Contribution à l'étude de la biodégradation et de la biodisponibilité dans les sols de la mésotrione et du glyphosate

Stéphanie Durand

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Durand. Contribution à l'étude de la biodégradation et de la biodisponibilité dans les sols de la mésotrione et du glyphosate. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT : 2007CLF21764 . tel-00718186

HAL Id: tel-00718186

https://theses.hal.science/tel-00718186

Submitted on 16 Jul 2012

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

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

N° d'Ordre : D. U. 1764

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N°: 538

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Spécialité : Chimie Organique Biologique)

Par

Stéphanie DURAND
(Diplômée d'Etudes Approfondies de Chimie et Microbiologie de l'Eau)

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION ET DE LA BIODISPONIBILITE DANS LES SOLS DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE

Soutenue publiquement le 20 Juillet 2007, devant la commission d'examen :

Président :		J. BOHATIER, Pr., Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand 1
Rapporteurs	:	H. BUDZINSKI, DR-CNRS, Université Bordeaux 1
		E. BARRIUSO, DR-INRA, INA Paris Grignon
Examinateurs		F. MARTIN-LAURENT, CR-INRA, INRA Dijon
		P. BESSE-HOGGAN, CR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2
		B. COMBOURIEU, MCF, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (UMR 6504) de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, dirigé par Monsieur Jean Bolte, Professeur. Je tiens tout d'abord à lui exprimer mes remerciements pour la confiance qu'il m'a apportée en m'accueillant dans son laboratoire.

Je suis sensible à l'honneur que me font Madame Hélène Budzinski, Directeur de Recherche à l'Université Bordeaux 1, et Monsieur Enrique Barriuso, Directeur de Recherche à l'INRA-INA de Paris Grignon, de prendre sur leur temps précieux pour examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur Fabrice Martin-Laurent, Chargé de Recherche à l'INRA de Dijon et à Monsieur Jacques Bohatier, Professeur à l'Université d'Auvergne de Clermont 1 d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury.

Un grand merci à Madame Pascale Besse-Hoggan, Chargé de Recherche ainsi qu'à Monsieur Bruno Combourieu, Maître de conférence, pour avoir encadré ce travail de thèse avec autant de patience et de disponibilité envers moi. Je vous remercie beaucoup pour la formation apportée en chimie organique biologique et analytique.

Je tiens également à remercier Madame Anne-Marie Delort, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe RMN Métabolique et Environnement.

J'exprime ma profonde reconnaissance à :

- Martine Sancelme, pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide en microbiologie, en particulier, pour la mise en place des nombreuses cultures réalisées au cours de ce travail. Merci à Elodie Cano pour l'aide apportée.
- Anne-Sophie Biesse-Martin pour le soutien en RMN dans l'identification structurale des métabolites. Un grand merci pour ton écoute, tous tes bons conseils et ton rire communicatif !
- Bertrand Légeret pour toutes les analyses réalisées par LC/MS
- Isabelle Bourgeois et Armelle Dreau de la Société Organon, sans qui les analyses LC/RMN n'auraient pas pu être réalisées.

- Toute l’équipe du Professeur Juan Cornejo, Directeur de l’Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologica (CSIC, Séville) qui m’a gentiment accueillie au sein de son laboratoire pour un stage d’un mois et qui m’a formée aux techniques d’adsorption.

Je ne saurais oublier Mohamed Ettaoussi qui a participé à ce travail de thèse lors de son stage de Master 2 ainsi que Nicolas, Pierre, Mathieu et Georges Alain, étudiants en Licence Professionnelle qui ont participé aux validations des méthodes de dosage par HPLC.

Je remercie l’ensemble du personnel du laboratoire qui a partagé ma vie quotidienne tout au long de ces quelques années, en particulier l’amicale du café.

J’ai une pensée toute particulière aux étudiants qui ont contribué à rendre la vie au laboratoire plus agréable et je n’oublierai pas tous les bons moments passés ensemble : Marlène (première assistante chef, en cuisine), Zab (miss Lollipops), Doudou (et ton fameux sourire), Charlène (une autre très bonne cuisinère), Sido (notre musicienne), Nico (la Louloute), Pierre, Andrei, Ahmatjan, Radouane, Nicolas, Régis, Mathieu, Samir et les autres… Merci à tous.

Enfin un énorme merci à Cyril et à mes parents pour m’avoir soutenu et encouragé.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 7

LES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES ET LES ORGANOPHOSPHORES : DEUX FAMILLES DE PESTICIDES 9

I LES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES 9
I.1 Découverte et mode d'action 9
I.2 Les tricétones commercialisées 13
I.2.1 La nitisinone (NTBC) 13
I.2.2 La sulcotrione 14
I.2.3 La mésotrione 15
II LES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES 18
II.1 Introduction 18
II.2 Le glyphosate 20
II.2.1 Présentation 20
II.2.2 Propriétés physico-chimiques 21
II.2.3 Mode d'action 22
II.2.4 Toxicité 23

DEGRADATION DE LA SULCOTRIONE, DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE. 27

I LES BENZOYLCYCLOHEXANE-1,3-DIONES 27
I.1 Dégradation par voie photochimique 27
I.1.1 La sulcotrione 28
I.1.2 La mésotrione 30
I.2 Dégradation par voie biologique 32
I.2.1 La sulcotrione 32
I.2.2 La mésotrione 33
II LE GLYPHOSATE 35
II.1 Dégradation par voie photochimique 35
II.2 Dégradation par voie biologique 35
II.2.1 Transformation biologique du glyphosate en glycine 37
II.2.2 Transformation biologique du glyphosate en AMPA 39

BIODEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES NITRES 43

I OXYDATION DU CYCLE AROMATIQUE 44
I.1 Réactions catalysées par une dioxygénase 45
I.1.1 Présentation 45
I.1.2 Exemples de composés aromatiques nitrés 46
I.2 Réactions catalysées par une monooxygénase 50
I.2.1 Présentation 50
I.2.2 Exemples de composés aromatiques nitrés 50
II REDUCTION DU GROUPEMENT NITRO 54
II.1 En aérobiose 56
II.1.1 Le nitrobenzène 56
II.1.2 Le 2,4,6-trinitrotoluène 57
II.2 En anaérobiose 59
II.2.1 Le nitrobenzène 59
II.2.2 Le 2,4,6-trinitrotoluène 60
III REDUCTION PARTIELLE DU CYCLE AROMATIQUE 62

ADSORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES SOLS 65

I PRESENTATION GENERALE DES SOLS 65
I.1 La fraction organique *66*
I.2 La fraction minérale *68*
I.2.1 Les argiles 69
I.2.2 Les argiles cationiques 70
I.2.3 Argiles anioniques 72
II LES PHENOMENES D'ADSORPTION 74
II.1 Généralités *74*
II.2 Facteurs influençant l'adsorption *76*
II.2.1 Influence de la matière organique 77
II.2.2 Influence de la fraction argileuse et des (hydro)oxydes 79
II.2.3 Conclusions 80
III ADSORPTION DES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES 81
III.1 La sulcotrione *81*
III.2 La mésotrione *83*
IV ADSORPTION DU GLYPHOSATE 84
IV.1 Adsorption du glyphosate sur les constituants organiques du sol *85*
IV.2 Adsorption du glyphosate sur la fraction argileuse du sol *87*
IV.3 Adsorption sur les oxydes et hydroxydes *89*
V CONSEQUENCES DE L'ADSORPTION SUR LA BIODISPONIBILITE DES HERBICIDES 92

METHODES DE DOSAGE DE LA SULCOTRIONE ET DE LA MESOTRIONE OU DU GLYPHOSATE 95

I METHODES DE DOSAGE DE LA SULCOTRIONE ET DE LA MESOTRIONE 95
I.1 Dosage en milieux aqueux *96*
I.2 Dosage dans les sols *98*
II METHODES DE DOSAGE DU GLYPHOSATE 98
II.1 Méthodes directes *99*
II.2 Méthodes de dérivation *103*
II.2.1 Dérivations post-colonne 103
II.2.2 Dérivations pré-colonne 104
II.3 Méthodes de pré-traitement des échantillons *108*

LES OBJECTIFS 111

MATERIEL ET METHODES 115

GENERALITES 117

I COMPOSES CHIMIQUES 117
II ARGILES ET AUTRES MATRICES SOLIDES 117
III CONDITIONS DE CULTURE ET INCUBATION EN PRESENCE DE XENOBIOTIQUES 124
III.1 Conditions de culture *124*
III.2 Incubation en présence de xénobiotiques *125*
IV TECHNIQUES D'ANALYSE POUR LE CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION ET L'IDENTIFICATION DES METABOLITES 125
IV.1 Contrôle des cinétiques de biodégradation *125*
IV.1.1 Analyses par RMN ^{1}H 125
IV.1.2 Quantification par RMN ^{1}H 126
IV.1.3 Analyses par HPLC 127

IV.2 Techniques d'analyse pour l'identification des métabolites ... *127*
IV.2.1 Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) ... 127
IV.2.2 Analyses par RMN à deux dimensions ... 127
IV.2.3 Analyses par LC- RMN ... 128
V ETUDE DE L'ADSORPTION DES PESTICIDES ... 129
V.1 Essais d'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur le matériel ... *129*
V.2 Les cinétiques d'adsorption ... *129*
V.3 Les isothermes d'adsorption ... *130*
V.4 Etude par RMN ... *131*
V.4.1 RMN ^{1}H HR – MAS ... 131
V.4.2 RMN du solide ... 132

ETUDE DE LA MESOTRIONE ... 135

I CRIBLAGE DE SOUCHES MICROBIENNES ... 135
II INCUBATION DE LA MESOTRIONE ET DE SES METABOLITES AVEC LA SOUCHE *BACILLUS* SP. 3B6 ... 138
II.1 En conditions aérobies ... *138*
II.2 Dans différents tampons ... *139*
II.3 En conditions anaérobies ... *139*
II.4 En présence de matrices solides ... *140*
III CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE ... 140
III.1 Analyses par HPLC ... *140*
III.2 Analyses par RMN du ^{1}H ... *141*
IV ANALYSES PAR RMN 2D POUR L'IDENTIFICATION DES METABOLITES FORMES LORS DE LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE ... 142
IV.1 Expérience TOCSY ^{1}H-^{1}H (TOtal Correlation SpectroscopY) ... *142*
IV.2 Expérience HSQC ^{1}H–^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Correlation) ... *143*
IV.3 Expérience HMQC ^{1}H-^{13}C (Heteronuclear Multi-Quantum Correlation) ... *144*
IV.4 Expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ... *144*
V SYNTHESE DU BENZOISOXAZOLE ... 145
VI ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR LES MATRICES SOLIDES ... 146

ETUDE DU GLYPHOSATE ... 147

I LES SOUCHES *FUSARIUM SOLANI* PB1 ET *TRAMETES VERSICOLOR* T2 ... 147
II INCUBATION DES SOUCHES *FUSARIUM SOLANI* PB1 ET *TRAMETES VERSICOLOR* T2 AVEC LE GLYPHOSATE ... 147
III CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE ... 148
III.1 Analyses par HPLC ... *148*
III.2 Analyses par RMN du proton ... *149*
IV ADSORPTION DU GLYPHOSATE SUR LES MATRICES SOLIDES ... 150

RESULTATS ET DISCUSSION ... 151

PARTIE 1 : ETUDE DE LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE ... 155

I RECHERCHE DE MICROORGANISMES CAPABLES DE DEGRADER LA MESOTRIONE ... 155
II CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE PAR LA SOUCHE *BACILLUS* SP. 3B6 ... 161
II.1 Effet de la concentration en mésotrione sur sa dégradation ... *162*
II.2 Premiers profils métaboliques. Analyse qualitative. ... *165*
III ANALYSE DETAILLEE DES PROFILS METABOLIQUES. APPROCHE ANALYTIQUE COMPARATIVE ... 173
III.1 Identification des métabolites M2 et M3 ... *173*
III.1.1 Analyse par RMN et LC/RMN ... 173
III.1.2 Analyse par LC-UV-MS ... 183
III.2 Identification du métabolite M4 ... *190*

III.2.1 Identification du métabolite M5 192
III.3 Devenir de la partie « cyclohexanedione » *196*
IV BILAN QUANTITATIF DU METABOLISME DE LA MESOTRIONE PAR *BACILLUS* SP. 3B6 199
IV.1 Mise au point sur les conditions d'analyses quantitatives *199*
IV.2 Bilan quantitatif des différents essais de biodégradation de la mésotrione *204*
V EFFET DU PH DU MILIEU SUR LA DEGRADATION DE LA MESOTRIONE. 208
V.1 Evolution du pH au cours de la cinétique réalisée dans un tampon phosphate, pH 7 ..... *209*
V.2 Evolution du pH au cours de la cinétique réalisée dans un tampon borate de sodium, pH 9 ..... *210*
V.3 Bilan quantitatif des effets du pH *213*
VI MODE DE FONCTIONNEMENT DE LA NITROREDUCTASE : AEROBIE ET/OU ANAEROBIE ? 215
VII BIOTRANSFORMATION DE METABOLITES IDENTIFIES OU PRESUMES 226
VII.1 Etude de la biodégradation du MNBA *226*
VII.2 Etude de biodégradation du AMBA *230*
VII.3 Etude de biodégradation de la cyclohexane-1,3-dione *230*
VIII BILAN GENERAL SUR LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE PAR *BACILLUS* SP. 3B6 232
VIII.1 Bilan quantitatif du métabolisme de la mésotrione *232*
VIII.2 Schéma de biodégradation *237*

BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE 239

I MISE AU POINT DE LA METHODE DE DOSAGE DU GLYPHOSATE PAR HPLC 239
II ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE PAR *TRAMETES VERSICOLOR* T2 242
II.1 Après culture sur milieu Tartrate *242*
II.1.1 Suivi cinétique de la biodégradation par HPLC 242
II.1.2 Identification des métabolites 243
II.2 Après culture sur les milieux Peptone et Malt *246*
III ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE PAR *FUSARIUM SOLANI* PB1 247
III.1 Après culture sur milieu Tartrate *247*
III.2 Après culture sur les milieux Peptone et Malt *247*
IV BILAN SUR LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE 248

PARTIE 2 : ETUDE DE L'ADSORPTION DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE SUR DES ARGILES CATIONIQUES, COMPLEXES ARGILO-HUMIQUESET SUR UN SOL NATUREL

ADSORPTION DE LA MESOTRIONE 257

I ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR LES ARGILES CATIONIQUES 257
I.1 Etude des cinétiques d'adsorption *257*
I.2 Isothermes d'adsorption *260*
I.2.1 Etude de la montmorillonite K10 260
I.2.2 Etude de la montmorillonite KSF 263
II ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR UN SOL AGRICOLE 268

ADSORPTION DU GLYPHOSATE 273

I ADSORPTION SUR LES ARGILES CATIONIQUES COMMERCIALES 273
I.1 Cinétiques d'adsorption *273*
I.2 Isothermes d'adsorption *275*
I.2.1 Etude avec la montmorillonite K10 276
I.2.2 Etude de la montmorillonite KSF 279
II ADSORPTION SUR LE SOL AGRICOLE 283
III ADSORPTION SUR DES FRACTIONS ARGILEUSES NATURELLES EXTRAITES DE SOL 285
IV ADSORPTION SUR LES COMPLEXES ARGILO-HUMIQUES 290
V ADSORPTION SUR UNE ARGILE ANIONIQUE (HDL) 294

LA RMN, UN OUTIL POUR ETUDIER LES INTERACTIONS SOL – PESTICIDE ? 299

I LA TECHNIQUE MAS (MAGIC ANGLE SPINNING) ET LES PROBLEMATIQUES ENVIRONNEMENTALES 300
II SUIVI DU COMPORTEMENT DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE DANS LES MATRICES MINERALES. APPROCHE QUALITATIVE. 302
II.1 Mise en place du protocole expérimental *302*
II.2 Application au cas de la mésotrione *304*

II.2.1 Montmorillonite K10 305
II.2.2 Kaolinite 307
II.2.3 Saturation de l'argile KSF par une solution de mésotrione 309
II.3 Application au cas du glyphosate 311
II.3.1 Montmorillonite K10 312
II.3.2 La montmorillonite KSF 313
II.3.3 La kaolinite 317
II.3.4 Phase HDL Mg_2AlNO_3 319
III APPROCHE QUANTITATIVE DES PHENOMENES D'ADSORPTION PAR RMN MAS. 321
III.1 Référence interne 321
III.2 Référence électronique : ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentration) 323

PARTIE 3 : ETUDE DE LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE DE MATRICES SOLIDES

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE D'ARGILES CATIONIQUES 333

I CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE DE KAOLINITE 334
II BIODEGRADATION EN PRESENCE DE MONTMORILLONITES 341
II.1 La montmorillonite K10 341
II.2 La montmorillonite KSF 349

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE DU SOL NATUREL 351

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 357

CONCLUSIONS 359

PERSPECTIVES 365

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 369

INTRODUCTION GENERALE

Dans le domaine agricole, les pesticides (insecticides, acaricides, fongicides, herbicides…) ont été développés pour protéger les cultures et détruire les espèces animales et végétales nuisibles à une production agricole intensive, répondant à la demande et aux besoins du marché. L'utilisation de ces composés, avec plusieurs centaines de spécialités commerciales répertoriées, ne cesse d'augmenter avec par exemple, sur la période 1991-2001, une consommation mondiale de 4400 millions de tonnes rien que pour les herbicides (FAOSTAT. http://faostat.fao.org). Pendant de nombreuses années, ces produits ont été épandus dans la nature sans se soucier de leur devenir et des possibles conséquences que leur utilisation pouvait avoir sur les écosystèmes ou même sur la santé humaine. La découverte de résidus de pesticides dans les cours d'eau et les zones de captage a permis une prise de conscience des risques encourus. Cette première interpellation a été appuyée par la mise en place de directives européennes, fixant les limites de concentration des pesticides dans l'eau de consommation (0,1 µg/L pour tout pesticide et 5 µg/L pour la totalité des pesticides), ou obligeant à réaliser des études concernant le devenir et les risques encourus pour l'environnement de tout nouveau pesticide, avant sa mise sur le marché.

Le devenir des pesticides dans l'environnement est conditionné par de nombreux facteurs abiotiques et biotiques, qui du fait du mode d'épandage de ces composés, vont intervenir dans les différents compartiments eau / air / sol. En effet, les spécialistes les plus pessimistes estiment que seulement 0,3 % de la quantité de pesticides épandue atteint sa cible, le reste étant dispersé dans l'environnement. Selon les propriétés physico-chimiques du composé, processus de transfert (volatilisation, adsorption / rétention dans les sols, lessivage, entraînement vers les eaux souterraines) et processus de dégradation (photochimique, chimique ou biologique) vont entrer en compétition ou bien s'associer pour l'élimination du pesticide (Figure 1). La compréhension de l'ensemble des mécanismes impliqués dans le devenir des pesticides est donc primordiale pour tenter de prévoir les risques de contamination potentielle.

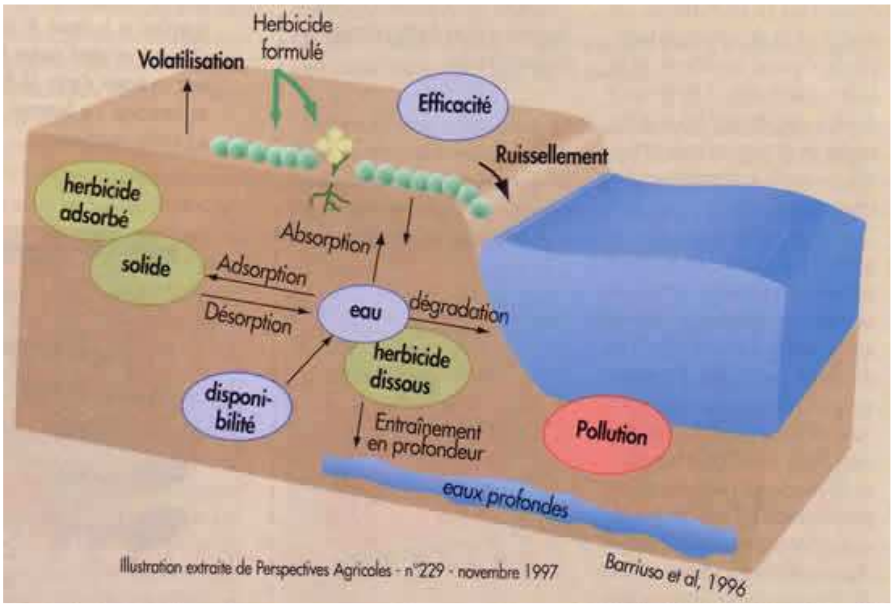


Figure 1 : Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans l'environnement (d'après Barriuso *et al.*, 1996)

La plupart des pesticides vont avoir pour réceptacle le sol, compartiment de passage quasi-obligé avant leur transfert vers d'autres compartiments connexes. Le sol va donc occuper une place centrale dans la régulation des pollutions avec un double rôle d'épuration et de stockage des pesticides. Le pouvoir épurateur des sols est lié à la présence d'une micro- et d'une macrofaune très importante et très variée, qui va contribuer à l'élimination de ces composés. Phénomènes de transfert (adsorption, désorption, lessivages) et de dégradation vont donc avoir lieu dans les sols. Les processus clés dans ce compartiment sont ceux d'adsorption / désorption, qui vont régir non seulement le piégeage, et donc la rétention du pesticide dans les sols mais aussi sa biodisponibilité. D'autre part, dans les sols, les cinétiques de biodégradation, comme les voies métaboliques, peuvent être fortement modulées en fonction des interactions existant entre le pesticide et le sol.

Il est donc important d'essayer de comprendre les facteurs qui régissent les phénomènes d'adsorption conditionnant le devenir du pesticide dans les sols.

Notre travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des conséquences de ces interactions sol - pesticide sur la biodégradation de deux herbicides : la mésotrione et le glyphosate. Nous nous sommes particulièrement interessés à ces deux pesticides afin de réaliser à long terme une étude comparative du fait de leurs propriétés physico-chimiques très différentes.

La mésotrione, herbicide commercialisé seulement depuis 2001, appartient à la famille des tricétones qui regroupe à la fois des produits pharmaceutiques (Norfadin®) et des

herbicides. Seules quelques études, réalisées en plein champ, sont dédiées à la mésotrione, mais les voies de biodégradation de cet herbicide restent mal connues et aucune cinétique n'a été décrite. La mésotrione est considérée comme très toxique pour les organismes aquatiques et pourrait entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement.

Le glyphosate (commercialisé sous le nom de Roundup®) est, lui, l'un des herbicides les plus utilisés au monde aussi bien par les agriculteurs que par les « jardiniers du dimanche ». Commercialisé depuis 1974, il a fait l'objet de nombreuses études, dont les résultats sont souvent contradictoires, tant en terme de toxicité, que de devenir dans les sols. Une des explications pourrait être la difficulté de sa détection et de sa quantification, aucune norme n'existant à ce jour. En matière de devenir dans les sols, son élimination est rapide, notamment par biodégradation (deux voies métaboliques ont été proposées), mais il est également facilement adsorbé. Toutefois, très peu d'articles font le lien entre ses propriétés d'adsorption et sa biodégradation dans le sol.

Dans notre travail de thèse, des essais ont été d'abord réalisés en milieu liquide afin de suivre les cinétiques de biodégradation de ces composés, d'identifier les métabolites formés et d'établir les schémas métaboliques. En parallèle, des expériences d'adsorption ont été réalisées sur différents constituants du sol ou sol entier. Enfin, des études de biodégradation en présence de ces matrices solides ont été effectuées.

Ce mémoire comporte deux grandes parties :

- Une partie bibliographique présentant tout d'abord les deux pesticides étudiés : la mésotrione et le glyphosate, ainsi que leurs voies de biodégradation dans l'environnement. Sachant que très peu de données existent dans la littérature sur la dégradation biologique de la mésotrione, nous nous sommes intéressés aux voies de biodégradation des composés de structure analogue : les composés aromatiques nitrés. Nous avons ensuite fait le point sur les différents facteurs conditionnant l'adsorption de pesticides dans les sols, en donnant des exemples d'études ayant trait à la mésotrione et au glyphosate. Enfin, nous présenterons les techniques analytiques développées pour le dosage des tricétones et du glyphosate dans l'eau et le sol.

- Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats obtenus lors des études de biodégradation de la mésotrione et du glyphosate en milieu aqueux. Nous analyserons et commenterons ensuite les résultats concernant l'adsorption des deux herbicides sur des constituants de sol (argiles et/ou complexes argilo-humiques), ainsi que sur un sol naturel provenant d'une plaine agricole située à proximité de Clermont-Ferrand. Enfin, un dernier chapitre sera consacré à l'étude de la biodégradation de la mésotrione en présence de différentes matrices solides et aux modulations observées (d'un point de vue qualitatif et quantitatif) lors des cinétiques de la mésotrione et de ses métabolites.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

LES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES ET LES ORGANOPHOSPHORES : DEUX FAMILLES DE PESTICIDES

I LES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES

I.1 Découverte et mode d'action

En 1977, des chercheurs de la firme Zeneca en Californie se sont intéressés à une plante ligneuse australienne cultivée hors de son aire d'origine (Australie) à des fins ornementales : *Callistemon citrinus,* sous laquelle très peu de plantes se développaient. Après analyses du sol environnant et des diverses parties de la plante, ils ont mis en évidence la présence d'une phytotoxine dans les racines : la leptospermone (Figure 2).

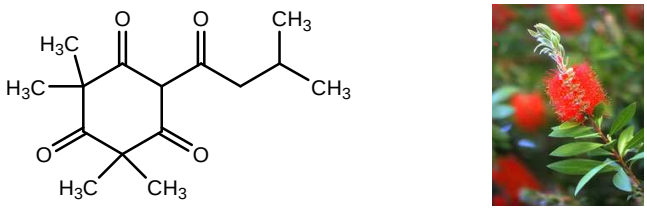


Figure 2 : Structure de la leptospermone présente dans la plante *Callistemon citrinus*

Des tests avec la molécule pure ont été réalisés sur diverses plantes et ont montré une activité herbicide modérée avec un taux d'application nécessaire pour un contrôle efficace de 1 à 5 kg/ha. Un programme de synthèse de composés analogues, ayant pour but une optimisation de l'efficacité des propriétés herbicide, a donc été entrepris, basé sur des études de relations structure–activité (Lee *et al.,* 1998) :

- Pour la partie benzoyle (Figure 3A), un substituant en position 2 (X) est obligatoire pour que la molécule ait une activité herbicide, la présence d'un substituant additionnel en position 4 (Y) augmentant encore l'activité. Une forte corrélation a été mise en évidence entre l'activité herbicide et la densité électronique globale du noyau aromatique, les analogues les plus actifs étant ceux présentant un déficit électronique important sur le cycle. X et Y doivent donc avoir un fort caractère inductif électro-attracteur pour conférer une plus grande efficacité à la molécule.

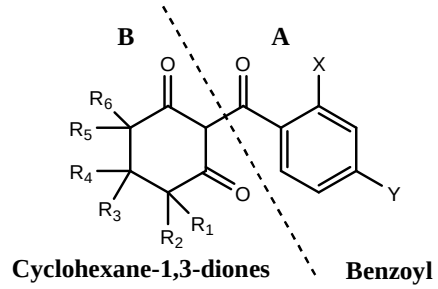
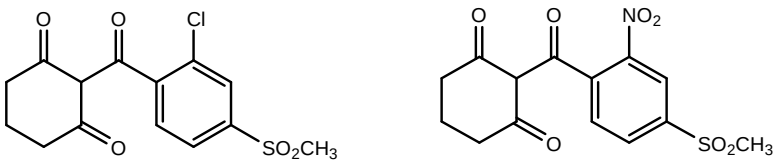


Figure 3 : Squelette des composés de la famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones (Mitchell *et al.,* 2001)

- Les benzoylcyclohexanediones sont des acides faibles. Il a également été montré qu'une forte corrélation entre la constante d'acidité (pKa) et l'activité herbicide existe. Ainsi plus le composé est acide, plus il est efficace.

- Pour la partie cyclohexanedione (Figure 3B), des essais de substitution du cycle ont été réalisés notamment par des groupements méthyle comme dans le cas de la leptospermone (Mitchell *et al.*, 2001). Les molécules substituées sont alors plus difficilement métabolisées par les plantes et présentent donc une activité herbicide améliorée. Cependant, la sélectivité vis-à-vis du maïs est alors perdue et la persistance dans les sols est fortement augmentée. Il semble donc préférable de ne pas substituer la partie cyclohexanedione.

De nombreux composés analogues de la leptospermone ont donc été synthétisés et testés. Certains se sont révélés très actifs (jusqu'à 1 g/ha) mais ont du être éliminés à cause de propriétés indésirables telles qu'une persistance dans le sol excessive, une forte toxicité pour l'homme ou une absence de sélectivité vis-à-vis des céréales cultivées. Après plusieurs années de recherche, des molécules (Figure 4) possédant une meilleure activité herbicide et un spectre d'utilisation plus large que la leptospermone ont été mises sur le marché (Mitchell *et al.*, 2001). Ces analogues peuvent être utilisés en pré ou post-levée pour la canne à sucre, le maïs ou d'autres céréales avec un taux d'application optimal de 1 à 2 kg/ha. La famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones était née. Cette famille d'herbicides est donc très récente.



Sulcotrione (1993) **Mésotrione (2001)**

Figure 4 : Structures d'analogues de la leptospermone

Le mode d'action des benzoylcyclohexanediones chez les plantes est lié à une inhibition compétitive de l'enzyme 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD), qui

intervient dans la biosynthèse des caroténoïdes au niveau des chloroplastes et entraîne un blanchiment du feuillage (chlorose). Cette enzyme, non-hémique à fer (II), catalyse la conversion du 4-hydroxyphénylpyruvate en acide homogentisique (Figure 5), dans une étape de biosynthèse complexe impliquant une décarboxylation oxydative, une hydroxylation du cycle aromatique et une migration du substituant carboxyméthylé dans un unique cycle catalytique (Jefford et Cadby, 1981).

En inhibant la HPPD, l'herbicide provoque l'arrêt chez la plante de la production de l'homogentisate (Figure 5), intermédiaire clef de:

- la plastoquinone (co-facteur indispensable de la phytoène désaturase, enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes) impliquée dans le transfert des électrons lors de la photosynthèse, qui constitue l'accepteur final dans la synthèse des caroténoïdes (pigments nécessaires à la photosynthèse car protecteurs contre les rayons lumineux).
- l'α-tocophérol, anti-oxydant neutralisant les composés toxiques formés lors de la photosynthèse.

L'inhibition de l'HPPD conduit donc à une destruction rapide de la chlorophylle et à un blanchiment des végétaux, dû à l'altération de la structure cellulaire par production non contrôlée de radicaux libres, qui précédent la disparition des espèces sensibles.

Cette enzyme (HPPD), impliquée dans la seconde étape du catabolisme de la tyrosine, est commune à tous les organismes aérobies à l'exception de quelques bactéries Gram positif. Chez les mammifères, la HPPD est nécessaire pour moduler les niveaux de tyrosine dans le sang. Elle constitue, de ce fait, une cible de choix pour le traitement thérapeutique de plusieurs maladies plus ou moins sévères impliquant des déficiences de la voie catabolique de la tyrosine (Figure 5) comme la tyrosinémie de type I (déficit en fumarylacétoacétate hydrolase conduisant à une accumulation anormale de fumaryl-acétoacétate, maléyl-acétoacétate, succinyl-acétoacétate et succinyl-acétone, qui sont ensuite dégradés dans le foie en métabolites toxiques provoquant cirrhose et cancer) ou l'alcaptonurie (déficience de l'homogentisate-1,2-dioxygénase (Figure 5)) (Brownlee *et al.*, 2004).

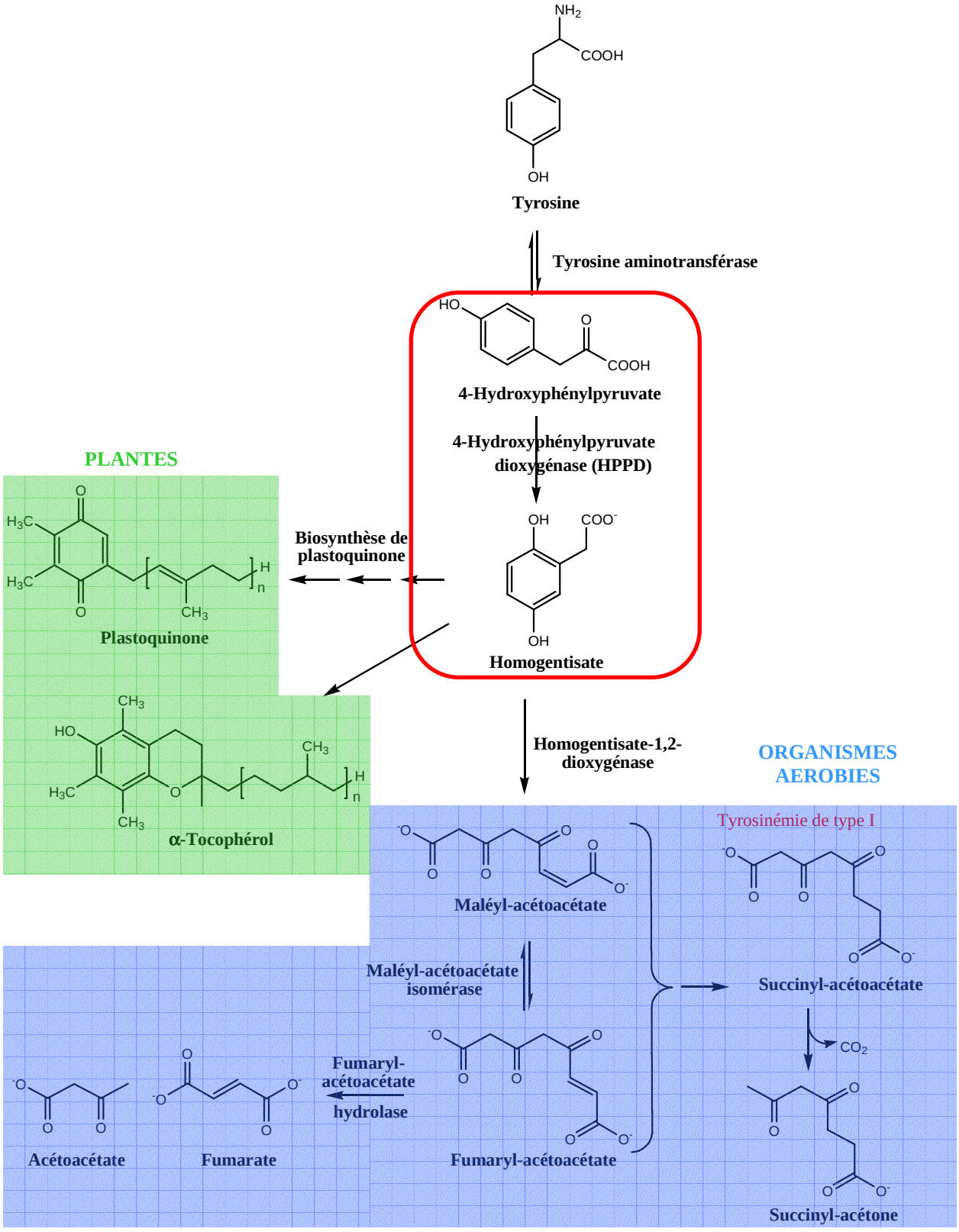


Figure 5 : Catabolisme de la tyrosine chez les plantes et les organismes aérobies

Les inhibiteurs de HPPD sont donc testés parallèlement en tant qu'herbicide chez les végétaux et médicament potentiel chez les mammifères.

Des études plus poussées de relations structure activité d'un point de vue de l'activité thérapeutique ont été réalisées pour comprendre quels étaient les groupements requis pour une bonne activité inhibitrice de l'HPPD, ainsi que le mécanisme d'inhibition dans le site actif. Des essais avec des molécules naturelles (Meazza *et al.*, 2002) et synthétiques (Wu *et al.*, 2002) ont montré l'importance de la fonctionnalité tricétone, mimant le groupement α-cétoacide du 4-hydroxyphénylpyruvate grâce à l'équilibre céto-énolique possible et permettant ainsi une interaction forte des atomes d'oxygène avec le fer II présent dans le site catalytique (Brownlee *et al*., 2004). La présence des trois fonctions carbonyle assure également une structure coplanaire qui augmente le pouvoir inhibiteur du composé (Wu *et al.*, 2002). Le mécanisme d'inhibition de l'HPPD par cette famille de composés reste cependant encore sujet à controverse : en particulier, la structure exacte du composé tricétonique en solution (forme de l'énol *endo* ou *exo* cyclique ?) ainsi que sa position et ses interactions avec le fer dans le site actif n'ont pas encore été clairement identifiées (Moran, 2005 ; Neidig *et al*., 2005 ; Szczecinski *et al*., 2006). Des études de modélisation moléculaire très récentes (Dayan *et al.*, 2007) ont montré l'existence d'un domaine lipophile à proximité du fer favorisant la liaison de composés ayant en position 2 des ligands de type aromatique.

I.2 Les tricétones commercialisées

Plusieurs composés de la famille des benzoylcyclohexanediones ont été élaborés, testés pour leurs activités herbicide ou thérapeutique et ont été plus ou moins récemment mis sur le marché.

I.2.1 La nitisinone (NTBC)

La nitisinone ou 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione (NTBC) a été une des premières tricétones développées en tant qu'herbicide (Michaely et Kraatz, 1988) (Figure 6).

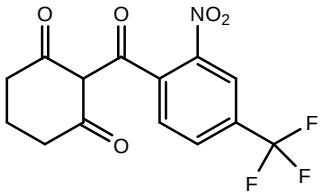


Figure 6 : Structure de la nitisone (NTBC)

Cependant, compte-tenu de la forte mortalité liée à la tyrosinémie I (Figure 5), la NTBC a d'abord été utilisée en tant qu'agent thérapeutique avant même les phases cliniques I

et III habituelles (Lindstedt *et al.*, 1992). Le développement de ce composé a conduit à sa commercialisation sous le nom d'Orfadin®. Très efficace, il permet aux patients atteints de cette maladie de vivre normalement en évitant une transplantation du foie indispensable auparavant.

I.2.2 La sulcotrione

I.2.2.1 Présentation

La première tricétone utilisée en tant qu'herbicide a été commercialisée en 1993 par la société Bayer CropScience : il s'agit de la sulcotrione ou 2-(2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione (Figure 7).

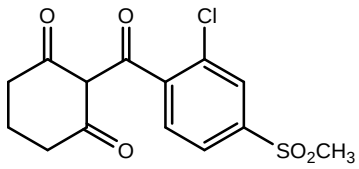


Figure 7 : Structure de la sulcotrione

La sulcotrione est un herbicide sélectif du maïs. Elle est généralement utilisée en post-levée des adventices au stade de 5-6 feuilles du maïs, mais peut aussi être utilisée en pré-émergence et en pré-semis. Les doses utilisées varient entre 300 et 450 g/ha. La sulcotrione agit principalement par voie foliaire mais peut aussi agir par voie racinaire. Les produits d'appellation Mikado® et Sulko+® sont des suspensions concentrées contenant 300 g/L de sulcotrione.

I.2.2.2 Propriétés physico-chimiques

La sulcotrione est un acide faible ayant un pKa de 3,1. Sa solubilité dans l'eau s'élève à 0,165 g/L à 20°C. Elle est beaucoup plus élevée dans les solvants organiques : de 6 g/L dans l'éthanol ou le xylène à 40 g/L dans l'acétone. La sulcotrione est stable en milieu aqueux (temps de demie-vie de 100 jours à pH 7) et peu volatile (K_H = 5,39x10^{-6} Pa à 25°C) (données Agritox).

I.2.2.3 Toxicité de la sulcotrione

Des études de toxicité aiguë de la sulcotrione ont montré chez le rat une DL_{50} par voie orale supérieure à 5 g/kg pour la matière active pure (Gamelin *et al.*, 2006) et supérieure à 2 g/kg pour la formulation (Bayer CropScience). Cependant, la sulcotrione présente une certaine toxicité pour les organismes aquatiques et est suspectée d'avoir des effets

cancérogènes (classée toxicologiquement comme substance cancérogène de troisième catégorie) (données Agritox).

I.2.2.4 Métabolisme de la sulcotrione

Seules des études d'inhibition de l'enzyme HPPD isolée de foie de rat ont été réalisées en comparant la sulcotrione et la NTBC (Ellis *et al.*, 1995). Ces deux molécules s'associent fortement dans le site actif de l'enzyme, la sulcotrione ayant cependant une moins bonne affinité pour l'enzyme. Aucune donnée n'est disponible concernant les voies métaboliques impliquées chez les mammifères sauf une élimination lente par voie rénale, la sulcotrione étant retrouvée en concentration non négligeable dans les urines après ingestion volontaire (Gamelin *et al.*, 2006).

I.2.3 La mésotrione

I.2.3.1 Présentation – Principales utilisations

La mésotrione est le dernier composé appartenant à la famille des benzoylcyclohexanediones synthétisé par la firme Zeneca (devenue Syngenta). Cette molécule a été ciblée comme candidate potentielle au remplacement de l'atrazine interdite à la vente depuis 2003 en France suite à sa persistance dans l'environnement. La molécule active [2-(4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione] a la structure suivante (Figure 8).

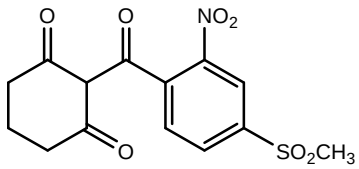


Figure 8 : Structure de la mésotrione

La mésotrione est utilisée comme herbicide sélectif pour la culture du maïs en pré- et en post-levée avec un taux d'application de 100 à 225 g/ha et de 70 à 150 g/ha respectivement. Elle possède un spectre d'utilisation plus large que celui de la sulcotrione. Elle présente une activité foliaire, racinaire (permettant de contrôler les levées antérieures au traitement) et anti-germinative. Son spectre d'utilisation est large, puisqu'elle permet d'éliminer les dicotylédones qui étaient résistantes à l'atrazine et certaines graminées annuelles (Notice technique Syngenta ; Béraud *et al.*, 2001). La formulation commercialisée depuis 2001 sous le nom de Callisto® est une suspension contenant 100 g/L de principe actif.

Sutton *et al.* (2002) ont montré que certaines espèces d'adventices appartenant aux genres *Amaranthus*, *Chenopodium* ou *Solanum*, présentes dans les cultures de maïs et résistantes aux triazines, sont sensibles à la mésotrione. De même, des espèces des genres *Sonchus* et *Xanthium* résistantes à l'herbicide imazethypyr (inhibiteur de l'acétolactate synthase) sont éliminées avec la mésotrione. L'application d'un mélange mésotrione-inhibiteur du photosystème II comme l'atrazine (Creech *et al.,* 2004) ou la terbuthylazine (Sutton *et al.,* 2002) permet d'obtenir des effets synergiques sur certaines adventices et d'élargir le spectre d'action. Vyn *et al.* (2006) ont testé l'efficacité de différents herbicides purs ou en mélange sur *Amaranthus tuberculatus*, plante qui infeste les champs agricoles aux USA et qui est récalcitrante aux inhibiteurs classiques de l'acétolactate synthétase (sulfonylurées) ou de la photosynthèse au niveau du photosystème II (triazines). Lorsque la mésotrione pure est utilisée pour traiter une culture de maïs en pré-emergence, les résultats montrent que dans plus de 95 % des cas, les mauvaises herbes disparaissent sans perte de rendement pour le maïs. L'application en post-émergence du mélange mésotrione/atrazine contrôle à 90 % la croissance de la plante après 70 jours du traitement et est donc très efficace.

Le maïs n'est pas sensible à la mésotrione car il est capable de la détoxifier par l'intermédiaire d'enzymes de la famille des cytochromes P450 (Béraud *et al.,* 2001). Ce processus est trop lent ou n'existe pas chez les adventices permettant à la mésotrione de migrer dans toutes les parties de la plante et de la détruire.

I.2.3.2 Propriétés physico-chimiques

La mésotrione est un acide faible (pKa = 3,12 à 20°C). A 20°C, sa solubilité dans l'eau passe de 2,2 g/L à pH 4,8 à 22 g/L à pH 9. Elle est très stable dans l'eau quels que soient le pH et la température du milieu. La mésotrione est soluble dans les solvants organiques et est très peu volatile ($K_H < 5,7x10^{-6}$ Pa à 20 °C) (données Agritox).

I.2.3.3 Toxicité de la mésotrione

La mésotrione n'est ni mutagène, ni tératogène, ni cancérogène. Des études de toxicité chez le rat ont évalué sa DL_{50} par voie orale à 5 g/kg pour la matière active et à 2 g/kg pour la formulation. La toxicité aiguë de la molécule est faible ce qui lui permet d'être non classée sur le plan toxicologique (Béraud *et al.,* 2001). La CEE a pourtant classé toxicologiquement la mésotrione comme dangereuse pour l'environnement (données Agritox). Elle est considérée

comme très toxique pour les organismes aquatiques et pourrait entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

I.2.3.4 Métabolisme de la mésotrione chez le rat et la souris

Gledhill *et al.* (2001) se sont intéressés au métabolisme de la mésotrione chez le rat mâle et femelle ainsi que chez la souris afin de savoir si la mésotrione pouvait avoir une application thérapeutique dans le traitement de la tyrosinémie I comme la NTBC. Des doses de 1 et 100 mg/kg de mésotrione marquée au ^{14}C ont été administrées par voie orale ainsi que par injections intraveineuses. L'herbicide est rapidement absorbé mais est aussi rapidement éliminé sans transformation dans les urines chez le rat comme chez la souris. L'analyse des urines, des fèces et de la bile a permis d'identifier plusieurs métabolites par LC/MS, bien que la mésotrione représente plus de 90 % de la radioactivité dans ces fluides. Un schéma métabolique de la mésotrione chez le rat et la souris a ainsi été proposé (Figure 9).

Des métabolites provenant de l'hydroxylation en position 4 (métabolite majoritaire) et 5 de la cyclohexanedione de la mésotrione ou de la rupture oxydative entre les deux cycles (MNBA et AMBA) sont retrouvés en très faible quantité (< 5 %) dans les urines quels que soient l'animal et la dose ingérée. Seuls les produits issus de l'hydroxylation de la mésotrione sont retrouvés dans la bile. Dans les fèces, les métabolites provenant de l'action de la flore intestinale sont le MNBA et l'AMBA. Ces métabolites sont communs chez le rat et la souris et ne sont pas dépendants des doses ingérées.

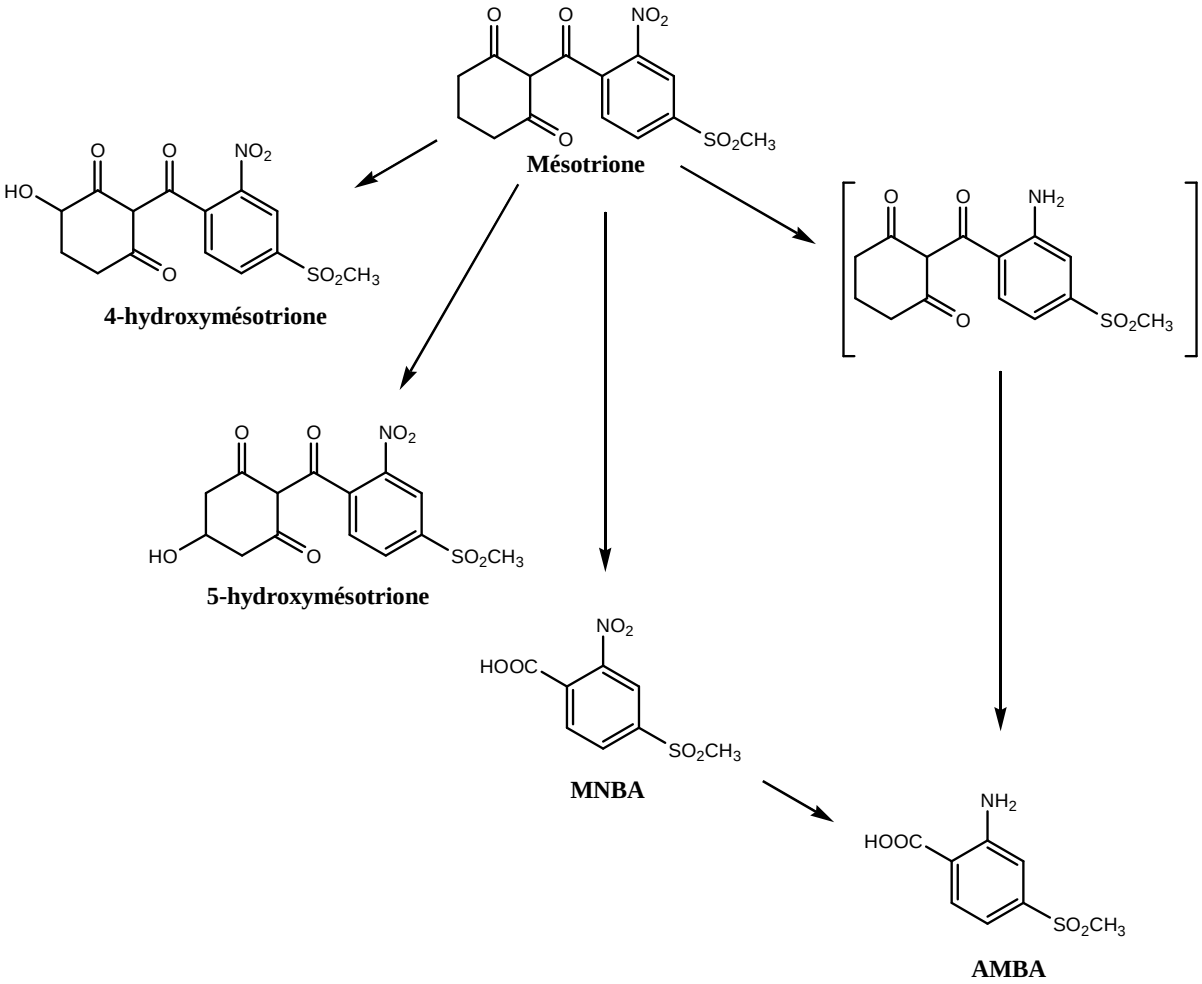


Figure 9 : Schéma métabolique de la mésotrione proposé chez le rat et la souris (d'après Gledhill *et al.*, 2001)

La mésotrione a également été testée en tant que traitement potentiel de la tyrosinémie I et ses effets pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont été comparés à ceux de la NTBC chez des adultes volontaires sains en administration orale (Hall *et al*., 2001). Si la mésotrione s'avère être un bon inhibiteur de la HPPD, rapidement absorbée et bien tolérée, son effet très atténué par rapport à celui de la NTBC et sa rapide élimination dans les urines (temps de demie-vie dans le plasma : 1 h contre 54 h pour la NTBC) ne peuvent pas en faire un traitement de choix.

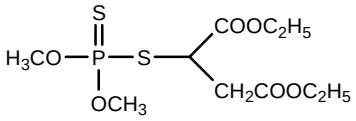
II LES PESTICIDES ORGANOPHOSPHORES

II.1 Introduction

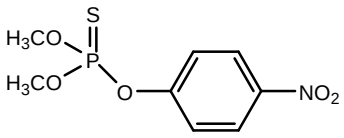
Le premier insecticide organophosphoré, le pyrophosphate de tétraéthyle a été utilisé dès 1937 mais le véritable développement des organophosphorés date des années 1970. Il a

été favorisé par l'interdiction d'utiliser des composés organochlorés comme le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT), interdit pour sa rémanence, sa tendance à être bioaccumulé et sa toxicité potentielle vis-à-vis des organismes non ciblés.

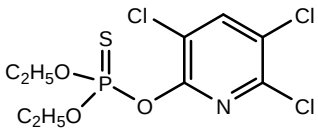
Cette famille de pesticides regroupe des produits chimiques dérivés du phosphore (dérivés ester ou thiol de l'acide phosphorique, phosphonique ou phosphoramidique) qui sont utilisés comme insecticides, fongicides, acaricides, herbicides, etc. Les organophosphorés se sont imposés par leur très grande efficacité : ils représentent 38 % des pesticides totaux utilisés dans le monde, le glyphosate étant le plus largement utilisé (Singh et Walker, 2006). Très solubles dans l'eau, ils sont retrouvés dans de nombreux écosystèmes : par exemple, des études ont révélé que 100 % des eaux de ruissellement en Ecosse et 75 % des sites aquatiques au Pays de Galles sont contaminés par des organophosphorés utilisés pour traiter les moutons (Boucard *et al.*, 2004). Le mode d'action des organophosphorés repose dans la plupart des cas, sur l'inhibition d'une enzyme (acétylcholine estérase) impliquée dans la voie métabolique de l'acétylcholine, un important neurotransmetteur. Après transmission de l'influx nerveux, l'acétylcholine doit être hydrolysée en choline et acétylCoA par cette enzyme pour éviter une sur-stimulation du système nerveux. Les organophosphorés vont inhiber cette enzyme par formation de liaisons covalentes dans le site actif, entraînant donc son changement de structure. Sur la Figure 10 sont représentés quelques exemples de dérivés organophosphorés parmi les plus utilisés.



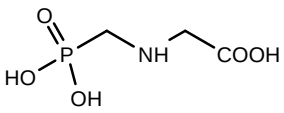
Malathion (1947)



Méthylparathion (1949)



Chlorpyrifos (1965)



Glyphosate (1971)

Figure 10 : Exemples de dérivés organophosphorés très utilisés

Le malathion, le méthylparathion et le chlorpyrifos (Figure 10) par exemple sont utilisés en agriculture en tant que produits anti-parasitaires (insecticide et acaricide). Le glyphosate est employé en tant qu'herbicide.

II.2 Le glyphosate

II.2.1 Présentation

Le glyphosate ou N-phosphonométhylglycine (Figure 11) a été breveté par la firme Monsanto en 1969 puis commercialisé en 1974. Ce brevet ayant expiré depuis 2000, il est désormais produit par d'autres sociétés et plus de 400 préparations contenant du glyphosate sous forme de solides (sels de sodium, ammonium) ou liquides (isopropylamine, triméthylsulfonium) pour améliorer la solubilité dans l'eau, sont autorisées à la vente en France. Le nom commercial le plus connu contenant la matière active sous forme de sel d'isopropylamine (360 g/L) est le Roundup®.

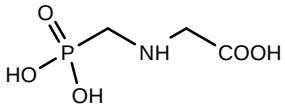


Figure 11 : Structure chimique du glyphosate

Cet herbicide est le plus utilisé à travers le monde tant par les particuliers (jardiniers du dimanche) que par les professionnels (agriculteurs, maintenance de la voirie ou chemins de fer). Il est donc utilisé à large échelle : il est par exemple, pulvérisé en Colombie par voie aérienne afin d'éliminer les cultures de pavots prohibées ou représente 20 % du total des pesticides utilisés aux U.S.A occupant ainsi le second rang avec plus de 453 tonnes en 2001 (Kiely *et al.*, 2004). Il s'agit d'un herbicide systémique à activité foliaire, non sélectif et à large spectre : véhiculé par la sève, il peut être transporté dans tous les organes de la plante jusqu'aux extrémités des racines. Il est utilisé essentiellement en post-levée et non en pré-levée du fait de sa forte adsorption dans les sols, qui le rend peu efficace vis-à-vis des adventices à éliminer. Le glyphosate a été pris comme exemple en tant que matière active pour étudier l'effet d'adjuvants issus d'homologues de triglycérides éthoxylates (Haefs *et al.*, 2002). Ces adjuvants sont testés pour évaluer l'efficacité de la pénétration foliaire du glyphosate dans les plantes. Ils sont suffisamment stables (pour des conditions de stockage), rapidement dégradés dans l'environnement et non phytotoxiques pour concevoir de nouvelles formulations. Certains parviennent même à des performances comparables à celles du Roundup®, voire même sont plus efficaces en promouvant la phytotoxicité du glyphosate envers certaines plantes.

II.2.2 Propriétés physico-chimiques

Le glyphosate est un acide organique faible très soluble dans l'eau : 10,5 g/L à 20°C à un pH de 2 (données Agritox). Il est environ dix fois moins soluble dans les solvants organiques. Sa tension de vapeur de $13{,}1 \times 10^{-6}$ Pa à 25°C lui confère un caractère peu volatile.

Possédant un groupement amine, un groupement acide phosphonique et un groupement acide carboxylique, le glyphosate présente plusieurs sites acido-basiques. Il peut donc se présenter sous différentes formes (anionique, cationique ou globalement neutre) en fonction du pH. Le diagramme de prédominance des formes du glyphosate en fonction du pH est présenté sur la Figure 12.

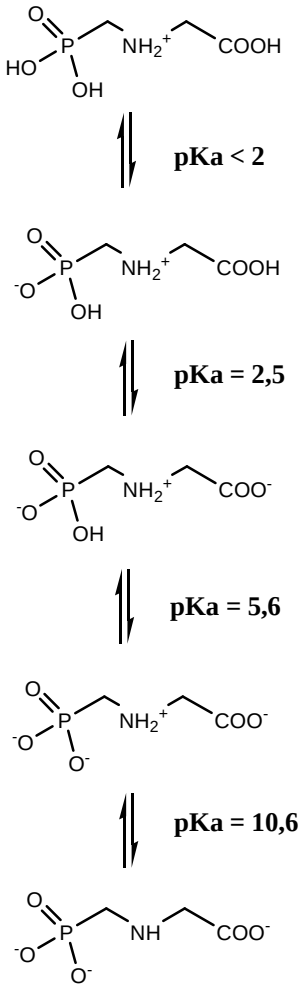


Figure 12 : Formes de dissociation du glyphosate et leurs constantes d'ionisation (d'après Sprankle *et al.*, 1975b)

Le glyphosate est relativement stable dans l'eau. La présence d'une liaison C-P, chimiquement et thermiquement très stable, rend cette molécule très résistante à la

dégradation abiotique. Son temps de demie-vie est estimé entre 30 et 170 jours à 25°C, dans une gamme de pH allant de 5 à 9 selon le type de sol (Tomlin, 2000).

II.2.3 Mode d'action

Le glyphosate est absorbé par les feuilles et les tiges, puis est transporté jusqu'aux racines par la sève. Il agit en bloquant la biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) essentiels pour la croissance et la survie des plantes. Le déficit en acides aminés aromatiques entraîne l'arrêt de la synthèse des protéines et de la formation de certains composés phénoliques. L'enzyme inhibée est la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), qui est localisée dans les chloroplastes et qui catalyse la synthèse du 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) à partir du phosphoénolpyruvate (PEP) et du shikimate-3-phosphate (Figure 13). La molécule de glyphosate va entrer en compétition avec le phosphonoénolpyruvate (PEP) et non avec le shikimate-3-phosphate. Elle ne se lierait pas directement dans le site actif de l'enzyme, mais dans un possible site allostérique, entraînant un changement structural qui empêcherait le PEP de se lier (Reade et Cobb, 2002).

La voie du shikimate est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Les mammifères ne possèdent pas cette voie métabolique, les acides aminés aromatiques devant faire partie de leur alimentation.

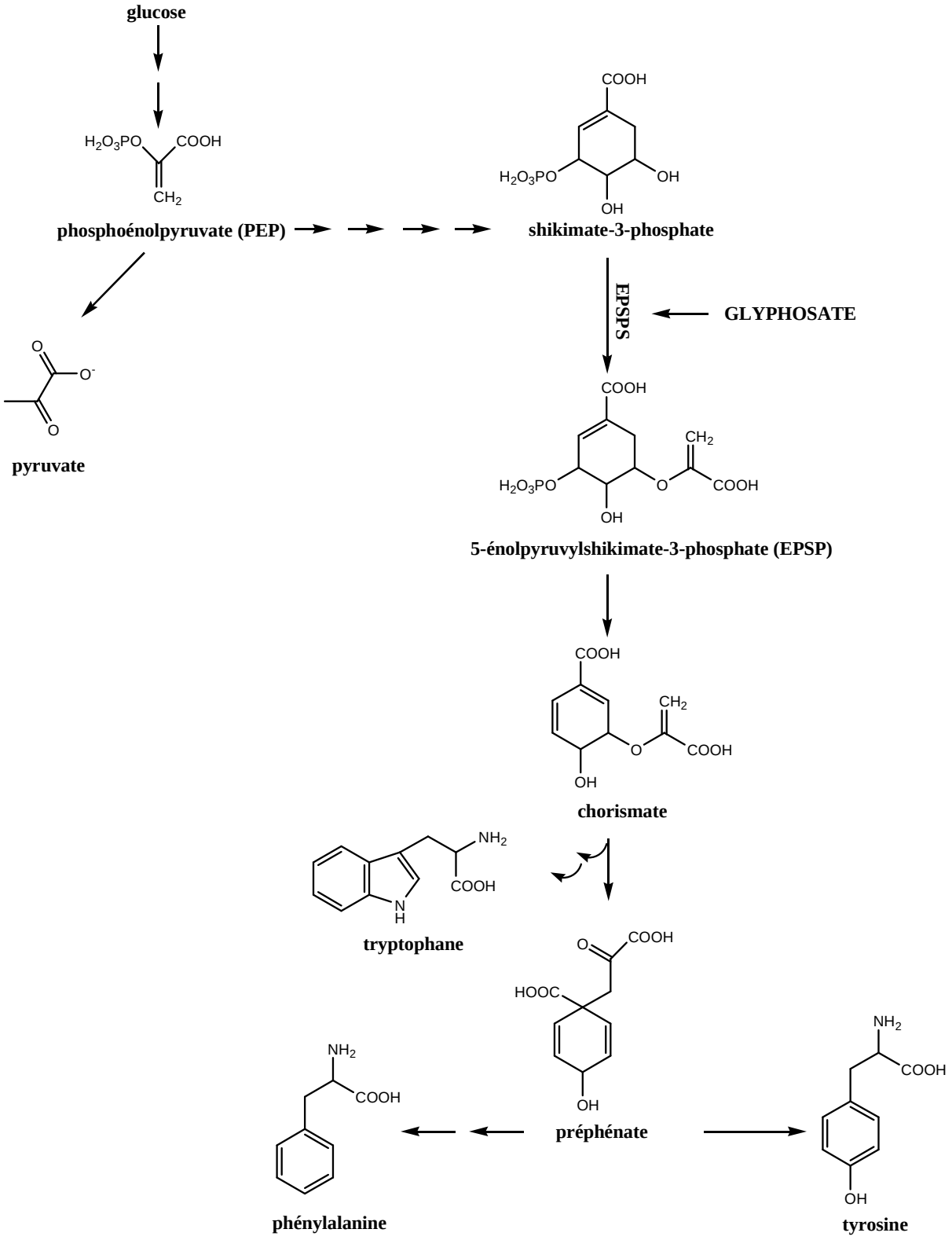


Figure 13 : Biosynthèse des acides aminés aromatiques chez les végétaux supérieurs (d'après Tan *et al.*, 2006)

II.2.4 Toxicité

La DL_{50} chez le rat est supérieure à 2 g/kg pour le glyphosate (données Agritox) en toxicité aiguë mais la formulation semble beaucoup plus toxique (DL_{50} du Roundup®

représente le tiers de celle du glyphosate). En 1979, Folmar *et al.* ont comparé la toxicité du glyphosate pur et de plusieurs formulations, dont le Roundup®, chez quatre espèces de poissons et d'invertébrés dans le compartiment aquatique. Le Roundup® se révèle beaucoup plus toxique que la matière active pure (LC_{50} = 8,3 mg/L pour la truite arc-en-ciel contre 140 mg/L avec le glyphosate chez la même espèce à 12°C). Sa toxicité augmente avec la température et le pH de l'eau pour toutes les espèces testées contrairement à la molécule pure dont la toxicité reste constante. Plus récemment, Martinez et Brown (1991) ont eux, étudié la toxicité par inhalation du glyphosate et du Roundup® chez le rat. Une fois de plus, la formulation est beaucoup plus toxique que le glyphosate pur, la dose requise pour obtenir une mortalité de 100 % en 24 h étant le tiers de celle qu'il faut administrer avec le glyphosate. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'études sur la division cellulaire (Marc *et al.*, 2002) ou sur les fonctions bioénergétiques de mitochondries isolées de foie de rat (Peixoto, 2005), le glyphosate seul n'ayant aucun effet significatif alors que le Roundup® entraîne des altérations de ces fonctions. Un possible effet de synergie a été proposé entre la molécule active et les produits des formulations considérés comme « inertes » (Cox, 2004).

De même, le glyphosate ne semble avoir aucun effet tératogène, mutagène, ni cancérigène avéré, mais les formulations ont montré une activité génotoxique induisant des mutations génétiques et des dommages chromosomaux sur des rats (Bolognesi *et al.*, 1997). Les effets du glyphosate sur l'homme sont encore mal connus et restent sujets à controverse.

Les conséquences environnementales de la forte utilisation du glyphosate risquent encore de s'aggraver suite d'une part à la péremption du brevet Monsanto, et d'autre part au développement des Plantes Génétiquement Modifiées (PGM) résistantes au glyphosate. En effet, afin de limiter la diversité des produits phytosanitaires à employer pour traiter les cultures, les chercheurs ont tenté de modifier génétiquement les plantes d'intérêt pour les rendre résistantes aux pesticides employés pour leur traitement, ce qui ne serait pas le cas pour les adventices (Tan *et al.*, 2006). Le glyphosate a été choisi comme pesticide modèle dans ces expériences car il n'est pas sélectif. Deux stratégies complémentaires ont été couplées pour obtenir des plantes tolérantes au glyphosate : l'altération du gène cible afin de rendre moins sensible l'enzyme cible à l'action de l'herbicide (remplacement du gène endogène de l'EPSPS par celui d'*Agrobacterium* sp., codant pour une EPSPS moins sensible au glyphosate tout en présentant une homolgie de séquence très proche du gène initial) et

l'optimisation du système de détoxification de l'herbicide dans la plante (insertion des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biodégradation du glyphosate). Le glyphosate est ainsi métabolisé rapidement par les plantes modifiées génétiquement. Cette nouvelle approche aurait pour avantage de limiter la quantité et la diversité des pesticides à employer en fonction de la culture à traiter. Toutefois, il est nécessaire de bien choisir le pesticide cible : le glyphosate a été choisi pour son large spectre d'action et sa rapide dégradation supposée dans le sol. Cependant, il faudrait aussi s'assurer que les métabolites formés, lorsque le glyphosate est détoxifié par les plantes, ne soient pas plus toxiques que le pesticide parent et vérifier l'accumulation de l'herbicide et de ses sous-produits de dégradation dans les plantes à récolter et dans le sol. En prenant tous ces paramètres en compte, le glyphosate n'apparaît plus comme le bon candidat (Mamy *et al.*, 2005).

Suite à l'augmentation de l'emploi de ces deux herbicides, le glyphosate et la mésotrione, il est intéressant de connaître leurs voies de dégradation dans l'environnement.

DEGRADATION DE LA SULCOTRIONE, DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE

Après épandage sur les champs agricoles, une fraction minoritaire du pesticide va atteindre sa cible biologique, la fraction majeure pouvant alors se retrouver dans les trois principaux compartiments de l'environnement : air, eau et sol. En effet le devenir d'un pesticide dans l'environnement va être conditionné non seulement par ses propriétés physico-chimiques intrinsèques mais aussi par de nombreux facteurs abiotiques et biotiques du milieu dans lequel il va se retrouver. Les mécanismes abiotiques peuvent être de nature physique (il peut se volatiliser, s'adsorber dans le sol ou s'y infiltrer pour atteindre les nappes phréatiques) ou chimique (réaction d'hydrolyse, d'oxydation, photodégradation). Les processus biotiques correspondent à l'absorption, à l'accumulation et la métabolisation des pesticides par les différents organismes vivants du milieu (microorganismes, végétaux, …).

Ce chapitre résume les données de la littérature concernant les différentes voies de dégradation impliquées majoritairement dans le devenir des herbicides appartenant aux familles des benzoylcyclohexane-1,3-diones et des organophosphorés : la photo- et la biodégradation.

I LES BENZOYLCYCLOHEXANE-1,3-DIONES

Peu d'études existent sur le devenir dans l'environnement des composés de la famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones. Nous présentons dans cette partie les données de la littérature concernant les deux principaux représentants de cette famille : la sulcotrione et la mésotrione.

I.1 Dégradation par voie photochimique

La photodégradation des polluants organiques est supposée être un des principaux procédés de dégradation dans les eaux naturelles de surface. Ils peuvent être soumis à la photolyse directe (action directe du soleil) ou indirecte (action d'espèces réactives radicalaires produites par l'intermédiaire de composés photoréactifs). La matière organique dissoute (1 à 30 mg/L dans les eaux de surface) participe à cette dégradation car elle fournit la principale

source d'espèces réactives (oxygène, radicaux). Les nitrates contenus dans ces eaux (jusqu'à 100 mg/L) peuvent être également des photoactivateurs. Sous irradiation, ils génèrent des radicaux hydroxyle qui interviennent dans la photodégradation des contaminants organiques. Toutefois la formation de ces radicaux est faible, car les nitrates sont souvent piégés par les constituants de la matière organique du milieu.

I.1.1 La sulcotrione

Ter Halle *et al.* (2006) ont étudié la photolyse directe de la sulcotrione en milieu aqueux dans un photoréacteur à des longueurs d'onde inférieures à 290 nm. Ces auteurs ont montré que la phototransformation de la sulcotrione dépend du pH de la solution. A pH 6,5 (99 % de la forme anionique), elle est très lente : moins de 10 % de sulcotrione sont transformés après 6 h d'irradiation, alors qu'à pH 2,5 (80 % de forme protonée), 50 % sont transformés après 70 min d'irradiation. L'analyse par HPLC-ESI-MS de la solution de sulcotrione irradiée à pH 6,5 a permis l'identification de cinq photoproduits (Figure 14).

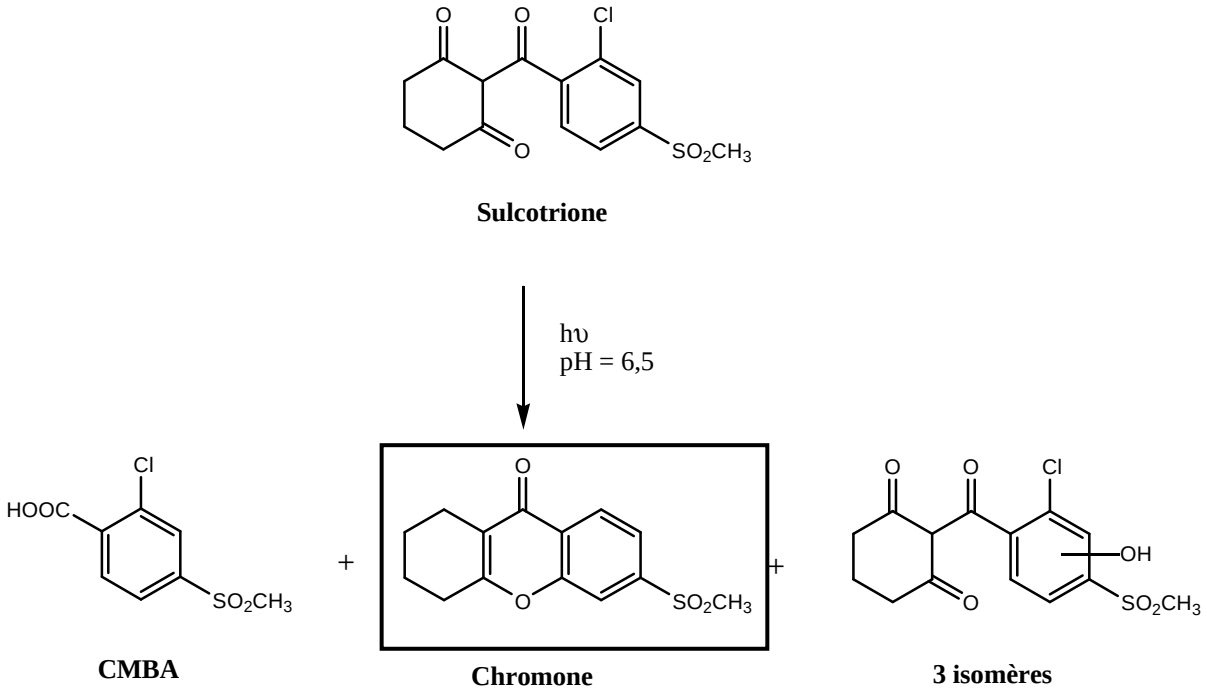


Figure 14 : Photoproduits de la sulcotrione à λ < 290 nm et pH = 6,5 (Ter Halle *et al.*, 2006)

Le premier photoproduit est issu de l'hydrolyse oxydative entre les deux cycles : il s'agit de l'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoique (CMBA). Le second photoproduit est obtenu à partir de la sulcotrione par élimination d'acide chlorhydrique et cyclisation intramoléculaire, conduisant à un dérivé de chromone (photoproduit majoritaire). Le

mécanisme proposé est présenté sur la Figure 15. Les autres photoproduits sont des isomères de la sulcotrione hydroxylée sur le noyau aromatique.

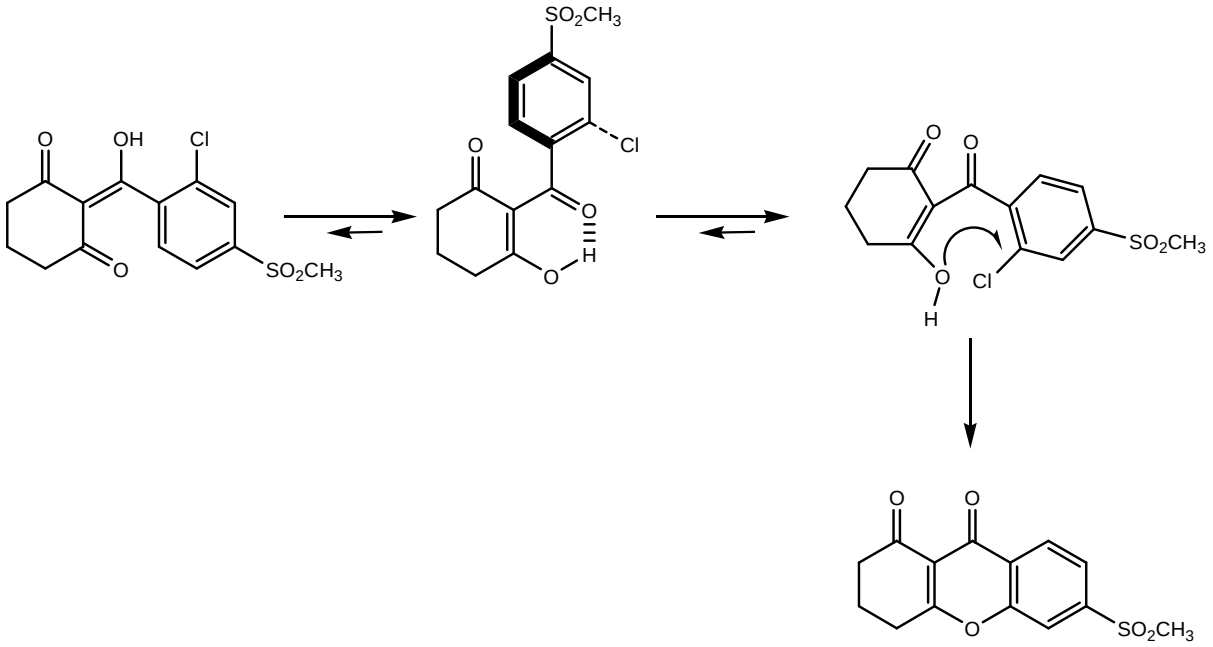


Figure 15 : Mécanisme proposé pour la formation d'un dérivé chromone, photoproduit de la sulcotrione (Ter Halle *et al.*, 2006)

Chaabane *et al.* (2007) ont étudié la photodégradation de la sulcotrione dans différents milieux aqueux (eaux Milli-Q®, de rivière et de mer) avec des lampes UV-B (λ_{max} = 313 nm) ou un simulateur de lumière solaire. Ils ont montré que l'efficacité de la photolyse de la sulcotrione est fortement dépendante du pH (dégradation uniquement à des pH acides quand la sulcotrione est sous forme moléculaire), de la longueur d'onde d'irradiation (sulcotrione beaucoup plus stable sous lumière solaire que sous les lampes UV-B) et de l'eau utilisée (temps de demie-vie ($T_{1/2}$) = 23 h (eau de rivière) ; 10 h (eau Milli-Q®) ; 3,6 h (eau de mer) sous lampes UV-B, la présence de matière organique dissoute ou de sels pouvant expliquer les différences observées). Cinq photoproduits ont été identifiés lors de cette étude. Ils sont issus d'un mécanisme de photohydrolyse rapide (composés communs aux deux études) suivi de réactions de substitution (Figure 16). Ces auteurs ont montré une absence de toxicité de tous ces composés vis-à-vis d'une bactérie marine hétérotrophe et d'une cyanobactérie (Chaabane *et al.*, 2007).

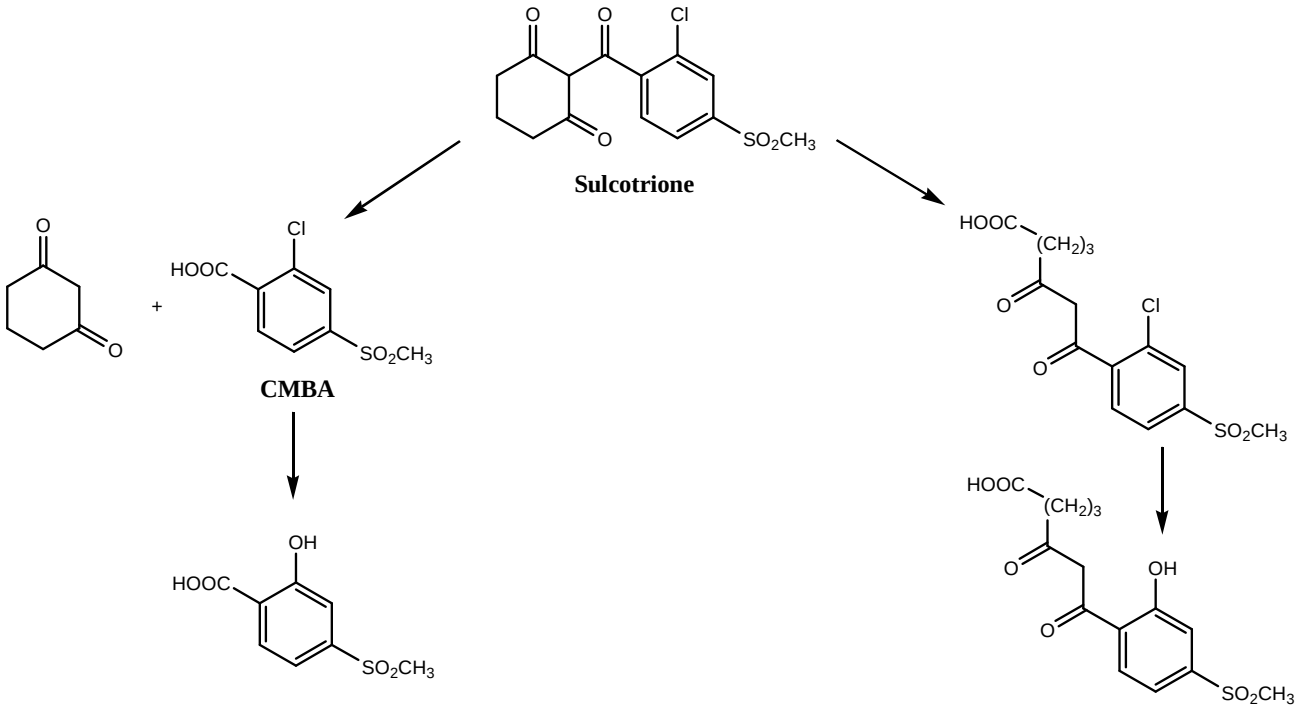


Figure 16 : Photoproduits de la sulcotrione obtenus après irradiation sous lampes UV-B (λ_{max} = 313 nm) (Chaabane *et al.*, 2007)

Des essais complémentaires d'irradiation de la sulcotrione sur des films de cire cuticulaire reconstituée (cire qui recouvre les feuilles des plantes) ont montré que la sulcotrione est phototransformée beaucoup plus rapidement qu'en solution ($T_{1/2}$ = 1 h 30 à pH 3,8 sur les films de cire cuticulaire de maïs contre 8 h en phase aqueuse au même pH) et que le photoproduit formé majoritairement est la chromone (Ter Halle *et al.*, 2006). L'utilisation de la formulation (Mikado®) dans les mêmes conditions accroît encore le taux de phototransformation (temps de demie-vie divisé par trois), sans doute par une meilleure dispersion de la sulcotrione à la surface de la cire grâce aux adjuvants de la formulation.

Remarque : L'irradiation de la sulcotrione sur des films de cuticule reconstituée ne reflète peut-être pas exactement ce qui pourrait se passer à la surface d'une vraie feuille en milieu environnemental. En effet ces films ont été reconstitués par récupération de la cire des feuilles à partir d'extraction au dichlorométhane. Leurs propriétés peuvent donc avoir été modifiées.

I.1.2 La mésotrione

La mésotrione est plus stable vis-à-vis de la photolyse que la sulcotrione. Sous irradiation de haute énergie avec des lampes UV-B (λ_{max} = 313 nm), son temps de demie-vie a été estimée à 165 h dans l'eau Milli-Q® (Chaabane *et al.*, 2007). La photolyse directe d'une

solution de mésotrione à 0,1 mM (pH = 6,5) à λ = 365 nm (correspondant à 94 % de l'énergie rayonnante) dans un photoréacteur a été étudiée par Ter Halle et Richard (2006). La phototransformation est relativement faible et plusieurs photoproduits sont observés dont seulement trois ont pu être identifiés par HPLC-ESI-MS (Figure 17).

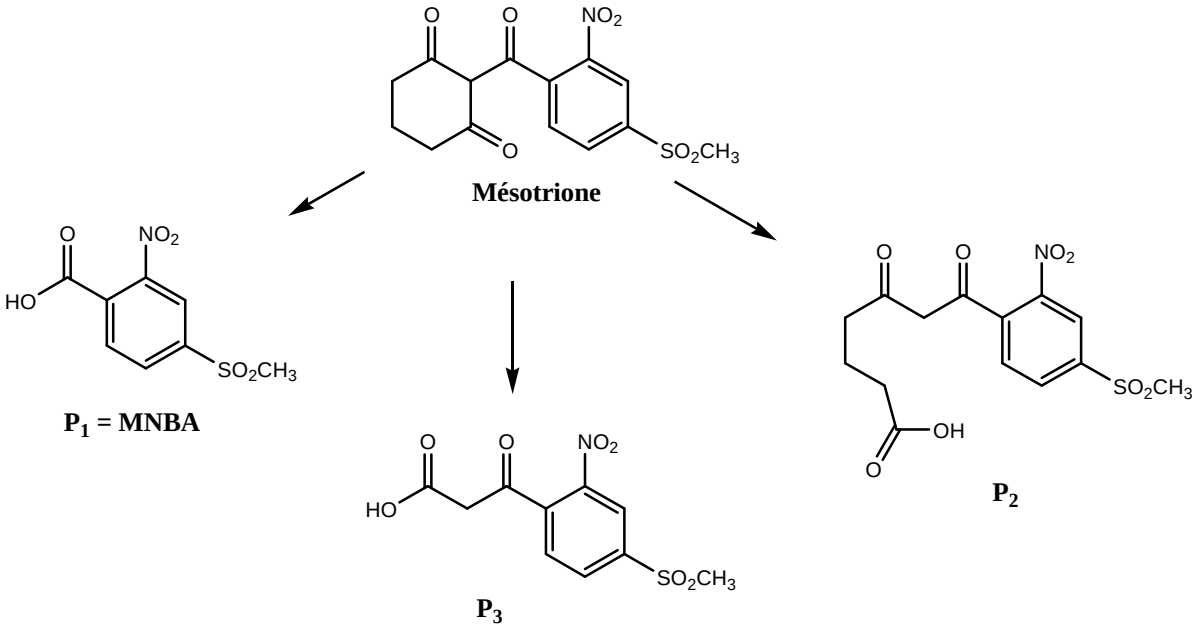


Figure 17 : Photoproduits de la mésotrione (Ter Halle et Richard, 2006)

Les photoproduits identifiés correspondent respectivement au produit de photohydrolyse (P_1) (Acide 4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoïque = MNBA), à celui d'hydrophotolyse (P_2) et à un β-cétoacide (P_3). Les auteurs ont également montré que la mésotrione a des propriétés de photosensibilisateur, sans doute liées à la présence des fonctions carbonyle, et induit la phototransformation de composés photostables à 365 nm (phénol et dérivés).

La photolyse indirecte de la mésotrione a également été testée en présence de matière organique dissoute ou d'ions nitrates. Plus la concentration en matière organique dissoute dans le milieu est importante (15 et 30 mg/L), plus la vitesse de phototransformation de la mésotrione est élevée. Une concentration plus faible (5 mg/L) inhibe de manière surprenante la phototransformation du contaminant. Les mêmes observations sont faites en présence d'ions nitrates, ceux-ci n'ayant qu'un rôle négligeable lorsqu'ils sont en présence de matière organique dissoute car piégés par celle-ci. Le mécanisme d'action suggéré consiste en une réaction d'oxydation de la mésotrione par réaction avec l'oxygène singulet produit lors de l'irradiation de la matière organique.

Une autre voie importante de dégradation des polluants organiques, notamment dans le sol, provient de l'action des microorganismes.

I.2 Dégradation par voie biologique

I.2.1 La sulcotrione

La dégradation de la sulcotrione a été suivie dans un sol limono-sableux de Belgique par Rouchaud *et al.* (1998a). La formation de trois métabolites a été observée par CCM après extraction du sol à différents temps de prélèvement (Figure 18).

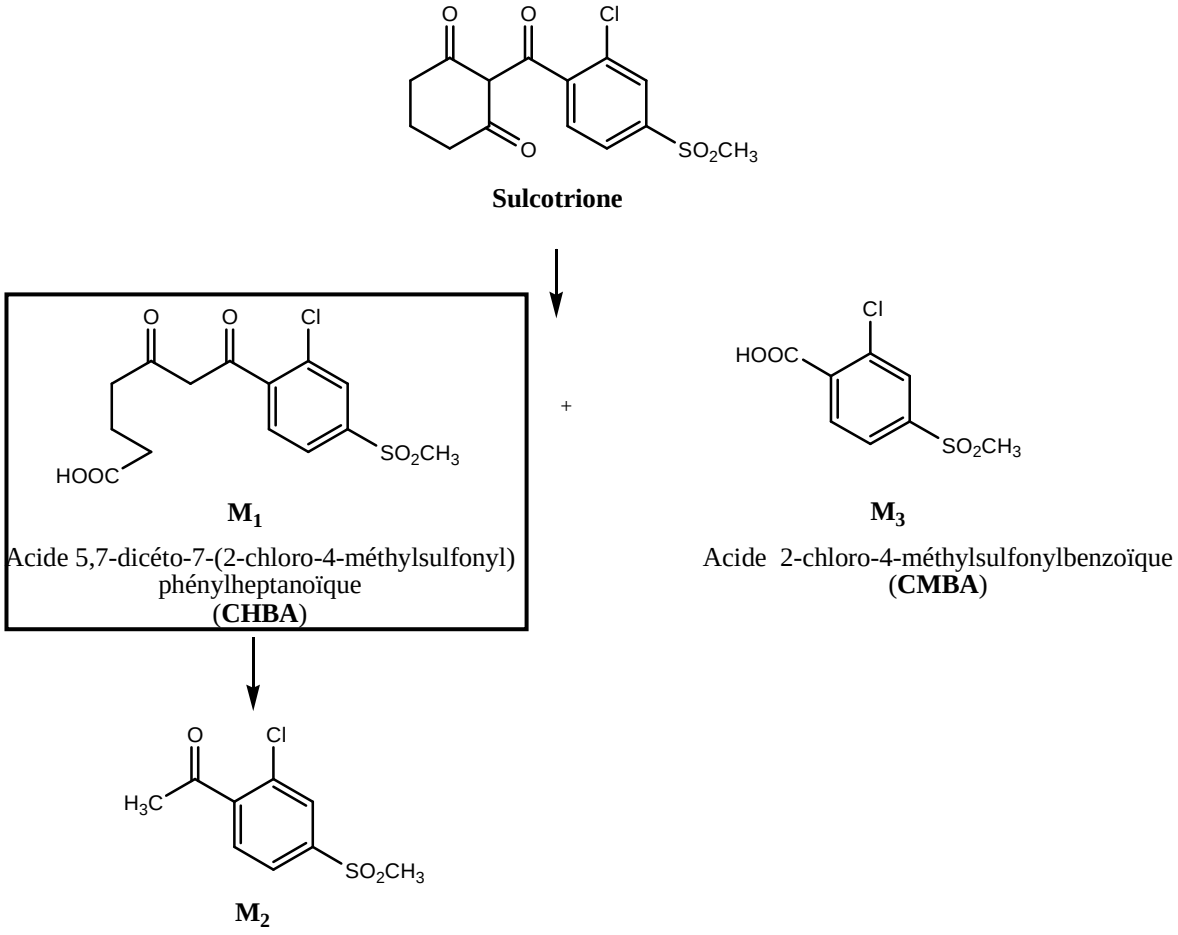


Figure 18 : Métabolites de la sulcotrione identifiés dans les sols

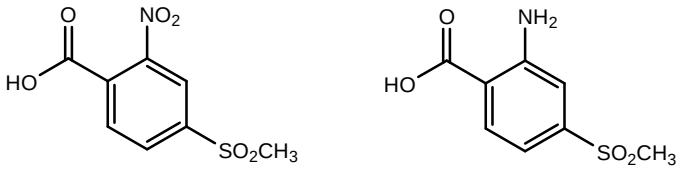
Le premier métabolite formé (**M_1**), sous-produit majoritaire (28 à 41 % de sulcotrione transformée deux mois après le traitement), est l'acide 5,7-dicéto-7-(2-chloro-4-méthylsulfonyl)phénylheptanoïque (CHBA). Il est issu d'une ouverture hydrolytique non attendue de la cyclohexane-1,3-dione. **M_1** est ensuite converti dans le sol en **M_2** qui s'accumule ponctuellement (10 à 20 % de sulcotrione transformée, 1 à 3 mois après épandage

de la sulcotrione). Le produit attendu lors de l'hydrolyse de la sulcotrione, l'acide 2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoïque (CMBA = **M_3**), est lui aussi formé. La concentration de **M3** retrouvée dans le sol, deux mois après le traitement, représente 15 % de la sulcotrione transformée. Il est à noter que **M_1** possède une importante activité herbicide contrairement à **M_2** et **M_3**.

