tau = 0,2 \mu\text{s}$), présente une bande large avec un maximum d'absorption vers 510 nm (figure V.10). C'est une espèce de courte durée de vie qui disparaît par une cinétique du premier ordre en solution desoxygénée ($k=4,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). Sa disparition est accélérée lorsque l'on sature la solution en oxygène ($k=7,1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) ou lorsque l'on ajoute de l'acrylate de méthyle à 2×10^{-2} M ($k=1,7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) (figure V.11). Cette espèce pourrait donc correspondre à l'état excité triplet.

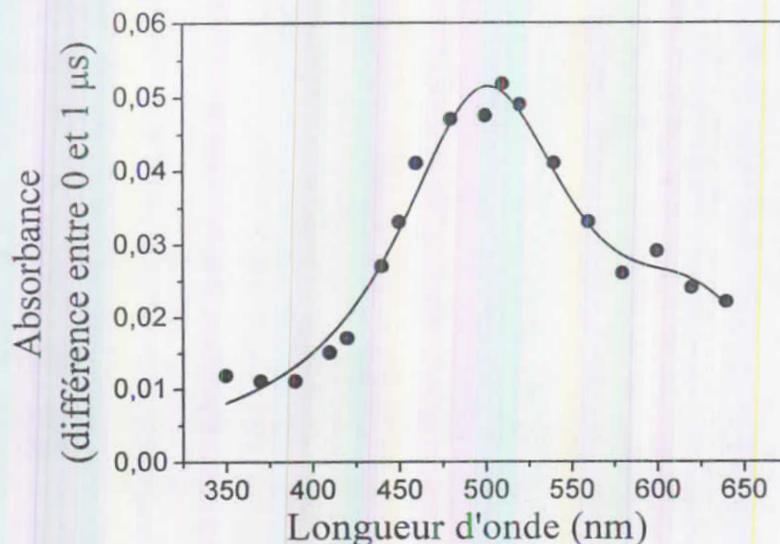
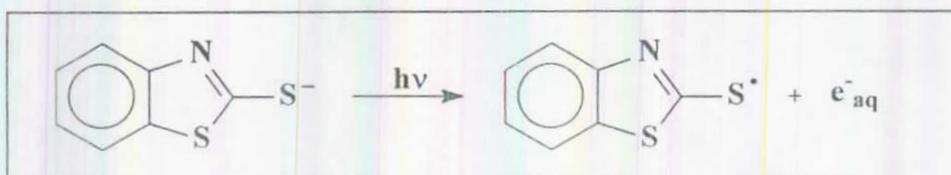


Figure V.10 : Spectre d'absorption transitoire d'une solution desoxygénée de MBT tamponnée à pH=8.0

- Le deuxième transitoire observé a un maximum vers 725 nm ce qui est caractéristique de l'électron solvaté en milieu aqueux. Il disparaît par une cinétique du premier ordre ($k = 2,5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) dans un milieu desoxygéné et il est piégé par l'oxyde nitreux N_2O .



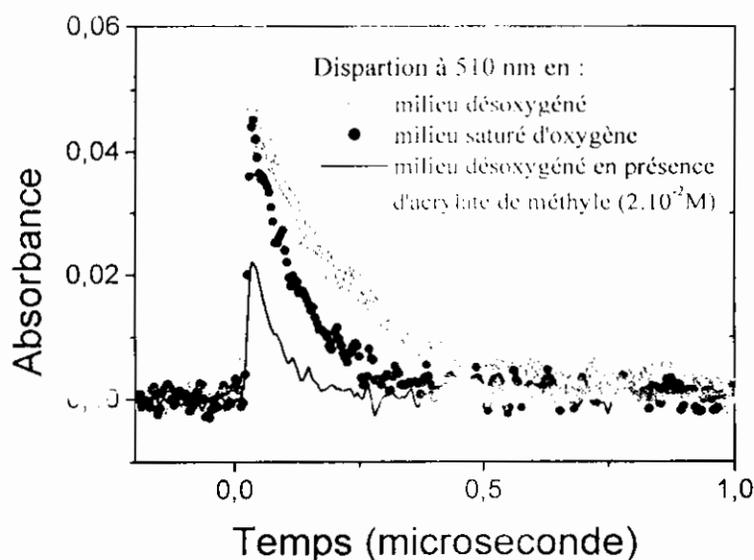


Figure V.11 : Cinétique de disparition du MBT à 510 nm en milieu : (○) désoxygéné, (●) saturé d'oxygène, (—) désoxygéné et en présence d'acrylate de méthyle ($2 \times 10^{-2} M$)

- La troisième espèce détectée absorbe entre 340 et 380 nm avec un maximum à 350 nm (figure V.12). Sa durée de vie est plus longue que celle des 2 autres transitoires puisqu'elle est d'environ 100 μs . Cette dernière espèce dont la formation semble associée à celle de l'électron solvaté est vraisemblablement le radical benzothiazolye formé par photoionisation après départ de l'électron.

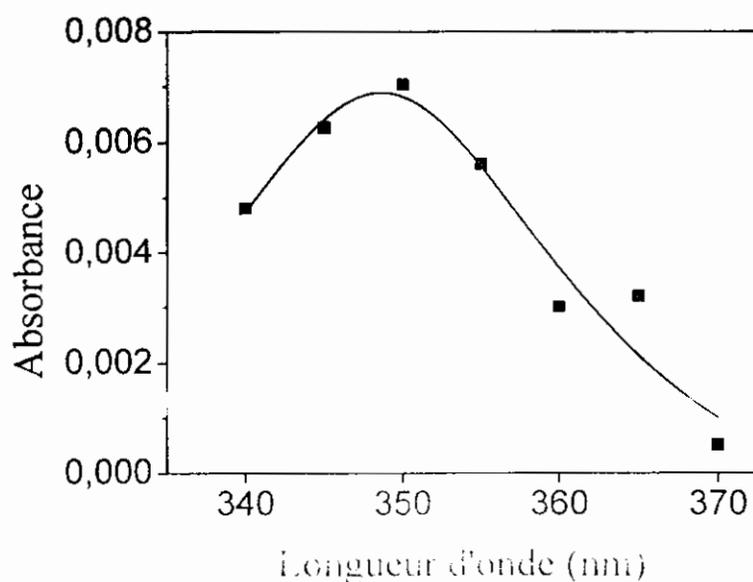


Figure V.12 : Spectre d'absorption transitoire obtenu par photolyse laser à 266 nm d'une solution du MBT en milieu désoxygéné

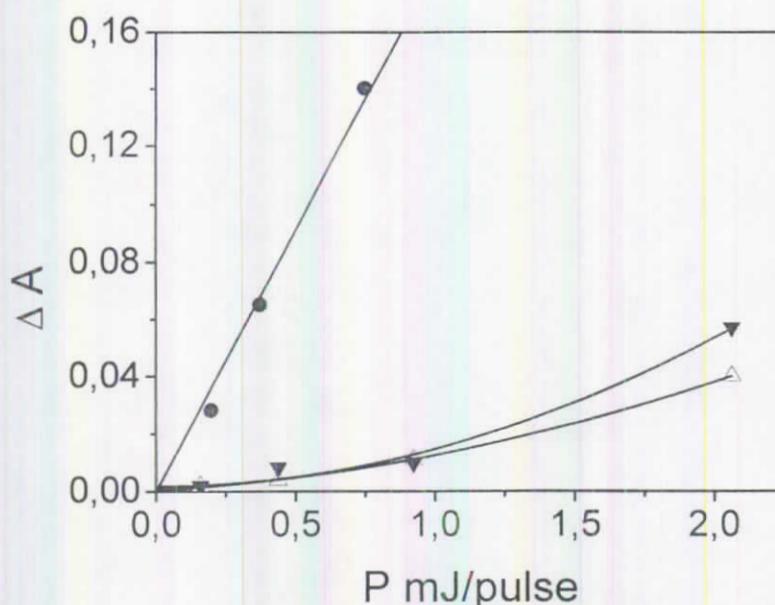


Figure V.13 : Dépendance de la densité optique à 510 (●), 350 (Δ) et 725 (▼) nm avec l'énergie d'excitation laser P. $[MBT] = 1,2 \times 10^{-4} M$, $\lambda_{excitation} = 266 nm$, $pH = 8$

Nous avons représenté les absorbances de fin d'impulsion à 510, 725 et 350 nm en fonction de l'énergie P d'impulsion sur la figure V.13. La décroissance de l'absorbance à 510 nm est linéaire avec P indiquant ainsi une formation par un processus monophotonique de l'espèce. Par contre les absorbances à 350 et 725 nm croissent d'une manière presque quadratique avec P montrant ainsi des formations par des processus mixtes mono et biphotoniques des espèces concernés. La similitude des courbes indique que les deux transitoires sont produit par les mêmes processus. Il pourrait donc être conclu que les espèces de longue durée de vie sont le radical benzothiazolyle et l'électron solvaté, qui sont produits simultanément par photoionisation. Sur la base de piégeage par l'oxygène et le méthylacrylate, l'espèce de courte vie pourrait être attribuée à l'état excité triplet.

V.3.3- Irradiation en lumière continue

L'étude de la phototransformation directe de BT-SH a été principalement effectuée avec les formes moléculaire et anionique, formes susceptibles d'être présentes dans les eaux naturelles. Comme le montre les spectres UV des deux formes de la figure V.8, l'absorption du composé se prolonge jusqu'à 350 nm.