L'apport d'amendements organiques dans le but d'améliorer la biodégradation de la sulcotrione a également été testé. Cherrier *et al.* (2004) ont étudié, à l'aide de la molécule uniformément marquée au ^{14}C sur le noyau benzénique, l'impact de différents apports organiques (aucun (sol référence), fumier et fumier composté) sur la disparition de la sulcotrione sur un terrain limono-sableux. Après deux mois d'incubation, les résidus extractibles contiennent entre 13 et 36 % de sulcotrione selon la parcelle testée. La minéralisation de l'herbicide, mesurée par la production de $^{14}CO_2$, est lente et dépend du sol étudié. Plus le sol est riche en matières dégradables (fumier ou compost), plus le taux de minéralisation est fort, allant jusqu'à 35 % de minéralisation en présence de fumier au bout de deux mois. Quel que soit l'apport, deux métabolites de la sulcotrione sont retrouvés dans les résidus extractibles : l'un est le CMBA, majoritairement formé, l'autre n'a pu être identifié. La fraction de résidus extractibles diminue au cours de l'incubation suite à la minéralisation des produits ou à leur adsorption sur le sol. L'apport de fumier permet d'obtenir un taux de minéralisation et une fraction de composés non-extractibles plus importants, tandis que le fumier composté privilégie la formation du CMBA. Cet exemple montre bien la difficulté à dissocier phénomènes d'adsorption et de biodégradation.

I.2.2 La mésotrione

A notre connaissance, aucune étude détaillée sur la biodégradation de la mésotrione n'a été publiée. Il est simplement rapporté que le métabolisme de la mésotrione dans les sols conduit à deux métabolites, l'acide 4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoïque (MNBA) et l'acide 2-amino-4-méthylsulfonylbenzoïque (AMBA) (Figure 19).



MNBA **AMBA**

Figure 19 : Métabolites de la mésotrione retrouvés dans les sols

Dyson *et al.* (2002) ont suivi la biodégradation de la mésotrione dans 15 sols européens et américains possédant des propriétés différentes (texture, pH, pourcentage de matière organique) afin de mettre en évidence des corrélations entre ces différents paramètres et la vitesse de dégradation de la mésotrione. Ils ont montré que le temps de demie-vie de ce pesticide dans le sol est surtout influencé par le pH et dans une moindre mesure par le taux de matière organique du sol. Les métabolites n'ont pas été étudiés.

Le maïs détoxifie et dégrade rapidement la mésotrione en métabolites au point qu'elle ne quitte pas la zone traitée (Béraud *et al.*, 2001). Des essais en plein champ ont montré qu'elle n'est plus retrouvée dans les cultures 14 jours après l'application. La mésotrione est absorbée rapidement par les adventices sensibles aux herbicides foliaires. Elle est sélective envers le maïs car cette plante la métabolise très rapidement. Le MNBA, l'AMBA et la mésotrione hydroxylée en position 4 sur la cyclohexane-1,3-dione sont également présents dans le métabolisme des plantes (Mitchell *et al.*, 2001). Le même type de réactions est observé lors de la dégradation de la sulcotrione par le maïs (Tarr, 2000).

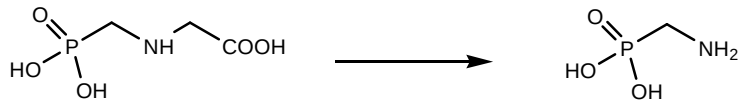
Un métabolite commun est observé par ces deux procédés (dégradation biotique et abiotique) : il s'agit du composé issu de l'hydrolyse entre les deux cycles de la molécule (MNBA pour la mésotrione et CMBA pour la sulcotrione). Le second point commun à la dégradation de ces deux herbicides est l'ouverture de la cyclohexane-1,3-dione qui a lieu dans le cas de la sulcotrione lors d'une dégradation biotique et dans le cas de la mésotrione lors d'une dégradation photochimique.

II LE GLYPHOSATE

II.1 Dégradation par voie photochimique

Rueppel *et al.* (1977) ont montré que le glyphosate n'était que peu sensible à la lumière solaire et que le processus de photodégradation ne jouait qu'un rôle mineur comparé à la dégradation par voie biologique. Une étude plus récente (Lund-Hoie et Friestad, 1986) a montré au contraire une forte photodégradation du glyphosate mais les auteurs travaillent sous irradiation UV (254 nm). Dans ces conditions, son temps de demie-vie dans l'eau déionisée est de quatre jours pour une concentration initiale de 1 ppm.

Une solution de glyphosate à 2000 ppm irradiée dans les mêmes conditions que précédemment durant 5 semaines a permis de mettre en évidence la formation de photoproduits (Figure 20):



Glyphosate **AMPA**

Figure 20 : Photoproduit identifié lors de la dégradation UV du glyphosate (Lund-Hoie et Friestad, 1986)

Le principal photoproduit formé est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) qui n'est pas sensible à la photodégradation. 44 % du glyphosate est dégradé en AMPA dans ces conditions.

La photodégradation reste cependant dans l'environnement une voie mineure de disparition du glyphosate. De même, sa dégradation chimique (hydrolyse ou oxydation) ne semble que peu (Sprankle *et al.,* 1975a ; Carlisle et Trevors, 1988) ou pas impliquée (Rueppel *et al.,* 1977, Anton *et al.,* 1993). La principale voie de dégradation du glyphosate est la dégradation biologique.

II.2 Dégradation par voie biologique

Le glyphosate peut être biodégradé par des bactéries ou par des champignons, le glyphosate étant ou non utilisé comme source de phosphore ou éventuellement d'azote. Aucune publication ne rapporte son utilisation en tant que source de carbone. Deux voies métaboliques ont été décrites conduisant à la formation intermédiaire de la glycine ou de

l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) (Singh et Walker, 2006). La voie faisant intervenir la glycine est présentée sur la Figure 21.

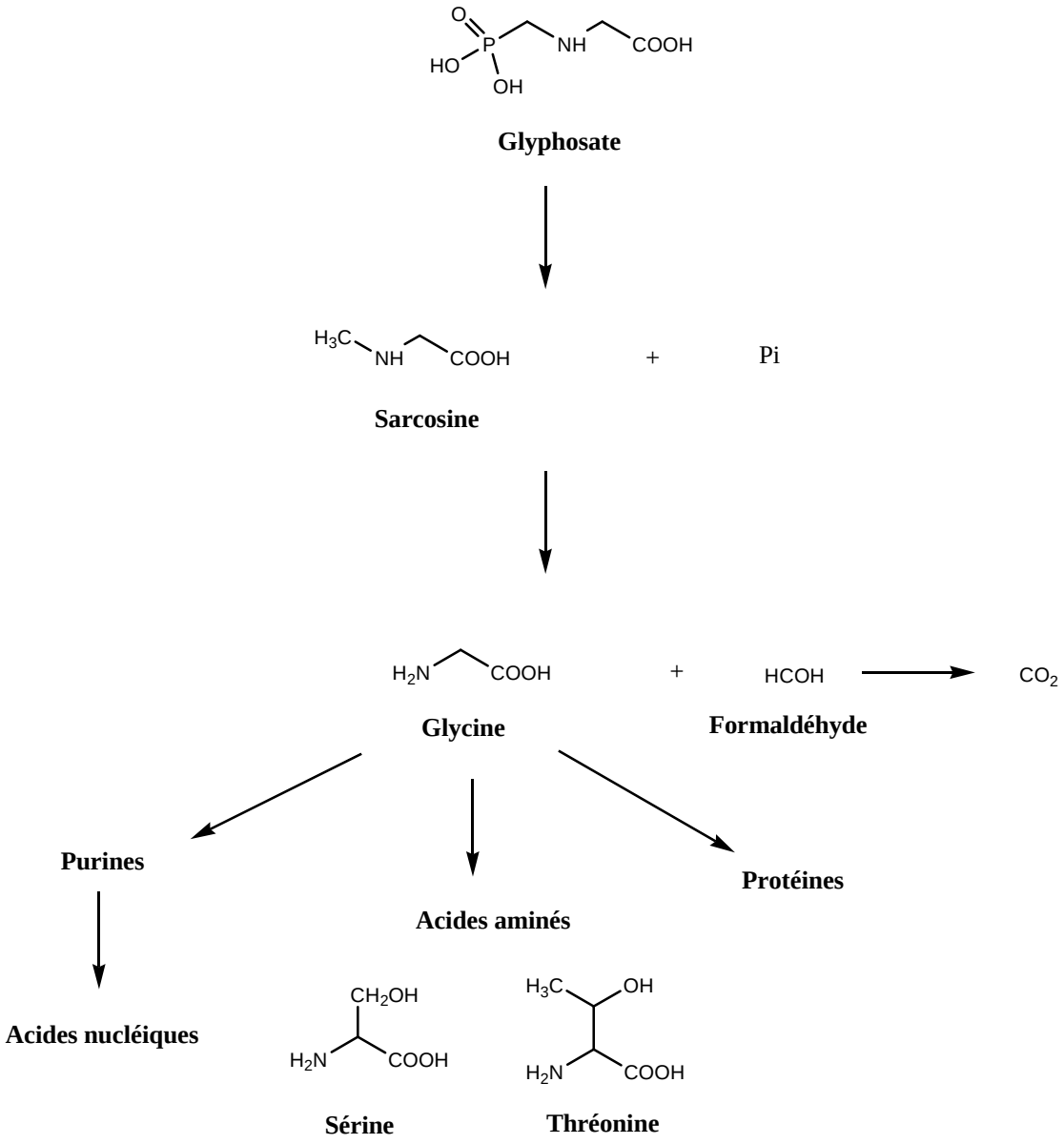


Figure 21 : Schéma métabolique de biodégradation du glyphosate (Jacob *et al.*, 1987)

La coupure de la liaison C-P par une lyase conduit à la formation de la sarcosine (N-méthylglycine) et de phosphore inorganique (phosphates). La sarcosine est à son tour transformée en glycine et formaldéhyde. La glycine est utilisée par les bactéries pour synthétiser des protéines, des acides nucléiques et des acides aminés tels que la sérine, la cystéine, la méthionine et l'histidine. Ce premier schéma métabolique a été proposé lors de la dégradation du glyphosate par les souches *Pseudomonas* sp. PG2982, isolée du compartiment sol (Jacob *et al.*, 1985 ; Kishore et Jacob, 1987 ; Jacob *et al.*, 1987) et *Arthrobacter* sp. GLP-1 (Pipke *et al.*, 1987). L'étude sur *Pseudomonas* sp. PG2982 a été la première mettant en

évidence cette voie métabolique du glyphosate par une souche pure de microorganisme. Celle concernant *Arthrobacter* sp. GLP-1 est la première à mettre en évidence le même métabolisme chez une bactérie Gram positif.

La seconde voie de dégradation du glyphosate conduisant à la formation de l'AMPA est présentée sur la Figure 22.

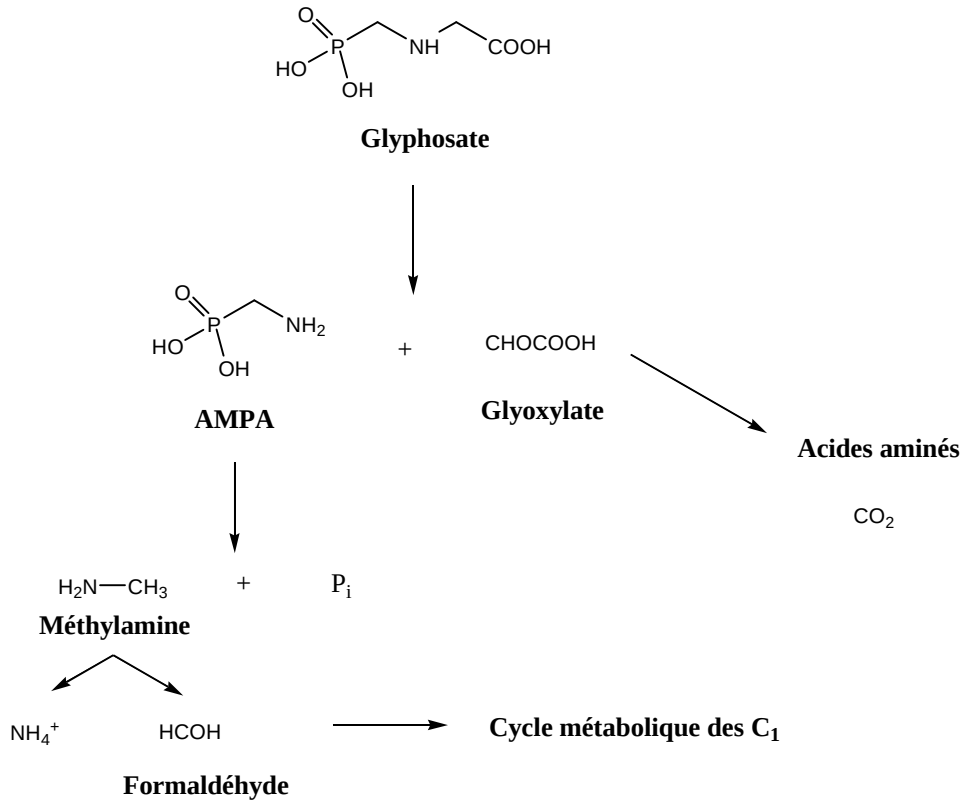


Figure 22 : Schéma métabolique de biodégradation du glyphosate (Singh et Walker, 2006)

La seconde voie métabolique implique la conversion du glyphosate en acide aminométhylphosphonique (AMPA) par perte d'une unité C_2 (glyoxylate). Ce composé est alors déphosphorylé par une C-P lyase et converti en méthylamine puis formaldéhyde. L'AMPA est le principal métabolite retrouvé dans les sols (Rueppel *et al.*, 1977 ; Singh et Walker, 2006).

II.2.1 Transformation biologique du glyphosate en glycine

Les souches *Pseudomonas* sp. PG2982 (Kishore et Jacob, 1987) et *Arthrobacter* sp. GLP-1 (Pipke *et al.*, 1987) dégradent le glyphosate par une coupure initiale de la liaison C-P conduisant à la formation intermédiaire de sarcosine et de phosphates inorganiques, puis après oxydation, à la glycine. Cette rupture de la liaison C-P est relativement étonnante du fait de sa

grande stabilité chimique, photochimique et thermique. Ces deux souches utilisent le glyphosate comme source de phosphore (Jacob *et al.*, 1987), et la dégradation est inhibée par l'apport dans le milieu de phosphates inorganiques. Une telle régulation du potentiel dégradatif du glyphosate en fonction de la teneur en phosphates du milieu a été ultérieurement décrite avec une autre souche, *Alcaligenes* sp. GL (Lerbs *et al.*, 1990). Les métabolites formés avec la souche *Pseudomonas* sp. PG2982 ont été identifiés par RMN du solide (Cross Polarization Magic Angle Spinning ou CPMAS) sur des cellules entières lyophilisées après croissance sur un milieu enrichi en glyphosate doublement marqué au ^{13}C (en position : 2 ou 3) et à l'^{15}N (Jacob *et al.*, 1985 ; 1987). Cette technique a l'avantage de donner une vue d'ensemble des produits contenus dans l'échantillon, des protéines aux acides nucléiques, lorsqu'ils sont marqués. Ces auteurs ont ainsi pu démontrer par différentes techniques que le glyphosate était transformé en glycine (Jacob *et al.*, 1985) et que l'intermédiaire était la sarcosine (Jacob *et al.*, 1987). L'AMPA n'est pas observé lors de la dégradation du glyphosate par ces deux souches pures. Le métabolisme de *Pseudomonas* sp. PG2982 a été étudié plus en détails avec la même technique d'analyse (RMN CPMAS), en particulier pour mettre en évidence l'influence de la source d'azote sur le métabolisme du glyphosate. La souche de *Pseudomonas* sp. PG2982 a donc été cultivée sur un milieu glycine ou sur un milieu ammonium avec, dans les deux cas, du glyphosate (marqué au ^{13}C) comme source de phosphore (Jacob *et al.*, 1987). Les auteurs ont ainsi pu montrer que lorsque la source d'azote est le sulfate d'ammonium, la glycine, formée lors de la dégradation du glyphosate, est utilisée intacte, directement pour la biosynthèse des purines et des protéines. Par contre, lorsque la souche est cultivée sur un milieu glycine (utilisée comme source d'azote), la glycine issue du glyphosate n'est alors plus intégrée telle quelle dans les purines et les protéines, mais est majoritairement catabolisée *via* le système métabolique du pyruvate. Cela a été démontré toujours par RMN par la perte du marquage des carbones du glyphosate, atomes de carbone alors dilués dans la multitude des voies métaboliques du pyruvate (contrairement au milieu riche en ammonium pour lequel les ^{13}C du glyphosate sont retrouvés quasi intégralement dans les purines). D'autres microorganismes utilisant cette même voie métabolique *via* la sarcosine ont été plus récemment isolés : plusieurs souches de la famille des *Rhizobiaceae* (Liu *et al.*, 1991), des *Streptomyces* isolés à partir de boues de stations d'épuration (Obojska *et al.*, 1999) ou d'échantillons environnementaux (Dick et Quinn, 1995). Dans chaque cas, l'apport de phosphates inorganiques conduit à une inhibition de la dégradation du glyphosate. La présence dans le milieu de phosphates inorganiques entraînerait la non-expression des gènes codant pour le système enzymatique de la C-P lyase

rendant alors les cellules incapables de métaboliser le glyphosate (Liu *et al.*, 1991). Des systèmes de contrôle et de régulation à différents niveaux métaboliques ont été mis en évidence chez une souche mutante d'*Arthrobacter* sp. GLP1 (Pipke et Amrhein, 1988) et chez une souche d'*Alcaligenes* sp. GL (Lerbs *et al.*, 1990). Ainsi l'entrée, la vitesse et les voies de dégradation du glyphosate seraient contrôlées en fonction, par exemple, de la concentration de phosphates inorganiques dans le milieu, de celle du glyphosate externe ou du taux d'expression de la capacité dégradante de la sarcosine. La souche *Streptomyces* StC, elle, est capable d'utiliser le glyphosate à la fois comme source de phosphore et/ou d'azote, la voie métabolique restant inchangée. Ainsi en partant d'une concentration assez élevée de 10 mM en glyphosate comme seule source d'azote ou de phosphore et d'azote, cette souche libère jusqu'à 60 % de phosphates inorganiques au bout de 10 jours de dégradation (Obojska *et al.*, 1999).

II.2.2 Transformation biologique du glyphosate en AMPA

La deuxième voie met en jeu la formation « intermédiaire » de l'AMPA, métabolite mis en évidence pour la première fois par Rueppel *et al.* (1977) à partir d'échantillons de sol. Contrairement à la première voie, l'apport de phosphates inorganiques n'inhibe pas la dégradation de glyphosate, pouvant laisser penser que cette voie a été développée par les microorganismes pour répondre à un besoin de dégrader le glyphosate en présence de ces phosphates (Kishore et Jacob, 1987).

La première souche microbienne dégradant le glyphosate a été isolée à partir des boues activées de la station d'épuration de l'usine Monsanto produisant ce composé par Balthazor et Hallas (1986), le glyphosate constituant la seule source de phosphore. Cette souche, appartenant au genre *Flavobacterium*, est capable de transformer quasi-quantitativement le glyphosate en AMPA, qui est ensuite minéralisé par l'action d'une phosphonate hydrolase libérant ainsi notamment des ions phosphates et ammonium utilisables par la souche. La présence de phosphates inorganiques n'inhibe pas la dégradation du glyphosate en AMPA mais inhibe celle du AMPA.

Une autre souche très active a été isolée du même milieu : il s'agit de *Pseudomonas* sp. LBr (Jacob *et al.*, 1988). Elle est capable de dégrader efficacement le glyphosate jusqu'à des concentrations très élevées de l'ordre de 20 mM. Afin d'étudier le métabolisme de cette bactérie, ces auteurs ont analysé des cellules lyophilisées par RMN du solide, après culture sur un milieu contenant du glyphosate marqué au ^{13}C (source de phosphore). Ils ont pu mettre

en évidence une particularité de cette souche qui est celle d'utiliser les deux voies de dégradation du glyphosate : la voie majoritaire est celle de l'AMPA, qui est formé en grande quantité mais qui est ensuite très peu métabolisé ; la voie de la glycine, bien que mineure, est également observée (environ 5 % du glyphosate est transformé en glycine). La capacité de cette souche à dégrader le glyphosate est liée à la concentration de phosphates dans le milieu et aux besoins de la cellule en phosphore. D'autres souches bactériennes utilisant cette voie métabolique ont été récemment décrites (Singh et Walker, 2006), la dégradation étant plus ou moins efficaces. L'AMPA semble toujours dégradé plus lentement que le glyphosate.

Les souches fongiques jouent également un rôle important dans la dégradation du glyphosate, la première étude montrant cette capacité a été réalisée avec *Penicillium citrinum* (Zboinska *et al.*, 1992). Krzysko-Lupicka *et al.* (1997) ont également montré que parmi 26 souches fongiques isolées de sol testées, 7 peuvent utiliser le glyphosate comme seule source de phosphore : *Trichoderma viride* II, *Trichoderma viride* II A3g, *Penicillum* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis* sp. et *Aspergillus niger*. Le métabolisme des trois dernières souches a été étudié plus en détails, mettant en évidence une forte dépendance de la croissance des cellules et de la dégradation du glyphosate avec le pH initial du milieu (le pH initial doit être ajusté à 6 au départ pour éviter une trop forte baisse du pH au cours de la dégradation inhibant la croissance) et le passage par l'AMPA comme métabolite intermédiaire. *Penicillium chrysogenum*, lui, est le premier champignon décrit comme pouvant utiliser le glyphosate comme source d'azote (Klimek *et al.*, 2001). Avec les souches fongiques, la question reste posée d'une véritable dégradation ou d'une incorporation dans la biomasse. L'incubation de *Trametes* sp. en présence de glyphosate marqué au ^{14}C a montré une minéralisation de 8 % du glyphosate et une incorporation de 16,5 % dans le cytoplasme (fraction glucidique) (Charney *et al.*, 2004).

D'autre part le glyphosate peut être métabolisé par certains végétaux, pommiers et poiriers (Carlisle et Trevors, 1988). Le principal métabolite produit est l'AMPA. Toutefois au contact du sol, il est plus facilement adsorbé sur des particules qu'absorbé par les racines des plantes (Hance, 1976).

Les voies métaboliques du glyphosate, herbicide utilisé depuis de nombreuses années, ont été largement étudiées. Il semble que la plupart des souches capables d'utiliser le glyphosate ne le transforment que minoritairement en AMPA et majoritairement en sarcosine. Toutefois, le AMPA est pratiquement le seul métabolite détecté (et recherché) dans des matrices environnementales du fait de sa faible biodégradabilité et de sa persistance dans les sols, la sarcosine étant facilement intégrée au métabolisme central des microorganismes. Ceci suggère également que les constituants des sols peuvent moduler la métabolisation du glyphosate. Quoiqu'il en soit, la rupture de la liaison C-P reste l'opération essentielle pour la dégradation du glyphosate, même si l'action de l'enzyme C-P lyase, dont l'expression et l'activité sont fortement modulées par la présence de phosphates dans le milieu, reste mal connue.

L'identification des métabolites issus de la dégradation d'un pesticide est importante car ils peuvent être encore plus toxiques ou plus persistants que le pesticide lui-même. La mésotrione se transformerait dans le sol en MNBA et AMBA d'après les études de terrain réalisées par la firme la produisant : Syngenta. Des études de photodégradation de la mésotrione ont montré la formation d'autres composés. Il est par conséquent intéressant de déterminer quels métabolites potentiels intermédiaires peuvent se former au cours de la biodégradation de la mésotrione. Une recherche bibliographique sur la biodégradation de composés de structure analogue à la mésotrione (composés aromatiques nitrés) a donc été réalisée pour avoir une idée des possibles métabolites formés.

BIODEGRADATION DE COMPOSES AROMATIQUES NITRES

Les composés aromatiques nitrés tels que les nitrophénols, nitrobenzènes, nitrotoluènes sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles (matière première pour la fabrication de colorants, polymères, produits pharmaceutiques et pétroliers), agricoles (pesticides) et militaires (explosifs). La majorité des composés aromatiques nitrés ainsi que leurs produits de dégradation sont toxiques pour les plantes, les animaux et les microorganismes (Haghighi–Podeh et Bhattacharya, 1996 ; Schmitt *et al.*, 2000), certains présentant même des propriétés mutagènes et cancérigènes (Won *et al.*, 1976; Padda *et al.*, 2003). Ils constituent donc une menace pour l'homme et l'environnement. Certains composés ont été classés dans la liste des polluants recherchés prioritairement par l'Agence Américaine de Protection Environnementale (EPA, 2007). Cependant, l'omniprésence de ces composés nitrés dans l'environnement a permis aux microorganismes d'exploiter leur grande diversité génétique et de développer différents mécanismes pour transformer ou éliminer ces composés. Cependant, très peu conduisent à la minéralisation (Ye *et al.*, 2004). Ils jouent un rôle important dans la dégradation de ces polluants souvent persistants, car ils sont capables de les utiliser comme nutriments.

Les composés aromatiques nitrés peuvent être dégradés selon différents mécanismes biochimiques. Ils ont longtemps été considérés comme réfractaires aux attaques par des oxygénases par suite du caractère électro-attracteur du groupement nitro, qui appauvrit le cycle aromatique en électrons (Pelmont, 2005). En revanche, il a été montré que les composés nitroaromatiques portant des substituants polaires tels que des fonctions alcool ou acide carboxylique sont plus facilement biodégradables (Spain et Gibson, 1991 ; Jain *et al.*, 1994 ; Cartwright et Cain, 1959). La dégradation biologique des nitrodérivés peut suivre trois stratégies différentes (Ye *et al.*, 2004 ; Symons et Bruce, 2006) :

- **Oxydation du cycle aromatique** dans une réaction catalysée soit par une dioxygénase avec introduction simultanée de deux groupements hydroxyle et élimination ou non du groupement nitro en nitrite ; soit par une monooxygénase avec introduction d'un seul groupement hydroxyle et élimination du groupement nitro sous forme de nitrites.

- **Réduction partielle du groupement nitro** en fonction hydroxylamine *via* un intermédiaire nitroso.

- **Réduction partielle du cycle aromatique** conduisant au complexe de Meisenheimer par addition nucléophile d'un ion hydrure et élimination de nitrites.

Nous présenterons ici uniquement quelques exemples illustrant les diverses voies possibles de biodégradation de dérivés nitrés ainsi que le type de métabolites formés. La biodégradation de nitrobenzène, nitrophénol, nitrobenzoate et nitrotoluène sera présentée plus en détails. Il est à noter que plusieurs voies sont souvent répertoriées pour un même microorganisme.

Ces différents mécanismes enzymatiques pourraient être impliqués dans la biotransformation de la mésotrione, qui est un dérivé nitré. Aucun schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione n'ayant en effet été proposé à ce jour, il nous a semblé intéressant de voir quels étaient les métabolites qui pourraient se former lors d'une attaque du cycle aromatique ou du groupement nitro.

I OXYDATION DU CYCLE AROMATIQUE

Le cycle benzénique est fortement stabilisé par son énergie de résonance résultant de la délocalisation uniforme des électrons dans le noyau. Son oxydation par voie chimique nécessite des conditions drastiques. Le cycle est toutefois fragilisé par l'introduction d'un ou deux substituants oxygénés. De nombreuses bactéries telles que *Pseudomonas*, *Nocardia* et *Aerobacter* ont été décrites comme capables d'oxyder en aérobiose le cycle aromatique en catéchol grâce à une dioxygénase. Certains microorganismes (*Pseudomonas*, *Burkholderia*) peuvent également, dans une réaction catalysée par une monooxygénase, introduire un groupement hydroxyle sur le noyau aromatique, voire enchaîner deux réactions catalysées par une monooxygénase pour conduire au catéchol (Pelmont, 2005). Les composés aromatiques comportant un ou deux groupements nitrés sont plus sensibles aux réactions d'oxydation en aérobiose et conduisent à la formation de produits intermédiaires possédant des fonctions hydroxyle responsables de ruptures oxydatives du cycle. En introduisant ces groupements polaires, le caractère hydrophile de ces composés est augmenté et leur dégradation est facilitée.

I.1 Réactions catalysées par une dioxygénase

I.1.1 Présentation

Les dioxygénases permettent l'introduction de deux atomes d'oxygène sur le noyau aromatique. Elles sont classées en deux catégories. La première incorpore deux groupements hydroxyle sur le noyau aromatique en position *ortho* l'un de l'autre en utilisant comme source d'électrons un cofacteur d'oxydoréduction, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP). Le *cis*-dihydrodiol obtenu est ensuite converti en catéchol par une déshydrogénase. La deuxième classe de dioxygènases, les catéchol 1,2-dioxygénases (voie *ortho*) et les catéchol 2,3-dioxygénases (voie *meta*), prend en charge le catéchol en ouvrant le cycle aromatique et en introduisant deux atomes d'oxygène à des endroits spécifiques. Des réactions successives d'isomérisation et d'hydratation conduisent à l'acide 3-oxoadipique et à l'acide 4-hydroxy-2-oxopentanoïque (Pelmont, 2005) (Figure 23).

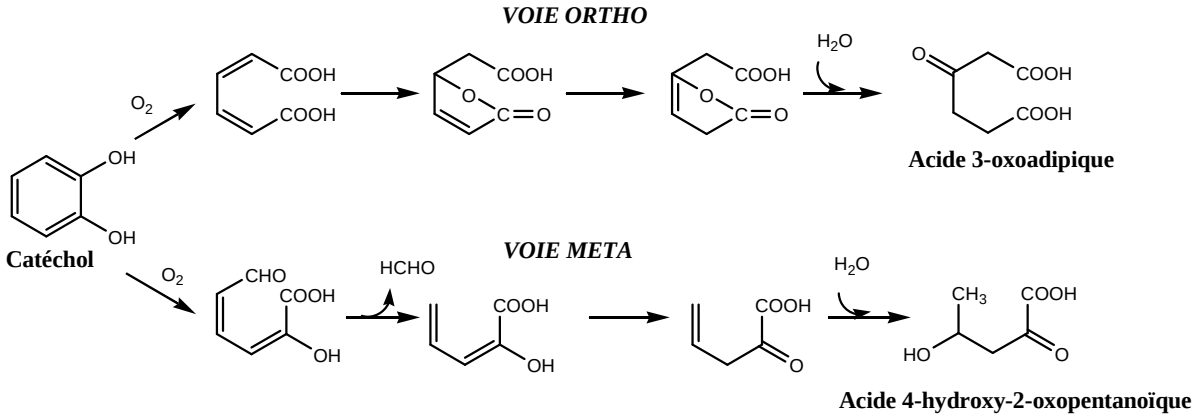


Figure 23 : Voies des catéchols (Pelmont, 2005)

Les deux produits finaux sont transformés par la protocatéchuate 3,4-dioxygénase et intègrent le cycle de Krebs ou le métabolisme de l'acétate (Pelmont, 2005) (Figure 24).

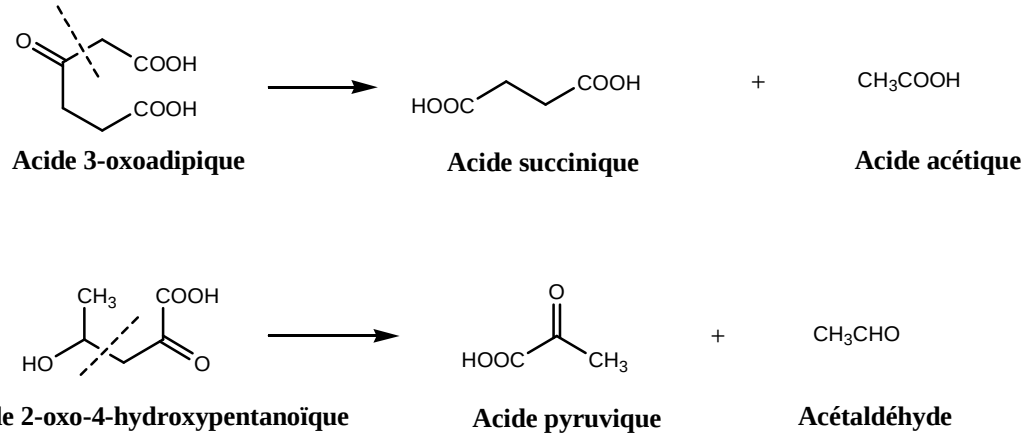


Figure 24 : Transformation des acides 3-oxoadipique et 2-oxo-4-hydroxypentanoïque (Pelmont, 2005)

I.1.2 Exemples de composés aromatiques nitrés

I.1.2.1 Le nitrobenzène

Le nitrobenzène est utilisé comme matière première pour la fabrication d'aniline. Il est aussi employé pour la synthèse de pesticides, médicaments, huiles lubrifiantes et caoutchouc (Ye *et al.*, 2004).

Haigler et Spain (1991) ont étudié la capacité de sept souches bactériennes, appartenant au genre *Pseudomonas* possédant les voies de dégradation du toluène (plasmide TOL) à oxyder le nitrobenzène (NB). Toutes les souches sont cultivables en présence de NB à condition qu'une source de carbone soit apportée (glucose). En revanche, seules cinq souches le dégradent, après induction des cultures avec du toluène, selon deux voies métaboliques impliquant soit une dioxygénase, soit une monooxygénase lors de l'étape initiale de biotransformation. Seule la première voie sera présentée plus en détails ici (Figure 25).

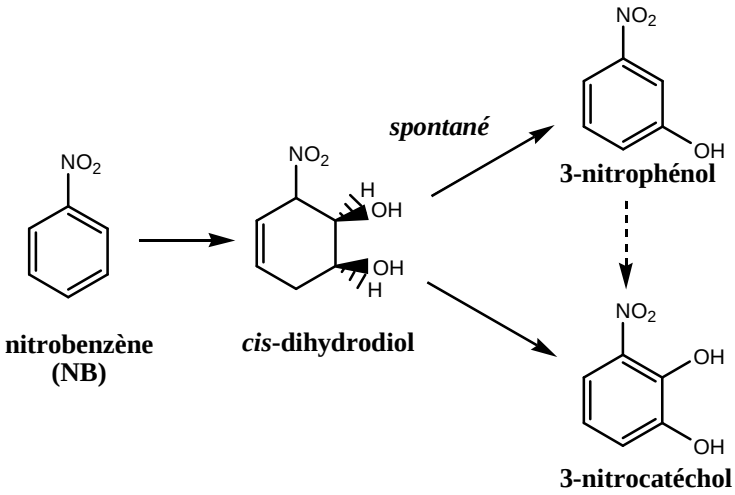


Figure 25 : Transformation du nitrobenzène par des souches appartenant au genre *Pseudomonas* (Haigler et Spain, 1991)

Pseudomonas putida F1 et *Pseudomonas* sp. JS150 transforment le NB en 3-nitrocatéchol avec comme intermédiaire le *cis* nitrobenzène dihydrodiol impliquant l'action d'une dioxygénase. Cette enzyme a pu être mise en évidence par l'utilisation d'une part d'oxygène marqué ($^{18}O_2$) lors de la biotransformation (incorporation des deux atomes de $^{18}O_2$ sur le cycle aromatique), et d'autre part, d'une souche mutante, *Pseudomonas putida* 39/D, dans laquelle le gène codant pour l'enzyme transformant le *cis*-dihydrodiol en catéchol a été supprimé. Avec cette souche mutée, le *cis* 1,2-dihydroxy-3-nitrocyclohexa-3,5-diène a pu être clairement identifié. La formation de 3-nitrophénol a également été notée : il résulte de la décomposition chimique spontanée du dihydrodiol. Avec ces souches, le 3-nitrocatéchol se dégrade lentement mais aucun métabolite n'a été observé.

I.1.2.2 Le 2-nitrotoluène

La dégradation du 2-nitrotoluène par la souche *Pseudomonas* JS42, isolée par Haigler *et al.* (1994b) à partir d'un sol contaminé par des nitrobenzènes, est initiée par une dioxygénase (Figure 26), mais cette fois-ci, le groupement NO_2 va être éliminé sous forme de nitrites lors de la réaromatisation du cycle.

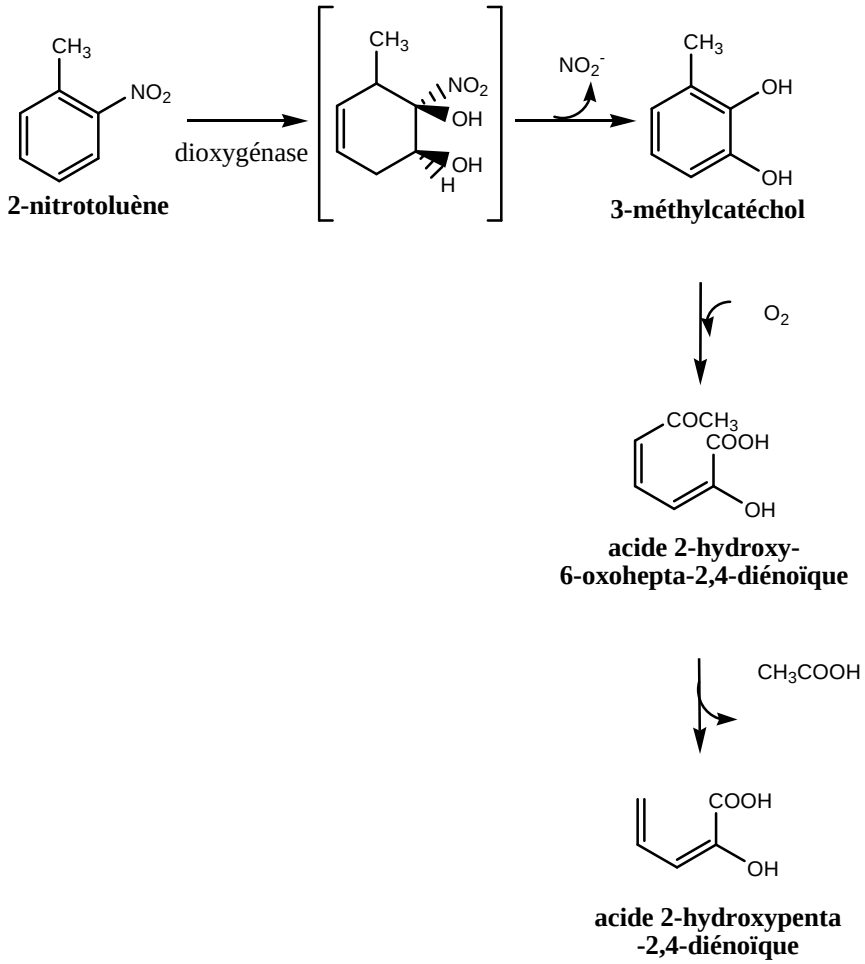


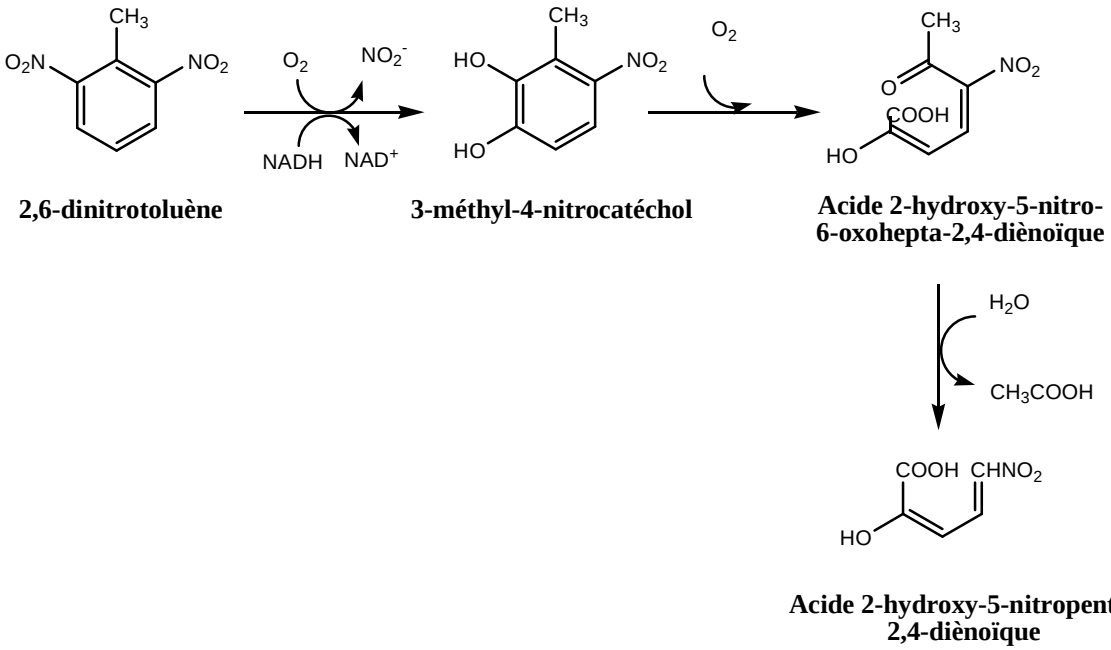
Figure 26 : Schéma métabolique du 2-nitrotoluène par *Pseudomonas* JS42 (Haigler *et al.*, 1994b)

Cette souche est capable d'utiliser le 2-nitrotoluène comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie. Le 2-nitrotoluène est converti en 3-méthylcatéchol, après passage par l'intermédiaire *cis*-dihydroxylé (action d'une dioxygénase), qui élimine spontanément le groupement nitré sous forme d'ions nitrites. Le 3-méthylcatéchol est ensuite oxydé par une dioxygénase avec ouverture classique du cycle aromatique selon la voie *meta* du catéchol. Il est à noter que seulement 50 à 75 % de la quantité d'ions nitrites théorique est retrouvée dans le milieu, ce qui suggère l'induction d'un système actif d'utilisation ou de transformation de ces ions.

I.1.2.3 Le 2,4- et 2,6-dinitrotoluène

Le 2,4 et le 2,6-dinitrotoluène sont des impuretés majeures (mais aussi des produits de dégradation) du 2,4,6-trinitrotolène (TNT) qui est un explosif. Le 2,4-dinitrotoluène est aussi un précurseur du toluène diisocyanate, utilisé dans la production du polyuréthane.

Nishino *et al.* (2000) ont isolé de sites contaminés par des dinitrotoluènes, deux souches capables de minéraliser le 2,4-dinitrotoluène mais aussi le 2,6-dinitrotoluène par deux voies différentes : *Burkholderia cepacia* JS850 et *Hydrogenophaga palleronii* JS863. Quand le 2,6-dinitrotoluène constitue la seule source de carbone et d'azote, il est converti en 3-méthyl-4-nitrocatéchol par une dioxygénase avec élimination simultanée d'ions nitrites. Cet intermédiaire est ensuite oxydé avec ouverture du cycle aromatique selon la voie *meta* du catechol, conduisant à un dérivé mononitré (Figure 27).



2,6-dinitrotoluène **3-méthyl-4-nitrocatéchol** **Acide 2-hydroxy-5-nitro-6-oxohepta-2,4-dièn oïque**

Acide 2-hydroxy-5-nitropenta-2,4-dièn oïque

Figure 27 : Schéma métabolique de biodégradation du 2,6-dinitrotoluène par *Burkholderia cepacia* JS850 et *Hydrogenophaga palleronii* JS863 (Nishino *et al.*, 2000)

La voie de biodégradation du 2,4-dinitrotoluène par ces mêmes souches diverge après la première étape commune de dioxygénation conduisant dans ce cas au 4-méthyl-5-nitrocatéchol avec élimination concomitante d'ions nitrites (Figure 28). Le deuxième groupement nitro est éliminé également sous forme d'ions nitrites mais cette fois-ci suite à l'intervention d'une monooxgènase, avec formation de la 2-hydroxy-5-méthylquinone, qui est à son tour réduite en 2,4,5-trihydroxytoluène. L'ouverture classique du cycle aromatique intra- ou extradiol est ensuite observée avec formation de différents produits suivant le microorganisme mis en cause.

Cette voie métabolique a été mise en évidence chez d'autres souches (Spanggord *et al.*, 1991 ; Haigler *et al.*, 1994a). Les dinitrotoluène dioxygénases de *Pseudomonas* sp. DNT et de *Burkholderia cepacia* JS850 ont été caractérisées après purification partielle (Suen et

Spain, 1993 ; Haigler *et al.*, 1994a) et il a été montré que le gène codant pour ces enzymes est porté par un plasmide. Une étude approfondie menée sur *Burkholderia cepacia* R34 a montré que cette bactérie sous pression constante de dinitrotoluène, avait détourné des enzymes de diverses voies métaboliques pré-existantes pour mettre en place une voie spécifique pour le 2,4-dinitrotoluène, qu'elle métabolise et utilise comme source de carbone et d'azote (Johnson *et al.*, 2002). Les auteurs ont pu montrer que tous les gènes codant pour les différentes enzymes nécessaires à la dégradation du 2,4-dinitrotoluène sont contigus et incluent également des régions liées à la régulation de la voie métabolique.

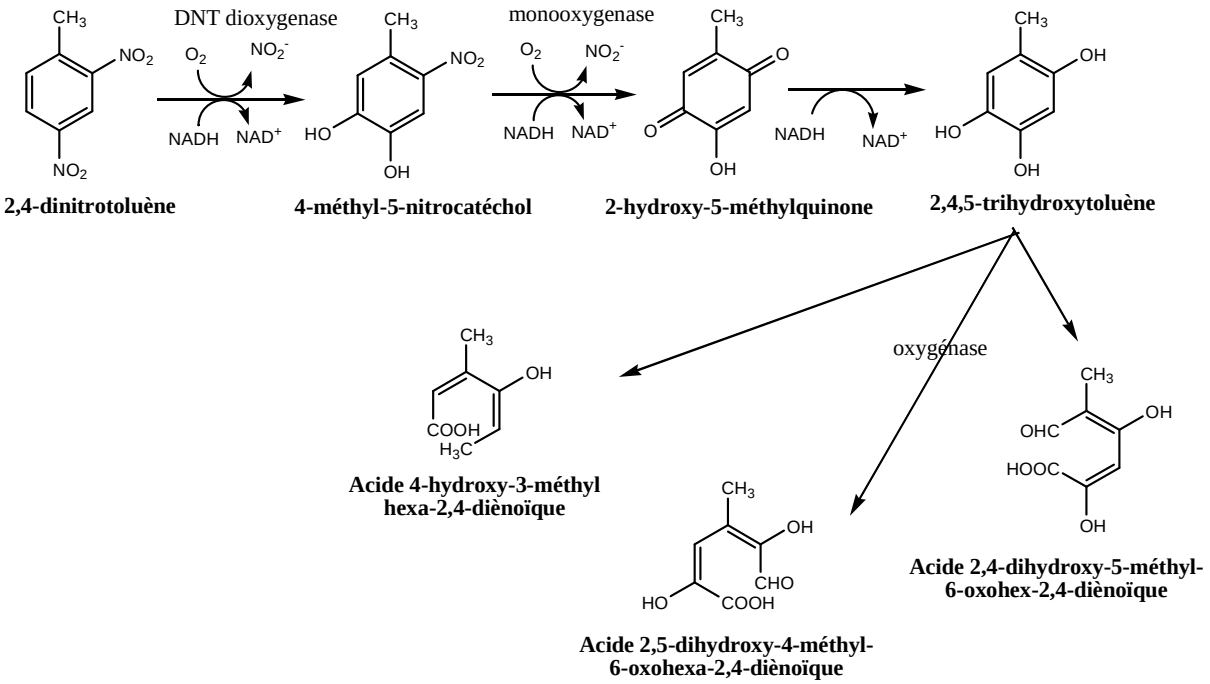


Figure 28 : Schéma métabolique de biodégradation du 2,4-dinitrotoluène (Haigler *et al.*, 1994b ; Nishino *et al.*, 2000)

I.2 Réactions catalysées par une monooxygénase

I.2.1 Présentation

Lors d'une réaction catalysée par une monooxygénase, l'unique atome d'oxygène introduit sur le polluant apparaît sous la forme d'un groupement hydroxyle, le deuxième étant réduit en H_2O. Cette réaction nécessite souvent le NADPH comme cofacteur.

I.2.2 Exemples de composés aromatiques nitrés

I.2.2.1 Le nitrobenzène

Lors de leur étude sur les capacités dégradatives de souches de *Pseudomonas* préalablement induites par le toluène, vis-à-vis du nitrobenzène (NB), Haigler et Spain (1991)

ont mis en évidence, outre l'intervention initiale d'une dioxygénase chez certaines souches (cf I.1), une autre voie métabolique impliquant une monooxygénase (Figure 29).

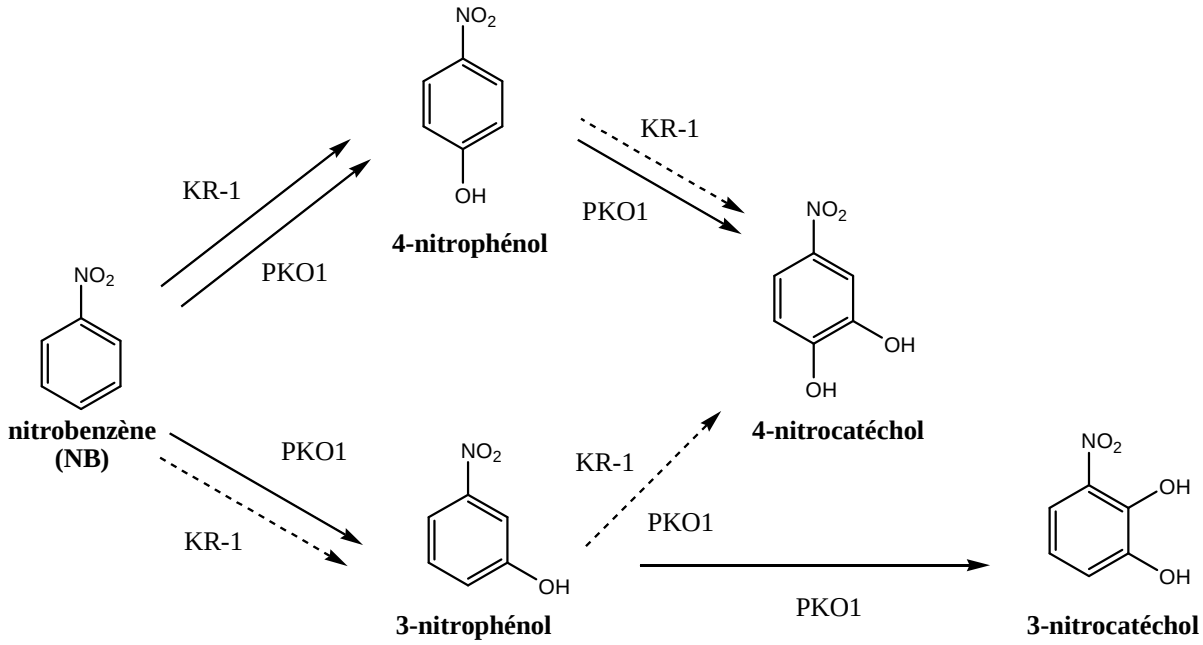


Figure 29 : Schéma de biodégradation du nitrotoluène par *P. mendocina* KR-1 et *P. pickettii* PKO1 (Haigler et Spain, 1991)

Pseudomonas mendocina KR-1 convertit le NB (10^{-4} M) en 3-nitrophénol (10 %) et 4-nitrophénol (63 %) après 5 heures d'incubation. Des traces de 4-nitrocatéchol ont pu être également observées par HPLC. Cette voie a été confirmée par incubation directe du 3- ou 4-nitrophénol qui a conduit au 4-nitrocatéchol.

Des cultures induites sur toluène de *Pseudomonas pickettii* PKO1 catalysent la conversion du NB en 3- ou 4-nitrocatéchol avec formation intermédiaire de 3-nitrophénol et de traces de 4-nitrophénol. L'incubation dans les mêmes conditions du 4-nitrophénol conduit au 4-nitrocatéchol et celle du 3-nitrophénol au 3-nitrocatéchol avec présence de traces de 4-nitrocatéchol. Les nitrocatéchols sont ensuite lentement dégradés sans qu'aucun métabolite n'ait put être détecté par HPLC.

La formation conjointe, avec ces deux souches, de 3- et 4-nitrophénol montre que l'attaque initiale du cycle aromatique par une monooxygénase est peu spécifique. Les enzymes responsables de la deuxième incorporation d'un groupement hydroxyle sur les nitrophénols ont été identifiées comme étant une toluène monooxygénase ou une phénol hydrolase. Dans ces deux cas, le groupement nitro n'est pas éliminé dans les premières étapes.

I.2.2.2 Le 4-nitrophénol

Les nitrophénols, en particulier le 4-nitrophénol, sont des polluants importants de l'environnement issus d'effluents industriels ou de la dégradation de pesticides organophosphorés tels que le parathion ou le méthylparathion.

Plusieurs souches pures aérobies ont été étudiées pour leur capacité à dégrader le 4-nitrophénol. Deux voies métaboliques principales ont été identifiées mettant toutes les deux en jeu l'action initiale d'une monooxygénase et conduisant toutes les deux à l'acide maléylacétique avec élimination quantitative d'ions nitrites. La première, plus commune chez les bactéries à Gram négatif, conduit à la formation intermédiaire d'une hydroquinone, certainement *via* une 1,4-benzoquinone avec élimination d'ions nitrites (Figure 30). L'hydroquinone est ensuite oxydée par une dioxygénase pour conduire à un composé ouvert : l'hydroxymuconique semialdéhyde, qui est converti en acide maléylacétique. La monooxygénase impliquée a été partiellement purifiée et caractérisée (Spain et Gibson, 1991 ; Chauhan *et al.*, 2000).

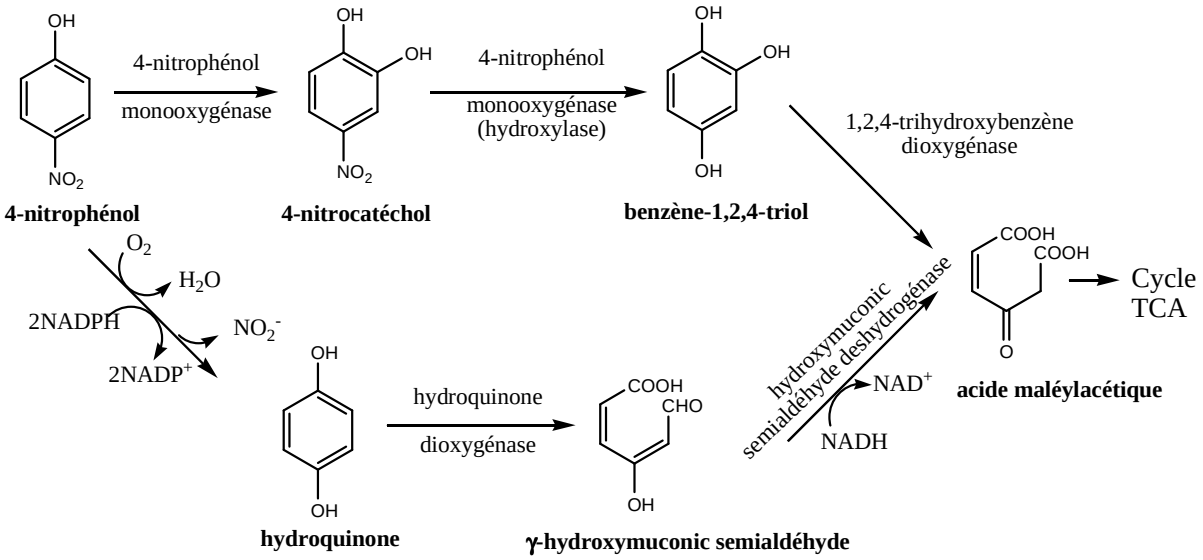


Figure 30 : Voies de biotransformation du 4-nitrophénol (Spain et Gibson, 1991)

Dans la seconde voie, plus commune chez les bactéries à Gram positif, le 4-nitrophénol est oxydé par une première monoooxygénase en 4-nitrocatéchol, qui est oxydé à son tour, avec élimination simultanée d'ions nitrites, en benzène-1,2,4-triol par une deuxième monooxygénase (Figure 30). Ce composé est ensuite ouvert par une dioxygénase agissant sur le cycle aromatique pour donner l'acide maléylacétique (Jain *et al.*, 1994). Les deux étapes successives de monooxygénation sont catalysées par une seule enzyme à deux composantes

comprenant une flavoprotéine réductase et une oxygénase. Cette enzyme a été mise en évidence chez *Bacillus sphaericus* JS905 (Kadiyala et Spain, 1998) et plus récemment chez une bactérie Gram négatif, *Serratia* sp. DS001 (Pakala *et al.*, 2007).

I.2.2.3 Les nitrobenzoates

Les nitrobenzoates sont des intermédiaires de synthèse de colorants et de médicaments, mais ils peuvent également être des métabolites obtenus lors de la dégradation du nitrotoluène.

Ces composés peuvent être également dégradés par l'intervention initiale d'une monooxygénase. La dégradation du 3-nitrobenzoate par deux souches de *Nocardia* conduit d'abord au 3-hydroxybenzoate avec élimination concomitante d'ions nitrites, puis au protocatéchuate en deux étapes successives de monooxygénation (Cartwright et Cain, 1959). Le protocatéchuate est ensuite clivé classiquement par une dioxygénase (Figure 31).

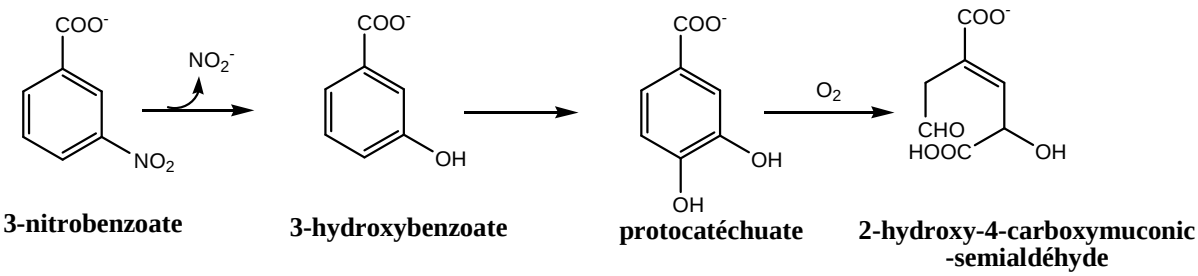


Figure 31 : Schéma métabolique du 3-nitrobenzoate par une souche appartenant au genre *Nocardia* (Cartwright et Cain, 1959)

A noter que les monooxygénases peuvent aussi s'attaquer initialement à un substituant du cycle aromatique et laisser le noyau aromatique intact, comme dans le cas de la dégradation du nitrotoluène, conduisant ainsi au 4-nitrobenzoate (Haigler et Spain, 1993) (Figure 32).

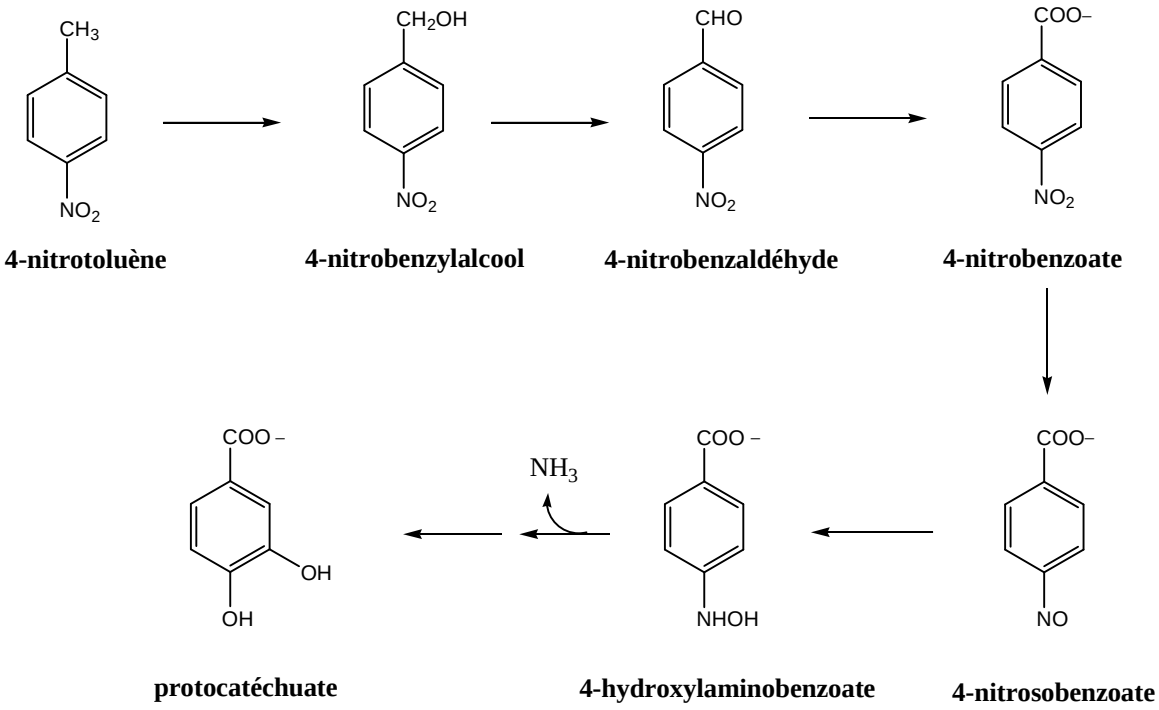


Figure 32 : Schéma métabolique de dégradation du 4-nitrotoluène (Haigler et Spain, 1993)

II REDUCTION DU GROUPEMENT NITRO

La réduction du groupement $–NO_2$ est une première étape de dégradation des dérivés aromatiques nitrés relativement commune, qui conduit soit à la minéralisation du composé, soit à l'accumulation de métabolites dont certains sont cytotoxiques et/ou mutagènes.

Deux types de nitroréductases existent et sont différenciées par leur capacité à réduire les groupements nitro en présence ou en absence d'oxygène (Somerville *et al*., 1995) :

- Les nitroréductases de type I, insensibles à l'oxygène, catalysent une série de réduction à deux électrons du groupement $–NO_2$ conduisant successivement aux dérivés nitroso, hydroxylamino et amino. Cette réduction peut donc se produire aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose (Figure 33).

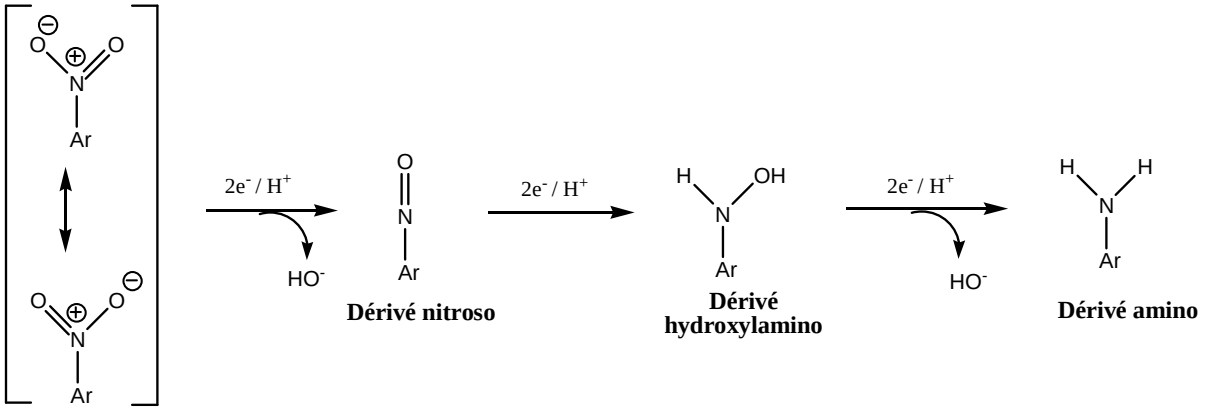


Figure 33 : Mécanisme de réduction du groupement nitro par une réductase de classe I (Esteve-Nunez *et al.*, 2001)

Le dérivé nitroso, très réactif, est souvent difficile à isoler ou même à détecter, mais les intermédiaires hydroxylamino ont, eux, été identifiés à plusieurs reprises. Ces composés peuvent également subir un réarrangement enzymatique par une mutase du type réarrangement de Bamberger (Figure 34), qui va conduire à la formation de dérivés aminophénol, qui sont de bons substrats des dioxygénases ouvrant ensuite le cycle aromatique.

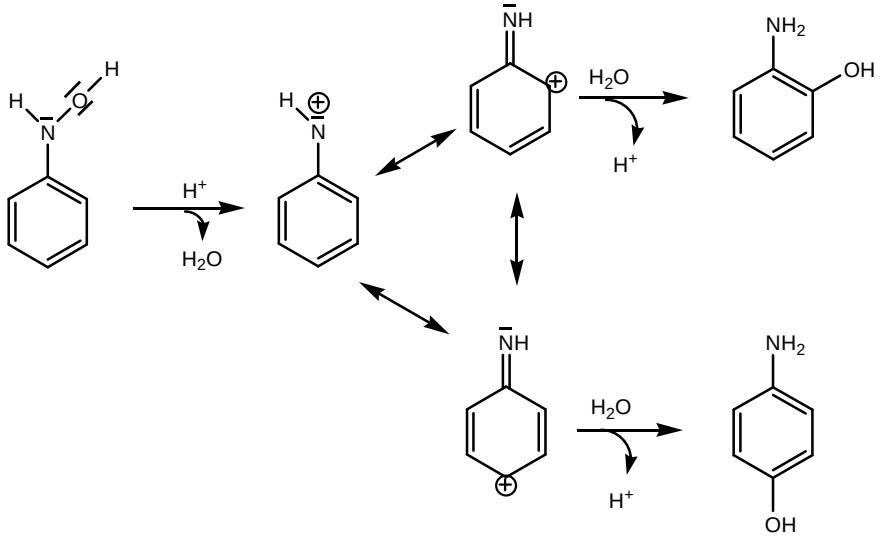


Figure 34 : Réarrangement de Bamberger

- Les nitroréductases de type II, sensibles à l'oxygène, catalysent une réduction à un électron qui génère un radical anion nitré, qui va réagir avec l'oxygène de l'air pour donner un ion superoxyde tout en régénérant le composé parent nitré (Figure 35).

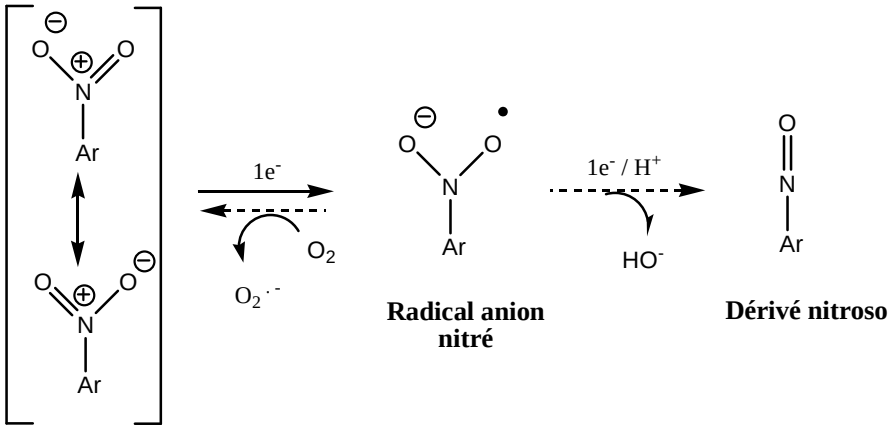


Figure 35 : Mécanisme de réduction du groupement nitro par une réductase de classe II (Esteve-Nunez *et al.*, 2001)

II.1 En aérobiose

II.1.1 Le nitrobenzène

Pseudomonas pseudoalcaligenes JS45 se cultive sur nitrobenzène comme seule source de carbone et d'azote. Cette souche attaque le nitrobenzène grâce à une nitroréductase (flavoprotéine fortement liée au co-facteur FMN), conduisant à la formation de l'hydroxylaminobenzène sans formation d'aniline (Figure 36). Ce métabolite subit ensuite un réarrangement par une mutase donnant l'aminophénol correspondant (Somerville *et al.*, 1995). Cette hydroxylaminobenzène mutase a été caractérisée après clonage et séquençage des gènes correspondants et son mécanisme d'action a été étudié (He *et al.*, 2000). Contrairement à la réaction chimique, le mécanisme enzymatique est intramoléculaire avec transfert du groupement hydroxyle issu du groupement hydroxylamino et non de l'eau (Nadeau *et al.*, 2003). L'aminophénol est ensuite oxydé par une dioxygénase avec ouverture du cycle aromatique et élimination ultérieure d'ammoniaque (Figure 36).

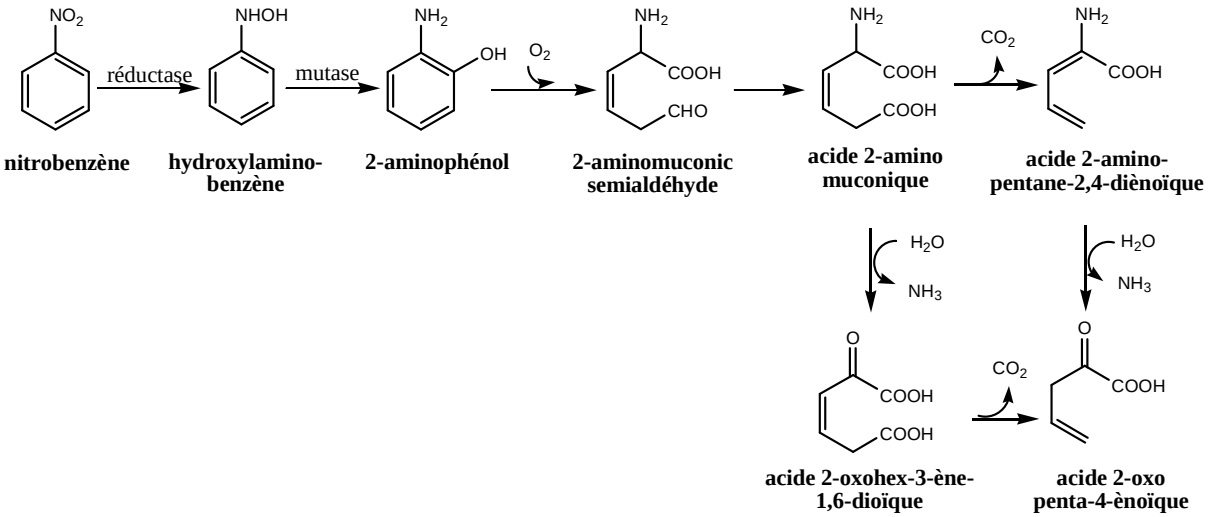


Figure 36 : Schéma de dégradation du nitrobenzène impliquant une nitroréductase

Il est également possible lors de la réduction de nitrobenzène d'aboutir au dérivé aminé correspondant en utilisant soit des consortia (Hallas et Alexander, 1983), soit des souches pures (Schackmann et Müller, 1991).

II.1.2 Le 2,4,6-trinitrotoluène

Le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), largement utilisé en tant qu'explosif (particulièrement durant la seconde guerre mondiale), est un composé récalcitrant à la source de fortes contaminations du sol et des eaux souterraines, non seulement sur les sites de production mais aussi sur de nombreux sites militaires (concentrations pouvant atteindre jusqu'à 100 mg/L dans l'eau et 12 g/kg dans le sol sur certains sites). Fortement toxique et mutagène, le TNT a fait l'objet de très nombreuses études sur son devenir dans l'environnement au cours de ces 20 dernières années (Esteve-Numez *et al.,* 2001 ; Heiss et Knackmuss, 2002 ; Symons et Bruce, 2006).

Ce composé est difficile à biodégrader du fait de sa structure : la symétrie de la localisation des groupements $–NO_2$ sur le noyau aromatique (encombrement stérique) et la forte déficience en électrons du noyau aromatique due au caractère électro-attracteur des groupements $–NO_2$ rendent difficile son attaque par des oxygénases. Par contre, la forte polarisation de la liaison N-O qui confère une charge positive à l'atome d'azote ainsi que la forte électronégativité de l'oxygène rend le groupement facilement réductible (Esteve-Numez *et al.,* 2001) (Figure 37).

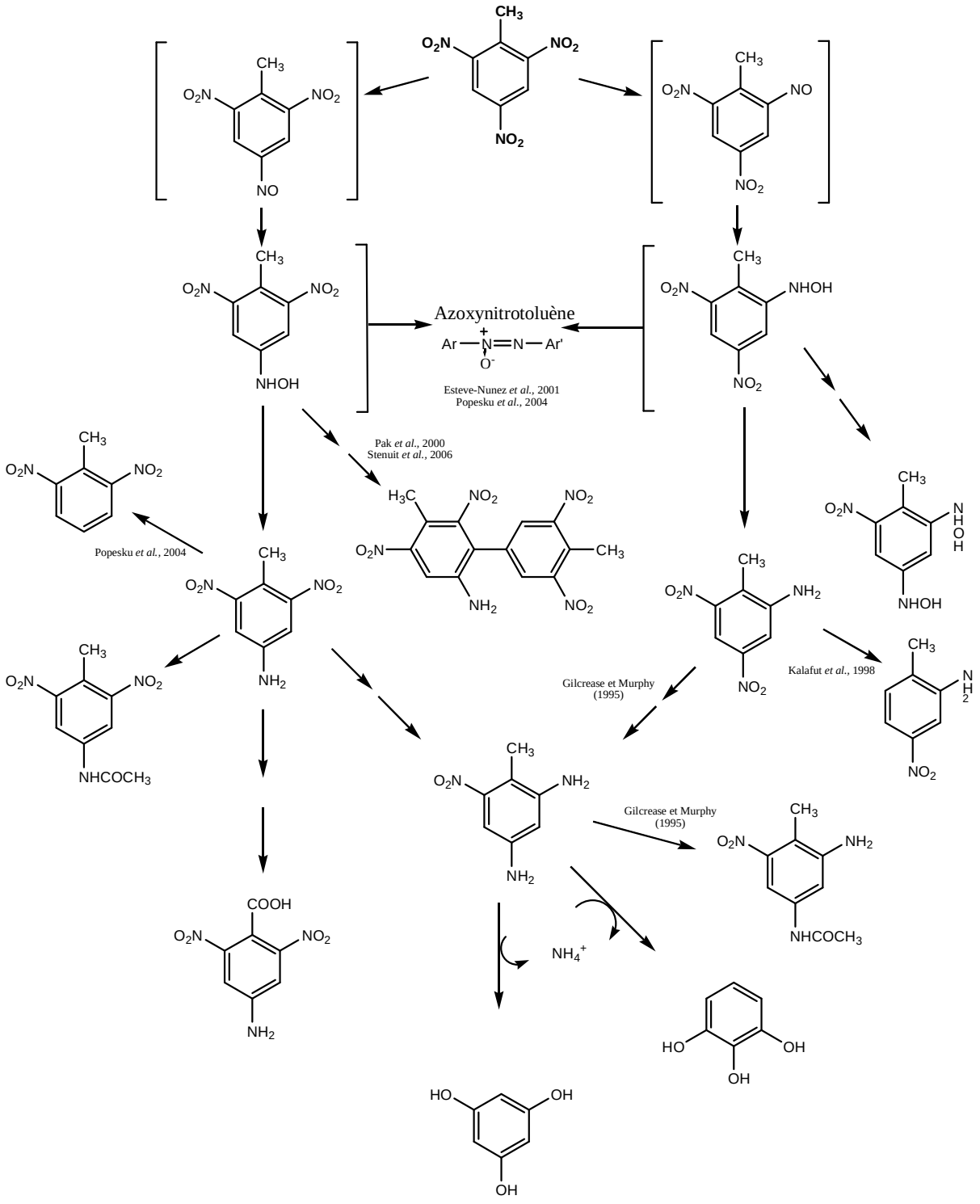


Figure 37 : Dégradation aérobie du TNT par des bactéries (Esteve-Nunez *et al.*, 2001)

La plupart des bactéries aérobies capables de dégrader le TNT commencent par réduire un premier groupement nitro de la molécule (majoritairement celui en position *para,* plus facilement réductible) en fonction nitroso (rarement détectable car ces composés sont bien meilleurs substrats que les dérivés nitrés correspondants (Race *et al.*, 2005)), hydroxylamine et éventuellement amine. Un deuxième groupement nitro peut ensuite être à

son tour réduit avec certaines souches suivant les mêmes intermédiaires, mais la réduction au-delà du diaminonitrotoluène n'a pas été observée. La présence d'oxygène va également favoriser les réactions de condensation abiotiques ou biotiques entre les espèces réduites réactives pour former des composés récalcitrants du type nitro- et/ou aminoazoxytoluène (Esteve-Nunez *et al.*, 2001 ; Popesku *et al.*, 2004) (Figure 37) ou même des dérivés de type biphényle (Pak *et al.*, 2000 ; Stenuit *et al.*, 2006), qui vont empêcher la minéralisation. D'autres voies de détoxification ont été mises en évidence à partir de ces intermédiaires réduits chez certaines souches et dans certaines conditions : production de 2-amino-4-nitrotoluène par *Bacillus* sp. et *Staphylococcus* sp. avec élimination simultanée d'ions nitrites (Kalafut *et al*., 1998), ce composé pouvant ensuite servir de substrat à des oxygénases ; production de 2,6-dinitrotoluène par une culture mixte (Popesku *et al.*, 2004) ; acétylation du 2,4-diamino-6-nitrotoluène par *Pseudomonas fluorescens* pour donner le 4-*N*-acétylamino-2-amino-6-nitrotoluène qui s'accumule dans le milieu (Gilcrease et Murphy, 1995) (Figure 37).

Contrairement aux bactéries, plusieurs souches fongiques ont montré des capacités de minéralisation du TNT à condition que les concentrations en polluant ne soient pas trop fortes. *Phanerochaete chrysosporium* a été la première souche étudiée. Les premières étapes de dégradation correspondent également à des réductions successives des différents groupements nitro du cycle aromatique. L'implication de réductases mais également de lignine et de manganèse peroxydases pour les étapes ultérieures de dégradation ont été mises en évidence (Esteve-Nunez *et al.*, 2001).

II.2 En anaérobiose

Dans des conditions anaérobies telles que celles rencontrées dans les boues de stations d'épuration ou dans certaines zones du sol, la réduction des dérivés nitrés est beaucoup plus efficace et rapide que dans des conditions aérobies. Elle conduit généralement au dérivé totalement aminé correspondant. Par contre, ce dernier est beaucoup plus difficilement transformé dans ces conditions en raison de son effet mésomère donneur (Mc Cormick *et al.*, 1976) et s'accumule dans le milieu. Cependant, les dérivés aminés sont moins toxiques que leurs analogues nitrés.

II.2.1 Le nitrobenzène

Le nitrobenzène est réduit quantitativement en aniline, qui s'accumule dans le milieu. Il n'est donc pas minéralisé (Razo-Flores *et al.*, 1999). Seul un procédé en deux étapes, la

première anaérobie pour conduire à l'aniline et la deuxième aérobie pour transformer l'amine aromatique, permet de minéraliser le nitrobenzène (Dickel *et al.*, 1993).

II.2.2 Le 2,4,6-trinitrotoluène

En conditions anaérobies, la réduction du TNT est plus rapide et plus complète allant généralement jusqu'au 2,4,6-triaminotoluène (ce qui est impossible en aérobiose) par réduction séquentielle des différents groupements nitro en groupement amino *via* des intermédiaires hydroxylamino (Mc Cormick *et al.*, 1976 ; Esteve-Nunez *et al.*, 2001 ; Yin *et al.*, 2005), les enzymes impliquées étant les mêmes qu'en aérobiose. L'absence d'oxygène évite en plus la formation de composés de polymérisation. Le 2,4,6-triaminotoluène est donc généralement l'intermédiaire obtenu (Figure 38). Cependant aucune preuve concluante de la minéralisation de ce composé n'a été apportée. En revanche, l'incorporation irréversible par liaisons covalentes de ce composé ou d'intermédiaires hydroxylamino avec des substances humiques et des particules de sol chargées a été prouvée et serait même une voie majeure du devenir du TNT dans l'environnement (Heiss et Knackmuss, 2002 ; Newcombe et Crawford, 2007).

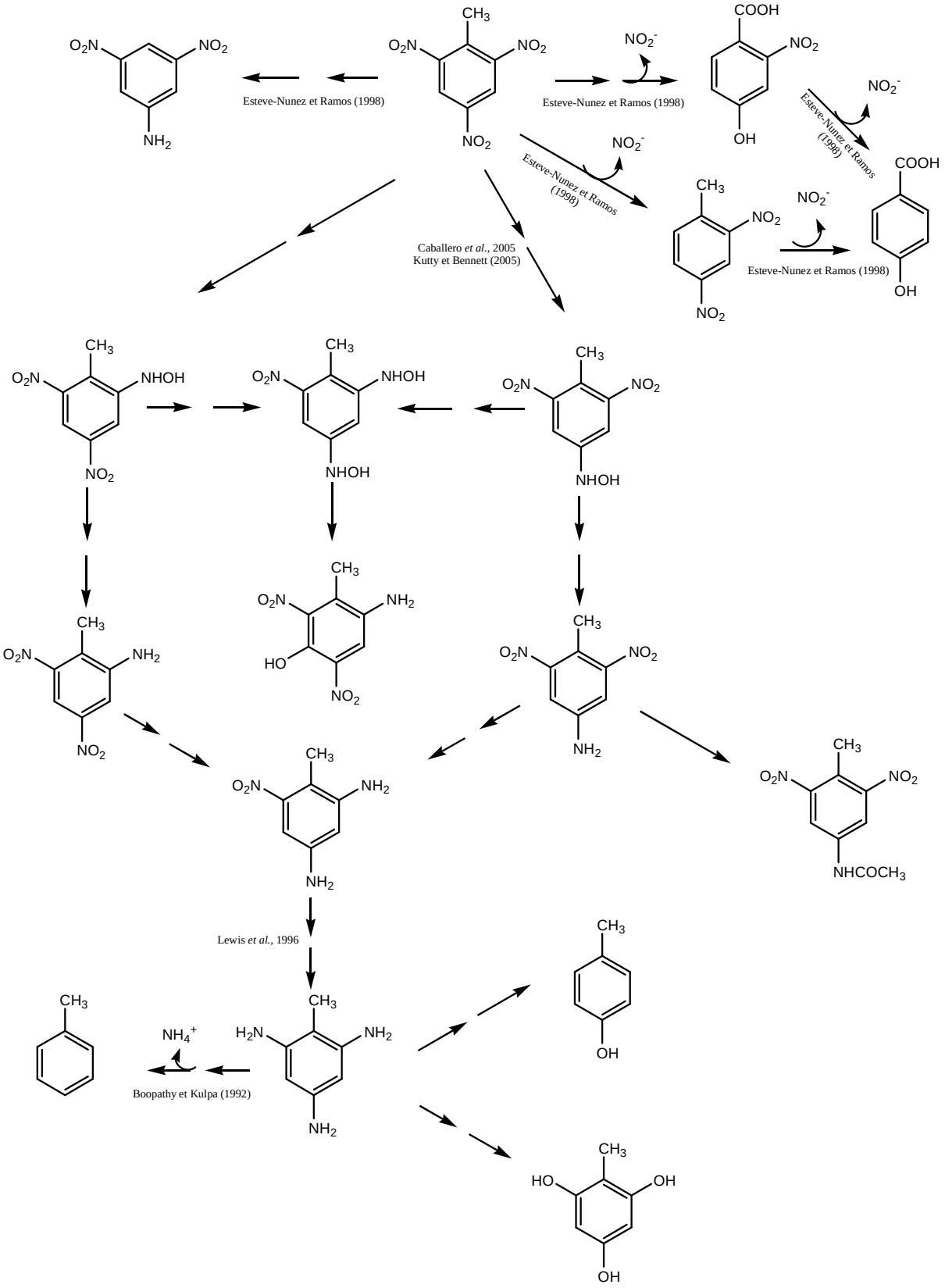


Figure 38 : Voies métaboliques de la dégradation du TNT par des bactéries en anaérobiose (Esteve-Nunez *et al.*, 2001)

D'autres réactions ou métabolites ont été mis(es) en évidence chez certaines souches bactériennes à partir des dérivés réduits ou du TNT lui-même : oxydation du méthyle de la

chaîne latérale du TNT en acide carboxylique chez *Pseudomonas* sp. JLR11 suivie ou accompagnée de réactions impliquant l'élimination d'ions nitrites dans le milieu (Esteve-Nunez et Ramos, 1998) ; accumulation de toluène par *Desulfovibrio* sp. B avec un mécanisme proposé, sans aucune preuve, correspondant à des désaminations successives du 2,4,6-triaminotoluène (Boopathy et Kulpa, 1992) ou formation de dérivés phénoliques sans certitude du composé parent dégradé en présence de *Clostridium bifermentans* (Lewis *et al*., 1996).

Plusieurs nitroréductases impliquées ont été caractérisées et les gènes correspondants clonés. Des exemples récents sont ceux de PnrA chez *Pseudomonas putida* JLR11, flavoproptéine NADPH dépendante (Caballero *et al.*, 2005), et de NitA chez *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Kutty et Bennett, 2005), flavoprotéine NADH dépendante, qui sont toutes deux capables, entre autre, de transformer le TNT en 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluène. Les alignements d'ADN des différentes nitroréductases caractérisées semblent montrer trois domaines conservés correspondant aux sites d'interactions avec le donneur d'électrons, le cofacteur et le composé nitré. Il est à souligner également qu'elles montrent toutes une attaque préférentielle du groupement nitro situé en *para* du toluène.

III REDUCTION PARTIELLE DU CYCLE AROMATIQUE

Une troisième stratégie a été mise en évidence dans quelques cas lors de la biodégradation aérobie de dérivés trinitrés. La présence de trois groupements $–NO_2$ fortement électro-attracteurs semble suffisante pour rendre le cycle aromatique suffisamment déficient en électrons pour pouvoir subir une attaque nucléophile. Il y a alors formation d'un complexe de Meisenheimer monohydrure ou même dihydrure (Figure 39). Ces composés prennent alors une couleur rouge orangée, portent une (monohydrure) ou deux (dihydrure) charges négatives et perdent donc leur caractère aromatique. Ils peuvent être des métabolites finaux (Vorbeck *et al.*, 1998) ou bien retrouver leur aromaticité par élimination d'un groupement nitro, conduisant ainsi à un dinitrotoluène qui peut être minéralisé (French *et al.*, 1998 ; Haïdour et Ramos, 1996) (Figure 38). Dans ce dernier cas, la perte de la couleur orangée du milieu s'accompagne de la détection d'ions nitrites. Cette réaction a été mise en évidence pour la première fois avec la réductase purifiée d'*Enterobacter cloacae* qui réduit le TNT en complexe de Meisenheimer avec oxydation concomitante de NADPH et élimination d'ions nitrites (French *et al.*, 1998). Elle est donc bien catalysée enzymatiquement.