L'irradiation d'une solution 3×10^{-5} M à pH = 5,26 en milieu aéré conduit à une diminution importante de la bande d'absorption à 320 nm, mais aucune nouvelle bande n'a été observée (figure V.14a). On aurait pu penser que l'évolution de l'absorbance à cette longueur d'onde à faible degré d'avancement pourrait permettre le calcul du rendement quantique de disparition, mais les spectres enregistrés indiquent qu'un ou plusieurs produits absorbent dans le même domaine de longueurs d'onde.

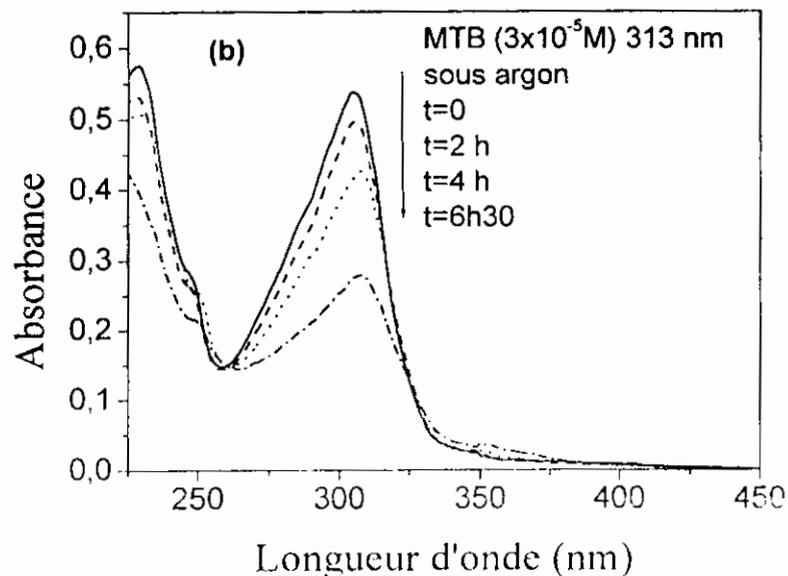
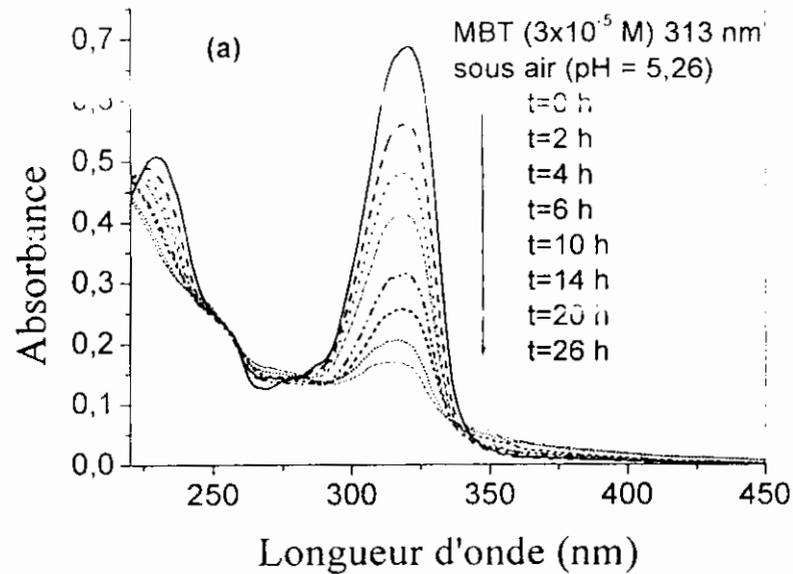


Figure V.14 : Evolution de l'absorbance d'une solution 3×10^{-5} M de MBT, pH = 5,26, irradiée à 310 nm en milieu : (a) aéré, (b) désoxygéné

Afin d'évaluer avec précision le rendement quantique de disparition de BT-SH, toutes les mesures quantitatives ont été effectuées par CLHP selon le protocole décrit dans la partie expérimentale. Cette dernière méthode nécessite un avancement voisin de 10 %.

Dans une première étape, nous avons mesuré les rendements quantiques de photolyse de BT-SH à 313 nm. En milieu désoxygéné à l'argon (figure V.14b), la forme moléculaire a un rendement quantique de photolyse inférieur à 5×10^{-4} . Avec la forme anionique, nous avons trouvé $1,3 \times 10^{-3}$. En solution saturée d'air, on a trouvé respectivement $1,9 \times 10^{-3}$ et $1,9 \times 10^{-2}$ pour les formes anionique et moléculaire. Ces résultats montrent tout d'abord que l'anion est beaucoup plus réactif que le composé neutre. Ensuite, ils montrent que l'oxygène a un effet accélérateur sur la réaction. En plus, nous avons irradié la forme anionique dans une solution saturée en oxyde nitreux. Nous avons trouvé un rendement quantique de photolyse égal à $(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-3}$ légèrement supérieur que celui de la solution saturée en argon.

Dans une deuxième étape, nous avons suivi la formation des photoproduits en analysant des solutions irradiées par CLHP. L'irradiation en solution désoxygénée conduit à la formation apparemment unique de BT-H ($\eta > 90\%$). En solution aérée, le benzothiazole (BT-H) et le 2-hydroxybenzothiazole (BT-OH) ont pu être détectés. Un troisième photoproduit présentant un temps de rétention très court est également observé. Ce produit qui est élué avec le pic du solvant est vraisemblablement sous forme ionique. Il se pourrait donc que ce soit un acide.

V.3.4- Irradiation en lumière solaire

Des solutions de 2-mercaptobenzothiazole (10^{-4} M) ont été irradiées en lumière solaire dans de l'eau pure tamponnée à pH=8.0 par des tampons phosphate et dans de l'eau naturelle prélevée dans le lac d'un barrage (Villerest sur la Loire près de Roanne). Par CLHP, nous avons suivi, dans les deux cas, la disparition de MBT et la formation des deux principaux photoproduits BT-H et BT-OH. Les résultats sont présentés figure V.15.

Dans l'eau pure, le temps de demi-vie de BT-SH est d'environ 250 min, alors qu'il n'est que de 65 min dans l'eau de barrage. Dans l'eau pure, BT-H et BT-OH sont formés dans des quantités assez voisines. Dans l'eau naturelle, BT-H et BT-OH sont formés plus rapidement en accord avec le fait que BT-SH disparaît plus vite. On note également que la formation de BT-H est nettement favorisée par rapport à celle de BT-OH. Ceci nous permet de conclure que les constituants

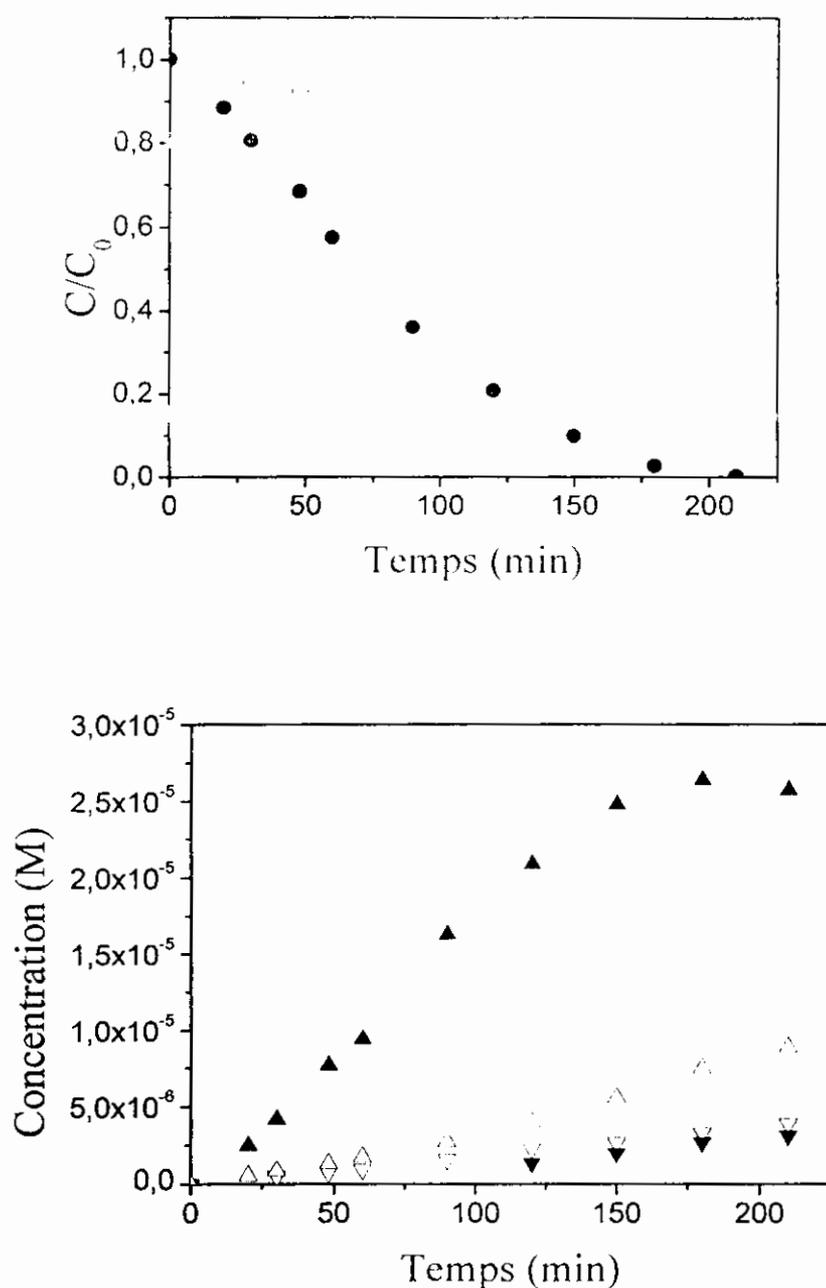


Figure V.15 : A-Cinétique de disparition de MBT (10^{-4} M) en lumière solaire (réacteur en quartz) : (○) dans l'eau pure, (●) dans l'eau naturelle
 B-Formation des photoproduits : (Δ) (▲)BT-H ; (▼)(▽): BT-OH

chromophores de l'eau de barrage accélèrent la disparition de BT-SH et favorisent la formation de BT-H.