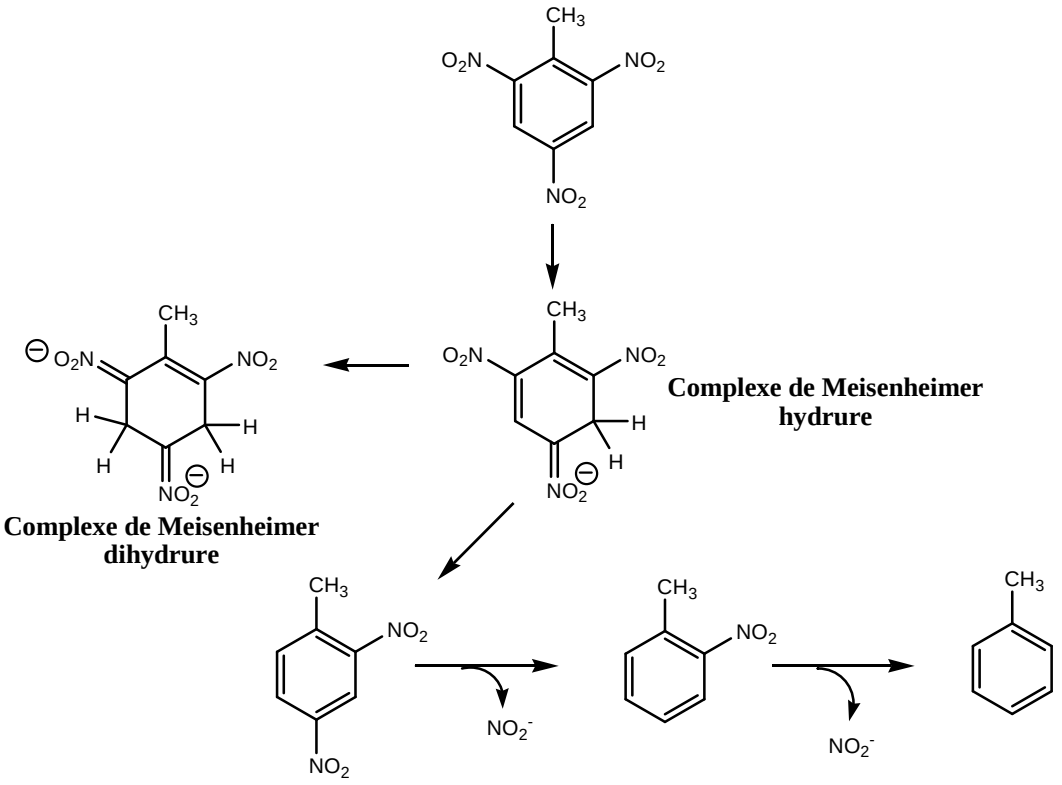


Figure 39 : Réduction partielle du cycle aromatique lors de la dégradation du TNT par des bactéries en aérobiose (Esteve-Nunez *et al.*, 2001)

Ces quelques exemples ont pour but de décrire les métabolites potentiels formés à partir de composés aromatiques nitrés et leurs voies de biodégradation. Ce type de métabolites pourrait être formé avec la mésotrione, qui possède une structure analogue.

Les voies métaboliques peuvent être fortement modifiées dans l'environnement en raison de la diversité des microorganismes présents et des interactions ayant lieu entre le sol et le pesticide qui conditionnent sa minéralisation. Il est par conséquent important de connaître le comportement d'un polluant dans le sol. Une étude sur l'adsorption de ces composés ainsi que les paramètres qui la régissent sont donc nécessaires.

ADSORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES SOLS

Les interactions des polluants organiques avec le sol conditionnent leur rémanence ainsi que leur cinétique de transfert et de transformation. Ces interactions sont multiples et liées à la nature physico-chimique de la molécule ainsi qu'aux conditions pédoclimatiques et aux facteurs physico-chimiques environnementaux (pH, température, concentrations du polluant, conditions rédox). Lors des processus de transfert dans les sols, les polluants ont tendance à diffuser lentement dans les matrices organiques et inorganiques avec lesquelles ils peuvent interagir de manière plus ou moins forte. De plus, ces polluants peuvent s'accumuler dans des microfissures et des microcavités inaccessibles aux microorganismes et à leurs enzymes. Les taux de biodégradation sont alors contrôlés par la vitesse de désorption plus que par l'activité dégradative des microorganismes.

Après une brève présentation des principaux constituants du sol et de leur influence sur les propriétés d'adsorption des polluants organiques, nous exposerons les données de la littérature concernant l'adsorption des herbicides appartenant à la famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones puis du glyphosate. Les conséquences des interactions sol-pesticide sur la biodisponibilité seront aussi évoquées.

I PRESENTATION GENERALE DES SOLS

Un sol est un milieu triphasique (solide-liquide-gaz) dans lequel le pourcentage de solide varie entre 40 et 70%. Les sols possèdent des compositions et des structures complexes qui varient selon les conditions climatiques, topologiques et selon la nature de la faune et de la flore. Les constituants des sols, de part leur diversité, contribuent de façon décisive au devenir des polluants organiques et inorganiques. Chaque constituant du sol va moduler seul ou de façon combinée l'adsorption et la biodisponibilité du polluant, en fonction de son caractère plus ou moins ionique.

Les constituants les plus représentatifs des sols sont : la matière organique (MO), les argiles (principalement cationiques), les oxydes et les hydroxydes métalliques. Les sols

sédimentaires ou limoneux contiennent une part très importante de silice, retenant moins les produits phytosanitaires.

I.1 La fraction organique

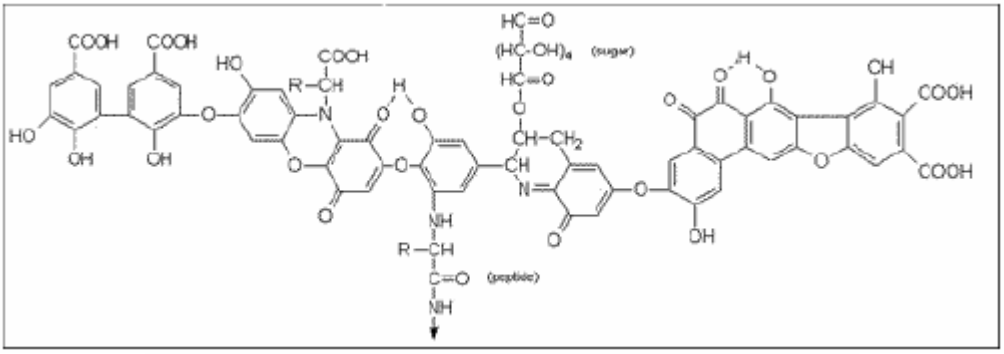
La matière organique (MO) est un constituant important du sol. Elle est en général plus abondante dans la partie supérieure du sol et représente en moyenne de 1,5 à 4 % de la masse d'un horizon superficiel, avec quelques sols très particuliers où la teneur en matière organique peut atteindre 9 à 10 %. Outre son rôle clé dans les relations entre le sol et les plantes, ainsi que dans la structure du sol, elle conditionne souvent le devenir des pesticides non polaires. La matière organique est sans cesse recyclée, décomposée chimiquement et sous l'action de la micro et macroflore. Sa décomposition varie selon la température, le pH (dans un sol au pH acide, la matière organique n'est pas décomposée), l'aération et la teneur en eau du sol. Les substances humiques (SH) constituent la fraction polymérique de la matière organique et jouent un rôle déterminant dans le devenir des polluants. Les SH sont traditionnellement classées en trois groupes en fonction de leur solubilité dans l'eau, de leur pH de solubilisation et de leur poids moléculaire :

- l'humine de couleur noire est insoluble dans l'eau quel que soit le pH. Son poids moléculaire est supérieur à 100000.
- Les acides humiques (AH), bruns ou noirs, sont solubles en milieu basique et insolubles dans le domaine des pH acides (pH<2). Leur poids moléculaire est compris entre 10000 et 100000.
- Les acides fulviques (AF), jaunes, sont solubles dans l'eau quelle que soit la valeur du pH. Leur poids moléculaire est compris entre 1000 et 5000.

Même si la séparation de ces trois fractions est opérationnelle, elle n'indique pas l'existence de 3 types réellement distincts de molécules organiques, la structure des substances humiques restant mal définie et sujet à controverse. Elle est considérée suivant les écoles, comme un assemblage polymérique pour les uns, une association supramoléculaire de molécules de diverses tailles aux fonctions variées pour les autres ou correspond à un modèle de type micellaire pour les troisièmes (Sutton et Sposito, 2005). Il est de ce fait difficile de la représenter par une formule moléculaire. Plusieurs modèles ont été proposés ne présentant en général que des séquences de structure humique avec leurs principales fonctions chimiques.

Ces différentes séquences se distinguent notamment par la nature et la teneur en fractions aromatique et phénolique et par la présence de groupements carboxylique, quinone et de dérivés aminés peptidiques (Figure 40).

a)



b)

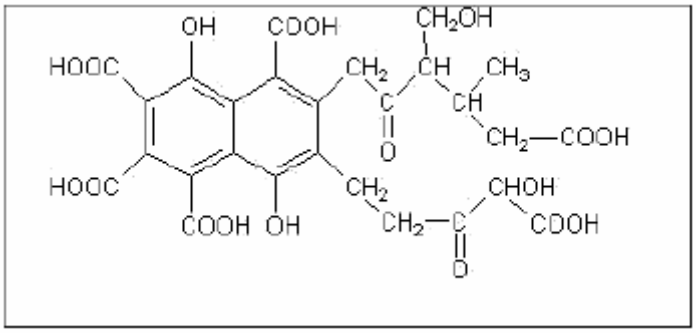


Figure 40 : Modèles d'un acide humique (a) (Stevenson, 1982) et d'un acide fulvique (b) (Buffle, 1988)

Les substances humiques ont une **charge de surface** globalement négative en raison des fonctions carboxylate et hydroxyle présentes. Des échanges cationiques et protoniques sur ces fonctions permettent la liaison entre les substances humiques et les cations solubles du sol. Toutefois, du point de vue macroscopique, la MO présente un **caractère hydrophobe** qui la différencie d'autres constituants du sol comme les argiles ou les hydroxydes métalliques.

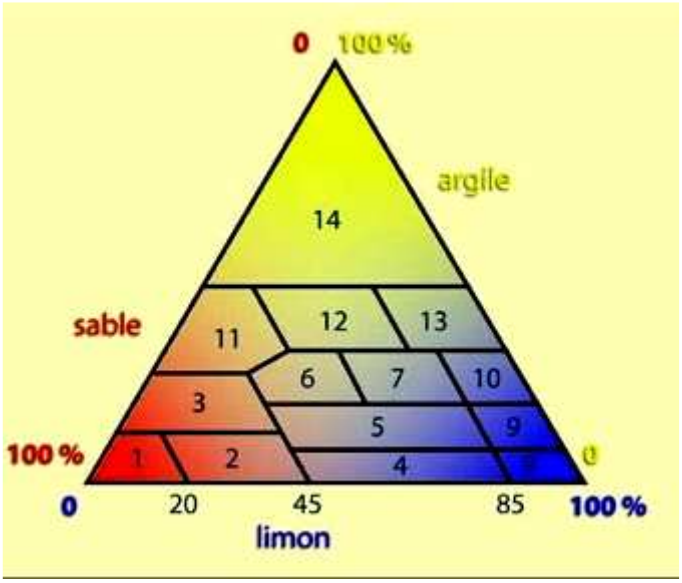
De nombreux produits phytosanitaires peuvent, nous le verrons, interagir avec la MO. Aussi, la teneur et la composition de la MO d'un sol peut contribuer plus ou moins fortement aux mécanismes d'adsorption/désorption de polluants organiques et/ou inorganiques. La matière organique n'est majoritairement pas libre dans les sols mais forme avec les fractions argileuses des complexes appelés complexes argilo-humiques. Ces complexes augmentent la **capacité d'échange cationique (CEC)** du sol et sont susceptibles de jouer un rôle clé dans les propriétés d'adsorption des produits phytosanitaires.

I.2 La fraction minérale

La structure du sol dépend de l'assemblage de la matière organique et des particules minérales en agrégats. Les microorganismes, la faune et les racines déplacent et organisent ces agrégats organiques et minéraux. Trois types de particules minérales sont distingués selon leur taille :

- Les argiles (taille < 2µm), dont la surface spécifique est en général élevée (jusqu'à 800 $m^2.g^{-1}$)
- Les limons (2 µm < taille < 50 µm)
- Les sables fins (50 µm < taille < 2 mm)

Chaque sol possède des proportions d'argiles, de limons et de sables qui lui sont propres et permettent de les regrouper en classes : c'est la texture du sol (Figure 41).



1 : Sable ; 2 : Sable limoneux ; 3 : Sable argileux ; 4 : Limon léger sableux ; 5 : Limon moyen sableux ; 6 : Limon sablo-argileux ; 7 : Limon argilo-sableux ; 8 : Limon léger ; 9 : Limon moyen ; 10 : Limon argileux ; 11 : Argile sableuse ; 12 : Argile ; 13 : Argile limoneuse ; 14 : Argile lourde.

Figure 41 : Texture d'un sol

La texture et la structure d'un sol conditionnent ses propriétés physiques et chimiques. Nous nous sommes uniquement intéressés par la suite aux argiles. Ce choix a été motivé par l'importance que les argiles pourraient jouer sur les propriétés d'adsorption de pesticides ionisables tels que le glyphosate et la mésotrione.

I.2.1 Les argiles

Elles proviennent de la fragmentation des roches sédimentaires, et sont composées de minéraux spécifiques (silicates d'aluminium plus ou moins hydratés) qui présentent une structure feuilletée (phyllosilicates). Elles peuvent représenter jusqu'à 40% d'un sol agricole. Les feuillets sont constitués de couches d'octaèdres ($M(OH)_6$, avec M = Al, Mg…) et de tétraèdres (SiO_4) reliées par les atomes d'oxygène (Figure 42).

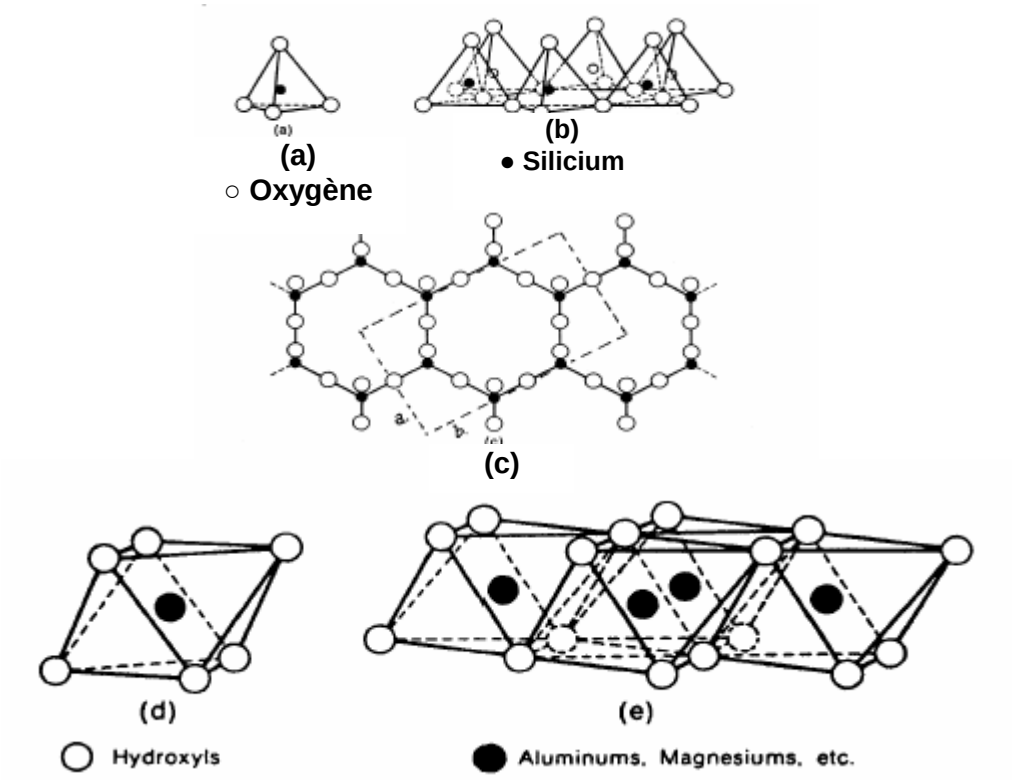


Figure 42 : Eléments structuraux des tétraèdres (a,b,c) et des octaèdres (d,e)

Les tétraèdres (T) (Figure 42a) sont formés d'un atome de silicium entouré de quatre atomes d'oxygène. Ils s'agencent en se partageant les atomes d'oxygène en mailles hexagonales (Figure 42b et c). Les octaèdres (O) sont composés d'un cation central bi ou trivalent (Al^{3+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}…) et de six groupements OH^- (Figure 42d et e). Les tétraèdres et les octaèdres s'agencent pour constituer des couches (Figure 43). Les couches peuvent être neutres ou chargées négativement, compensées par des cations qui se logent dans l'espace entre les couches. La charge de la couche dépend des substitutions de cations dans les feuillets T et O. La structure des feuillets détermine celle des minéraux et leurs propriétés adsorbantes.

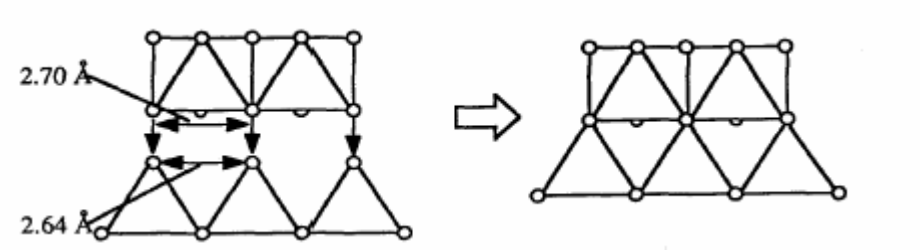


Figure 43 : Agencements des tétraèdres et des octaèdres

Les argiles sont classées en trois grandes familles selon la distance entre les feuillets : 0,7, 1 ou 1,4 nm. Cette distance peut par conséquent varier quand l'argile est hydratée ou au contraire asséchée, d'où le terme souvent rencontré « d'argile gonflante ». Les argiles les plus communes sont:

- la kaolinite (0,7 nm) de 'formule' simplifiée $Si_2O_5Al_2(OH)_4$.
- la montmorillonite (1 nm) de 'formule' $Si_4O_{10}Al_{5/3}Mg_{1/3}Na_{1/3}(OH)_2$.
- le groupe des chlorites (1,4 nm) de 'formule' générale $A_{4\text{-}6}Z_4O_{10}(OH, O)_8$ avec A = Al, Fe, Li, Mg, Mn ou Ni et Z = Al, Fe et/ou Si.

La distance séparant deux feuillets, ou distance inter-lamellaire, est un des paramètres majeurs permettant d'évaluer l'adsorption ou l'intercalation de pesticides dans les argiles. Enfin, dans la fraction argileuse d'un sol, deux familles de matériaux se distinguent par des propriétés d'échange ionique différentes, propriétés déterminantes dans la rétention de polluants possédant une charge électrique:

- les argiles cationiques échangeuses de cations,
- les argiles anioniques ou Hydoxydes Double Lamellaires, échangeuses d'anions.

Outre des charges de surface opposées, ces argiles vont présenter des surfaces spécifiques différentes.

I.2.2 Les argiles cationiques

Les argiles diffèrent, nous l'avons vu, selon la structure du feuillet : on distingue les argiles 1/1 (1 couche tétraédrique + 1 couche octaédrique : T/O), les argiles 2/1 (2 couches tétraédriques pour 1 couche octaédrique : T/O/T) et les argiles 2/1/1 (2 couches tétraédriques pour 2 couches octaédriques : T/O/T/O) (Figure 44). Les argiles cationiques sont classées en

fonction de la combinaison de leurs feuillets, du cation dans l'octaèdre, de la charge de la couche et des entités chimiques occupant l'espace inter-foliaire : eau, cations, etc.

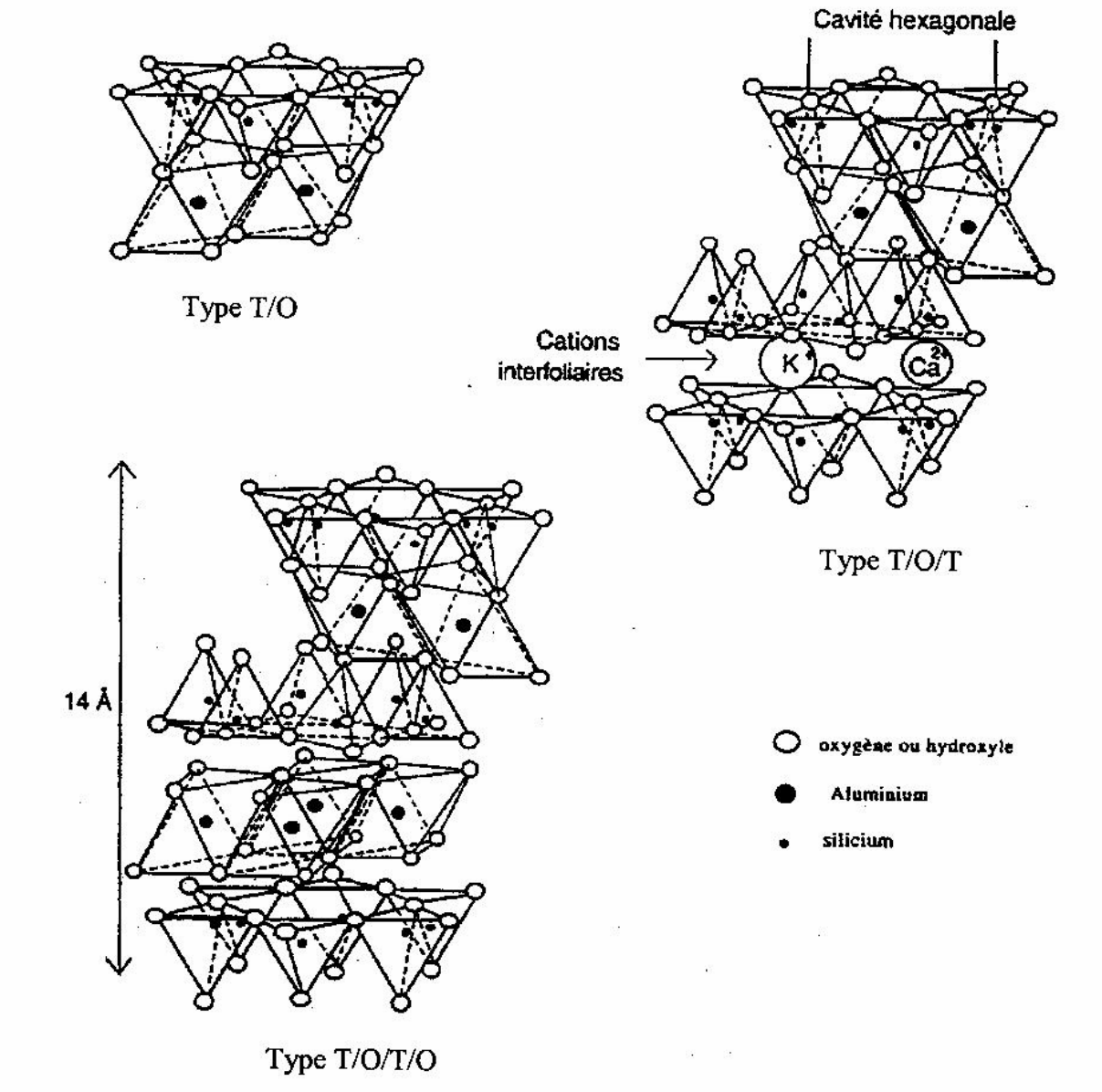


Figure 44 : Structure des argiles cationiques

- Argiles 1/1 ou T/O

Chaque feuillet possède une couche tétraédrique associée à une couche octaédrique. Ce groupe d'argile se caractérise par un taux de substitution cationique très faible. Cette substitution n'existe pas dans la couche tétraédrique, mais uniquement dans la couche octaédrique où Al^{3+} peut être remplacé par Fe^{3+} ou Ti^{4+}. L'association des deux feuillets se

fait par des liaisons hydrogène Si-O---HO-Al. La kaolinite est une argile possédant cette structure.

- Argiles 2/1 ou T/O/T

La structure 2/1 est composée de 2 couches tétraédriques et d'une couche octaédrique, avec la seconde couche T renversée par rapport à la première. La muscovite, l'illite et les montmorillonites sont des exemples d'argiles possédant cette structure.

- Argiles 2/1/1 ou T/O/T/O

Elles sont formées par un empilement de feuillets de type brucite (T/O/T) alternant avec les couches octaédriques (O). Les chlorites peuvent être classées dans cette catégorie.

En réalité, il existe au sein des d'argile 2/1 mais surtout 2/1/1 une grande variabilité dans les structures des feuillets.

Quel que soit le type d'argile, la cohésion entre les feuillets est assurée par des liaisons ioniques et des liaisons hydrogène.

Enfin, la surface spécifique des argiles cationiques peut atteindre 800 m^2/g pour certaines montmorillonites (Chamayou et Legros, 1989, Calvet, 2003). Les kaolinites ont des surfaces spécifiques parmi les plus faibles des argiles. La CEC est, quant à elle, fonction de la charge des feuillets. Elle dépasse rarement 90 meq/100 g d'argile. Les ions échangeables appartiennent aux familles des alcalins, alcalino-terreux et métaux de transition.

Remarque : dans certains cas, des produits phytosanitaires possédant une charge positive peuvent s'échanger en lieu et place d'ions métalliques.

I.2.3 Argiles anioniques

Les données concernant les argiles anioniques sont extraites de la thèse de J. Inacio (2002).

Ces argiles se retrouvent rarement dans l'environnement sous la forme de gisements. Elles appartiennent au groupe minéral des hydrotalcites ($[Mg_6Al_2(OH)_{16}]CO_3$, $4H_2O$) et des pyroaurites. La description de ces minéraux peut être faite à partir de la brucite $Mg(OH)_2$ où les ions Mg^{2+} sont en coordinance octaédrique avec six atomes d'oxygène des groupements hydroxyle. Les feuillets hexagonaux sont constitués d'octaèdres $Mg(OH)_6$ accolés par les

arrêtes, de manière coplanaire. La substitution d'un cation divalent par un cation trivalent crée une charge positive au niveau des feuillets ($[M^{II}_{1-x}M^{III}_{x}(OH)_2]^{x+}$) (Figure 45). L'électroneutralité est assurée par la présence d'anions (A) accompagnés de molécules d'eau, situés dans l'espace inter lamellaire ($[X_{x/q}{}^{q-}, nH_2O]^{x-}$). M^{II} est un cation métallique divalent, M^{III} est un cation métallique trivalent. X est le taux de substitution. Les anions les plus rencontrés sont : CO_3^{2-}, Cl^-, NO_3^- et SO_4^{2-}.

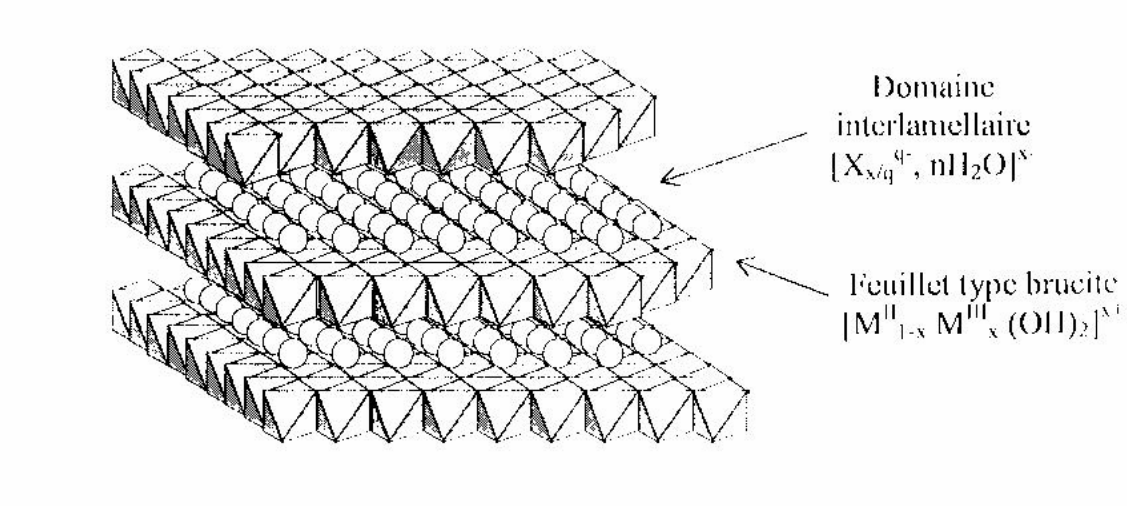


Figure 45 : Structure des argiles anioniques

La capacité d'échange anionique dépend de la valeur de X et peut atteindre jusqu'à 400 meq/100 g d'argile, valeur 4 fois supérieure à celle des argiles cationiques. Elle varie en fonction de l'anion inter lamellaire. Pour autant, les surfaces spécifiques mesurées pour ces matériaux sont généralement inférieures à celles des argiles cationiques, de l'ordre de 20 à 80 m^2/g.

L'intérêt majeur de ces argiles dans des études d'adsorption est qu'elles peuvent être synthétisées, obtenues pures et parfaitement caractérisées. Elles constituent donc des outils de choix pour la validation de méthodes analytiques de suivi d'adsorption ou d'évaluation de la biodisponibilité d'un pesticide.

II LES PHENOMENES D'ADSORPTION

II.1 Généralités

Il ne serait question dans ce paragraphe de faire un bilan exhaustif des mécanismes mis en jeu lors de phénomènes d'adsorption ou de désorption. Seules les grandes lignes permettant une première lecture des résultats de mesures d'adsorption seront rappelées.

L'adsorption est un phénomène de transfert d'une phase liquide contenant l'adsorbat vers une phase solide avec rétention des solutés à la surface de l'adsorbant. Ce processus comprend plusieurs étapes (Figure 46).

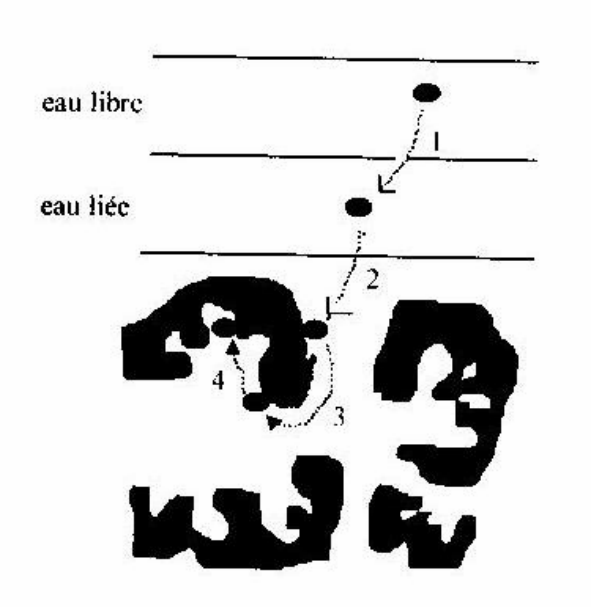


Figure 46 : Etapes de transfert d'un soluté lors de son adsorption

L'étape 1 est le transfert de la particule de la couche externe d'hydratation vers la couche interne. L'étape 2 correspond au déplacement de l'eau liée jusqu'à l'adsorbant. L'étape 3 est la diffusion à l'intérieur de l'adsorbant sous l'influence du gradient de concentration et enfin l'étape 4 présente l'adsorption du soluté dans un micropore. On détermine, lors de l'étape 2, un coefficient de transfert qui dépend de l'agitation du milieu. Le caractère spécifique ou non de la liaison entre l'adsorbat et l'adsorbant permet de distinguer les forces mises en jeu. L'adsorption non spécifique est rendue possible par des forces d'attraction physique de type Van der Waals ou des liaisons hydrogène entre l'adsorbat et l'adsorbant. L'énergie des liaisons de Van der Waals est faible (5 kcal/mol). Il n'y a pas de modification de l'entité chimique de l'adsorbat : ce phénomène est par conséquent réversible

(**physisorption**). L'adsorption non spécifique est d'une faible sélectivité vis-à-vis des molécules de soluté. Une compétition intermoléculaire existe entre les pesticides et les molécules organiques provenant de la matière organique dissoute. La formation de liaisons chimiques fortes (25-400 kcal/mol) se déroule entre des composés ionisables et des groupements fonctionnels présents sur l'adsorbant. Ce processus est irréversible, c'est l'adsorption spécifique (**chimisorption**).

Selon le caractère plus ou moins ionisable et/ou hydrophobe du polluant organique, les mécanismes d'adsorption vont différer. Aujourd'hui, ceux de polluants organiques apolaires et non ionisables, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont dans l'ensemble bien connus (don Wauchope *et al.*, 2002). Il s'agit principalement de mécanismes mettant en jeu des interactions hydrophobes de faible énergie (de type Van der Waals). En revanche, il n'existe pas de « modèle général » permettant de décrire le comportement de polluants organiques ionisables (Kah et Brown, 2006). En effet, dans ce cas, la forme moléculaire (et les propriétés d'adsorption) des polluants dépend(ent) du pH à la surface des constituants du sol, pH qui peut varier de façon importante d'un environnement à l'autre. Chaque étude va donc constituer un cas particulier selon l'hydrophobie du polluant, avec plus ou moins d'éléments de comparaison avec les données existantes pour d'autres polluants et/ou d'autres adsorbants.

Prédire et comparer les propriétés d'adsorption de polluants organiques constituent un enjeu scientifique important nécessitant des outils de modélisation performant (Csutoras et Kiss, 2007). Les équilibres entre les molécules d'adsorbat fixées et celles restées en équilibre dans la phase liquide sont modélisés à partir des isothermes d'adsorption. Ces derniers décrivent la relation existant, à l'équilibre, pour une température donnée, entre la concentration de l'adsorbat dans la phase liquide (Ce) et celle adsorbée à la surface du solide (Cs). Plusieurs auteurs ont élaboré des modèles mathématiques plus ou moins simplifiés permettant de décrire ces phénomènes. Les modèles de Freundlich ou Langmuir en sont des exemples (Gonen et Rytwo, 2007).

Ces modèles ont été validés dans certains cas par la détermination des surfaces spécifiques des matériaux et par l'estimation du nombre de sites disponibles au niveau de l'adsorbant.

Cependant, cette approche par isotherme d'adsorption conduit à des données souvent difficiles à comparer suivant les conditions utilisées (rapport solide/liquide, force ionique du milieu, pH, etc.) mais présente également un certain nombre de limites en ne tenant pas compte en particulier du temps de résidence du composé dans le sol (Mamy et Barriuso, 2007).

Pour confronter ces modèles et comparer les capacités d'adsorption de différents sols, les paramètres tels que le K_d ou le K_{oc} (oc signifiant « organic content ») sont utilisés. K_d est de façon simplifiée le rapport entre Cs (quantité de matière de polluant par unité de masse de phase solide) et Ce (concentration du polluant à l'équilibre dans la phase liquide). K_d peut donc être assimilé au coefficient de partage du polluant entre la phase solide et la phase liquide. Le K_{oc}, quant à lui, est donné par le rapport entre le K_d et le pourcentage de MO du matériau (sol) (don Wauchope *et al.*, 2002 ; Weber *et al.*, 2004). Ces valeurs remplacent avantageusement le simple pourcentage d'adsorption d'un polluant organique sur un matériau. Toutefois, l'utilisation des K_d et des K_{oc} est soumise à certaines limitations telles qu'un manque de répétabilité pour un sol donné, la difficulté à comparer des K_d pour des sols aux caractéristiques très différentes, voire à des taux d'humidité relative du sol très variés (don Wauchope *et al.*, 2002).

D'autres approches basées sur des calculs de structures et d'énergies d'interaction entre adsorbats et adsorbants ont également été développés (Tunega *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2007). Toutefois, ces méthodes, très séduisantes pour appréhender les mécanismes au niveau moléculaire, sont limitées par la taille des systèmes pris en compte par des approches quantiques (problème de puissance de calcul et absence de modèles fiables de structure pour la MO) ; ces méthodes ne peuvent donc être envisagées que sur des modèles très simplifiés.

II.2 Facteurs influençant l'adsorption

Comme tout équilibre thermodynamique, l'adsorption peut être affectée par les variables intensives que sont la température et la pression (dans le cas d'adsorption de gaz). La taille de la molécule, la charge électrique, la structure de l'adsorbat ainsi que la solubilité et la teneur en eau du matériau sont des paramètres influençant également l'équilibre (Hermosin et Cornejo, 1989). Par exemple, un poids moléculaire élevé réduit la diffusion à l'étape 3 et par conséquent, la fixation de l'adsorbat sur l'adsorbant. L'adsorption est un phénomène exothermique. Modifier la température d'enregistrement d'un isotherme

d'adsorption d'un polluant organique entre une phase liquide et une phase solide (dans la limite d'une variation de ±5°C) n'aura généralement que peu d'influence sur le résultat (la température demeurant constante pour chaque point de l'isotherme, *vide supra*).

La détermination des paramètres d'adsorption réalisée en laboratoire s'effectue généralement à l'équilibre en « batch » (par opposition à des mesures dynamiques en lysimètres) selon des protocoles bien définis et référencés (OECD, 2000. Adsorption-desorption using a batch equilibrium method in OECD guide for the testing of chemicals. OECD Test Guidline 106, OECD Publications, Paris.). Pour des mesures d'adsorption de pesticides en phase aqueuse, la pression et la température sont constantes. L'adsorption doit être réalisée à pH et composition de l'adsorbant constants, même si ces derniers paramètres (étroitement liés) peuvent être modulés afin de mieux appréhender les mécanismes mis en jeu.

Aussi, nous focaliserons la suite de ce paragraphe sur l'influence des constituants du sol (l'adsorbant) sur les phénomènes d'adsorption des pesticides.

Il est à noter qu'une fois l'équilibre d'adsorption atteint, les polluants peuvent réagir avec des fonctions de la MO ou des hydroxydes métalliques pour former des résidus liés par liaison covalente (Barriuso *et al.*, 1997 ; Hang *et al.*, 2003). Ces mécanismes sont par nature irréversibles.

Remarque : même si la détermination de K_d et K_{oc} par la méthode batch est la plus utilisée (car la plus « reproductible » et la plus facile à mettre en œuvre), ce n'est pas la seule : des expériences en lysimètres (leaching) ou des mesures de rapport frontal en chromatographie sur couche mince sont parfois utilisées (don Wauchope *et al.*, 2002 ; Verma *et al.*, 2005).

II.2.1 Influence de la matière organique

Nous avons vu dans l'introduction que la MO présentait deux grandes caractéristiques :

- un caractère global hydrophobe du fait de la présence de nombreux cycles aromatiques et phénoliques et,
- la présence de charges négatives localisées (même si la charge globale nette est négative) en raison de fonctions carboxylate (présentes en bouts de chaîne et sur des ramifications) et de phénols qui peuvent localement être sous forme de phénolates.

Le caractère hydrophobe de la MO va donc être primordial pour des polluants organiques apolaires tels que les HAP (Bonin et Simpson, 2007). L'adsorption d'autres polluants tels que l'isoproturon ou le 2,4-D est également modulée de façon importante par la MO (Spark et Swift, 2002).

Il est ainsi admis aujourd'hui que la teneur en MO d'un sol va accroître l'adsorption des polluants à caractère hydrophobe, l'adsorption se faisant dans ce cas principalement par un mécanisme de partitionnement entre une phase aqueuse polaire et une phase organique apolaire. De récentes études ont même permis de corréler les K_d et les K_{ow} de composés tels que le phénanthrène sur des sols à teneur variable en MO. Une des techniques utilisées pour obtenir des corrélations 'K_d – teneur en MO' est la Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C (méthode CPMAS ^{13}C). Cette méthode analytique permet d'identifier et de quantifier relativement chaque fraction de la MO (les fractions carboxylates, aromatiques et aliphatiques) et de corréler leur présence et pourcentage avec les capacités d'adsorption des polluants hydrophobes (Golding *et al.*, 2005). Il est clair que dans de tels processus, la teneur en eau du milieu est primordiale et pourra orienter l'adsorption vers une fraction plus ou moins hydrophobe du sol. Enfin, il est souvent décrit que ces mécanismes de partitionnement sont pH-indépendants, même si la dissociation des substances humiques, pH-dépendante, peut diminuer la capacité d'adsorption de composés hydrophobes.

D'autre part, la présence de charges négatives localisées dans certains domaines de la MO permet l'adsorption de métaux alcalins, alcalino-terreux ou de transition, qui vont ainsi modifier les propriétés d'adsorption de la MO. On parlera d'échange cationique, comme dans le cas des argiles. A titre d'exemple, il a été montré que la MO, en présence de fer, permettait l'adsorption de composés moins hydrophobes (Piccolo *et al.*, 1995). Dans ce cas, le fer au degré d'oxydation (+III) joue le rôle d'intermédiaire entre la MO et le polluant.

De plus, la présence de fonctions polaires localisées permet également dans quelques cas, l'établissement de liaisons hydrogène comme cela a été décrit entre la fraction soluble de la MO et un herbicide ionique tel que le glyphosate (Piccolo et Celano, 1994). Toutefois, l'établissement de ce type de liaison de plus haute énergie dépend énormément de la conformation de la MO et du fait qu'elle soit engagée ou non dans des complexes argilo-humiques. L'autre paramètre clé est le pH. En effet, le pH est déterminant pour l'adsorption de composés ionisables. Or, Haynes (1970) a suggéré que le pH à la surface de la MO dissoute pourrait être de 0,5 à 2 unités inférieur à celui mesuré dans la phase liquide. Enfin, il

est raisonnable d'envisager une compétition entre les molécules d'eau et le polluant pour l'établissement de liaisons hydrogène. Il est donc difficile de prédire l'établissement de ce type d'interaction.

Enfin, la présence de fonctions à fort potentiel nucléophile tels que les ions phénolates, les fonctions amine et les fonctions hydroxyle permet aux polluants adsorbés à la surface de se lier de façon covalente aux substances humiques. C'est le cas par exemple du bromure de méthyle (agent de fumigation) qui peut se lier à la MO par des réactions de type substitution nucléophile, les ions phénolates jouant le rôle de nucléophile et les ions bromures celui de nucléofuge (Tao et Maciel, 2002). Le même type de résidus liés a été décrit pour le TNT (explosif) après alkylation de fonctions hydroxyle de la MO (Knicker, 2003). Le devenir des résidus liés ainsi formés est alors plus difficilement mesurable. Le marquage au carbone 14 et l'analyse de chaque fraction de la biomasse permet d'avoir une idée globale de l'intégration ou non des résidus à la MO des sols. De nombreuses contraintes limitent cette approche, telles que la disponibilité commerciale du composé marqué au ^{14}C et l'absence de détecteur analytique performant permettant d'identifier les résidus liés et leurs produits de transformation. Une alternative intéressante se développe depuis quelques années : remplacer le marquage au ^{14}C par un marquage sélectif du polluant au ^{13}C. L'analyse des résidus liés et leur intégration à la biomasse peuvent alors être envisagées par GC/MS et (Pyr)-GC-IRMS respectivement (Loiseau *et al.*, 2002). En effet, l'enrichissement isotopique de chaque fraction doit *a priori* être quantifiable par spectrométrie de masse isotopique.

II.2.2 Influence de la fraction argileuse et des (hydro)oxydes

Le fort pouvoir adsorbant des argiles et la facilité de les transformer pour optimiser l'adsorption de polluants organiques en fait un matériau très intéressant. Le début de l'étude des interactions argiles - pesticides date des années 1970. La charge de surface des argiles cationiques est globalement négative. Cette charge nette combinée à la présence de nombreux atomes d'oxygène et de groupements hydroxyde vont favoriser les interactions entre les pesticides davantage polaires et la fraction argileuse, même si cette dernière comporte des sites plus hydrophobes (Cornejo *et al.*, 2004 ; Kah et Brown, 2006).

Plusieurs mécanismes d'adsorption sont possibles en fonction de l'adsorbat. Les pesticides cationiques ou à charge globale positive peuvent se fixer sur des argiles cationiques (de charge de surface négative) par un processus d'échange cationique (Lagaly, 2001). Ce mécanisme a également été décrit pour des herbicides de la famille des triazines dont les pKa

sont compris entre 1,7 et 4,3. Ceci pourrait paraître surprenant si l'on considère que ces valeurs sont inférieures à la plupart des pH des sols, les triazines étant alors majoritairement non protonnées. Sannino *et al.* (1999) ont ainsi suggéré que la protonation des pesticides, nécessaire au mécanisme d'échange ionique, se faisait localement à la surface des argiles. En effet, le pH à proximité de la surface pourrait être inférieur de 3 à 4 unités à celui de la solution contenant l'argile en suspension. Avec de telles valeurs de pH en surface, la protonation est immédiate et le mécanisme d'échange cationique favorisé.

D'autre part, les polluants ayant des fonctions polaires (OH, NO_2, X=O…) peuvent se lier aux argiles par des forces électrostatiques ou par des interactions de coordination. Dans ce dernier cas, on parlera de mécanismes d'échange de ligands, caractéristiques des réactions de complexation. Ce mécanisme est impliqué dans la rétention de nombreux composés organiques présentant des fonctions acides (acides carboxyliques, phosphoniques, etc.) à la surface d'oxydes métalliques (ou de certains hydroxydes). C'est la cas lors de l'adsorption du Clofencet sur des oxydes de fer avec la formation de complexes bidendates (Dubus *et al.*, 2001). Un des atomes d'oxygène intègrerait la sphère de coordination du fer.

De plus, dans tous les cas où des ponts avec des molécules d'eau peuvent se former, les liaisons hydrogène jouent un rôle important. Ce mécanisme entre dans la catégorie des mécanismes de type « pont cationique ». La présence de cations métalliques est généralement nécessaire ou tout du moins favorable à l'établissement de ce type d'interactions (Clausen *et al.*, 2001).

La formation de résidus liés sur la fraction argileuse n'a pas été rapportée de façon non ambiguë dans la littérature. Les pesticides anioniques peuvent aussi se fixer sur des argiles par liaisons hydrogène ou par un échange anionique lorsque l'argile est anionique (Inacio *et al.*, 2001).

II.2.3 Conclusions

Ce bref aperçu de l'influence de la MO et/ou de la fraction argileuse montre les difficultés à généraliser des modèles d'adsorption pour des sols de composition différente et des polluants organiques aux propriétés physico-chimiques très diverses. Et la plupart des mécanismes proposés dans la littérature sont sujets à controverse.

Seules quelques « règles » semblent pouvoir s'appliquer aujourd'hui aux composés non ionisables. La présence d'une fonction « ionisable » sur un polluant rend sa prédiction

d'adsorption délicate, voire impossible. Chaque étude constituera donc un cas particulier dont l'interprétation sera basée sur les données obtenues sur d'autres sols et d'autres polluants.

Dans le paragraphe qui suit, nous allons présenter les données décrites dans la littérature concernant l'adsorption de la mésotrione (et de son homologue la sulcotrione), puis du glyphosate.

III ADSORPTION DES BENZOYLCYCLOHEXANE -1,3- DIONES

III.1 La sulcotrione

L'adsorption de la sulcotrione dans les sols est très faible, les K_d mesurés pour différents sols variant de 0,23 à 7,04 $L.kg^{-1}$ (Wilson et Foy, 1992 ; Baer et Calvet, 1997 ; Baer et Calvet, 1999). Cette faible adsorption ne permet pas, selon les auteurs, la réalisation d'isothermes de désorption. Ces résultats tendent *a priori* à montrer une augmentation du risque d'entrainement de l'herbicide dans les eaux de surface, puis les eaux souterraines. Toutefois, les études réalisées en plein champ ont suggéré que la mobilité de la sulcotrione est relativement limitée (Rouchaud *et al.,* 1998a ; 1998b). En effet, 4 mois après l'application de l'herbicide, les plus grandes concentrations sont retrouvées dans les premiers horizons jusqu'à 10 cm. Seules de très faibles quantités de sulcotrione ont été détectées dans l'horizon 10-15 cm, cette dernière n'ayant jamais été détectée dans l'horizon 15-20 cm, quel que soit le sol.

Différents facteurs physico-chimiques permettant d'expliquer ces résultats ont été avancés par les auteurs.

1) La mobilité de la sulcotrione augmenterait pour de faibles teneurs en matière organique, impliquant de fait des interactions entre la sulcotrione et la MO. Cette corrélation a été établie après épandage de différentes quantités d'amendements organiques sur les sols. Pour compléter les résultats concernant l'influence de la MO, Rouchaud *et al.* (1996) ont évalué la persistance de la sulcotrione dans un sol recevant différents apports organiques. Le temps de demie-vie de la sulcotrione dans la parcelle de terrain témoin est de 16 jours. Il varie de 22 à 29 jours quand le sol reçoit un amendement organique. Cependant, Mamy et Barriuso (2005) ont suggéré que l'adsorption de la sulcotrione était indépendante de la teneur en matière organique, contrairement aux travaux de Wilson et Foy (1992).

2) Plus le pH est élevé, plus la dissipation de l'herbicide est importante. Mamy *et al.* (2005) et Mamy et Barriuso (2007) ont confirmé ce résultat en montrant que la sulcotrione est peu adsorbée sur un sol alcalin, sa persistance augmentant quand le pH du sol diminue (*vide supra*).

3) Dans une moindre mesure, une teneur en argiles non négligeable, même pour les sols répertoriés comme « sableux », semble conditionner la 'mobilité' de la sulcotrione. Enfin, dans des sols contenant une teneur en MO similaire, la persistance de la sulcotrione est plus faible dans le sol contenant plus de sable que de terreau ou d'argile (Rouchaud *et al.*, 1998b). Ces résultats suggèrent, entre autre, l'implication de la fraction argileuse dans l'adsorption de la sulcotrione. Toutefois, Wilson et Foy (1992) ont montré que la sulcotrione présentait une faible affinité pour les argiles.

Enfin, il semble qu'il y ait une bonne corrélation entre les propriétés d'adsorption de la sulcotrione et la concentration dans le milieu de métaux complexables tels que le fer ou le manganèse (Mamy et Barriuso, 2005).

Ces différents résultats, parfois contradictoires, sont très fortement sol-dépendants mais l'environnement pédo-climatique peut également fortement conditionner la transformation biotique de l'herbicide. En effet, le lessivage des sols a été étudié du fait de la faible adsorption de la sulcotrione. Rouchaud *et al.* (1998a) ont rapporté que la sulcotrione pénètre à des profondeurs plus faibles en hiver qu'en été (les pluies sont plus faibles en hiver qu'en été). Cherrier *et al.* (2005) ont analysé le comportement de la sulcotrione, marquée au ^{14}C sur le noyau aromatique, suite au lessivage d'une colonne de sol placée en conditions naturelles durant les deux mois d'été 2002, c'est-à-dire soumise aux conditions climatiques (seules deux périodes d'irrigation ont été réalisées). La sulcotrione semble relativement peu mobile, puisque deux mois après le traitement, le cumul des eaux de ruissellement permet de récupérer 14,5 % de sulcotrione par lessivage. Deux métabolites de la sulcotrione, dont le CMBA, sont visibles après 15 jours et restent en surface (jusqu'à 15 cm sur les 28 cm de la colonne). A la fin de l'expérience, seul l'horizon 0-5 cm contient la sulcotrione (10 %) et ses métabolites (55 % de CMBA et 35 % du métabolite 2). Il semble que la sulcotrione forme peu de résidus non-extractibles (environ 15%) (Cherrier *et al.*, 2005). Ces données rejoignent globalement les travaux de Mamy *et al.* (2005) qui ont montré que des résidus non-extractibles étaient certes rapidement formés (28 jours), mais que leur quantité était relativement peu importante par rapport à d'autres herbicides comme le metazachlor.

Par ailleurs, dans le but d'étudier le comportement de la sulcotrione et de ses métabolites (CMBA et cyclohexane-1,3-dione), Chaabane *et al.* (2005) ont réalisé des études d'adsorption et désorption de ces composés sur quatre sols différents en conditions de laboratoire. La cyclohexane-1,3-dione est le composé s'adsorbant le plus ($K_{f\ (eau)}$ = 1,4 à 10,0 cm^3/g) et se désorbant le moins (11 % au maximum). L'affinité modérée de la sulcotrione et du CMBA semble équivalente vis-à-vis de ces sols ($K_{f\ (eau)}$ = 0,66 à 2,82 cm^3/g pour la sulcotrione et $K_{f\ (eau)}$ = 0,35 à 1,59 cm^3/g pour le CMBA). Toutefois, seule la sulcotrione permet une bonne désorption (67 à 91 %). Il est à noter que les valeurs de K_d, déterminées uniquement pour la sulcotrione, sont légèrement moins importantes dans l'eau déionisée que dans une solution de $CaCl_2$. La présence de $CaCl_2$ permettrait une interaction de type « pont ionique » entre la sulcotrione sous forme majoritairement anionique (au pH des sols utilisés), et les sols, dont la surface est, nous l'avons vu, globalement négative. Enfin, ces auteurs concluent au peu d'influence du pH et de la teneur en MO et à l'importance de la teneur en argiles, résultats en désaccord partiel avec d'autres études (Rouchaud *et al.*, 1998 ; Mamy *et al.*, 2005).

En conclusion, la sulcotrione présente une faible affinité pour les sols et est relativement mobile. Les différentes études révèlent un comportement très sol dépendant pour la sulcotrione, avec également une influence notable de la teneur en eau des sols. Il apparaît qu'il n'y a pas de consensus quant à l'influence du pH et de la MO du sol : ceci est principalement dû à la disparité des études et des sols étudiés. Seule la teneur en argile du sol semble influencer de façon « systématique » le devenir de la sulcotrione : une teneur élevée en argiles augmente l'adsorption et réduit la mobilité de l'herbicide.

III.2 La mésotrione

Dans la littérature très peu de données sur l'adsorption de la mésotrione existent. Les résultats sont principalement issus d'études de terrain.

Le temps de demie-vie de la mésotrione dans le sol est variable selon les études : 2 à 8 jours (Béraud *et al.*, 2001), 5 à 32 jours (Dyson *et al.*, 2002) ou 34 à 50 jours (Rouchaud *et al.*, 2000). Des essais en plein champ ont montré qu'elle n'est plus retrouvée au-delà de 10 cm pour un seuil de détection de 0,005 mg/kg de sol (Béraud *et al.*, 2001). Sur 15 sols européens et américains testés, Dyson *et al.* (2002) ont mesuré des K_d relativement faibles de 0,13 à 5,0 $L.kg^{-1}$. Ces auteurs ont également montré une forte corrélation entre la diminution de

l'adsorption de la mésotrione et l'augmentation du pH du sol. Compte tenu de son faible pKa (3,1), la mésotrione doit être totalement dissociée quel que soit le sol étudié, même s'il est difficile de corréler le pH de la solution avec le pH local effectif à la surface des colloïdes. Dans ces études, de larges gammes de texture de sol, de pH (4,4 à 7,5) et de teneur en matière organique (0,6 à 3,35 %) ont été couvertes par les différents sols étudiés. Même si la corrélation entre l'adsorption et le pH semble bien établie, l'influence de le la teneur en MO semble poser davantage de problèmes. En effet, les auteurs indiquent qu'il n'est pas correct de déterminer un K_{oc} pour la mésotrione, car la forme anionique (dissociée), dominante *a priori* au pH des sols, n'est pas susceptible de s'adsorber sur la MO en raison de la charge nette globale négative de cette dernière. Les auteurs évoquent des relations empiriques donnant le K_{oc} en fonction du pH, ce qui semble raisonnable compte tenu du pKa moyen de la mésotrione. Les valeurs de K_d ainsi simulées et mesurées sont sensiblement du même ordre de grandeur, malgré les très fortes disparités observées d'un sol à l'autre. Une corrélation directe entre adsorption et teneur en MO semble cependant suggérée (le modèle tenant compte du pH pour cet herbicide ionisable).

Par ailleurs, Rouchaud *et al.* (2000) ont étudié, après traitement de quatre champs de culture de maïs différents (sableux, argileux, limono-sableux ou riche en limons), la mobilité de la mésotrione. Le temps de demie-vie de la mésotrione est respectivement de 34, 42, 40 et 50 jours. Les auteurs ont pu constater que la persistance de la mésotrione augmente à la fois avec l'apport récent d'amendements organiques et la quantité de matière organique du sol, et dépend de la texture du sol. Un sol limoneux permet une plus grande adsorption de la mésotrione qu'un sol sableux. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Maeghe *et al.* (2002), qui ont étudié la persistance d'inhibiteurs de l'enzyme HPPD (dont la mésotrione) dans différents sols belges. Ils ont constaté que la mésotrione, comme la sulcotrione, ont une persistance plus importante dans des sols sableux et limono-sableux.

Ces quelques données ne permettent pas de tirer de conclusions généralisables sur le devenir de la mésotrione dans les sols.

IV ADSORPTION DU GLYPHOSATE

Une première lecture des données bibliographiques révèle que le glyphosate est généralement fortement adsorbé dans les sols, ce qui lui confère une faible mobilité. Autio *et*

al. (2004) ont mesuré les K_f (utilisés préférentiellement aux K_d selon les auteurs) du glyphosate sur 21 sols finlandais. Ces coefficients d'adsorption varient de 37 à 303 $L.kg^{-1}$ selon le sol, confirmant ainsi une adsorption forte de l'herbicide. Cependant, dans cette vaste étude, aucune corrélation triviale n'a pu être établie entre l'adsorption du glyphosate, et par exemple, la teneur en MO ou le pH des sols. Mamy et Barriuso (2005) ont, quant à eux, étudié l'adsorption du glyphosate sur trois types de sols français. Les résultats confirment globalement une forte adsorption de l'herbicide (les K_f varient de 17,6 à 60,5 L. kg^{-1}). Cette fois-ci, des corrélations ont pu être établies entre l'adsorption et différents paramètres pédologiques : pH des sols, teneur en cuivre, phosphates et oxydes de fer et d'aluminium. Les auteurs ont également montré que cette adsorption était dépendante du temps, et que la teneur en MO n'était pas un facteur majeur dans le phénomène d'adsorption. La diminution de l'adsorption du glyphosate avec une augmentation du pH s'explique par une charge négative nette globale (densité électronique) plus importante à pH élevé du glyphosate (De Jonge et De Jonge, 1999). Ces auteurs ont également montré que l'apport d'ions tels que Ca^{2+}, K^+ ou NH_4^+ (augmentation de la force ionique) avait une forte influence sur l'adsorption du glyphosate. Ceci s'explique par une « désorption » des H^+ de la surface du sol, le pH de la suspension diminuant de fait et l'adsorption de l'herbicide augmentant.

Il est à noter que les K_f mesurés dans une solution de $CaCl_2$ à 0,01 $mol.L^{-1}$ sont environ 2,5 fois plus grands que ceux mesurés dans l'eau déionisée. Ainsi, des protocoles d'adsorption très variés expliquent la diversité des valeurs de K_f trouvées dans la littérature, la présence d'ions Ca^{2+} modifiant les mécanismes d'adsorption mis en jeu. Le glyphosate peut former un complexe relativement stable avec le calcium, ce qui doit favoriser l'adsorption.

Mais est-il possible de mettre en évidence les mécanismes physico-chimiques expliquant ces corrélations ? Nous présentons dans les paragraphes qui suivent un bilan non exhaustif des résultats de la littérature concernant l'adsorption du glyphosate sur différentes fractions de sols : matière organique, argiles, oxydes et hydroxydes métalliques. En effet, le nombre important de publications sur le glyphosate permet une analyse plus fine que pour les tricétones.

IV.1 Adsorption du glyphosate sur les constituants organiques du sol

Même présent sous sa forme anionique dans les sols (forme dominante au pH des sols), de nombreuses études ont montré une adsorption du glyphosate sur la matière organique

du sol (Sprankle *et al.,* 1975b ; Nomura et Hilton, 1977). Plus précisément, Sprankle *et al.* (1975b) ont suggéré la formation de complexes de type acides fulviques – métal – acide phosphonique du glyphosate pour expliquer l'adsorption de l'herbicide, le métal étant préférentiellement un cation trivalent tel que Fe^{3+} ou Al^{3+}. Dans ce cas, le métal joue en quelque sorte le rôle de pont entre le glyphosate et la MO. Piccolo *et al.* (1994, 1996) ont étudié l'adsorption du glyphosate sur les substances humiques par IR et RMN et ont proposé un autre mécanisme dominant. L'adsorption se ferait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène (et non par interactions électrostatiques avec des métaux). La formation de ces liaisons hydrogène dépendrait de la structure (stéréochimie) et de la dimension des macromolécules : des fractions de haut poids moléculaire favoriseraient l'adsorption du glyphosate. L'interaction glyphosate-substances humiques par liaisons hydrogène ne serait que temporaire et aisément « détruite » lors du lessivage des sols.

Les études des interactions entre le glyphosate et la matière organique du sol soluble dans l'eau sont peu nombreuses (Vereecken, 2005). Les substances humiques solubles pourraient former des complexes stables avec le glyphosate dans des horizons plus profonds des sols, modulant considérablement la « mobilité » de l'herbicide (Piccolo *et al.,* 1996). Piccolo et Celano (1994) ont étudié le mécanisme d'adsorption entre le polluant et les acides humiques solubles par spectroscopie IR et ils ont pu montrer que les liaisons hydrogène sont responsables de la formation d'un complexe entre les acides humiques et le glyphosate. Ces résultats, en accord avec ceux trouvés sur les fractions non solubles, sont basés sur une analyse fine des différents modes de vibration des liaisons P=O et $P\text{-}O^-$ observés sur des complexes glyphosate-acides humiques. Ces complexes ont été préparés « artificiellement » à partir de solutions de glyphosate à 0,01 N et d'acides humiques à environ 0,05 $mg.kg^{-1}$ puis lyophilisés avant analyse des solides par IR. Piccolo *et al.* (1995) ont montré que ces interactions entre les acides humiques et le glyphosate sont encore plus fortes en présence de fer, rejoignant ainsi les hypothèses de Sprankle *et al.* (1975b).

Cependant, les études sur des sols entiers donnent des conclusions assez contradictoires sur le rôle de la MO dans les phénomènes d'adsorption du glyphosate : pas de corrélation significative pour De Jonge *et al.* (2001), Autio *et al.* (2004) et Mamy et Barriuso (2005) ; influence négative pour Gerritse *et al.* (1996), qui observent une diminution de l'adsorption du glyphosate lorsque la teneur en MO augmente (pour des teneurs en fer et aluminium constantes), ou positive pour Nomura et Hilton (1977). Il faut noter que dans cette

dernière étude, le pourcentage de MO dans les deux sols ayant la plus forte affinité pour le glyphosate est voisin de 10 %, correspondant à des sols relativement « exceptionnels » qui n'ont pas été examinés par les autres auteurs.

Cependant, la teneur et la nature de la MO ne suffisent généralement pas à décrire les propriétés d'adsorption du glyphosate. D'autres facteurs influencent son adsorption.

IV.2 Adsorption du glyphosate sur la fraction argileuse du sol

Sprankle *et al.* (1975b) ont été les premiers à constater que le glyphosate a une plus grande affinité pour un sol limono-argileux que pour un sol sableux, suggérant ainsi que la fraction argileuse jouait un rôle important dans l'adsorption du glyphosate. Ces auteurs ont montré que l'adsorption dépend à la fois de la nature de l'argile (adsorption de plus en plus forte dans l'ordre bentonite < montmorillonite < illite < kaolinite), mais aussi des cations compensateurs ($Na^+ << Ca^{2+} < Zn^{2+} < Mg^{2+} < Cu^{2+} < Fe^{3+} < Al^{3+}$). Des divergences existent cependant dans les résultats de la littérature, notamment quant au pouvoir adsorbant de la kaolinite, qui se trouve être selon les études, soit le meilleur adsorbant parmi les argiles testées (Sprankle *et al.*, 1975b ; Miles et Moye, 1988), soit le plus mauvais (Glass, 1987 ; Dion *et al.*, 2001). Ces résultats contradictoires résultent en fait de différences dans le protocole expérimental : différence de pH et de force ionique de la solution, différence de gamme de concentrations testées pour le glyphosate, différence sur la provenance ou la pureté de la kaolinite étudiée (Gerritse *et al.*, 1996). Le pH du milieu est effectivement un paramètre important de l'adsorption, puisqu'il joue non seulement sur la charge du glyphosate, mais aussi sur celle de surface de l'argile. Ainsi, Damonte *et al.* (2006) ont mis en évidence une augmentation de l'adsorption du glyphosate sur une montmorillonite quand le pH diminue, les pH les plus favorables étant dans la gamme 4 – 5,5. L'espèce monoanionique du glyphosate (existante dans la gamme de pH 2,2 – 5,5) est celle qui a le plus tendance à s'adsorber sur ce type d'argile (Morillo *et al.*, 2000). Par contre, à pH très acide (< 3), l'adsorption redevient faible car l'argile, tout comme le glyphosate, présentent une charge de surface positive, entraînant un phénomène de répulsion (Damonte *et al*., 2006).

Les études, réalisées sur des sols entiers, sont, là encore, beaucoup moins tranchées sur le rôle de la fraction argileuse dans l'adsorption du glyphosate. Glass (1987) et Gerritse *et al.* (1996) ont montré une forte augmentation de l'adsorption lorsque la teneur en fraction argileuse du sol augmente. Piccolo *et al*. (1994) ont observé, lors de leur étude de 4 sols, une

certaine corrélation entre la teneur en argiles gonflantes (vermiculite) et la quantité de glyphosate adsorbée. Cependant, ils concluent que ce paramètre ne conditionne pas les mécanismes majeurs de l'adsorption et n'empêche pas une forte désorption. Morillo *et al.* (2000), eux, ne trouvent aucun effet de la teneur en fraction argileuse de leurs sols sur l'adsorption du glyphosate. D'après ces auteurs, l'adsorption ne dépend pas non plus de la capacité d'échange cationique (CEC), ce qui est en désaccord avec Glass (1987) mais en accord avec Sprankle *et al.* (1975b) et Miles et Moye (1988). La surface spécifique des argiles et les propriétés de sorption/désorption ne semblent pas non plus être corrélées avec le taux d'adsorption du glyphosate (Miles et Moye, 1988). A titre d'exemple, la montmorillonite et la bentonite testées possèdent les plus hautes CEC et les surfaces spécifiques les plus élevées et ne présentent, cependant, qu'une faible affinité pour le glyphosate.

Les mécanismes d'adsorption proposés font intervenir des interactions électrostatiques et la formation de complexes par l'intermédiaire des cations échangeables à la surface des argiles (Piccolo *et al*., 1994). Dans ce dernier cas, la force des interactions va dépendre du cation impliqué. Ainsi, le glyphosate lié à l'argile par un complexe avec des ions Ca^{2+} sera plus facilement désorbé que celui lié par un complexe avec un ion Fe^{3+} (De Jonge *et al.*, 2001). Le glyphosate est aussi capable de s'échanger avec les ions situés dans l'espace interfoliaire et ainsi de s'adsorber (s'intercaler) entre les feuillets de l'argile. Ceci a été montré sur des argiles anioniques (Li *et al.*, 2004 ; 2005) et cationiques (Damonte *et al.*, 2006) par une augmentation de la distance inter-feuillet métal-métal observée par diffraction des RX.

Malgré une forte adsorption sur les argiles, le glyphosate peut entrer en compétition avec les phosphates des sols (saturation des sites d'adsorption par les ions phosphates), les mécanismes d'interaction étant similaires. Ainsi, la présence de phosphates inorganiques réduit l'adsorption du glyphosate sur les argiles (Dion *et al*., 2001). De même, l'apport à long terme de phosphates dans un sol agricole va entraîner au cours du temps, une diminution de l'adsorption du glyphosate, qui sera de plus lié par des interactions plus facilement réversibles (De Jonge *et al.*, 2001). Ces résultats semblent une fois encore confirmer les résultats de Sprankle *et al.* (1975b), indiquant que le glyphosate se lie au sol par le biais de son groupement acide phosphonique (Sprankle *et al.*, 1975b ; Hance, 1976 ; Carlisle et Trevors, 1988 ; De Jonge et De Jonge, 1999 ; Dion *et al.*, 2001).

IV.3 Adsorption sur les oxydes et hydroxydes

De nombreuses études ont mis en évidence la forte affinité du glyphosate pour les ions Fe^{3+} et Al^{3+}, qu'ils soient présents dans des complexes synthétiques avec des acides humiques (Piccolo *et al.*, 1995) ou dans des argiles (Sprankle *et al*., 1975b ; Glass, 1987). La formation de complexes de surface (chélates) avec ces ions métalliques impliquant le groupement phosphonate du glyphosate (et donc de complexe pont MO – Métal – Glyphosate) a même été évoquée pour expliquer l'adsorption du glyphosate sur ces matériaux.

Les hydroxydes de fer et d'aluminium amorphes sont fréquemment associés aux argiles dans les sols, et de fortes corrélations entre teneur de ces composés dans les sols et adsorption du glyphosate ont été mises en évidence (Piccolo *et al.*, 1994). Ces auteurs ont observé que le glyphosate interagit plus fortement avec les sols contenant un fort pourcentage en hydroxydes de fer et d'aluminium. L'étude des isothermes d'adsorption (type S) suggère deux mécanismes d'adsorption : le premier semble correspondre à des interactions avec les cations échangeables à la surface des argiles (présentes également dans les sols étudiés) et serait valable pour les faibles concentrations en glyphosate ; le deuxième pourrait être un mécanisme d'échange de ligands, dans lequel un hydroxyle de la sphère d'hydratation du fer (ou de l'aluminium) serait échangé par un groupement P-OH de la fonction acide phosphonique du glyphosate. Ce mécanisme s'appliquerait pour les plus fortes concentrations en glyphosate. Cependant, malgré de fortes interactions, 15 à 35 % du glyphosate adsorbé sur des sols à forte teneur en hydroxydes métalliques peuvent être désorbés. L'adsorption du glyphosate ne semble donc pas permanente et le polluant peut être lessivé.

L'adsorption du glyphosate dans les sols est donc fortement dépendante de la teneur en hydroxydes et oxydes métalliques, notamment le fer et l'aluminium (Piccolo *et al*., 1994 ; Gerritse *et al.*, 1996 ; Mamy *et al.*, 2005 ; Kjær *et al.*, 2005). Cette adsorption sera plus ou moins forte suivant le pH du sol, car la charge des oxydes de fer et d'aluminium, tout comme celle du glyphosate, varie avec ce paramètre. L'adsorption du glyphosate sera donc faible aux pH très acides ou très alcalins puisque les deux partenaires porteront la même charge, et elle sera maximale pour des valeurs de pH intermédiaires (McConnell et Hossner, 1985 ; Miles et Moye, 1988). La surface spécifique de l'oxyde métallique joue également un rôle important dans l'adsorption : elle est plus importante sur les goethites que sur les hématites, dont les surfaces spécifiques sont plus faibles (McConnell et Hossner, 1985), résultat qui est controversé par Miles et Moye (1988).

Des études plus poussées ont été réalisées pour mettre en évidence le mécanisme d'adsorption du glyphosate sur ces oxydes métalliques, en particulier sur la goethite (α-FeOOH). Sheals *et al.* (2002) ont montré, par FTIR et spectroscopie XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) que le glyphosate est lié à la surface de la goethite majoritairement grâce à la formation de complexes de coordination monodentate, le glyphosate intégrant la sphère de coordination du fer par l'intermédiaire d'un des atomes d'oxygène du groupement phosphonate du glyphosate. Ces résultats s'appuient essentiellement sur les données de l'XPS, montrant la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le NH_2^+ du glyphosate et un atome d'oxygène du phosphonate. Il est à noter que les analyses XPS ont été effectuées sous un vide très poussé et à -160°C, conditions particulièrement favorables à l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires. Une autre approche utilisant la microscopie à force atomique (AFM) à l'échelle moléculaire a été réalisée par Dideriksen et Stipp (2003). Ces auteurs ont travaillé sur des échantillons à pH=2 (nécessité de la technique) et ont pu proposer la formation de complexes 1:2 mono- ou bidentates faisant intervenir dans la coordination à la fois le groupement phosphonate et le groupement carboxylate du glyphosate (Figure 47).

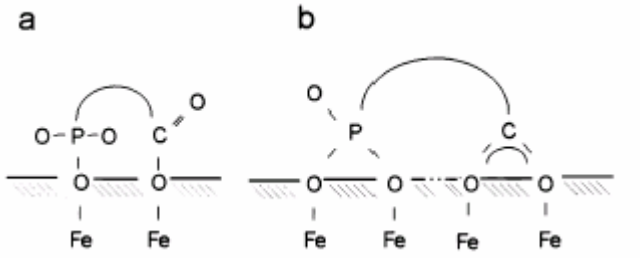


Figure 47 : Formation de complexes monodentate (a) et bidentate (b) faisant intervenir les groupement phosphonate et carboxylate du glyphosate

Cependant, la coordination du glyphosate dépend du pH et implique une compétition entre les deux types de groupement. L'addition dans le milieu de phosphates ou le changement de pH vers la neutralité va supprimer la coordination avec le groupement carboxylate du glyphosate. Il faut noter qu'une étude comparative avec les phosphates dans les mêmes conditions montre un mécanisme d'adsorption différent avec la formation d'un complexe 1:1 monodentate.

Cette hypothèse de mécanisme est partiellement étayée par les travaux de Barja et dos Santos Afonso (2005), qui ont réalisé une étude comparative d'adsorption du glyphosate, du AMPA et de la sarcosine sur la goethite en fonction du pH. Ces auteurs ont montré que le

glyphosate s'adsorbe sur la surface de la goethite sous forme anionique, que la sarcosine s'adsorbe très difficilement et uniquement à une très forte concentration et que le AMPA possède une meilleure affinité pour l'oxyde à pH supérieur à son pKa (interactions électrostatiques favorisées). Les données obtenues par ATR-FTIR ont révélé la présence de deux complexes prédominants : un premier où le glyphosate est lié de façon covalente et monodentée par son groupement phosphonate à l'atome de fer, à l'intérieur de la sphère de coordination, et un second mettant en jeu toujours le groupement phosphonate mais qui se lierait à deux atomes de fer voisins de la surface par un processus de chélation pontée bidentate. Les groupements carboxylate et amino ne seraient pas engagés et/ou affectés par ces complexes.

Les phénomènes d'adsorption compétitive entre phosphates inorganiques et glyphosate ont également été étudiés avec les oxydes métalliques. Gimsing et Borggaard (2001) ont montré que le phosphate est, dans ce cas, le meilleur compétiteur puisqu'il peut même exclure le glyphosate des ses sites d'adsorption sur la goethite. Des expériences en batch ont également permis de montrer que les phosphates s'adsorbent avec une densité de surface double de celle du glyphosate à pH = 7, confirmant un mode de complexation différent de ces deux composés.

Même si beaucoup d'incertitudes subsistent, l'adsorption du glyphosate dans le sol semble principalement liée à la fraction argileuse du sol, et plus particulièrement à la teneur en hydroxydes et oxydes de fer et d'aluminium. Elle dépend également fortement du pH des sols, qui influe sur les charges électroniques que portent le glyphosate et les oxydes ou les argiles. La matière organique joue un rôle plus mineur et indirect dans l'adsorption de l'herbicide et interviendrait principalement par des mécanismes de type pont MO-métal-glyphosate. Enfin, dans un sol riche en phosphates inorganiques, la mobilité du glyphosate augmente en raison de la compétition entre ces deux composés pour les sites d'adsorption. Des études de lessivage sur des champs drainés ont montré que le glyphosate peut être transporté vers des couches plus profondes du sol par la combinaison de pluies de forte intensité sur un sol macroporeux mouillé. Enfin, compte tenu de sa solubilité élevée dans l'eau, de ses propriétés de désorption et de sa biodégradabilité, le pourcentage de résidus non-extractibles dans les sols semble relativement faible par rapport à d'autres herbicides (Mamy *et al.*, 2005).

V CONSEQUENCES DE L'ADSORPTION SUR LA BIODISPONIBILITE DES HERBICIDES

Le phénomène d'adsorption plus ou moins fort observé entre un pesticide et le sol va avoir des conséquences non seulement sur les processus de transport (mobilité du pesticide, entraînement vers les eaux souterraines), mais également sur les processus de biodégradation. En effet, il est communément admis qu'un pesticide fortement adsorbé, donc peu biodisponible et/ou bioaccessible (Semple *et al.*, 2004), est plus difficilement ou plus lentement biodégradé. Plusieurs études ont mis en évidence le fait que la dégradation était limitée à la solution aqueuse des sols et que les molécules adsorbées étaient protégées de l'action des microorganismes (Smith *et al.*, 1992 ; Radosevich *et al*., 1996). Ce précepte a cependant été remis en question dans quelques travaux récents, où les taux de biodégradation observés étaient supérieurs aux taux de désorption (Park *et al.*, 2003 ; Huesemann *et al.*, 2004). D'autre part, d'autres facteurs que l'adsorption peuvent également moduler l'activité microbienne et les taux de biodégradation (Barriuso *et al.*, 1997). Lors d'études sur le terrain, il n'est pas toujours facile de différencier les contributions de chaque phénomène. La question reste donc ouverte : est ce que la biodisponibilité d'un composé limite sa biodégradation ?

Peu de données sont disponibles sur de possibles corrélations entre adsorption et biodégradation pour la sulcotrione et la mésotrione. Mamy *et al.* (2005) ont montré que la disparition de la sulcotrione était plus rapide dans des sols alcalins, où son adsorption est plus faible. Cependant, le temps de demie-vie ($T_{1/2}$) de cet herbicide est très similaire quel que soit le sol testé (2-3 jours). Le $T_{1/2}$ du principal métabolite, CMBA, est, lui, beaucoup plus long et plus dépendant du sol, mais les études d'adsorption correspondantes n'ont pas pu être réalisées. Dyson *et al.* (2002) ont montré une corrélation positive entre coefficient d'adsorption (K_d) de la mésotrione et temps de demie-vie ($r^2 = 0,45$), lors d'une étude réalisée sur 15 sols européens et américains possédant des propriétés variées : texture de sol, pH (4,4 à 7,5), teneur en matière organique (0,6 à 3,35 %).

Concernant le glyphosate, les études de terrain sont beaucoup plus nombreuses, mais il n'est pas toujours facile de relier, à la lecture, adsorption et biodégradation. La minéralisation du glyphosate, qui est la voie principale de disparition de cet herbicide (Mamy *et al.*, 2005), semble dépendre directement de son adsorption sur le sol (Sprankle *et al.*, 1975b ; Nomura et Hilton, 1977 ; Strange-Hansen *et al.*, 2004 ; Mamy *et al.*, 2005). La dégradation diminue avec le pH et avec la teneur en phosphates du milieu (Sprankle *et al.*, 1975b), facteurs essentiels à

l'adsorption. Une certaine corrélation du $T_{1/2}$ et du K_f du glyphosate peut être mise en évidence dans les études réalisées sur différents sols par Mamy (2001 [*cité dans sa thèse]* ; Mamy *et al.*, 2005). Cependant, cette corrélation « simpliste » n'est pas toujours observée de façon claire (Sorensen *et al.*, 2006), des facteurs ponctuels, comme une forte teneur en manganèse, pouvant interférer en favorisant la biodégradation dans un sol donné (Mamy *et al.*, 2005). De toutes façons, l'hétérogénéité spatiale considérable des taux d'adsorption du glyphosate, même sur des petites surfaces, rend toute tentative d'analyse fine très difficile (Stenrod *et al.*, 2006).

Une seule étude, réalisée par Schnürer *et al.* (2006), a porté sur l'effet de l'adsorption sur la biodisponibilité et la biodégradation du glyphosate sur un sol en présence de goethite. Des analyses par ATR-FTIR ont montré que le glyphosate adsorbé est biodisponible. Sa dégradation, plus lente qu'en milieu aqueux, se déroule par étape, le groupement phosphonate restant « accroché » sur la surface. Aucune interaction directe entre les microorganismes et la goethite n'a été observée.

Ces quelques études mettent en évidence une certaine corrélation entre adsorption et biodégradation de ces herbicides dans le sol, d'autres facteurs (Kah et Brown, 2006) pouvant sans doute intervenir directement sur les microorganismes : une forte teneur en MO peut, par exemple, augmenter l'activité microbienne. Les métabolites ne sont, par contre, pas toujours pris en compte, et les suivis de biodégradation se résument souvent à des variations de CO_2. Enfin, il n'est pas toujours facile de séparer les différents processus et les facteurs les influençant. Ainsi, si un faible pH et une faible teneur en phosphates augmentent l'adsorption du glyphosate, et donc diminuent sa biodégradation, il faut souligner que ce sont également des conditions plutôt défavorables à la biodégradation en général.

METHODES DE DOSAGE DE LA SULCOTRIONE ET DE LA MESOTRIONE OU DU GLYPHOSATE

Le développement d'une méthode analytique de dosage d'un pesticide nouvellement mis sur le marché et de ses métabolites constitue un point crucial pour pouvoir suivre leur devenir de manière fiable. Facilité de mise en place, répétabilité, reproductibilité sont des critères majeurs à prendre en compte pour le choix de la méthode utilisée, mais il faut surtout mettre au point des méthodes sélectives (évitant les interférences avec les constituants de la matrice) et très sensibles (faibles limites de détection et de quantification). En effet, la plupart des pesticides sont présents à l'état de traces, et selon les normes européennes, les concentrations autorisées pour les pesticides dans l'eau potable doivent être inférieures à 0,1 µg/L pour un pesticide donné et inférieures à 0,5 µg/L pour l'ensemble des pesticides. L'analyse directe est donc extrêmement difficile, et il est nécessaire, dans un premier temps, de mettre au point des méthodes efficaces de préparation d'échantillons avant de les analyser. En effet, les échantillons sont souvent trop complexes ou trop dilués pour être analysés sans une étape préliminaire de préparation des échantillons, qu'il s'agisse de concentration dans le cas de prélèvements aqueux, ou d'extractions et de concentrations dans le cas de prélèvements de sol.

Nous présenterons donc ici les principales méthodes de dosage des deux familles de pesticides que nous avons étudiées en nous focalisant sur les méthodes chromatographiques, leur couplage à la spectrométrie de masse et la RMN, techniques dont nous disposions au laboratoire.

I METHODES DE DOSAGE DE LA SULCOTRIONE ET DE LA MESOTRIONE

Du fait de leur développement relativement récent, peu d'informations sont disponibles sur des méthodes permettant le dosage d'herbicides de la famille des tricétones. La présence de nombreuses fonctionnalités polaires, l'absence de volatilité et le caractère ionisable (faiblement acide) de ces composés rendent le choix de la méthode particulièrement difficile.

I.1 Dosage en milieux aqueux

La méthode classique utilisée pour doser ces pesticides dans des concentrations élevées de l'ordre de 10^{-6} M à 10^{-3} M (de 0,3 mg/L à 0,3 g/L) est l'HPLC en phase inverse (Colonne C-18) équipée d'un détecteur à barettes de diodes (DAD). Compte-tenu du caractère polaire et acide des tricétones, les conditions chromatographiques requièrent l'utilisation d'une phase éluante acide (acide formique, trifluoroacétique (TFA) ou *ortho*phosphorique) de manière à les retenir sur la phase stationnaire (Chaabane *et al.,* 2005 ; Ter Halle et Richard, 2006 ; Ter Halle *et al.,* 2006 ; Chaabane *et al.,* 2007).

Pour les études à l'état de traces, comme dans une eau naturelle, la HPLC phase inverse constitue toujours une méthode de choix, mais le détecteur utilisé doit avoir une plus grande sensibilité que celle d'un DAD.

Une méthode sélective, sensible et robuste pour la détermination de la mésotrione et de ses deux principaux métabolites (MNBA et AMBA) par HPLC a été développée en se basant sur les propriétés fluorescentes du AMBA (Alferness et Wiebe, 2002). En effet, le protocole utilisé correspond à une transformation séquentielle chimio-enzymatique de la mésotrione et du MNBA en AMBA (Figure 48). Il présente ainsi les avantages d'avoir recours à un détecteur sensible, le fluorimètre, et de rendre possible la quantification du MNBA très polaire, qu'il est difficile de retenir sur une phase stationnaire dans des conditions HPLC phase inverse.

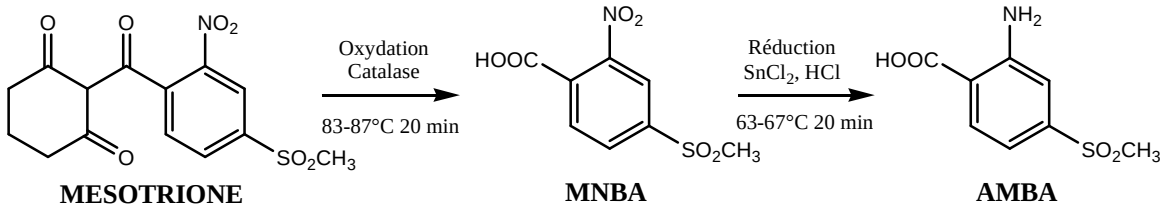


Figure 48 : Conversion chimio-enzymatique de la mésotrione et du MNBA en AMBA.

L'échantillon aqueux, après filtration et acidification, va être injecté une première fois sur l'HPLC pour d'une part, quantifier directement par fluorescence le AMBA, et d'autre part, collecter séparément les fractions correspondantes au MNBA et à la mésotrione. Le MNBA est alors converti en AMBA par réduction du groupement nitro avec du chlorure d'étain en milieu acide à 63-67°C. La fraction obtenue est alors injectée une seconde fois pour déterminer la concentration en MNBA de l'échantillon. Enfin, dans une dernière étape, la mésotrione est soumise à une rupture oxydative par action d'une catalase, libérant ainsi du

MNBA, qui est alors réduit suivant le protocole précédent. Cette approche multi-étapes, relativement lourde (durée d'analyse complète de 2 jours), repose sur une excellente efficacité de conversion (Mésotrione → AMBA : 85-90 % ; MNBA → AMBA : 90-95 %), une grande sélectivité et permet d'atteindre une limite de quantification pour les 3 composés de 0,1 µg/L (limite de détection : 0,01 µg/L).

Des méthodes encore plus sensibles, permettant d'atteindre des limites de détection de quelques ng/L, ont été décrites et utilisent la LC/ESI-MS/MS (Freitas *et al.,* 2004 ; Stoob *et al.,* 2005). Cette technique, très sélective, permet la détermination précise d'un composé *via* la détection de fragments à partir d'un ion parent préalablement sélectionné. Cependant, le processus d'ionisation, primordial pour une quantification rigoureuse et précise, est généralement affecté par la matrice. En effet, les composés de la matrice et les analytes entrent en compétition pour l'ionisation entraînant une extinction d'ionisation. Ce phénomène est bien connu et différents procédés peuvent être appliqués pour éviter ce problème comme l'utilisation d'une pré-colonne pour éliminer les constituants de la matrice ou l'ajout d'un standard dans l'échantillon. Freitas *et al.* (2004) ont mis au point un protocole permettant de doser un ensemble de pesticides acides, dont la mésotrione et la sulcotrione, dans des échantillons aqueux par cette méthode (électrospray mode négatif). Après addition d'un standard interne deutéré et concentration de l'échantillon par extraction en phase solide (SPE) hors ligne sur une colonne Oasis® HLB, celui-ci est analysé par LC/(-)ESI-MS/MS avec une phase éluante acidifiée par de l'acide formique. Il faut noter que le choix de l'acide est assez crucial, certains acides empêchant l'ionisation comme l'acide *ortho*phosphorique ou d'autres comme le TFA risquant de contaminer la source ou empêchant la formation de l'ion déprotoné lors d'analyse en mode négatif (Freitas *et al.,* 2004). Pour maximiser la réponse du détecteur, une étape de neutralisation par du tampon Tris est réalisée post-colonne. La limite de quantification pour les substances acides varie entre 0,5 et 10 ng/L. Cette méthode a été améliorée par l'utilisation d'un système en ligne automatisé de SPE, couplé directement à la LC/MS, rendant ainsi le processus plus rapide et évitant les erreurs de manipulation (Stoob *et al.,* 2005). La limite de détection pour la sulcotrione et la mésotrione dans des échantillons d'eau ultra-pure ou d'eaux naturelles est de 2 ng/L.