Après un taux de conversion de 50 %, BT-H et BT-OH sont formés dans l'eau Milli-Q avec des rendements chimiques respectifs de 13 et 6 % . On note également que la formation de BT-

H est nettement favorisée par rapport à celle de BT-OH dans l'eau naturelle, BT-H étant produit avec un rendement chimique de 25% alors que le BT-OH était seulement détecté en état de trace.

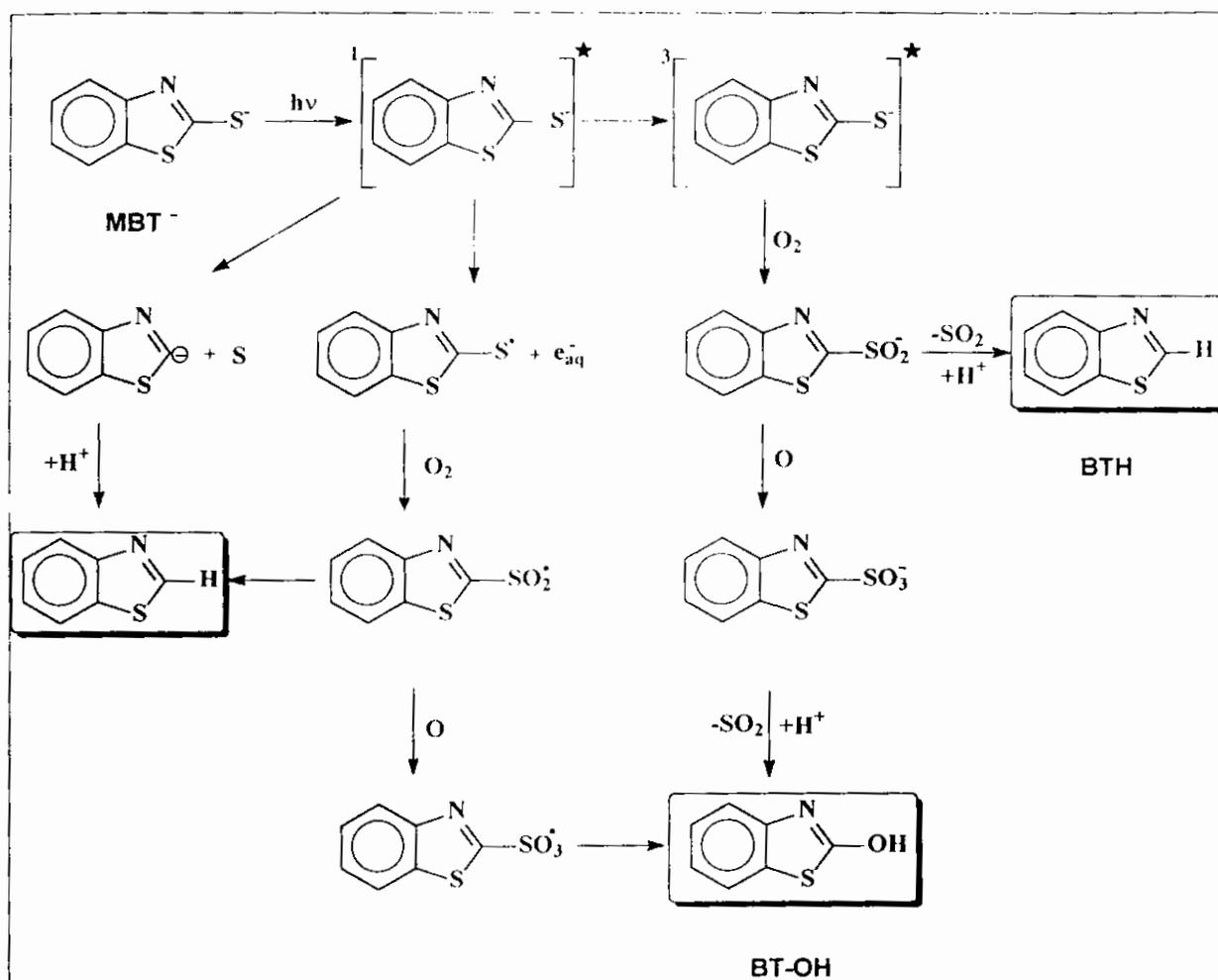
On remarque enfin sur la figure V.15 que les photoproduits continuent de se former alors même que la concentration de MBT dans le milieu est devenue très faible. Ceci indique que ce ne sont pas des produits primaires mais qu'ils proviennent de la décomposition lente, thermique ou photochimique, de substances intermédiaires.

V.3.6- Mécanisme

Les expériences de la photolyse laser portent des informations sur les étapes primaires de la photolyse du MBT. Elles ont permis la détection de l'état excité triplet anionique du MBT. Ce dernier montre quelques similitudes spectrales avec les états triplet de thiones aromatiques comme c'est rapporté dans la littérature. Le triplet de la pyridine-4(1*H*)-thione et la pyridine-2(1*H*)-thione montrent une large bande dans l'acétonitrile avec des maximums respectivement à 428 et 455 nm, (Alam et *al.*, 1998). Le triplet du 4,6-diphényl-3-cyanopyridine-2(1*H*)-thione a été aussi détecté dans l'acétonitrile sous forme d'une bande large avec un maximum à 520 nm (El-Kemary et *al.*, 2000). Il a été aussi prouvé que l'anion subit la photoionisation pour conduire à la formation des électrons solvatés et le radical benzothiazolye.

L'ensemble de ces observations nous permet de proposer le schéma réactionnel suivant :

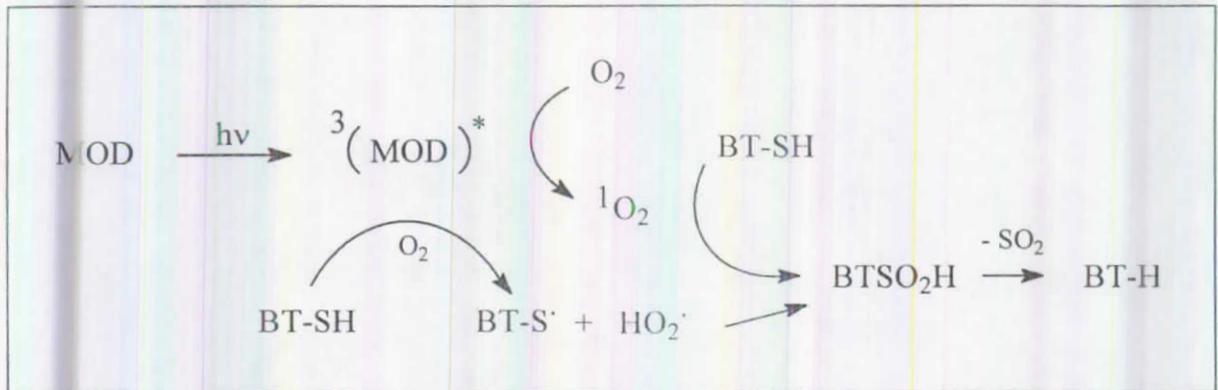
- ❖ En milieu désoxygéné, la transformation de MBT implique vraisemblablement l'état excité singulet qui subit une photoionisation ou une coupure C-S. Dans l'eau cette coupure pourrait être hétérolytique conduisant au carbanion qui par protonation va donner BT-H.
- ❖ En présence d'oxygène, d'autres réactions se produisent : oxydation du triplet et du radical BTS; en particulier. Les formations de BT-H et de BT-OH pourraient résulter de l'élimination de SO₂.