I.2 Dosage dans les sols

Le dosage de pesticides dans les sols va requérir une étape préliminaire d'extraction dans des solvants organiques ou des mélanges aqueux, selon la nature du composé, avant l'analyse de l'extrait. Cette étape est délicate : elle doit assurer un excellent taux de recouvrement du pesticide et éventuellement de ses métabolites sans entraîner une extraction trop importante des constituants de sol, qui pourraient gêner ultérieurement l'analyse.

Pour l'analyse de la sulcotrione et de la mésotrione dans les sols, plusieurs protocoles d'extraction ont été décrits en fonction de l'objectif du travail. La méthode peut comprendre plusieurs étapes dans le cas de suivi de ces herbicides dans les sols, afin de différencier la fraction disponible (extraction avec des solutions aqueuses du type $CaCl_2$ 0,01 M) et la fraction plus fortement liée (mélange HCl 0,1 M/Acétonitrile 10/90) (Cherrier *et al.*, 2004 ; Cherrier *et al.*, 2005 ; Mamy *et al.*, 2005) ou même permettre d'extraire également les métabolites (NH_4OH 0,05 M puis acétone) (Dyson *et al.*, 2002). Elle peut également être directe dans le cas de dosages d'herbicides. Alferness et Wiebe (2002) ont appliqué leur méthode d'analyse consistant à convertir la mésotrione et le MNBA en AMBA pour pouvoir le détecter ensuite par fluorescence, à des échantillons de sol. L'extraction est réalisée par mise en contact du sol sous agitation avec une solution de NH_4OH. Après centrifugation et acidification du surnageant (3,5–4), l'extrait est traité et analysé par HPLC suivant le protocole décrit précédemment. La limite de détection de la mésotrione et de ses métabolites est de 0,005 mg/kg.

II METHODES DE DOSAGE DU GLYPHOSATE

Bien que commercialisé depuis le milieu des années 70, il n'existe à ce jour aucune norme pour la quantification du glyphosate. Ce composé, très polaire et possédant un caractère amphotère, ne possède ni groupement chromophore, ni fluorophore. Très soluble dans l'eau, il est difficile de l'extraire à l'aide de solvants organiques. De très nombreuses méthodes d'analyse ont été décrites dans la littérature (cf. revue de Stalikas et Konidari, 2001), présentées chaque fois comme sensibles, reproductibles et fiables jusqu'à la méthode suivante qui fait état des limites de la précédente. D'autre part, les limites de quantification atteintes sont souvent supérieures aux normes européennes. Les principales méthodes de dosage sont cependant basées sur les techniques chromatographiques.

II.1 Méthodes directes

Quelques méthodes de détection directe du glyphosate et de son principal métabolite, l'AMPA, ont été décrites dans la littérature, l'objectif étant de mettre en place une méthode sélective, sensible et rapide, ne nécessitant pas de traitement préalable lourd de l'échantillon. La chromatographie ionique (IC) est une des techniques de choix utilisée dans le cadre de l'analyse d'un composé ionique tel que le glyphosate, le point crucial étant la détection.

L'utilisation de détecteurs conductimétrique (Zhu *et al.*, 1999) ou électrochimique (Sato *et al.*, 2001) permet l'analyse du glyphosate dans des mélanges complexes (échantillons d'eaux naturelles, urines ou plasma humains) avec une bonne sélectivité vis-à-vis des anions inorganiques du milieu. Cependant, les limites de détection restent relativement élevées (42 à 50 µg/L).

Le couplage de la chromatographie ionique et de la spectrométrie de masse (IC/MS) a ouvert de nouvelles voies pour la détermination de micropolluants organiques polaires dans des échantillons aqueux, la difficulté restant le choix de l'interface appropriée intégrée entre la colonne analytique et le détecteur. Dans le cas du glyphosate, pour obtenir une bonne séparation des composés, l'éluant doit être fortement chargé en sels ou en tampon (de 2 à 15 mM suivant les méthodes décrites), ce qui peut créer des interférences lors de l'ionisation et un fort bruit de fond sur les chromatogrammes. Bauer *et al.* (1999) ont utilisé un module de suppression de conductivité entre la colonne et le spectromètre de masse (ESI-MS), qui permet d'échanger les cations du milieu par des protons. Cette technique permet de réduire le bruit de fond et d'augmenter fortement la sensibilité. Il faut cependant choisir un éluant adéquat (acétate, carbonate, hydrogénocarbonate) conduisant à la formation d'acides faibles pour éviter les phénomènes de corrosion. Cette méthode, simple et directe, permet d'atteindre des limites de détection pour le glyphosate de 1 µg/L. Par contre, l'AMPA sort sous forme d'un pic très large difficile à quantifier (Figure 49). Son passage dans le module de suppression entraîne certainement la protonation de la fonction amine de l'AMPA, qui interagit ensuite avec l'échangeur de cations.

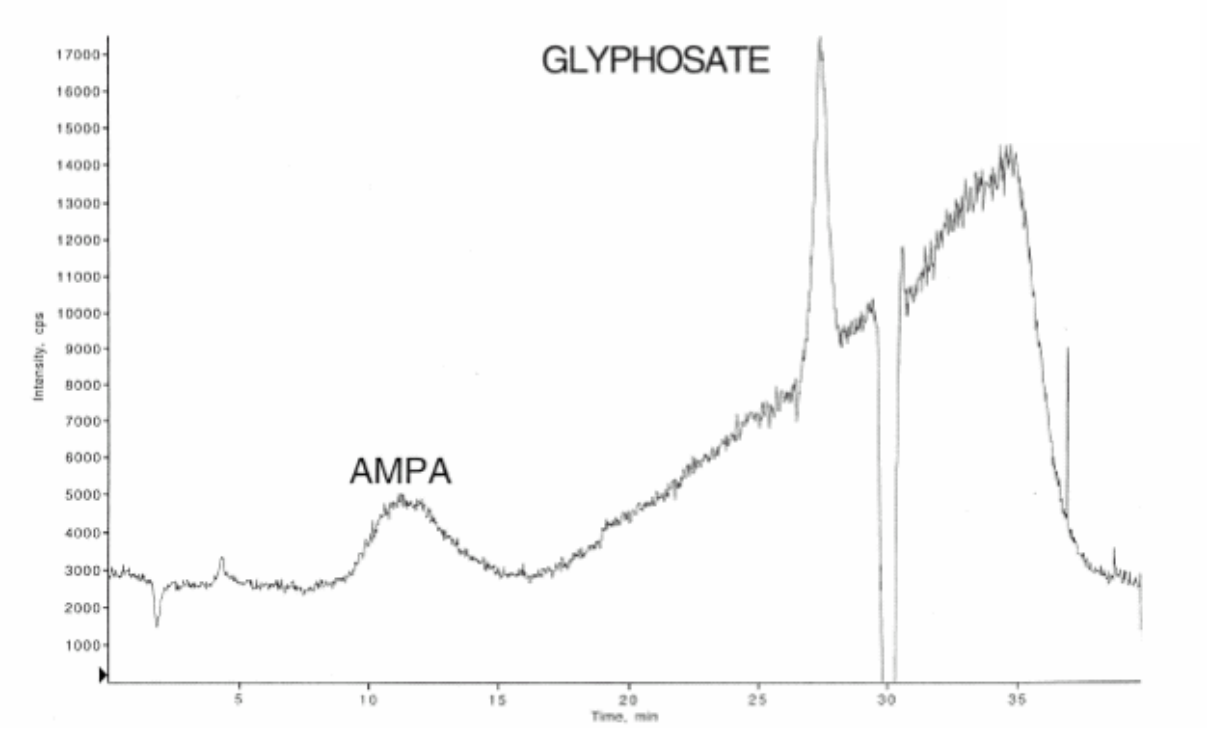


Figure 49 : Chromatogramme du glyphosate et du AMPA obtenu par IC/MS (d'après Bauer *et al.*, 1999)

L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), détecteur particulièrement sensible et qui présente une forte spécificité vis-à-vis de l'élément choisi, a été utilisé avec un certain succès dans le dosage direct du glyphosate et de son métabolite dans des eaux naturelles. Le couplage de la séparation ionique sur colonne échangeuse d'anions et de la détection par un système simple quadripôle ICP-MS (ionisation dans une torche à plasma) a permis, après optimisation, de descendre la limite de détection du glyphosate à 0,7 µg/L (Guo *et al.*, 2005). Cette méthode s'est révélée très spécifique puisque aucune interférence n'a été observée avec les anions présents dans la matrice ou les ions métalliques. Sadi *et al.* (2004) ont encore amélioré la sensibilité de la technique en travaillant d'une part avec un détecteur ICP-MS équipé de cellules de collision/réaction octapole, améliorant ainsi le rapport signal/bruit, et d'autre part, en travaillant avec une chromatographie phase inverse par paire d'ions (*tetra*butylammonium), ce qui permet d'avoir un solvant plus compatible avec le détecteur et une excellente séparation en moins de 5 minutes. Dans ces conditions, les limites de détection reportées sont de 32 ng/L pour le glyphosate et de 25 ng/L pour l'AMPA (Figure 50).

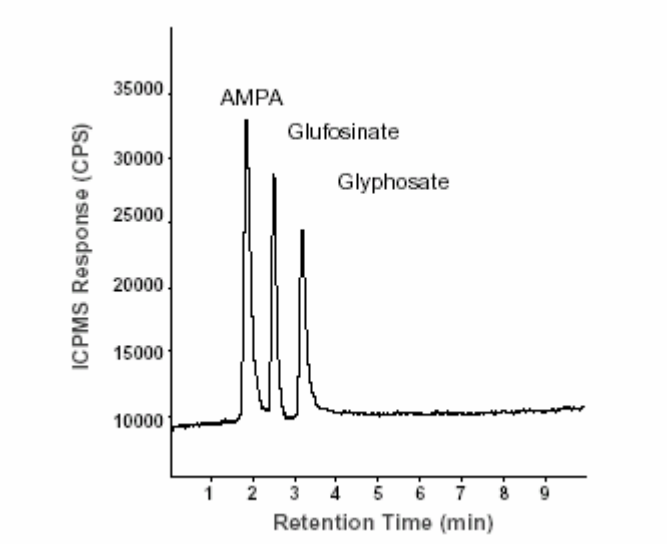


Figure 50 : Chromatogramme d'un mélange (500 µg/L) d'AMPA, de glufosinate (herbicide phosphoré analogue du glyphosate) et de glyphosate par ICP-MS équipé de cellules de collision (d'après Sadi *et al.*, 2004)

D'autres techniques analytiques directes de dosage du glyphosate ont été explorées comme l'électrophorèse capillaire ou la RMN, leur faible sensibilité étant un obstacle à leur large utilisation. Cependant dans certains contextes particuliers, ces méthodes peuvent se révéler intéressantes. Ainsi, le diagnostic clinique peut requérir dans le cas d'empoisonnement ou tentatives de suicide une réponse rapide. L'analyse directe de fluides biologiques (urines, fluides gastriques, sérum) par RMN du ^{31}P et du ^{1}H, sans séparation préalable des composés, permet d'identifier et de quantifier le glyphosate rapidement et facilement (Cartigny *et al.*, 2004). Les spectres RMN ^{31}P sont très simples contrairement aux spectres RMN ^{1}H, où les différents métabolites endogènes sont également visibles (Figure 51). La résonance du groupement CH_2-P du glyphosate à 3,12 ppm (doublet) dans le spectre RMN ^{1}H ne semble pas interférer avec les autres signaux quel que soit le fluide biologique étudié et sert de base à la quantification.

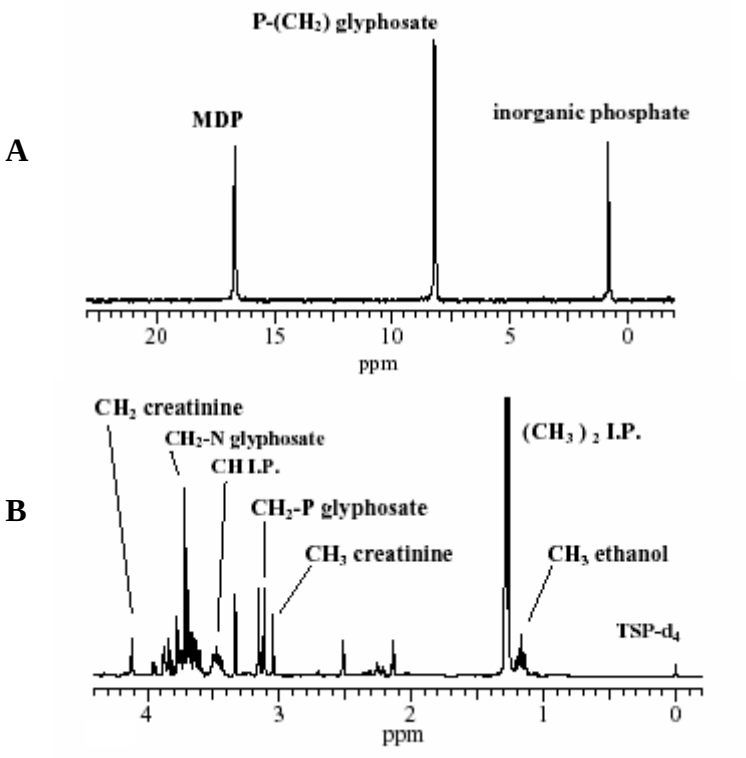


Figure 51 : Spectres RMN ^{31}P, calibré sur l'acide méthylène diphosphonique (MDP), (A) et ^{1}H, calibré sur le triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutéré (TSP-d_4) (B) d'urine contaminée par du glyphosate (d'après Cartigny *et al.*, 2004)

La technique RMN, en combinant ^{1}H et ^{31}P, permet, dans ce contexte, d'établir un diagnostic rapide (10-20 min), en n'ayant besoin que d'un petit volume d'échantillon (500 µL) sans aucun prétraitement de l'échantillon. Elle permet également d'avoir une vision globale des possibles perturbations du métabolisme endogène liée à l'ingestion du glyphosate par exemple, et ce lors d'une unique analyse. La limite majeure de cette technique reste son manque de sensibilité (limite de détection pour le glyphosate : 30 mg/L).

Toutes ces techniques très spécifiques permettent une analyse directe de l'échantillon naturel pour le dosage du glyphosate, mais elles manquent généralement de sensibilité et ne permettent donc pas d'atteindre les concentrations sub-µg/L requises par les normes européennes. Il a donc fallu développer une nouvelle stratégie et faire appel à une étape préalable de dérivation du glyphosate. Greffer un groupement chromophore ou fluorophore sur le glyphosate en s'inspirant des méthodes de protection des amines, le rendant ainsi détectable, permet de plus de diminuer sa polarité et donc d'améliorer les séparations.

II.2 Méthodes de dérivation

L'introduction d'une étape supplémentaire de dérivation pour améliorer la sensibilité de la méthode de dosage va également constituer un point clef critique, où les paramètres tels que rendement de la réaction, élimination des réactions parasites, reproductibilité, facilité de mise en œuvre vont être cruciaux pour la mise en place d'une méthode simple et efficace. Aussi un nombre impressionnant de travaux sont publiés chaque année décrivant l'amélioration d'une méthode existante ou une nouvelle méthode, plus directe, plus propre ou permettant d'atteindre des limites de détection plus faibles. Les méthodes chromatographiques (GC, HPLC) sont généralement utilisées pour la séparation de ces dérivés (Stalikas et Konidari, 2001).

Dans cette partie bibliographique, nous nous focaliserons sur les méthodes utilisant la HPLC, plus facilement compatibles pour des échantillons aqueux, qui permettent des dérivations pré- ou post-colonnes directement dans les échantillons aqueux, automatisables et qui ont donc un plus grand essor à l'heure actuelle. Pour plus d'informations sur les méthodes utilisant la CPG, cf. la revue de Stalikas et Konidari (2001).

II.2.1 Dérivations post-colonne

Le protocole préconisé par l'EPA (Méthode 547, 1990), basé sur la méthode développée par Moye *et al.* (1983), consiste en une approche post-colonne de dérivation par l'*o*-phtalaldéhyde (Figure 52) en présence de 2-mercaptoéthanol (OPA-ME) après oxydation du glyphosate en glycine, et après séparation sur colonne échangeuse de cations.

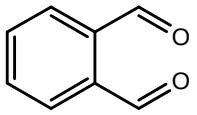


Figure 52 : Structure de l'*o*-phtalaldéhyde

Les limites de détection reportées pour l'analyse de ce dérivé fluorophore du glyphosate sont de 6 µg/L dans les eaux de boisson et de 9 µg/L dans les eaux de surface (Mallat et Barcelo, 1998). Cette faible sensibilité peut être expliquée par le fait que les échantillons naturels sont injectés directement sans étape d'extraction ou de concentration préalable. De plus, les sels présents dans l'échantillon risquent d'endommager la colonne échangeuse de cations. Mallat et Barcelo (1998) ont amélioré cette méthode en mettant en place des étapes de lavage et de pré-concentration de l'échantillon par extractions en phase solide (SPE) avec passages successifs sur une cartouche polymérique (LiChrolut EN), puis

sur une cartouche échangeuse d'anions (OH^-, Amberlite) avant analyse. Le protocole de dérivation a également été légèrement modifié en utilisant de la *N*,*N*-diméthyl-2-mercaptoéthylamine à la place du mercaptoéthanol. Ces auteurs obtiennent ainsi des limites de détection de l'ordre de 2 et 4 µg/L pour le glyphosate et l'AMPA respectivement. Patsias *et al.* (2001) ont automatisé cette méthode en mettant en ligne l'extraction en phase solide sur colonne échangeuse d'anions, la chromatographie par échange de cations suivie de la dérivation post-colonne par OPA-ME et la détection par fluorescence (SPE-LC-FD). Après optimisation des différentes étapes, les limites de détection atteintes sont de 0,02 µg/L pour le glyphosate et de 0,1 µg/L pour l'AMPA (le pourcentage de récupération pour le métabolite notamment lors de l'étape de SPE, restant faible).

Un autre procédé post-colonne de dosage indirect du glyphosate a été décrit (Lovdahl et Pietrzyk, 1992). La 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone (morine) forme avec les ions Al^{3+} (et d'autres ions métalliques) des complexes fluorescents. Cette méthode est utilisée pour déterminer la concentration en ions Al^{3+}dans des eaux naturelles. En présence d'ions phosphate, l'émission de fluorescence diminue linéairement avec la quantité de phosphates présents dans l'échantillon. L'utilisation de ce réactif peut donc permettre de corréler l'intensité de la fluorescence à la quantité de glyphosate présent. Les limites de détection pour le glyphosate et l'AMPA, séparés sur colonne échangeuse d'anions, sont de 14 et 40 ng/L respectivement.

II.2.2 Dérivations pré-colonne

Les protocoles pré-colonne décrits sont essentiellement basés sur la dérivation avec le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl). Connu comme un bon groupement protecteur des amines, il réagit aussi bien avec les amines primaires que secondaires. La réaction de dérivation doit se dérouler en milieu basique (Figure 53).

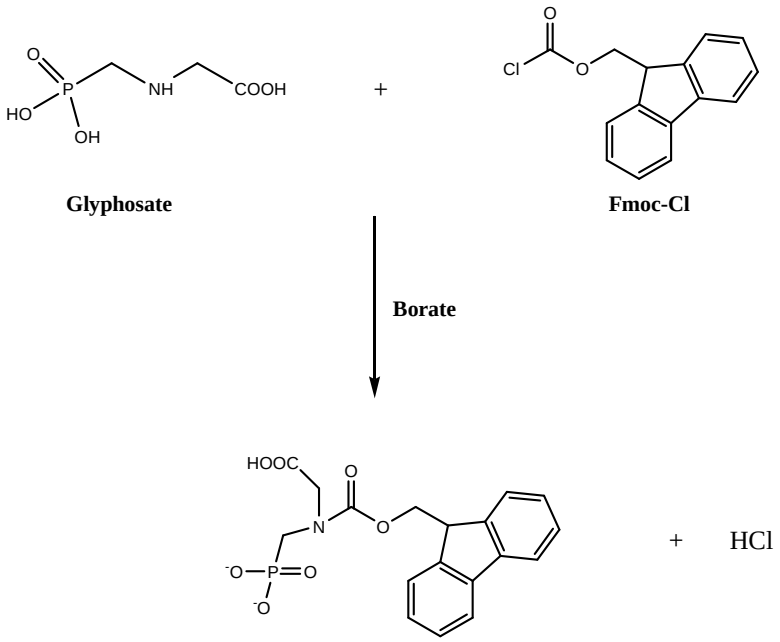


Figure 53 : Réaction de dérivation du glyphosate par le groupement Fmoc-Cl

L'inconvénient majeur de cette méthode de dérivation est la forte réactivité du Fmoc-Cl avec l'eau, qui conduit à la formation de Fmoc-OH. Il faut donc mettre le réactif en large excès pour obtenir un bon rendement de dérivation. Mais le Fmoc-OH formé en grande quantité va donner un pic très large au début du chromatogramme qui peut interférer ou même complètement occulter le signal du dérivé du glyphosate ou du dérivé du AMBA selon les conditions chromatographiques. Des étapes d'extraction par un solvant organique ont été incluses dans le protocole pour éliminer les impuretés organiques du milieu, mais aussi l'excès de réactif. Cependant le Fmoc-OH n'est pas éliminé par cette technique. Les premiers essais ont été réalisés en utilisant une détection UV ou par fluorescence (Glass, 1983, Sancho *et al.*, 1996), la limite de détection décrite étant de 0,4 µg/L pour le glyphosate.

De nombreux travaux ont donc porté d'une part, sur l'optimisation du protocole de dérivation et d'autre part, sur des améliorations de séparation du pic parasite de Fmoc-OH et des composés d'intérêt, tout ceci afin d'améliorer la détection et la quantification du glyphosate et du AMPA. Des études systématiques de chaque point du procédé de dérivation ont été réalisées (Le Fur *et al.*, 2000 ; Le Bot *et al.*, 2002 ; Nedelkoska et Low, 2004): rapport molaire échantillon/Fmoc-Cl ; concentration des différents réactifs ; temps de réaction ; choix du solvant d'extraction ; stabilité du complexe… Il a fallu également mettre en place des étapes préliminaires de traitement des échantillons naturels afin d'éliminer les possibles interférences des constituants du milieu sur la dérivation : élimination des ions divalents

(Cu^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}) par addition d'EDTA (Le Fur *et al.*, 2000) ; contrôle de la force ionique du milieu par piégeage des ions sur SPE (Le Bot *et al.*, 2002), … L'optimisation de la méthode d'analyse afin de séparer le pic du dérivé AMPA de celui du Fmoc-OH a également été réalisée en comparant divers types de phases stationnaires : colonne C_{18} classique, colonne amino greffée sur silice (Le Bot *et al.*, 2002) ou polymérique (Nedelkoska et Low, 2004). Dans les meilleures conditions de dérivation et de séparation (colonne amino), les limites de détection obtenues sont de 0,025 µg/L et de 0,05 µg/L pour le glyphosate et l'AMPA respectivement (Le Bot *et al.*, 2002). Toutefois il subsiste un problème lié à la durée de vie de la colonne analytique, qui ne supporte pas plus de 150-200 injections (problème de pH trop alcalin pour la phase ; réaction possible du Fmoc-Cl en excès avec les groupements amino de la phase ; saturation par Fmoc-OH…).

Une autre approche a été développée par Hidalgo *et al.* (2004) et Nedelkoska et Low (2004) : la LC-LC-détecteur à fluorescence. Les auteurs utilisent deux colonnes analytiques placées en série : la première (colonne C_{18} ou amino) permet de séparer le Fmoc-OH des dérivés glyphosate et AMPA ; la seconde colonne analytique (colonne amino) permet de séparer les dérivés formés d'intérêt. Nedelkoska et Low (2004) ont même placé une vanne entre les deux colonnes permettant d'éliminer le Fmoc-OH séparé sur la première colonne et de protéger ainsi la deuxième colonne (Figure 54).

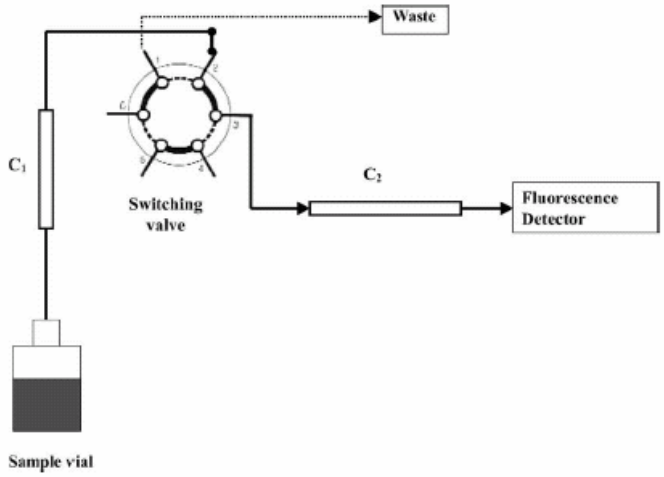


Figure 54 : Montage en série de deux colonnes analytiques (C_1 et C_2) séparées par une vanne. C_1 sépare le Fmoc-OH qui est dirigé vers la poubelle et le reste de la fraction de l'échantillon à analyser est envoyé vers C_2 (d'après Nedelkoska et Low, 2004).

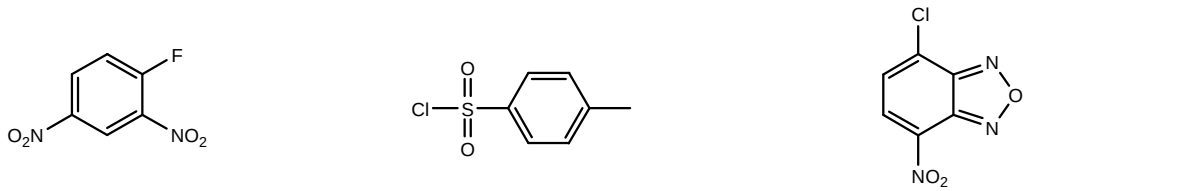
Ce système permet d'injecter un volume plus important (2 mL) et d'espérer une meilleure quantification par fluorescence. Les auteurs ont également testé un procédé de pré-

concentration des échantillons naturels faisant appel à une cartouche SPE échangeuse d'anions. Cette nouvelle méthode permet d'obtenir des limites de quantification en glyphosate de 0,1 µg/L pour un échantillon non concentré, et de 0,02 µg/L pour un échantillon concentré.

Une autre stratégie pour essayer d'améliorer la sensibilité de la méthode de dosage est de travailler avec un détecteur plus spécifique et plus performant comme la spectrométrie de masse. Vreeken *et al*. (1998) ont développé une méthode SPE/LC-ESI-MS/MS en ligne qui permet d'identifier et quantifier le glyphosate et l'AMPA dans différents échantillons d'eau, sur la base du temps de rétention et du rapport constant de trois ions sélectionnés pour chaque composé. La dérivation a lieu directement dans l'échantillon aqueux avant pré-concentration sur cartouche SPE, séparation sur une colonne C_{18} et analyse par MS/MS en mode négatif. Les limites de détection sont de 0,03 µg/L pour le glyphosate et l'AMPA. Lee *et al.* (2002) ont obtenu une meilleure reproductibilité en travaillant en LC/MS simple quadripôle, mais en utilisant un standard marqué du glyphosate (2-^{13}C, ^{15}N) comme référence interne, minimisant ainsi les variations liées à la dérivation et aux effets de matrice. Ibanez *et al.* (2005, 2006) ont optimisé les paramètres MS/MS travaillant cette fois-ci en mode positif, deux fois plus sensible que le mode négatif, toujours en présence d'un étalon interne marqué (glyphosate 1,2-^{13}C, ^{15}N). Ces auteurs ont également basé leur quantification sur la transition la plus sélective pour chaque composé afin d'éviter les interférences avec d'autres ions. Après optimisation de la méthode de préparation des échantillons (mise en place d'une première étape d'acidification), ils ont pu ainsi atteindre une limite de détection de 5 ng/L et une limite de quantification de 50 ng/L pour le glyphosate et l'AMPA dans des échantillons d'eaux naturelles issues de différentes sources.

Le dosage de pesticides dans des échantillons de boues d'épuration est particulièrement difficile à réaliser du fait de la complexité de ces milieux. Une approche originale a été récemment décrite mettant en jeu une réaction de dérivation *in situ* par le Fmoc-Cl après fixation des analytes sur un support solide adéquat (résine échangeuse d'anions SAX). Après mise au point des conditions de dérivation (pH de la résine, temps de réaction, volume et concentration de la solution du réactif, conditions d'élution) et d'analyse par LC/ESI-MS/MS en mode positif, les auteurs ont pu atteindre des limites de détection de 20 et 30 µg/L et des limites de quantification de 35 et 50 µg/L pour le glyphosate et l'AMPA respectivement, dans des boues d'épuration (Ghanem *et al.*, 2007).

Il faut noter que d'autres agents de dérivation ont été testés comme le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (Lundgren, 1986), le chlorure de l'acide *p*-toluènesulphonique (Khrolenko et Wieczorek, 2005) ou le 4-chloro-7-nitrobenzofurazane (Colin *et al.*, 2000 ; Duran Meras *et al.*, 2005). Ils réagissent avec le groupement amine du glyphosate et de l'AMPA en milieu basique et les dérivés formés sont détectés par fluorescence (Figure 55). Cependant, les limites de détection obtenues sont toujours bien supérieures aux normes européennes en matière de potabilité.



1-Fluoro-2,4-dinitrobenzène Chlorure d'acide *p*-toluènesulphonique 4-Chloro-7-nitrobenzofurazane (NBD-Cl)

Figure 55 : Structures de réactifs de dérivation du glyphosate

II.3 Méthodes de pré-traitement des échantillons

Le développement d'une méthode analytique implique non seulement la mise en place d'une technique performante d'analyse, mais aussi celle d'un protocole de préparation et de pré-concentration de l'échantillon, simple, reproductible, efficace et représentatif de l'échantillon réel. Il a été estimé que les deux-tiers du temps total nécessaire pour une analyse sont consacrés à ces étapes de pré-traitement de l'échantillon, qui sont aussi les sources principales d'erreurs dans un protocole analytique (Stalikas et Konidari, 2001).

Le glyphosate et l'AMPA sont très polaires et solubles dans la phase aqueuse. Les extractions liquide-liquide utilisant des solvants organiques sont inutiles, car ces composés n'y sont pas solubles. Pour les échantillons d'eau, l'extraction solide-liquide (SPE) sur des phases ioniques est une méthode de choix pour les étapes de « purification » et de concentration, qui s'est révélée comme très efficace, relativement simple et permettant d'excellents taux de récupération surtout pour le glyphosate. Cette méthode est donc largement utilisée comme décrit précédemment.

Dans le cas d'échantillons de sols, les protocoles sont beaucoup plus lourds. En effet, le glyphosate et l'AMPA ont une grande affinité envers certains constituants des sols. Ainsi, les résidus liés présentent un comportement vis-à-vis de l'extraction totalement différent de la fraction des résidus non liés. Ces différences de force d'interactions entre le composé et la

matrice solide suivant le sol étudié vont souvent donner des résultats non reproductibles avec des taux de récupération relativement faible, et donc des limites de détection relativement élevées. Une étude assez exhaustive de solvants d'extraction sur des échantillons de sol en présence de glyphosate radiomarqué a montré que le pourcentage d'extraction augmentait avec le pH et la force ionique du solvant (Miles et Moye, 1988), ce qui peut s'expliquer par la nature des interactions mises en jeu (liaisons hydrogène et forces de répulsion). L'extraction d'échantillons de sol avec une solution de KOH 0,5 M, bien qu'entraînant l'extraction parallèle des substances humiques, a permis d'atteindre une limite de détection du glyphosate de 1 mg/kg. L'addition d'un étalon interne avant la phase d'extraction de N-(phosphonométhyl)-β-alanine (Lundgren, 1986) ou de glyphosate marqué (1,2-^{13}C, ^{15}N) (Ibanez *et al*., 2005) pour diminuer les erreurs de quantification, suivie d'une dérivation classique au Fmoc-Cl, a permis d'améliorer les limites de détection et de quantification atteintes à 5 µg/kg et 50 µg/kg pour le glyphosate et l'AMPA respectivement.

En résumé, nous avons pu constater que les méthodes d'analyse pour le glyphosate sont diverses, chacune nécessitant encore des mises au point pour atteindre de manière fiable et reproductible des limites de quantification adéquates avec les normes Européennes de potabilité. Malgré sa commercialisation depuis plus de 30 ans, aucune norme de dosage du glyphosate n'existe à ce jour.

LES OBJECTIFS

L'étude bibliographique concernant la mésotrione n'apporte que très peu de données sur la biodégradation et l'adsorption de ce pesticide et la plupart des travaux émanent de la firme Syngenta qui la produit. A ce jour, seuls deux métabolites (MNBA et AMBA) ont été identifiés. Aucun microorganisme capable de dégrader la mésotrione n'a été isolé, et de ce fait, aucune cinétique de biodégradation n'a pu être effectuée (pas de bilan quantitatif global). Les voies métaboliques impliquées dans la biodégradation de la mésotrione restent donc méconnues. Concernant l'adsorption de cet herbicide, les quelques résultats, issus d'études sur le terrain, montrent que le pH du sol, sa texture, le taux de matière organique conditionnent la mobilité de la mésotrione dans l'environnement.

Le glyphosate, commercialisé depuis 1974, a été plus largement étudié. Deux voies métaboliques ont été mises en évidence : l'une passe par la formation intermédiaire de la sarcosine et l'autre par le AMPA. Toutefois, seul le AMPA est recherché dans les matrices environnementales à cause de sa persistance. Le glyphosate est fortement adsorbé sur le sol, ce qui lui confère une faible mobilité. L'adsorption semble principalement liée à la fraction minérale du sol avec une grande affinité envers les oxydes de fer et d'aluminium, la matière organique ne jouant qu'un rôle indirect. La présence de phosphates inorganiques est responsable d'une plus grande mobilité du glyphosate. Pour suivre le glyphosate, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées faisant appel à différentes techniques plus ou moins sensibles, permettant d'atteindre des limites de quantification plus ou moins faibles.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier les interactions existant entre chacun de ces deux herbicides et des matrices solides (constituants du sol, sol naturel entier), afin d'évaluer les conséquences sur la biodégradation de ces herbicides. Nous avons choisi de travailler sur ces deux pesticides afin de réaliser à long terme une étude comparative du fait de leurs propriétés physico-chimiques très différentes. La mésotrione comme le glyphosate peuvent-ils être plus facilement dégradés lorsqu'ils sont adsorbés ou au contraire ne pas être biodisponibles ?

Pour atteindre cet objectif, notre démarche scientifique a été la suivante :

- Etudier la biodégradation de la mésotrione et du glyphosate en milieu aqueux. Pour la mésotrione, aucune souche isolée n'a été décrite. Notre travail a donc débuté par un large criblage de microorganismes, afin de sélectionner une souche capable de transformer la mésotrione. Des cinétiques de biodégradation ont été ensuite réalisées dans différentes conditions (concentration, pH, anaérobiose) pour mettre en évidence les métabolites formés. Nous avons choisi d'utiliser différentes techniques d'analyse complémentaires (HPLC, LC/MS, RMN ^{1}H *in situ*, LC/RMN) afin d'élucider la structure des métabolites et d'établir un schéma métabolique. Concernant le glyphosate, nous avons étudié sa biodégradation par deux champignons *Trametes versicolor* T2 et *Fusarium solani* PB1. L'optimisation du protocole analytique de dosage du glyphosate a du être préalablement réalisée.

- Etudier l'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur différents constituants du sol (argiles, complexes argilo-humiques), afin d'essayer de mettre en évidence des corrélations entre adsorption du polluant et caractéristiques de ces matrices. Nous avons ensuite travaillé sur un sol naturel riche en argile pour nous rapprocher des conditions environnementales. Pour compléter ce travail, nous avons évalué le potentiel d'une nouvelle approche analytique pour l'étude des interactions sol-pesticide à l'échelle moléculaire, la RMN HR-MAS. En effet, des études antérieures réalisées au laboratoire sur des matrices minérales de synthèse et d'autres polluants ont montré le fort potentiel de cette méthode, sans toutefois qu'elle ait pu être validée.

- Réaliser des cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence de matrices solides afin d'évaluer les modifications engendrées par leur présence sur les cinétiques et les voies métaboliques de biodégradation de l'herbicide.

MATERIEL ET METHODES

GENERALITES

I COMPOSES CHIMIQUES

La mésotrione ainsi que ses métabolites décrits dans la littérature (le MNBA et l'AMBA) nous ont été gracieusement fournis par la société Syngenta Crop Protection. La cyclohexane-1,3-dione provient de la société Acros Organics. Le glyphosate, ainsi que l'AMPA, sont commercialisés par Sigma Aldrich. Les réactifs utilisés pour la dérivation de ces deux composés sont le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl) (Avocado), l'acétone de grade HPLC (Avocado) et le tétraborate de sodium (Sigma-Aldrich). Le triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutéré ($TSPd_4$), utilisé comme référence interne pour les analyses RMN, est commercialisé par la société Eurisotop.

II ARGILES ET AUTRES MATRICES SOLIDES

Différentes argiles cationiques ont été testées : trois montmorillonites (KSF, K10, et SWy-2) et une kaolinite. Excepté la montmorillonite SWy-2 qui provient de « Source Clay Repository – The Clay Society Mineralogy » aux Etats-Unis, toutes les argiles cationiques sont commercialisées par Sigma Aldrich. La plupart des sols du monde contiennent de la **kaolinite** dans leur fraction argileuse, cette argile présentant une relative résistance aux agressions chimiques. La kaolinite appartient à la famille des phyllosilicates 1/1, c'est-à-dire qu'elle est constituée de feuillets présentant une couche siloxane tétraédrique (SiO_4) et une couche octaédrique d'hydroxyde d'aluminium (Figure 56).

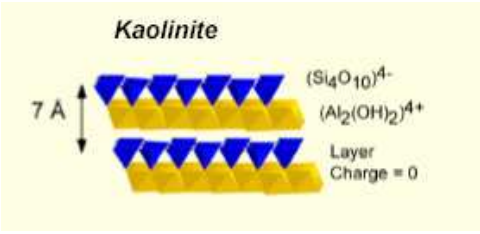


Figure 56 : Structure 1/1 de la kaolinite

L'association de deux feuillets se fait par un réseau de liaisons hydrogène très dense, empêchant les phénomènes d'intercalation. La distance interlamellaire est de 7 Å. La charge

globale de cette argile est neutre. Cependant, les feuillets peuvent posséder une charge électrique négative très faible, due à la substitution de quelques cations Si^{4+} par des cations de charge inférieure comme Al^{3+}.

Les **montmorillonites** sont des argiles de la famille des phyllosilicates 2/1. Les feuillets sont constitués d'un plan d'octaèdres enchâssé entre deux plans de tétraèdres (Figure 57).

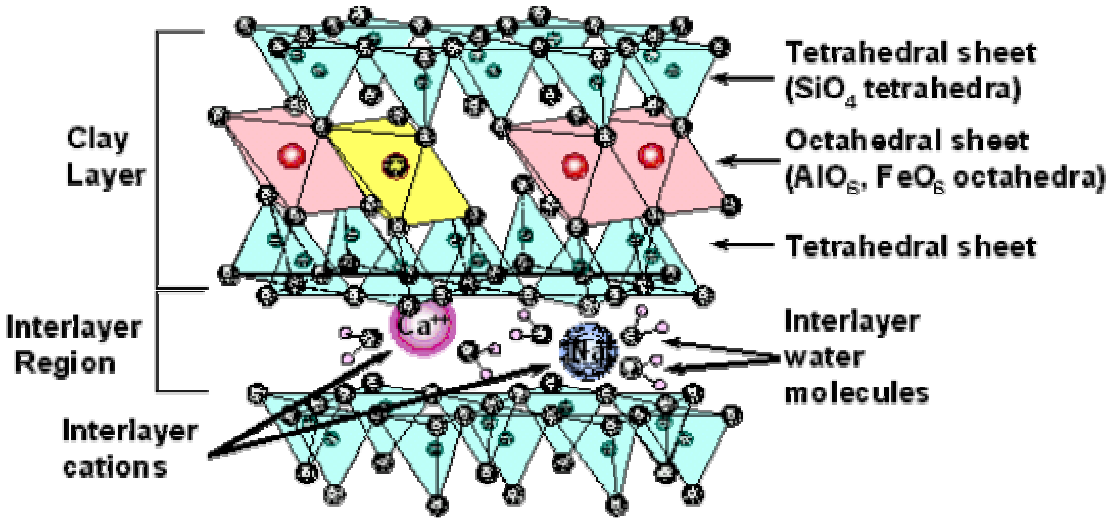


Figure 57 : Structure 2/1 de la montmorillonite (EUBA, European Bentonite Producers Association, http : //www.ima-eu.org/eubaindex.htm)

Les substitutions des cations des feuillets sont nombreuses et variées, notamment des atomes de silicium par des atomes d'aluminium dans les couches de tétraèdres, générant une charge négative dans les feuillets qui va être compensée par la présence de cations hydratés dans l'espace interlamellaire. La densité de charge, ainsi que la nature des cations interfoliaires, vont déterminer les propriétés physico-chimiques de ces minéraux. Ces argiles présentent des propriétés d'expansion du domaine interlamellaire importantes. On parle d'argiles « gonflantes ». Les montmorillonites sont souvent utilisées comme des argiles modèles à cause de leur grande surface spécifique et de leur forte capacité d'échange cationique (CEC), tout autant dans les études d'adsorption qu'en tant que catalyseurs dans des réactions chimiques. Après étude de la littérature, nous avons choisi 3 montmorillonites commerciales : deux très largement utilisées en synthèse organique - la **K10** et la **KSF** - en tant que catalyseurs acides (Li et Li, 1998 ; Rios *et al.*, 2003 ; De Stefanis et Tomlinson, 2006) et une utilisée plus généralement dans des études d'adsorption, la montmorillonite

Wyoming **SWy-2**, qui présente, elle, un caractère basique (Carrizosa *et al*., 2004 ; Kulshrestha *et al*., 2004).

Les argiles anioniques utilisées, de type hydroxydes double lamellaires (HDL) [Mg_2-Al-NO_3], ont été synthétisées au Laboratoire des Matériaux Inorganiques dans l'équipe du Prof. Claude Forano (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand). Les Hydroxydes Double Lamellaires (HDL), dont la structure a été détaillée dans le chapitre 4 de la partie bibliographique, peuvent être présentés comme des « argiles inverses » des argiles cationiques. Les feuillets, formés d'octaèdres $M(OH)_6$ accolés par les arêtes de manière coplanaire, présentent une charge positive du fait de la substitution d'un cation (M) divalent par un cation trivalent. L'électroneutralité de la structure est assurée cette fois-ci, par l'intercalation entre les feuillets d'anions hydratés (CO_3^{2-}, Cl^-, NO_3^- ou SO_4^{2-}). La charge du feuillet, la capacité d'échange anionique (pouvant atteindre 400 meq/100 g d'argile, environ 4 fois supérieure à celle des argiles cationiques), ainsi que la surface disponible par unité de charge sont liées au taux de substitution des cations divalents par des cations trivalents.

Dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du Prof. Juan Cornejo de l'Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia (CSIC, Séville), différents complexes argilo-humiques ont été préparés et des fractions argileuses extraites de sol ont également été purifiées. Toutes ces matrices solides ont été caractérisées par ce groupe. Les quatre fractions argileuses, sont nommées : Askov, Borris, P2 et Kettering. Le protocole d'extraction utilisé est le suivant : le sol est mis au contact d'un mélange acide acétique/acétate (pH = 5) durant 7 jours, puis il est lavé à l'eau distillée pendant 7 jours supplémentaires. Ce traitement est utilisé pour éliminer le carbonate de calcium. La fraction argileuse (< 2 µm) est récupérée par un procédé de séparation par sédimentation (30 jours). Elle est ensuite saturée en ions Ca^{2+} par une solution de $CaCl_2$ puis lavée abondamment à l'eau. La caractérisation de ces fractions argileuses a montré la présence de kaolinite, de montmorillonite, d'illite et de vermiculite dans diverses proportions selon le sol extrait. Les illites et la vermiculite sont des phyllosilicates de la famille des 2/1 de structure très proche de celle des micas, ces derniers possèdent une couche octaédrique gibbsitique (seul de l'aluminium est présent) comprise entre deux couches tétraédriques siliciques où 1/4 du silicium est remplacé par de l'aluminium. La substitution

des ions Si^{4+} par des ions Al^{3+} dans les couches tétraédriques est compensée par l'introduction de deux ions K^{+}, qui servent de tenons entre les feuillets. Dans le cas de l'**illite** (Figure 58A), les ions Al^{3+} de la couche octaédrique sont partiellement substitués par des ions Fe^{2+} ou Mg^{2+}. L'ensemble du feuillet de l'illite n'est donc pas neutre, une charge négative permet la fixation labile de couches de molécules d'eau et d'ions potassium hydratés. Dans le cas de **la vermiculite** (Figure 58B), les taux de substitution sont beaucoup plus importants. En effet, entre 1/3 et 1/2 des ions silicium sont remplacés par des ions Al^{3+} dans la couche tétraédrique, et la couche octaédrique est presque entièrement magnésienne. Le feuillet possède, par conséquent, un déficit de charges positives, qui est compensé par des ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} plus ou moins hydratés situés entre les feuillets sans localisation précise.

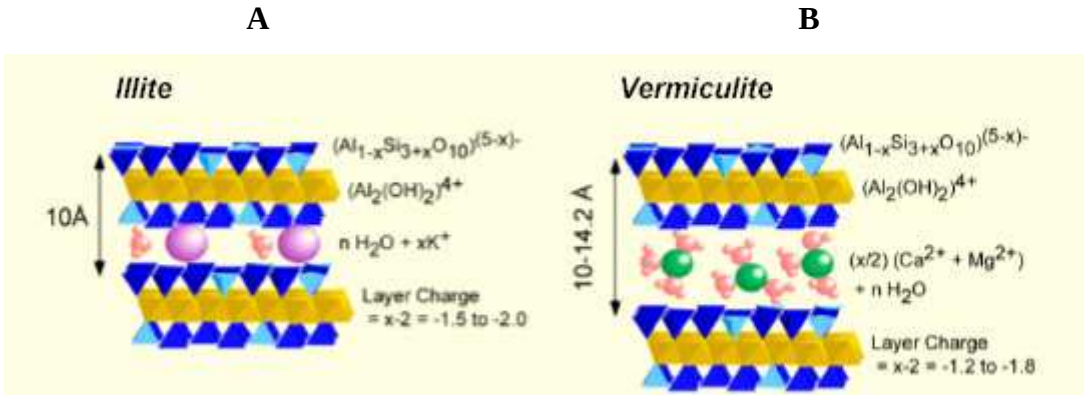


Figure 58 : Structures de l'illite (A) et de la vermiculite (B). Dans ces structures 10 à 20 % des ions Al^{3+} peuvent être substitués par des ions Mg^{2+} ou Fe^{2+} générant ainsi une charge négative

Le sol naturel provient d'un site expérimental de l'INRA situé à proximité de Clermont-Ferrand dans la plaine de la Limagne. Il est issu d'une parcelle non cultivée, n'ayant pas reçu de produits phytosanitaires depuis au moins 30 ans (source INRA). Deux horizons de sol ont été prélevés : 0-5 cm et 10-20 cm. Les échantillons de sol sont séchés à température ambiante jusqu'à poids constant, puis tamisés à 1 mm. Des analyses de ces deux horizons ont montré qu'ils sont très similaires dans leur composition. Ce sol est très riche en fraction argileuse (37 %) et contient 2,46 % de carbone organique (pH voisin dans l'eau de 7,9). Un premier profil qualitatif RMN a été réalisé sur ce sol tamisé à 1 mm mais non traité. Des analyses du solide ont montré la présence d'aluminium et de silicium. Le spectre ^{27}Al MAS (Figure 59a et b) montre deux sites de géométrie caractéristique : un octaédrique (3 ppm) et l'autre tétraédrique (centré sur 60 ppm). Il n'est pas possible de quantifier chacune

des populations d'après de simples expériences 1D. En effet, le moment quadrupolaire de l'aluminium et la constante quadrupolaire résultante perturbent fortement le champ magnétique local perçu par le noyau, donc la constante d'écran nucléaire (déplacement chimique) et l'intensité des signaux. D'autre part, dans le cas de constantes quadrupolaires importantes (quelques kHz à quelques MHz), l'intensité des signaux est modulée par les champs radiofréquences (durée d'impulsions). Il faudrait réaliser des expériences de type MQMAS pour extraire le déplacement chimique isotrope.

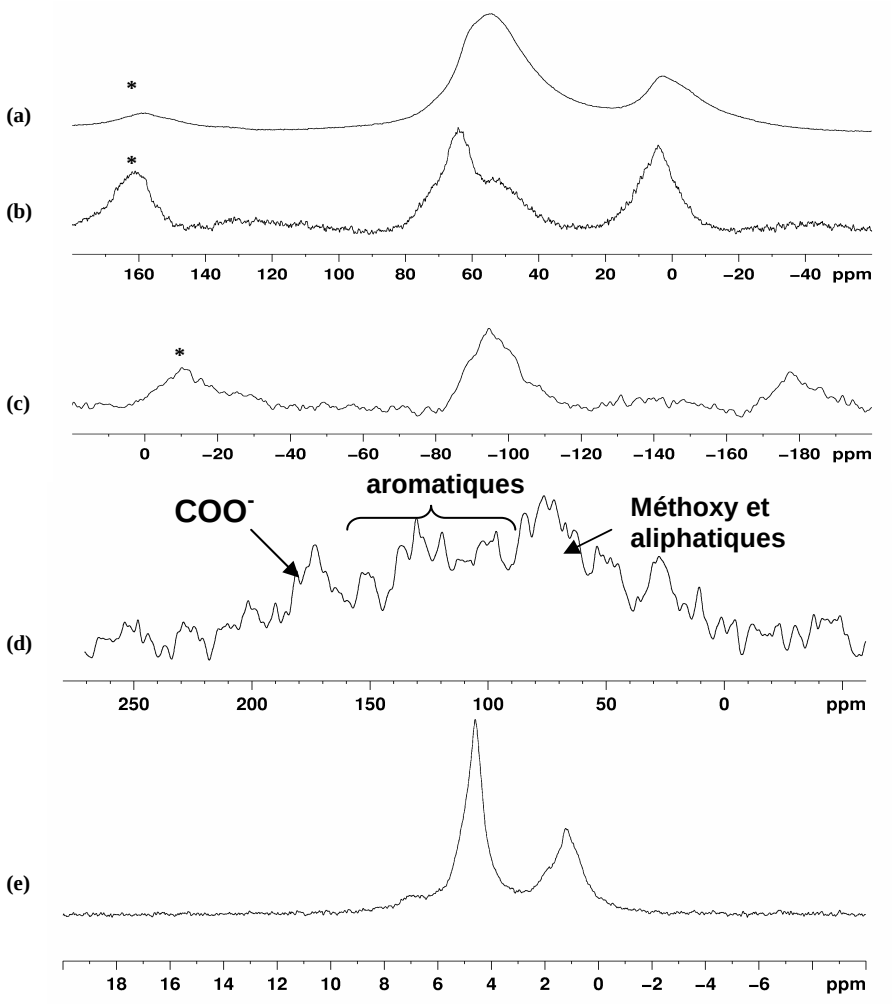


Figure 59 : Spectres de RMN MAS du sol de Limagne. (a) ^{27}Al MAS ν_r = 12 kHz, impulsion rf 1.6 µs. (b) idem, impulsion rf 4,2 µs. (c) ^{29}Si MAS ν_r = 5 kHz. (d) ^{13}C CP-MAS ν_r = 12 kHz. (e) ^{1}H MAS. * bandes de rotation.

Le spectre ^{29}Si MAS (Figure 59c) présente un type de silicium centré vers -96 ppm caractéristique d'aluminosilicates et d'oxydes de silicium. La résonance très large indique une distribution de populations (hétérogénéité) importante de l'échantillon. Il est donc tout à fait compatible avec la présence de quartz, mais surtout d'argiles de type illite (phyllosilicate) riche en potassium ou de kaolinite (phyllosilicate). L'analyse ^{13}C CP-MAS (Figure 59d) de ce

sol ne nous donne que peu d'informations, en raison d'un très faible rapport signal/bruit. Nous pouvons toutefois distinguer les différentes résonances caractéristiques de la matière organique : carboxylates vers 171 ppm, carbones aromatiques des phénols entre 115 et 145 ppm, groupements méthoxy entre 90 et 100 ppm, carbones de type CH-O et CH_2-O entre 50 et 80 ppm. Le spectre ^1H MAS (écho de Hahn) (Figure 59e) confirme la présence de ces différents groupements. Notons que les protons aromatiques (115-145 ppm) sont moins intenses en raison de temps de relaxation plus longs. Il serait intéressant d'analyser ce sol une fois traité par un réducteur, comme le dithionite, afin d'éliminer une partie du fer sous sa forme paramagnétique et ainsi d'améliorer le rapport signal/bruit. Un traitement à l'acide fluorhydrique permettrait comparativement d'éliminer le quartz et une partie de la fraction argileuse. Toutefois, ce traitement peut hydrolyser certaines fonctions chimiques telles que les fonctions amide présentes dans la MO de la plupart des sols. Les analyses X réalisées par dispersion d'énergie à l'aide d'un MEB équipé d'un détecteur EDS montrent la présence d'oxydes de fer et de titane caractéristiques de cendres volcaniques (Figure 60). Des agrégats de différentes argiles sont observés, constitués par ordre décroissant de Si, O, Al, K et/ou Ca. Ces argiles qui forment bien des feuillets pourraient correspondre à des illites ($(K,H_3O)Al_2(Si_3Al)O_{10}(H_2O,OH)_2$) ou à des kaolinites ($Al_2Si_2O_5(OH)_4$). On trouve également quelques « agrégats » d'argiles avec du magnésium, peut-être des montmorillonites.

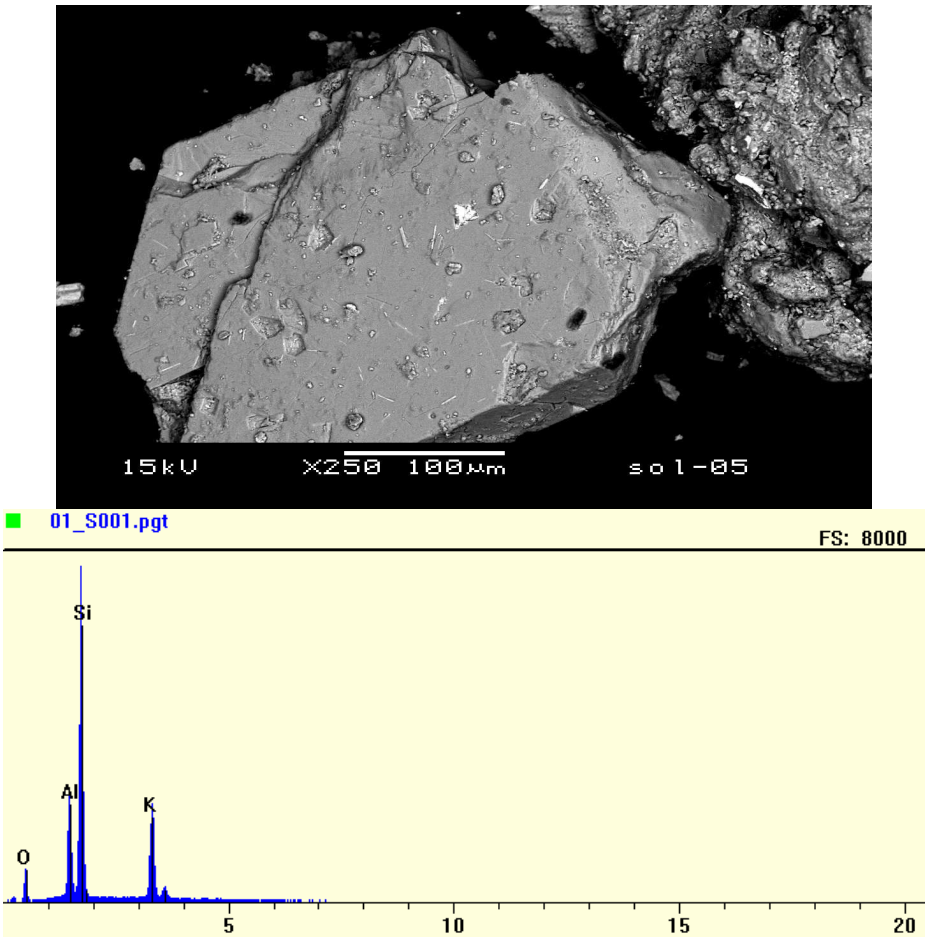


Figure 60 : Cliché MEB obtenu à partir de l'horizon 0-5 cm tamisé à 1 mm et analyse chimique (qualitative) obtenue par une sonde EDS. Le minéral observé pourrait correspondre à une illite (phyllosilicate).

Ces analyses ont été confirmées par des analyses de Diffraction des Rayons X (DRX), réalisées par le Dr Tania Alekseeva, de l'Académie des Sciences de Moscou. Les diffractogrammes des deux horizons ont été effectués, après traitement des échantillons de sol, par de l'eau oxygénée à 10 % pour éliminer la fraction organique, puis saturation de la fraction argileuse par une solution de $MgCl_2$. La fraction argileuse de notre sol est constituée majoritairement de montmorillonite (sous forme Ca dans notre échantillon) avec des traces de kaolinite (Figure 61).

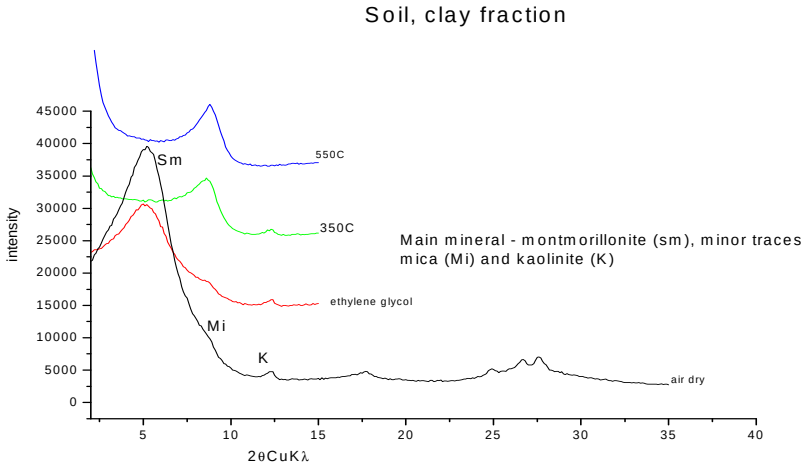


Figure 61 : Diffractogramme RX de la fraction argileuse du sol testé

L'ensemble de ces matrices solides (argiles, sol) a été caractérisé par diffraction des RX et par analyses élémentaires (Fe, Na, C, O, etc…) réalisées par le service central d'analyse du CNRS (Solaize).

III CONDITIONS DE CULTURE ET INCUBATION EN PRESENCE DE XENOBIOTIQUES

III.1 Conditions de culture

Les microorganismes sont aliquotés (3 mL) et conservés à -80°C en présence de 10 % de glycérol (agent cryoprotecteur). Un aliquot est décongelé puis utilisé pour ensemencer 100 mL de milieu de culture (précisé ultérieurement pour chaque souche) dans un erlenmeyer de 500 mL. Cette préculture est agitée à 17 ou 27°C et à 200 rpm. 2 mL de préculture sont ensuite ajoutés à 100 mL d'un milieu de culture dans un erlenmeyer de 500 mL. Cette culture est agitée à 17 ou 27°C et à 200 rpm. La croissance des microorganismes est ensuite arrêtée en fin de phase exponentielle.

III.2 Incubation en présence de xénobiotiques

Les cellules sont centrifugées à 8000 rpm pendant 15 min à 5°C. Le surnageant est éliminé et le culot est soumis à deux lavages successifs, l'un avec une solution de NaCl à 8 ‰ et l'autre avec de l'eau de Volvic. L'eau de Volvic a été choisie pour sa composition physico-chimique et son pH constants. De plus, elle est très peu minéralisée. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans l'eau de Volvic et réparti dans des erlenmeyers de 500 mL en présence d'une solution de xénobiotique, à raison de 5 g de biomasse humide dans 100 mL de solution. Les erlenmeyers sont ensuite placés sur une table d'agitation à 200 rpm et à 17 ou 27°C. Des prélèvements de 1 mL sont effectués régulièrement pour suivre la cinétique de biodégradation. Ils sont centrifugés à 12500 rpm pendant 3 min. Le surnageant est congelé à -20°C jusqu'au moment des analyses HPLC et RMN.

Remarque : Pour chaque expérience, ont été effectués dans les mêmes conditions:

- Des témoins abiotiques (pesticide ou métabolites dans l'eau) pour contrôler la stabilité thermique et chimique de ces composés.
- Des témoins cellules (suspension cellulaire en absence de xénobiotique) afin de suivre la formation de métabolites endogènes (propres aux cellules) pour chaque expérience.

IV TECHNIQUES D'ANALYSE POUR LE CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION ET L'IDENTIFICATION DES METABOLITES

IV.1 Contrôle des cinétiques de biodégradation

IV.1.1 Analyses par RMN ^{1}H

Les spectres ont été enregistrés à 500,13 MHz sur un spectromètre Avance Bruker 500 à 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre. La sonde utilisée est une sonde inverse triple accord ^{1}H-^{13}C-^{15}N équipée d'une bobine de gradients de champs sur l'axe z. La présence importante d'eau dans les échantillons rend l'utilisation d'une séquence (présaturation) éliminant sa résonance obligatoire. Elle utilise deux impulsions de phases opposées d'une durée totale de 3 s.

Remarque : cette technique d'analyse est employée pour contrôler les cinétiques de biodégradation réalisées à partir d'une concentration minimale de 1 mM en xénobiotiques pour des raisons de sensibilité.

IV.1.2 Quantification par RMN ^{1}H

Les échantillons n'ont subi aucun traitement de purification après leur centrifugation. A 540 µL de surnageant sont rajoutés 60 µL d'une solution de $TSPd_4$ (triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutéré) à 5 mM préparée dans D_2O (Figure 62). Le $TSPd_4$ est utilisé comme référence interne. Il sert à la fois à la calibration de l'échelle des déplacements chimiques et à la quantification des produits, ses 9 protons résonnant à 0 ppm sous forme d'un singulet

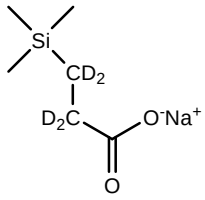


Figure 62 : Structure chimique du $TSPd_4$

Les concentrations en xénobiotique [m] sont proportionnelles à la valeur d'intégration de chaque pic. D'après la formule suivante, en connaissant le nombre de protons correspondant à chaque signal, on peut calculer la concentration [m] du xénobiotique :

$$[m] = \frac{9A_o\,[A_{ref}]}{b\,A_{ref}} \text{ x facteur de dilution du surnageant}$$

- [m] = concentration en xénobiotique m (mM)
- A_o est l'intégrale d'un signal du xénobiotique m
- $[A_{ref}]$ est la concentration du $TSPd_4$ dans le tube RMN (0,5 mM)
- b est le nombre de proton correspondant au signal intégré du xénobiotique m
- A_{ref} est l'intégrale du $TSPd_4$
- Facteur de dilution du surnageant lorsqu'il est ajouté à la solution de $TSPd_4$ pour l'analyse RMN (= 1,1 dans notre cas).

IV.1.3 Analyses par HPLC

Les analyses par HPLC sont réalisées soit :

- sur une chaîne Agilent 1100 munie de deux détecteurs : un détecteur à barrettes de diodes et un détecteur de fluorescence, et pilotée par le logiciel Chemstation.
- soit sur une chaîne Perkin Elmer Série 200 munie d'un détecteur à barrettes de diodes, pilotée par le logiciel Total Chrom Navigator.

Les conditions HPLC (colonne, éluant, etc…) varient suivant le composé et seront précisées ultérieurement.

IV.2 Techniques d'analyse pour l'identification des métabolites

IV.2.1 Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

La chaîne HPLC est un appareil Waters Alliance 2695 muni d'un détecteur à barrettes de diodes, couplé à un spectromètre de masse Waters (Micromass) QTOF, équipé d'une source électrospray (ESI), interface Z-spray. Les analyses ont été faites systématiquement en mode positif et négatif.

Les conditions chromatographiques utilisées seront précisées ultérieurement (utilisation d'un gradient). Après dilution dans un mélange eau - acétonitrile (50-50 en V/V) et séparation en chromatographie liquide, l'échantillon est introduit dans la source *via* un capillaire métallique. Sous l'action du gaz nébuliseur chauffé à 120°C (azote, 50 L/h) et d'un champ électrique appliqué entre le capillaire et une contre électrode (3 kV en mode positif et -2,1 kV en mode négatif), un spray de gouttelettes chargées est formé. Ce dernier perd par la suite les molécules de solvant grâce au gaz de désolvatation (N_2), chauffé à 300°C avec un débit de 500 L/h. Des expériences en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sont aussi réalisées en utilisant l'azote dans la cellule de collision avec un gradient d'énergie de 15 à 45 eV. Une calibration est réalisée avant de débuter les analyses en LC/MS avec de l'acide *ortho*-phosphorique (1 µL/L, 3 µL/min), puis une correction est apportée durant les analyses des échantillons avec de la trityrosine (5 µL/min) (méthode Lock Spray^{TM}).

IV.2.2 Analyses par RMN à deux dimensions

La RMN à deux dimensions sert principalement à la détermination structurale de composés organiques en complément de la spectrométrie de masse. Les principaux noyaux

observés lors des analyses sont le proton, le carbone et l'azote. Tous les spectres 2D sont réalisés sur le même spectromètre Avance Bruker 500 que celui décrit précédemment (sonde inverse triple accord). Les métabolites étant en faible concentration dans les échantillons, une détection en mode inverse avec des gradients de champ pour la sélection des chemins de cohérence est nécessaire pour des éléments tels que le carbone et l'azote (noyaux peu sensibles). Certaines expériences nécessitent une séquence pour éliminer le signal de résonance de l'eau : présaturation ou watergate (Sklenar *et al.*, 1993)

IV.2.3 Analyses par LC- RMN

Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec Isabelle Bourgeois et Armelle Dreau de la société Organon sur un spectromètre Avance Bruker 500 à 25°C avec une sonde munie d'une cellule de 30 µL. Ce spectromètre est couplé à un chromatographe HPLC Agilent 1100 muni d'un détecteur à barrettes de diodes. Les conditions chromatographiques appliquées sont celles utilisées pour les analyses par LC/MS. Seuls les éluants sont remplacés par des solvants deutérés. Toutefois une séquence éliminant la résonance du signal de l'eau et de l'acétonitrile est appliquée (double présaturation). La méthode utilisée pour les analyses est basée sur le principe *« Stop-Flow »* : le composé désiré (piégé selon l'intensité du signal en UV) est stocké dans la cellule de la sonde durant le temps nécessaire à l'acquisition du spectre ^{1}H. Les paramètres d'acquisition du spectre ^{1}H sont rassemblés dans le Tableau 1:

Tableau 1 : Paramètres d'acquisition d'un spectre ^{1}H en LC/RMN

Impulsion ^{1}H de 90°	7,8 µs
Délai de relaxation	2,4 s
Durée d'acquisition	1,64 s
Nombre de points	32768
Nombre de scans	287
Fenêtre spectrale	10000 Hz
Nombre de scans factices	8
Irradiation en continu (présaturations)	2,4 s

V ETUDE DE L'ADSORPTION DES PESTICIDES

V.1 Essais d'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur le matériel

Les solutions d'herbicide et les matrices solides sont mises en contact dans des tubes de centrifugation en polypropylène copolymère (PPCO) lors des essais d'adsorption. Afin de vérifier l'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur ces tubes, 10 mL de deux solutions de mésotrione et de glyphosate (l'une à 0,2 mM, l'autre à 4 mM) ont été placés chacune dans des tubes agités à 50 rpm à température ambiante grâce à un agitateur orbital. Nous avons vérifié l'adsorption des deux polluants sur le PPCO sous la forme d'une cinétique d'adsorption. Des prélèvements réguliers (chaque point de la cinétique correspondant à un tube) sont effectués pendant 5 jours. Ils sont ensuite analysés par HPLC, ainsi que les solutions initialement préparées non mises en contact dans les tubes.

Au cours des expériences d'adsorption, après la mise en contact d'une solution de pesticide et d'une matrice solide, des prélèvements sont effectués, centrifugés puis filtrés sur des filtres à seringue (porosité = 0,45 µm) en polytétrafluoroéthylène (PTFE). Afin de tester l'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur le PTFE, une droite d'étalonnage (0-4 mM) pour chaque pesticide a été réalisée, avec des solutions étalons filtrées et non filtrées. Chaque solution (filtrée et non filtrée) a été analysée par HPLC pour mettre en évidence une possible adsorption sur les filtres.

V.2 Les cinétiques d'adsorption

Les différentes argiles et le sol naturel ont été testés avec chacun des deux herbicides à température ambiante dans des rapports solide/liquide 1/200 et 1/3. A 10 mL d'une solution à 1 mM de pesticide ajustée à pH 7 sont ajoutés 50 mg ou 3,3 g de solide dans un tube à centrifuger en PPCO de 50 mL. Chaque tube constitue un point de la cinétique d'adsorption. Ces tubes sont agités à température ambiante et à 50 rpm grâce à un agitateur orbital. Des prélèvements réguliers (tube) sont effectués pendant cinq jours, centrifugés à 12500 rpm à température ambiante pendant 15 min puis filtrés sur des filtres en PTFE de 0,45 µm de porosité. Le pH des surnageants est mesuré. Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC suivant les conditions indiquées pour chaque herbicide. La concentration en pesticide à l'équilibre (Ce) est ainsi obtenue. La concentration adsorbée (Cad) est déterminée par différence entre la concentration initiale (Ci) et la concentration à l'équilibre (Ce).

V.3 Les isothermes d'adsorption

Trois rapports solide/liquide ont été testés (1/200, 1/10 et 1/3) pour chaque matrice solide et chaque pesticide. Dans un tube à centrifuger de 50 mL sont mis en contact 10 mL d'une solution de pesticide ajustée à pH 7 à différentes concentrations (de 0,2 à 4 mM) avec une certaine masse de solide selon le rapport solide/liquide testé. Les tubes sont agités à 50 rpm sur un agitateur orbital pendant 24 h à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés à 12500 rpm à température ambiante pendant 15 min, puis les surnageants sont filtrés comme précédemment. Le pH des échantillons est mesuré puis les analyses HPLC sont effectuées sur un appareil Agilent 1100. Les isothermes sont représentés selon la méthode directe et les modèles de Freundlich ou de Langmuir. Les relations sont les suivantes :

- Méthode directe : $Cad/m = K \times Ce$
- Modèle de Freundlich : $Cad/m = K_f \times Ce^{1/n}$

La représentation du modèle de Freundlich est réalisée sous la forme : log (Cad/m) = f(log Ce). La pente de la droite obtenue indiquera la valeur de (1/n) et l'ordonnée à l'origine « log K_f ».

- Modèle de Langmuir : $Ce/Cs = (Ce/Cm) + (1/CmL)$

La représentation du modèle de Langmuir est réalisée sous la forme Ce/Cs = f(Ce). La pente de la droite obtenue indiquera la valeur 1/Cm et l'ordonnée à l'origine (1/CmL)

Nomenclature :

- Cad : Concentration de pesticide adsorbée (mM)
- m : masse de solide (g)
- K : constante thermodynamique d'équilibre
- Ce : Concentration de pesticide à l'équilibre (mM)
- K_f et 1/n : constantes de Freundlich caractéristiques de la capacité maximum d'adsorption (mmol/g) et de l'affinité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté donné respectivement.

- Cm et L : constantes de Langmuir caractéristiques de la capacité maximum d'adsorption (mmol/g) (adsorption en monocouche) et de l'énergie d'adsorption (L/mmol) respectivement.

A partir de ces représentations, il est possible de définir le type d'adsorption obtenu et les capacités d'adsorption de chaque matrice solide pour un polluant donné.

V.4 Etude par RMN

V.4.1 RMN ^{1}H HR – MAS

Après avoir mis en contact la matrice solide et une solution de pesticide concentrée dans différents rapports solide/liquide (1/200 à 1/5), la suspension est analysée par RMN ^{1}H HR-MAS. Les solides hydratés sont placés dans un rotor en oxyde de zirconium de 4 mm. Le volume de l'échantillon, délimité par des inserts sphériques en Téflon (PTFE), est de 12 µL. Les spectres ont été réalisés soit sur un spectromètre Avance Bruker 500 MHz équipé d'une sonde double accord ^{1}H-^{13}C munie d'une bobine de gradients de champs positionnée à l'angle magique, soit sur un spectromètre Avance Bruker 300 MHz équipé d'une sonde MAS multinoyaux de 4 mm. Une séquence éliminant le signal de résonance de l'eau a été appliquée (présaturation). La séquence a été synchronisée avec la fréquence de rotation du rotor (5000 Hz). Toutes les analyses ont été réalisées à température ambiante. Les paramètres d'acquisition sont présentés dans le Tableau 2:

Tableau 2 : Paramètres d'acquisition des spectres ^{1}H en HR-MAS

	300 MHz	**500 MHz**
Impulsion ^{1}H de 90°	6,3 µs	6,3 µs
Impulsion de présaturation	3 s	3 s
Délai de relaxation	3 s	3 s
Durée d'acquisition	0,49 s	4,68 s
Nombre de points	5868	65536
Nombre de scans	128	128
Fenêtre spectrale	5995 Hz	7003 Hz
Nombre de scans factices	4	4
Durée de la séquence	21 min	23 min

V.4.2 RMN du solide

Après saturation de certaines matrices solides par une solution concentrée de mésotrione (10 mM) ou de glyphosate (7,5 mM), les solides sont séchés à l'étuve à 50°C pendant une nuit et analysés par RMN ^{1}H MAS ou par CP-MAS sur un spectromètre Avance Bruker 300 MHz équipé d'une sonde MAS multinoyaux 4 mm. Le même traitement a été utilisé pour l'analyse des points des isothermes (échantillons solides).

Le solide est alors placé dans un rotor en oxyde de zirconium de 4 mm. L'utilisation d'inserts sphériques en Téflon, en réduisant le volume de l'échantillon, permet d'accroître l'homogénéité des champs magnétiques locaux (champ statique et impulsions radiofréquence) au niveau de l'échantillon.

RMN CPMAS ^{13}C. La séquence utilisée pour enregistrer les spectres ^{13}C est une séquence de polarisation croisée avec une vitesse de rotation de 12 kHz. Une rampe d'impulsions a été utilisée pour optimiser les conditions de Hartmann-Hahn, avec un temps de contact de 2 ms. Un découplage ^{1}H de type TPPM 15 (Bennett *et al.*, 1995) de 85 kHz a été utilisé pendant la durée d'acquisition (60 ms) pour supprimer les interactions dipolaires hétéronucléaires résiduelles et ainsi augmenter la résolution. Un délai de relaxation de 4 s a

été employé. 4000 à 8000 scans ont été utilisés selon les échantillons, afin d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant.

Spectres ^{1}H MAS et Echo de Hahn. Les spectres ^{1}H MAS ont été enregistrés après 64 scans au moyen d'une impulsion simple de 3,6 µs, sans rotation ou à 12 kHz. Des spectres ^{1}H ont également été enregistrés après 256 scans au moyen d'une séquence d'écho de Hahn de type 90° - tau – 180° - tau à 12 kHz. La séquence est synchronisée sur la vitesse de rotation du rotor. La valeur de tau est optimisée de façon à compenser les temps morts de l'électronique.

ETUDE DE LA MESOTRIONE

I CRIBLAGE DE SOUCHES MICROBIENNES

Les microorganismes testés ont été cultivés sur milieu nutritif spécifique (100 mL) dans des erlenmeyers de 500 mL à 17 ou 27°C suivant la source du microorganisme, sous une agitation de 200 tours/min. Tous les milieux d'ensemencement ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min sous une pression additionnelle de 1 bar. L'ensemencement s'effectue sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une pré-culture cultivée dans les mêmes conditions. Les conditions précises de culture pour chaque microorganisme sont données dans les Tableau 3, Tableau 4 etTableau 5:

Tableau 3 : Souches bactériennes testées

	CULTURE				CULTURE		
SOUCHES	**T(°C)**	**Milieu**	**Temps**	**SOUCHES**	**T(°C)**	**Milieu**	**Temps**
Actinobacterium sp. 12B4	27	TS	3j	*Nocardioides* sp. SP12	27	TS	24h
Agrobacterium tumefaciens IB85	27	TS	24h	*Paenibacillus* sp. 7B6	17	R2A	3j
Agrococcus sp. 7B2	27	E	5j	*Paenibacillus* sp. P	17	R2A	3j
Agromyces sp. R	17	R2A	3j	*Pantoea* sp. 12B5	27	TS	24h
Arthrobacter bergeri 5B11	27	TS	24h	*Pedobacter* sp. 6B2	27	R2A	48h
Arthrobacter rhombi 3B7	27	TS	24h	*Pseudomonas fluorescens* ATCC12842	27	TS	24h
Arthrobacter sp. 2B16	27	TS	24h	*Pseudomonas graminis* 6B4	27	TS	24h
Arthrobacter sp. 7B9	27	TS	24h	*Pseudomonas graminis* 13B3	17	TS	3j
Arthrobacter sp. N4	27	TS	24h	*Pseudomonas pseudoalcaligenes* IB78	27	TS	24h
Arthrobacter sp. SR30	27	TS	24h	*Pseudomonas* sp. 2B15	27	TS	24h
Bacilliales bacterium 12B7	27	R2A	3j	*Pseudomonas* sp. 14B2	27	TS	24h
Bacillus amyloliquefaciens CIP103265	27	TS	24h	*Pseudomonas* sp. 14B10	27	TS	24h
Bacillus cereus 2B9	27	TS	24h	*Pseudomonas* sp. ADP	27	TS	14h
Bacillus cereus ATCC14579	27	TS	24h	*Pseudomonas syringae* 3B1	27	TS	24h
Bacillus licheniformis ATCC21733	27	TS	24h	*Pseudomonas syringae* 12B8	27	TS	24h
Bacillus megaterium DSM32	27	TS	24h	*Pseudomonas syringae* 13B2	17	TS	48h
Bacillus pumillus 5B1	17, 27	TS	24h	*Pseudomonas viridiflava* 14B14	17	TS	24h
Bacillus sp. 2B5	17, 27	TS	24h	*Rhodococcus erythropolis* BTS1	27	TS	24h
Bacillus sp. 3B6	17, 27	TS	24h	*Rhodococcus rhodochrous* OBT18	27	TS	24h
Bacillus sp. 5B2	27	TS	24h	*Rhodococcus rhodochrous* ATCC29692	27	TS	24h
Bacillus sp. 7B11	27	TS	24h	*Saccharothrix* sp. 6B3	27	E	5j

Bacillus sp. 16B1	27	TS	24h	*Sphinghomonas* sp. 3B10	27	TS	24h
Bacillus sphaericus ATCC10208	27	TS	24h	*Sphinghomonas* sp. 7B13	17	TS	24h
Bacillus subtilis ATCC6633	27	TS	24h	*Sphinghomonas* sp. 7B15	17	R2A	48h
Bacillus subtilis D	17	TS	24h	*Sphinghomonas* sp. 14B5	27	TS	24h
Bacillus subtilis var. niger IFO3108	27	TS	24h	*Sphinghomonas* sp. 14B6	17	R2A	48h
Bacterium CAGY3 2B22	27	TS	24h	*Sphingobacterium* sp. 14B8	17	R2A	48h
Brevundimonas sp. C	17	E	3j	*Staphylococcus arlettae* 5B8	27	TS	24h
Cellulomonas sp. 3B8	27	TS	24h	*Staphylococcus epidermitis* 3B15	17	TS	48h
Chelatobacter sp. SR45	27	TS	24h	*Staphylococcus equorum* 5B16	27	TS	48h
Chelatobacter sp. SR46	27	TS	24h	*Staphylococcus* sp. 3B16	27	TS	48h
Chelatococcus sp. A	17	R2A	3j	*Staphylococcus* sp. 3B17	27	TS	48h
Clavibacter michiganensis 2B14	27	TS	48h	*Staphylococcus* sp. 5B3	17	TS	48h
Curtobacterium flaccumfaciens 13B4	17	TS	48h	*Staphylococcus* sp. 5B6	27	TS	24h
Cytophaga sp. 2B1	17	TS	24h	*Staphylococcus* sp. 6B1	27	TS	48h
Enhydrobacter aerosaccus I	17	R2A	3j	*Stenotrophomonas maltophilia* IB93	27	TS	24h
Flavobacterium sp. 2B4	27	TS	24h	*Streptomyces* sp. 1S1	27	E	60h
Flavobacterium sp. 14B7	17	R2A	3j	*Streptomyces* sp. 1S2	27	E	60h
Frigoribacterium sp. 14B13	17	TS	24h	*Streptomyces* sp. 2S11	27	E	90h
Hydrogenophaga sp. H	17	R2A	3j	*Streptomyces* sp. 5S4	27	E	60h
Intrasporangiaceae 3B4	27	TS	48h	*Streptomyces* sp. 5S9	27	E	60h
Janthinobacterium sp. 2B18	17	TS	24h	*Streptomyces* sp. 7S1	27	E	60h
Kocuria sp. 7B12	27	E	48h	*Streptomyces* sp. 12S7	27	E	60h
Kocuria sp. 2B13a	27	TS	24h	*Streptomyces* sp. 12S10	27	E	60h
Leucobacter sp. 3B20	17	TS	5j	*Streptomyces* sp. 14S9	27	E	60h
Manganese oxidizing bact. 7B14	18	TS	4j	*Streptomyces* sp. 14S12	27	E	60h
Methylobacterium sp. 7B5	17	R2A	12j	*Streptomyces* sp. 21S1	27	E	60h
Microbacterium phyllo. 2B3	17	TS	24h	*Zoogloea* sp. 3B12	27	TS	48h
Micrococcus luteus 3B2	27	TS	24h				
Micrococcus sp. 2B2	27	TS	24h	**SOUCHES NON IDENTIFIEES**			
Micrococcus sp. 7B4	27	TS	24h	3B3	27	TS	24h
Micrococcus sp. 12B6	27	TS	24h	3B9	27	TS	24h
Micromonospora sp. E	17	E	3j	3B13	27	E	60h
Mycobacterium aurum MO1	27	TS	24h	3B14	17	TS	48h
Mycobacterium chlorophenolicum RP1	27	TS	24h	5B5	27	TS	24h
Nocardioides sp. 7B7	27	R2A	4j	N	17	R2A	4j

<u>Remarque</u> : Les souches suivies d'un code Chiffre-B-chiffre ont été isolées de l'eau de nuages collectée au sommet du Puy de Dôme. Les souches suivies d'une lettre de A à N ont été isolées à partir de neige prélevée au Spitzberg.

Tableau 4 : Souches de levure testées

	PRE-CULTURE / CULTURE		
SOUCHES	**T (°C)**	**Milieu**	**Temps**
Aureobasidium sp. J	17	E	3j
Cryptococcus albidus 14B3a	17	E	3j
Cryptococcus laurentii 14B3b	17	E	48h
Phaecoccomyces nigricans M	17	E	3j
Pseudozyma sp. 14B11	27	R2A	48h
Saccharomyces cerevisiae NRRL Y977	27	TS	24h
SOUCHES NON IDENTIFIEES			
Levure 5B13	17	E	5j
Levure 12B1	17	E	48h
Levure 12B9	17	E	48h
Levure 12B11	17	E	48h
Levure 12B12	17	E	48h
Levure 13B1	17	E	24h
Levure 14B1	17	E	24h
Levure 14B4	17	E	6j
Levure C’	17	E	3j
Levure G	17	E	3j

Tableau 5 : Souches fongiques testées

	PRE CULTURE			CULTURE		
SOUCHES	**T(°C)**	**Milieu**	**Temps**	**T(°C)**	**Milieu**	**Temps**
Aspergillus caepitosus	27	1	24h	27	1	24h
Aspergillus fumigatus	27	1	24h	27	1	24h
*Aspergillus niger*ATCC9142	27	1	24h	27	1	24h
Beauveria bassiana ATCC7159	27	2	48h	27	3	24h
Penicillium camemberti	27	1	48h	27	1	60h
Penicillium corylophylum 24a	27	1	48h	27	1	60h
Penicillium corylophylum 24_2	27	1	48h	27	1	40h
Penicillium corylophylum Dierckx	27	1	24h	27	1	24h
Penicillium expansum	27	1	24h	27	1	40h
Penicillium fellutanum	27	1	24h	27	1	20h
Penicillium vermiculatum	27	1	24h	27	1	24h
Penicillium verrucosum	27	1	24h	27	1	40h

La composition des milieux de culture TS, R2A, E (Emerson), 1, 2 et 3 est la suivante pour 1 L d'eau distillée :

- Milieu TS (Trypcase-Soja, bioMérieux) : Bio-Trypcase 17 g ; Bio-Soyase 3 g ; NaCl 5 g ; K_2HPO_4 2,5 g et KH_2PO_4 2,5 g
- Milieu R2A : Extrait de levure (Difco) 0,5 g ; protéose peptone n°3 (Difco) 0,5 g ; casaminoacides (Difco) 0,5 g ; glucose 0,5 g ; amidon soluble (Difco) 0,5 g ; pyruvate de sodium 0,3 g ; K_2HPO_4 0,3 g et $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g.
- Milieu Emerson : Amidon soluble (Difco) 15 g ; extrait de levure (Difco) 2,5 g ; K_2HPO_4 1 g et $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g.
- Milieu 1 : Extrait de levure (Difco) 5 g ; soyoptim (Roquette) 5 g ; glucose 20 g; NaCl 5 g et K_2HPO_4 5 g.
- Milieu 2 : Corn steep atomisé (Roquette) 12 g et glucose 10 g. Le pH est ajusté à 5,0 par addition de NaOH.
- Milieu 3 : Tryptone (Difco) 10 g ; glucose 30 g ; K_2HPO_4 1 g ; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g ; $MgSO_4.7H_2O$ 0,5 g ; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,3 g et KCl 0,5 g.

Après culture et préparation des cellules selon les conditions précédemment décrites (page 124), l'incubation en présence de xénobiotique se fait à raison de 5 g de biomasse humide pour 100 mL d'une solution de mésotrione à 0,1 mM préalablement préparée dans l'eau de Volvic (pH = 7).

II INCUBATION DE LA MESOTRIONE ET DE SES METABOLITES AVEC LA SOUCHE *BACILLUS* SP. 3B6

La souche *Bacillus* sp. 3B6 est cultivée sur le milieu TS (pré-culture et culture : 24h).

II.1 En conditions aérobies

L'incubation en présence de mésotrione ou de ses métabolites potentiels a été réalisée en regroupant 6 erlenmeyers de 100 mL de culture préparés suivant la méthode générale décrite précédemment avec une incubation à 27°C (page 124). La quantité de protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) à partir de trois prélèvements (3 mesures

différentes) de 2 mL de suspensions cellulaires qui ont été dilués de 5 à 40 fois. Ces mesures ont permis de déterminer une quantité de protéines de 270 µg/mL. Le culot de cellules correspondant à ces 600 mL de culture est repris, après lavages successifs avec une solution de NaCl à 8 ‰ puis avec de l'eau de Volvic, dans 100 mL de solution de mésotrione à différentes concentrations: 0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM. Des prélèvements de 3 mL sont effectués régulièrement sur les 5 jours d'incubation pour permettre toutes les analyses RMN, HPLC et LC/MS nécessaires au suivi cinétique ainsi qu'à l'identification des métabolites formés.

II.2 Dans différents tampons

Un essai a été réalisé afin d'étudier l'influence du pH sur les produits de dégradation de la mésotrione. Aucune modification n'a été apportée à la pré-culture, ni à la culture de la souche de *Bacillus* sp. 3B6. Après lavages, le culot de cellules a été repris dans 100 mL soit dans un tampon phosphate 100 mM pH 7 (30,5 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 0,2 M + 19,5 mL d'une solution de NaH_2PO_4 à 0,2 M complétée à 100 mL par de l'eau distillée), soit dans un tampon borate 25 mM pH 9,2 (9,53 g de $Na_2B_40_7.10H_20$ dans 1 L d'eau distillée). La concentration en mésotrione est de 1 mM et le pH de la solution de mésotrione a été ajusté à 7 et 9,2 respectivement. Un témoin cellules seules a été réalisé dans chaque tampon.

II.3 En conditions anaérobies

Dans le but de connaître l'importance de la présence d'oxygène sur la formation des métabolites, deux essais ont été réalisés sous atmosphère d'argon. Les conditions de pré-culture et de culture de la souche n'ont pas été modifiées. Après les différents lavages, la suspension cellulaire, ainsi que la solution de mésotrione, sont dégazées séparément sous vide d'abord, puis sous flux d'argon (3 fois 15 min) avant d'être mises en contact. L'incubation est réalisée dans des flacons de 250 mL fermés hermétiquement par un septum sur lequel est placé un ballon contenant de l'argon. La concentration en xénobiotique s'élève à 1 mM. Tous les prélèvements ont été effectués au cours de la cinétique sous courant d'argon afin de limiter l'entrée d'oxygène dans le milieu. Un témoin cellules seules a été réalisé dans les mêmes conditions, ainsi qu'un témoin cellules seules en aérobiose pour pouvoir comparer les résultats avec une même culture.

II.4 En présence de matrices solides

Les matrices testées sont trois argiles cationiques commerciales : deux montmorillonites (KSF et K10) et une kaolinite, ainsi que deux horizons d'un sol prélevé à proximité de Clermont-Ferrand (page 117). Deux rapports solide/liquide : 1/10 et 1/3 ont été expérimentés pour chaque argile et un seul (rapport 1/10) pour le sol. Le protocole expérimental effectué en erlenmeyers se déroule en 2 étapes :

- **Etape de pré-incubation** : Il s'agit d'une mise en contact de la matrice testée (10 ou 33 g selon le rapport testé) et de la solution de mésotrione à 1 mM (50 mL) pendant 24 h dans des erlenmeyers de 500 mL pour permettre d'atteindre l'équilibre d'adsorption de la mésotrione sur la matrice. Un prélèvement est réalisé immédiatement après la mise en contact et juste avant d'ajouter la suspension bactérienne.

- **Etape d'incubation** : La suspension bactérienne est ajoutée au milieu pour suivre alors la biodégradation

Le culot bactérien, obtenu comme décrit précédemment, est remis en suspension dans 45 mL d'eau de Volvic. 5 mL d'une solution de mésotrione à 10 mM sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale de 1 mM. Après addition de la suspension bactérienne, les erlenmeyers sont replacés sous agitation à 27°C et 200 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 mL sont effectués pendant 5 jours. Ils sont centrifugés à 12500 rpm pendant 3 min, puis les surnageants sont congelés à – 20° C jusqu'au moment des analyses RMN et HPLC. En plus d'un témoin cellules dans l'eau de Volvic, des témoins cellules en présence de la matrice dans l'eau de Volvic ont été réalisés dans les mêmes conditions.

III CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE

III.1 Analyses par HPLC

Elles ont été effectuées soit sur une colonne phase inverse Nucléodur 5 µm (C18 150 x 4,6 mm) en mode isocratique (analyses LC-UV), soit sur une colonne phase inverse Hypersil ODS 5 µM (C18 100 x 2,1 mm) en mode gradient (analyses LC/MS ou LC/RMN) en utilisant les conditions d'analyse suivantes (Tableau 6).

Tableau 6 : Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par HPLC

	Mode isocratique	**Mode gradient**
Eluant A/B (V/V)	A = H_2O + 0,01 % H_3PO_4 (pH = 2,9) B = Acétonitrile A/B = 80/20 A/B = 70/30 (criblage)	A = H_20 + 0,01 % HCOOH (pH = 2,6) B = Acétonitrile 0-5 min : 95 % A 5-30 min : 95-5 % A (linéaire) 30-34 min : 5 % A 34-35 min : 5-95 % A 35-40 min : 95 % A
Débit	1 mL/min	0,3 mL/min
Température de la colonne	22 °C	22 °C
Longueur d'onde	λ = 254 nm	λ = 254 nm Acquisition spectrale (220 à 600 nm)
Temps de rétention	Mésotrione : 52 min (12 min criblage) AMBA : 5,5 min (3 min criblage) MNBA : 2 min (1,5 min criblage)	Mésotrione : 17 min AMBA : 10,5 min MNBA : 1,5 min

Les échantillons analysés sur la colonne Hypersil en mode gradient ont été dilués par 3 avec un mélange eau/acétonitrile (50/50) pour une concentration initiale en mésotrione de 1 mM et par 20 pour une concentration de 5 mM.

III.2 Analyses par RMN du ^1H

Les spectres ^1H sont enregistrés selon le protocole général décrit précédemment. La préparation de l'échantillon a été légèrement modifiée : 140 µL de D_2O sont ajoutés à 400 µL de l'échantillon, puis la solution est complétée à 600 µL par une solution de $TSPd_4$ à 5 mM préalablement préparée dans D_2O. La plus grande proportion de D_2O, même si elle dilue l'échantillon, permet de minimiser la contribution de l'eau légère et ainsi d'accroître la résolution. Le facteur de dilution du surnageant appliqué lors des calculs de concentration du xénobiotique est alors de 1,5. Le Tableau 7 donne les paramètres d'acquisition des spectres ^1H :

Tableau 7 : Paramètres d'acquisition des spectres ^{1}H pour les cinétiques de biodégradation de la mésotrione

Impulsion ^{1}H de 90°	7,3 µs
Impulsion de saturation (irradiation en continu)	3 s
Délai de relaxation	3 s
Durée d'acquisition	4,67 s
Nombre de points	65536
Nombre de scans	256
Fenêtre spectrale	7003 Hz
Nombre de scans factices	4
Durée de l'analyse	46 min

IV ANALYSES PAR RMN 2D POUR L'IDENTIFICATION DES METABOLITES FORMES LORS DE LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE

IV.1 Expérience TOCSY ^{1}H-^{1}H (TOtal Correlation SpectroscopY)

Cette séquence 2D homonucléaire permet de corréler les signaux de protons couplés scalairement ($^{n}J^{1}_{H-}{}^{1}_{H}$ avec $n \geq 3$) et de définir les différents ^{1}H d'un même système de spins. La séquence choisie pour le spin – lock est mlev17. L'avantage de cette expérience par rapport à la COSY (Correlation SpectroscopY) est qu'elle permet d'observer les couplages protons longue distance. Une séquence pour éliminer le signal de résonance de l'eau (Watergate) a été introduite à la fin de la TOCSY. Le Tableau 8 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une TOCSY :

Tableau 8 : Paramètres d'acquisition d'une TOCSY

Nombre de scans	16
Nombre d'expériences TD1	256
TD 2	1024
Durée d'acquisition	102 ms
Pulse ^{1}H de 90°C	7,3 µS
Durée du spin-lock (MLEV-17)	90 ms
Fenêtres spectrales	F1 = F2 = 5000 Hz (10 ppm)

IV.2 Expérience HSQC ^{1}H–^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Dans une HSQC, un double INEPT permet de visualiser les constantes de couplage $^{1}J_{(^{1}H-^{13}C)}$. La connaissance *a priori* de l'ordre de grandeur de cette constante est nécessaire :

$$d = [4 \times {}^{1}J_{(^{1}H-^{13}C)}]^{-1}$$

Cette constante de couplage est de l'ordre de 135 et 160 Hz pour des carbones aliphatiques et aromatiques respectivement. Les paramètres d'acquisition utilisés pour réaliser la séquence HSQC sont présentés dans le Tableau 9 :

Tableau 9 : Paramètres d'acquisition HSQC ^{1}H-^{13}C

Nombre de scans	80
Nombre d'expériences	192
TD 2	1024
Durée d'acquisition	73 ms
Fenêtres spectrales	F1 = 27669 Hz (220 ppm) F2 = 7003 Hz (14 ppm)

IV.3 Expérience HMQC ^{1}H-^{13}C (Heteronuclear Multi-Quantum Correlation)

L'objectif de cette séquence est identique à celui de la séquence HSQC (fournir des corrélations ^{1}H-^{13}C). Elle est toutefois moins sensible mais plus robuste. La séquence a été optimisée pour différentes constantes de couplage $^{1}J_{^{1}H-^{13}C}$ allant de 135 à 180 Hz. Les paramètres d'acquisition sont rassemblés dans le Tableau 10 :

Tableau 10 : Paramètres d'acquisition HMQC ^{1}H-^{13}C

Nombre de scans	72
Nombre d'expériences	224
TD 2	2048
Durée d'acquisition	146 ms
Fenêtres spectrales	F1 = 27669 Hz (220 ppm) F2 = 7003 Hz (14 ppm)

IV.4 Expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

L'objectif de cette séquence est d'établir des corrélations hétéronucléaires *via* la détection inverse pour des couplages à plusieurs liaisons ($^{n}J_{HX}$) tout en évitant celles à une liaison ($^{1}J_{HX}$). Afin d'éliminer les constantes $^{1}J_{HX}$, un filtre « low-pass » est placé en début de séquence incluant un délai réglé dans les paramètres de la séquence correspondant à :

$$d = (2 \times {}^{1}J_{HX})^{-1}$$

Ce délai est modifié selon ce que l'on souhaite étudier : structures aliphatiques, aromatiques ou éthyléniques. Il est appliqué lors de l'évolution des systèmes de spins avant la première impulsion à 90° appliquée pour le noyau X. Après impulsion, les systèmes de spins évoluent selon :

$$d = [2 \times ({}^{n}J_{HX})]^{-1} \qquad (50 \leq d \leq 150 \text{ ms})$$

Ce délai conduit au couplage à longue distance. Une élimination du signal de l'eau (présaturation) est également appliquée en début de séquence. Cette expérience a été réalisée avec comme hétéronoyau le carbone ou l'azote. Les constantes de couplage $^{n}J^{1}_{H-}{}^{13}_{C}$ (n = 2 et

3) sont de l'ordre de la dizaine de Hertz. L'azote 15 est un noyau très peu sensible et ses constantes de couplage à longue distance sont mal connues. Le Tableau 11 indique les paramètres d'acquisition pour les HMBC ^{1}H-^{13}C et ^{1}H-^{15}N :

Tableau 11 : Paramètres d'acquisition des HMBC ^{1}H – ^{13}C, ^{15}N

	HMBC ^{1}H – ^{13}C	**HMBC ^{1}H – ^{15}N**
Nombre de scans	80	400
Nombre d'expériences	224	200
TD 2	1024	1024
Durée d'acquisition	103 ms	73 ms
d_6	65 ms	80 ms
Fenêtres spectrales	F1 = 28928 Hz (230 ppm) F2 = 7003 Hz (14 ppm)	F1 = 30000 Hz (600 ppm) F2 = 7003 Hz (14 ppm)

V SYNTHESE DU BENZOISOXAZOLE

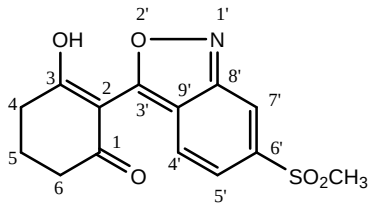


Figure 63 : Structure chimique du benzoisoxazole

Ce dérivé isoxazole, 2-(6'-méthylsulfonylbenzo[c]isoxazol-3'-yl)-3-hydroxycyclohex-2-èn-6-one (Figure 63), a été synthétisé par réduction de Clemensen selon la méthode décrite par Bellamy et Ou (1984). A une solution de 500 mg de mésotrione (1,5 mmol) dans 20 mL d'éthanol absolu, agitée sous argon est ajouté 1,7 g de $SnCl_2.2H_2O$ anhydre (7,5 mmol). Le mélange est chauffé à 70°C pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, le contenu du ballon est versé dans un bain de glace. Le pH du mélange est ajusté à 7 – 8 par addition de soude avant d'être extrait par l'acétate d'éthyle. Un précipité jaune, très important, se forme. Il est filtré sur verre fritté et récupéré. Après séchage dans un dessicateur chauffant, le composé jaune est récupéré avec un rendement de 80 %.

- MS (ESI+) : 308 ($[M+H]^+$), 291, 252, 229, 201, 190.

- RMN ^{1}H : (500,13 MHz, H_2O :D_2O 90 :10, pH = 8) δppm : 2,13 (2H, qt, H_5) ; 2,61 (2H, t, H_6) ; 3,28 (2H, t, H_4) ; 3,39 (3H, s, CH_3) ; 8,02 (1H, dd, 1,5Hz, 8,5Hz, $H_{5'}$) ; 8,56 (1H, d, 8,5Hz, $H_{4'}$) ; 8,85 (1H, d, 1,5Hz, $H_{7'}$).

- RMN ^{13}C (125,7 MHz, H_2O :D_2O 90 :10, pH = 8) δppm : 22,8 (C_5) ; 28,8 (C_4); 41 (C_6); 46 (CH_3); 115,9 (C_2); 120,4 ($C_{7'}$); 125,2 ($C_{5'}$); 131 ($C_{4'}$) ; 133,4 ($C_{9'}$); 143,8 ($C_{8'}$) ; 145 ($C_{6'}$); 161,6 (C_3) ; 175,2 ($C_{3'}$) ; 202,7 (C_1).

VI ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR LES MATRICES SOLIDES

Le protocole expérimental utilisé est celui décrit précédemment page 129. Les analyses sont réalisées sur une chaîne HPLC Agilent 1100. Les échantillons sont analysés sur une colonne phase inverse Zorbax Eclipse XDB 5µm (C18 150 x 4,6 mm) en mode isocratique (comme pour le criblage) avec une phase éluante A (H_2O + 0,01% H_3PO_4)/Acétonitrile = 70/30 (V/V). Le temps de rétention de la mésotrione est alors de 12 min.

ETUDE DU GLYPHOSATE

I LES SOUCHES *FUSARIUM SOLANI* PB1 ET *TRAMETES VERSICOLOR* T2

Deux souches de fongiques, *Fusarium solani* PB1 et *Trametes versicolor* T2, fournies par le Dr. C. Mougin (INRA Versailles Grignon), sont mises en pré-culture, puis en culture pendant 72 h sur trois milieux différents : Tartrate, Malt et Peptone. Pour 1 L d'eau distillée, la composition est la suivante :

- Milieu Tartrate : Extrait de levure (Difco) 1 g ; tartrate di-Na 2,3 g ; tartrate di-NH_4 1,8 g ; glucose 5 g ; Tryptone (Difco) 2 g ; KH_2PO_4 2 g ; $CaCl_2$. $2H_2O$ 0,14 g ; $MgSO_4.7H_2O$ 0,7 g ; $FeSO_4.7H_2O$ 0,07 g ; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,046 g ; $MnSO_4.H_2O$ 0,035 g et $CuSO_4.5H_2O$ 0,007 g.
- Milieu Malt : Extrait de Malt (Difco) 20 g ; glucose 20 g et biopolytone (bioMérieux) 2 g.
- Milieu Peptone : Tryptone (Difco) 20 g ; K_2HPO_4 1 g ; glucose 30 g ; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g ; $MgSO_4$ 0,5 g ; $ZnSO_4$ 0,3 g et KCl 0,5 g.

II INCUBATION DES SOUCHES *FUSARIUM SOLANI* PB1 ET *TRAMETES VERSICOLOR* T2 AVEC LE GLYPHOSATE

Après 72 h de culture, les cellules ont été filtrées sous vide sur verre fritté dans des conditions stériles. Deux lavages successifs avec une solution de NaCl à 8 ‰, préalablement stérilisée, ont été effectués. Pour les cultures sur milieux Malt et Peptone, les cellules sont réparties dans des erlenmeyers de 500 mL stériles, à raison de 5 g de biomasse humide pour 100 mL d'une solution de glyphosate à 0,8 mM. Pour les cultures sur milieu Tartrate, les cellules sont réparties dans des erlenmeyers de 250 mL stériles, à raison de 5 g de biomasse humide pour 30 mL de solution de glyphosate 3 mM préparée préalablement dans une solution de sels et d'oligoéléments ($CaCl_2.2H_2O$ 0,14 g ; $MgSO_4.7H_2O$ 0,7 g ; $FeSO_4.7H_2O$ 0,07 g ; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,046 g ; $MnSO_4.H_2O$ 0,035 g ; $CuSO_4.5H_2O$ 0,007 g q.s.p. 1L eau distillée). Les erlenmeyers sont ensuite agités à 200 rpm et à 27°C. Des prélèvements de 2 mL

en conditions stériles sont effectués pendant 15 jours, centrifugés à 12500 rpm pendant 3 min puis congelés à -20 °C jusqu'au moment des analyses RMN et HPLC.

III CONTROLE DES CINETIQUES DE BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE

III.1 Analyses par HPLC

Le glyphosate, comme ses métabolites, ne possèdent aucun groupement chromophore et ne fluorescent pas naturellement. Il est donc nécessaire de réaliser une dérivation avec un dérivé fluorescent pour pouvoir détecter le composé par HPLC. Nous avons choisi d'utiliser le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl). La détection par fluorescence est très sensible, la concentration maximale en glyphosate utilisée pour les cinétiques de biodégradation est de 3 mM et l'étalonnage couvre la gamme 0-3 mM. Pour ces concentrations, le récepteur est saturé. Par conséquent, nous avons dilué 200 fois tous les échantillons à analyser avant de les dériver. Le protocole de dérivation utilisé est adapté de celui proposé par Miles et Moye (1988) :

Dans un tube à essai sont mis en contact :

- 0,1 mL d'échantillon
- 0,1 mL d'une solution de FMOC-Cl préparée à 0,01 M dans l'acétonitrile
- 0,9 mL d'acétone grade HPLC
- 0,9 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,05 M (pH = 9)

Le mélange est agité au Vortex pendant 1 min puis laissé au repos 30 min. Il est ensuite extrait avec 3 fois 1 mL d'acétate d'éthyle. Après agitation entre chaque lavage, la phase organique est éliminée. La phase aqueuse est prélevée après le troisième lavage et transvasée dans un vial pour l'analyse HPLC immédiate.

Les analyses sont effectuées sur une colonne phase inverse Nucleodur 5 µM (C18, 150 x 4,6 mm). Les conditions d'analyse en mode isocratique sont résumées dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Conditions d'analyse du glyphosate par HPLC

Eluant A/B (V/V)	Pour 1 L : A = 0,05 M KH_2PO_4 + 4 mL KOH à 2 M (pH = 6,9) B = acétonitrile A/B = 70/30
Débit	1 mL/min
Température de la colonne	30 °C
Longueur d'onde	λ_{exc} = 270 nm et λ_{em} = 317 nm
Temps de rétention	Glyphosate : 4 min AMPA : 25 min Sarcosine : 29 min

III.2 Analyses par RMN du proton

Le Tableau 13 résume les paramètres d'acquisition pour un spectre RMN ^{1}H du glyphosate en liquide :

Tableau 13 : Paramètres d'acquisition pour les spectres RMN du ^{1}H des cinétiques de biodégradation du glyphosate

Impulsion ^{1}H de 90°	6,9 µS
Impulsion de saturation	3 s
Délai de relaxation	3 s
Durée d'acquisition	4,67 s
Nombre de points	65536
Nombre de scans	128
Fenêtre spectrale	7003 Hz
Nombre de scans factices	4
Durée de l'analyse	23 min

IV ADSORPTION DU GLYPHOSATE SUR LES MATRICES SOLIDES

Le protocole expérimental appliqué est celui décrit précédemment (page 129): après les mises en contact, les prélèvements sont centrifugés puis le pH des surnageants est mesuré. Quelques modifications ont cependant du être effectuées pour la préparation des échantillons à analyser par HPLC. En effet l'analyse est réalisée avec un détecteur à fluorescence, beaucoup plus sensible que le détecteur UV-visible. Il est donc nécessaire dans la plupart des cas de diluer les échantillons avant leur analyse par HPLC.

Lors des cinétiques d'adsorption du glyphosate sur les différentes matrices : l'étalonnage (0-1 mM), les solutions initiales mises en contact avec le solide et les surnageants sont dilués 100 fois, dérivés et enfin analysés par HPLC.

Pour les isothermes d'adsorption, l'étalonnage (0-4 mM) et les solutions initiales sont dilués 200 fois avant d'être dérivés puis analysés par HPLC. Les surnageants sont, quant à eux, dilués 100 fois, dérivés puis analysés par HPLC.

Les analyses ont été effectuées sur une colonne phase inverse Nucleodur 5 µM (C18 150 x 4,6 mm). Les conditions d'analyses en mode isocratique sont identiques à celles utilisées pour l'analyse des échantillons biologiques issus des cinétiques de biodégradation du glyphosate. Seule la durée d'analyse a été raccourcie à 6 min, la présence d'AMPA dans ces expériences d'adsorption n'étant pas attendue.

RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE I :

Etude de la biodégradation de la mésotrione et du glyphosate

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE

I RECHERCHE DE MICROORGANISMES CAPABLES DE DEGRADER LA MESOTRIONE

La première étape de cette étude a été de réaliser un large criblage de microorganismes isolés des différents compartiments environnementaux : eau, air et sol, afin de sélectionner ceux aptes à biotransformer la mésotrione. Nous avons évalué les capacités de dégradation de nombreuses souches bactériennes, fongiques et de levure en réalisant des tests avec des cellules au repos métabolique (à raison de 5 g de biomasse humide) dans 100 ml d'une solution à 0,1 mM (34 mg/L) de mésotrione. La température d'incubation est de 17 ou/et 27°C en fonction de la température optimale de croissance du microorganisme. La disparition de la mésotrione est suivie régulièrement par HPLC sur 5 jours d'incubation pour les bactéries et les levures, et sur 14 jours d'incubation pour les champignons. Un témoin correspondant à une solution de mésotrione sans cellules a été incubé dans les mêmes conditions. Aucune disparition de mésotrione n'est observée dans ce témoin.

Les souches testées sont issues :

- de la banque de souches du laboratoire. Il s'agit de souches de collection ou de souches isolées lors de précédentes études, notamment de sols pollués.

- de la Banque Nationale de Microorganismes Non-Pathogènes de Moldavie. Dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences de Moldavie (Dr Angela Cinciléi), nous avons pu tester dix souches fongiques isolées de sols moldaves pollués par des contaminants organiques.

- d'eau de nuages : au sein de notre équipe, une nouvelle thématique a été développée depuis 2003 portant sur l'étude de la structure et de la fonction des communautés microbiennes dans les nuages. Pierre Amato a effectué, dans le cadre de sa thèse, des prélèvements de l'eau de condensation des nuages, au sommet du Puy-de-Dôme (1465 m), afin de déterminer notamment les communautés microbiennes présentes. Plusieurs prélèvements ont été réalisés selon le protocole décrit par Amato *et al.* (2005) : l'eau de

condensation des nuages est récoltée sur un impacteur (Figure 64) préalablement stérilisé. Les échantillons d'eau récoltés sont mis en culture sur différents milieux en boîtes de Pétri. A partir de ces cultures mixtes, des souches pures ont été isolées sur boites de Pétri. Chaque souche pure a ensuite été identifiée par analyse de sa séquence ARNr 16S. Nous avons testé 90 souches bactériennes, fongiques et de levure issues de ce milieu.

Figure 64 : Impacteur servant à collecter l'eau de condensation des nuages

- de neige prélevée au Spitzberg : Toujours au cours de sa thèse, Pierre Amato a participé à une campagne d'étude de la chimie du mercure en zone polaire. Des prélèvements de neige ont été réalisés à Ny-Ålesund (base scientifique située sur l'île du Spitzberg) pour étudier d'un point de vue microbiologique le manteau neigeux. Treize souches issues de ce milieu ont été testées pour leur capacité de dégradation vis-à-vis de la mésotrione.

Le suivi cinétique de la concentration en mésotrione par HPLC avec certaines des souches testées montre au cours du temps, une variation du temps de rétention (réduction) accompagné d'un élargissement (ou même dans certains cas d'un dédoublement) du pic de la mésotrione, même si l'aire totale ne varie pas. Il n'y a donc pas disparition de la mésotrione. Cet effet a déjà été observé (pics traînant devenant larges) et a été attribué à la capacité de la mésotrione à chélater des métaux tels que le cuivre, le zinc ou le magnésium (Alferness et Wiebe, 2002). Il y aurait donc des effets de matrice liés aux cellules ou au milieu d'incubation. Il est donc important d'effectuer des prélèvements réguliers au cours de la cinétique pour pouvoir suivre l'évolution du pic de la mésotrione.

Les Tableau 14 (souches bactériennes), Tableau 15 (souches de levure) et Tableau 16 (souches fongiques) présentent les taux de disparition de la mésotrione obtenus après 5 et 14 jours d'incubation pour les bactéries et les levures, et les champignons respectivement. Les chiffres entre parenthèses indiquent le temps au bout duquel le pourcentage de disparition indiqué est atteint.

Tableau 14 : Tests de biodégradation de la mésotrione par des souches bactériennes. Taux de disparition après 5 jours d'incubation. Essais avec des cellules au repos métabolique – Mésotrione 0,1 mM

SOUCHES	Taux de disparition (%) (temps mis pour l'atteindre)	SOUCHES	Taux de disparition (%) (temps mis pour l'atteindre)
Actinobacterium sp. 12B4	0	***Nocardioides* sp. SP12**	**11 (25 h)**
***Agrobacterium tumefaciens* IB85**	**22**	***Paenibacillus* sp. 7B6**	**30 (72 h)**
Agrococcus sp. 7B2	0	***Paenibacillus* sp. P**	**12**
Agromyces sp. R	0	***Pantoea* sp. 12B5**	**100 (48 h)**
Arthrobacter bergeri 5B11	0	***Pedobacter* sp. 6B2**	**28**
Arthrobacter rhombi 3B7	0	*Pseudomonas fluorescens* ATCC12842	0
Arthrobacter sp. 2B16	0	***Pseudomonas graminis* 6B4**	**10**
Arthrobacter sp. 7B9	0	***Pseudomonas graminis* 13B3**	**10**
Arthrobacter sp. N4	0	*Pseudomonas pseudoalcaligenes* IB78	0
Arthrobacter sp. SR30	0	***Pseudomonas* sp. 2B15**	**10 (24 h)**
Bacilliales bacterium 12B7	0	*Pseudomonas* sp. 14B2	0
***Bacillus amyloliquefaciens* CIP103265**	**45**	*Pseudomonas* sp. 14B10	0
Bacillus cereus 2B9	0	*Pseudomonas* sp. ADP	0
Bacillus cereus ATCC14579	0	*Pseudomonas syringae* 3B1	0
***Bacillus licheniformis* ATCC21733**	**100 (24 h)**	***Pseudomonas syringae* 12B8**	**100 (24 h)**
***Bacillus megaterium* DSM32**	**100 (6 h)**	***Pseudomonas syringae* 13B2**	**60**
***Bacillus pumillus* 5B1**	**100 (5 h)**	*Pseudomonas viridiflava* 14B14	0
***Bacillus* sp. 2B5**	**100 (24 h)**	*Rhodococcus erythropolis* BTS1	0
***Bacillus* sp. 3B6**	**100 (1 h)**	*Rhodococcus rhodochrous* OBT18	0
Bacillus sp. 5B2	0	*Rhodococcus rhodochrous* ATCC29692	0
Bacillus sp. 7B11	0	*Saccharothrix* sp. 6B3	0
***Bacillus* sp. 16B1**	**30**	*Sphinghomonas* sp. 3B10	0
***Bacillus sphaericus* ATCC10208**	**32**	*Sphinghomonas* sp. 7B13	0
***Bacillus subtilis* ATCC6633**	**100 (4-5 h)**	***Sphinghomonas* sp. 7B15**	**30**
***Bacillus subtilis* D**	**100 (24 h)**	*Sphinghomonas* sp. 14B5	0
***Bacillus subtilis var. niger* IFO3108**	**35**	*Sphinghomonas* sp. 14B6	0
Bacterium CAGY3 2B22	0	*Staphylococcus arlettae* 5B8	0
Brevundimonas sp. C	0	*Staphylococcus epidermitis* 3B15	0
Cellulomonas sp. 3B8	0	*Staphylococcus equorum* 5B16	0
Chelatobacter sp. SR45	0	*Staphylococcus* sp. 3B16	0

Chelatobacter sp. SR46	0	*Staphylococcus* sp. 3B17	0
Chelatococcus sp. A	0	*Staphylococcus* sp. 5B3	0
Clavibacter michiganensis 2B14	0	*Staphylococcus* sp. 5B6	0
***Curtobacterium flaccumfaciens* 13B4**	**22**	*Staphylococcus* sp. 6B1	0
Cytophaga sp. 2B1	0	*Stenotrophomonas maltophilia* IB94	0
Enhydrobacter aerosaccus I	0	*Streptomyces* sp. 1S1	0
***Flavobacterium* sp. 2B4**	**25**	*Streptomyces* sp. 1S2	0
***Flavobacterium* sp. 14B7**	**20**	*Streptomyces* sp. 2S11	0
Frigoribacterium sp. 14B13	0	*Streptomyces* sp. 5S4	0
***Hydrogenophaga* sp. H**	**5**	***Streptomyces* sp. 5S9**	**8**
Intrasporangiaceae 3B4	0	*Streptomyces* sp. 7S1	0
***Janthinobacterium* sp. 2B18**	**40 (24 h)**	*Streptomyces* sp. 12S7	0
Kocuria sp. 7B12	0	*Streptomyces* sp. 12S10	0
Kocuria sp. 2B13a	0	*Streptomyces* sp. 14S9	0
Leucobacter sp. 3B20	0	*Streptomyces* sp. 14S12	0
Manganese oxidizing bact. 7B14	0	*Streptomyces* sp. 21S1	0
Methylobacterium sp. 7B5	0	*Zoogloea* sp. 3B12	0
***Microbacterium phyllo*. 2B3**	**45 (24 h)**		
Micrococcus luteus 3B2	0		
Micrococcus sp. 2B2	0	**SOUCHES NON IDENTIFIEES**	
Micrococcus sp. 7B4	0	3B3	0
Micrococcus sp. 12B6	0	3B9	0
Micromonospora sp. E	0	3B13	0
Mycobacterium aurum MO1	0	3B14	0
Mycobacterium chlorophenolicum RP1	0	5B5	0
Nocardioides sp. 7B7	0	N	0

<u>Remarque</u>: Les souches suivies par un code chiffre–B–chiffre ont été isolées de l'eau des nuages, celles suivies par une lettre de A à N sont isolées des prélèvements de neiges au Spitzberg.

Tableau 15 : Tests de biodégradation de la mésotrione par des souches de levure. Taux de disparition après 5 jours d'incubation. Essais avec des cellules au repos métabolique – Mésotrione 0,1 mM

SOUCHES	Taux de disparition (%)	SOUCHES NON IDENTIFIEES	Taux de disparition (%)
		Levure 5B13	0
		Levure 12B1	0
Aureobasidium sp. J	0	Levure 12B9	0
Cryptococcus albidus 14B3a	0	Levure 12B11	0
Cryptococcus laurentii 14B3b	0	Levure 12B12	0
Phaecoccomyces nigricans M	0	Levure 13B1	0
Pseudozyma sp. 14B11	0	Levure 14B1	0
Saccharomyces cerevisiae NRRL Y977	0	Levure 14B4	0
		Levure C'	0
		Levure G	**21**

Tableau 16 : Tests de biodégradation de la mésotrione par des souches fongiques. Taux de disparition après 14 jours d'incubation. Essais avec des cellules au repos métabolique – Mésotrione 0,1 mM

SOUCHES	Taux de disparition (%)	SOUCHES	Taux de disparition (%)
Aspergillus caepitosus	0	*Penicillium corylophylum* 24_2	0
Aspergillus fumigatus	0	*Penicillium corylophylum Dierckx*	0
*Aspergillus niger*ATCC9142	0	*Penicillium expansum*	0
Beauveria bassiana ATCC7159	0	*Penicillium fellutanum*	0
Penicillium camemberti	0	*Penicillium vermiculatum*	0
Penicillium corylophylum 24a	0	*Penicillium verrucosum*	0

Au total 137 souches, essentiellement bactériennes (79 %), ont été testées et parmi elles, seules 29 ont dégradé de manière significative la mésotrione (taux de disparition ≥ 10 %). Aucun des champignons testés n'est capable de transformer cet herbicide et seule une souche de levure (Levure G issue des neiges du Spitzberg) la transforme partiellement (20 %). Les taux de disparition observés varient de 10 à 100 % au bout de 5 jours d'incubation dans nos conditions de laboratoire.

La firme Syngenta Crop Protection mettait en avant la forte biodégradabilité de la mésotrione au moment de la mise en vente de cet herbicide. Nos résultats ont montré que dans

nos conditions, 20 % des souches testées transforment la mésotrione. Le Tableau 17 rassemble les souches capables de transformer, au moins partiellement, la mésotrione.

Tableau 17 : Souches capables de dégrader la mésotrione (0,1 mM)

SOUCHES	Taux de disparition (%)	SOUCHES	Taux de disparition (%)
Agrobacterium tumefaciens IB85	22	*Janthinobacterium* sp. 2B18	40 (24 h)
Bacillus amyloliquefaciens IP103265T	45	*Microbacterium phyllo.* 2B3	45 (24 h)
***Bacillus licheniformis* ATCC21733**	**100 (24 h)**	*Nocardioides* sp. SP12	11 (25 h)
***Bacillus megaterium* DSM32**	**100 (6 h)**	*Paenibacillus* sp. 7B6	30 (72 h)
***Bacillus pumillus* 5B1**	**100 (5 h)**	*Paenibacillus* sp. P	12
***Bacillus* sp. 2B5**	**100 (24 h)**	***Pantoea* sp. 12B5**	**100 (48 h)**
***Bacillus* sp. 3B6**	**100 (1 h)**	*Pedobacter* sp. 6B2	28
Bacillus sp. 16B1	30	*Pseudomonas graminis* 6B4	10
Bacillus sphaericus ATCC10208	32	*Pseudomonas graminis* 13B3	10
***Bacillus subtilis* ATCC6633**	**100 (4-5 h)**	*Pseudomonas* sp. 2B15	10 (24 h)
***Bacillus subtilis* D**	**100 (24 h)**	***Pseudomonas syringae* 12B8**	**100 (24 h)**
Bacillus subtilis var. niger IFO3108	35	*Pseudomonas syringae* 13B2	60
Curtobacterium flaccumfaciens 13B4	22	*Sphinghomonas* sp. 7B15	30
Flavobacterium sp. 2B4	25		
Flavobacterium sp. 14B7	20	Levure G	21

Parmi les 29 souches capables de dégrader la mésotrione, 9 d'entre elles la transforment complètement : 7 appartiennent au genre *Bacillus*, 1 appartient au genre *Pantoea* et la dernière est du genre *Pseudomonas*. Les souches du genre *Bacillus* sont les plus efficaces car la disparition complète de la mésotrione est observée en quelques heures. Il faut cependant noter que toutes les souches du genre *Bacillus* testées ne dégradent pas la mésotrione : ainsi les deux souches de *Bacillus cereus* testées et les souches de *Bacillus* sp. 5B2 et 7B11 ne la transforment pas du tout. Une autre remarque concerne les deux souches de *Pseudomonas syringae* testées, la souche 12B8 dégradant complètement la mésotrione en 24 h alors que la souche 13B2 ne la transforme qu'à 60 % après 5 jours d'incubation. Une des hypothèses pourrait être la différence de température d'incubation utilisée lors de la biodégradation. La souche 12B8 a été incubée à 27°C tandis que la souche 13B2 a été incubée à 17°C.

Parmi les souches testées, la bactérie *Bacillus* sp. 3B6 est la plus efficace puisque nous observons une disparition complète de la mésotrione (0,1 mM) en 1 h (Durand *et al.*, 2006a). Cette souche, isolée de l'eau de condensation des nuages au sommet du Puy-de-Dôme, appartient à un genre fréquemment retrouvé dans les sols et connu pour avoir de fortes potentialités dégradatives.

Nous avons donc choisi de poursuivre nos études de dégradation avec la souche Bacillus sp. 3B6, et d'étudier plus en détails le métabolisme de la mésotrione.

II CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE PAR LA SOUCHE *BACILLUS* SP. 3B6

Après 24 h de culture (600 ml) sur milieu Trypcase-Soja (TS), la souche *Bacillus* sp. 3B6 (cellules au repos métabolique) est incubée en présence d'une solution de mésotrione (100 mL) à différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10 mM). La température d'incubation est de 27°C. Des prélèvements réguliers de 3 mL sont effectués sur 5 jours pour permettre les analyses HPLC, RMN et LC/MS. Un témoin correspondant à une suspension bactérienne en absence de mésotrione est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation afin de différencier les métabolites propres aux cellules de ceux issus de la biodégradation de la mésotrione.

Comme évoqué précédemment, cette souche est capable de transformer 100 % de la mésotrione en 1 h pour une concentration initiale de 0,1 mM. Augmenter la concentration en mésotrione avait pour objectif :

- d'évaluer l'impact de l'herbicide à forte dose sur la souche *Bacillus* sp. 3B6 et,
- de pouvoir réaliser un premier profil métabolique qualitatif. En effet, à plus forte concentration, nous pouvions espérer des cinétiques de transformation plus lentes et une accumulation de métabolites.

Chaque essai a été répété au minimum deux fois et comparé à différents contrôles. Le bilan qualitatif est rigoureusement identique pour chaque répliquât. Quantitativement, les résultats sont très proches d'un essai à l'autre.

II.1 Effet de la concentration en mésotrione sur sa dégradation

Les résultats des cinétiques de biodégradation de la mésotrione à différentes concentrations, analysées par HPLC, sont présentés Figure 65.

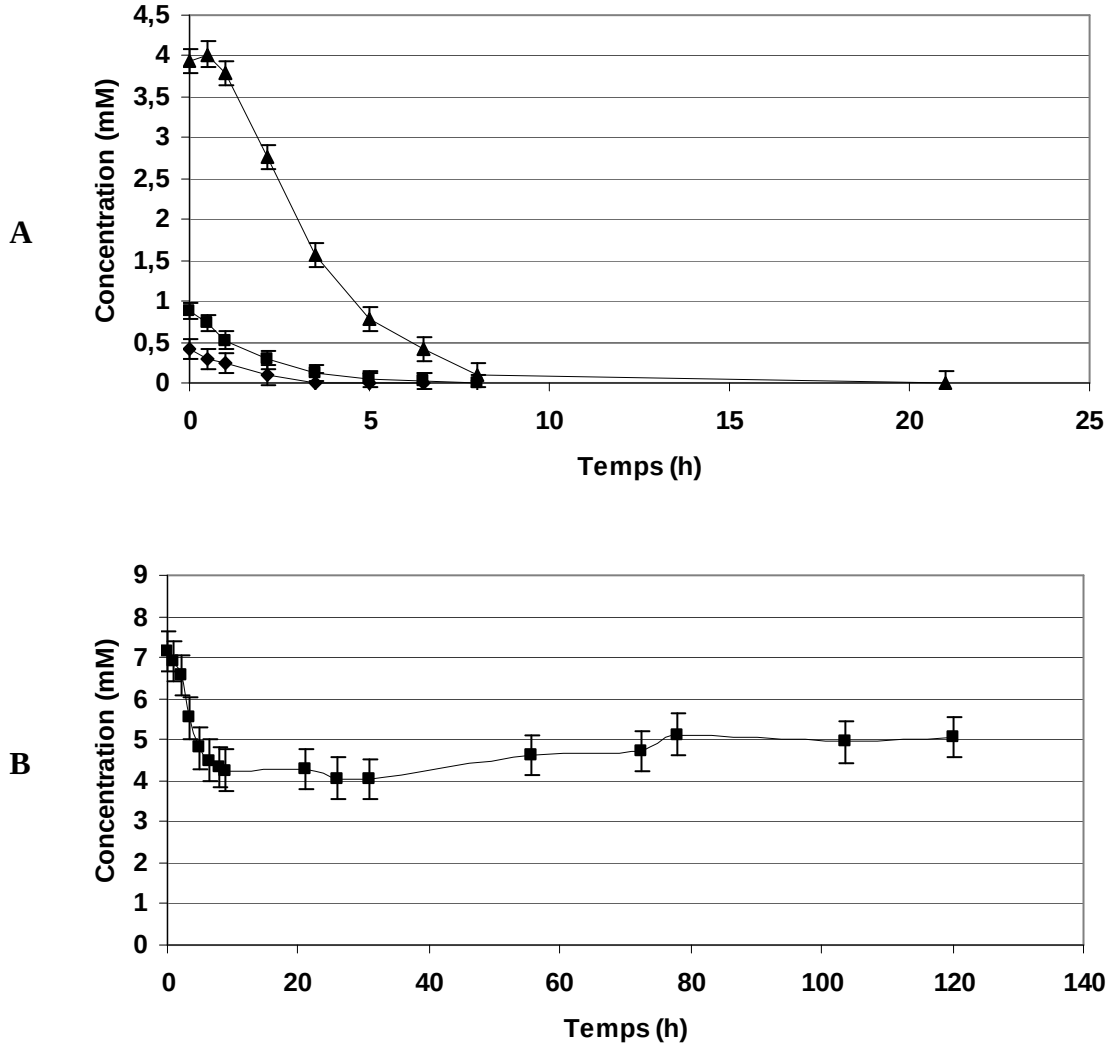


Figure 65 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 analysées par HPLC A) (◆) 0,5 mM ; (■) 1 mM ; (▲) 5 mM ; B) 10 mM

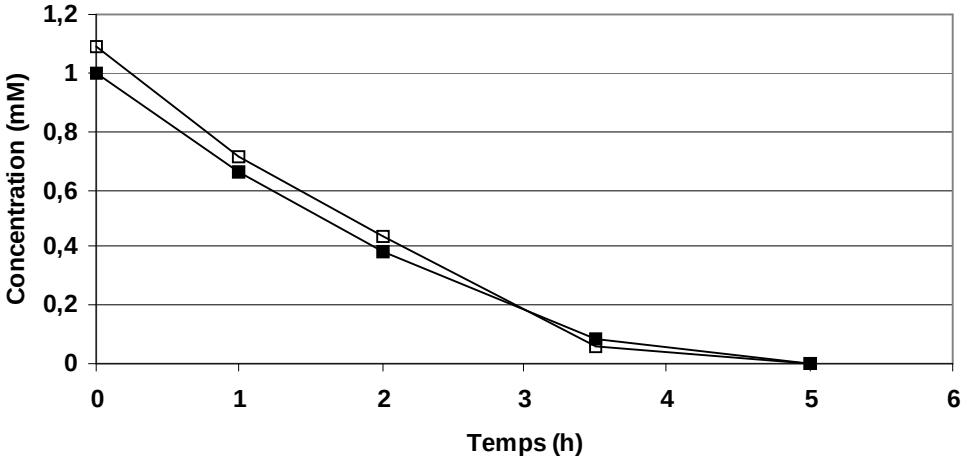
Les trois essais correspondant à des concentrations initiales en mésotrione de 0,5, 1 et 5 mM montrent que la souche *Bacillus* sp. 3B6 est capable de transformer 100 % de l'herbicide en 3 h 30, 5 h et environ10 h respectivement. Seule la transformation pour une concentration initiale de 10 mM est incomplète (~ 50 % de transformation). Il faut noter que dans le cas de fortes concentrations initiales en mésotrione (5 et 10 mM), la concentration initiale mesurée dans les surnageants est plus faible que la concentration théorique attendue. Cette observation, qui est reproductible, a déjà été notée avec d'autres microorganismes et

d'autres xénobiotiques. L'hypothèse proposée est un phénomène de biosorption, c'est-à-dire une adsorption rapide du xénobiotique sur les cellules.

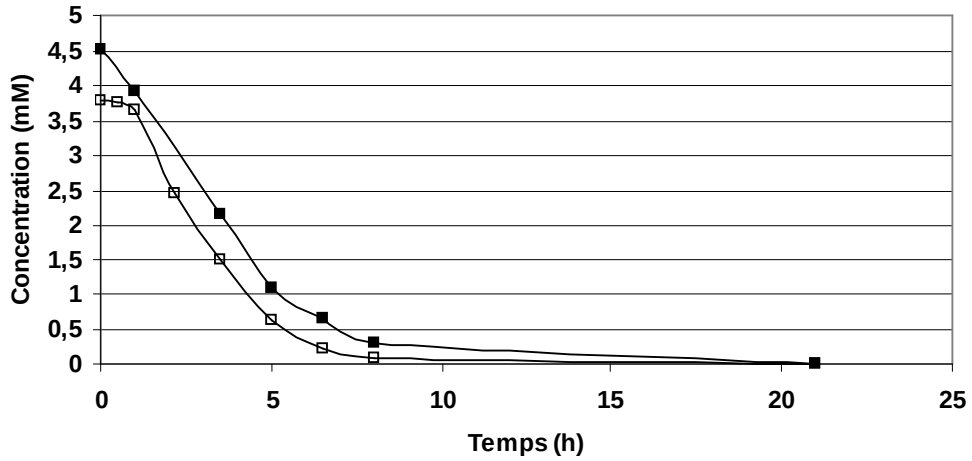
La cinétique de biodégradation de la mésotrione à 10 mM montre l'apparition d'un palier après une dizaine d'heures d'incubation. Trois hypothèses peuvent être émises : (i) la mésotrione présente un caractère toxique pour cette bactérie aux fortes doses ; (ii) au cours de la biodégradation, la mésotrione est transformée en un métabolite plus toxique que la molécule parent ; (iii) les cellules, n'utilisant pas la mésotrione comme nutriment, épuisent leur stock d'énergie au cours du temps et ne sont plus capables de la biotransformer.

Les échantillons des essais de concentration de 1, 5 et 10 mM en mésotrione ont aussi été analysés par RMN ^{1}H (Figure 66). L'essai à 0,5 mM n'a pas été contrôlé par cette méthode pour des raisons de sensibilité inhérentes à la RMN. L'objectif de cette double analyse par HPLC et RMN *in situ* était d'obtenir la vision la plus complète et la plus objective des métabolites formés. Toutefois, la quantification effectuée par RMN ^{1}H *in situ* devait être validée par comparaison systématique avec les données HPLC (Figure 66).

A



B



C

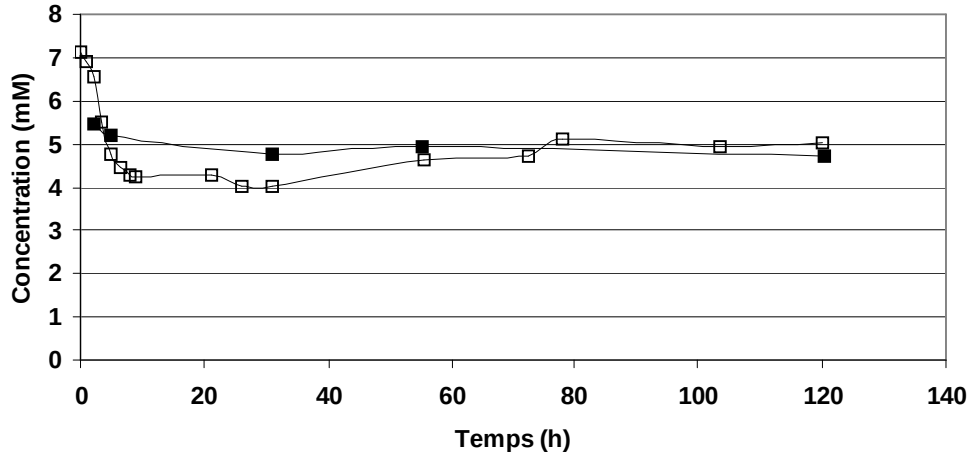


Figure 66 : Comparaison des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par *Bacillus* sp. 3B6 analysées par HPLC (□) et RMN ^{1}H *in situ* (■) pour des concentrations initiales de A (1 mM), B (5 mM) et C (10 mM)

Les résultats des essais à 1 et 5 mM issus des analyses par RMN ^{1}H sont en accord avec ceux obtenus par HPLC (Figure 65). La mésotrione est complètement transformée après

5 h et 21 h d'incubation respectivement. Les résultats des essais à 10 mM concordent aussi avec ceux observés par HPLC. La mésotrione n'est que partiellement transformée (50 %). Les différences obtenues sont contenues dans l'erreur relative de 10 % communément admise lors des quantifications par RMN *in situ*. La quantification par RMN ^{1}H est par conséquent validée. Dans la suite de notre travail de thèse, tous les essais de biodégradation de la mésotrione ont donc été suivis et quantifiés systématiquement par RMN ^{1}H et par HPLC.

II.2 Premiers profils métaboliques. Analyse qualitative.

Chaque expérience a été répétée au minimum deux fois et présentait des profils très similaires tant du point de vue qualitatif que quantitatif, l'intervalle d'erreur étant de 10 %. Des contrôles ont été réalisés systématiquement en parallèle dans les mêmes conditions : mésotrione seule, témoin cellules seules (cellules préparées suivant le protocole général et incubées en absence de mésotrione).

Pour simplifier la lecture du manuscrit, nous ne présenterons que les résultats correspondants à une seule expérience.

Outre la limite de 10 mM pour laquelle la souche *Bacillus* sp. 3B6 n'est plus capable de transformer quantitativement la mésotrione dans nos conditions d'incubation, ces essais nous ont permis d'obtenir les premiers profils métaboliques décrits jusque là pour cet herbicide. Pour leur réalisation, trois concentrations ont été comparées : 1, 5 et 10 mM. Dans ces conditions, l'apparition de cinq métabolites majeurs a été observée et suivie par HPLC et RMN ^{1}H *in situ*. Pour simplifier la lecture du manuscrit, ils ont été nommés M1, M2, M3, M4 et M5 sur les chromatogrammes. La cinétique de biodégradation de la mésotrione à 1 mM, suivie par HPLC-UV, est présentée Figure 67 en tant qu'exemple.

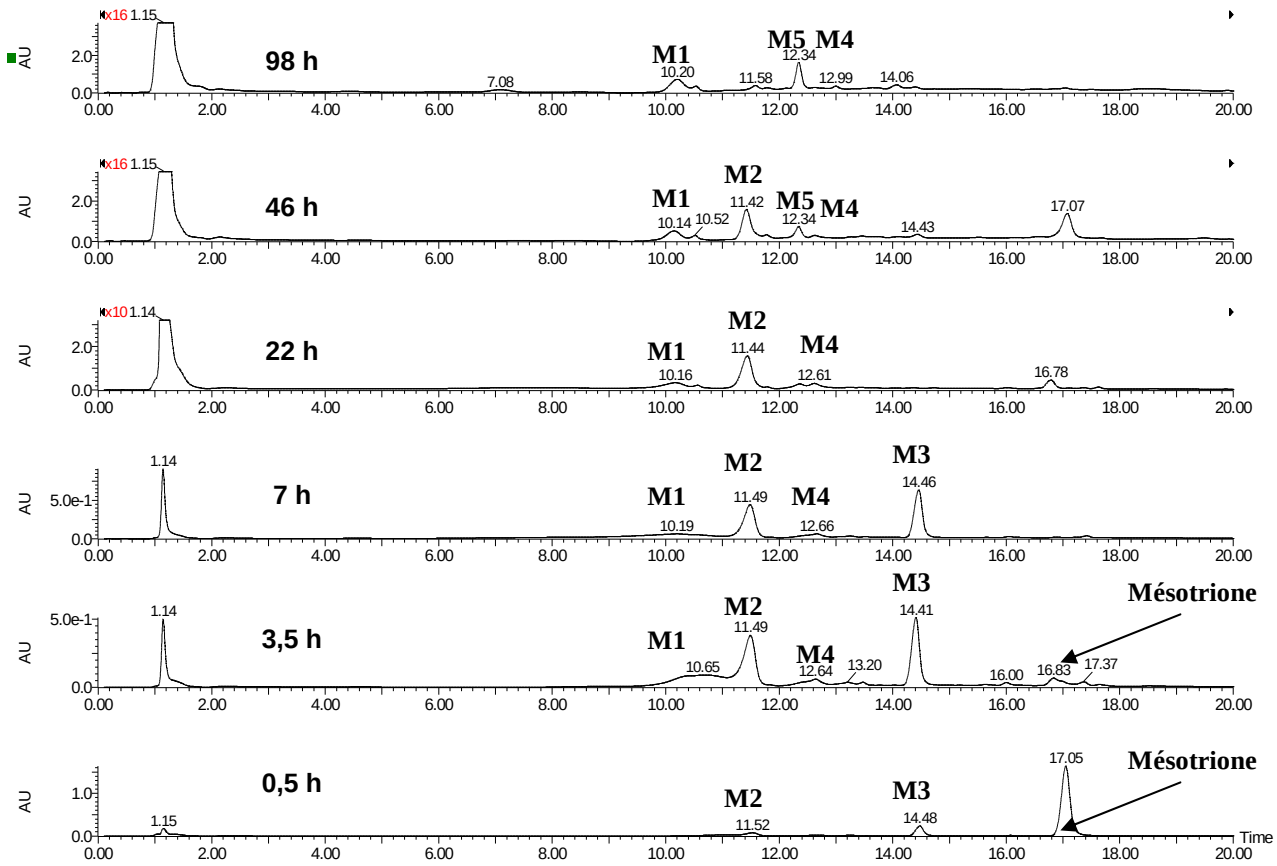


Figure 67 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione (1 mM) analysée par HPLC.
AU : Unités arbitraires

Le pic correspondant à la mésotrione (t_R = 17 min) disparaît après 5 h d'incubation pour une concentration initiale en mésotrione de 1 mM:

Le métabolite **M1** apparaît après 1 h d'incubation et est toujours présent en fin de cinétique. Les données UV indiquent une diminution de sa concentration, même si sur la Figure 67, il semble s'accumuler. Toutefois il faut noter que les facteurs d'agrandissement de chaque chromatogramme sont différents.

- Le métabolite **M2** est présent dès le premier prélèvement à 30 min et disparaît après 80 h d'incubation.

- Le métabolite **M3** apparaît comme **M2** en début de cinétique et disparaît après 22 h d'incubation.

- Le métabolite **M4** apparaît après 3 h 30 et s'accumule dans le milieu tout comme **M5** qui n'est présent de façon significative qu'au-delà de 25 h d'incubation.

Ces mêmes métabolites ont également été observés à des concentrations plus élevées lorsque nous avons travaillé avec des concentrations initiales en mésotrione de 5 et 10 mM. Les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites sont sensiblement les mêmes pour des concentrations initiales jusqu'à 5 mM. Un premier suivi quantitatif relatif des métabolites (en aires UV) est représenté Figure 68, aucun métabolite n'ayant jusque là été identifié.

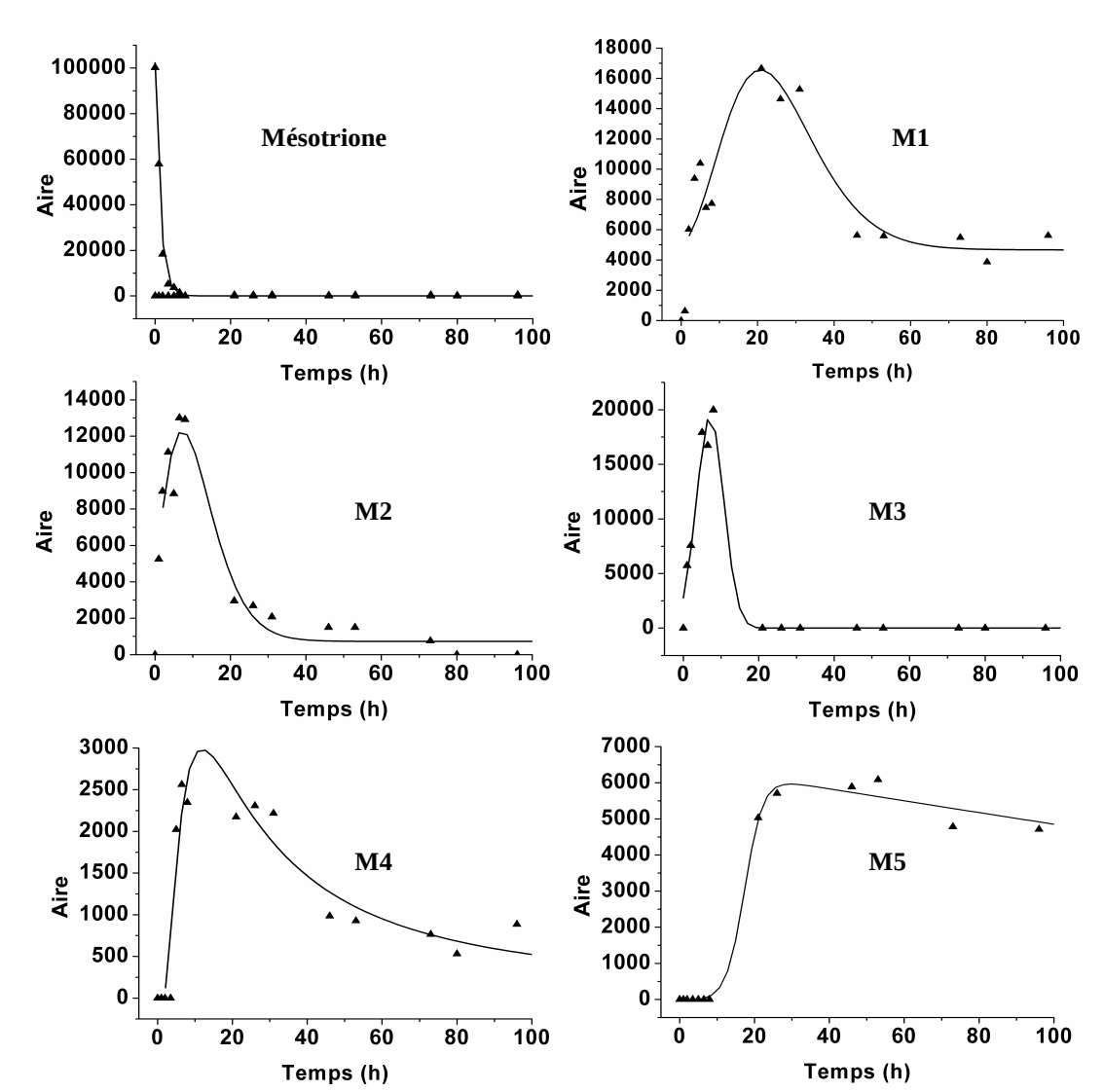


Figure 68 : Suivi relatif (aires UV) de la mésotrione et des différents métabolites au cours d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione à 1 mM

Ces mêmes cinétiques ont été suivies par RMN ^{1}H *in situ*. Seule la zone correspondant aux protons aromatiques est présentée sur la figure Figure 69.

Les signaux de la mésotrione (7,52, 8,27 et 8,72 ppm) sont aisément identifiés sur la Figure 69. L'herbicide disparait après 5 h d'incubation comme cela a déjà été observé par HPLC. Les signaux correspondants aux différents métabolites ont pu être identifiés par comparaison avec les spectres de cinétiques témoins ne comportant pas de mésotrione (cellules seules dans les mêmes conditions d'incubation). Les principaux métabolites, visibles quelle que soit la concentration initiale en herbicide, sont marqués d'un astérisque sur la Figure 69.

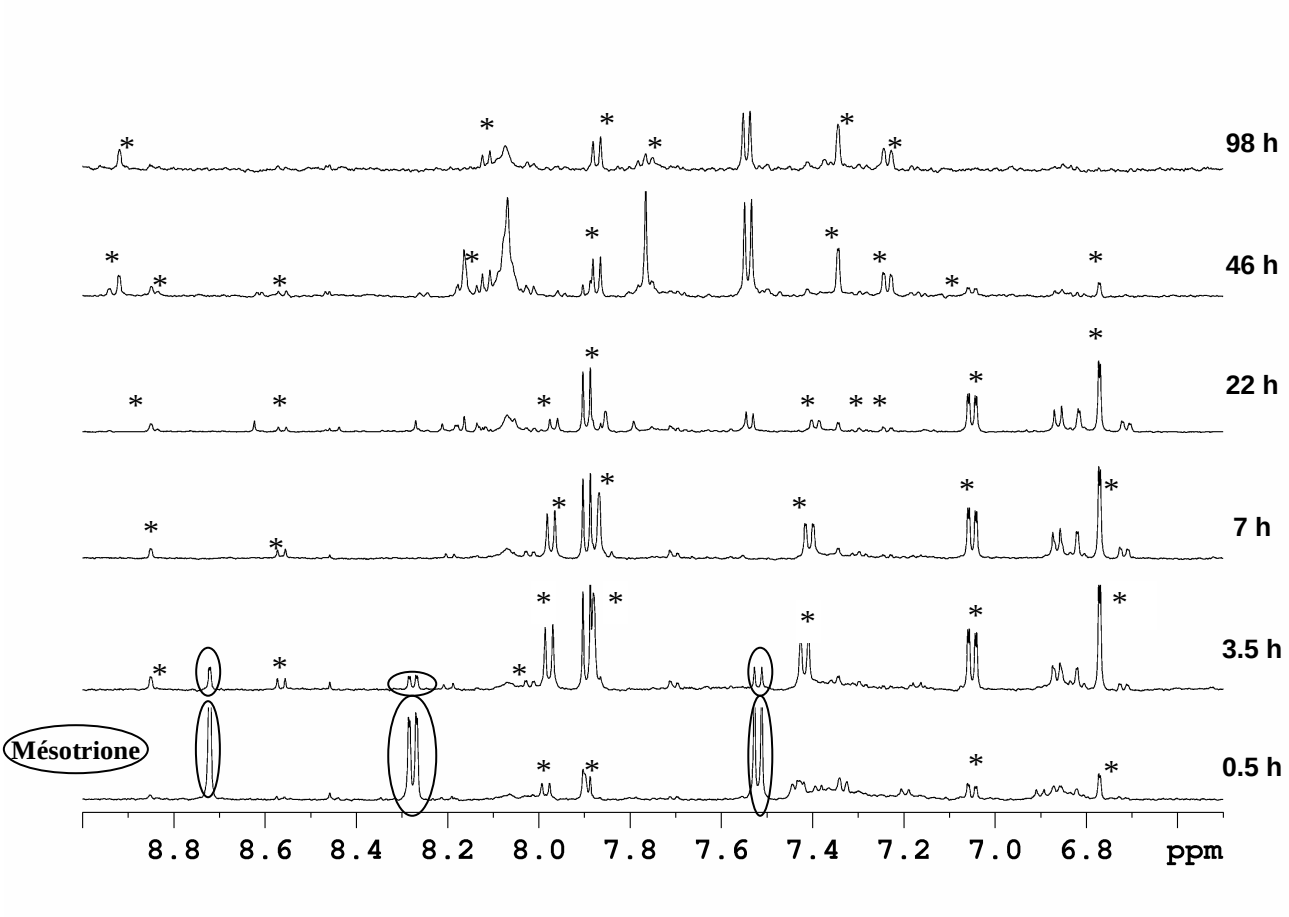


Figure 69 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 analysée par RMN ^{1}H *in situ*. *Les astérisques correspondent à des signaux identifiés comme appartenant à des métabolites de la mésotrione (càd qui ne sont pas présents dans les témoins cellules seules).*

Dans un premier temps, la présence des métabolites décrits dans la littérature (MNBA et AMBA) a été recherchée. Des standards de AMBA et MNBA ont été analysés par HPLC dans les mêmes conditions chromatographiques que les surnageants des cinétiques de biodégradation. Ils présentent des temps de rétention de 10,5 et 1,5 min respectivement. Le métabolite M1 possède un temps de rétention de 10,2 min. En procédant à une co-élution entre le standard AMBA et un échantillon brut de la cinétique, M1 a été identifié sans

difficulté comme étant le AMBA. Ce résultat a été confirmé par la comparaison des spectres UV (λ_{max} = 230, 255 et 355 nm) du standard et de M1 (Figure 70).

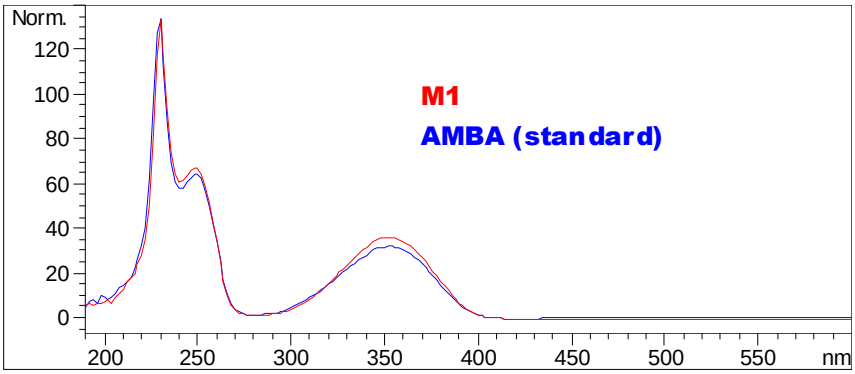


Figure 70 : Spectres UV-visible du AMBA et de M1

De plus, les trois signaux caractéristiques du AMBA à 7,23, 7,34 et 7,87 ppm (H_2O/D_2O 90/10 v/v, pH = 7,6) ont été clairement identifiés sur les spectres de RMN ^1H obtenus à partir de l'analyse *in situ* des surnageants (Figure 71).

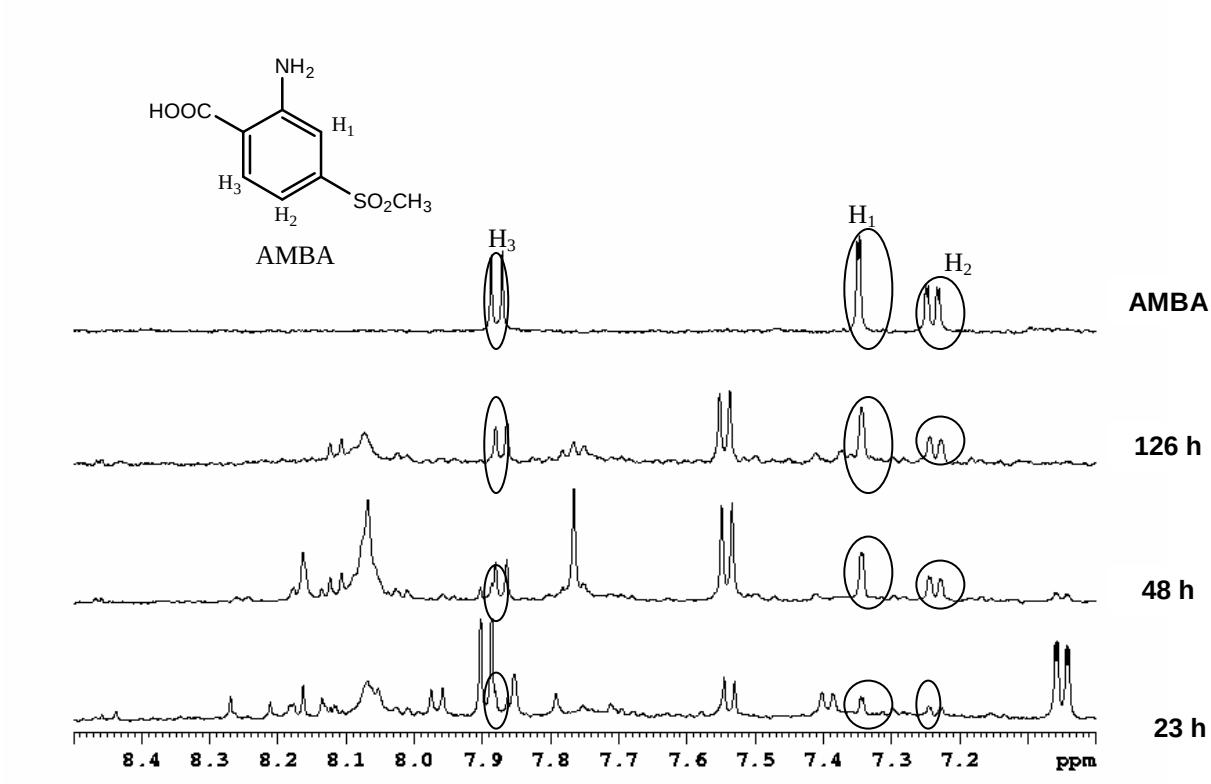


Figure 71 : Comparaison des spectres ^1H d'échantillons de biodégradation de la mésotrione avec celui d'un standard d'AMBA à 1 mM (zone des aromatiques)

En revanche, le MNBA n'a pu être identifié dans nos conditions chromatographiques par co-élution. En effet, son pKa très faible (pKa ~ 1,5) le rend difficile à retenir sur une

phase inverse (t_R = 1,5 min), tout du moins lorsque l'analyse simultanée de la mésotrione et de métabolites inconnus est souhaitée (*vide supra*). De plus, lors de ces analyses, des signaux propres aux cellules apparaissent entre 1 et 1,6 min gênant la détection du MNBA.

Toutefois, une analyse fine des spectres de RMN ^{1}H *in situ* obtenus lors de l'incubation de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence d'une concentration initiale en mésotrione de 5 et 10 mM (Figure 72) a révélé la présence de MNBA en faible concentration.

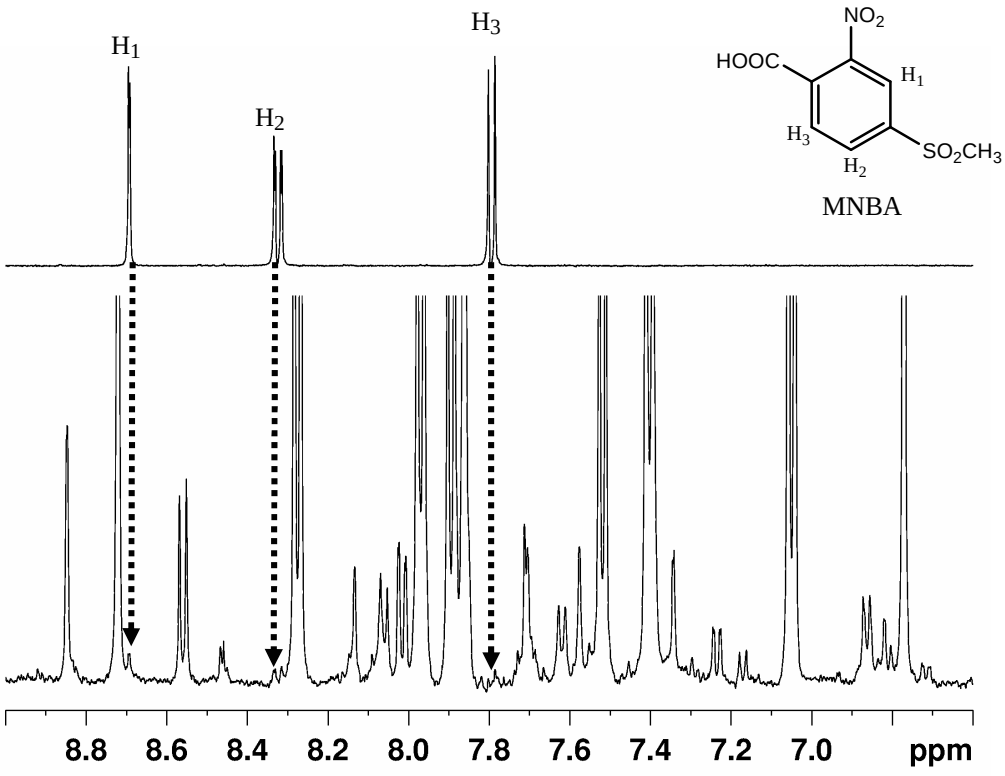


Figure 72 : Spectres ^{1}H du MNBA (standard) (en haut) et d'un surnageant de dégradation de la mésotrione 10 mM (To + 5 h) (en bas)

En effet, dans nos conditions d'incubation, le MNBA ne représente pas plus de 1% de la quantité de mésotrione transformée. Sur les spectres de RMN ^{1}H correspondant aux essais de biodégradation à 5 mM en mésotrione, la concentration maximale atteinte est de 50 µM après 1 h d'incubation, puis il se dégrade à son tour. Avec les essais de biodégradation de mésotrione à 10 mM, un palier est atteint après 2 h d'incubation correspondant à une concentration maximale de 90 µM. Aucune trace de MNBA n'a été observée dans les cinétiques de biodégradation de la mésotrione à 1 mM. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : il peut ne pas se former, être métabolisé dès qu'il se

forme (concentration apparente nulle) ou bien sa concentration peut être trop faible pour pouvoir être détectée par RMN.

Pour confirmer ou infirmer une de ces hypothèses, nous avons repris les analyses par HPLC en utilisant cette fois-ci un spectromètre de masse comme détecteur (analyseur hybride de type QTOF (Quadripôle - Temps de vol)). La haute sensibilité inhérente à la spectrométrie de masse devrait *a priori* nous permettre de pallier le manque de sensibilité relative de la RMN. De plus, la recherche spécifique de(s) ion(s) correspondant au MNBA permet d'accroître la sensibilité (détection en mode SIM, Single Ion Monitoring) et dans une certaine mesure de s'affranchir d'un temps de rétention court (t_R = 1,5 min) proche de ceux des composés endogènes polaires excrétés par les cellules (acides aminés, oses, etc.).

Les analyseurs de type QTOF sont devenus ces dernières années les outils de choix pour des études de criblage métabolique. En revanche, ils ne sont pas adaptés à des études quantitatives.

Les structures de chaque métabolite ont été analysées sur la base des fragmentations caractéristiques se produisant dans la source (CID) et dans la cellule de collision (CAD ou MS/MS), établie en ionisation (électrospray ou ESI) positive et négative. Un mécanisme de fragmentation a été proposé pour chaque composé afin d'expliquer les spectres obtenus. La comparaison des profils isotopiques mesurés et simulés pour chaque ion s'est avérée être fort utile notamment pour détecter la présence de l'atome de soufre (présence d'un pic à M+2).

Conformément aux résultats observés par HPLC-UV et RMN ^{1}H *in situ*, l'analyse des TIC (Total Ion Current) a montré une disparition de la mésotrione (1 mM) après 5 h d'incubation. En mode électrospray positif ((+)ESI), l'ion quasimoléculaire $[M+H]^+$ est observé majoritairement à m/z 340, un fragment à m/z 228, correspondant à la perte de la partie cyclohexanedione, étant également formé (Figure 73a). En mode négatif ((-)ESI), les ions majoritaires correspondent à la perte du groupement nitro à m/z 291 (Figure 73b). Des mécanismes de formation de ces ions sont proposés Figure 73.

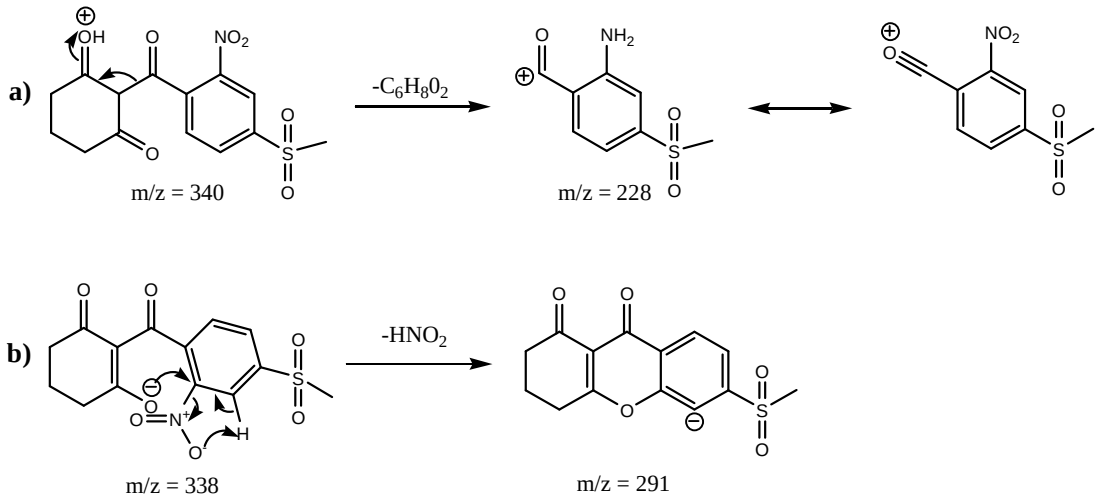


Figure 73 : Proposition de mécanisme de fragmentation de la mésotrione en (+)ESI (a) et en (-)ESI (b)

L'analyse des profils isotopiques a confirmé la présence de l'atome de soufre avec la présence d'un pic à [M+2]. Même si l'intensité des ions détectés à la sortie du temps de vol a tendance à être déformée (problème inhérent à ce type d'analyseur/détecteur), elle semble toutefois suffisamment reproductible pour servir d'élément d'aide à la décision dans la suite de ce travail.

La présence du AMBA a été confirmée dès 1 h d'incubation par l'observation dans les surnageants de ses ions caractéristiques à m/z 198 et 170 en (+)ESI et (-)ESI respectivement (Figure 74). Les compositions élémentaires trouvées correspondent avec les structures proposées. Le AMBA est toujours présent en fin de cinétique, ce qui est conforme aux analyses précédentes.

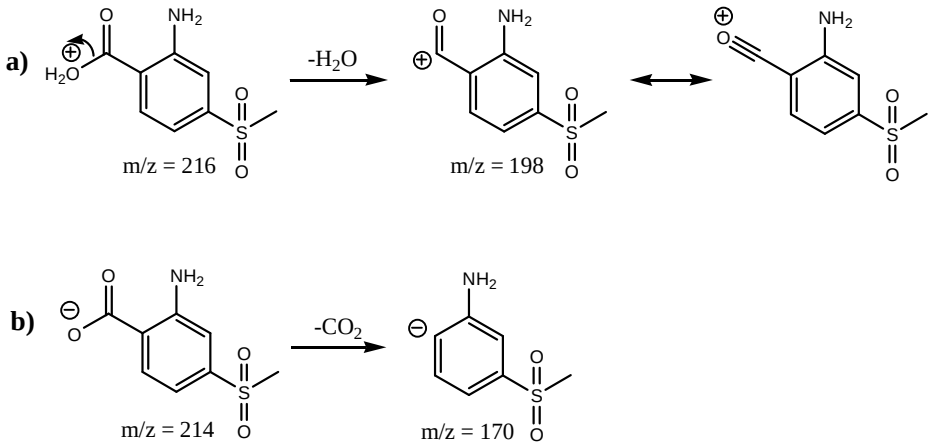


Figure 74 : Proposition de mécanisme de fragmentation du AMBA en (+)ESI (a) et en (-)ESI (b)

Le MNBA n'a jamais été observé dans nos conditions d'incubation par LC/MS, alors qu'il est détecté par RMN. Il apparaît donc qu'il ne s'agit pas d'un problème de limite de

détection (10^{-8} M pour la spectrométrie de masse, 10^{-7} pour l'UV). Un effet de matrice pourrait être à l'origine de ce résultat. En effet, il n'est pas rare en chromatographie qu'un analyte ne puisse être quantifié suite à des interactions entre des constituants de la matrice biologique et la phase mobile et/ou stationnaire.

III ANALYSE DETAILLEE DES PROFILS METABOLIQUES. APPROCHE ANALYTIQUE COMPARATIVE

Outre la présence de AMBA, la formation de quatre autres métabolites a été observée sur les chromatogrammes : M2, M3, M4 et M5. Afin de corréler les données HPLC et RMN *in situ*, des analyses concomitantes par LC/ESI-MS (et LC/ESI-MS/MS) et par LC/RMN ont été réalisées sur les mêmes échantillons en utilisant les mêmes conditions chromatographiques (gradient d'élution ACN/H_2O acidifiée à pH 2,6). Ainsi, pour un composé de t_R donné, les empreintes UV, masse (électrospray en modes positif et négatif) et RMN ont été obtenues.

III.1 Identification des métabolites M2 et M3

III.1.1 Analyse par RMN et LC/RMN

Sur les cinétiques de biodégradation de la mésotrione, M2 et M3 se forment dès 30 minutes et disparaissent après 80 h et 22 h d'incubation respectivement. Ces deux métabolites sont instables à température ambiante, en particulier M3. En effet, les analyses HPLC et RMN de surnageants, laissés 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, ont montré que l'aire du signal du métabolite M2 chute de 10 % et celle de M3 de 60 % par rapport à des analyses réalisées sur des échantillons fraîchement prélevés (à partir d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione à 5 mM). Parallèlement à ces phénomènes de dégradation de M2 et M3, nous observons une augmentation de l'aire du AMBA (M1) d'environ 55 %. Cette dernière observation suggère que ces deux métabolites se transforment au moins partiellement en absence de cellules en AMBA (échantillons analysés après centrifugation et élimination des cellules). Mais cette hypothèse devra être confirmée.

Afin de déterminer l'empreinte RMN ^1H de M2 (t_R =11,5 min) et M3 (t_R = 14,5 min), des analyses par LC/RMN ont été réalisées sur des surnageants d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione à 5 mM. La concentration choisie est volontairement élevée en raison de l'instabilité des métabolites et de la relative faible sensibilité de la RMN (limite

de détection de 0,5 à 1 µM dans nos conditions) (Figure 75). Les temps de rétention de M2 (t_R =12,9 min) et M3 (t_R = 15,6 min) sont légèrement différents lors des analyses de LC/RMN.

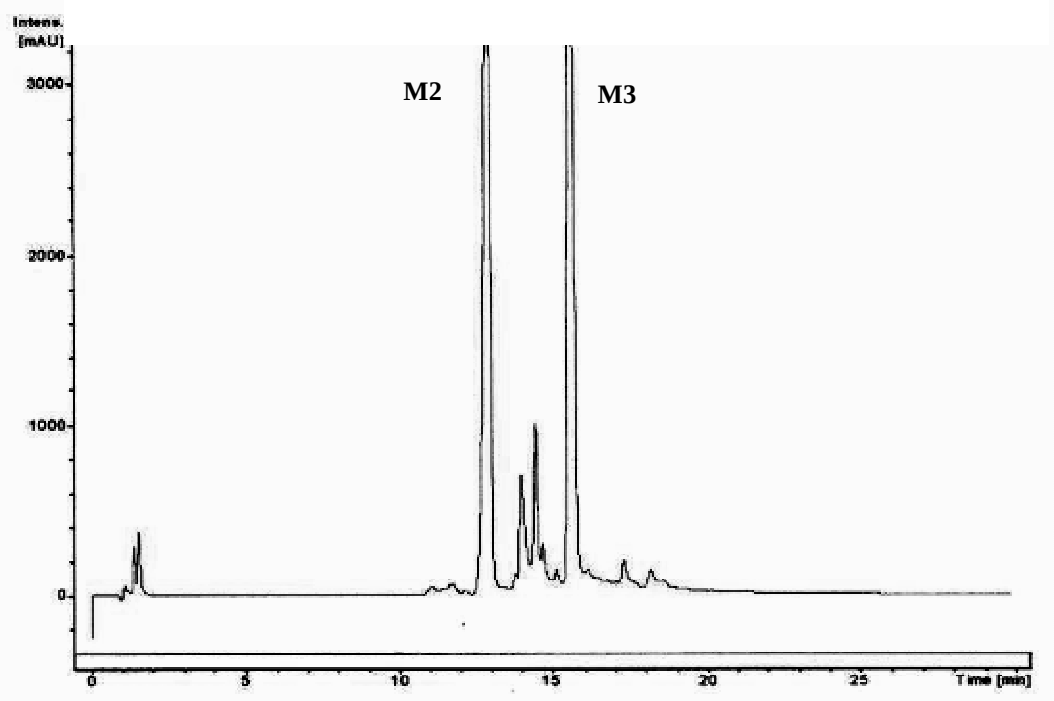


Figure 75 : Chromatogramme LC/RMN d'un surnageant (To + 7 h) issu d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione 5 mM par *Bacillus* sp. 3B6.

La Figure 76 présente une comparaison des spectres RMN ^{1}H (zone aromatique) obtenus par LC/RMN et par RMN *in situ*.

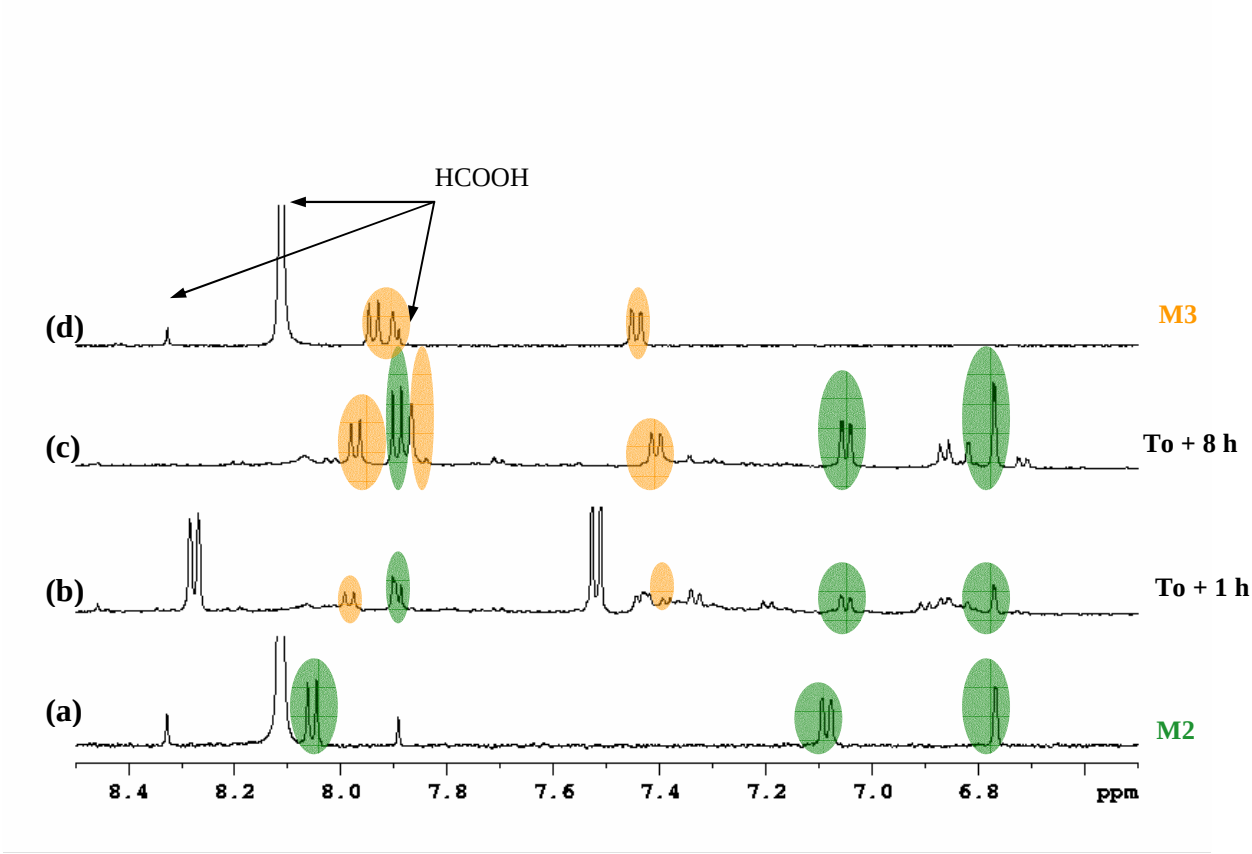


Figure 76 : Spectres RMN ^{1}H (zone des aromatiques) de M2 (a) et M3 (d) obtenus par LC/RMN, comparés aux spectres des milieux d'incubation d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione 5 mM (b et c).

Sur le spectre de l'échantillon correspondant à 1 h d'incubation (Figure 76b), les signaux à 7,52 et 8,27 ppm appartiennent à la mésotrione. Les signaux des protons appartenant aux métabolites M2 et M3 sont cerclés de vert et d'orange respectivement. La variation de déplacement chimique observée par LC/RMN est due à une variation de pH de l'échantillon : pH ~ 9 en RMN *in situ* et pH = 2,6 (pH de la phase mobile) en LC/RMN. Les analyses des milieux d'incubation à pH ~ 2,6 ont confirmé cette variation de déplacement chimique et ont montré la réversibilité du processus : il n'y a pas de transformation chimique rapide suite à cette acidification. Une légère floculation de certains échantillons des cinétiques et des contrôles (sans mésotrione) a toutefois été observée. Il semble qu'une partie des sucres phosphorylés précipite à ce pH.

La Figure 77 présente la zone des protons aliphatiques des spectres enregistrés avec les deux techniques.