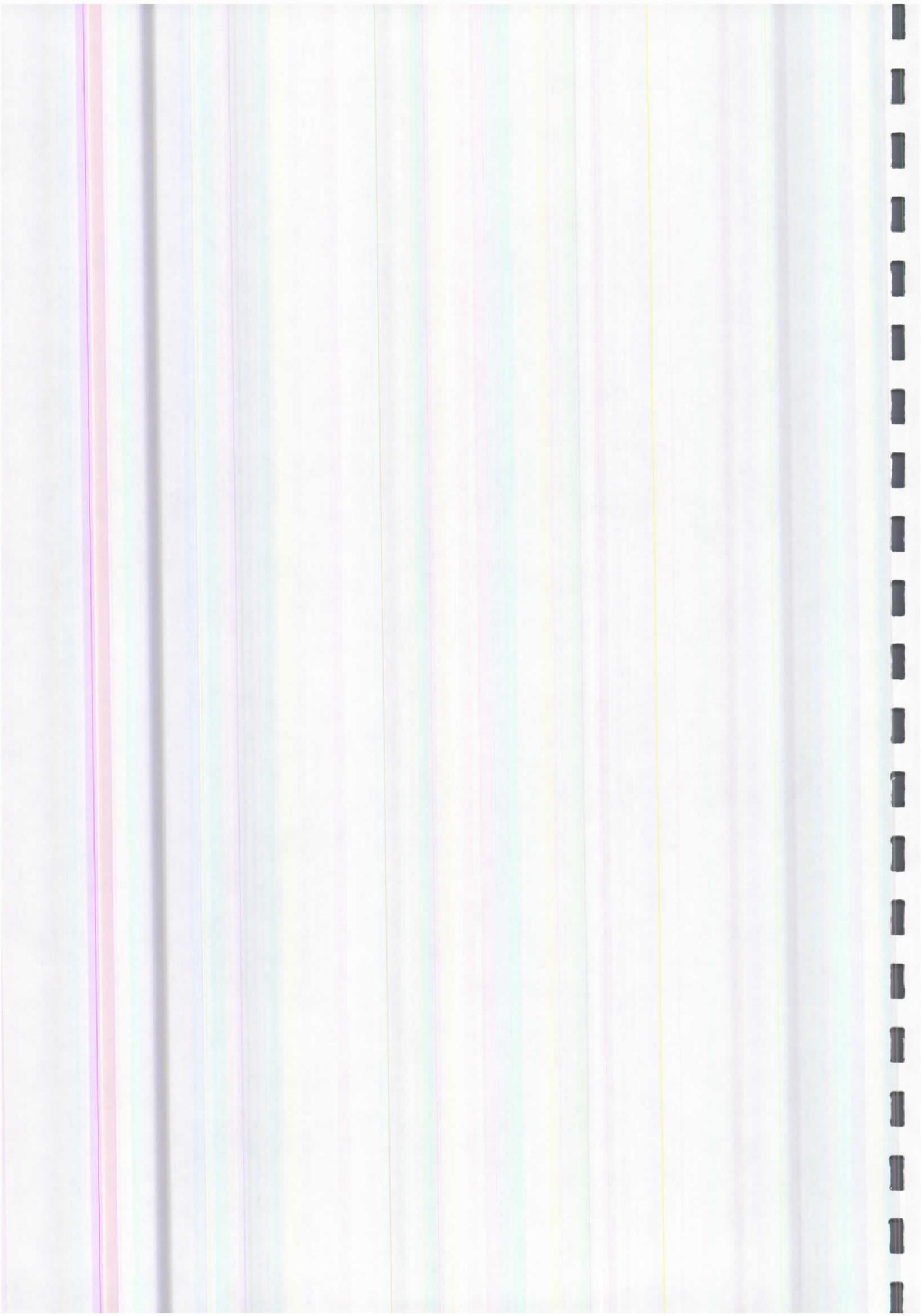
Lors des expositions en lumière solaire, on a constaté que MBT disparaît plus vite dans l'eau naturelle que dans l'eau distillée. Ceci prouve que ce substrat disparaît non seulement par photolyse directe mais aussi par réaction photoinduite. Il est bien connu que les constituants chromophores de l'eau et notamment la matière organique naturelle produit des espèces réactives comme par exemple de l'oxygène singulet. Cette espèce avec laquelle les composés soufrés réagissent facilement est vraisemblablement capable d'oxyder MBT. On peut s'attendre à ce que l'oxydation de MBT par ¹O₂ conduise au sulfinate comme cela a été décrit dans la littérature (Robert-Banchereau et al., 1997, Pasto et al., 1994) pour des composés de ce type. Comme décrit dans le schéma ci-dessus, la perte de SO₂ va conduire à la formation de BT-H composé très majoritaire dans l'eau naturelle.

En conclusion, nous avons étudié la phototransformation du 2-mercaptobenzothiazole dans l'eau par irradiation continue et cinétique rapide. Seule la forme anionique se photolyse de façon mesurable. Différentes réactions se produisent : photoionisation ou rupture de la liaison C-S à partir du singulet et oxydation du triplet. Dans tous les cas le centre réactif est le thiolate. La

phototransformation du 2-mercaptobenzothiazole peut être également photoinduite par les chromophores présents dans les eaux naturelles (Matière Organique Dissoute).



CONCLUSIONS & PERSPECTIVES



Conclusions

La photolyse des halobenzonitriles en solution aqueuse conduit principalement à la réaction de la photohydrolyse en plus des réactions de la réduction. La nature de l'halogène ne semble pas affecter la nature de photoproduits mais leur quantité. La photoréduction devient la réaction très majoritaire en solution alcoolique. Différents intermédiaires ont été mis en évidence. Le bilan final abouti à une déshalogénéation totale de substrats. L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire concernant le comportement photochimique des halobenzonitriles en solutions aqueuse ou alcoolique est résumé sur la figure 1.

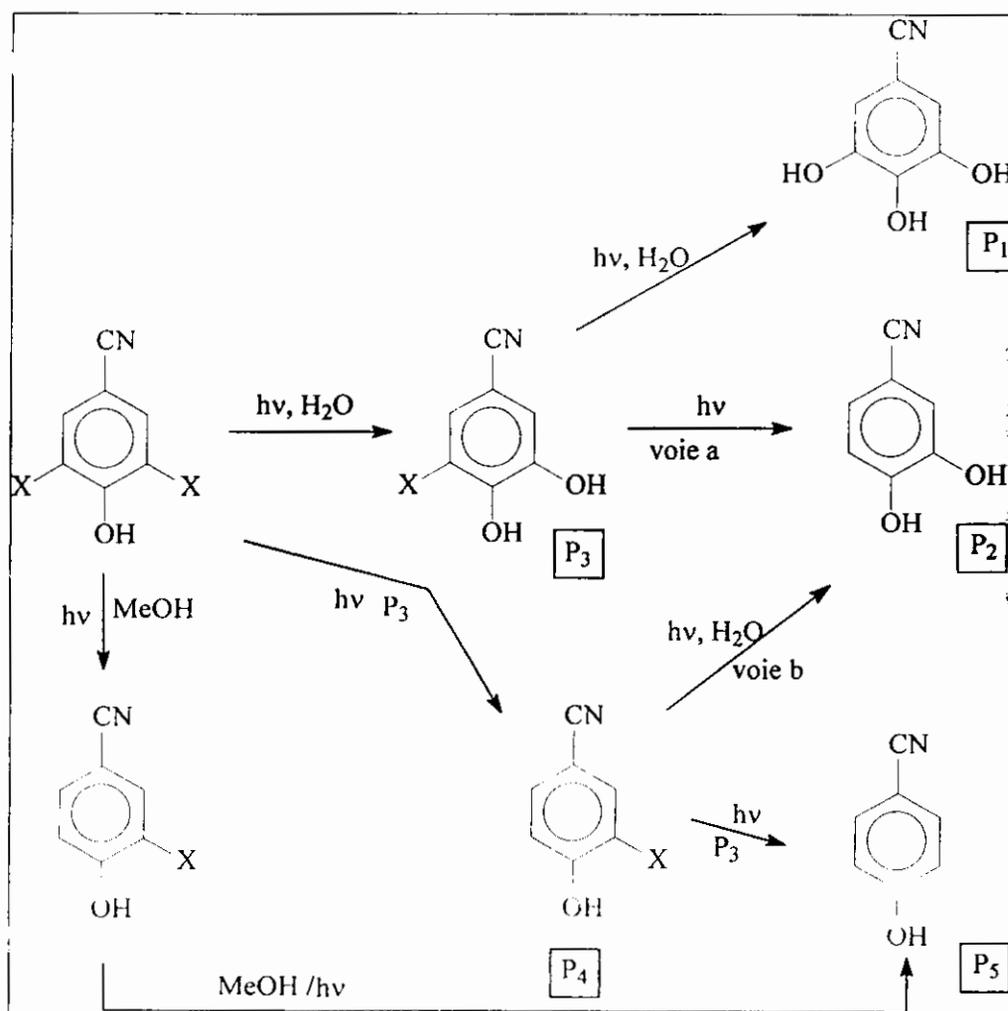


Figure 1 : Comportement photochimique général des halobenzonitriles en solutions aqueuse ou alcoolique.

De part la toxicité des benzothiazoles vis-à-vis de l'environnement, de nombreux travaux ont été réalisés pour mettre au point des conditions de biodégradation de ces composés par des boues activées et des cultures mixtes de stations d'épuration. Si la biotransformation des benzothiazoles a été constatée dans la plupart des cas, leur minéralisation fut rare.

Le caractère relativement récalcitrant de ces composés ainsi que leurs propriétés toxiques sur les microorganismes expliquent également le fait que peu de souches pures capables d'utiliser exclusivement ce type de molécules pour leur croissance aient été isolées. Peu des souches pures bactériennes obtenues se sont montrées capables de biotransformer le BT, le OBT, le BTSD₃, le MBT et le MBTU mais il y a très peu d'informations concernant les voies métaboliques impliquées et les enzymes intervenants dans ces métabolismes microbiens.

Le faible niveau de connaissances sur le métabolisme des benzothiazoles s'explique sans doute par le manque d'outils analytiques adaptés à l'étude de ces molécules, aussi bien dans les compartiments aquatiques que terrestres.

En effet, ces outils analytiques doivent permettre d'étudier :

- ❖ des milieux bruts car les métabolites formés sont souvent instables ou/et difficiles à purifier.
- ❖ des milieux complexes contenant à la fois les métabolites d'intérêt formés en faibles quantités en mélange avec les métabolites cellulaires et en présence de grandes quantités d'eau (55 M).

Au cours de cette thèse, les résultats que nous avons obtenus ont permis d'apporter une contribution significative sur les connaissances du devenir des benzothiazoles dans l'environnement, en identifiant les premiers métabolites produits par les souches fongiques utilisant les benzothiazoles comme seules sources de carbone et d'azote.

C'est ainsi que nous avons mis en évidence un intermédiaire commun à tous les benzothiazoles étudiés quel que soit la souche fongique utilisée. L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire avec les deux souches fongiques *Cunninghamella elegans* et *Aspergillus niger* est présenté sur la figure 2.

relativement stables à des $\lambda > 290$ nm mais ils sont bien métabolisés par *C. elegans* et *A. niger*.

Par ailleurs, les intermédiaires formés au cours de ces biotransformations ont été isolés et leur toxicité a été évaluée avec le test Microtox®. Les résultats montrent que dans tous les cas, la première étape de biotransformation conduit à des dérivés plus hydrophiles et moins toxiques que les produits de départ (Figure 2). Les toxicités des métabolites du MBT et du BT (voire du ABT) restent tout de même relativement élevées comparées à celle du OH-MBTU.

Mais il est important de noter qu'en utilisant des souches fongiques avec de nouvelles conditions d'incubation (cellules au repos), nous avons observé toutefois que le MBT, considéré jusqu'à présent comme "le" benzothiazole biorécalcitrant, était complètement dégradé.

Contrairement à ce qui a été observé au laboratoire auparavant avec les rhodococques, les souches fongiques testées semblent incapables de métaboliser le BTSO_3 pour toutes les concentrations considérées.

L'ensemble de ces résultats offre de nombreuses perspectives.

Perspectives

Bien que la disparition de l'ioxynil et du chloroxynil soit presque totale aussi bien dans l'eau distillée sous l'UV artificiel qu'en eau naturelle sous irradiation solaire, la **minéralisation** mérite bien d'être étudiée par détermination du COT (Carbone Organique Total).

Dans le cas où les résultats de la minéralisation ne seraient pas satisfaisantes, on peut envisager d'autres voies de photodégradation, par exemple en utilisant des **semi-conducteurs** en suspension ou fixés sur support.

En outre, le fait que les substrats soient totalement déshalogénés à l'issue de leur photolyse directe, ouvre la possibilité d'un couplage efficace de **processus photochimiques et microbiologiques** (usage simultané des radiations UV et souches microbiennes)

Pour les benzothiazoles, plusieurs grands axes seront développés à court terme pour compléter ce travail.

Le premier consistera à réaliser des expériences de RMN ^1H *in situ* et de spectrométrie de masse afin de mieux cerner le métabolisme de benzothiazoles et notamment :

- de caractériser les métabolites qui demeurent non identifiés tels que les produits d'ouverture du cycle benzénique,
- d'élucider les mécanismes impliqués dans les dernières étapes de dégradation des benzothiazoles et notamment les transformations qui interviennent sur la partie thiazole de ces molécules. Des substrats marqués au carbone ^{13}C en position 2 du cycle thiazole pourront être synthétisés et utilisés comme marqueurs de cette partie de la molécule.

Le second aspect vise à développer deux nouvelles stratégies afin d'améliorer les processus de dégradation des benzothiazoles qui restent relativement biorécalcitrants.

- L'approche complémentaire biodégradation/phototransformation a montré qu'elle était potentiellement efficace dans le cas du MBTU et du MBF. Cette méthode sera appliquée à d'autres benzothiazoles. Elle pourra éventuellement permettre

d'améliorer les taux de dégradation et de minéralisation des composés les plus récalcitrants tels que le ABT et le MBT par l'utilisation des photocatalyseurs tels que les semi-conducteurs ou les substances humiques.

- Des recherches pourront également être réalisées pour mettre au point des procédés de décontamination plus efficaces avec des cellules immobilisées. Ce procédé permet de piéger les cellules dans des matrices solides poreuses, ce qui a pour effet de les rendre plus résistantes à des conditions expérimentales plus drastiques. Des expériences de biodégradation à des pH plus élevés permettront de favoriser l'ionisation de certains benzothiazoles et de travailler à des concentrations plus importantes. L'adhérence des cellules à un support solide pourra également favoriser leur métabolisme. Avec une durée de vie plus grande, des systèmes de traitement en batch pourront être envisagés.

En conclusion, ces études permettront d'élargir notre champ d'expertise d'une part à l'étude des mécanismes impliqués dans la dégradation biotique ou abiotique de polluants organiques et des processus de remédiation (bio/photodégradation - Immobilisation), et d'autre part dans l'application de méthodes d'analyse performantes non invasives comme la RMN *in situ*.

REFERENCES & ANNEXES



Aguer J. P., Caractérisation des espèces réactives mises en jeu dans les transformations photoinduites par les acides humiques. Comparaison entre les acides humiques naturels et les acides humiques synthétiques. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, 1995.

Alam M. M., Fujitsuka M., Watanabe O. et Ito O. Laser photolysis study of photochemical reactions of triplet states of pyridinethiones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1998, 2, 817-824.

Alif A. et Boule P., Photochemistry and environment. Part XIV. Phototransformation of nitrophenols induced by excitation of nitrite and nitrate ions. *J. Photochem. Photobiol. A*, 1991, 59, 357-367.

Altenschmidt U. and Fuchs G., Novel aerobic 2-aminobenzoate metabolism. Purification and characterisation of 2-aminobenzoate-CoA ligase, localisation of gene on a 8-kbp plasmid, and cloning and sequencing of the gene from a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 205, 721-727.

Andreozzi R., Caprio V. et Marotta R., Oxidation of benzothiazole, 2-mercaptobenzothiazole and 2-hydroxybenzothiazole in aqueous solution by means of H₂O₂/UV or photoassisted Fenton systems. *J. Chem. Biotechnol.*, 2001, 76 :196-202.

Andreozzi R., D'Apuzzo A. et Marotta R., A kinetic model for the degradation of benzothiazole by Fe³⁺-photo-assisted Fenton process in a completely mixed batch reactor. *J. Hazardous Materials*, 2000, B80 : 241-257.

Azam F., Fuhr F. and Mittelstaedt W., Fate of [carbonyl-¹⁴C]methabenzthiazuron in an arid region soil-effect of organic amendment, and soil disturbance and fumigation. *Plant and soil*, 1988, 107, 149-158.

Baxendale J. H. and Wilson J. A., *Trans. Faraday Soc.*, 1957, 53, 344-356.

Bertini I., Cremonini M. A., Ferreti S., Lozzi I., Luchinat C. and Viezzoli M. S., Arene Hydroxylases : metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds. *Coord. Chem. Rev.*, 1996, 151, 145-160.

Berger B. M., Factors influencing transformation rates and formation of products of phenylurea herbicides in soil. *J. Agr. Food. Chem.*, 1999, 47, 3389-3396.

Besse P., Combourieu B., Boys, G., Sancelme M., De Wever H. and Delort A. M., Long-range ¹H-¹⁵N heteronuclear shift correlation at natural abundance: a tool to study benzothiazole biodegradation by two *Rhodococcus* strains. *Appl Environ Microbiol.*, 2001, 67, 1412-1417.

Bielski B. H. J., Cabelli D. E., Arudi R. L. and Ross A. B., Reactivity of HO₂/O₂⁻ radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 1985, 14, 1041-1100.

- Bonichon F.**, Mécanismes de phototransformation d'hydroxybenzonnitriles et d'halogénophénols en solution aqueuse. Thèse d'université de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, 1999.
- Boule P., Guyon C. et Lemaire J.**, Photochemistry and Environment. XI. Photochemical behaviour of monochlorophenols in diluted aqueous solution *Chemosphere*, 1982, 12, 1179-1188.
- Boule P., Guyon C., Tissot A. et Lemaire J.**, Phototransformations en milieu aqueux dilué. *J. Chim. Phys.*, 1985, 5, 513-516.
- Boule P., Guyon C. et Lemaire J.**, Photochimie et Environnement. VIII: Comportement photochimique des dichlorophénols en solution aqueuse diluée, *Chemosphere*, 1984, 13, 603.
- Boule P., Meunier L., Bonnemoy F., Boulkamh A., Zertal A. et Lavédrine B.**, Direct phototransformation of aromatic pesticides in aqueous solution, *Inter. J. Photoenergy*, 2002, 4, 69-78 and references therein.
- Boronin A. M.**, Diversity and relationships of *Pseudomonas* plasmids. *In Pseudomonas : molecular biology and biotechnology* (ed. E. Galli, S. Silver and B. Witholt), 1992, 329-340. American Society for Microbiology.
- Brecker L. and Ribbons D.W.**, Biotransformations monitored *in situ* by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Trends Biochem.*, 2000, 18, 197-202.
- Brownlee B. G., Carey J. H., Mac-Innis G. A. and Pellizzari I. T.**, Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1992, 11, 1153-1168.
- Bryson H., Fulton B. and Benfield P.**, Riluzole : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs*, 1996, 52, 549-563.
- Bujdakova H., Kuchta T., Sidoova E. and Gvozdjakova A.**, Anti-*candida* activity of four antifungal benzothiazoles. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 112, 329-334.
- Bunse N. H., Bergsma J. P., Graff W. D., Kumar Y. and Ravanal L.**, *J. Org. Chem.*, 1980, 45, 3708.
- Calver J. G. et Pitts J. N.**, *Photochemistry*, John Wiley & Sons New York 1966, p. 783.
- Canonica S., Jans U., Stemmler K. and Hoigné J.**, transformation kinetics of phenols in water : Photosensitization by dissolved organic material and aromatic ketones. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 1822-1830.
- Cheng H., Fuhr F., Jarczick H. J. and Mittelstaedt W.**, Degradation of Methabenzthiazuron in the Soil. *Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26, 595-599.
- Collin L. et Machado F.**, *Résultats non publiés*

Combourieu B., Haroune N., Besse P., Sancelme M. and Delort A.M., ¹H nuclear magnetic resonance : a tool to study biodegradative pathways of organic pollutants in Mycobacterium and Rhodococcus isolates. *Research Advances in Microbiology*, 2003, 3, 1-22.