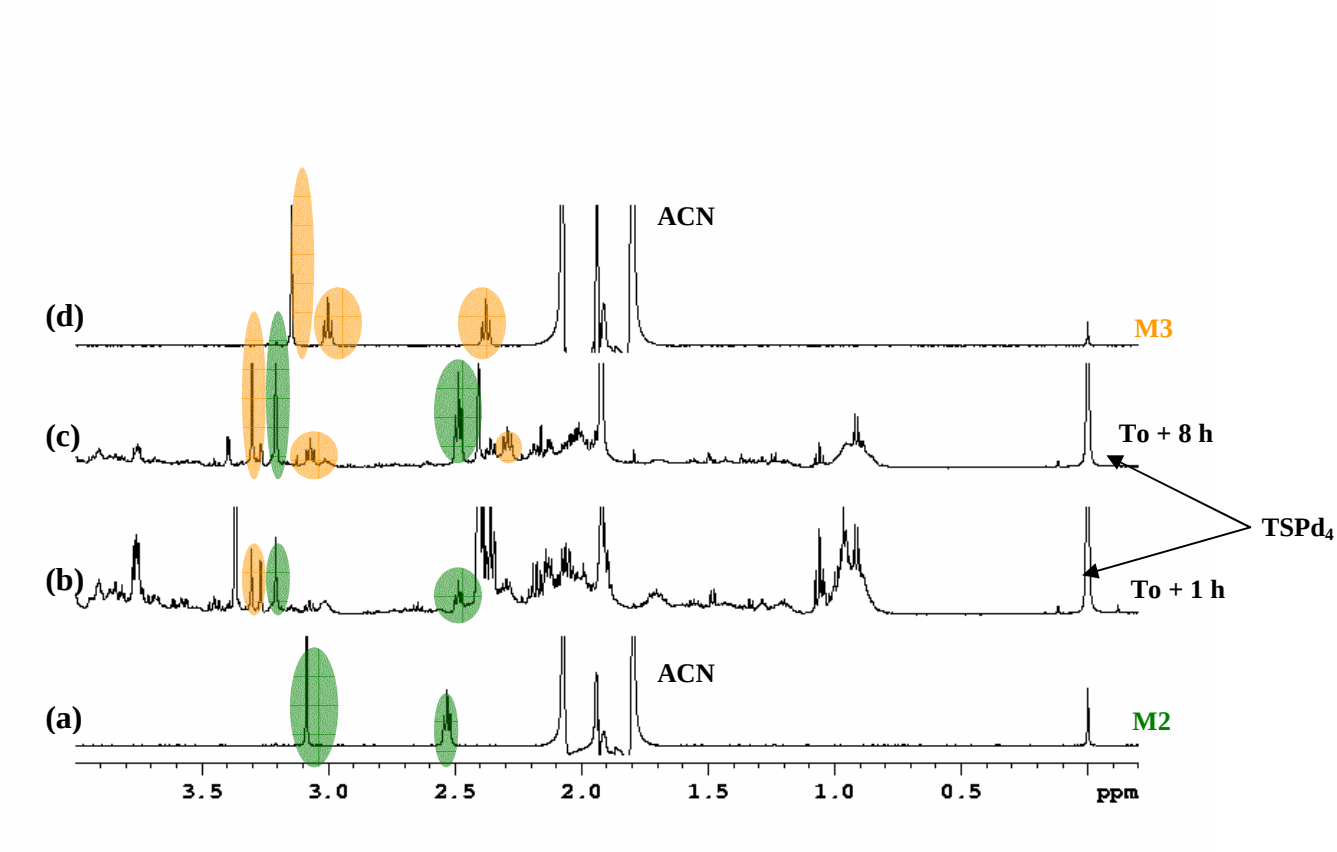


Figure 77 : Spectres RMN ^{1}H (zone des aliphatiques) de M2 (a) et M3 (d) obtenus par LC/RMN, comparés aux spectres des milieux d'incubation d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione 5mM (b et c).

Une fois encore, l'attribution des signaux de M2 et M3 s'est faite en comparant les spectres des milieux d'incubation avec ceux des témoins cellules et en procédant à de nouvelles analyses des spectres des milieux d'incubation à pH acide.

L'étape suivante consistait donc en une analyse des spectres de M2 et M3. Dans un premier temps, cette étude 'structurale' s'est faite par comparaison avec les attributions des signaux de la mésotrione (Figure 78) à pH neutre (Tableau 18), et en se référant aux réactions enzymatiques plausibles sur ce type de structure (cf. chapitre 3 de l'étude bibliographique).

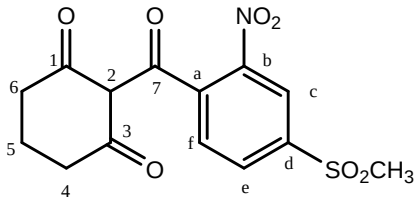


Figure 78 : Structure de la mésotrione

Tableau 18 : Attribution des signaux RMN ^{1}H de la mésotrione (pH neutre) et signaux observés pour M2 et M3 sur les spectres de milieux d'incubation

MESOTRIONE			**M2**			**M3**		
δ (ppm)	*Multiplicité*	*Intégration*	*δ (ppm)*	*Multiplicité*	*Intégration*	*δ (ppm)*	*Multiplicité*	*Intégration*
2,41 (H_4 et H_6)	t	2 H et 2 H	2,49	t	4 H	3,07	t	2 H
1,91 (H_5)	qt	2 H				2,29	t	2 H
8,72 (c)	d	1 H	6,77	d	1 H	7,86	d	1 H
8,27 (e)	dd	1 H	7,05	dd	1 H	7,40	dd	1 H
7,52 (f)	d	1 H	7,90	d	1 H	7,97	d	1 H
3,37 (CH_3)	s	3 H	3,21	s	3 H	3,30	s	3 H

A la lecture de ce tableau, il apparaît rapidement que M2 et M3 possèdent un cycle aromatique substitué de façon identique à la mésotrione (même multiplicité). Les protons en position « c et e » sont davantage blindés dans le cas des métabolites que dans celui de la mésotrione. Ce résultat indique que le substituant en position « b » dans M2 et M3 possède un caractère attracteur moins important que le groupement nitro.

La même analogie structurale a été recherchée dans la région des protons aliphatiques (même multiplicité apparente). Seul un groupement CH_2 (triplet à 2,49 ppm) est observé pour M2 par LC/RMN, M3 présentant deux CH_2 résonant à 2,29 et 3,07 ppm. Il semble que des quintuplets (équivalents aux H_5 de la mésotrione) soient masqués par l'acétonitrile (éluant HPLC). Dans l'hypothèse où M2 ne comporterait qu'un seul triplet, la présence d'un élément (axe) de symétrie dans la molécule serait à envisager. En effet, le spectre obtenu en LC/RMN indique que le groupement CH_2 du M2 correspond à quatre protons.

D'après leurs aires relatives, les signaux à 3,21 et 3,30 ppm correspondent à des groupements méthyle non couplés scalairement, portés par M2 et M3 respectivement.

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la structure de M2 et M3, nous avons réalisé des analyses en RMN 2D. En effet ces métabolites sont en faible concentration dans nos échantillons et une détection directe des noyaux peu sensibles comme le carbone ou l'azote est impossible. Nous avons donc du utiliser une détection en mode inverse (détection du carbone ou de l'azote *via* le proton) afin d'obtenir les informations souhaitées sur ces noyaux (carbone protoné ou encore couplage proton – carbone (ou azote) longue distance afin de voir les enchaînements de groupements possibles). Nous avons donc fait appel à différentes séquences, qui permettent chacune d'obtenir des informations complémentaires :

- Expérience TOCSY ^{1}H-^{1}H (TOtal Correlation SpectroscopY) : Cette séquence 2D homonucléaire permet de corréler les signaux ^{1}H couplés scalairement et d'identifier tous les signaux ^{1}H appartenant à une même molécule (même réseau de spins). Avec ce type de séquence, nous pouvons obtenir des renseignements sur les enchaînements de type méthylène, car la TOCSY permet l'observation de couplages ^{1}H-^{1}H à longue distance ($^{n}J^{1}H$-^{1}H avec $n \geq 3$, n = nombre de liaisons). En jouant sur la durée du spin-lock, nous obtenons des renseignementes sur les couplages ^{1}H-^{1}H à plus ou moins longue distance. Une expérience TOCSY sur un échantillon de mésotrione (Figure 78) nous permet d'observer par exemple une tâche de corrélation entre H_c et H_f.

Nous avons enregistré des expériences TOCSY 2D sur des surnageants d'une cinétique de biodégradation à 5 mM, à différents temps d'incubation, et ceci, pour des durées de spin lock (de type mlev17) de 30 à 90 ms. A 90 ms, l'ensemble des réseaux de spins (couplages ^{1}H-^{1}H à longue distance) devrait pouvoir être observé.

Après 5 h d'incubation, une tâche de corrélation est observée entre le triplet à 2,49 ppm et un quintuplet à 2,01 ppm (métabolite M2) (Figure 79). Ceci confirme la présence d'un quintuplet masqué par l'acétonitrile en LC/RMN. La présence sur l'empreinte de M2 de ces deux groupements méthylène dont un quintuplet (l'aire du triplet étant double par rapport à celle du quintuplet) confirme l'existence d'un enchainement R-CH_2-CH_2-CH_2-R', les deux groupements méthylène en « bout de chaîne » étant équivalents pour le métabolite M2.

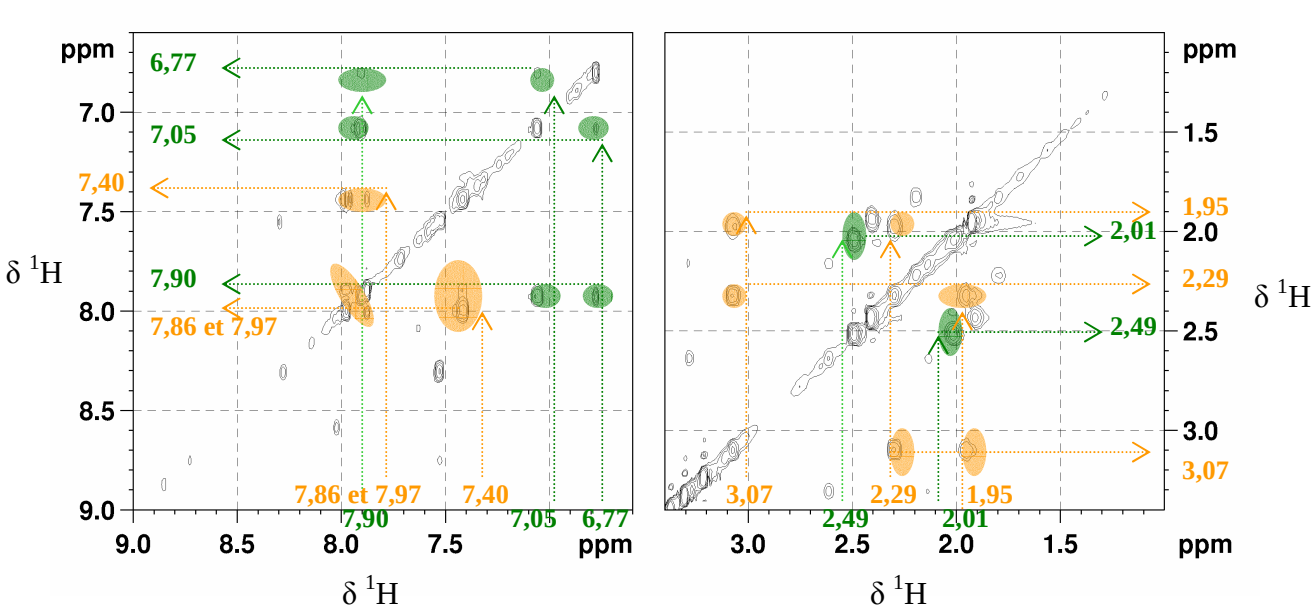


Figure 79 : Expérience TOCSY ^{1}H-^{1}H enregistrée sur un surnageant de biodégradation (To + 5 h) pour une concentration initiale en mésotrione de 5 mM. Durée du spin lock : 90 ms

Trois tâches de corrélation ont été observées pour le métabolite M3 :

- une entre les deux triplets (3,07 et 2,29 ppm)
- une autre entre le triplet à 3,07 ppm et un quintuplet à 1,95 ppm
- une entre le triplet à 2,29 ppm et le quintuplet à 1,95 ppm

M3 comporte donc un enchaînement R-CH_2-CH_2-CH_2-R', analogue à celui observé pour la mésotrione, c'est-à-dire où les deux groupements méthylène en « bout de chaîne » ne sont pas équivalents contrairement au métabolite M2.

Ces premiers résultats ne permettent pas de distinguer la présence d'une structure cyclique ou ouverte. D'autres expériences ont donc du être réalisées.

- Expériences HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) ^{1}H-^{13}C : Ces séquences 2D permettent d'observer les corrélations ^{1}H-^{13}C à travers une liaison. Ces séquences nous permettent de différencier les carbones protonés et les carbones quaternaires. Lors de l'analyse d'un échantillon de mésotrione par cette séquence, nous aurions une tâche de corrélation entre C_4 et H_4 ou C_f et H_f, mais aucune tâche ne serait visible pour C_7 (Figure 78).

- Expériences HMBC ^{1}H-^{13}C ou HMBC ^{1}H-^{15}N (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) : Ces séquences permettent d'observer les couplages longue distance entre un

proton donné et un ^{13}C (ou ^{15}N) en évitant les couplages directs. Ce type d'expérience nous permet d'observer sur la mésotrione une tâche de corrélation entre l'atome d'azote et H_c ou encore entre C_7 et H_f. L'identification des substituants des deux cyles de la mésotrione ou de ses métabolites (aromatique et non aromatique) ne peut être réalisée que par ce type d'expérience.

Des expériences de type HMQC, HSQC et HMBC ^{1}H-^{13}C ont donc été enregistrées sur différents surnageants afin d'essayer de relier la partie aliphatique et la partie aromatique de M2 et M3 (même si les analyses par LC/RMN ont d'ores et déjà confirmé l'appartenance d'un cycle aromatique et d'une structure aliphatique à la même molécule). L'exemple d'une expérience HMBC ^{1}H-^{13}C optimisée pour des couplages scalaires à longue distance ^{1}H-^{13}C de 7,8 Hz est présenté Figure 80.

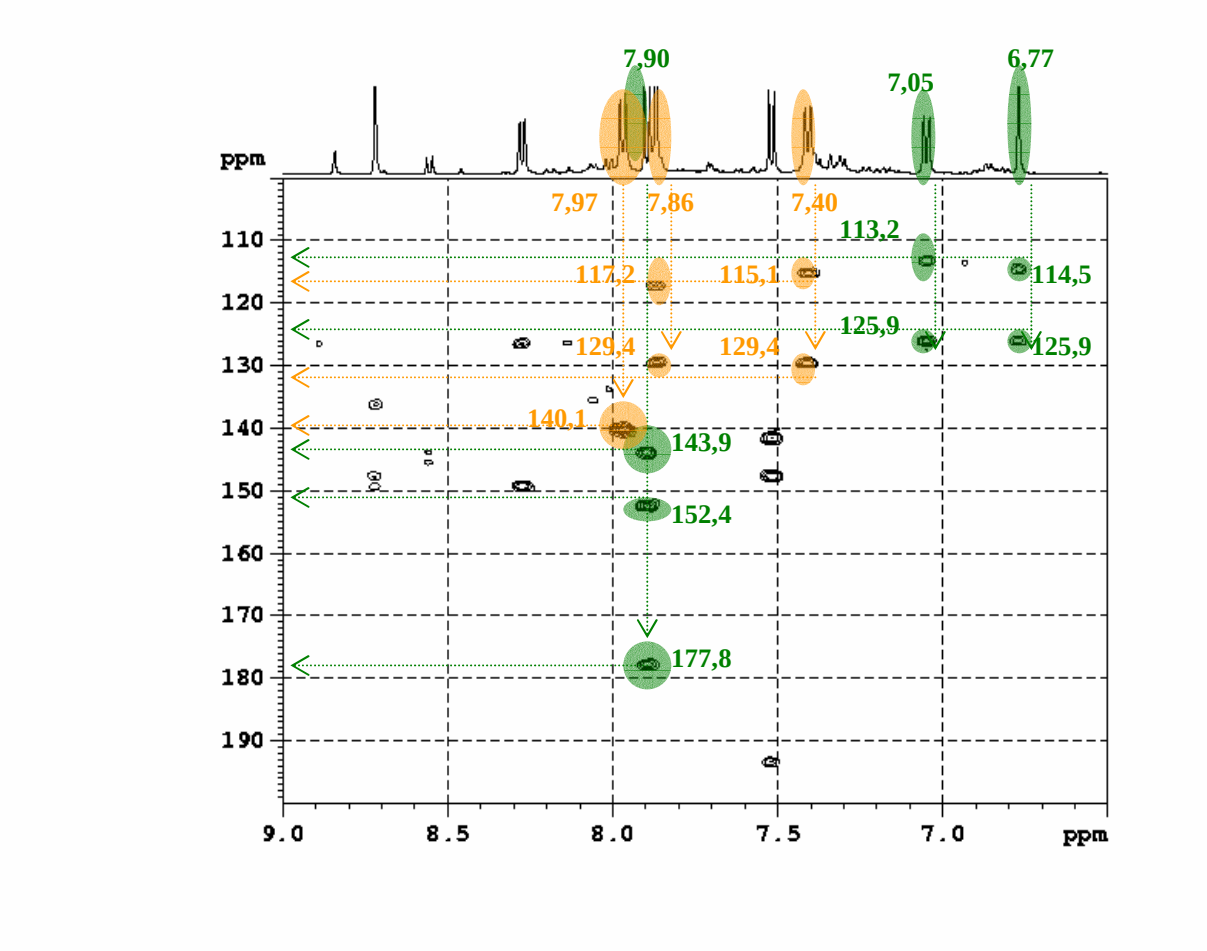


Figure 80 : HMBC ^{1}H-^{13}C d'un échantillon de biodégradation de la mésotrione (5 mM) (To + 5 h)

Outre l'attribution des déplacements chimiques des atomes de carbone du cycle aromatique, cette HMBC indique que le proton à 7,90 ppm et un carbone résonant à 177,8

ppm sont distants de trois liaisons dans M2. Ce déplacement chimique est caractéristique d'un groupement carbonyle blindé par effet mésomère. Cela peut être le cas de certains carbones d'énol. Nous pouvons ainsi compléter notre hypothèse de structure pour M2 (Figure 81).

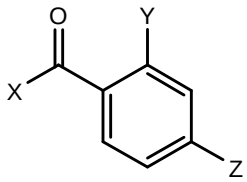


Figure 81 : Hypothèse de structure de M2

L'analyse de la partie aliphatique a permis de

- confirmer les enchaînements identifiés à l'aide des TOCSY permettant d'observer les couplages longue distance entre ^{1}H-^{1}H.
- montrer la présence de différents atomes de carbone non protonés confirmée par des HMBC ^{1}H-^{13}C (Figure 82).

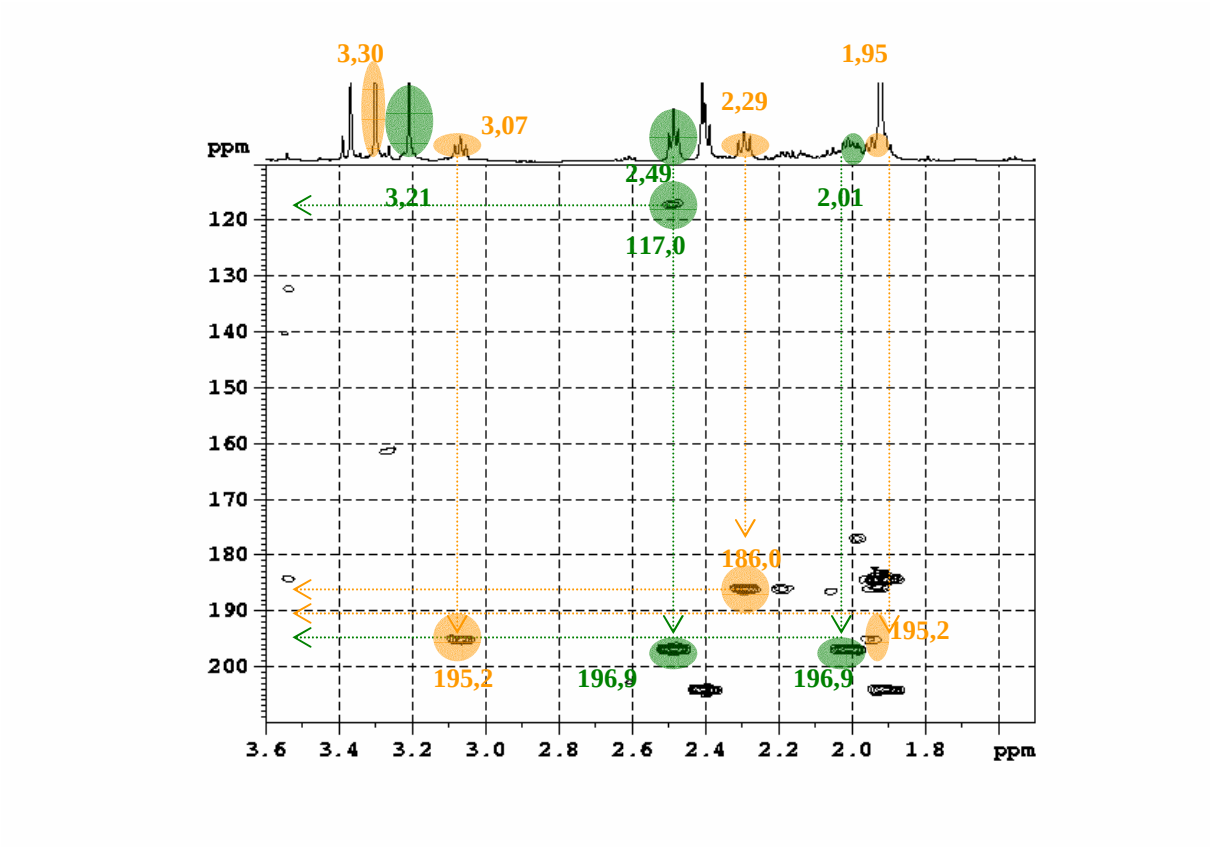


Figure 82 : HMBC ^{1}H-^{13}C d'un échantillon de biodégradation de la mésotrione (5 mM) (To + 5 h)

Le triplet du métabolite M2 résonant à 2,49 ppm est couplé avec un carbone résonant à 196,9 ppm, attribué à une fonction cétone vraisemblablement impliquée dans un équilibre

céto-énolique. Ceci est confirmé par le couplage ^{3}J de ce même triplet avec un carbone résonant à 117,0 ppm, caractéristique d'un carbone d'énol. Une HSQC a montré que ce carbone ne portait pas de proton. En combinant ces informations avec celles obtenues par LC/RMN, il s'avère qu'une structure de type cyclohexane-1,3-dione est conservée dans M2 (Figure 83).

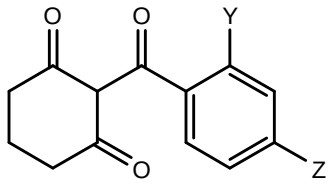


Figure 83 : Structure proposée pour M2

Dans la littérature, aucune étude ne relate la transformation biotique d'un groupement méthylsulfone. Afin de savoir si le groupement méthyle observé à 3,21 ppm (M2) est bien celui d'un groupement méthylsulfone (substituant Z), des expériences de type CIGAR-HMBC ont été réalisées avec succès. Ces expériences permettent *a priori* de couvrir une gamme plus importante de couplages scalaires ^{1}H-^{13}C, typiquement de 2 à 10 Hz. Cependant, certains « trous » d'excitation ont été constatés par rapport à l'expérience HMBC « standard ». L'utilisation d'excitations sélectives ^{13}C (impulsion adiabatique de type Crp60, 500 µs) n'a pas permis d'améliorer ces problèmes d'excitation. Quoiqu'il en soit, ces dernières expériences ont permis de corréler le groupement méthyle résonant à 3,21 ppm avec un carbone résonant à 143,8 ppm, attribué au carbone « d » du cycle aromatique. Il semble donc qu'un groupement méthylsulfone soit toujours présent.

Des expériences HMBC ^{1}H-^{15}N ne nous ont pas permis d'observer de corrélation entre le proton à 6,77 ppm (« c ») et un atome d'azote en « Y ». Ceci s'explique par l'instabilité 'chimique' de M2 et par sa faible concentration (~ 1 mM au maximum dans les surnageants). La lyophilisation des échantillons ne s'est pas avérée être une alternative pertinente pour résoudre ce problème. En effet, outre la perte totale du métabolite M3 après lyophilisation, la concentration en M2 n'a pas dépassé 2 mM, ce qui est insuffisant pour une détection inverse de l'azote en abondance naturelle.

En résumé, la structure suivante peut être proposée pour le métabolite M2 (Figure 84).

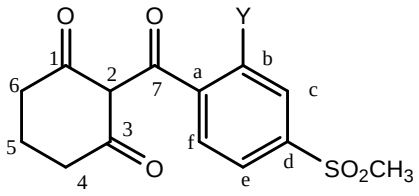


Figure 84 : Structure proposée pour M2

L'attribution des différents signaux est la suivante : 2,01 (H_5), 2,49 (H_4-H_6), 3,21 (CH_3), 6,77 (H_c), 7,05 (H_e), 7,90 (H_f), 23,6 (C_5), 38,2 (C_4-C_6), 45,8 (CH_3), 113,2 (C_c), 114,5 (C_e), 117,1 (C_2), 125,9 (C_a), 135,2 (C_f), 143,9 (C_d), 152,4 (C_b), 177,8 (C_7) et 196,9 (C_1-C_3).

En ce qui concerne le métabolite M3, une approche similaire a permis une attribution partielle des signaux ^{1}H et ^{13}C et de proposer la structure suivante (Figure 85) :

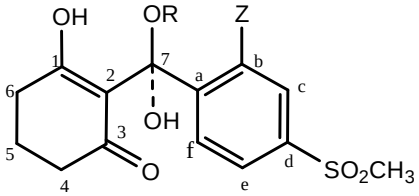


Figure 85 : Structure proposée pour M3

L'attribution des différents signaux est la suivante : 1,95 (H_5), 2,29 (H_4 ou H_6 ?), 3,07 (H_4 ou H_6 ?), 3,30 (CH_3), 7,40 (H_e), 7,86 (H_c), 7,97 (H_f), 25,1 (C_5), 40,1 (C_4 ou C_6 ?), 40,7 (C_4 ou C_6 ?), 46,4 (CH_3), 115,1 (C_c), 117,2 (C_e), 126,4 (C_f), 129,4 (C_a), 140,1 (C_d ou C_b), 141,1 (C_b ou C_d), 160,1 (C_7 ?), 186,0 (C_1 ou C_3) et 195,2 (C_1 ou C_3).

Toutefois, des incertitudes subsistent quant à l'attribution de certains signaux. Les limites de la RMN sur des mélanges complexes en faibles concentrations semblent atteintes.

Nous avons alors repris l'interprétation des analyses effectuées par LC/ESI-MS et LC/ESI-MS/MS sur ces échantillons à l'aide d'une démarche analogue à celle décrite pour le métabolite M1 : présence d'azote, compositions élémentaires des ions parents et des ions fils en MS^2 et analyse relative des profils isotopiques.

III.1.2 Analyse par LC-UV-MS

Les Figure 86 et Figure 87 correspondent aux spectres de masse des métabolites M2 et M3 à la fois en (+)ESI et en (-)ESI. En (+)ESI, seuls deux ions à m/z 133 et 212 différencient les deux composés.

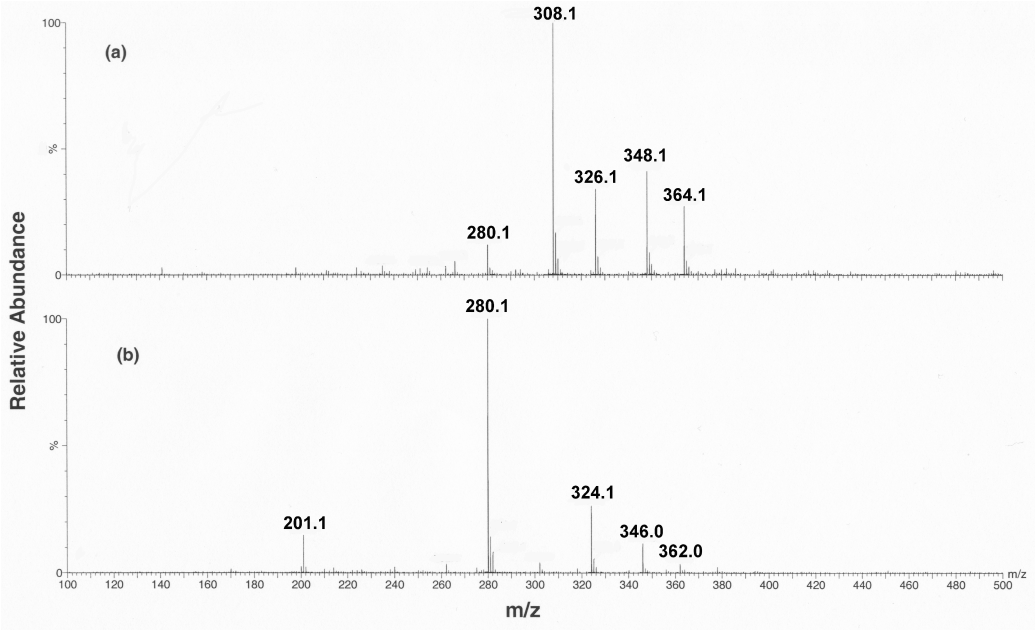


Figure 86 : Spectres LC-ESI-MS de M2 (a) (+)ESI et (b) (-) ESI

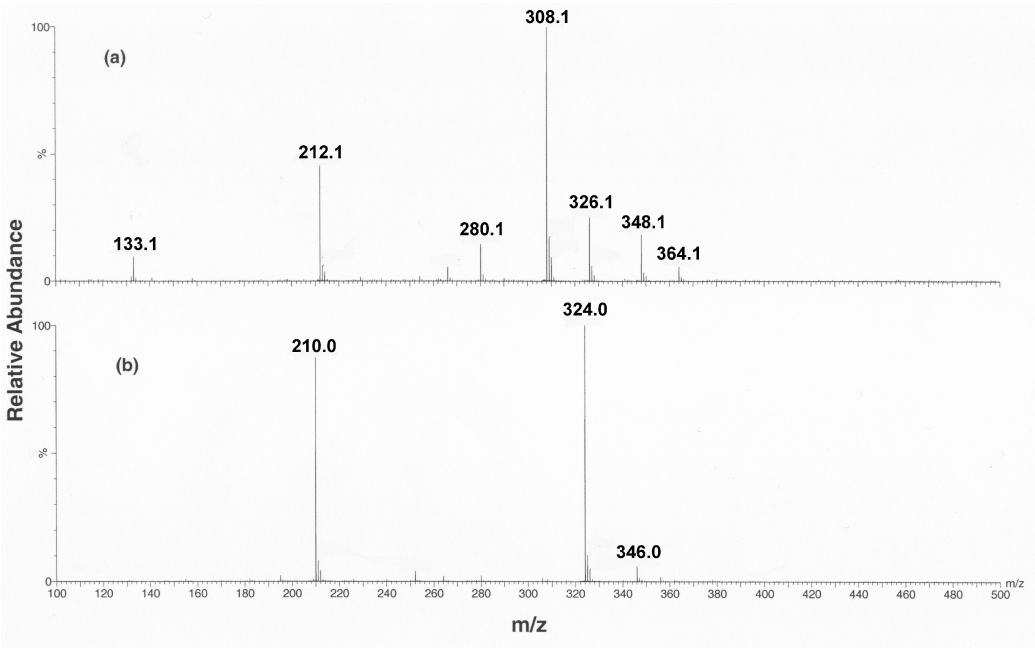


Figure 87 : Spectres LC-ESI-MS de M3 (a) (+) ESI et (b) (-) ESI

Que ce soit pour M2 ou M3, l'intensité de l'ion à m/z 308 diminue relativement à celle de l'ion à m/z 326 lorsque la tension de cône (de Taylor) passe de 35 V à 15 V. Ceci suggère que l'ion à m/z 308 résulte d'une fragmentation de l'ion 326 au sein de la source, vraisemblablement due à la perte d'une molécule d'eau. L'ion quasimoléculaire serait donc l'ion m/z 326 $[M+H]^+$ et les ions à m/z 348 et 364 correspondraient respectivement aux adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$. De tels complexes impliquant des métaux alcalins sont fréquents avec des composés de type β-dicétone (Hall et Brodbelt, 1999).

Les spectres de M2 et M3 enregistrés en (-)ESI (Figure 86b et Figure 87b) semblent confirmer une masse de m/z 324 pour l'ion quasimoléculaire $[M-H]^-$. La présence d'adduits sodium $[M-2H+Na]^-$ est également observée à m/z 346. D'autres ions fragments différencient les deux métabolites (m/z 280, 201 et 210).

Le premier enseignement résultant de ces données de MS (Mass Spectroscopy) est la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote, raisonnablement un.

L'analyse des profils isotopiques indique la présence d'un atome de soufre pour M2 et M3 (pic à [M+2]). Ceci est cohérent avec la présence d'un groupement méthylsulfone suggérée par les données de RMN. De plus, ces profils isotopiques ont montré que les ions sont tous monochargés.

Ces résultats sont confortés par des compositions élémentaires identiques déterminées en (-)ESI et (+)ESI avec un écart de 0,7 et 1,5 mDa par rapport aux masses calculées pour M2 et M3 respectivement : $C_{14}H_{14}NO_6S^-$.

La première hypothèse envisagée a été de considérer M2 et M3 comme deux isomères de position, correspondant à des formes tautomères différentes. Une telle barrière énergétique bloquant cet équilibre nécessiterait la présence de liaisons hydrogène fortes. Un écart aussi important en temps de rétention pour deux formes tautomères a été décrit dans la littérature pour une autre molécule, la chlortetracycline (Cherlet *et al.*, 2006). Cependant, nous avons exclu cette hypothèse pour deux raisons :

- la mésotrione et son homologue chloré (la sulcotrione) ne présentent pas ce phénomène,
- le composé M3 a totalement disparu après 22 h d'incubation, alors que M2 est toujours présent sur les chromatogrammes UV et TIC jusqu'à 80 h.

Il nous fallait donc identifier le type de fonction azotée présente sur le cycle aromatique.

D'après l'étude bibliographique réalisée, les composés nitroaromatiques peuvent être biodégradés en aérobiose ou en anaérobiose, la fonction nitro subissant différentes étapes de réduction conduisant à la fonction hydroxylamine, et allant parfois jusqu'à l'amine. Certaines hydroxylamines peuvent également subir un réarrangement enzymatique (analogue à celui de

Bamberger) par une mutase pour conduire à un dérivé aminophénol en -1,2 ou -1,4. (Figure 88).

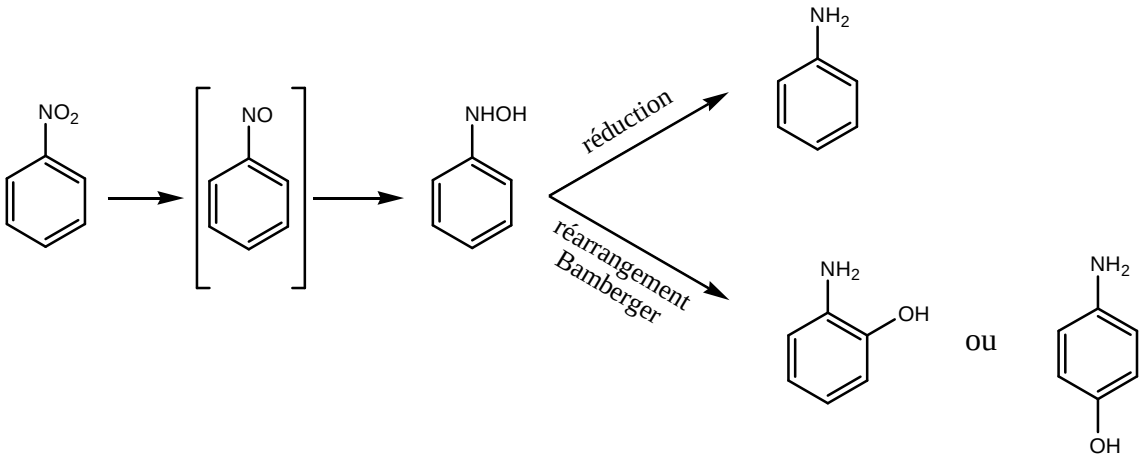
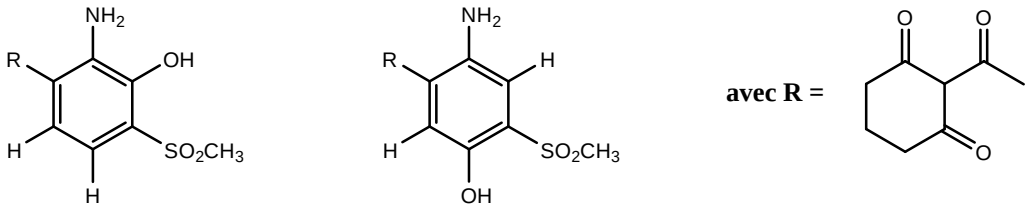


Figure 88 : Voies de biodégradation possibles des composés nitroaromatiques

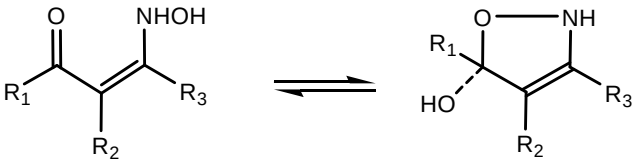
Avec une masse apparente de 325, M2 et M3 semblent correspondre à des produits de réduction de la mésotrione du type hydroxylamine ou aminophénols. Toutefois, les données de RMN ^{1}H permettent d'éliminer l'hypothèse d'une structure de type aminophénols. En effet, une telle structure impliquerait la présence sur le spectre de RMN ^{1}H soit de deux doublets résultant du couplage scalaire des deux protons adjacents (1,2-aminophénol), soit de deux singulets (1,4-aminophénol) (Figure 89). Or nous observons un doublet et deux doublets de doublet.



1,2-aminophénol **1,4-aminophénol**

Figure 89 : Structures de type aminophénol envisageables

Il s'agirait donc d'une fonction de type hydroxylamine. Cependant M2 et M3 ont des structures différentes. La présence d'une fonction carbonyle en position *gamma* par rapport à l'hydroxylamine permet d'envisager l'équilibre suivant (Figure 90):



Hydroxylamine
λ = 355 nm

Isoxazol-3-ol
λ = 315 nm

Figure 90 : Equilibre hydroxylamine-isoxazol-3-ol (Barth *et al.*, 1997)

Ce type d'équilibre a déjà été étudié sur d'autres familles de molécules, notamment par infra-rouge en temps résolu et par spectrophotométrie UV (Barth *et al.*, 1997 ; Uncuta *et al.*, 2003). Ces différents travaux indiquent que les deux formes (ouverte et cyclisée) présentent un maximum d'absorption en UV caractéristique : 315 nm pour la forme cyclisée et 355 nm pour la forme ouverte (Figure 90).

Notre hypothèse semble être confirmée par l'analyse UV-visible de nos échantillons. Le spectre de M2 est présenté sur la Figure 91.

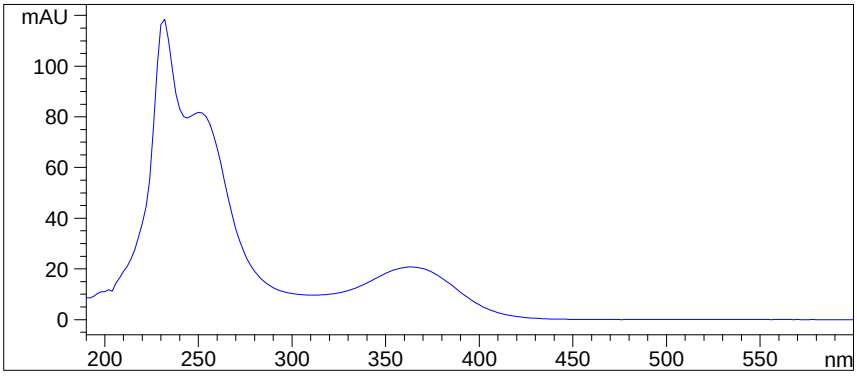


Figure 91 : Spectre UV visible de M2

Un des maxima de ce spectre est à 355 nm. M2 pourrait donc être substitué par une fonction hydroxylamine –NHOH (cf. groupement Y de la Figure 84).

Le spectre UV visible de M3 est présenté à la Figure 92.

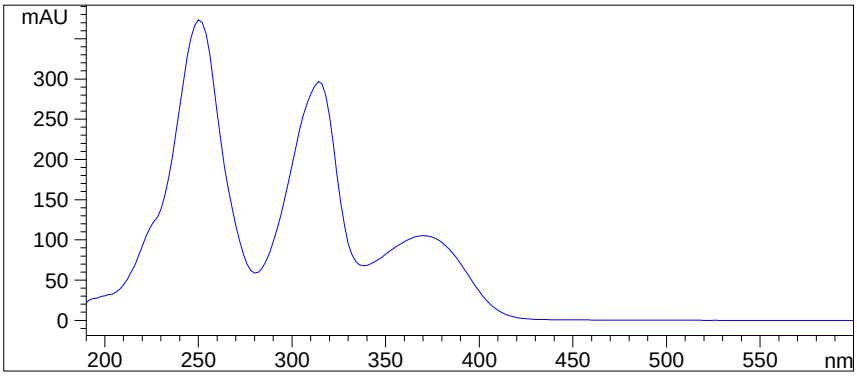
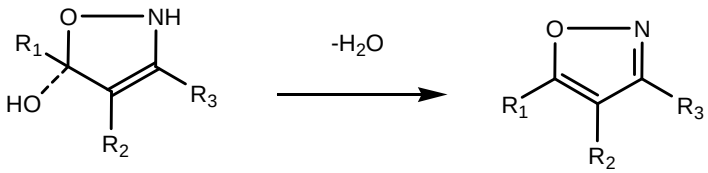


Figure 92 : Spectre UV-visible de M3

Un des maxima de M3 est 315 nm, ce qui correspondrait à une structure de type isoxazol-3-ol.

Les isoxazol-3-ols sont relativement instables. Ils se déshydratent facilement pour former des isoxazoles (Figure 93).



Isoxazol-3-ol
$\lambda = 315$ nm

Isoxazole

Figure 93 : Déshydratation de l'isoxazol-3-ol pour former l'isoxazole

Uncuta *et al.* (2003) ont montré que cette réaction abiotique est favorisée en conditions aérobies. Ceci expliquerait que le métabolite M3 se dégrade très vite à température ambiante en présence d'oxygène.

Deux structures complètes ont ainsi pu être proposées pour M2 et M3 (Figure 94).

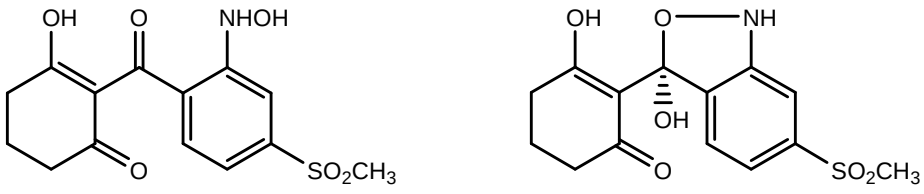


Figure 94 : Structures proposées pour M2 et M3

Des expériences en MS/MS (à différentes énergies de collision) nous ont permis d'établir les séquences de fragmentation suivantes :

- m/z 326→308→280→238 en (+)ESI (Figure 86a) et m/z 324→280 en (-)ESI (Figure 86b) pour M2.

- m/z 326→308→280 d'une part et m/z 326→212 d'autre part en (+)ESI (Figure 87a) et m/z 324→210 en (-)ESI (Figure 87b) pour M3.

La fragmentation m/z 326→212 est une fragmentation de type CID, se produisant dans la source.

Nous avons ainsi pu proposer différents mécanismes de fragmentation en électrospray, à la fois en mode positif et en mode négatif (Figure 95 et Figure 96). Ces mécanismes confortent les structures proposées pour M2 et M3.

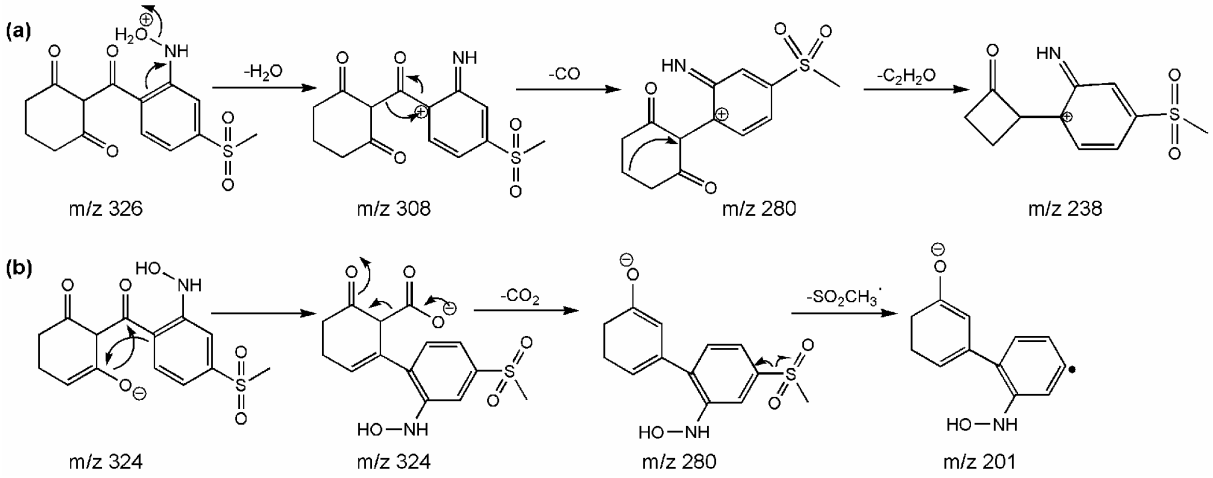


Figure 95 : Mécanismes de fragmentation proposés pour M2 (a) en (+)ESI et (b) en (-)ESI

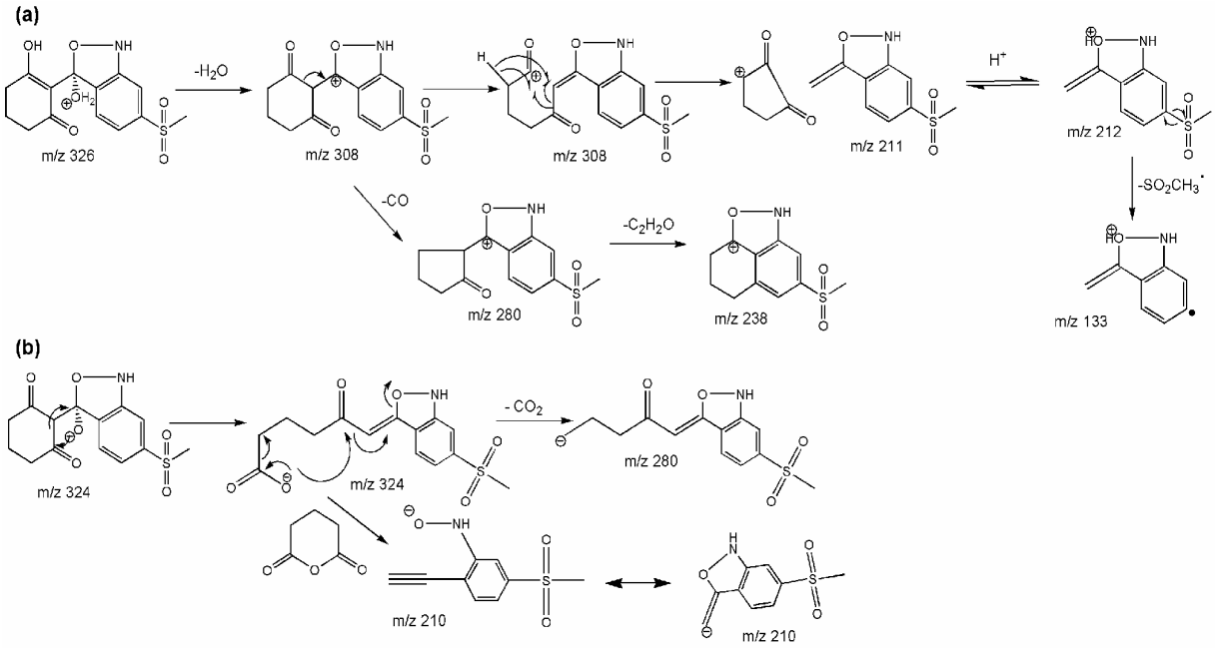


Figure 96 : Mécanismes de fragmentation proposés pour M3 (a) en (+)ESI et (b) en (-)ESI

III.2 Identification du métabolite M4

Si les structures de M2 et M3 proposées sont exactes, l'isoxazole issu d'une réaction de déshydratation quasi-spontanée devrait être également présent dans les surnageants (Figure 97).

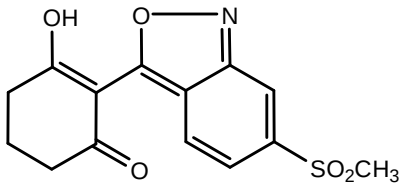


Figure 97 : Structure de l'isoxazole attendu

L'isoxazole attendu a donc été synthétisé à partir de la mésotrione par une réduction de type Clemensen ($SnCl_2$ dans l'éthanol à 70°C), purifié puis analysé par HPLC. Son temps de rétention de 12,6 min et son spectre UV sont identiques à celui du métabolite M4. Une coélution entre le produit synthétisé et un échantillon du milieu d'incubation a permis de confirmer la présence de cet isoxazole dans nos échantillons.

Les spectres de masse de M4 et du produit de synthèse sont eux aussi identiques. La caractéristique majeure est l'absence de fragments significatifs sur les spectres, que ce soit en CID ou en augmentant l'énergie de collision en MS/MS. Ceci s'explique par la stabilisation

importante de cette structure par mésomérie. La composition élémentaire, déterminée à partir des masses mesurées (erreur de 0,7 mDa), est bien $C_{14}H_{14}NO_8SNa^+$ en (+)ESI.

Le métabolite M4 (isoxazole) a également été identifié sur les spectres RMN ^1H des surnageants de biodégradation de la mésotrione, par comparaison avec le spectre du produit de synthèse enregistré dans les mêmes conditions de pH et de concentration (Figure 98).

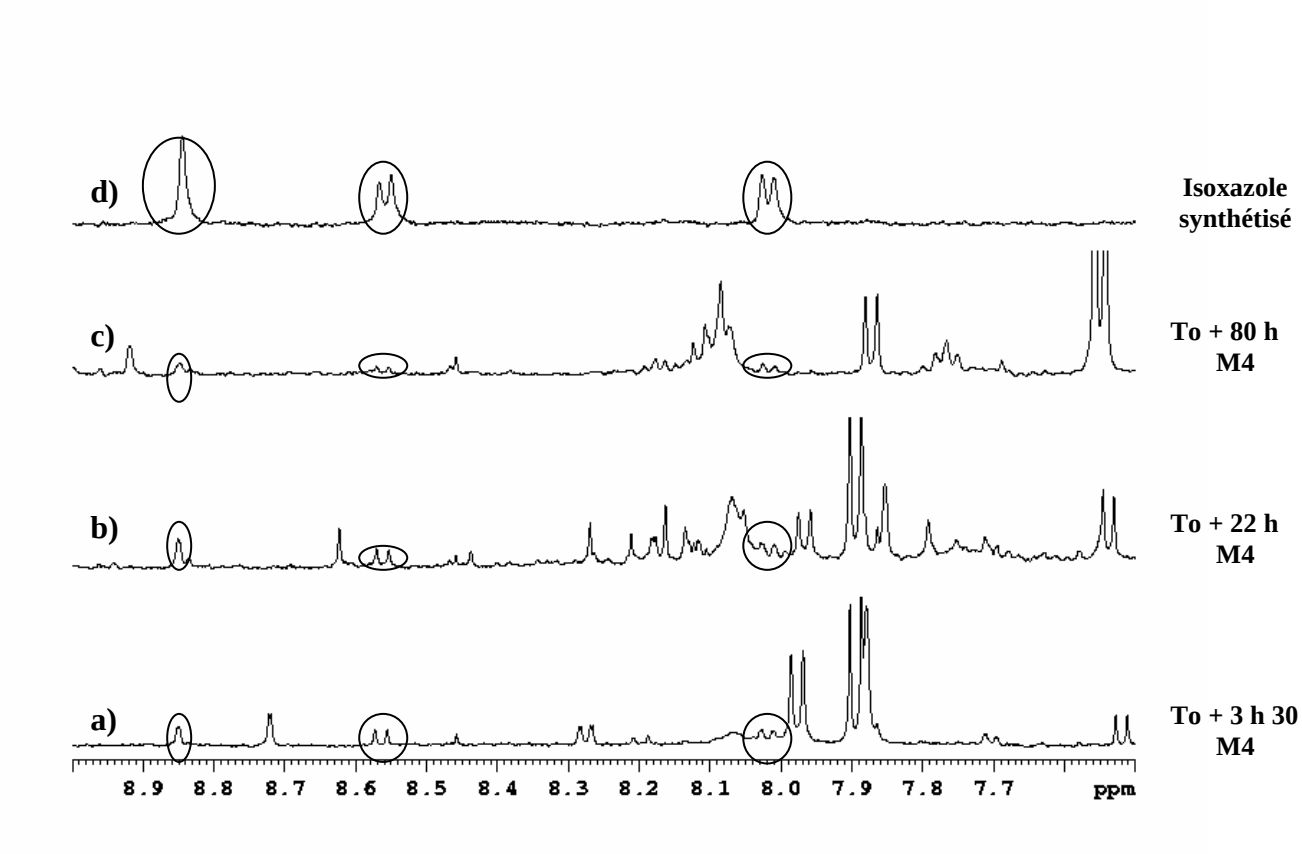
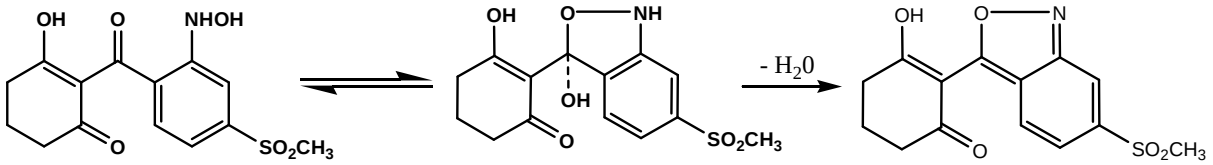


Figure 98 : Spectres RMN ^1H (zone aromatique) d'échantillons de biodégradation de la mésotrione 1 mM (a, b et c) et de l'isoxazole synthétisé (d)

Ainsi, de façon indirecte, la présence de cet isoxazole confirme la présence de l'hydroxylamine et de l'isoxazol-3-ol correspondants.

Le métabolite M2 est donc en équilibre avec le métabolite M3, qui conduit par déshydratation au métabolite M4 suivant le schéma présenté sur la Figure 99:



M2 **M3** **M4**

Figure 99 : Structures des métabolites M2, M3 et M4

Seul un bilan quantitatif nous permettrait *a priori* de savoir si le métabolite M4 peut être produit directement à partir de M2 (ou de la mésotrione) ou s'il provient exclusivement de la transformation abiotique de M3.

III.2.1 Identification du métabolite M5

Le métabolite M5 (t_R = 12,3 min.) apparaît de façon significative à partir de 25 h d'incubation environ (Figure 67et Figure 68) et sa concentration semble rester constante au cours du temps. Son spectre UV-visible ne nous a pas permis pas de confirmer la présence ou non d'une fonction hydroxylamine, de nombreux équilibres céto-énoliques et/ou la présence de liaisons hydrogène pouvant modifier les maxima d'absorption.

Les analyses par LC/RMN ne nous ont pas permis d'obtenir son spectre de RMN ^{1}H, sa concentration restant trop faible, même après concentrations successives par lyophilisation des quelques échantillons contenant le métabolite M5.

Nous nous sommes alors focalisés sur les résultats de la spectrométrie de masse.

Les spectres LC/ESI-MS et LC/ESI-MS/MS de M5 en modes positif et négatif, enregistrés après 98 h d'incubation, sont présentés sur la Figure 100.

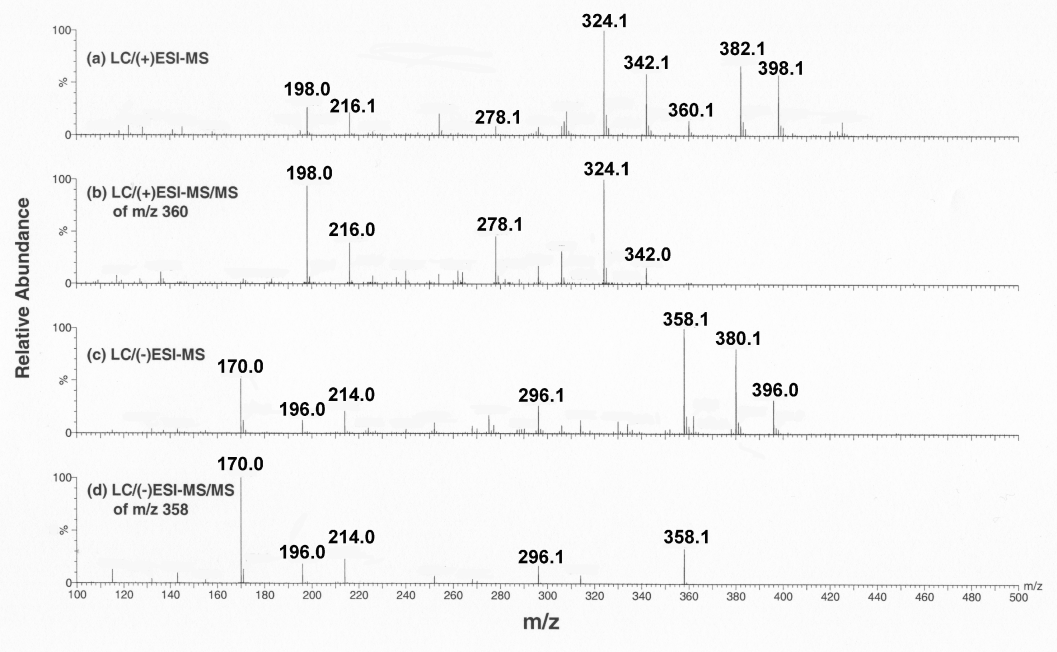


Figure 100 : Spectres LC/ESI-MS (a et c) et LC/ESI-MS/MS (b et d) du composé M5

La comparaison des spectres (+)ESI et (-)ESI nous a permis de déterminer une masse apparente de 359 (Figure 100). La présence d'adduits sodium et potassium de forte intensité pourrait indiquer la présence d'une dicétone, très bon ligand de métaux alcalins.

La fragmentation en MS/MS de l'ion quasimoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 360 révèle la présence d'au moins deux molécules d'eau en (+)ESI. Un ion à m/z 306 semble indiquer la perte d'une troisième molécule d'eau. De plus, la présence d'ions fragments à m/z 216 et 198 suggère une structure proche de celle du métabolite M1, dont les deux ions caractéristiques sont identiques en (+)ESI. Ces fragmentations se produisent dans la source, même pour des tensions de cône basses. En (-)ESI, nous retrouvons les ions caractéristiques de M1 à m/z 214 et 170 ce qui confirme l'hypothèse faite en (+)ESI. La transition m/z 214 → 170 est caractéristique de la perte d'une molécule de CO_2, suggérant la présence d'une fonction carboxylate dans la structure de M5.

La masse de M5 plus élevée que celle de la mésotrione ou des métabolites précédemment décrits laisserait présumer d'un produit d'oxydation. D'autre part, une ouverture de cycle en position 2 par rapport aux deux fonctions carbonyle a été proposée comme voie possible de dégradation de la sulcotrione, analogue chloré de la mésotrione (Rouchaud *et al.*, 1998a). Par ailleurs, plusieurs études relatent la métabolisation du cyclohexane en cyclohexanone, cette dernière étant hydroxylée en position 2 par rapport à la fonction cétone (Grogan, 2005 ; Hoehle *et al.*, 2006 ; Straganz *et al.*, 2002). Sur la base de ces

données et d'après l'analyse des spectres MS/MS obtenus en (-)ESI et (+)ESI, nous avons proposé la structure suivante pour le métabolite (Figure 101).

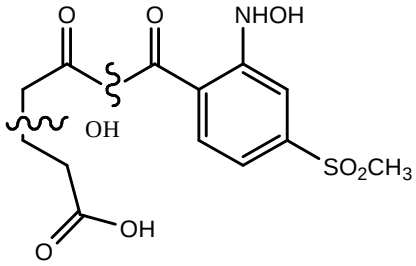


Figure 101 : Structure proposée pour le métabolite M5

Les compositions élémentaires déterminées à partir des masses mesurées sont en accord avec cette structure : $C_{14}H_{16}NO_8S^-$ (erreur : 0,7 mDa) en (-)ESI et $C_{14}H_{18}NO_8S^+$ (erreur : 5,1 mDa) en (+)ESI. Les profils isotopiques confirment la présence d'un atome de soufre.

Enfin, les mécanismes proposés de fragmentations tendent à confirmer cette structure (Figure 102).

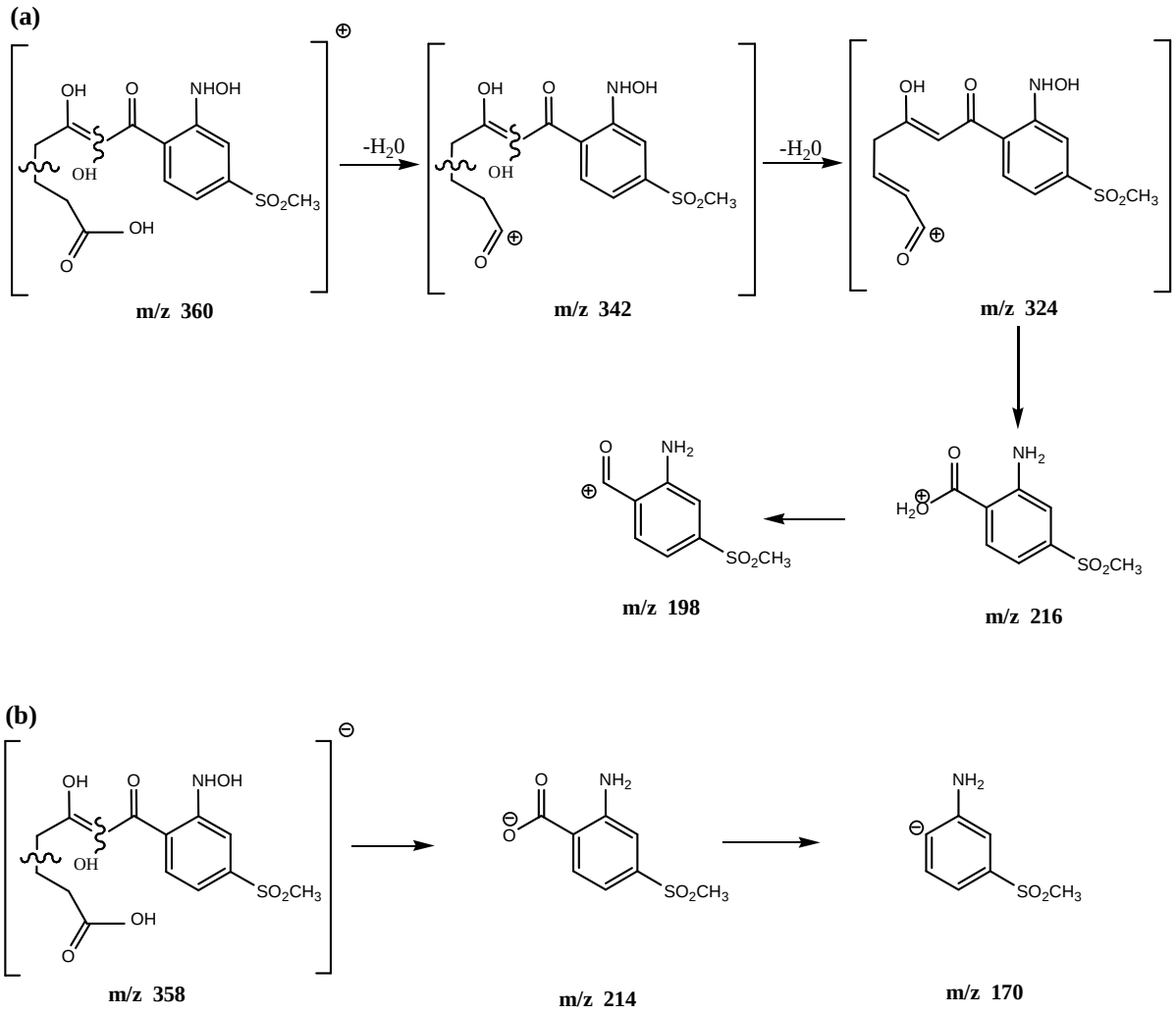


Figure 102 : Mécanismes de fragmentation proposés pour le métabolite M5 (a) en (+)ESI et (b) en (-)ESI

Remarque : Un dernier métabolite avec un t_R de 10,5 min a été détecté dès 8 h d'incubation. Sa concentration semble rester constante tout au long de la cinétique. Avec une masse apparente de 365, nous pouvions penser à un dérivé conjugué de type glutathion ou glucuroconjugué. Toutefois, aucune hypothèse de structure ne semble correspondre avec la présence de tels dérivés.

Le spectre UV-visible de ce métabolite présente deux maxima d'absorption à 415 et 510 nm, ce qui suggère la présence d'une structure chimique très conjuguée (Figure 103).

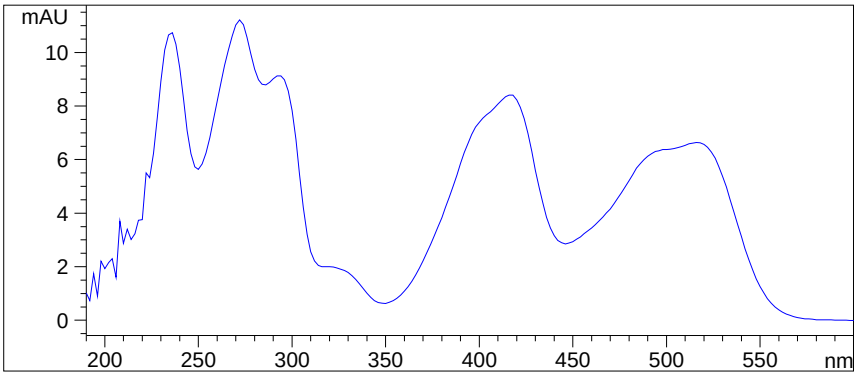


Figure 103 : Spectre UV-visible d'un métabolite ayant un t_R de 10,5 min

Les hydroxylamines peuvent former des dimères pour conduire à des composés de type azoïque. Nous n'avons pas pu confirmer la présence d'une fonction azo. Cependant, celle-ci expliquerait les maxima d'absorption dans le visible observés. Certains signaux très déblindés sur les spectres de RMN ^{1}H des surnageants pourraient correspondre avec des protons de composés aromatiques diazoïques.

III.3 Devenir de la partie « cyclohexanedione »

La présence de AMBA (M1) indique clairement que la partie non aromatique de la mésotrione (cyclohexane-1,3-dione) est affectée au cours de la biotransformation.

La fonction nitro est réduite (par une nitroréductase) en hydroxylamine pour conduire à M2. Cette fonction peut alors « spontanément » jouer le rôle de nucléophile au cours d'une addition nucléophile intramoléculaire conduisant à M3. Ce dernier perd facilement une molécule d'eau pour former l'isoxazole M4, en particulier dans des conditions aérobies. Les analyses par RMN ^{1}H *in situ* et par HPLC ont montré que lorsque les concentrations en M2 et M3 diminuaient, celle en AMBA augmentait. Ce résultat suggère que la partie cyclohexane-1,3-dione est « libérée » à partir de M2 et/ou M3. Cette transformation peut être envisagée après hydroxylation du cycle cyclohexane-1,3-dione suivie de son ouverture, puis rupture de la liaison exocyclique ou directement par hydroxylation et rupture de cette liaison exocyclique. Dans ce dernier cas, la cyclohexanedione serait susceptible d'être retrouvée dans le milieu d'incubation (à condition qu'elle ne soit pas métabolisée rapidement).

La structure proposée pour M5 permet d'envisager une rupture oxydative de la partie cyclohexane-1,3-dione avant que la liaison exocyclique ne soit rompue. Dans ce contexte, M5 proviendrait raisonnablement de M2.

Enfin le AMBA (M1), présent dès le début de la cinétique, pourrait également provenir de la dégradation du MNBA, détecté en très faibles concentrations par RMN ^{1}H *in situ*.

Ces différentes voies sont *a priori* compatibles avec la présence de cyclohexane-1,3-dione dans le milieu. Cependant, ni les analyses par RMN ^{1}H *in situ*, ni les analyses par LC/MS ne nous ont permis de détecter ce métabolite présumé.

Nous avons alors recherché des métabolites potentiels de la cyclohexane-1,3-dione. Le glutarate est certainement l'un des candidats les plus sérieux en tant que métabolite (Figure 104).

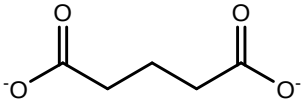


Figure 104 : Structure du glutarate

Le glutarate n'a pu être détecté par LC/MS. En revanche, une analyse détaillée des spectres de RMN a montré la présence d'un triplet et d'un quintuplet résonant à 2,19 et 1,79 ppm respectivement et appartenant au même réseau de spins (d'après une expérience TOCSY), le triplet correspondant *a priori* à 4 protons, le quintuplet à 2. L'interprétation des HMBC ^{1}H-^{13}C a montré la présence de trois atomes de carbone non équivalents résonant à 25,7, 40,3 et 186,0 ppm (Figure 105). L'ajout de glutarate dans le milieu a confirmé sa présence en tant que métabolite même si des traces de ce composé ont été observées dans des cinétiques témoins ne comportant pas de mésotrione.

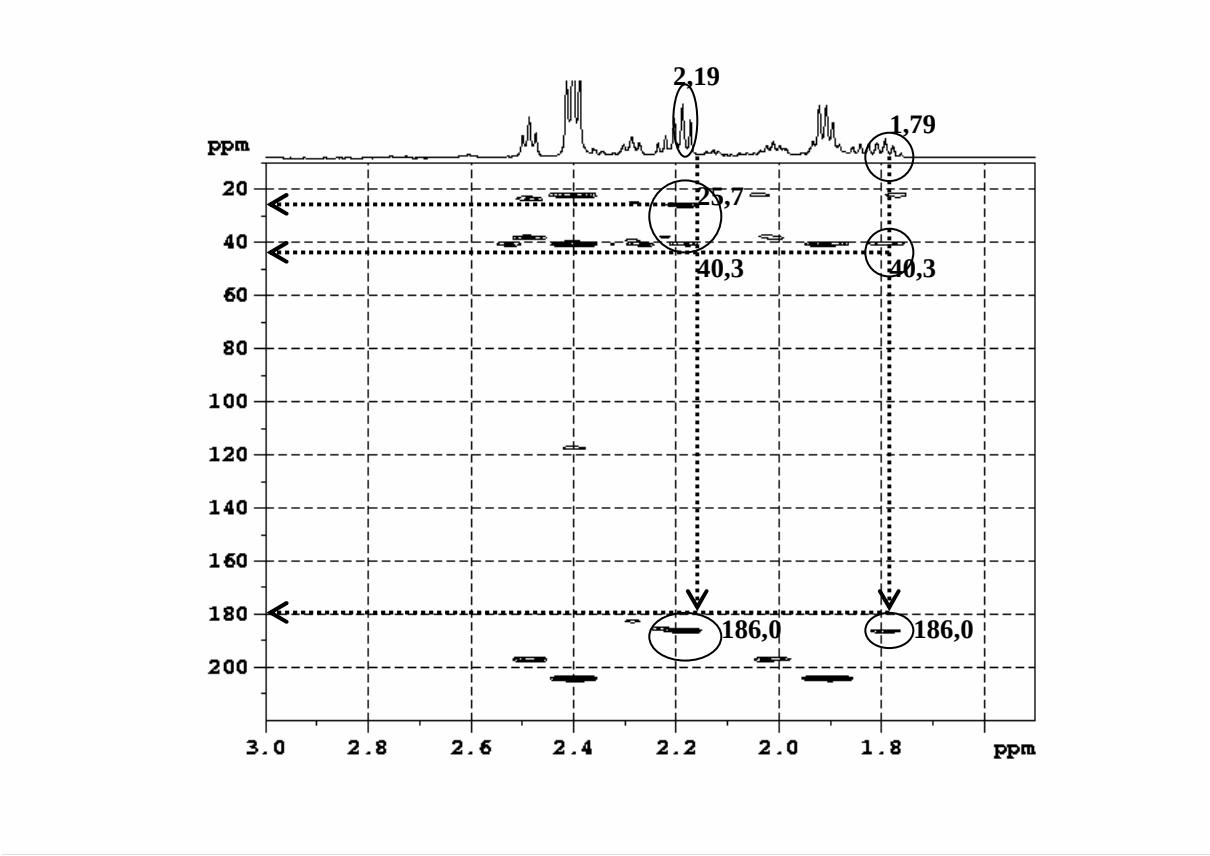


Figure 105 : HMBC ^{1}H-^{13}C d'un échantillon d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione à 10 mM (To + 8 h)

Un premier schéma métabolique de dégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 a ainsi pu être proposé (Figure 106).

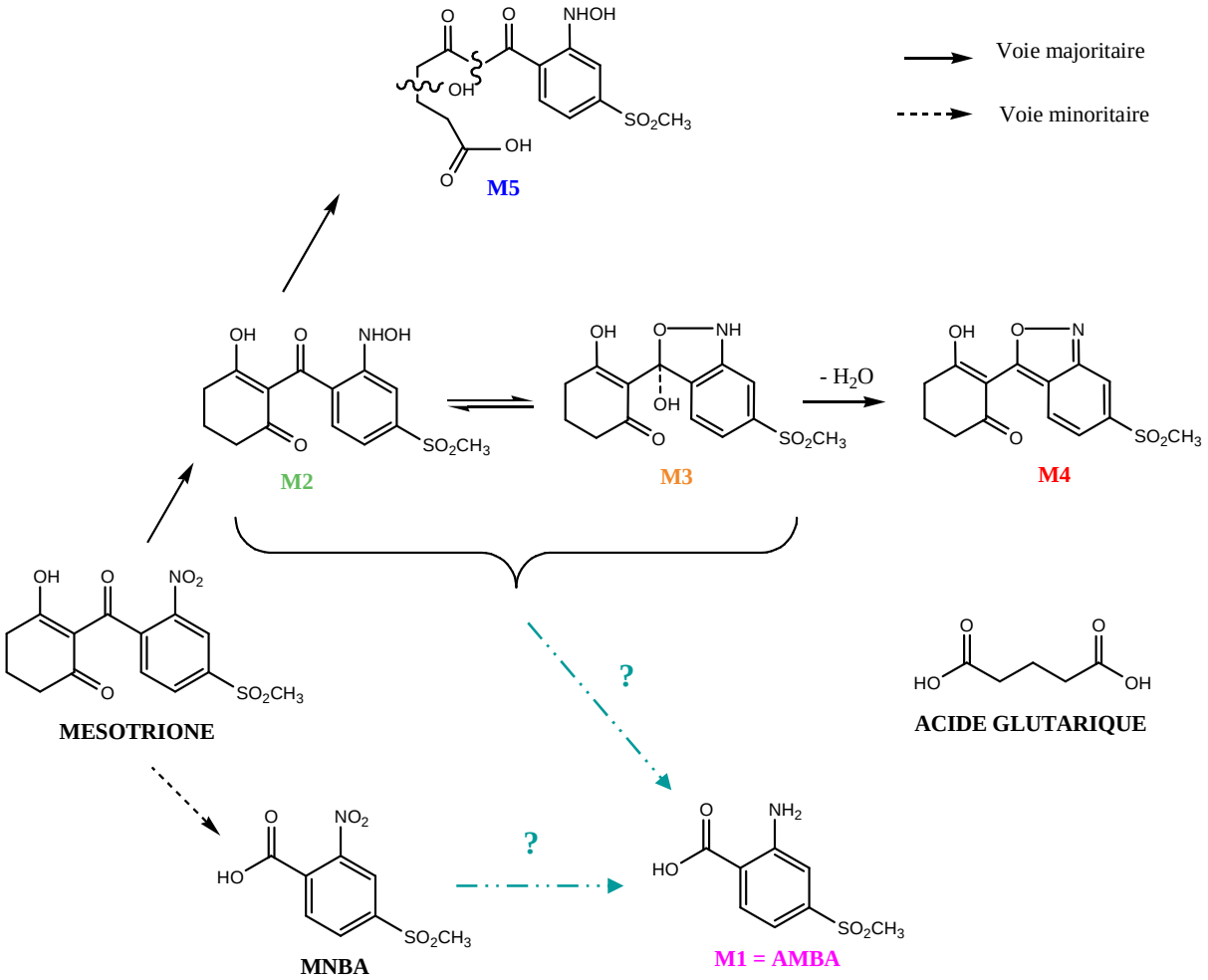


Figure 106 : Schéma proposé de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Un bilan quantitatif du suivi de l'ensemble des métabolites identifiés devrait nous permettre de conforter ce schéma métabolique.

IV BILAN QUANTITATIF DU METABOLISME DE LA MESOTRIONE PAR *BACILLUS* SP. 3B6.

Seuls les métabolites M1 et M4, disponibles respectivement sous forme d'un standard donné par la société Syngenta et d'un composé que nous avons synthétisé, ont pu être suivis quantitativement par HPLC en complément des analyses par RMN ^{1}H.

IV.1 Mise au point sur les conditions d'analyses quantitatives

La Figure 107 présente l'évolution du métabolite M1 (AMBA) pour des concentrations initiales en mésotrione de 1 et 5 mM, à la fois par HPLC et par RMN.

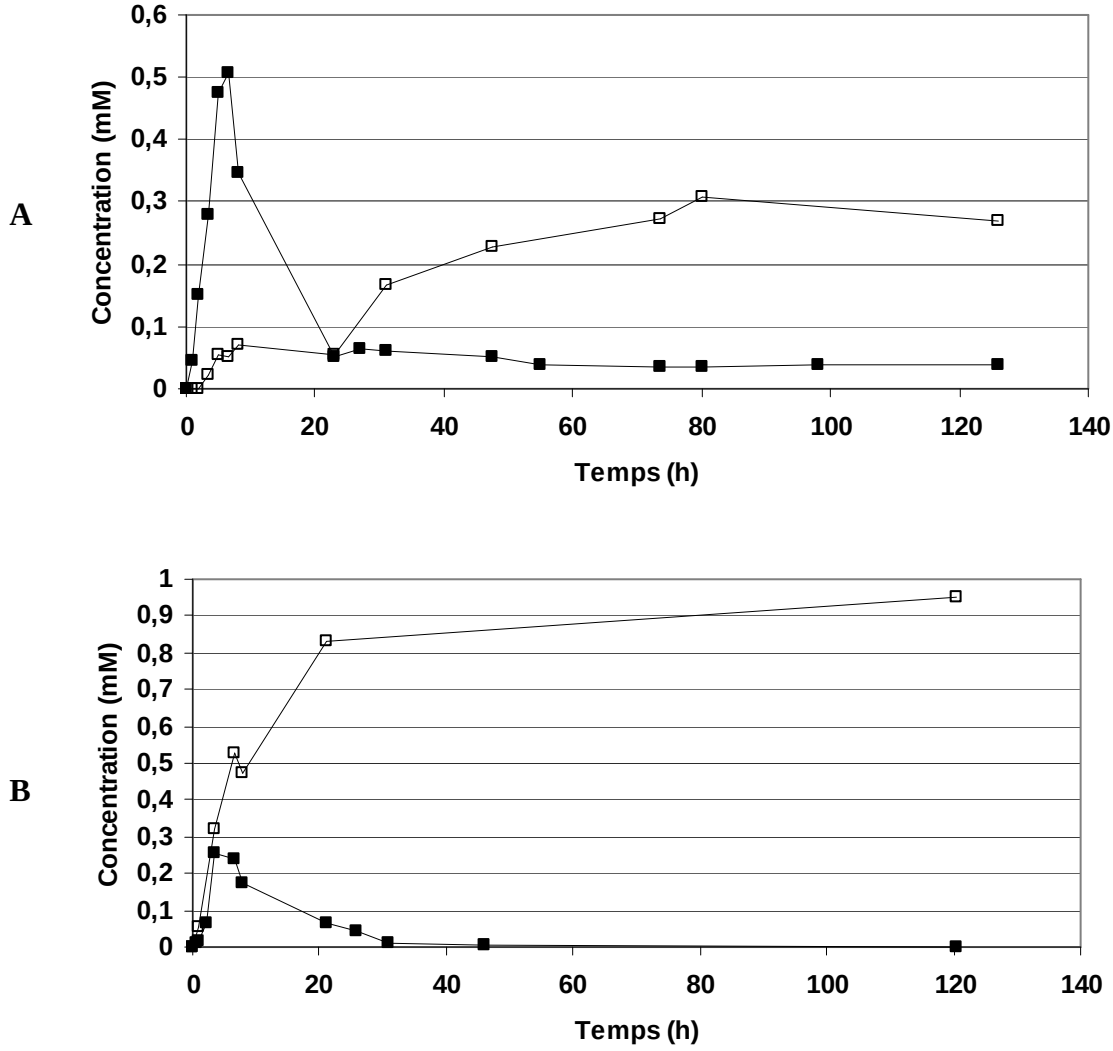


Figure 107 : Cinétiques d'apparition du AMBA (M1) lors de biodégradation de la mésotrione (1 mM (A) et 5 mM (B)) analysées par HPLC (■) et par RMN ^{1}H (□)

Les analyses par HPLC et RMN indiquent de façon surprenante des cinétiques totalement différentes : formation puis dégradation du AMBA d'après les résultats HPLC et accumulation d'après ceux obtenus par RMN. L'ordre d'injection des échantillons en HPLC (fortes concentrations en premier ou non) n'est pas à l'origine de cette différence. De plus, des étalonnages répétés à partir de standards de AMBA ont montré que la méthode chromatographique choisie est répétable et reproductible, comme l'analyse par RMN ^{1}H. Il ne peut donc y avoir de saturation de la colonne HPLC par le AMBA. Enfin, les étalonnages effectués entre deux séries d'analyse de surnageants de biodégradation se sont avérés corrects. Il semble donc qu'un « effet de matrice » soit à l'origine de ces artéfacts en HPLC. Dilués dans la phase mobile (ACN / eau acidifiée, pH 2,6), certains échantillons issus de cinétiques

de biodégradation et de témoins présentent un précipité qui pourrait expliquer les problèmes rencontrés pour la quantification par HPLC.

Pour tenter de confirmer cet effet de matrice, nous avons repris l'ensemble de la démarche analytique.

Différents étalonnages ont donc classiquement été réalisés dans de l'eau ultra-pure et dans la matrice biologique (surnageant de l'essai témoin (cellules seules) prélevé en fin de cinétique) (Figure 108). Pour vérifier que l'ordre d'injection n'entraîne pas de problème pour l'analyse, nous avons utilisé le protocole (chronologique) suivant, chaque injection étant répétée deux fois consécutivement :

i) injection des échantillons d'AMBA dissous dans la matrice biologique, du plus concentré au moins concentré,

ii) réalisation de la droite d'étalonnage dans l'eau ultra pure,

iii) nouvelle injection des échantillons dans la matrice biologique dans l'ordre inverse (c'est-à-dire du moins concentré au plus concentré),

iv) et enfin enregistrement d'une nouvelle gamme étalon à partir des solutions d'AMBA dans l'eau ultra pure.

Les résultats obtenus sur deux séries d'analyse (duplicats) sont présentés sur les Figure 108 et Figure 109.

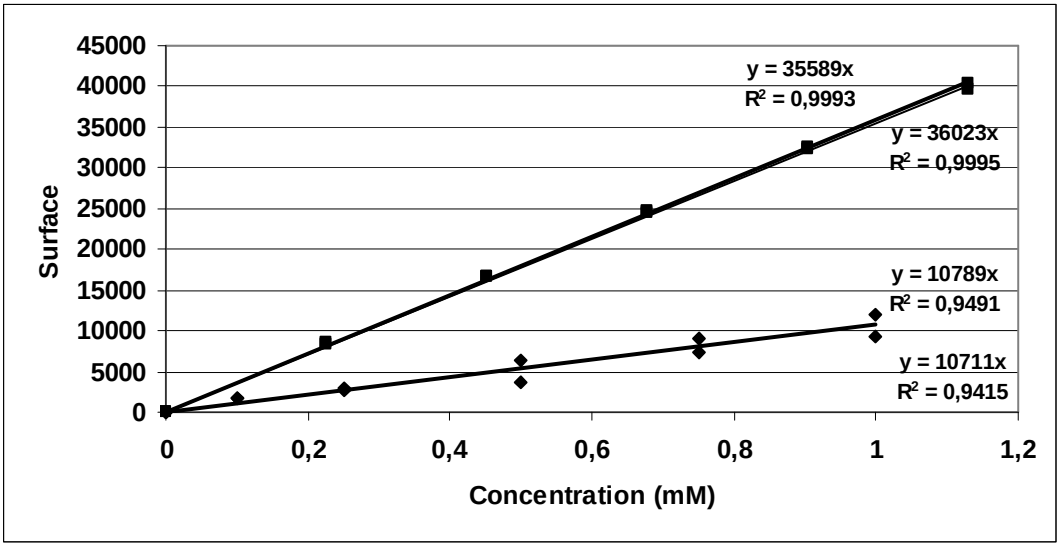


Figure 108 : Comparaison des droites d'étalonnage du AMBA en solution dans l'eau ultra pure (■) et dans la matrice biologique (♦) lors des premières injections (séries i et ii)

Les droites d'étalonnage obtenues dans l'eau ultra pure (étape ii) présentent un coefficient de corrélation très satisfaisant (r^2 = 0,999) sur deux essais consécutifs; ce coefficient est inférieur pour les droites obtenues dans la matrice biologique (r^2 = 0,942 et 949) et l'analyse est « moins » répétable (étape i). En effet, l'écart type sur les deux pentes des droites d'étalonnage dans l'eau ultra-pure est de 237, 6 (178,1 pour l'ordonnée à l'origine) tandis qu'il s'élève à 1028,4 pour les droites d'étalonnage dans la matrice biologique (631,4 pour l'ordonnée à l'origine)

Le test de linéarité de Fischer de la droite d'étalonnage du AMBA dans l'eau ultra-pure et dans la matrice biologique est présenté au Tableau 19:

Tableau 19 : Test de linéarité de Fischer pour les droites d'étalonnage du AMBA dans l'eau ultra-pure (A) et dans la matrice biologique (B)

A

Source des variations	*Somme des carrés*	*Degrés de liberté*	*Variance estimée*	*F*	*Valeur critique à 1%*
Régression	1240470635	1	1240470635	19654,67	16,26
Erreur de modèle	145672	3	48557	0,77	12,06
Erreur expérimentale	315566	5	63113		
Totale	1240931873	9			

B

Source des variations	*Somme des carrés*	*Degrés de liberté*	*Variance estimée*	*F*	*Valeur critique à 1%*
Régression	111072309	1	111072309	66,45	16,26
Erreur de modèle	661121	3	220374	0,13	12,06
Erreur expérimentale	8358190	5	1671638		
Totale	120091620	9			

Ce test confirme que l'erreur sur le modèle est plus élevée dans le cas de la droite d'étalonnage réalisée avec la matrice biologique. Toutefois la linéarité des droites est validée : dans les deux cas, la première valeur du test de Fischer (F) est supérieure à 16,26 (valeur critique à 1 %) et la seconde est inférieure à 12,06 (valeur critique à 1 %).

Les concentrations de AMBA dans la matrice biologique sont fortement erronées, la surface du pic est trois fois plus faible dans le milieu biologique que dans l'eau. L'AMBA semble donc interagir avec la matrice biologique sur la phase stationnaire.

La deuxième série d'injections (sans lavage de la phase stationnaire) (étapes iii et iv) donne des résultats similaires aux précédents (Figure 109).

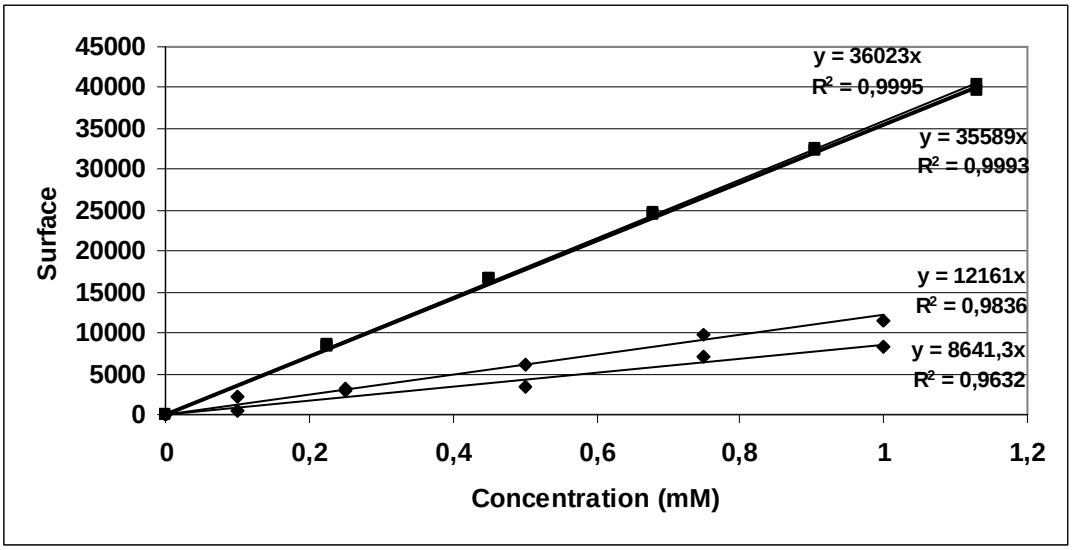


Figure 109 : Comparaison des secondes injections des droites d'étalonnage du AMBA dans l'eau ultra pure (■) et dans la matrice biologique (♦) (séries iii et iv)

Le dosage du AMBA dans la matrice biologique (étape iii) est nettement sous estimé (3 fois plus faible que dans l'eau). L'ordre d'injection ne semble pas être responsable de l'erreur du dosage du AMBA car la droite d'étalonnage dans la matrice biologique est très proche de celle obtenue précédemment, même si le coefficient de corrélation augmente (r^2 = 0,984 et 0,962). L'écart type entre les pentes des droites d'étalonnage dans la matrice biologique a augmenté par rapport à celui obtenu pour les premières injections. Il passe de 1028,4 (étape i) à 1324,1 (étape iii), ceci confirme l'aspect peu répétable des mesures. Celui des droites d'étalonnage dans l'eau ultra pure n'a pas été modifié. La multiplication des injections d'AMBA (avec ou sans matrice biologique) n'a pourtant pas modifié les résultats de la droite d'étalonnage dans l'eau ultra pure analysée en dernier (étape iv), l'hypothèse de la « saturation de la colonne » par le produit ne peut donc pas être retenue.

Comme évoqué précédemment, l'acidification du milieu due à la présence d'acide formique dans la phase mobile entraîne la précipitation de certains composés présents dans les surnageants, y compris dans ceux de cinétiques contrôles ne comportant pas de mésotrione. L'analyse des spectres de RMN ^{1}H *in situ* avant et après acidification semble indiquer la disparition de sucres excrétés par les cellules au cours des incubations. Il est connu que la solubilité des sucres phosphorylés diminue quand le pH diminue. Ce type de composés pourrait être à l'origine de cet effet de matrice, en interagissant avec le AMBA.

L'acide phosphorique provoque le même phénomène. L'utilisation d'une colonne permettant de séparer des composés polaires dans des mélanges de type ACN/eau tamponnée à pH 6,7 (de type ZIC-HILIC® par exemple) est une alternative à envisager dans l'avenir pour la quantification de ce métabolite. L'extraction en phase solide (SPE) a également été utilisée dans la littérature pour analyser la mésotrione par LC/MS. Mais dans ce cas, il est probable que plusieurs métabolites instables (notamment M2 et M3) ne soient pas observables.

Pour conclure, ce problème analytique a pu être mis en évidence grâce au suivi concomitant par RMN ^{1}H *in situ* et par HPLC. Etant donné que ce phénomène pourrait également se produire pour d'autres métabolites, il nous a semblé opportun de focaliser le travail de quantification sur la RMN, même si les analyses par HPLC ont été systématiquement réalisées pour contrôle. Pour simplifier la lecture du manuscrit, seules les quantifications réalisées par RMN seront présentées et prises en compte pour la suite des résultats.

IV.2 Bilan quantitatif des différents essais de biodégradation de la mésotrione

La Figure 110 présente la cinétique de biodégradation de la mésotrione à 1 mM, déjà montrée Figure 69, mais complétée ici par l'ensemble des métabolites formellement identifiés.

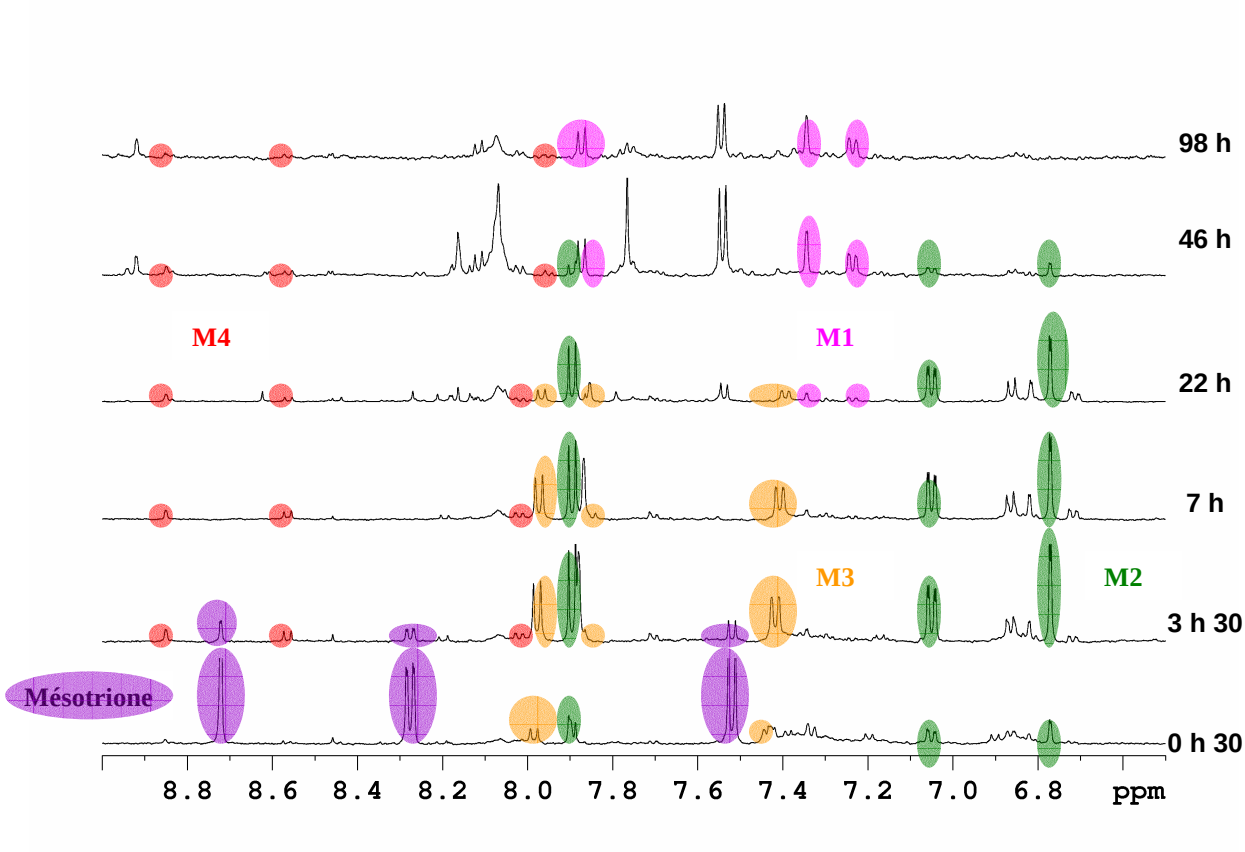


Figure 110 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Les différents métabolites formés lors des cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1, 5 et 10 mM) ont été quantifiés (Figure 111).

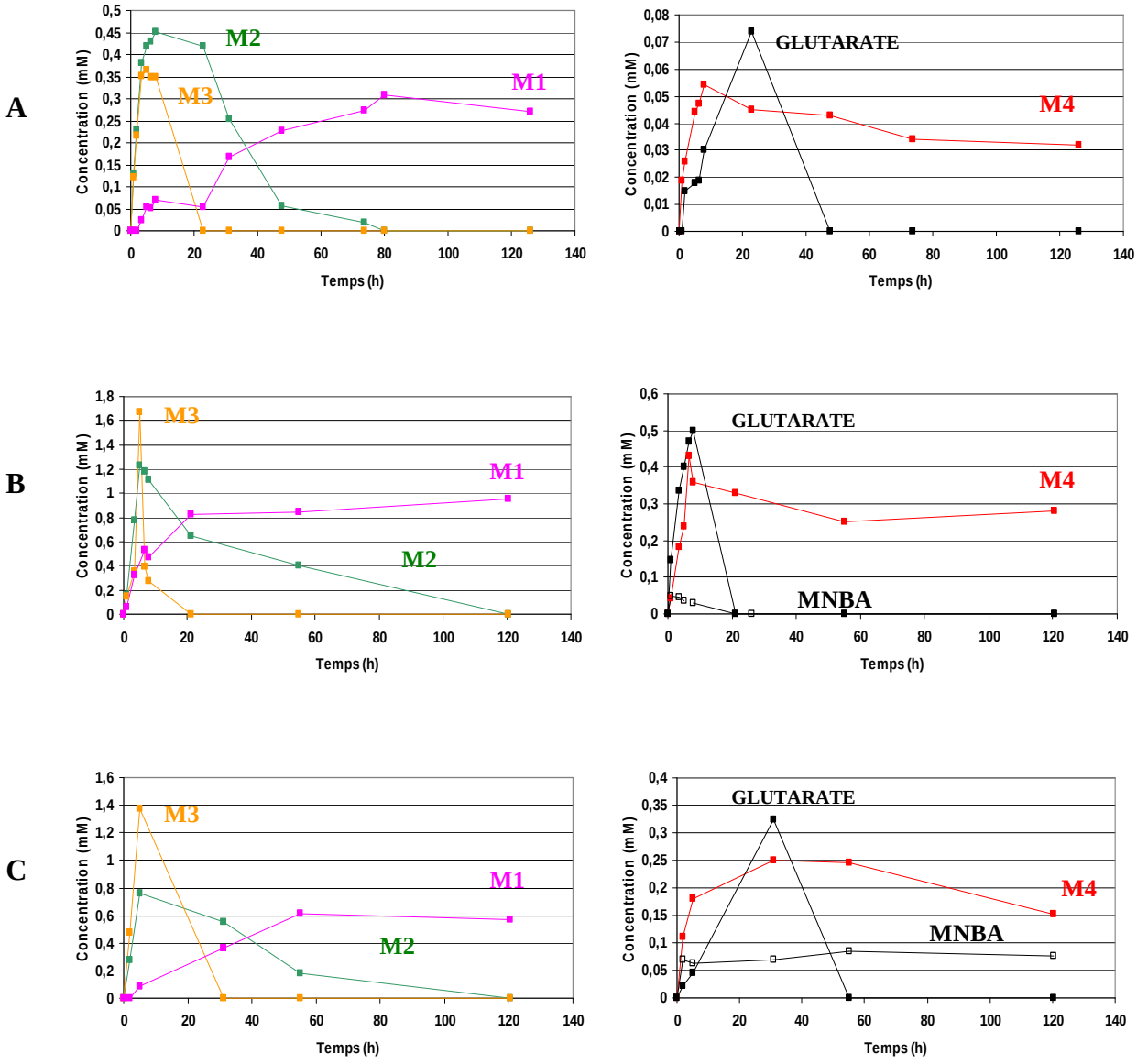


Figure 111 : Suivis cinétiques des métabolites M1 (AMBA) (■), M2 (■), M3 (■), M4 (■), glutarate (■) et MNBA (□) lors de biodégradation de la mésotrione à 1 mM (A), 5 mM (B) et 10 mM (C)

De manière générale, nous pouvons constater que :

- Quelle que soit la concentration initiale en mésotrione, nous avons pu observer qualitativement les mêmes métabolites, mis à part le MNBA qui n'a été détecté que pour une forte concentration en mésotrione (5 et 10 mM). Plusieurs hypothèses concernant cette absence de détection du MNBA peuvent être proposées : soit il ne se forme effectivement qu'en présence d'une forte concentration en mésotrione ; soit sa transformation en AMBA (M1) est très rapide ; soit le manque de sensibilité de la RMN ne nous permet pas de l'observer dans le cas de concentration faible en mésotrione.

- M1, M2 et M3 sont les métabolites majoritairement formés.
- La concentration de M1 augmente régulièrement et atteint un palier lorsque M3 disparaît.
- La dégradation de la mésotrione par cette bactérie ne permet pas d'obtenir une minéralisation du composé car les métabolites M1 (AMBA) et M4 s'accumulent dans le milieu d'incubation.
- Le glutarate est présent dès le début de la cinétique de biodégradation de la mésotrione puis est dégradé entre 20 et 60 h selon la concentration initiale testée. Sa concentration augmente à l'inverse de celle de la mésotrione, cette dernière serait donc une des sources de la formation du glutarate. Ce substrat est facilement métabolisé par les microorganismes ce qui explique qu'il disparaît rapidement.

Sur les chromatogrammes, nous avions observé la formation du métabolite M5. Cependant, son empreinte proton n'étant pas déterminée, il n'a pas été possible de le quantifier par RMN. L'évolution relative (en aire UV) de ce métabolite est donné à la Figure 68.

En résumé, nous pouvons conclure que le schéma métabolique proposé précédemment est confirmé par l'évolution de la concentration de chaque métabolite. La mésotrione n'est plus transformée complètement au-delà de 5 mM. Ce ralentissement, voire cette inhibition, suggère un caractère « toxique » de la mésotrione ou de l'un de ses métabolites. Les changements physico-chimiques (pH, force ionique, etc.) inhérents à l'évolution du métabolisme des cellules au cours des cinétiques pourraient également être responsables de cette « toxicité » apparente à forte concentration.

Plusieurs des métabolites identifiés présentent un caractère acide pouvant expliquer la baisse relative du pH des surnageants au cours des cinétiques lorsque la concentration initiale en mésotrione augmente. Aussi, il semblait pertinent de voir si cette modification de pH pouvait être à l'origine de l'inhibition de la biotransformation pour de fortes concentrations en mésotrione.

V EFFET DU PH DU MILIEU SUR LA DEGRADATION DE LA MESOTRIONE.

L'ensemble des cinétiques analysées jusqu'à présent a été effectué dans un milieu non tamponné (eau de Volvic, pH = 7).

Les variations de pH des surnageants au cours du temps pour trois cinétiques différentes sont présentées Figure 112.

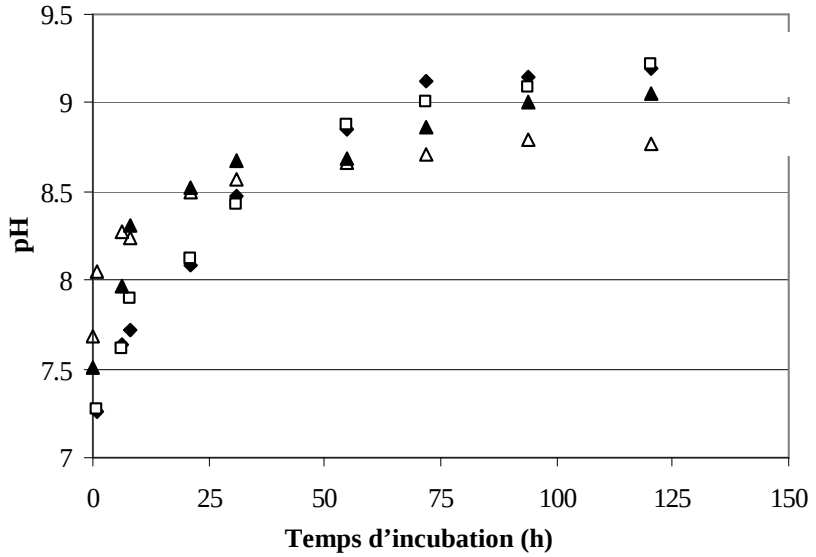


Figure 112 : Suivi du pH des surnageants prélevés lors de biodégradation de la mésotrione : 1 mM (□), 5 mM (▲), 10 mM (△) et dans la culture témoin sans mésotrione (♦).

Quel que soit l'essai, nous pouvons remarquer que le pH du milieu d'incubation se basifie au cours du temps et atteint une valeur autour de 9 après 125 h d'incubation (pour un pH initial voisin de 7,5). Toutefois, des variations existent suivant la concentration initiale en mésotrione. Ces modifications, même faibles en apparence (0,5 unité de pH en moyenne), sont le reflet d'une régulation importante par les cellules des différents gradients ioniques (dont les gradients de protons).

Aussi, deux tampons ont été choisis et testés pour leur impact sur les cinétiques de biodégradation : un tampon phosphate 100 mM (pH = 7) et un tampon borate 25 mM (pH = 9,2).

V.1 Evolution du pH au cours de la cinétique réalisée dans un tampon phosphate, pH 7

Les variations de pH des surnageants dans l'eau de Volvic et dans le tampon phosphate (de potassium) 100 mM (pH 7) sont présentées Figure 113.

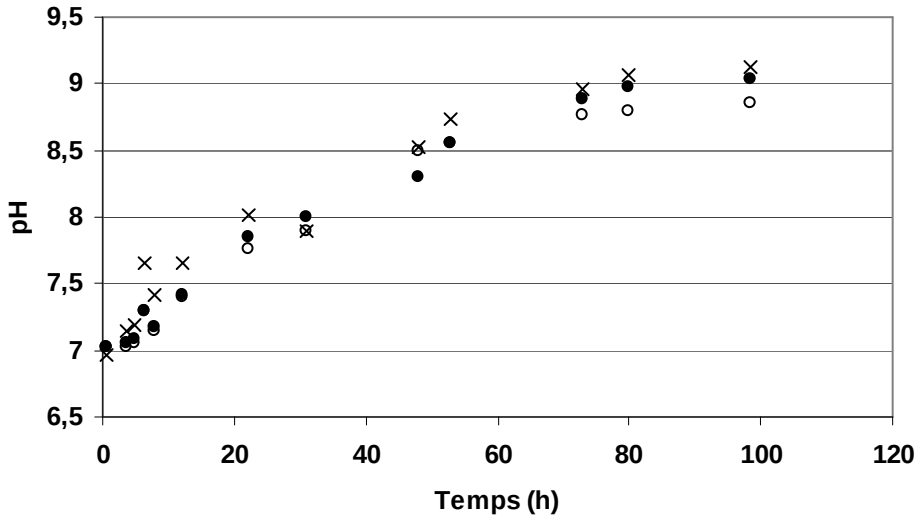


Figure 113 : Suivi du pH des surnageants de biodégradation de la mésotrione (1 mM) dans l'eau de Volvic (x), dans le tampon phosphate 100 mM pH 7 (○) et dans la culture témoin sans mésotrione réalisée dans le tampon phosphate (●)

Le pouvoir tampon du tampon phosphate 100 mM n'est pas suffisant pour fixer le pH du milieu d'incubation. Ce dernier augmente de manière très similaire à l'essai réalisé dans l'eau de Volvic (jusqu'à pH ~ 9). La force ionique du milieu semble être beaucoup plus importante que celle du tampon et les gradients ioniques ne semblent pas affectés par la présence de ces 100 mM de phosphate.

Nous avons alors comparé les cinétiques de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic et dans le tampon phosphate 100 mM pH 7 (Figure 114).

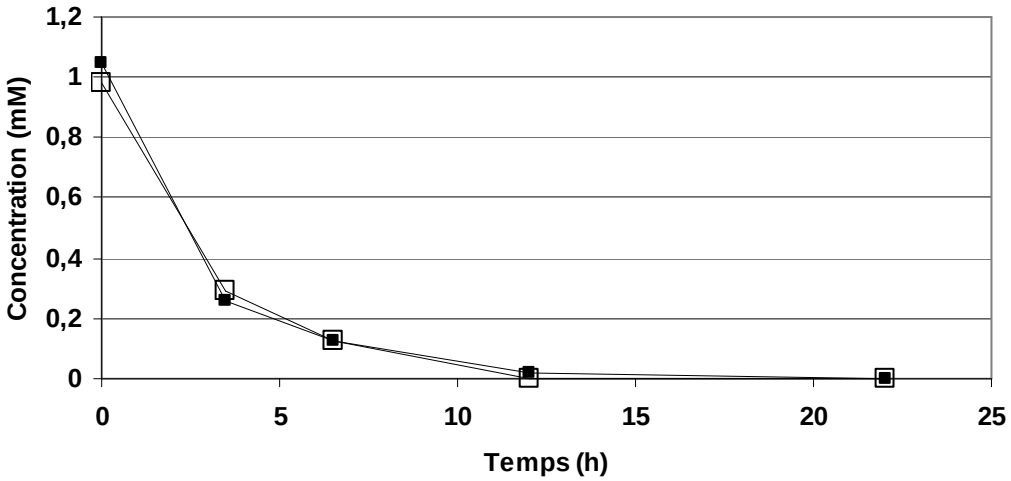


Figure 114 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 mM) dans l'eau de Volvic (■) et dans le tampon phosphate 100 mM pH 7 (□)

Les deux cinétiques sont superposables et les quantifications par RMN et HPLC sont identiques.

Du point de vue des métabolites formés, les chromatogrammes et les spectres de RMN ^{1}H montrent que le AMBA se forme dans le milieu d'incubation dans les deux conditions (26 % de la mésotrione est dégradée en AMBA au bout de 48 h). Qualitativement, les profils métaboliques réalisés par RMN ^{1}H sont les mêmes dans les deux essais. Le suivi quantitatif sera présenté de façon comparative pour les deux tampons testés ultérieurement (Figure 117).

V.2 Evolution du pH au cours de la cinétique réalisée dans un tampon borate de sodium, pH 9

La Figure 115 présente les évolutions du pH des surnageants au cours du temps pour la cinétique de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic, dans le tampon borate (pH 9) et dans une cinétique témoin (en absence de mésotrione) préparée dans le même tampon.

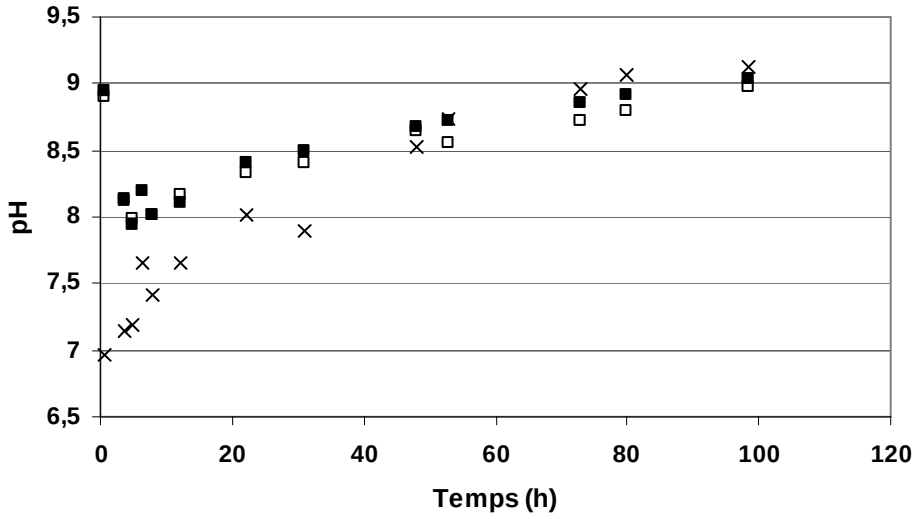


Figure 115 : Suivi du pH des surnageants de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic (x), dans le tampon borate 25 mM pH 9 (■) et dans la culture témoin sans mésotrione dans le tampon borate 25 mM pH 9 (□)

Le pH initial de l'échantillon témoin et celui du surnageant de la biodégradation réalisée dans le tampon borate pH 9 sont proches de 9 ; dans les deux cas, le pH diminue au cours des 20 premières heures d'incubation pour atteindre un pH de 8-8,5, puis augmente à nouveau et se stabilise autour de 9. Une fois encore, le pouvoir tampon semble insuffisant pour atteindre notre objectif.

Les cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 mM) dans le tampon borate 25 mM (pH 9) par RMN ^{1}H *in situ* et par HPLC comparées à la cinétique de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic sont présentées Figure 116.

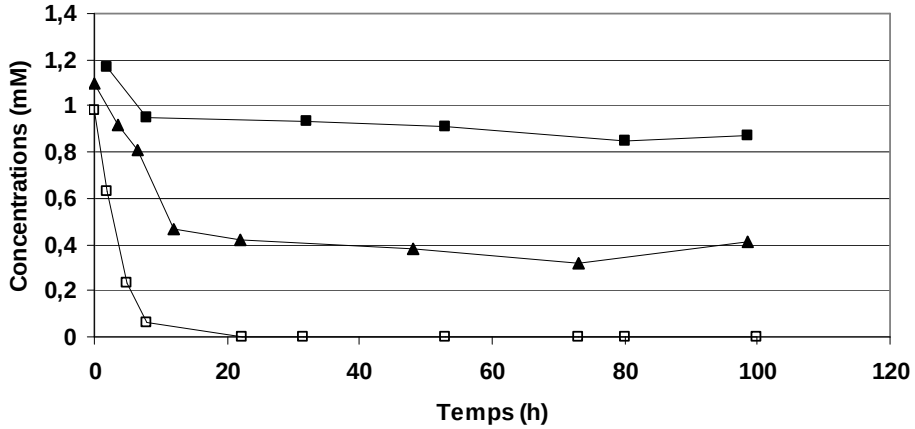


Figure 116 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 mM) dans le tampon borate, pH 9, contrôlées par RMN ^{1}H (■), par HPLC (▲) et cinétique de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic (□).

La mésotrione n'est pas totalement dégradée dans le tampon borate pH 9 quelle que soit la technique d'analyse choisie. Toutefois, les résultats obtenus dans l'eau de Volvic sont identiques aux précédents : la mésotrione est totalement transformée en quelques heures.

Les résultats obtenus par les deux techniques ne concordent pas. 62 % de la mésotrione semblent être transformés d'après les résultats HPLC contre 26 % d'après la RMN. Le tampon perturbe considérablement l'analyse par HPLC, avec un élargissement important des signaux. Aucun problème n'a été constaté par RMN, méthode ainsi choisie pour quantifier la mésotrione dans ces conditions.

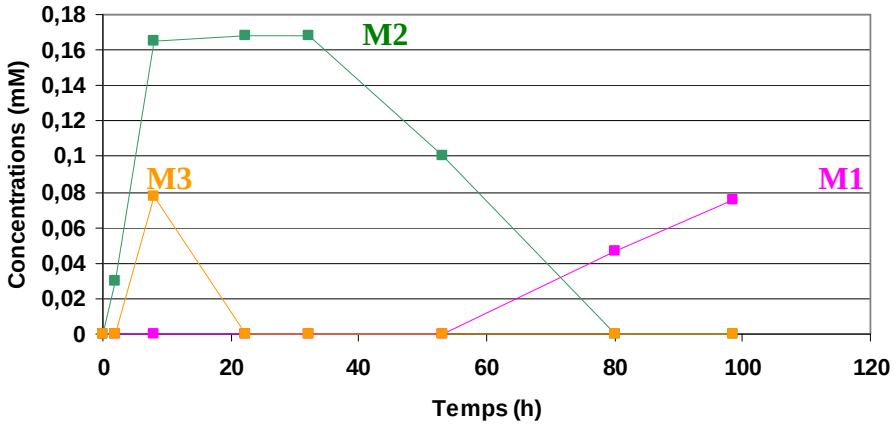
Le pH initial étant environ 1,5 à 2 unités de pH au-dessus des essais effectués dans l'eau de Volvic, il apparaît que les premières étapes du métabolisme de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 nécessitent un pH proche de la neutralité. Si la première réaction enzymatique est réellement la réduction du groupement nitro, cela pourrait signifier que la nitroréductase est sensible au pH. Mais il semble plus probable que les cellules ne soient pas en mesure de compenser les gradients ioniques en début de cinétique sans « épuiser » les réserves nécessaires au fonctionnement du métabolisme central de la bactérie. En effet, même si le pH est proche de 9 en fin de cinétique réalisée dans l'eau de Volvic, les premières étapes de transformation de la mésotrione sont effectuées à un pH voisin de 7,5.

V.3 Bilan quantitatif des effets du pH

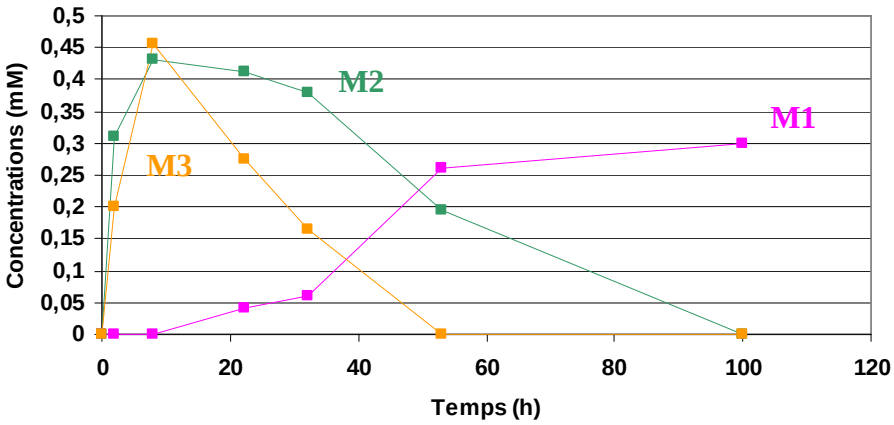
L'interprétation des chromatogrammes et des spectres de RMN ^{1}H montre la présence du métabolite AMBA dans la cinétique à pH 9. Environ 8% de la mésotrione sont dégradés en AMBA (M1).

La Figure 117 récapitule les informations quantitatives sur le suivi des cinétiques de biodégradation de la mésotrione à 1 mM réalisées dans les tampons phosphate et borate.

A



B



C

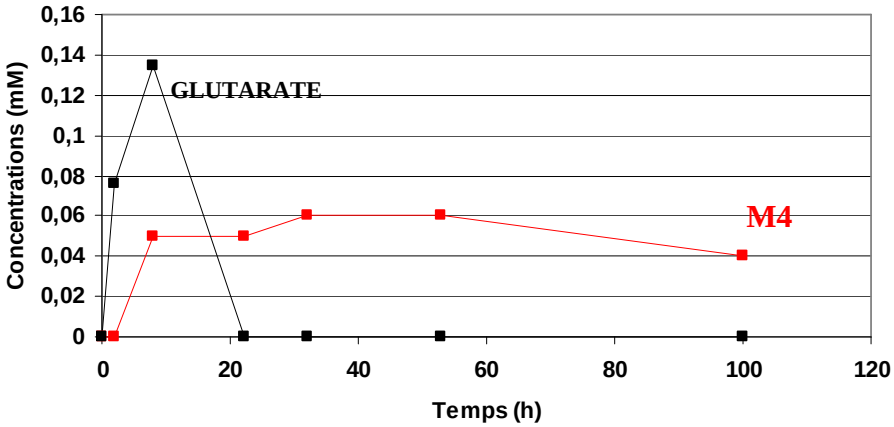


Figure 117 : Suivis cinétiques des métabolites M1 (■), M2 (■), M3 (■), M4 (■) et glutarate (■) lors de la biodégradation de la mésotrione (1 mM) dans un tampon borate 25 mM pH 9 (A) et un tampon phosphate 100 mM pH 7 (B et C)

Les résultats obtenus dans le tampon phosphate sont très proches de ceux obtenus précédemment lors des essais de biodégradation de la mésotrione dans l'eau de Volvic. Les

trois métabolites majoritaires sont M1, M2 et M3. M1 est formé en plus grande quantité à la disparition de M3, qui se transforme également partiellement en M4.

A pH 9, la mésotrione n'est que très peu dégradée. Les métabolites M4 et le glutarate ne sont pas observés, certainement pour des raisons de sensibilité. Les décalages apparents observés dans l'apparition et la disparition des métabolites M1, M2 et M3 peuvent également être liés à des problèmes de limite de détection.

En conclusion, il ne nous a pas été possible de tamponner suffisamment le milieu en utilisant des forces ioniques raisonnables, c'est-à-dire susceptibles *a priori* de ne pas affecter les gradients ioniques de la cellule. Les très faibles variations de pH observées en début de cinétique entre les différentes concentrations initiales en mésotrione testées pourraient cependant expliquer le ralentissement de la biotransformation.

Un autre paramètre a été évalué dans la dégradation de cet herbicide, il s'agit de la présence ou non d'oxygène. En effet, nous avons vu dans le chapitre 3 de la partie bibliographique que certaines nitroréductases pouvaient fonctionner en présence ou en absence d'oxygène. Même si les données comparatives sont rares dans la littérature, les voies métaboliques de la mésotrione pourraient être affectées par ce paramètre. Aussi, des cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 mM) ont été réalisées en anaérobiose afin de voir si le taux de transformation de l'herbicide, ainsi que les profils métaboliques étaient modifiés. Ces analyses devraient nous permettre d'approfondir notre compréhension des mécanismes régissant la biotransformation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 dans nos conditions d'incubation.

VI MODE DE FONCTIONNEMENT DE LA NITROREDUCTASE : AEROBIE ET/OU ANAEROBIE ?

Nous avons réalisé des cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1,5 mM) en absence d'oxygène afin d'une part, de mettre en évidence le type de réductase impliquée et d'autre part, de voir si les métabolites formés dans ces conditions sont identiques qualitativement et/ou quantitativement à ceux observés précédemment en aérobiose. La pré-culture comme la culture de la bactérie n'ont pas été modifiées. Les seuls changements, comparés aux expériences précédentes, portent sur la préparation de la solution de mésotrione qui a été longuement dégazée à l'argon, ainsi que la suspension cellulaire. Le flacon contenant

le milieu d'incubation est conservé sous argon durant les cinq jours de la cinétique afin de limiter la teneur en oxygène dans le milieu. Le pH des surnageants, prélevés au cours de la cinétique, a été contrôlé et comparé à ceux des surnageants en conditions aérobies (Figure 118).

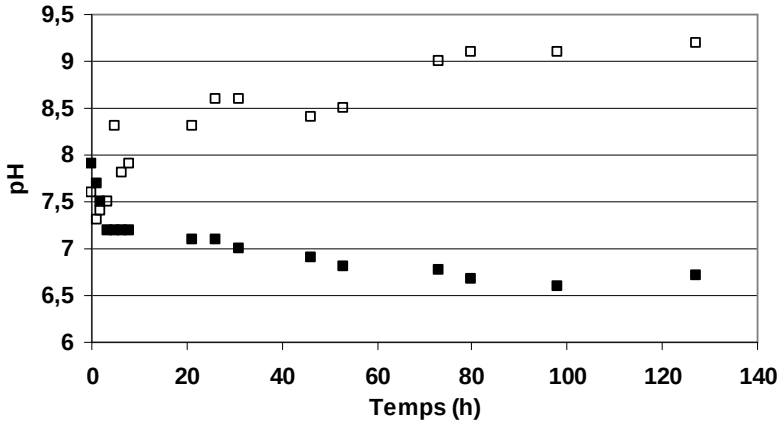


Figure 118 : Suivi du pH des surnageants des échantillons en conditions aérobies (□) et anaérobies (■)

Le pH du milieu d'incubation est légèrement acidifié en anaérobiose, il ne cesse de décroître au cours de la cinétique et se stabilise vers 6,5. La cinétique de biodégradation de la mésotrione est présentée sur la Figure 119.

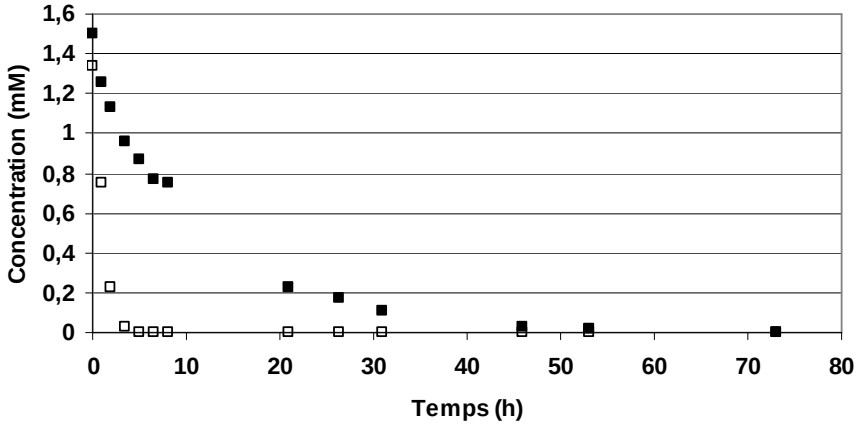


Figure 119 : Cinétiques de biotransformation de la mésotrione (1,5 mM) en aérobiose (□) et en anaérobiose (■) contrôlée par RMN ^{1}H

Les analyses HPLC et RMN ^{1}H fournissent les mêmes résultats. La souche *Bacillus* sp. 3B6 est capable de transformer la mésotrione dans un milieu dont la teneur en oxygène est

limitée. La dégradation de la mésotrione est totale mais plus lente en anaérobiose: 48 h contre 5 h en aérobiose. Les métabolites observés sur les chromatogrammes et en RMN ^{1}H dans les deux conditions sont les mêmes. Les métabolites formés sont donc principalement issus de réactions ne nécessitant pas d'oxygène. Cette observation tend à confirmer les structures proposées précédemment qui sont issues essentiellement de réactions de réduction du groupement nitro suivies de réarrangement.

D'autre part, cette disparition totale de la mésotrione prouve que la nitroréductase impliquée est donc une nitroréductase insensible à la présence ou à l'absence d'oxygène. Il s'agit d'une nitroréductase de type I.

Le suivi quantitatif des métabolites n'a été réalisé que par RMN ^{1}H (Figure 120), car cette technique ne nécessite pas de standard des produits à quantifier par différence avec l'HPLC. De plus cette technique semble la plus fiable pour la quantification de cette famille de molécules.

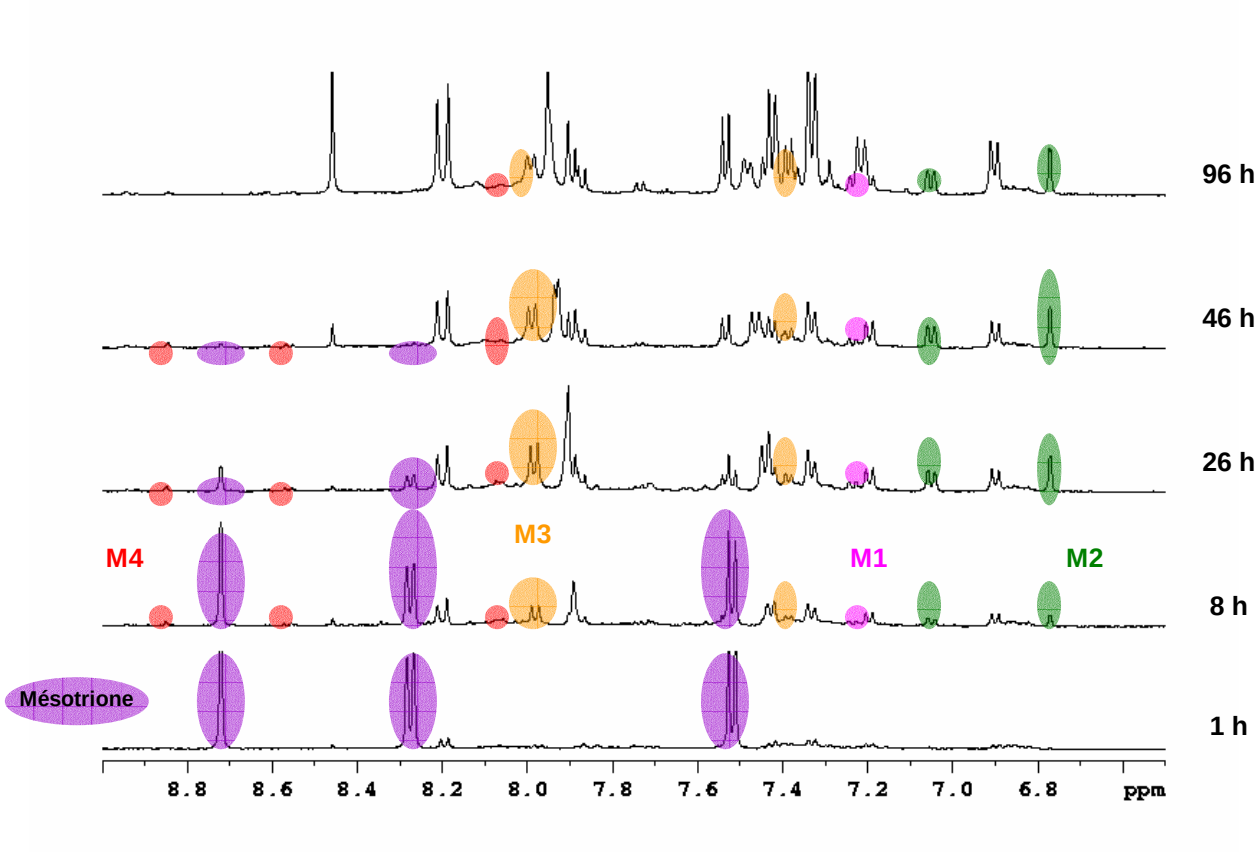


Figure 120 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1,5 mM, en anaérobiose, analysée par RMN ^{1}H

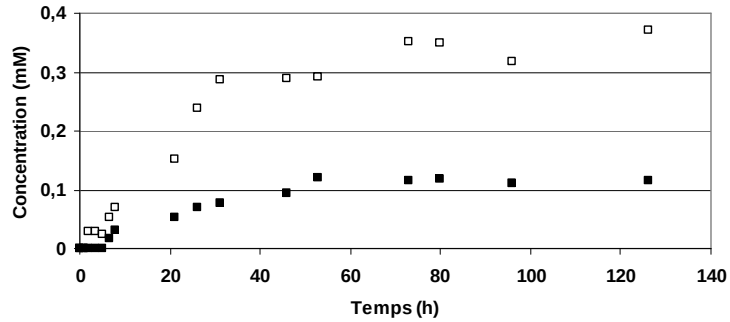
En anaérobiose, les signaux provenant des cellules elles-mêmes sont plus importants qu'en aérobiose. **M1**, **M2**, **M3** et **M4** sont visibles sur la cinétique, mais les temps d'incubation correspondant à leur apparition et disparition sont modifiés par rapport à ceux observés lors des expériences en aérobiose :

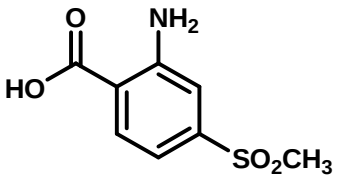
M1 apparaît après 6 h 30 d'incubation et s'accumule dans le milieu, alors qu'en conditions aérobies, il est présent dès 3 h 30.

M2 et **M3** apparaissent après 2 et 1 h (premier prélèvement) d'incubation respectivement et s'accumulent dans le milieu. En aérobiose, ils sont présents également dès le début de la cinétique, mais sont dégradés après 80 et 22 h d'incubation. Cette observation nous permet déjà de constater que les conditions anaérobies empêchent la dégradation des composés **M2** et **M3** pour lesquels nous avions montré la présence d'un équilibre chimique entre une fonction hydroxylamine (**M2**) et une fonction isoxazol-3-ol (**M3**).

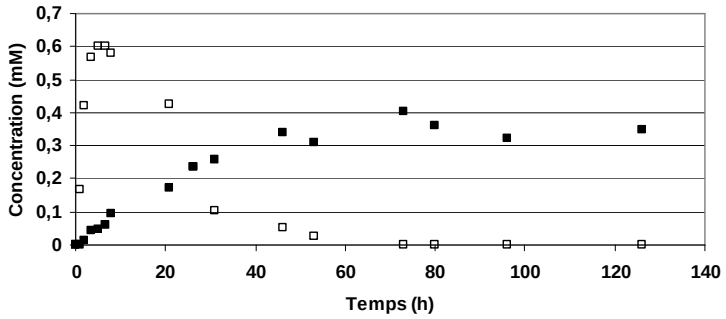
M4 est présent dès le début de la cinétique et s'accumule dans le milieu. Son évolution est une fois de plus conforme à l'hypothèse **M3**→**M4**.

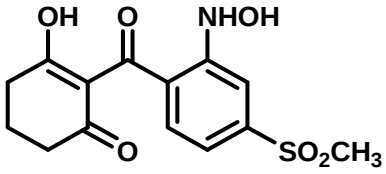
Nous avons rassemblé les résultats des cinétiques de biodégradation de la mésotrione en aérobiose et en anaérobiose en traçant l'évolution de la concentration de chaque métabolite afin de les comparer (Figure 121).



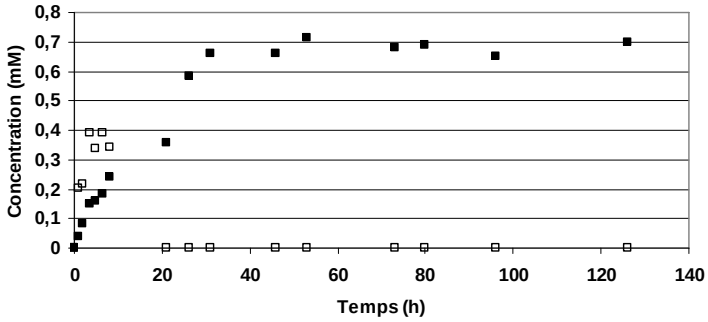


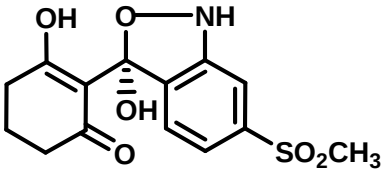
M1 (AMBA)



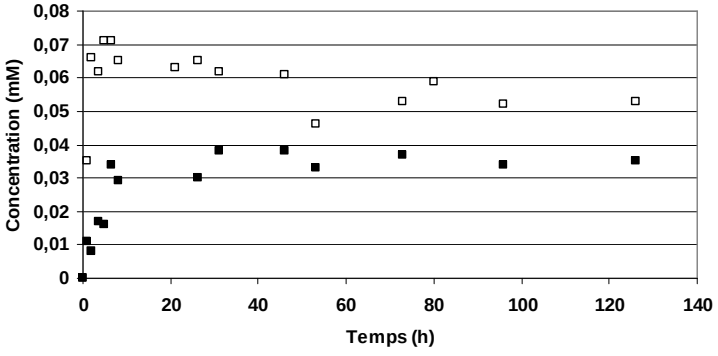


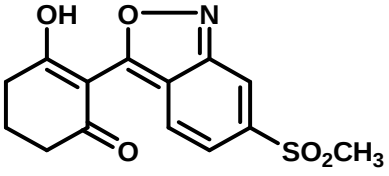
M2





M3





M4

Figure 121 : Cinétiques de formation des métabolites lors de la biodégradation de la mésotrione (1,5 mM) en anaérobiose (■) et en aérobiose (□)

En anaérobiose, le AMBA (M1) apparaît après un temps d'incubation plus long et atteint une concentration maximale trois fois plus faible qu'en aérobiose. Dans ces conditions,

les métabolites M2 et M3 s'accumulent dans le milieu et ne sont donc pas dégradés en AMBA. Nous avons vu précédemment que l'autre provenance de l'AMBA est la dégradation directe de la mésotrione, dégradation qui est plus lente en anaérobiose. Cela pourrait expliquer le décalage dans le temps d'apparition du AMBA, qui proviendrait donc, dans des conditions anaérobies, uniquement de la molècule mère soit par simple hydrolyse, soit par coupure oxydative, les conditions d'expérimentation ne permettant pas d'assurer une anaérobiose stricte.

Les métabolites M2 et M3, en équilibre, restent les métabolites majoritairement formés lors de la biodégradation de la mésotrione quelles que soient les conditions. Ils s'accumulent lorsqu'ils sont dans un milieu dont la teneur en oxygène est limitée. L'hypothèse de la présence d'une fonction hydroxylamine dans leur structure est confortée par cette observation, car nos résultats rejoignent les travaux de Maeda *et al.* (2006). En effet, ces auteurs ont cherché à isoler deux intermédiaires majoritaires produits lors de la dégradation du TNT par *Pseudomonas* sp. TM 15. Ces intermédiaires ont été décrits comme instables et impossibles à identifier par des techniques classiques telles que la LC/MS ou la GC/MS. En effet, ces composés sont dégradés en présence d'oxygène et/ou à haute température (90 °C). Il s'agit de composés possédant une fonction hydroxylamine : le 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluène et le 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluène. Ces résultats nous laissent donc penser que la dégradation des métabolites M2 et M3 pourrait être, au moins partiellement, abiotique.

Il faut également noter que le métabolite majoritaire est différent suivant les conditions : en aérobiose, l'équilibre est déplacé vers la formation de M2 alors qu'en anaérobiose, il est déplacé vers la formation de M3. Le pH du milieu d'incubation peut être responsable de ce déplacement d'équilibre (pH 9 en conditions aérobies et 6,5 en conditions anaérobies).

Le métabolite M4 résulte de la déshydratation de l'isoxazol-3-ol (M3). En conditions anaérobies, M3 n'est que peu transformé ; par conséquent la concentration en M4 est plus faible. En parallèle, M2 n'est pas transformé non plus, ce qui explique que la concentration relative (en intégrales) de M5 dans le milieu d'incubation soit également plus faible.

Lors de l'identification des métabolites, nous avons aussi évoqué la présence de glutarate provenant d'une oxydation de la partie cyclohexane-1,3-dione. Dans les conditions

anaérobies, le AMBA (M1) est moins concentré dans le milieu d'incubation ce qui signifie que peu de cyclohexane-1,3-dione est libérée. Nous n'avons pas pu suivre la concentration du glutarate dans les essais en conditions anaérobies du fait d'une présence plus importante des signaux provenant des cellules. En conditions anaérobies, les réactions d'oxydation ne sont pas favorisées, le glutarate devrait être donc être de toute façon moins concentré.

En conditions aérobies, les surnageants atteignent un pH voisin de 9 en fin de cinétique, en anaérobiose il est proche de la neutralité. Afin de s'assurer que le pH n'est pas responsable de la transformation des métabolites M2 et M3, nous avons modifié le pH d'un prélèvement de fin de cinétique de biodégradation de la mésotrione en anaérobiose et réalisé l'acquisition du spectre de RMN ^{1}H (Figure 122).

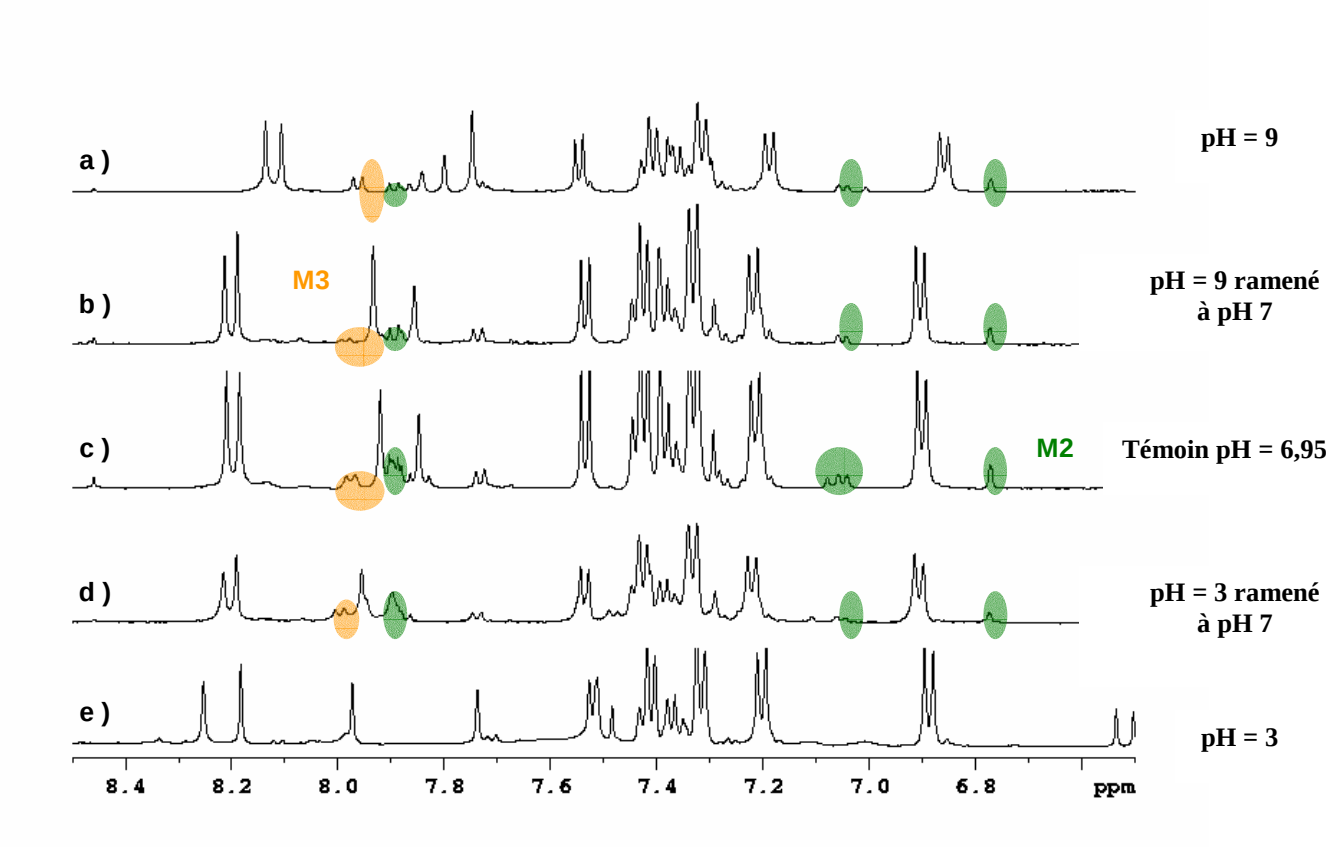


Figure 122 : Modification du pH des surnageants d'un échantillon en fin de cinétique de biodégradation de la mésotrione en anaérobiose

L'échantillon de référence a un pH de 6,95 (Figure 122c). Lorsque le pH est acidifié par de l'acide chlorhydrique (à un pH proche de celui de la phase mobile utilisée en HPLC) d'importantes modifications sont observées sur le spectre de RMN (Figure 122e). En particulier, les signaux de M2 et M3 ne sont *a priori* plus observés. Le même type d'analyse

effectué lors des études par LC/RMN (cf. paragraphe III.1.1) a montré que les déplacements chimiques de M2 et M3 étaient profondément modifiés par la présence d'acide formique (pH 3). La même observation est faite en présence d'acide chlorhydrique. Mais sur cet exemple, les signaux sont considérablement élargis (certains tendent à « disparaître »), ce qui pourrait s'expliquer par une diminution de la solubilité de M2 et M3 lorsque le pH diminue. Enfin, lorsque le pH est ramené à la neutralité (Figure 122d), les signaux de M2 et M3 sont à nouveau visibles aux déplacements chimiques usuels.

Quand le pH est porté à 9,0 (Figure 122a), c'est-à-dire au même pH que celui mesuré dans les surnageants de fin de cinétique de biodégradation en aérobiose, les signaux de M2 et M3 ne sont affectés ni qualitativement, ni quantitativement.

En résumé, M2 et M3 ne subissent donc aucune transformation observable dans les limites de quantification de la RMN (± 10 %) liée aux modifications de pH (pH acide ou alcalin).

Nous avons alors voulu savoir si la transformation de M2 et M3 avait lieu en absence de cellules (sans que le pH en soit la cause) ou en leur présence. Pour tenter de répondre à cette question, deux fois 10 mL du milieu d'incubation ont été prélevés en fin de cinétique de biodégradation de la mésotrione (150 h) en anaérobiose.

i) 10 mL sont replacés en conditions aérobies et des prélèvements, effectués régulièrement, sont analysés par RMN ^{1}H *in situ* (Figure 123).

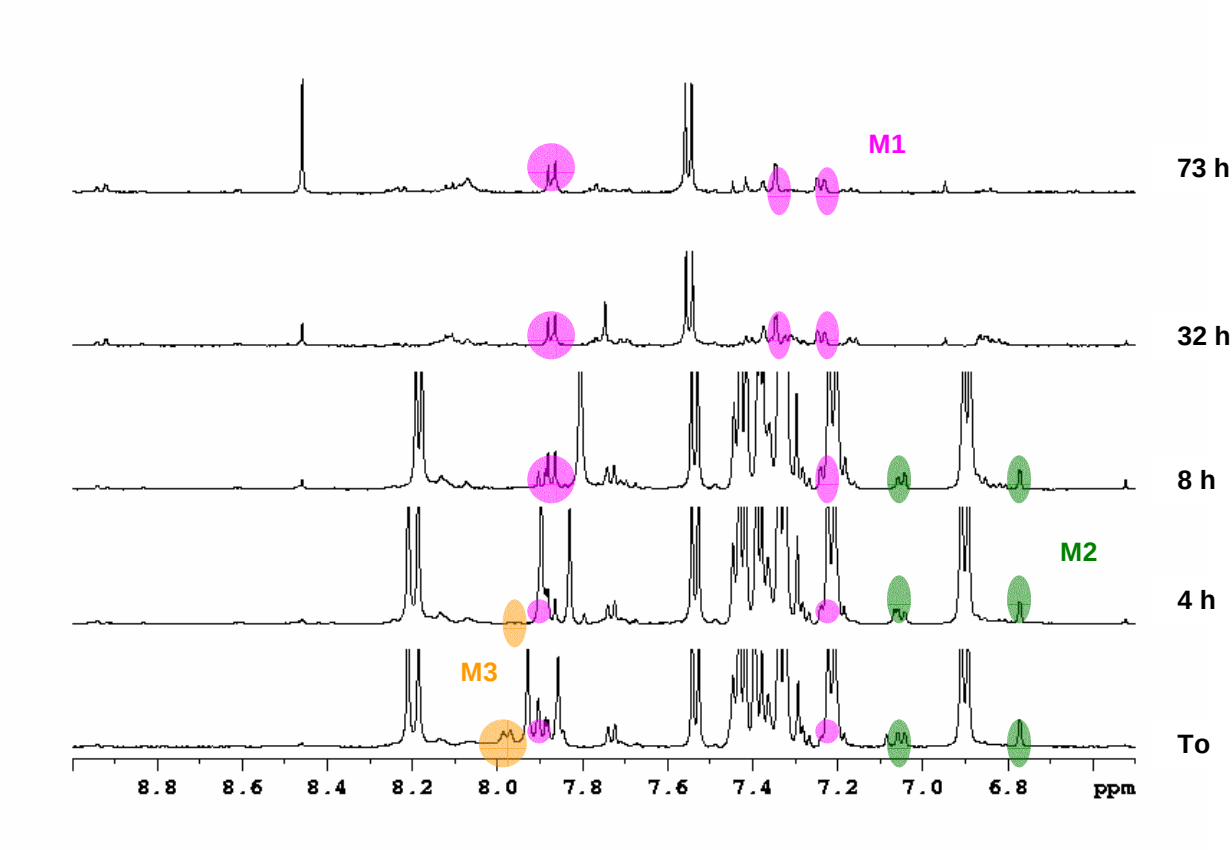


Figure 123 : Suivi cinétique de la dégradation de M2 et M3 en présence de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en conditions aérobies

Dans ces conditions (ré-oxygénation et présence de la souche *Bacillus* sp. 3B6), les métabolites M2 et M3 sont dégradés après 32 h et 8 h d'incubation. La concentration du AMBA (M1) augmente et atteint 0,8 mM dans le milieu d'incubation, concentration qui correspond à une transformation partielle de M2 et M3 (à To de cette cinétique [M1] = 0,20 mM, [M2] = 0,55 mM et [M3] = 0,31 mM). Cette observation confirme une fois de plus que le AMBA est bien formé à partir de M2 et M3, puisque la mésotrione est complètement absente du milieu.

ii) Une seconde cinétique a été réalisée avec les 10 mL restants. Plusieurs centrifugations ont été réalisées afin d'éliminer au maximum les cellules. Des prélèvements ont été effectués et analysés par RMN (Figure 124).

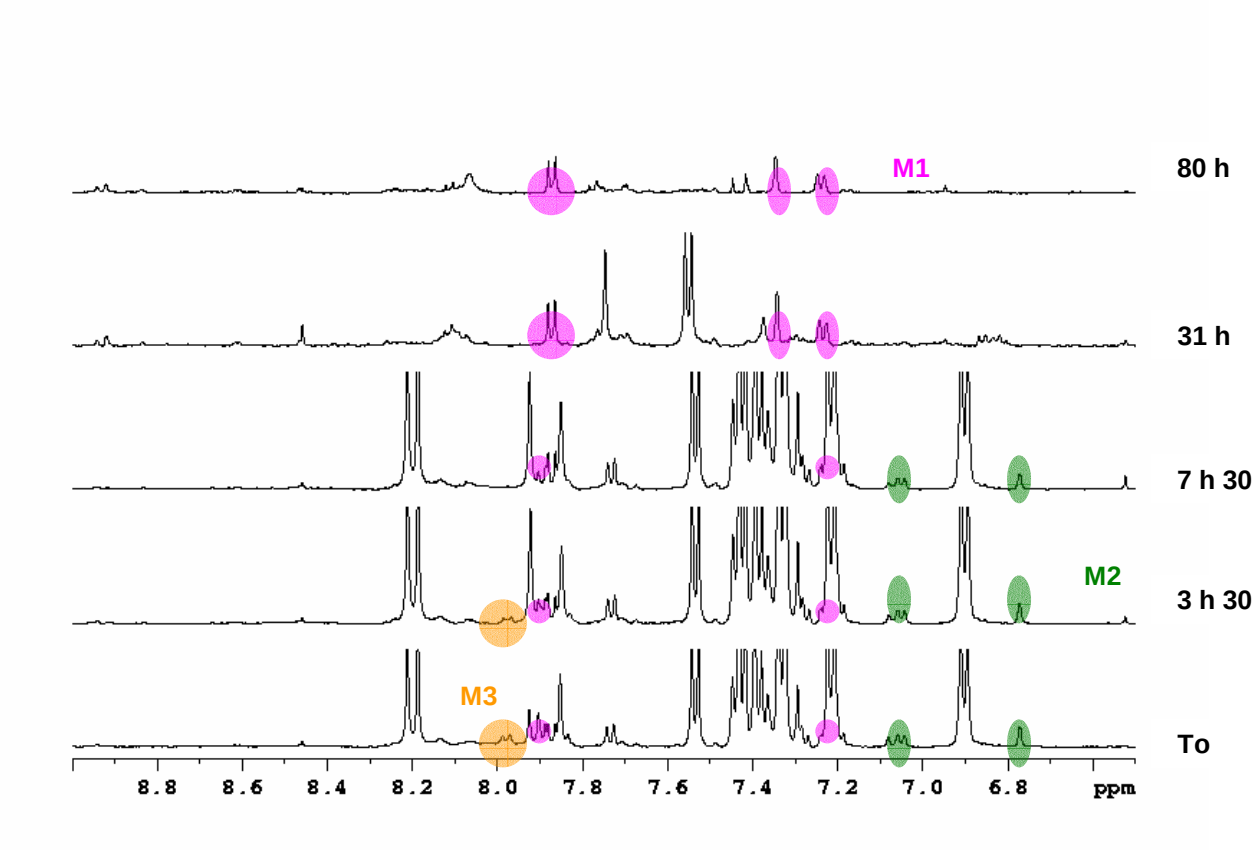


Figure 124 : Suivi cinétique de la transformation de M2 et M3 en absence de cellules et en conditions aérobies

M2 et M3 sont dégradés après quelques heures d'incubation en absence de cellules. Comme précédemment, le AMBA se forme de manière quasi-quantitative et atteint une concentration maximale de 0,8 mM (à To de cette cinétique [M1] = 0,26 mM, [M2] = 0,25 mM et [M3] = 0,38 mM).

Ces différentes expériences en conditions anaérobies nous ont permis :

- de conforter notre hypothèse de présence d'une fonction de type hydroxylamine dans les structures de M2 et M3 : accumulation en anaérobiose, caractère instable en aérobiose ; transformation en absence de cellules.

- de mettre en évidence le type d'enzyme impliquée dans la transformation mésotrione → M2. Il s'agit d'une nitroréductase de type I insensible à la présence d'oxygène.

VII BIOTRANSFORMATION DE METABOLITES IDENTIFIES OU PRESUMES

Dans nos conditions d'incubation, le AMBA (M1) est un des métabolites majeurs (du point de vue quantitatif) de *Bacillus* sp. 3B6. Le MNBA n'a été observé qu'à l'état de traces pour de fortes concentrations en mésotrione. Les quelques publications décrivant le devenir de la mésotrione dans l'environnement font état de la formation du MNBA et du AMBA, issu du MNBA par réduction du groupement nitro, comme métabolites majeurs.

Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer la biodégradabilité du AMBA et du MNBA dans nos conditions d'incubation. La concentration maximale observée pour le AMBA dans les précédentes cinétiques de biodégradation de la mésotrione est voisine de 1 mM (obtenue à partir de 5 mM de mésotrione) ; celle du MNBA est très faible (0,09 mM pour 10 mM de mésotrione). Nous avons choisi de tester deux concentrations : 0,3 et 0,8 mM.

La formation de ces deux métabolites nécessite la rupture de la liaison entre le cycle aromatique et la cyclohexane-1,3-dione. Nous avons de ce fait également évalué la biodégradabilité de la cyclohexane-1,3-dione par *Bacillus* sp. 3B6. Deux essais de biodégradation de cette molécule ont été effectués (0,3 et 0,5 mM). La bioconversion de molécules aux structures voisines a été décrite dans la littérature chez différents systèmes cellulaires (Grogan, 2005 ; Hoehle *et al.*, 2006 ; Straganz *et al.*, 2002). La présence de cette dicétone a également été suggérée comme métabolite potentiel du métabolisme du cyclohexane. Mais ces études concernent principalement des cellules eucaryotes.

Remarque : Nous avons contrôlé qu'aucun des trois composés n'est dégradé de façon abiotique, dans nos conditions d'incubation.

VII.1 Etude de la biodégradation du MNBA

Les cinétiques de biodégradation du MNBA ont tout d'abord été suivies par HPLC (Figure 125).

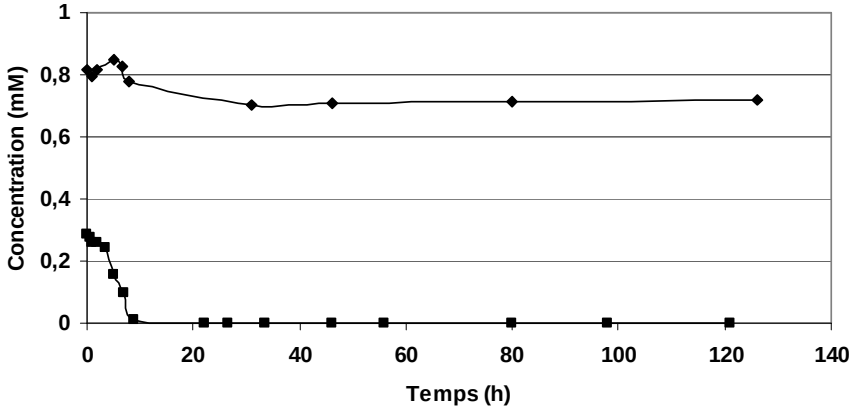


Figure 125 : Cinétiques de biodégradation du MNBA 0,8 mM (♦) et 0,3 mM (■) par la souche B*acillus* sp. 3B6 (analyse par HPLC)

Le MNBA est dégradé par la souche *Bacillus* sp. 3B6 à 100 % après 9 h d'incubation dans le cas d'une concentration initiale de 0,3 mM contre 17 % après 20 h d'incubation pour une concentration initiale de 0,8 mM. Après quelques heures d'incubation, un pic ayant un temps de rétention de 5,5 min apparaît. Celui-ci a pu être attribué au AMBA par co-élution avec un standard. La souche *Bacillus* sp. 3B6 possède donc l'enzyme permettant de réduire le groupement nitro du MNBA en groupement amino pour former du AMBA.

Nous avons également comparé les résultats obtenus par HPLC et par RMN ^{1}H pour l'essai de biodégradation du MNBA à 0,8 mM (Figure 126).

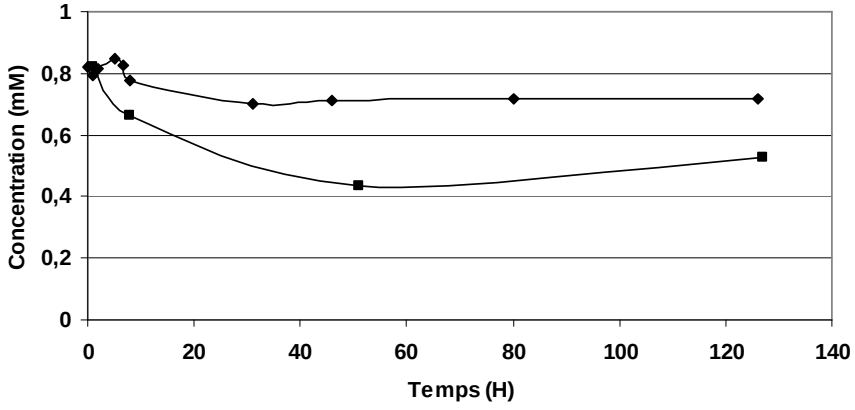


Figure 126 : Cinétiques de biodégradation du MNBA (0,8 mM) par la souche B*acillus* sp. 3B6 analysées par RMN ^{1}H (▪) et par HPLC en mode isocratique (♦)

Une dégradation de 17 % du MNBA est observée par HPLC et de 50 % par RMN ^{1}H. Le temps de rétention très court (t_R = 1,5 min) du MNBA rend difficile sa quantification par

HPLC. Il sort avec de nombreux composés très polaires présents dans les cellules. La même constatation a été faite après plusieurs optimisations des conditions chromatographiques (isocratique mais aussi gradients) visant à retarder la sortie du MNBA.

Les spectres de RMN ^{1}H *in situ* enregistrés au cours de l'essai à 0,8 mM sont présentés Figure 127.

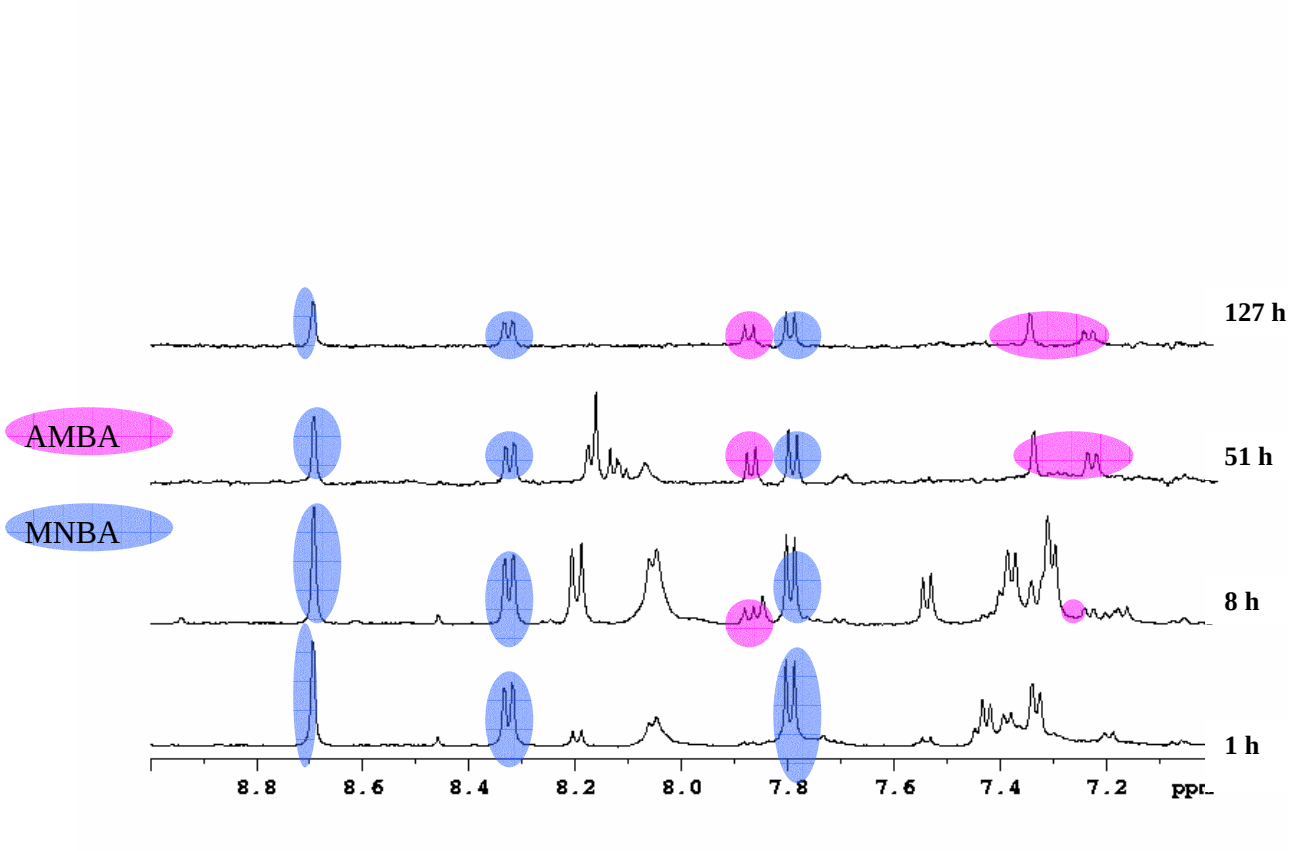


Figure 127 : Cinétique de biodégradation du MNBA (0,8 mM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6 analysée par RMN ^{1}H

Les signaux du AMBA sont aisément identifiés et quantifiés. La concentration en AMBA atteint un maximum de 0,4 mM après 50 h d'incubation (Figure 128).

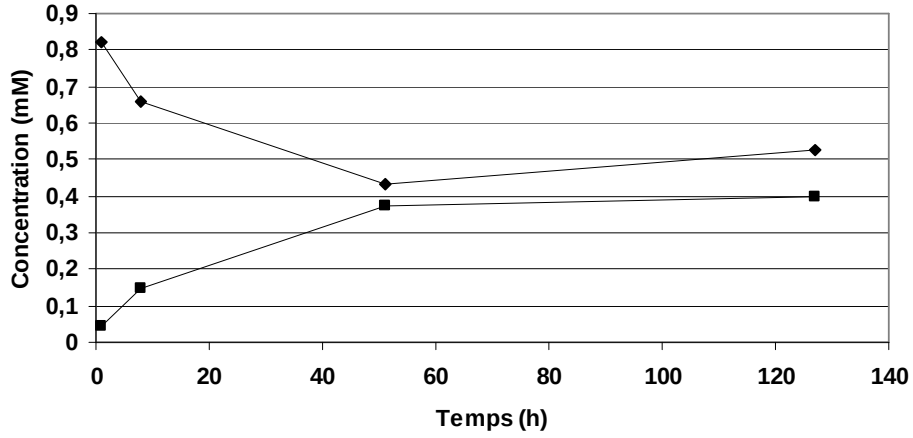


Figure 128 : Cinétiques de biodégradation du MNBA 0,8 mM (♦) et d'apparition du AMBA (▪) (RMN ^{1}H)

Pour une concentration initiale de 0,8 mM, 50 % du MNBA sont dégradés par *Bacillus* sp. 3B6 contre 67 % pour une concentration initiale de 0,3 mM (spectres RMN non montrés). Le MNBA pourrait donc avoir un effet toxique sur ce microorganisme à des concentrations encore plus élevées.

En conclusion, la dégradation du MNBA par la souche *Bacillus* sp. 3B6 conduit à la formation du AMBA. Cette souche possède donc bien l'enzyme (nitroréductase) nécessaire à la réduction d'un groupement nitro (Figure 129).

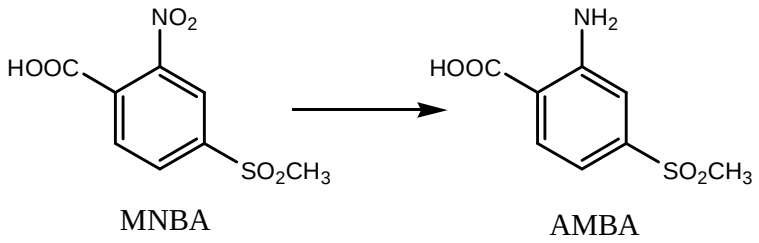


Figure 129 : Dégradation du MNBA en AMBA par la souche *Bacillus* sp. 3B6

La présence d'une telle enzyme pourrait expliquer la formation du MNBA, même si cette voie n'est pas la voie métabolique majoritaire dans nos conditions. En effet, il pourrait être transformé en AMBA dès sa formation à partir de la mésotrione. Mais les données quantitatives décrites précédemment tendent à prouver que, dans nos conditions d'incubation, le AMBA provient majoritairement de la transformation du M2 et du M3.

VII.2 Etude de biodégradation du AMBA

Compte tenu des effets de matrice décrits précédemment lors des analyses réalisées par HPLC (isocratique et gradients), seule la RMN ^{1}H *in situ* a été utilisée pour suivre quantitativement cette bioconversion. Les concentrations initiales testées sont comme précédemment 0,3 et 0,8 mM.

Quelle que soit la concentration testée, l'AMBA n'est pas dégradé. Il est donc normal qu'il s'accumule dans nos cinétiques de biodégradation de la mésotrione.

VII.3 Etude de biodégradation de la cyclohexane-1,3-dione

Des problèmes d'analyse par HPLC similaires à ceux décrits pour le AMBA ont été observés pour la cyclohexane-1,3-dione (contradiction des analyses en modes isocratique et gradient). La RMN ^{1}H *in situ* a donc été choisie pour suivre qualitativement et quantitativement cette bioconversion.

Seul le suivi quantitatif du triplet de la cyclohexane-1,3-dione a été possible, le quintuplet résonant à 1,92 ppm étant superposé à d'autres signaux provenant des cellules (Figure 130).

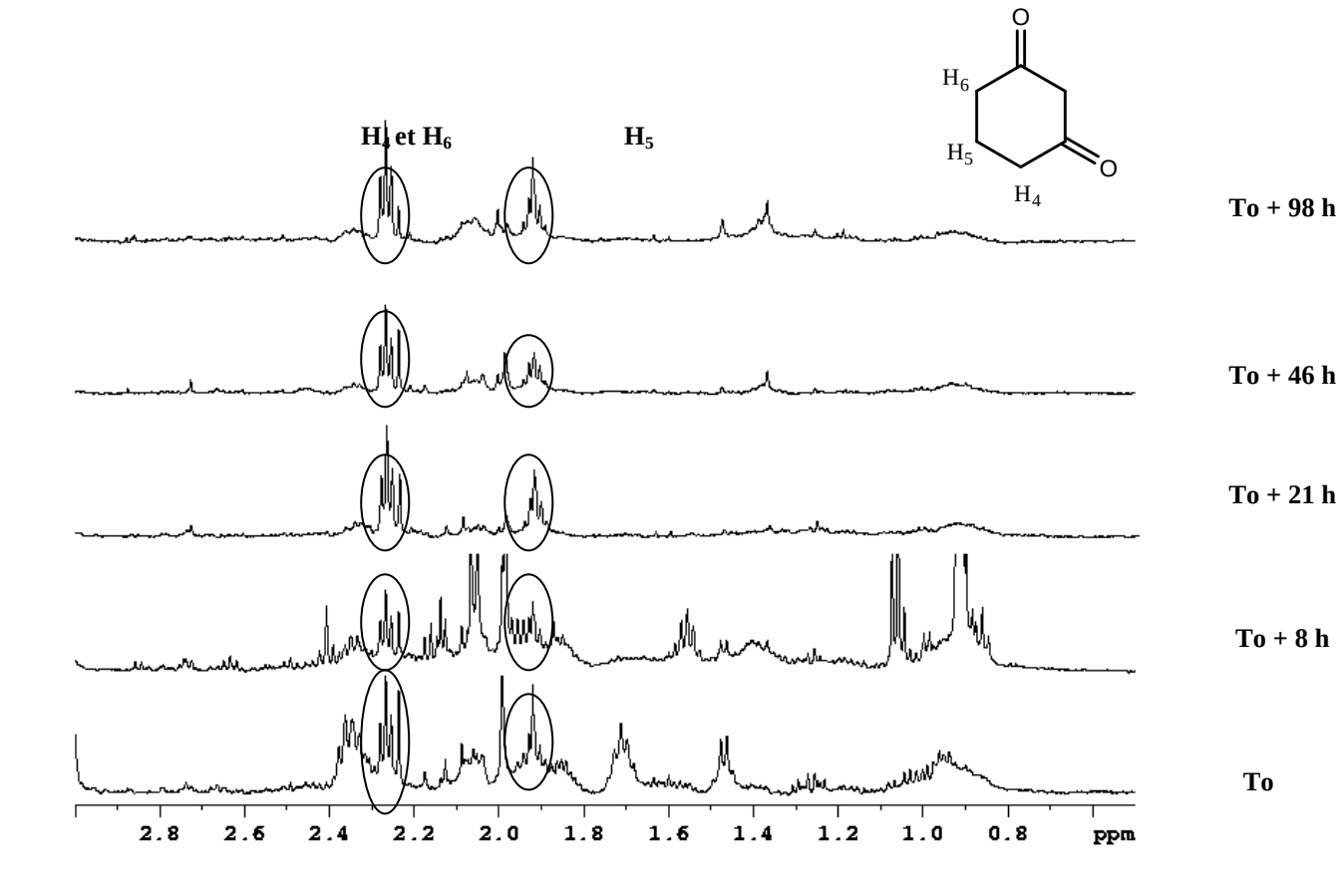


Figure 130 : Cinétiques de biodégradation de la cyclohexane-1,3-dione (0,8 mM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Sur cette cinétique, le composé ne semble pas être dégradé par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Toutefois, l'incertitude de mesure reste importante sur ces analyses par RMN ^{1}H de l'essai à 0,8 mM compte tenu de la complexité des spectres de RMN. Le même problème s'est posé lors de l'étude de la cinétique à 0,3 mM.

Ainsi, la cyclohexane-1,3-dione et le AMBA ne semblent pas être dégradés par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Le MNBA est le seul composé à être transformé en AMBA par cette souche (réduction du groupement nitro en groupement amino).

VIII BILAN GENERAL SUR LA BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE PAR *BACILLUS* SP. 3B6

La souche *Bacillus* sp. 3B6 est la première souche pure isolée capable de dégrader la mésotrione dans des conditions de laboratoire (Durand *et al.*, 2006a). En étudiant les cinétiques de biodégradation de cet herbicide dans différentes conditions (concentration initiale en mésotrione, pH du milieu d'incubation, conditions aérobies et anaérobies), nous avons pu observer, identifier et finalement quantifier les principaux métabolites formés. Ainsi, en réalisant les suivis de biodégradation de la mésotrione (1, 5 et 10 mM), nous avons pu observer la formation transitoire ou non, de sept métabolites, dont seulement deux avaient déjà été identifiés dans la littérature : le MNBA et le AMBA.

VIII.1 Bilan quantitatif du métabolisme de la mésotrione

Afin d'avoir une idée de l'efficacité de dégradation de la souche *Bacillus* sp. 3B6 vis-à-vis de la mésotrione, nous avons comparé, pour les différentes concentrations de mésotrione testées (1, 5 et 10 mM) et pour différents temps, la concentration totale des composés présents dans le milieu d'incubation (Figure 131). Il faut noter que le métabolite M5 n'est pas quantifiable, que nous avons observé un autre métabolite pouvant correspondre à une structure de type azoïque sans certitude, et que d'autres métabolites, en concentration très faibles, sont visibles sur les spectres de RMN ^{1}H ou sur les chromatogrammes.

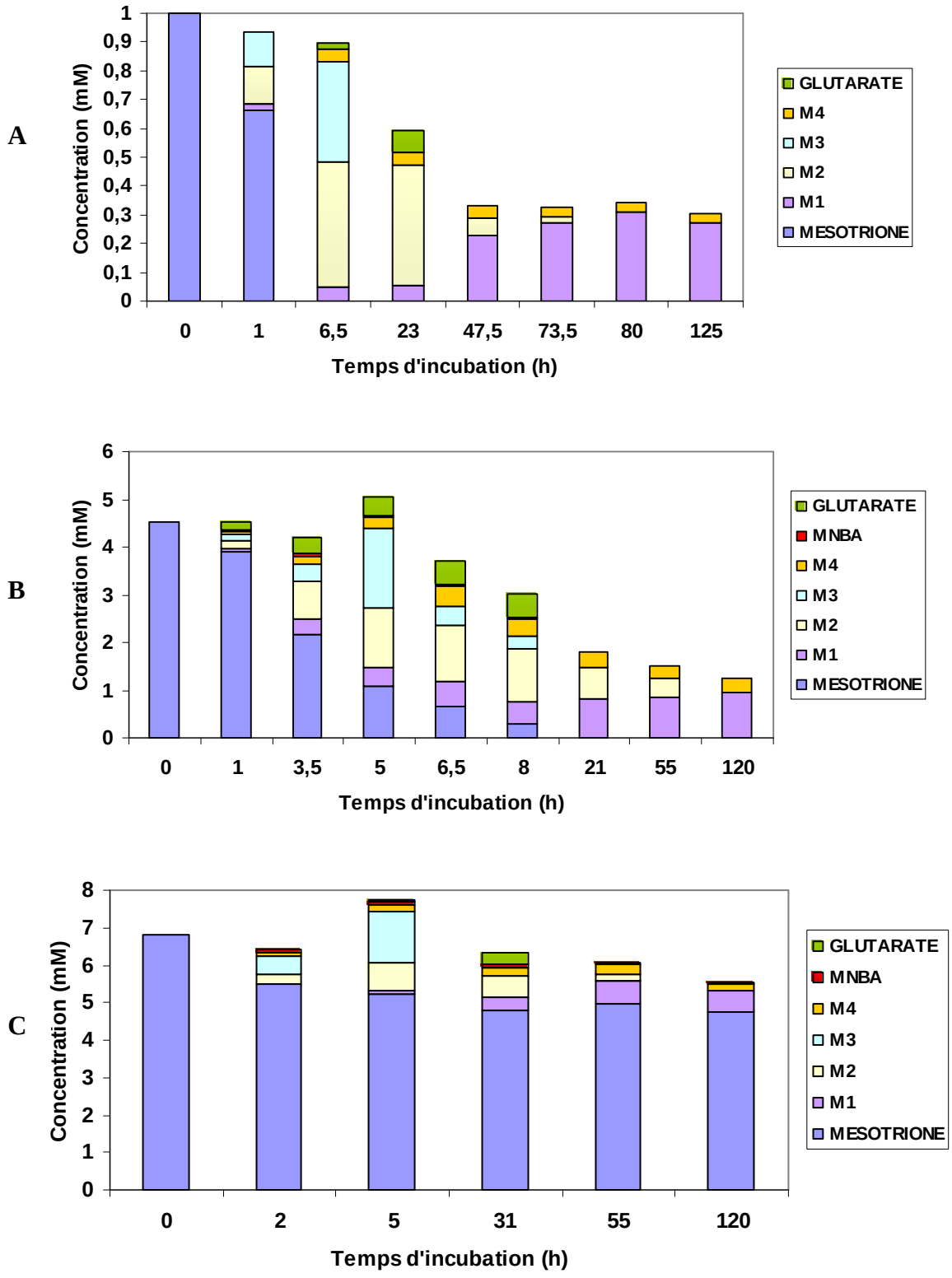


Figure 131 : Comparaison des bilans quantitatifs globaux à différents temps d'incubation pour une cinétique de biodégradation de la mésotrione à 1 mM (A), 5 mM (B) et 10 mM (C)

Ces bilans quantitatifs globaux nous permettent de mettre en évidence une forte diminution de la concentration totale des composés présents dans le milieu au cours du

temps : 70 % pour une concentration initiale de 1 mM en mésotrione, 75% pour une concentration de 5 mM et 45% pour une concentration de 10 mM après 125 heures d'incubation. Il semble donc que quelle que soit la concentration initiale testée en mésotrione, une partie du polluant soit minéralisée. Pour le vérifier, nous avons réalisé des mesures de carbone organique total (COT) sur différents surnageants d'incubation provenant de cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 et 5 mM) et de témoin cellules correspondants (en absence de mésotrione). Ces expériences préliminaires n'ont pas été probantes, les valeurs de carbone organique total étant dans les deux types d'échantillon très élevées et plus importantes dans le témoin cellules. La souche *Bacillus* sp. 3B6 semble donc relarguer dans le milieu, de nombreux composés organiques (visibles sur les chromatogrammes HPLC et les spectres RMN ^{1}H). Son métabolisme intrinsèque semble modifié par la présence de la mésotrione, puisque la quantité de carbone organique total est inférieure lorsque la mésotrione est présente dans le milieu. Il n'est donc pas possible d'avoir un véritable témoin de l'activité propre du microorganisme, qui pourrait servir de « blanc » pour les études de minéralisation. Cependant, nous pouvons estimer qu'une partie de la mésotrione est minéralisée, car les spectres RMN ^{1}H en fin de cinétique montrent certes la présence d'autres métabolites mais en très faible concentration.