Cooper W. J., Zika R. G., Petasne R. G. and Fischer A. M., Sunlight-induced photochemistry of humic substances in natural waters : Major reactive species. *Adv. Chem. Ser.*, 1989, 219, 333-349.

David-Oudjehani K. and Boule P., Photolysis of halophenols in aqueous solution sensitized by hydroquinone or phenol. *New J. Chem.*, 1995, 19, 199-206.

Delort A.-M. and Combourieu, B., *In situ* ¹H-NMR study of the biodegradation of xenobiotics: application to heterocyclic compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 26, 2-8.

De Vos D., De Wever H. and Verachtert H., Parameters affecting the degradation of benzothiazoles and benzimidazoles in activated sludge systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993a, 39, 622-626.

De Vos D., De Wever H. and Verachtert H., Isolation and characteristics of 2-hydroxybenzothiazole-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993b, 39, 377-381.

De Wever H., De Moor K. and Verachtert H., Toxicity of 2-mercaptobenzothiazole towards bacterial growth and respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994a, 42, 631-635.

De Wever H. and Verachtert H., 2-mercaptobenzothiazole degradation in laboratory fed-batch systems. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 1994b, 42, 623-630.

De Wever H., Biodegradability of benzothiazoles. PhD Thesis, Université de Louvain, Belgique, 1995.

De Wever H., Van Den Neste S. and Verachtert H., Inhibitory effects of 2-mercaptobenzothiazole on microbial growth in a variety of trophic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997a, 16, 843-848.

De Wever H., De Cort S., Noots I. and Verachtert H., Isolation and characterization of *Rhodococcus rhodochrous* for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiazole. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997b, 47, 458-461.

De Wever H., Vereecken K., Stolz A. and Verachtert H., Initial transformations in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 3270-3274.

De Wever H., Besse P. and Verachtert H., Microbial transformations of 2-substituted benzothiazoles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 57, 620-625.

Drotar A. M., Burton G. A., Tavernier J. E. and Fall R., Widespread occurrence of bacterial thiol methyltransferases and the biogenic emission of methylated sulfur gases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 1626-1631.

Dulin D., Drossman H. and Mill T., Products and quantum yields for photolysis of chloroaromatics in water. *Environ. Sci. Technol.*, 1986, 1, 72-77.

El-Kemary M. A., El-Khouly M. E. et Ito, O. Photophysical characteristics of two 4,6-disubstituted-3-cyanopyridin-2(1H)-thiones in various solvents. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2000, 137, 105-113.

Ellis B., and Griffiths P. J.F., *Spectrochim. Acta*, 1966, 22, 2005.

Fewson, C.A. Biodegradation of aromatics with industrial relevance. In *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds* (ed. T. Leisinger, A.M. Cook, R. Hütter and J. Nüesch), 1981, pp. 141-179. Academic Press Inc. (London) LTD.

Fiehn O., Reetsma T. and Jekel M., Extraction and analysis of various benzothiazoles from industrial wastewater. *Anal. Chim. Acta.*, 1994, 295, 297-305.

Fiehn O., Wegener G., Jochimsen J. et Jekel M., Analysis of the ozonation of 2-mercaptobenzothiazole in water and tannery wastewater using sum parameters, liquid- and gas chromatography and capillary electrophoresis. *Wat. Res.* 1998, 32 : 1075-1084.

Gaja M. A. and Knapp J. S., The microbial degradation of benzothiazoles. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83, 327-334.

Gaja M. A. and Knapp J. S., Removal of 2-mercaptobenzothiazole by activated sludge : a cautionary note. *Wat. Res.*, 1998, 32, 3786-3789.

Gold L. S., Slone T. H., Stern B. R. and Bernstein L., Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. *Mutat. Res.*, 1993, 286, 75-100.

Goettfert J., Parlar H. and Korte F., Microbial transformation of [¹⁴C]methabenzthiazuron by the soil fungus *Hypocrea Cf. pilulifera* St. Con: Isolation, identification and characterization of some metabolites from the chloroform extract. *J. Agric. Food. Chem.*, 1978, 26, 628-632.

Grabner G., Richard C. and Köhler G., Formation and reactivity of 4-oxocyclohexa-2,5-dienylidene in the photolysis of 4-chlorophenol in aqueous solution at ambient temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 11470-80.
Grange

Grivet J. P., Durand M. and Tholozan J. L., ¹³C NMR studies of bacterial fermentations. *Biochimie*, 1992, 74, 897-901.

Grivet J. P., Delort A. M. and Portais J. C., NMR and microbiology : from physiology to metabolomics. *Biochimie*, 2003, 85, 823-840.

Guengerich F. P., Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Biochem. Mol. Biol.* 1990, 25, 97-153.

Guengerich F.P., and Macdonald T. L., Mechanisms of cytochromes P450 catalysis. *FASEB J.*, 1990, 4, 937-944.

Guittonneau S., Momege S., Schafmeier A., Viac P. O. et Méallier P., Etude comparative de la dégradation du bromoxynil et du bromoxynil heptanoate par photolyse UV et par oxydation chimique (H₂O₂/UV ; O₃ ; Cl₂). *Rev. Sci. Eau*, 1995, 8(2), 201-216.

Guyon C., Boule P. et Lemaire J., Photochimie et Environnement. XI : photocontraction du cycle aromatique par irradiation des halogéno-2-phénols en solution aqueuse ou alcoolique., *Nouv. J. Chim.*, 1984, 11, 685-692.

Harayama S. and Rekik M., The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprises 13 genes. *Mol. Genet.*, 1990, 221, 113-120.

Haroune N., Combourieu B., Besse, P., Sancelme, M. and Delort A. M., ¹H NMR: a tool to study the fate of pollutants in the environment. *C. R. Acad. Sci. Paris, Chimie/Chemistry*, 2001, 4, 759-763.

Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Reemtsma T., Kloepfer A., Diab A., knapp J. S., Baumberg S. and Delort A. M., Benzothiazole degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA: evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 6114-6120.

Haroune N., Besse P., Combourieu B., Sancelme M., De Wever H. and Delort, A. M., Biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* bacteria monitored by ¹H Nuclear Magnetic resonance (NMR). In *Environmental chemistry*, (Eds E. Lichtfouse, S. Dudd, D. Robert) Springer, (2003) *in press*.

Hedegaard, J. and Gunsalus I. C., mixed function oxidation. IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 4038-4043.

Hoigné J., Faust B. C., Haag W. R., Scully F. E. and Zepp R. G., Aquatic humic substances as sources and sinks of photochemically produced transient reactants. *Adv. Chem. Ser.*, 1989, 219, 363-381.

Janin C., Chimie et pneumatiques. L'actualité chimique. Numéro spécial "Chimie et vie quotidienne", 1999, 11, 67-71.

Jensen-Korte U., Anderson C. and Spiteller M., Photodegradation of pesticides in the presence of humic substances. *Sci. Total Environ.*, 1987, 62, 335-340.

Joret J. C., Levi Y., Berger R., Nakache F. and Gibert M., Application du test Microtox à la surveillance de la qualité des eaux destinées à la production d'eau potable. *J. Fr. Hydrol.*, 1986, 17, 143-152.

Joschek H. I. and Miller S. I., Photooxidation of phenol, cresol and dihydroxybenzenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 14, 3273-3281.

Karelova E. and Tomasovicova D., Anaerobic degradation of 2-mercaptobenzothiazole by sulfur bacteria. *Biologia-Bratisl.*, 1988, 43, 617-622.

Kashiyama E., Hutchinson I., Chua M. S., Stinson S. F., Phillips L. R., Kaur G., Sausville E. A., Bradshaw T. D., Westwell A. D. and Stevens M. F. G., Antitumor benzothiazoles. 8. Synthesis, metabolic formation and biological properties of the C- and N-oxidation products of antitumor 2-(4-aminophenyl)-benzothiazoles. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4172-4184.

Kochany J., Choudhry G. G. et Webster G. R. B., Environmental phototransformation of herbicide bromoxynil in aquatic systems containing sodium chloride. *Environ. Sci. Res.*, 1991, 42, 259-276.

Kochany J., Choudhry G. G., Webster G. R. B., Photochemistry of halogenated benzene derivatives. Part IX. Environmental aquatic phototransformation of bromoxynil. *Pest. Sci.*, 1990a, 28(1), 69-81.

Kochany J., Choudhry G. G. et Webster G. R. B., Environmental photochemistry of the herbicide bromoxynil in aqueous solution containing soil fulvic acids. *Int. J. Environ. Chem.*, 1990b, 39(1), 59-74.

Kochany J., Effects of carbonates on aquatic photodegradation rate of bromoxynil. *Chemosphere*, 1992a, 24(8), 1119-1126.

Kochany J., Effects of iron(III) and manganese ions on the aquatic photodegradation rate of bromoxynil herbicide. *Chemosphere*, 1992b, 25(3), 261-270.

Kortüm G., Vogel W. and Andrussov K., Dissociation constants of organic acids in aqueous solution, **Butterworths, Londres**, 1961.

Machado F. and Boule P., Phototransformation of resorcinol induced by excitation of nitrite and nitrate ions. II : nitrate ions. *Toxicol. Environ. Chem.*, 1994, 42, 165-173.

Machado F., Collin L. et Boule P. Photolysis of bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzoxynil) in aqueous solution. *Pestic. Sci.*, 1995, 45 107-110.

Mainprize J., Knapp J. S and Cally A. G., The fate of benzothiazole-2-sulphonic acid in biologically treated industrial effluents. *J. Appl. Bact.*, 1976, 40, 285-291.

Millet M., Palm W. U., Zetsch C. 1998. Abiotic degradation of halobenzonitriles : investigation of the photolysis in solution. *Ecotox. Environ. Safety*, 41 : 44-50.

Murov S. L., Handbook of photochemistry, Marcel Dekker, Inc. New York, 1973, p 89.

Nebert, D. W. and Nelson D. R., P450 gene nomenclature based on evolution. *In Methods in Enzymology. Cytochrom P450.* M.R. Waterman and E. F. Johnson, eds. Academic Press, Orlando, Florida. 1991, 206, 3-11.

Nelson, D. R., Kamataki T., Waxman D. J, Guengerich F. P., Estabrook R. W., Feyereisen R., Gonzalez F. J., Coon M. J., Gunsalus I. C., Gotoh O., Okuda K. and

- Nebert D. W.**, The P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biol.*, 1993, 12, 1-51.
- Nimmo W. B., de Wilde P. C. and Verloop A.**, The degradation of diflubenzuron and its chief metabolites in soils. Part I : Hydrolytic cleavage of diflubenzuron. *Pestic. Sci.*, 1984, 15, 574-585.
- Nolte J., Heimlich F., Grop D., Zullei-Sciebert N., Preuss G.**, Studies on the behaviour of dihalogenated hydroxybenzoxitriles in water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, 351, 88-91.
- Nozaki M.**, Oxygenase and dioxygenase. *Top. Curr. Chem.*, 1979, 78, 145-186.
- Omura T. and Sato K.**, The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2370-2378.
- Párkányi C. et Abdelhamid A. O.**, Photodegradation of pesticide : photolysis of 2-mercaptobenzothiazole. *Heterocycle*, 1985, 23(11), 2917-2926.
- Pasto D. J., Cottard F. and Jumeile L.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 897.
- Pelmont J.**, Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble, 1993.
- Poulos T. L., Finzel B. C. and Howard A. J.**, High-resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}. *J. Mol. Biol.*, 1987, 195, 687-700.
- Power J. F., Sharma D. K., Langford C. H., Bonneau R. and Jousset-Dubien J.**, Photochemistry of environmental aquatic systems. Ed. Zika R. G. and Cooper W. J., Washington, Am. Chem. Soc., 1987, 157-.
- Printz H., Burauel P. and Führ F.**, Effect of organic amendment on degradation and formation of bound residues of methabenzthiazuron in soil under constant climatic conditions. *J. Environ. Sci. Health*, 1995, B30 : 435-456.
- Rabek J. F.**, Experimental methods in photochemistry and photophysics. John Wiley & Sons, 1982, pp. 944-949.
- Rada B., Holbova E., Mikulasek S., Sidova E. and Gvozdjakova A.**, Antiviral activity of benzothiazole and benzothiazolinethione derivatives in cell cultures. *Acta Virol.*, 1979, 23, 203-209.
- Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G. and Jekel M.**, Microbial transformations and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 478-485.
- Regula S., Ondris L. and Kacani S.**, Physicochemical pretreatment of wastewaters from the production of benzothiazole derivatives. *Czech. CS 208*, 626 December 1st (in Czech). Cited in *Chem. Abstr. CA 101* : 136470q.

Repkina V. I., Dokudovskaya S. A., Umrikhina R. A. and Samokhina V. A., Maximum permissible concentrations of benzothiazole and 2-mercaptobenzothiazole during biochemical treatment of wastewaters. *Khim. Prom-st.*, 1983, 10, 598-599.

Richard C. and Grabner G., Mechanism of phototransformation of phenol and derivatives in aqueous solution. In Boule P., ed, *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol 2.L Environmental Photochemistry.* Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1999, pp 218-240.

Robert-Banchereau E., Lacombe S. and Olivier J., *Tetrahedron*, 1997, 53, 2087

Roberts G. A., Grogan G., Greter A., Flitsch S. L. and Turner N. J., Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp., *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 3898-3908.

Rodgers M. A. J. and Snowden P. T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 554-.

Sakriß W., Gäb S. und Korte F., Photooxidationsreaktionen von methabenzthiazuron in lösung *Chemosphere*, 1976, 5, 339-348.

Sariasani S. F. Microbial cytochromes P450 and xenobiotic metabolism. *Adv. Appl. Microbial.*, 1991, 36, 133-178.

Sausville E. A., Bradshaw T. D., Westwell A. D. and Stevens M. F. G., Antitumor benzothiazoles. 8. Synthesis, metabolic formation and biological properties of the C- and N-oxidation products of antitumor 2-(4-aminophenyl)-benzothiazoles. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4172-4184.

Schulman S. G., Vincent W. R. and Underberg W. J. M., *J. Phys. Chem.*, 1981, 85, 4068.

Sebastian R. S., Gary D. B., Carsten S. J., Allan W. and Jens A., Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMNS Microbiology Ecology*, 2003, 45, 1-11.

Seifert R. M. and King D. A., Identification of some volatile constituents of *Aspergillus clavatus*. *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 30, 786-790.

Shingler V., Powlowski J. and Marklund U., Nucleotide sequence and functional analysis of complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. Strain CF600. *J. Bacteriol.*, 1992, 174(3), 711-724.

Strauss M. E., Barrick E. D. and Bannister R. M., Mortality experience of employees exposed to 2-mercaptobenzothiazole at a chemical plant in Nitro, West Virginia. *Brit. J. Ind. Med.*, 1993, 50, 888-893.

Strehlow H. and Wagner I., Flash photolysis in aqueous nitrite solutions. *Z. Phys. Chem.*, 1982, 132, 151-160.

Tardif R., Laparé S., Plaa G. L. and Brodeur J., Effect of simultaneous exposure to toluene and xylene on their respective biological exposure indices in humans. *Int. Arch. Occup Environ. Health*, 1991, 63, 279-284.

Texier I., Giannotti C., Malato S., Richter C. and Delaire J., Solar Photodegradation of pesticides in water by decatungstate. *Catal. Today*, 1999, 54, 297.

Tissot A., Boule P. et Lemaire J., Photochimie et environnement - V - Photohydrolyse du monochlorobenzène en solution aqueuse diluée. *Chemosphere*, 1983, 12, 6, 859-872.

Tixier C., Sancelme M., Bonnemoy F., Twagilimana L., Cuer A., Bohatier J. et Veschambre H., Fungal biodegradation of phenylurea herbicide, diuron : structure and toxicity of metabolites. *Pest. Manag. Sci.*, 2000, 56, 455-462.

Tixier C., Photo- et biotransformation de trois herbicides de type phénylurée : structure, synthèse et écotoxicité des intermédiaires, études sur terrain. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand France

Tomasi I., Artaud I., Bertheau Y. and Mansuy D., Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100 : Determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J. Bacteriol.*, 1995, 307-311.

Tomlinson T. G., Boon A. G. and Frotman C. N. A., Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bacteriol.*, 1966, 29, 266-291.

Tomlin C. D. S., *The Pesticide Manual*, 12thed., British Crop Protection Council, Farnham, UK, 2000 pp. 110 and 548.

Treinin A. and Hayon E., Absorption spectra and kinetics of NO₂, N₂O₃ and N₂O₄ in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, 92, 5821-5828.

Van der Meer, J.R., W.M. de Vos, S. Harayama and A.J.B. Zehnder. **Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.** *Microbiol. Rev.*, 1992, 56 (4) : pp. 677-694.

Vasseur P., Ferard J. F., Rast C. & Weingertner. Le test Microtox et le contrôle de la qualité des eaux. *Journal Français de la qualité des eaux*, 1986, 17, 153-162.

Vasseur P., Ferard J. F., Rast C. and Weingertner P., Le test Microtox et le contrôle de la qualité des eaux. *J. F. Hydrol.*, 1986, 17, 153-162.

Vialaton D., Richard C., Paya Perez A. et Larsen B., Phototransformation de polluants aromatiques dans l'eau. Influence de la matière organique naturelle. Evaluation de la photodégradabilité en lumière solaire. 2001

Vitzthum O. G., Werkhoff P. and Hubert P., New volatile constituents of black tea aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 1975, 23, 999-1003.

Wagner I., Strehlow H. and Busse G., Flash photolysis of nitrate ions in aqueous solutions. *Z. Phys. Chem.*, 1980, 123, 1-23.

Wallnöfer P., Tillmanns G., Thomas R., Wünsche C., Kurz J. and Jarczyk H. J. Mikrobieller abbau des herbizids methabenzthiazuron und identifizierung der metaboliten. *Chemosphere*, 1976, 5, 377-382.

- Wallnöfer P.**, The decomposition of urea herbicides by *Bacillus sphaericus* isolated from soil. *Weed Res.*, 1969, 9, 333-339.
- Wallnöfer P. R. and Bader J.**, Degradation of herbicides by cell-free extracts of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.*, 1970, 19, 714-717.
- Warneck P. and Wurzinger C.**, Product quantum yields for the 305 nm photodecomposition of nitrate ions in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, 1988, 92, 6278-6283.
- Williams P. A. and Worsey M. J.**, Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria : evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.*, 1976, 125, 818-828.
- Williams G. R.**, The effect of both powdered and liquid rubber additives on the growth of soil microorganisms. *Int. Biodeter.*, 1984, 21, 1179-1183.
- Williams P.A.** Genetics of biodegradation. *In* Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds (ed. T. Leisinger, A.M. Cook, R. Hütter and J. Nüesch), 1981, pp. 97-107. Academic Press.
- Yen K.M. and I.C. Gunsalus.** Plasmid gene organisation : naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, 79 : pp. 874-878.
- Zafiriou O. C.**, Sources and reactions of OH daughter radicals in seawater. *J. Geophysical research*, 1974, 3, 4491-4497.
- Zafiriou O. C. and Bonneau R.**, Wavelength-dependent quantum yield of OH radical formation from photolysis of nitrite ion in water. *Photochem. Photobiol.*, 1987, 45, 723-727.
- Zepp R. G., Hoigné J. and Bader H.**, Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. *Environ. Sci. Technol.*, 1987, 21, 343-350.
- Zepp R. G., Baughman G. L. and Schlotzhauer P. F.**, Comparison of the photochemical behaviour of various humic substances in water : Photosensitized oxygenations. I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitised by humic substances . *Chemosphere*
- Ziegler D. M.**, Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1993, 33, 179-199.
- Zylstra, G.J., McCombie W.R., Gibson D.T. and Finette B.A.**, Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1 : genetic organisation of tod operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54, 1498-1503.

Résumé

Les 3,5-dihalogéno-4-hydroxybenzonnitriles (ioxynil, bromoxynil et chloroxynil) ont un comportement photochimique semblable en solution aqueuse irradiée en lumière UV ou en lumière solaire artificielle. La photohydrolyse hétérolytique est la principale voie de phototransformation. Elle conduit à la formation de dihydroxybenzonnitriles monohalogénés comme dans le cas des 3-chlorophénol, 3,4- et 3,5-dichlorophénols, mais différemment des phénols 2-halogéno. Des produits de photoréduction ont été également obtenus quand l'irradiation est effectuée dans l'eau naturelle ou en présence de la matière organique.

Dans une deuxième étape les mêmes réactions se produisent avec l'autre liaison C-halogène. Le comportement photochimique ne semble pas être affecté par la nature de l'halogène Cl, Br ou I.

Le Methabenzthiazuron se photolyse très lentement à $\lambda > 290$ nm, mais s'oxyde bien en 6-hydroxymethabenzthiazuron par les souches *Aspergillus niger* ATCC 9142 comme en témoignent les expériences réalisées en RMN HMBC ^1H - ^{15}N . La toxicité de ce métabolite, déterminée par l'essai normalisé de Microtox®, était six fois plus faible que celle de la molécule mère. Le 6-hydroxymethabenzthiazuron n'est pas plus métabolisé par *Aspergillus niger* mais s'est avéré être photooxydé, par clivage du cycle aromatique, et photodimériser sous irradiation à $\lambda > 290$ nm. En présence des substances humiques, la photodégradation est plus lente. Les transformations du metabenzthiazuron obtenues avec l'*Aspergillus niger* ou par l'action de la lumière solaire, ne procèdent pas par l'intermédiaire de la chaîne urée N-dialkylée habituellement rapportée, mais par l'hydroxylation ou le clivage du cycle benzénique.

La photodégradation directe du 2-mercaptobenzothiazole dans l'eau implique l'état excité triplet, les électrons solvatés et le radical benzothiazolyl en tant qu'intermédiaires primaires. Cependant, un travail complémentaire est nécessaire pour clarifier les étapes de désulfuration. La phototransformation est photoinduite par les composants chromophores de l'eau naturelle. Dans ce cas, le 2-mercaptobenzothiazole est un cas particulier de la série des benzothiazoles, certains se sont avérés très photorésistants.

Mots clés : 3,5-dihalogéno-4-hydroxybenzonnitriles ; Métabenzthiazuron ; Benzothiazoles ; Photolyse ; Photohydrolyse ; eau ; eau naturelle ; espèces transitoires ; lumière solaire ; Biodégradation ; *Aspergillus niger* ; *Cunninghamella elegans*.

Abstract

The 3,5-dihalogeno-4-hydroxybenzonitriles (ioxynil, bromoxynil and chloroxynil) have a similar photochemical behaviour in pure aqueous solution irradiated in artificial UV light or sunlight. The main pathway is a heterolytic photohydrolysis leading to the monohalogenated dihydroxybenzonitrile as observed with 3-chlorophenol, 3,4- and 3,5-dichlorophenols, but differently from 2-halogeno phenols.

Photoreduction was also observed specially when irradiation is carried out in natural water or in the presence of organic matter.

In a second stage similar reactions occur with the other C-halogen bond. The photochemical behaviour is not significantly affected by the nature of the halogen Cl, Br or I.

Methabenzthiazuron was very slowly photolyzed when irradiated at $\lambda > 290$ nm; but could be successfully oxidized into 6-hydroxymethabenzthiazuron by *Aspergillus niger* ATCC 9142, as shown by ^1H - ^{15}N HMBC NMR experiments. The toxicity of this metabolite, determined by the standardized Microtox® test, was six times lower than that of the parent molecule. 6-hydroxymethabenzthiazuron was not further metabolized by *Aspergillus niger*, but was found to be photooxidized with ring cleavage of the aromatic ring and photodimerized upon irradiation at $\lambda > 290$ nm. In the presence of humic substances, the photodegradation was slower. The transformations of methabenzthiazuron observed either with the fungus *Aspergillus niger* or by the action of solar light, do not proceed via the urea chain N-dealkylation as usually reported, but via hydroxylation or cleavage of the benzene ring.

Direct photolysis of 2-mercaptobenzothiazole in water involves the triplet excited state, the solvated electrons and the benzothiazolyl radical as primary intermediates. However, some work is still needed to clarify the desulfuration steps. Phototransformation is photoinduced by chromophoric components of natural water. In this way, 2-mercaptobenzothiazole is a special case in the benzothiazole series, some having been proved to be very photoresistant.

Key words : 3,5-dihalogeno-4-hydroxybenzonitriles ; Methabenzthiazuron ; Benzothiazoles
Photolysis ; Photohydrolysis ; water ; natural water ; transient species ; solar light ;
Biodegradation ; *Aspergillus niger* ; *Cunninghamella elegans*.

Résumé

Les 3,5-dihalogéno-4-hydroxybenzonnitriles (ioxynil, bromoxynil et chloroxynil) ont un comportement photochimique semblable en solution aqueuse irradiée en lumière UV et en lumière solaire artificielle. La photohydrolyse hétérolytique est la principale voie de phototransformation. Elle conduit à la formation de dihydroxybenzonnitriles monohalogénés comme dans le cas des 3-chlorophénol, 3,4- et 3,5-dichlorophénols, mais différemment des phénols 2-halogénés. Des produits de photoréduction ont été également obtenus quand l'irradiation est effectuée dans l'eau naturelle ou en présence de la matière organique.

Dans une deuxième étape les mêmes réactions se produisent avec l'autre liaison C-halogène. Le comportement photochimique ne semble pas être affecté par la nature de l'hologène Cl, Br ou I.

Le Métabenzthiazuron se photolyse très lentement à $\lambda > 290$ nm, mais s'oxyde bien en 6-hydroxyméthabenzthiazuron par les souches *Aspergillus niger* ATCC 9142 comme en témoignent les expériences réalisées en RMN HMBC ^1H - ^{15}N . La toxicité de ce métabolite, déterminée par l'essai normalisé de Microtox®, était six fois plus faible que celle de la molécule mère. Le 6-hydroxyméthabenzthiazuron n'est pas plus métabolisé par *Aspergillus niger* mais s'est avéré être photooxydé, par clivage du cycle aromatique, et photodimériser sous irradiation à $\lambda > 290$ nm. En présence des substances humiques, la photodégradation est plus lente. Les transformations du metabenzthiazuron obtenues avec l'*Aspergillus niger* ou par l'action de la lumière solaire, ne procèdent pas par l'intermédiaire de la chaîne urée N-dialkylée comme cela est habituellement rapporté, mais par l'hydroxylation ou le clivage du cycle benzénique.

La photodégradation directe du 2-mercaptobenzothiazole dans l'eau implique l'état excité triplet, les électrons solvatés et le radical benzothiazolyl en tant qu'intermédiaires primaires. Cependant, un travail complémentaire est nécessaire pour clarifier les étapes de désulfuration. La phototransformation est photoinduite par les composants chromophores de l'eau naturelle. Dans ce cas, le 2-mercaptobenzothiazole est un cas particulier de la série des benzothiazoles, certains se sont avérés très photorésistant.

Mots clés : 3,5-dihalogéno-4-hydroxybenzonnitriles ; Métabenzthiazuron ; Benzothiazoles
Photolyse ; Photohydrolyse ; eau ; eau naturelle ; espèces transitoires ; lumière solaire ;
Biodégradation ; *Aspergillus niger* ; *Cunninghamella elegans*.