Ces bilans quantitatifs nous donnent également une image de l'évolution des différents métabolites quantifiables. Il apparaît, au vu des différents histogrammes, que les métabolites M2 et M3 sont des métabolites transitoires et que leur transformation en absence de cellules en AMBA (M1) n'est pas quantitative. D'autre part, les deux seuls métabolites présents en fin de cinétique, quelle que soit la concentration initiale en mésotrione, sont le AMBA (M1) et l'isoxazole M4.

Un effet toxique de ces métabolites pourrait expliquer leur accumulation ou l'arrêt de la biodégradation dans le cas d'une concentration initiale en mésotrione de 10 mM. Des tests Microtox® ont été réalisés par F. Bonnemoy du Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023 (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand). Le test Microtox® est un test normalisé de toxicité aiguë sur la bactérie marine, *Vibrio fischeri,* qui émet en conditions normales de la lumière bleu-vert. Il s'agit alors de déterminer la concentration (CE_{50}) en toxique qui entraîne l'inhibition de 50 % de la luminescence naturelle de cette bactérie. Le Tableau 20 présente les valeurs de CE_{50} obtenues pour la mésotrione et les métabolites standards (MNBA et AMBA) après 5, 15 et 30 min d'exposition au toxique. Les pH des

solutions de ces composés étant très acide (pH mésotrione = 3,15 à 1000 ppm, pH AMBA = 3,5 à 510 ppm et pH MNBA = 3,6 à 500 ppm), des tests ont également été réalisés sur les solutions dont le pH a été ramené à 7 par addition d'un tampon NaH_2PO_4-Na_2HPO_4, afin de différencier le véritable effet du toxique de l'effet acidité (auquel la bactérie est sensible).

Tableau 20 : Résultats du test Microtox® pour la mésotrione (d'après Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione, J.L. Bonnet, F. Bonnemoy, M. Dusser et J. Bohatier soumise à *Environmental Toxicity*)

Temps d'exposition		Mésotrione	Mésotrione pH = 7	MNBA	MNBA pH = 7	AMBA	AMBA pH = 7	Callisto®
5 min	CE_{50} (ppm)	46,5	103,4	36,6	295,0	17,6	11,5	1,1
	Ecart type	4,9	7,9	2,3	37,8	3,5	3,3	0,08
15 min	CE_{50} (ppm)	43,6	69,2	37,7	312,7	17,8	12,6	1,1
	Ecart type	2,4	4,0	2,0	35,5	4,0	3,0	0,1
30 min	CE_{50} (ppm)	38,4	64,5	38,8	352,7	17,5	12,2	1,2
	Ecart type	4,1	4,1	2,6	37,7	3,8	2,0	0,2

Les plus fortes toxicités observées pour les composés sous forme acide semblent liées à l'acidité du milieu et non au composé lui-même. La toxicité évolue pour certains composés selon le temps d'exposition, différentiant les molécules ayant un effet immédiat (comme le AMBA ou le Callisto®) de ceux ayant un effet moins rapide (comme la mésotrione).

La mésotrione présente une faible toxicité pour la bactérie, ce qui n'est pas le cas de la formulation Callisto® qui présente un CE_{50} de 1,1 mg/L. Il faut également noter une augmentation d'un facteur 5 de la toxicité lorsqu'on passe au AMBA (M1), métabolite qui s'accumule dans le milieu (CE_{50} = 12 mg/L). La présence d'une fonction amino sur le cycle aromatique confère à la molécule une plus forte toxicité que la présence d'une fonction nitro. Ainsi le AMBA est 30 fois plus toxique que le MNBA, métabolite intermédiaire.

Il faudrait maintenant pouvoir tester la toxicité des autres métabolites, en particulier celle de M4, métabolite qui, tout comme M1, s'accumule en fin de cinétique, pour pouvoir éventuellement apporter des réponses à l'arrêt de la biodégradation de la mésotrione à 10 mM.

Enfin il serait intéressant de comparer ces résultats obtenus sur une bactérie marine avec ceux obtenus sur des insectes utiles comme Bembidion Lampros souvent employé comme biomarqueur de toxicité dans les dossiers d'homologation de produits phytosanitaires.

Afin d'obtenir une vision plus globale des mécanismes de biodégradation de la mésotrione par *Bacillus* sp. 3B6, nous avons également réalisé une comparaison en aérobiose et anaérobiose des concentrations totales des composés présents dans le milieu d'incubation à différents temps d'incubation pour les cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1,5 mM) (Figure 132).

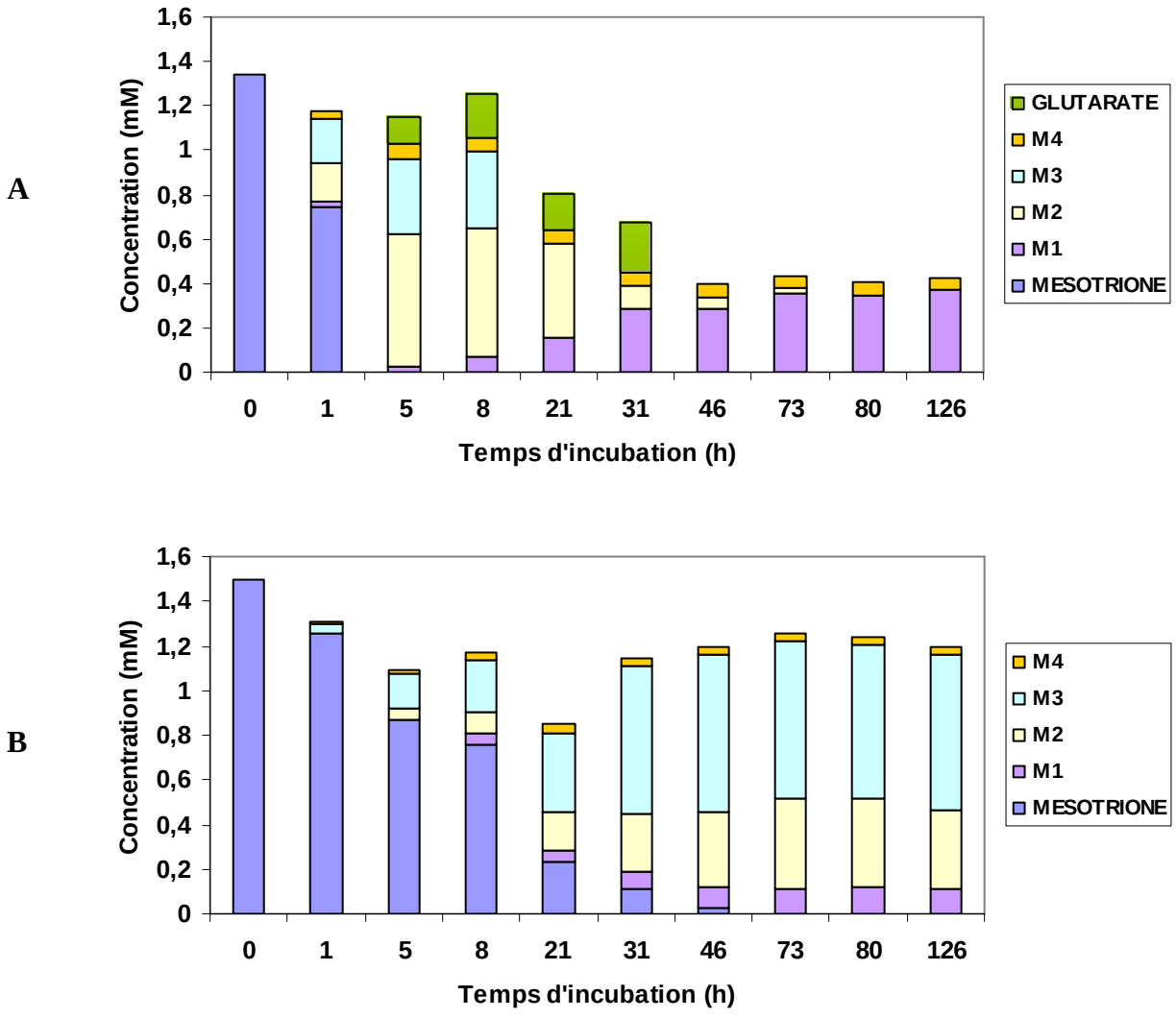


Figure 132 : Comparaison des bilans quantitatifs globaux pour différents temps d'incubation lors d'une cinétique de biodégradation de la mésotrione (1,5 mM) en aérobiose (A) et anaérobiose (B)

En aérobiose, le taux de disparition global après 125 heures d'incubation (70 %), ainsi que les concentrations des différents métabolites formés, sont relativement similaires aux

résultats présentés précédemment malgré une concentration initiale en mésotrione légèrement plus élevée ici (1,5 mM).

En anaérobiose, la mésotrione est totalement dégradée, mais elle est très peu minéralisée (15 %). En effet, elle est transformée en métabolites issus notamment de réactions de réduction, qui s'accumulent dans le milieu (notamment les métabolites M2 et M3) or de telles conditions d'anaérobiose sont susceptibles de se produire dans les sols.

VIII.2 Schéma de biodégradation

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un schéma de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (Figure 133) (Durand *et al.*, 2006b).

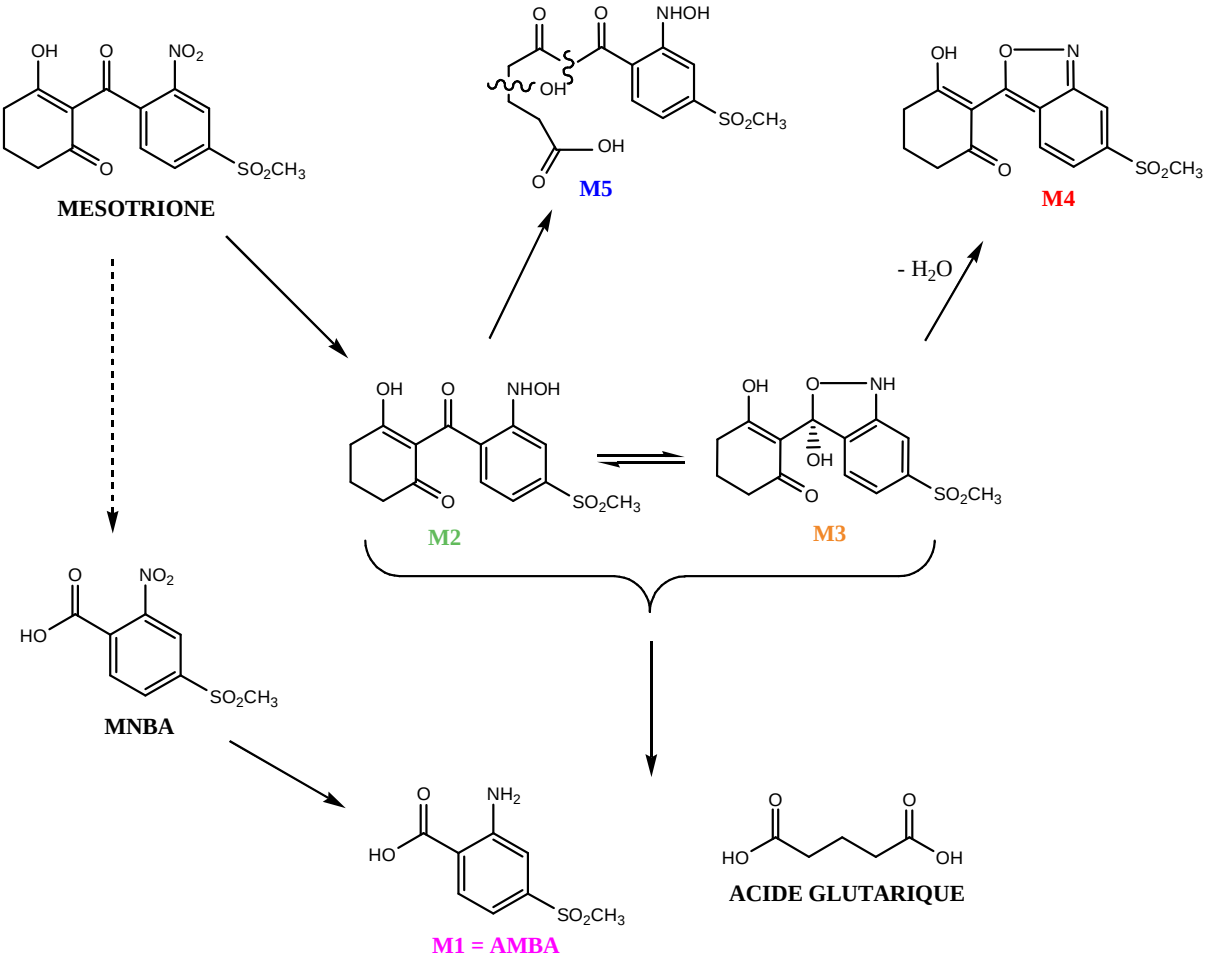


Figure 133 : Schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Deux voies métaboliques de la mésotrione ont pu être mises en évidence chez la souche *Bacillus* sp. 3B6 : une voie majoritaire correspond à la réduction de la fonction nitro de la mésotrione en hydroxylamine et conduit à la formation des métabolites M2 et M3 ; une

voie minoritaire conduit au métabolite M1 (AMBA) après rupture oxydative entre les deux cycles et réduction rapide du groupement nitro de l'intermédiaire (MNBA).

Le groupement nitro de la mésotrione est réduit par une nitroréductase de type I en fonction hydroxylamine (M2). Ce métabolite est en équilibre avec le composé M3 (l'isoxazol-3-ol), formé par addition nucléophile intramoléculaire de la fonction OH de l'hydroxylamine sur la fonction carbonyle exocyclique. La dégradation, en absence de cellules, de ces deux métabolites M2 et M3, relativement instables (instabilité observée en conditions aérobies et non en conditions anaérobies), conduit au AMBA (voie favorisée). M3 peut aussi se transformer en M4 (l'isoxazole) par perte d'une molécule d'eau. En parallèle, M2 peut conduire à la formation de M5 par ouverture oxydative de la partie cyclohexane-1,3-dione de M2. Ceci a été observé dans le cas d'un métabolite de la sulcotrione, analogue chloré de la mésotrione (Rouchaud *et al.,* 1998).

La formation d'acide glutarique a également été observée. Composé facilement assimilable par la bactérie, il pourrait provenir de la rupture oxydative de la « partie cyclohexanedione modifiée» libérée lors de la formation du AMBA à partir de la mésotrione ou des métabolites M2 et M3.

BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE

Quelques souches isolées ont été décrites dans la littérature comme dégradant le glyphosate (cf. chapitre 2 - partie bibliographique) mais il ne nous a pas été possible de les obtenir. Nous avons donc testé dans cette étude deux souches fongiques fournies par le Dr C. Mougin de l'INRA Versailles Grignon : *Trametes versicolor* T2 et *Fusarium solani* PB1. Ces deux champignons ont été isolés de sols contaminés par du glyphosate et sont capables de le transformer. Cependant, les voies métaboliques impliquées ne sont pas connues. Afin de trouver les conditions optimales de dégradation, nous avons testé trois milieux différents de pré-culture et culture : le milieu tartrate donné par C. Mougin et les milieux Malt et Peptone, milieux couramment utilisés pour les champignons dans des travaux de bioconversion. Les études de biodégradation ont été réalisées avec des cellules au repos métabolique (resting cells) en présence de glyphosate (3 mM, 510 mg/L, pH = 7). Cette forte concentration a été choisie pour tenter de suivre les cinétiques de biodégradation par RMN du ^{1}H et RMN du ^{31}P.

I MISE AU POINT DE LA METHODE DE DOSAGE DU GLYPHOSATE PAR HPLC

Après analyse de la bibliographie, nous avons choisi pour notre étude de doser le glyphosate par une méthode de dérivation pré-colonne avec le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl), suivie d'une analyse par HPLC équipée d'une colonne phase inverse en C_{18} et d'un détecteur à fluorescence. Le protocole de dérivation a été décrit par Miles et Moye (1988) (Figure 134).

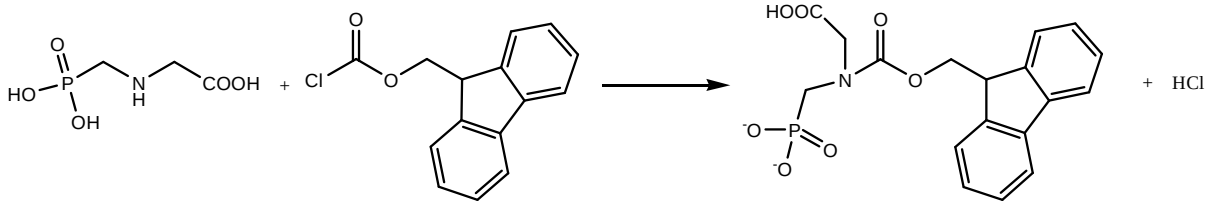


Figure 134 : Réaction de dérivation du glyphosate avec le chloroformate de 9-fluorénylméthyle (Fmoc-Cl)

Afin de valider la méthode, des premiers essais ont été réalisés sur des solutions de glyphosate pur dans différentes gammes de concentration allant de 1 nM à 5 mM : domaine de linéarité, répétabilité, … L'injection répétée du même échantillon a permis de mettre en

évidence l'instabilité du dérivé Fmoc-glyphosate formé. En effet, nous observons au cours du temps un élargissement du signal (t_r = 4,2 min), puis une déformation de la ligne de base avec apparition de plusieurs pics parasites sans doute liés à la forte réactivité du Fmoc-Cl, en excès dans le milieu. En effet, il est raisonnable d'envisager la réaction du Fmoc-Cl avec par exemple, des sites nucléophiles de la phase stationnaire tels que des silanols non greffés. Cette réaction aurait pour conséquence de modifier notablement les propriétés de la phase stationnaire, d'où des fluctuations importantes de la ligne de base. La quantification devient alors impossible, en particulier pour les faibles concentrations. La Figure 135 présente un exemple de ce phénomène.

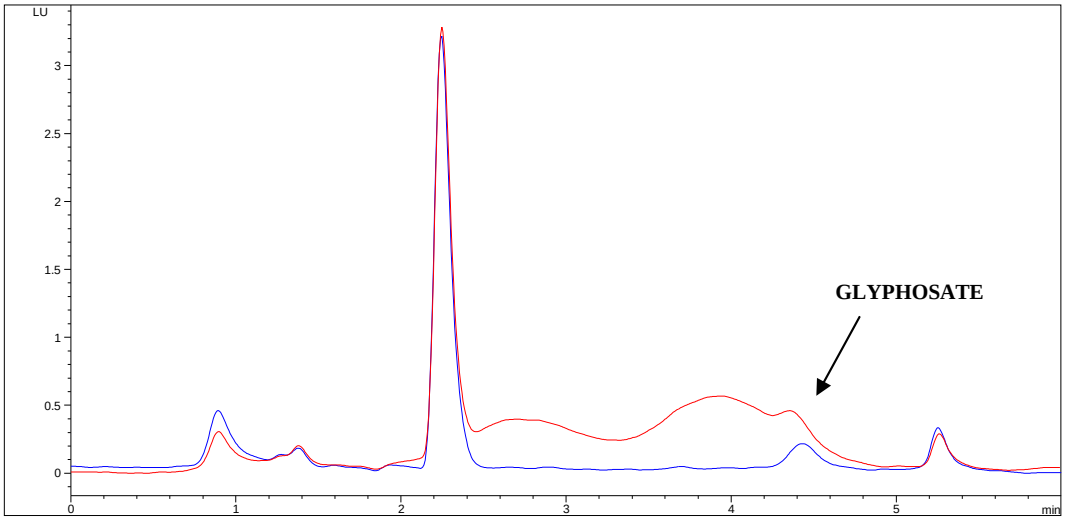


Figure 135 : Chromatogrammes d'un échantillon de glyphosate dérivé (3 nM) analysé immédiatement (bleu) et après 30 minutes à température ambiante (rouge)

Le chromatogramme représenté en bleu est obtenu pour un échantillon de glyphosate (3 nM) analysé immédiatement après sa dérivation. Le pic du glyphosate est parfaitement défini et peut être intégré sans aucun problème. Le chromatogramme représenté en rouge correspond au même échantillon analysé après 30 minutes passé sur le portoir de la chaîne HPLC à température ambiante. La ligne de base est fortement déformée, ce qui empêche toute quantification correcte. Dans ces conditions, les résultats ne sont pas exploitables, en particulier pour les faibles concentrations (en-dessous du micromolaire), si l'échantillon n'est pas analysé immédiatement après dérivation.

Nous avons cherché à optimiser le protocole de dérivation du glyphosate afin d'améliorer la limite de quantification mais aussi la stabilité du dérivé Fmoc-glyphosate. Ce travail a été réalisé par Mohamed Ettaoussi au cours de son stage de Master M2. Chaque paramètre intervenant dans le procédé de dérivation a été étudié séparément et modifié en

s'inspirant des données de la littérature (Le Fur *et al.*, 2000 ; Le Bot *et al.*, 2002 ; Nedelkoska et Low, 2004) (Tableau 21). La stabilité du dérivé Fmoc-glyphosate a été particulièrement suivie au cours d'injections successives. La gamme de concentration en glyphosate testée s'étend de 0 à 100 nM. Les conditions d'analyse par HPLC (phases mobile et stationnaire) n'ont pas été modifiées.

Tableau 21 : Différents paramètres modifiés au cours du procédé de dérivation du glyphosate

Protocole	Ajustement du pH à 7	Durée de réaction	Fmoc-Cl		Concentration borate (M)	Lavages	
			Acétone	Acétonitrile		Acétate d'éthyle	Ether éthylique
Classique		20 min	x		0,025	x	
I		20 min	x		0,025		x
II	x	20 min	x		0,025	x	
III		20 min		x	0,025	x	
IV		30 min		x	0,025	x	
V		20 min	x		0,05 0,1 0,5	x	
VI		**30 min**		**x**	**0,05**	**x**	

Le fait de changer le solvant d'extraction pour les lavages (protocole I) ou de neutraliser le pH, avant ou après dérivation (protocole II), n'améliore pas l'analyse et entraîne même de nouvelles perturbations : dilution de la concentration de l'échantillon par addition de NaOH pour ajuster le pH ; difficultés liées à l'étape de décantation et à l'utilisation d'un solvant extrêmement volatile comme l'éther éthylique. Nous avons donc choisi de ne pas modifier le pH des échantillons à analyser et de continuer à travailler avec de l'acétate d'éthyle.

La préparation de la solution de Fmoc-Cl dans l'acétonitrile, au lieu de l'acétone, (protocole III) et l'augmentation du temps de réaction (protocole IV) ont permis d'obtenir une meilleure réponse du détecteur (plus forte intensité du signal) correspondant à une amélioration du rendement de la réaction de dérivation. D'autre part, l'utilisation d'une solution de borate plus concentrée (protocole V) améliore la résolution des pics (pics plus fins et plus intenses) à condition de rester à des concentrations inférieures à 0,1 M. En effet, dans

le cas contraire, nous observons un précipité lors de l'ajout d'acétone ou d'acétonitrile, ce qui rend difficile la réaction de dérivation et l'étape de lavages du dérivé Fmoc-glyphosate.

Ces essais nous ont permis d'améliorer la méthode d'analyse classique pour quantifier de façon répétable et fiable, des échantillons jusqu'à 6 nM (2 µg/L en glyphosate dérivé) (protocole VI). En dessous de cette concentration, le rapport signal sur bruit n'est pas suffisant pour quantifier le glyphosate correctement. Avec cette nouvelle méthode optimisée, le dérivé Fmoc-glyphosate est stable pendant environ 24 h. Cependant, dans la mesure du possible, les analyses HPLC ont été réalisées immédiatement après la dérivation des échantillons.

II ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE PAR *TRAMETES VERSICOLOR* T2

II.1 Après culture sur milieu Tartrate

II.1.1 Suivi cinétique de la biodégradation par HPLC

Après 72 h de pré-culture et de culture sur milieu Tartrate, les cellules fongiques (resting cells) sont incubées avec une solution concentrée de glyphosate (3 mM). Les analyses HPLC montrent une disparition rapide et quasiment complète du glyphosate (Figure 136). Aucune dégradation du glyphosate n'est observée en absence de cellules dans les mêmes conditions : il n'y a donc ni dégradation abiotique, ni adsorption sur le verre de l'erlenmeyer du glyphosate.

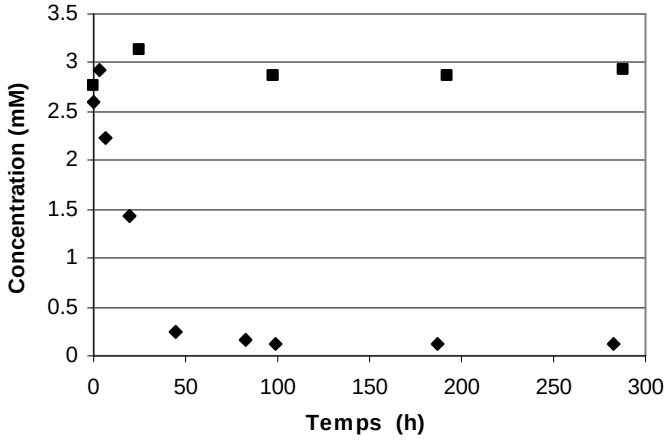


Figure 136 : Cinétiques de biodégradation du glyphosate (3 mM) par *Trametes versicolor* T2 (◆) et d'un témoin glyphosate sans cellules (■)

Cependant, ces résultats ne peuvent être considérés comme validés : en effet, après 3 jours d'incubation (72 h), de nombreux pics parasites apparaissent sur les chromatogrammes, pics qui sont également présents, pour la plupart, dans le témoin cellules seules. Il s'agit donc de composés relargués par les cellules. Malheureusement, dans ce cas, le témoin cellules ne peut servir directement de véritable « blanc », puisque le métabolisme intrinsèque du champignon peut être modifié de manière qualitative et quantitative par la présence du xénobiotique. La méthode de dérivation par le Fmoc-Cl n'est pas sélective du glyphosate, ce groupement protecteur pouvant réagir avec n'importe quelle fonction amine. Le dosage du glyphosate risque alors de n'être plus quantitatif, malgré l'excès de réactif utilisé.

II.1.2 Identification des métabolites

Une des façons de confirmer la véritable dégradation du glyphosate est d'essayer de mettre en évidence l'apparition de métabolites. Les principaux métabolites décrits dans la littérature, la sarcosine, la glycine et l'AMPA, sont des petites molécules sans groupement chromophore mais possédant toutes une fonction amine. La méthode optimisée de dérivation par le réactif Fmoc-Cl peut donc être appliquée. Nous avons ainsi pu déterminer les temps de rétention de chacun de ces produits dans nos conditions chromatographiques : $t_{R(glycine)}$ = 24 min, $t_{R(AMPA)}$ = 25,3 min et $t_{R(sarcosine)}$ = 28,9 min. Dans nos échantillons de biodégradation, un pic apparaît à 24,7 min dès 8 h d'incubation, qui pourrait correspondre au AMPA. Son aire augmente au cours du temps, mais il devient rapidement difficile à suivre du fait de la présence de pics parasites dans cette même région.

Nous avons également réalisé une expérience avec des cellules cultivées dans un milieu Tartrate déficient en phosphates (pas d'addition de KH_2PO_4). En effet, d'après la littérature, l'apport de phosphates inorganiques n'inhibe pas la dégradation du glyphosate *via* la voie de l'AMPA contrairement à ce qui est observé pour la voie de la sarcosine. Dans notre expérience, aucune différence significative de vitesse de biodégradation du glyphosate entre les cellules cultivées sur milieu Tartrate « normal » ou milieu tartrate sans ajout de phosphates n'a été notée.

Une autre stratégie est de faire appel à une technique permettant l'analyse directe de l'échantillon sans dérivation préalable du glyphosate, telle que la RMN. Cependant, cette méthode présente aussi des limites. En effet, les champignons secrètent des sucres qui sont relargués dans le milieu d'incubation. La centrifugation et la filtration des échantillons à analyser ne permettent pas leur élimination. Ces composés relargués dans le milieu viennent bruiter les spectres de RMN ^{1}H. Les empreintes de ces sucres sont visibles entre 3 et 4 ppm. Les deux signaux protons correspondants aux $-CH_2$ du glyphosate (3,09 et 3,72 ppm pour CH_2-P et CH_2-C respectivement) sont par conséquent masqués (Figure 137). Il est à noter que ces déplacements chimiques sont pH – dépendants. A titre d'exemple, pour un pH voisin de 3, ces déplacements chimiques sont de 3,35 et 4,03 ppm, respectivement. Aussi, des variations de déplacements chimiques ne sont pas à exclure suite à des interactions avec la matrice biologique (polysaccharides sécrétés par le champignon, etc.), rendant l'identification de métabolites délicate.

Les spectres ^{1}H correspondant aux temps To, 20 h et 83 h sont présentés sur la Figure 137 et comparés aux standards de la sarcosine et de l'AMPA, les deux métabolites possibles suivant la voie de biodégradation empruntée. La quantification du glyphosate, dans les matrices biologiques étudiées, est impossible du fait de la superposition des signaux RMN ^{1}H du glyphosate avec des signaux de la matrice biologique. Toutefois, l'allure générale des spectres est modifiée au cours de la cinétique. Sur le spectre enregistré après 83 h d'incubation, on note la présence de signaux à 3,89 ppm quasi-identiques au signal du groupement méthyle du AMPA. Il semble qu'il y ait en fait deux signaux superposés dans ce « massif », un doublet et un singulet. La déconvolution du doublet présumé laisserait apparaître une constante de couplage $^2J_{^1H-^{31}P}$ proche de 11,7 Hz, identique à celle observée pour le AMPA. Dans cette éventualité, sa concentration serait d'environ 0,9 mM après 83 h d'incubation. Même si la présence de AMPA sur les spectres de RMN est en accord avec les

données de l'HPLC, ce résultat devra être confirmé. Les premières analyses des surnageants par RMN ^{31}P (abondance naturelle voisine de celle de ^{1}H et réceptivité avoisinant les 85% de celle de l'hydrogène) ne nous ont pas, pour l'heure, permis de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse de travail, vraisemblablement pour des raisons de sensibilité. L'adaptation en cours de séquence de type HMBC aux couplages $^{2}J_{^{1}H-^{31}P}$ nous permettrait de palier partiellement les problèmes de sensibilité et de superposition de signaux.

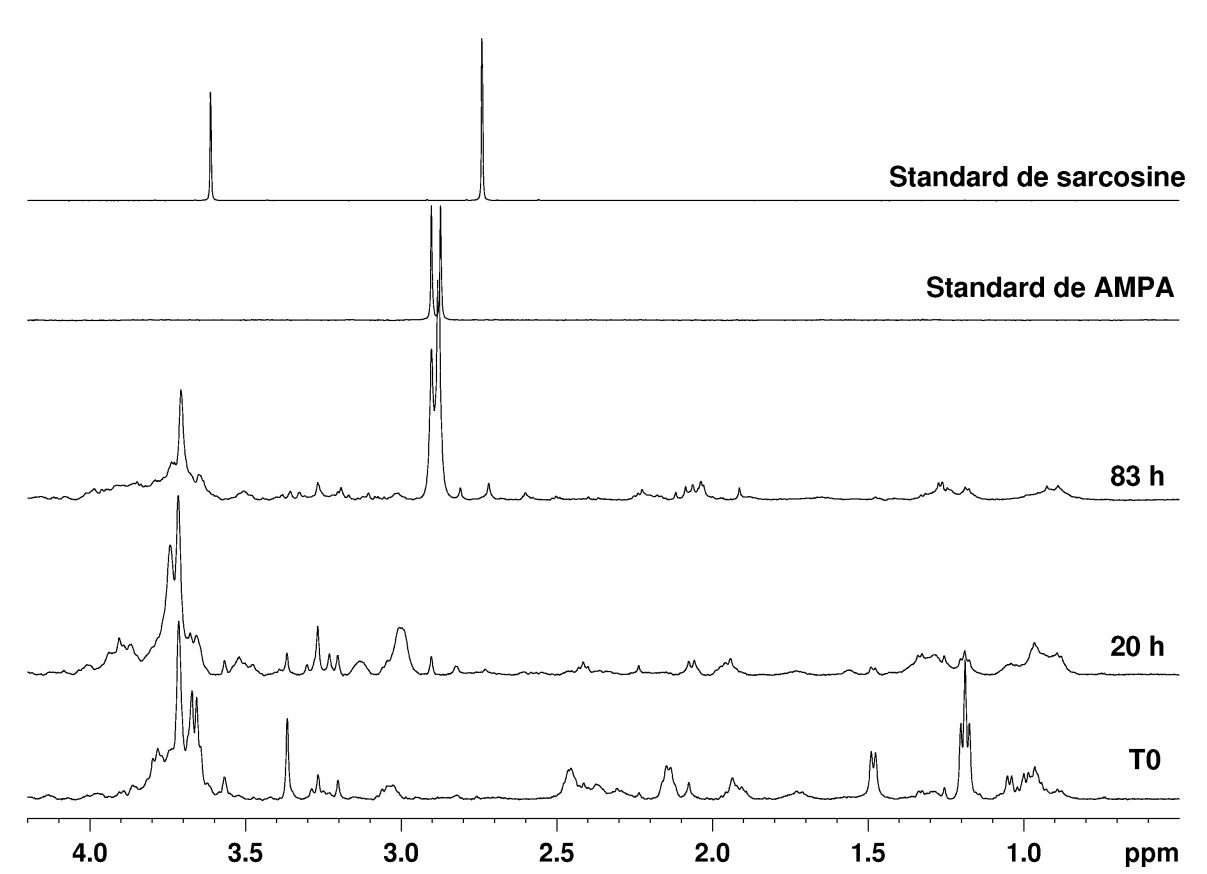


Figure 137 : Comparaison de spectres ^{1}H enregistrés lors de l'incubation du glyphosate en présence du champignon *Trametes versicolor* T2 à différents temps d'incubation et de spectres des standards de AMPA et de sarcosine

L'autre métabolite décrit dans la littérature, la sarcosine, n'a pas été observé sur les spectres de RMN ^{1}H, mais il pourrait être rapidement transformé en glycine. Cependant, la probabilité de trouver de la glycine, en quantité importante, dans le milieu est faible, car avec des cellules au repos métabolique, il est raisonnable de penser que cet acide aminé serait immédiatement intégré au métabolisme central des cellules. De plus, le déplacement chimique du CH_2 de la glycine, compris entre 3,55 et 3,22 en passant d'un pH neutre à un pH proche du pKa de l'amine, se trouve dans la zone des sucres relargués par le champignon. Nous serions alors dans le même cas de figure de superpositions de signaux que pour le glyphosate.

Nos techniques d'analyse montrent ici leur limitation dans le cas d'un milieu complexe tel qu'un milieu d'incubation de champignons. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire n'est pas assez sensible en ^{31}P et les signaux recherchés du glyphosate en ^{1}H sont superposés avec d'autres composés du milieu. Ces approches par RMN ont toutefois été présentées comme une alternative intéressante aux méthodes chromatographiques dès lors que les concentrations sont suffisamment élevées (Cartigny *et al.*, 2004). Il est à noter que dans cet article, les concentrations en glyphosate sont très élevées, de l'ordre de plusieurs grammes par litre (après ingestion par des humains de 20 mL de Roundup® de concentration comprise entre 7 et 400 $g.L^{-1}$ selon les formulations !), soit plus de dix à mille fois supérieures aux concentrations utilisées dans nos études. La HPLC, elle, du fait de la non sélectivité de la méthode de dérivation du glyphosate, peut donner des résultats non quantitatifs. Cependant, l'apparition d'un pic ayant un temps de rétention proche de celui du AMPA, relativement bien défini dans les échantillons correspondant aux premiers temps d'incubation où les composés relargués sont encore en faible quantité, peut permettre d'estimer qu'une dégradation du glyphosate a lieu. D'autres approches analytiques par LC/MS, avec dérivation préalable des échantillons, sont actuellement envisagées.

II.2 Après culture sur les milieux Peptone et Malt

D'autres milieux de culture couramment utilisés pour les champignons dans des études de bioconversion ont été testés dans le but d'étayer notre hypothèse de dégradation du glyphosate par la souche *Trametes versicolor* T2.

Nous avons pu observer que la dégradation du glyphosate dépend du milieu de culture. En effet, avec des cellules cultivées sur le milieu Malt ou le milieu Peptone, nous avons dû travailler avec une concentration en glyphosate de 0,8 mM (135 mg/L). Même avec cette plus faible concentration de glyphosate, aucune dégradation n'est observée avec les cellules cultivées dans le milieu Peptone, et la dégradation avec les cellules cultivées sur milieu Malt reste faible (25% après 15 jours d'incubation) (Figure 138).

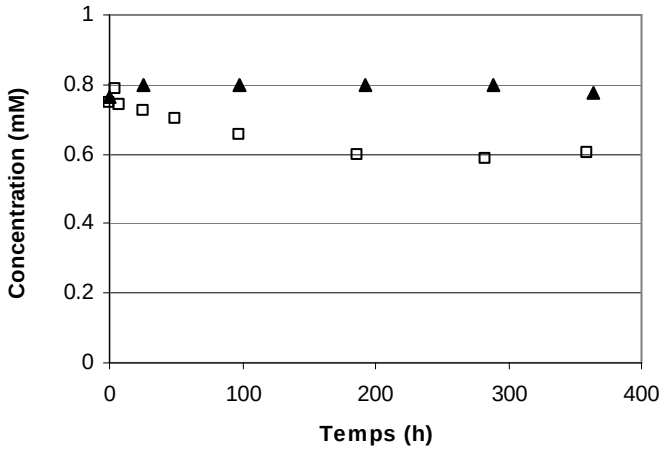


Figure 138 : Cinétiques de biodégradation du glyphosate (0,8 mM) par la souche *Trametes versicolor* T2 cultivée sur milieu Peptone (▲) et milieu Malt (□)

III ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE PAR *FUSARIUM SOLANI* PB1

III.1 Après culture sur milieu Tartrate

La souche *Fusarium solani* PB1 n'est pas très efficace pour dégrader le glyphosate. Avec des cellules cultivées dans les mêmes conditions que *Trametes versicolor* T2 sur milieu Tartrate complet, une disparition de 17% du glyphosate (3 mM) est observée après 12 jours d'incubation.

Il faudrait tester cette souche sur milieu déficient en phosphates et tester des concentrations plus faibles en glyphosate pour véritablement estimer les potentialités de cette souche à dégrader le glyphosate. Ces essais n'ont pu être réalisés faute de temps.

III.2 Après culture sur les milieux Peptone et Malt

Le pourcentage de dégradation du glyphosate par le champignon *Fusarium solani* PB1 s'élève à 25 % après 12 jours d'incubation lorsqu'il est cultivé dans le milieu Malt. Aucune dégradation significative n'est observée avec les cellules cultivées sur milieu Peptone (Figure 139). De nombreux signaux sont visibles sur les chromatogrammes, mais plusieurs le sont aussi dans les témoins cellules seules. Ce faible pourcentage de dégradation ne permet pas d'apporter d'éléments nouveaux sur la voie de dégradation empruntée.

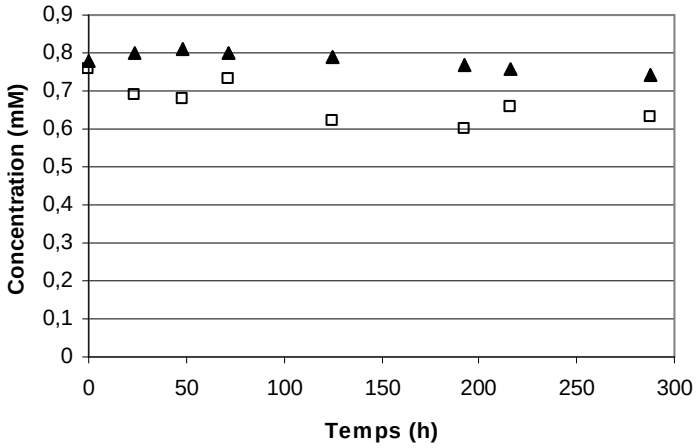


Figure 139 : Cinétiques de biodégradation du glyphosate (0,8 mM) par la souche *Fusarium solani* PB1 cultivée sur milieu Peptone (▲) et milieu Malt (□)

IV BILAN SUR LA BIODEGRADATION DU GLYPHOSATE

Seule l'incubation du champignon *Trametes versicolor* T2 avec le glyphosate permet d'observer une disparition importante de cet herbicide, en particulier lorsqu'il a été cultivé sur milieu Tartrate (95 % de disparition après 15 jours d'incubation pour une concentration initiale de 3 mM en glyphosate). La culture sur milieu Peptone inhibe totalement la biodégradation. L'apport de phosphates inorganiques sous forme de sels ne modifie pas les cinétiques de biodégradation. La souche *Fusarium solani* PB1, quant à elle, ne dégrade que faiblement le glyphosate quel que soit le milieu de culture utilisé.

Seuls les résultats obtenus par HPLC ont pu être réellement exploités, les analyses par RMN ^{1}H étant non interprétables du fait de la présence de sucres dissimulant l'empreinte proton du glyphosate ou par manque de sensibilité lors des analyses par RMN ^{31}P. Cependant, la méthode de dérivation utilisée pour pouvoir détecter le glyphosate en HPLC n'étant pas spécifique, il reste un point d'interrogation sur la véracité de la dégradation observée. La présence d'un pic présentant un temps de rétention proche de celui du AMPA, ainsi que le fait qu'une telle disparition du glyphosate n'est pas observée dans tous les cas (autre souche, autres milieux de culture), pourrait laisser penser qu'une dégradation du glyphosate a effectivement lieu avec la souche *Trametes versicolor* T2. Des analyses des milieux d'incubation, après dérivation, par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance sont actuellement envisagées pour confirmer cette hypothèse.

PARTIE II

Etude de l'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur différentes argiles, complexes argilo-humiques et sur un sol

Les herbicides, tels que la mésotrione ou le glyphosate, une fois épandus sur les champs agricoles vont certes atteindre leur cible, mais une partie des dépôts, outre la volatilisation, va se retrouver à plus ou moins long terme dans le sol. Il s'agit d'un milieu récepteur par excellence *via* les lessivages par la pluie, les possibles translocations par la plante ou une incorporation avec les résidus de végétaux ou de céréales après récolte. Il est donc important de connaître le devenir des pesticides dans le sol, compartiment hétérogène complexe, réservoir de stockage et lieu de vie pour une micro- et macrofaune très diverses, où processus de transfert et de dégradation vont entrer en compétition ou bien s'associer pour accélérer la disparition des polluants.

Un des facteurs clefs contrôlant le devenir des pesticides dans les sols est le phénomène d'adsorption. Cette propriété de partage des molécules d'un pesticide donné entre phases solide et liquide va en effet régir son comportement environnemental global (processus de transfert et de dégradation) : son caractère persistant ou non, sa capacité à être transporté et à devenir un polluant ou pas, à être biodégradé ou pas (biodisponibilité) ou même son efficacité vis-à-vis de sa cible. Il est donc important d'évaluer la capacité d'adsorption des sols vis-à-vis des pesticides pour comprendre leur devenir, mais aussi de mettre en évidence les paramètres majeurs contrôlant cette adsorption afin de pouvoir le prédire. Cependant, il existe une infinité de mélanges complexes et hétérogènes, constitués de particules de nature variée allant de l'échelle du nm au cm. Ainsi, après plus de 40 ans de recherche dans le domaine, l'approche globale du phénomène d'adsorption d'un pesticide donné dans un sol spécifique reste toujours plus ou moins empirique (don Wauchope *et al*., 2002).

Afin de simplifier notre approche, nous avons choisi de travailler avec des constituants essentiels isolés de sol, des argiles naturelles, mais aussi avec un sol entier, notre objectif étant l'étude des conséquences des interactions constituants du sol – pesticide (adsorption) sur leur biodégradation. Nous avons choisi, pour notre étude : (i) trois argiles cationiques naturelles commerciales, deux sont très largement utilisées en synthèse organique - la **K10** et la **KSF** - en tant que catalyseurs acides (Li et Li, 1998 ; Rios *et al.*, 2003 ; De Stefanis et Tomlinson, 2006) et la dernière est utilisée plus généralement dans des études d'adsorption, la montmorillonite Wyoming **SWy-2**, qui présente, elle, un caractère basique (Carrizosa *et al*., 2004 ; Kulshrestha *et al*., 2004), (ii) des argiles anioniques synthétiques (HDL), (iii) des fractions argileuses de sols.

Nous avons également travaillé sur un sol naturel (collaboration avec l'équipe du Prof. J. Bohatier, Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR 6023, Université Blaise Pascal) provenant d'un site expérimental de l'INRA, situé dans la plaine agricole de la Limagne à proximité de Clermont-Ferrand. Le sol étudié est issu d'une parcelle non cultivée, n'ayant pas reçu de produits phytosanitaires depuis au moins 30 ans (source INRA). Deux horizons ont été prélevés : 0-5 cm et 10-20 cm. Des analyses de ces deux horizons ont montré qu'ils sont très similaires dans leur composition. Ce sol est très riche en fraction argileuse (37 %) et contient 2,46 % de carbone organique (pH voisin dans l'eau de 7,9).

Deux approches ont été choisies pour essayer de caractériser le phénomène d'adsorption :

- une approche classique faisant appel à la réalisation de cinétiques, puis d'isothermes d'adsorption avec mise en contact de la matrice solide et de l'herbicide dans différents rapports solide / liquide ;
- une seconde approche faisant appel à la RMN, technique qui pourrait permettre d'appréhender directement *in situ* les phénomènes d'adsorption d'un point de vue qualitatif et quantitatif, et même éventuellement de caractériser les interactions sol-herbicide à l'échelle moléculaire. Il s'agissait dans ce cadre d'étudier les potentialités de cette technique, et plus spécialement de la RMN HR-MAS, pour apporter des éléments de réponse dans l'étude des mécanismes d'adsorption.

Nous avons choisi de travailler avec trois rapports solide/liquide, de très dilué (1/200) à des conditions proches de celles environnementales (1/3), en passant par un rapport intermédiaire (1/10). En effet, ce rapport peut influencer l'adsorption du polluant organique sur la matrice solide. Dans un grand nombre de cas, la capacité d'adsorption n'est pas proportionnelle à la quantité d'adsorbant. En effet lorsque le rapport est élevé, des agrégats plus ou moins compacts peuvent se former entre les particules, diminuant ainsi la surface spécifique et le nombre de sites d'adsorption potentiels. Dans le cas inverse, lorsque le rapport est faible, les particules de solide peuvent être soumises à des forces de répulsion présentant ainsi une surface de contact plus grande que dans le cas précédent, et favorisant ainsi les interactions avec le soluté.

La gamme de concentrations en herbicide choisie est relativement large (de 0,2 à 4 mM) et comprend de fortes concentrations peu probables en conditions environnementales,

sauf dans le cas de pollutions ponctuelles. Ce choix nous a été dicté par l'utilisation de la RMN, qui est une technique performante mais peu sensible, aussi bien au niveau des analyses classiques de surnageants (cf. partie I) que pour les nouvelles approches développées en terme d'adsorption. Il nous fallait effectivement commencer par des conditions extrêmes pour véritablement valider ou non les potentialités de la RMN dans ce domaine. Cette gamme de concentrations avait également été choisie pour réaliser les essais de biodégradation préalables.

Adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur le matériel utilisé dans les expériences d'adsorption :

Avant de débuter nos expériences d'adsorption des deux herbicides sur les différentes matrices solides choisies, il nous fallait d'abord vérifier que ces deux polluants ne s'adsorbent pas sur le matériel utilisé au cours de l'expérience. Nous avons donc testé l'adsorption de la mésotrione et du glyphosate sur les tubes de centrifugation en polypropylène copolymère (PPCO) utilisés pour la mise en contact de la matrice solide et de la solution de pesticide. Ce test a été réalisé sous la forme d'une cinétique d'adsorption de la mésotrione et du glyphosate (0,2 et 4 mM) sur 5 jours. L'adsorption a aussi été vérifiée sur les filtres à seringue (porosité = 0,45 µm) en polytétrafluoroéthylène (PTFE) employés pour filtrer les surnageants contenant l'herbicide, après adsorption et avant injection en HPLC. Ces essais ont été réalisés sur une gamme étalon de chaque herbicide allant de 0 à 4 mM.

La mésotrione ne s'adsorbe ni sur les tubes en PPCO, ni sur les filtres en PTFE. Par contre, le glyphosate s'adsorbe sur les filtres (environ 10 % pour une concentration initiale de 4 mM) (Tableau 22).

Tableau 22 : Récapitulatif de l'adsorption observée de la mésotrione et du glyphosate sur le matériel utilisé lors des études d'adsorption

	TUBES CENTRIFUGATION	FILTRES EN PTFE
MESOTRIONE	Pas adsorption	Pas adsorption
GLYPHOSATE	Pas adsorption	**10 % (pour une concentration à 4 mM)**

La Figure 140 présente les droites d'étalonnage du glyphosate obtenues à partir d'échantillons filtrés sur les filtres en PTFE et non filtrés.

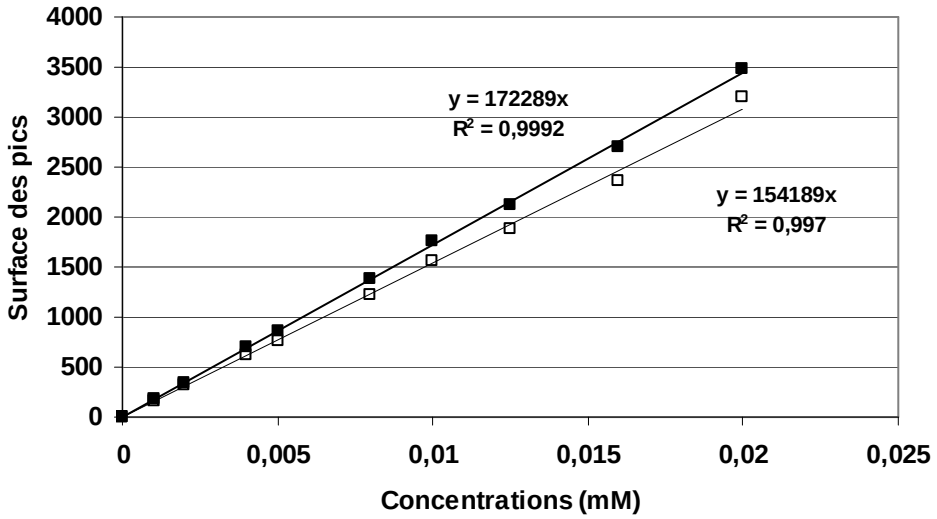


Figure 140 : Droites d'étalonnage du glyphosate réalisées à partir de solutions étalons diluées 200 fois et filtrées (□) et non filtrées (■)

Pour tenir compte de ce taux d'adsorption, toutes les solutions étalons en glyphosate utilisées ont été filtrées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les surnageants après adsorption, ce qui corrige toute erreur possible sur la concentration réellement adsorbée dans l'argile. Les solutions de la gamme étalon, les solutions initiales de glyphosate avant adsorption et les échantillons après adsorption sont donc traités selon le même protocole de dilution, de filtration, de dérivation et d'analyse par HPLC.

L'étude d'adsorption des deux herbicides sur les différentes matrices solides choisies a donc débuté par des expériences préliminaires de cinétiques d'adsorption, afin de définir le temps de contact nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre correspondant au maximum d'adsorption. Une fois les conditions définies, nous avons réalisé les isothermes d'adsorption pour les différents rapports solide/liquide (solution aqueuse du pesticide) définis précédemment. Chaque point constituant les isothermes a été doublé. Les isothermes ont été ensuite présentés par la méthode directe Cad/m = f(Ce) (Cad : concentration de soluté adsorbée (mM), m : masse de solide (g), Ce : concentration de soluté à l'équilibre (mM)). En fonction de l'allure de cet isotherme, Giles *et al*. (1960) ont réalisé une classification en quatre catégories principales, caractérisant le type d'adsorption (Figure 141).

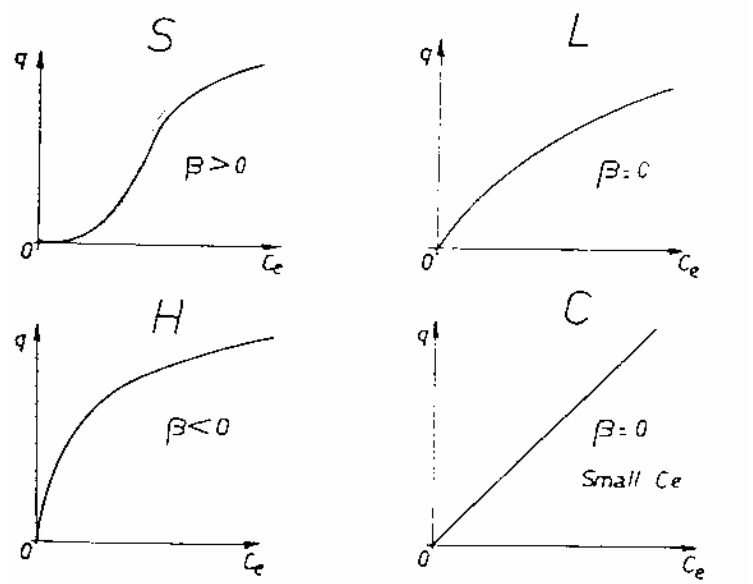


Figure 141 : Classification des isothermes d'adsorption (Calvet, 1989 d'après Giles *et al.* (1960))

La capacité d'adsorption est notée « q » sur la Figure 141. Par la suite, elle sera notée Cs (Cs = Cad/m en mmol/g). La forme de l'isotherme rend compte du mécanisme d'adsorption et dépend à la fois de la nature de l'adsorbat et de l'adsorbant.

- isotherme de type S : l'adsorption devient plus facile à mesure que la concentration du soluté en phase liquide augmente. L'allure de la courbe montre une forte compétition entre soluté et solvant ou d'autres espèces présentes à la surface de l'adsorbant, mais aussi un effet coopératif des premières molécules adsorbées vis-à-vis des suivantes soit par modification de la surface de l'adsorbant, soit par création d'une première couche de molécules adsorbées permettant l'adsorption des suivantes.

- isotherme de type L : l'allure de la courbe montre une diminution de la disponibilité des sites d'adsorption (ou des sites libres moins attractifs pour le soluté) au fur et à mesure que la concentration en soluté augmente. Ce type d'isotherme traduit une haute affinité du soluté pour l'adsorbant.

- isotherme de type H : Cet isotherme est le cas extrême de l'isotherme de type L. Il traduit une très forte affinité du soluté et de l'adsorbant.

- isotherme de type C : il existe une relation linéaire, jusqu'à une certaine concentration, entre la quantité de soluté adsorbé et la concentration de celui-ci à l'équilibre. Ce type d'isotherme est spécifique d'une simple partition du soluté entre la phase liquide et la phase solide ou bien d'une adsorption sur des sites préférentiels sans saturation.

Les isothermes peuvent aussi être ensuite modélisés selon la théorie de **Freundlich** ou celle de **Langmuir** en fonction du type d'isotherme obtenu, pour obtenir des paramètres permettant de comparer les capacités d'adsorption. Une bonne modélisation conduit à une équation avec un coefficient de corrélation ≥ 0,95.

- Equation de Freundlich : $Cad/m = K_f \times Ce^{1/n}$

La représentation du modèle de Freundlich, log (Cad/m) = f(log Ce), conduit à la détermination des paramètres $\mathbf{K_f}$ (capacité maximum d'adsorption (mmol/g)) et $\mathbf{n_f}$ (affinité d'un adsorbant donné vis-à-vis d'un soluté). Cette modélisation est très largement utilisée dans les études environnementales.

- Equation de Langmuir : $Cs = (Cm \times L \times Ce)/ (1+(L \times Ce)$

Le modèle de Langmuir est basé sur la fixation d'une couche monomoléculaire d'adsorbat. L'adsorption se fait sur des sites localisés et n'autorise pas la fixation d'autres solutés sur un site déjà occupé. D'après ce modèle, l'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence de particules adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et pas d'interaction entre les particules adsorbées). La représentation du modèle de Langmuir, Ce/Cs = f(Ce) permet d'obtenir les paramètres **Cm** (capacité maximum d'adsorption en monocouche (mmol/g)) et **L** (énergie d'adsorption (L/mmol)). D'autres modèles, comme celui de Langmuir-Blodgett, sont parfois appliqués.

ADSORPTION DE LA MESOTRIONE

I ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR LES ARGILES CATIONIQUES

I.1 Etude des cinétiques d'adsorption

Les études des cinétiques d'adsorption ont été réalisées uniquement avec les deux rapports extrêmes solide/liquide choisis (1/200 et 1/3). Il s'agit de mettre en contact, dans un agitateur orbital, la matrice argileuse testée (50 mg pour le rapport solide/liquide : 1/200 ; 3,33 g pour le rapport solide/liquide : 1/3) avec 10 mL d'une solution de mésotrione à 1 mM (pH 7) pendant un temps plus ou moins long. A chaque temps de mise en contact choisi, les échantillons sont centrifugés pour éliminer la matrice argileuse et les surnageants sont filtrés et analysés par HPLC. Le pH est également suivi au cours du temps. Les cinétiques d'adsorption de la mésotrione sur les argiles sont obtenues par le tracé : Cad/Ci = f(temps) (Figure 142).

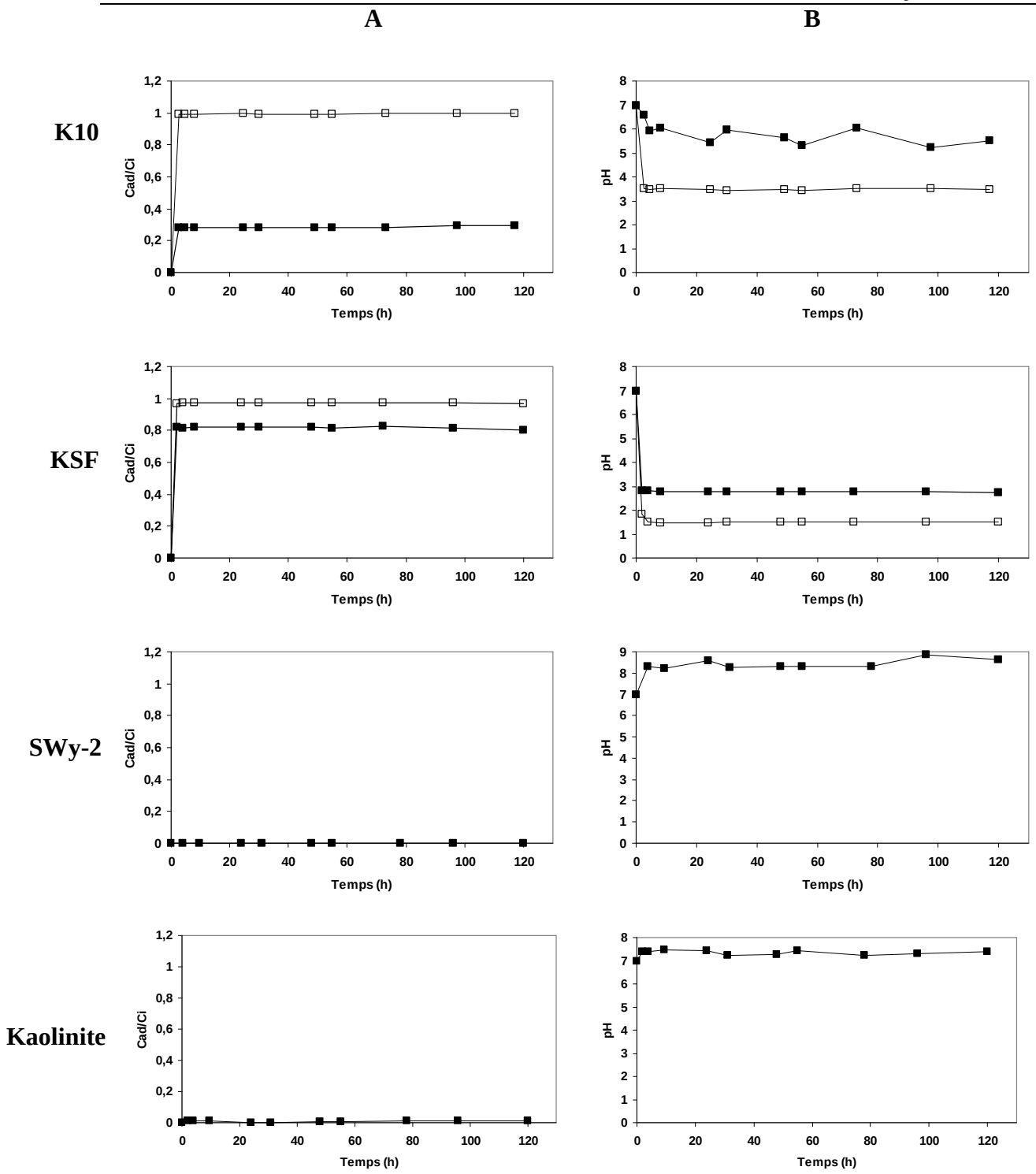


Figure 142 : A) Cinétiques d'adsorption de la mésotrione sur les montmorillonites K10, KSF, SWy-2 et sur la kaolinite pour les rapports solide/liquide 1/200 (■) et 1/3 (□). B) pH des surnageants correspondants

Les résultats préliminaires montrent qu'il n'y a aucune adsorption de la mésotrione sur la montmorillonite SWy-2 et sur la kaolinite (Cad/Ci =0), alors que les deux montmorillonites KSF et K10 adsorbent de moyennement à très fortement la mésotrione selon le rapport solide/liquide et l'argile testés. Ces taux d'adsorption peuvent être corrélés en première approximation, aux pH des surnageants mesurés. En effet, la mésotrione présente un pKa de

3,12. Avec la kaolinite ou la montmorillonite SWy-2, le pH mesuré est respectivement neutre et basique : la mésotrione est donc entièrement sous forme anionique et va donc subir les effets répulsifs de ces deux argiles dont les couches sont également chargées négativement à ce pH (faiblement pour la kaolinite et plus fortement pour la montmorillonite). Par contre, en présence des autres argiles, le pH des surnageants est acide, et se situe même en dessous du pKa de la mésotrione dans le cas de l'argile KSF. Cette fois-ci, la mésotrione est plutôt sous sa forme moléculaire et d'autres types d'interactions peuvent entrer en jeu entre la mésotrione et l'argile. Il semble donc que le pH du milieu soit un facteur clef dans l'adsorption de la mésotrione. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dyson *et al*. (2002) qui lors d'une étude sur 15 sols, ont montré une forte corrélation négative avec le pH (diminution de l'adsorption de la mésotrione quand le pH du milieu augmente).

Une forte adsorption de la mésotrione est obtenue sur les deux montmorillonites avec un taux de 30 et 100 % dans le cas de l'argile K10, et de 83 et 98 % avec l'argile KSF pour les rapports solide/liquide 1/200 et 1/3 respectivement.Elle est d'autant plus forte que le pH du milieu est acide.

Il faut noter également que la solution de mésotrione (initialement jaune) prend instantanément une couleur rouge au contact de l'argile KSF quel que soit le rapport testé. Nous avons vérifié que ce changement de couleur ne correspondait pas à un changement de structure de la mésotrione, l'argile KSF servant de catalyseur acide en synthèse organique. Aucun changement dans le comportement de la molécule, ni aucune apparition de nouveaux pics n'ont été observés en HPLC ou en RMN au cours des analyses des surnageants. Lors de l'étude du mécanisme d'action des composés appartenant à la famille des benzoylcyclohexanediones, Wu *et al.* (2002) ont mis en évidence la formation d'un chélate entre le dérivé 1,3-cyclohexanedione sous forme énol étudié, et le Fe(III) du site actif de l'enzyme HPPD, qui serait responsable de son inhibition (cf. chapitre 1 - étude bibliographique). Ces auteurs ont proposé ce mécanisme d'action en corrélant à la fois des résultats d'inhibition de l'enzyme, des analyses conformationnelles, mais surtout des tests avec le chlorure ferrique $FeCl_3$ permettant de mettre en évidence la formation de chélates entre le fer et le composé étudié. Ce test est positif lorsque le mélange change de couleur et devient violet. Dans notre cas, la suspension (mésotrione + KSF) a changé de couleur de manière instantanée : ceci pourrait être expliqué par la présence de fer dans l'argile KSF, qui serait chélaté par la mésotrione, ce qui pourrait être un des facteurs expliquant son adsorption.

Cependant, aucun changement de couleur n'est observé avec l'argile K10, bien que l'adsorption soit également forte et que l'argile comporte du fer. Aussi, plusieurs mécanismes d'interaction sont sans doute mis en jeu suivant le type d'argile.

D'une manière générale, pour les montmorillonites KSF et K10, nous avons pu constater que :

- l'état d'équilibre est atteint quasi-immédiatement dès le premier point de la cinétique d'adsorption (15 min). Aucune quantité supplémentaire de mésotrione n'est adsorbée ou désorbée ultérieurement dans nos conditions. Ce processus caractérise une diffusion relativement rapide à la surface des particules.
- le rapport solide/liquide n'influe pas sur le temps d'équilibre ; aucune différence n'a été constatée pour une même argile.
- la quantité de mésotrione adsorbée augmente avec la quantité d'argile.

Par la suite, nous avons choisi un temps de contact de 24 h pour réaliser les isothermes d'adsorption, afin de nous assurer que l'état d'équilibre était bien atteint.

I.2 Isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption sont réalisés en mettant en contact 50 mg (1/200), 1 g (1/10) ou 3,33 g (1/3) d'argile avec 10 mL d'une solution de mésotrione (de 0,2 à 4 mM, pH = 7) pendant 24 h sur un agitateur orbital. Après centrifugation et filtration, le pH des surnageants est contrôlé et les concentrations en mésotrione des surnageants mesurées. Les représentations des isothermes directs (Cad/m = f(Ce)) sont données pour chaque rapport solide/liquide testé.

I.2.1 Etude de la montmorillonite K10

Les isothermes d'adsorption de la mésotrione sur l'argile K10 dans les rapports 1/200, 1/10 et 1/3 sont présentés selon le modèle direct sur la Figure 143. Nous avons également représenté l'évolution du pH en fonction de la concentration à l'équilibre en mésotrione (solution initiale de la mésotrione : 7,25). L'ordonnée à l'origine correspond au pH du surnageant d'un témoin ne contenant pas de mésotrione (solution de mésotrione remplacée par de l'eau distillée).

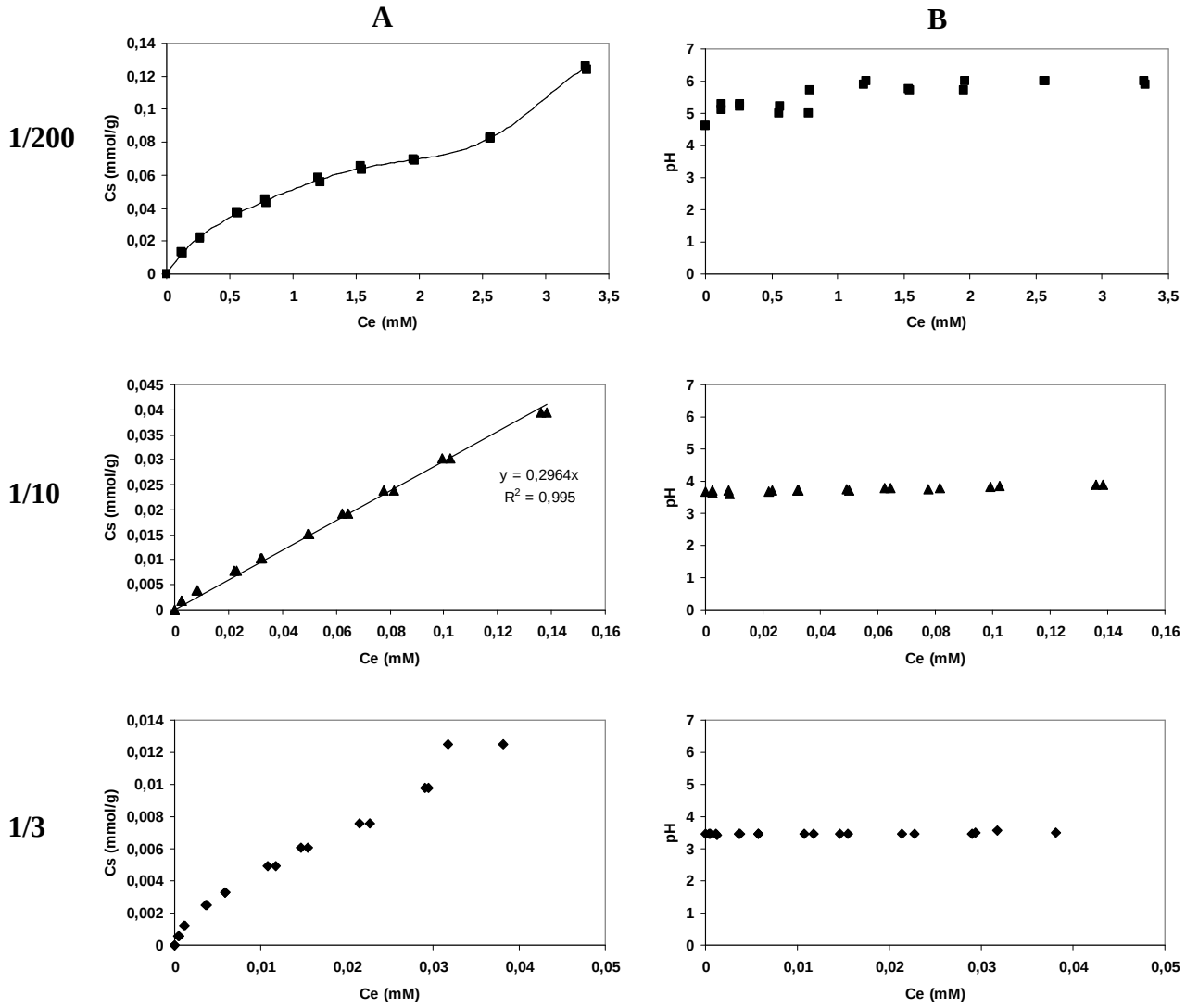


Figure 143 : Isothermes d'adsorption de la mésotrione sur l'argile K10 (A) et évolution du pH du surnageant en fonction de la concentration à l'équilibre en mésotrione (B) pour les rapports solide/liquide : 1/200, 1/10 et 1/3.

Selon le rapport solide/liquide testé, différents types d'isothermes sont observés. Pour les rapports solide/liquide 1/200 et 1/3, deux domaines peuvent être distingués : une première partie de l'isotherme présente une adsorption du type L, caractéristique d'une diminution des sites d'adsorption quand la concentration du soluté augmente. Ce type d'isotherme traduit une forte affinité adsorbat/adsorbant. Cette première étape correspond à la saturation progressive des sites de surface avec une augmentation rapide de Cs au départ avant d'arriver à un quasi-plateau. La deuxième partie de l'isotherme correspond à une nouvelle augmentation de l'adsorption. Cette deuxième étape peut s'expliquer soit par une intercalation du composé dans le domaine interlamellaire de l'argile, soit par la mise en place d'une deuxième couche de molécules de mésotrione à la surface de l'argile. Aucune saturation de l'argile n'est observée même aux fortes concentrations testées (4 mM).

Pour le rapport 1/10, l'isotherme est linéaire, caractéristique d'une adsorption non spécifique du type C. Il existe une répartition constante du soluté entre l'adsorbant et la phase liquide. Une deuxième hypothèse pourrait être liée à l'accroissement de la surface adsorbante au fur et à mesure que l'adsorption progresse (Calvet, 2003).

Afin de pouvoir comparer ces différents résultats, les isothermes ont été représentés avec le modèle de Freundlich qui ne prend en compte que les points correspondants à la première partie de l'isotherme. Un exemple de représentation avec ce modèle est présenté sur la Figure 144.

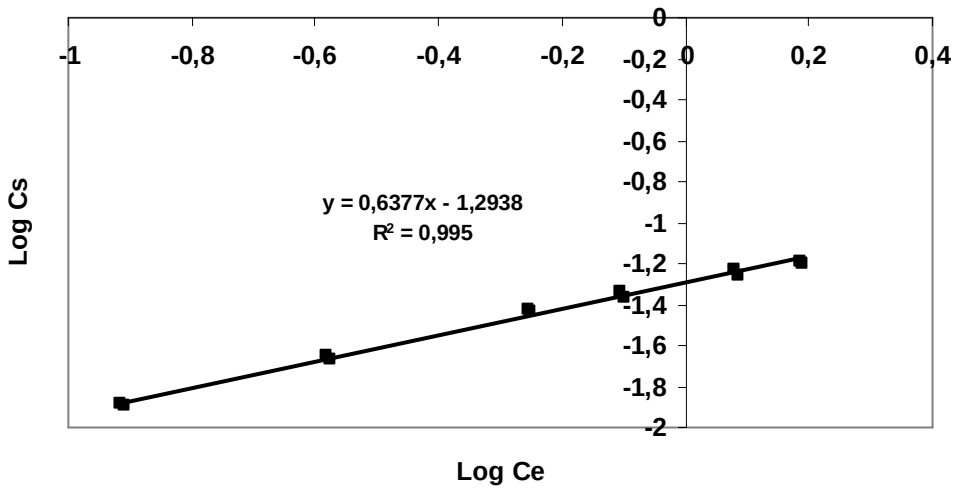


Figure 144 : Représentation de l'isotherme d'adsorption de la mésotrione sur l'argile K10 dans le rapport solide/liquide 1/200 selon le modèle de Freundlich

Le Tableau 23 rassemble les valeurs de capacité d'adsorption (K_f) et d'affinité (n_f) de l'argile K10 vis-à-vis de la mésotrione, obtenues à partir de ce modèle.

Tableau 23 : Paramètres de Freundlich pour l'adsorption de la mésotrione sur l'argile K10

	Rapport 1/200	**Rapport 1/10**	**Rapport 1/3**
K_f (mmol/g)	0,05	0,20	0,10
n_f	1,58	1,19	1,51
r^2	0,995	0,993	0,995

Les valeurs des coefficients de corrélation (0,99) montrent que le modèle de Freundlich est totalement approprié. Les valeurs de n_f étant proches, les capacités maximales d'adsorption (K_f) peuvent donc être comparées. Nous pouvons remarquer que cette capacité

d'adsorption est plus faible pour le rapport le plus riche en argile (1/3) comparé au rapport solide/liquide 1/10. Il semblerait donc que dans nos conditions, les particules d'argile forment des agrégats compacts, diminuant ainsi la surface spécifique totale et donc la quantité adsorbée d'herbicide. Ceci est conforté par l'allure de l'isotherme pour le rapport 1/3 qui est du type L signifiant qu'il y a une diminution de la disponibilité des sites quand la concentration en soluté augmente.

D'autre part, quel que soit le rapport solide/liquide testé, le pH des surnageants est acide, voisin du pKa pour les rapports 1/10 et 1/3 (pH autour de 3,5). Aussi, le pH au niveau de la surface pouvant être inférieur de deux unités à celui mesuré en solution, la mésotrione n'est que peu dissociée dans ces conditions.

I.2.2 Etude de la montmorillonite KSF

Le même protocole a été utilisé pour la montmorillonite KSF. Les isothermes d'adsorption de la mésotrione sur cette argile sont présentés avec le modèle direct pour les trois rapports solide/liquide 1/200, 1/10 et 1/3 sur la Figure 145, ainsi que l'évolution du pH (solution initiale en mésotrione à pH 7,1) en fonction de la concentration à l'équilibre.

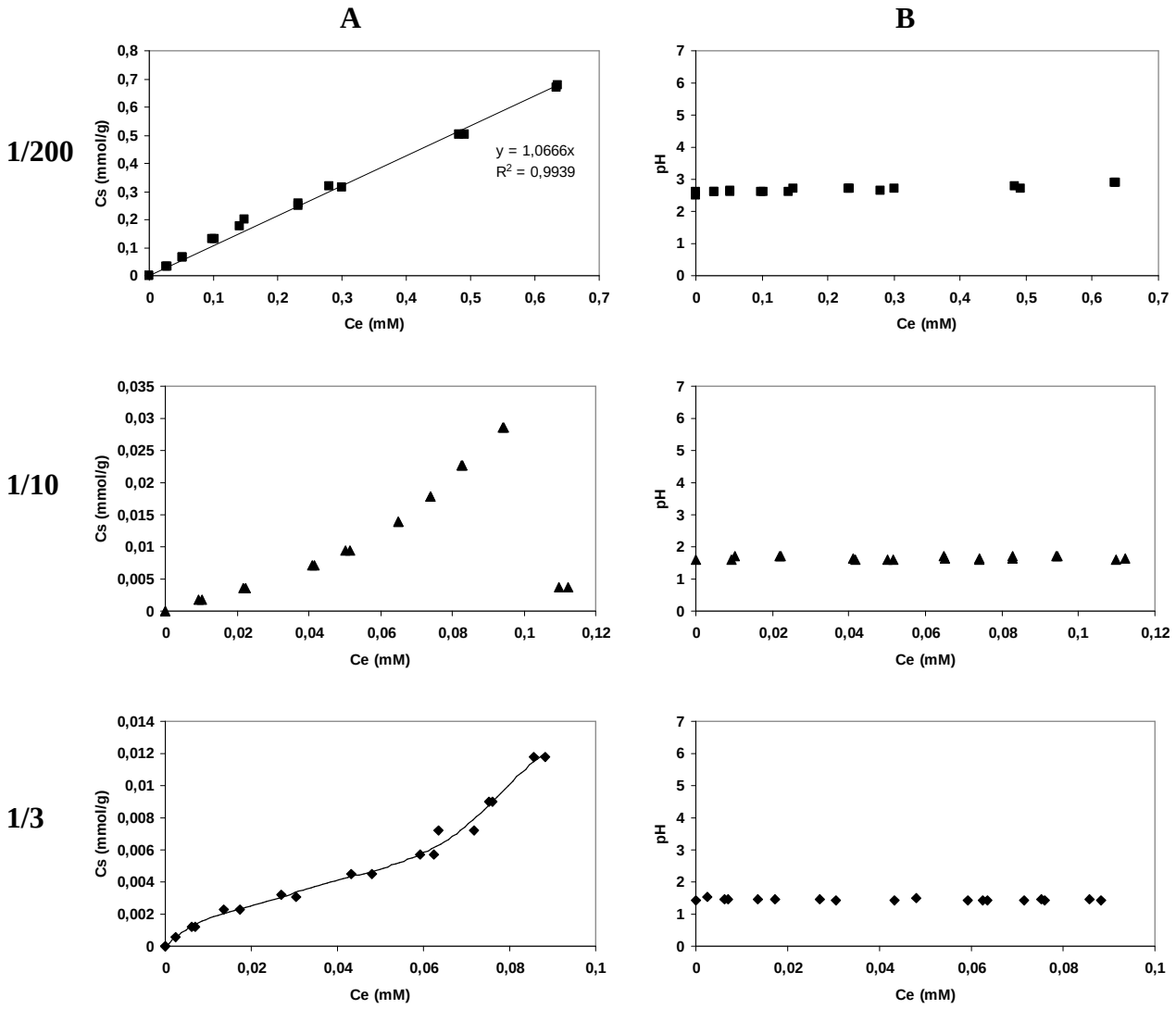


Figure 145 : Isothermes d'adsorption de la mésotrione sur l'argile KSF (A) et évolution du pH en fonction de la concentration à l'équilibre (B) pour les rapports solide/liquide 1/200, 1/10 et 1/3.

Comme précédemment, le type d'adsorption est différent selon le rapport solide/liquide testé. Le rapport 1/200 montre une adsorption non spécifique de type C. Le rapport 1/10 montre une adsorption de type S, correspondant à un mécanisme coopératif. En effet, l'adsorption des premières molécules, difficile du fait d'une plus grande affinité du solide pour le solvant que pour le soluté, entraîne soit une modification de la surface de l'adsorbant qui va favoriser l'adsorption des molécules suivantes, soit une augmentation de l'affinité au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité adsorbée en raison d'interactions latérales entre les molécules adsorbées. Pour le rapport solide/liquide supérieur (1/3), un isotherme en deux domaines est obtenu comme précédemment pour l'argile K10 : un premier domaine correspondant à un isotherme du type L, où plus la concentration en soluté est forte, plus il devient difficile d'adsorber des molécules additionnelles à la surface, car les sites d'adsorption spécifiques deviennent saturés ou les sites libres deviennent moins attractifs pour

les molécules de soluté restantes ; un deuxième domaine correspondant à une reprise de l'adsorption liée à de l'intercalation ou à la mise en place de nouvelles couches d'adsorption successives.

Dans ces expériences, le pH des surnageants est de nouveau très acide (entre 1,5 et 2,5), très inférieur au pKa de la mésotrione. Pour le rapport 1/10, le point correspondant à la concentration initiale maximale en mésotrione (4 mM) décroche par rapport à la courbe et présente une concentration de mésotrione adsorbée par gramme d'argile très faible. Le même résultat est obtenu pour le duplicat. Nous avons testé la solubilité de la mésotrione à 4 mM à un pH voisin de 1,5 et avons constaté une forte diminution de la solubilité. La concentration de mésotrione soluble à ce pH est d'environ 0,5 mM (soit 0,17 g/L), ce qui est conforme aux données de la littérature (solubilité de la mésotrione à 20°C : 2,2 g/L, 6,5 mM à pH = 4,8 ; 15 g/L, 44 mM à pH = 6,9 d'après Rouchaud *et al.*, 2000). Cette baisse de solubilité explique le résultat obtenu. Ce point sera supprimé lors de la modélisation par le modèle de Freundlich.

Remarque : ce phénomène n'a pas été observé pour le rapport solide/liquide 1/3, dont les surnageants sont à peu près au même pH.

Le Tableau 24 rassemble les constantes de Freundlich obtenues pour les isothermes de la mésotrione sur la montmorillonite KSF. Pour le rapport 1/3, le modèle de Freundlich a été appliqué uniquement pour Ce < 0,02 mM.

Tableau 24 : Constantes de Freundlich pour l'adsorption de la mésotrione sur l'argile KSF

	Rapport 1/200	**Rapport 1/10**	**Rapport 1/3**
K_f (mmol/g)	1,05	0,42	0,05
n_f	1,05	0,82	1,36
r^2	0,994	0,972	0,985

D'après ces résultats, la capacité d'adsorption de la mésotrione (K_f) diminue lorsque le rapport solide/liquide augmente. Ce phénomène est un peu surprenant, si nous le comparons avec les taux d'adsorption obtenus lors des différentes cinétiques préalablement réalisées, puisque là, l'adsorption augmentait avec la quantité de solide. Dans cette modélisation est pris en compte également le mécanisme d'adsorption qui peut être différent suivant le rapport solide/liquide. Il faut noter également que le paramètre n_f caractérisant l'affinité d'un adsorbant vis-à-vis d'un soluté est, ici, beaucoup plus variable que dans le cas précédent.

Afin de comparer les capacités d'adsorption de la mésotrione des différentes argiles testées, nous avons voulu calculer le coefficient de partage entre la phase solide et la phase liquide (K_d = Cs/Ce), valeur référence dans la littérature. Ce coefficient correspond à une formulation linéaire de l'isotherme lorsque n_f est égal à 1. Dans ce cas, $K_f = K_d$. Il s'agit d'une approximation qui ne peut être normalement applicable que pour des valeurs de n_f comprise entre 0,8 et 1,1 (Baer et Calvet, 1999). Dans le cas d'isothermes non linéaires, ce coefficient peut être uniquement calculé pour une concentration particulière, qui doit être précisée, après introduction dans l'équation du modèle utilisé (Schwarzenbach *et al.*, 2003).

Nous avons donc calculé deux coefficients de partage : le premier (K_{d1}) en tenant compte uniquement de la partie linéaire de nos isothermes pour être dans la gamme de n_f comprise entre 0,8 et 1,1 et le deuxième (K_{d2}) en calculant sa valeur pour une concentration initiale en mésotrione de 1 mM (concentration utilisée pour réaliser les cinétiques d'adsorption) (Tableau 25).

Tableau 25 : Tableau récapitulatif comparatif des essais d'adsorption de la mésotrione

Adsorbants	**K10**	**KSF**	**SWy-2**	**Kaolinite**
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/200	90 / 50	**1070 / 1160**	0	0
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/10	300 / 350	180 / 220	0	0
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/3	**1080 / 570**	100 / 130	0	0
% Fe	1,97	2,41	2,41	0,31
% Al	6,98	7,39	8,9	18,06
% Si	31,79	21,19	25,84	22,89
% Na	0,30	0,13	1,03	0,10
% K	1,58	0,60	0,64	1,40
% Ca	0,25	1,20	1,07	0,11
% Mg	0,83	2,00	1,35	0,14
Surface spécifique (m^2/g)	220-270	10	25	40
pH du surnageant	Acide	Acide	Basique	Basique
CEC (meq/100 g)	11,04	168,55	87,49	3,29
% CO	0,52	0,52	0,52	0

Les valeurs de K_{d1} (calculées à partir de la partie linéaire des isothermes directs donc pour de faibles concentrations en mésotrione) et de K_{d2} (calculées pour une concentration initiale 1 mM) obtenues sont très comparables, sauf pour l'argile K10 dans un rapport solide/liquide 1/3. Ces valeurs de K_d montrent que l'argile KSF (au plus faible rapport solide/liquide 1/200) et l'argile K10 pour le rapport le plus fort (1/3) donnent des taux d'adsorption voisins. Ces résultats peuvent être reliés aux taux d'adsorption obtenus lors des premières cinétiques, qui étaient effectivement très proches. Par contre, il semble y avoir un problème avec la valeur de K_d pour l'argile KSF avec le rapport solide/liquide 1/3, qui devrait être également du même ordre de grandeur (taux d'adsorption similaire). Toutes les valeurs obtenues semblent relativement élevées, mais nous ne disposons pas d'élément de comparaison dans la littérature.

Nous avons évoqué précédemment le fait que la présence de fer pouvait être un des facteurs conditionnant l'adsorption de la mésotrione (changement de couleur de la solution de mésotrione en présence de KSF correspondant à la formation d'un chélate métal-mésotrione).

L'argile KSF possède effectivement une forte teneur en fer. Cependant, la montmorillonite SWy-2 possède le même taux en fer et aucune adsorption n'est constatée. La différence entre ces deux argiles vient du pH du milieu : la forme de la mésotrione (moléculaire ou anionique) ainsi que la charge de surface de l'argile sont différentes. Le chélate avec le fer ne peut pas se former si aucune forme énol n'est présente sur la cyclohexane-1,3-dione (Wu *et al.*, 2002). Des études conformationnelles de la mésotrione à différents pH seraient nécessaires pour conclure.

La présence d'aluminium est aussi un des facteurs décrits comme pouvant influencer l'adsorption. Les taux d'aluminium sont équivalents pour les deux montmorillonites K10 et KSF, mais la montmorillonite, qui en contient le plus, ne présente aucune affinité pour la mésotrione. Ce paramètre ne semble donc être le facteur clef dans l'adsorption de la mésotrione.

La capacité d'échange cationique de l'argile KSF est la plus élevée (168,55 meq/100 g). Cette valeur signifie que l'adsorption et la désorption de cations est fortement favorisée pour cette argile. Certains mécanismes d'adsorption sont liés à cet échange. Toutefois, dans notre cas, aucune charge positive ne peut être portée par la mésotrione dans cette gamme de pH. Mais des cations métalliques, présents à la surface de l'argile ou « relargués » lors de l'isotherme, pourraient jouer le rôle d'intermédiaires en créant des ponts ioniques, l'interaction entre la mésotrione et le métal se faisant par chélation. Les deux argiles présentant les meilleures adsorptions (argiles K10 et KSF) correspondent à celles ayant les surfaces spécifiques extrêmes. Ce paramètre n'est donc pas non plus semble-t-il un facteur majeur.

En conclusion, le pH du milieu semble être le facteur clef intervenant dans les phénomènes d'adsorption de la mésotrione sur ces argiles. La teneur en fer semble jouer également un rôle, qui devra être confirmé par d'autres expériences.

II ADSORPTION DE LA MESOTRIONE SUR UN SOL AGRICOLE

Un seul rapport solide/liquide a été testé avec les deux horizons : 0-5 cm et 10-20 cm lors d'une cinétique d'adsorption. 10 mL d'une solution aqueuse de mésotrione à 1 mM, pH 7, ont été mis en contact avec 1 g de sol (1/10). L'expérience a été réalisée durant le stage de Master 2 de Mohamed Ettaoussi. Comme précédemment, nous avons représenté les deux

cinétiques d'adsorption de la mésotrione ainsi que l'évolution du pH en fonction du temps sur la Figure 146.

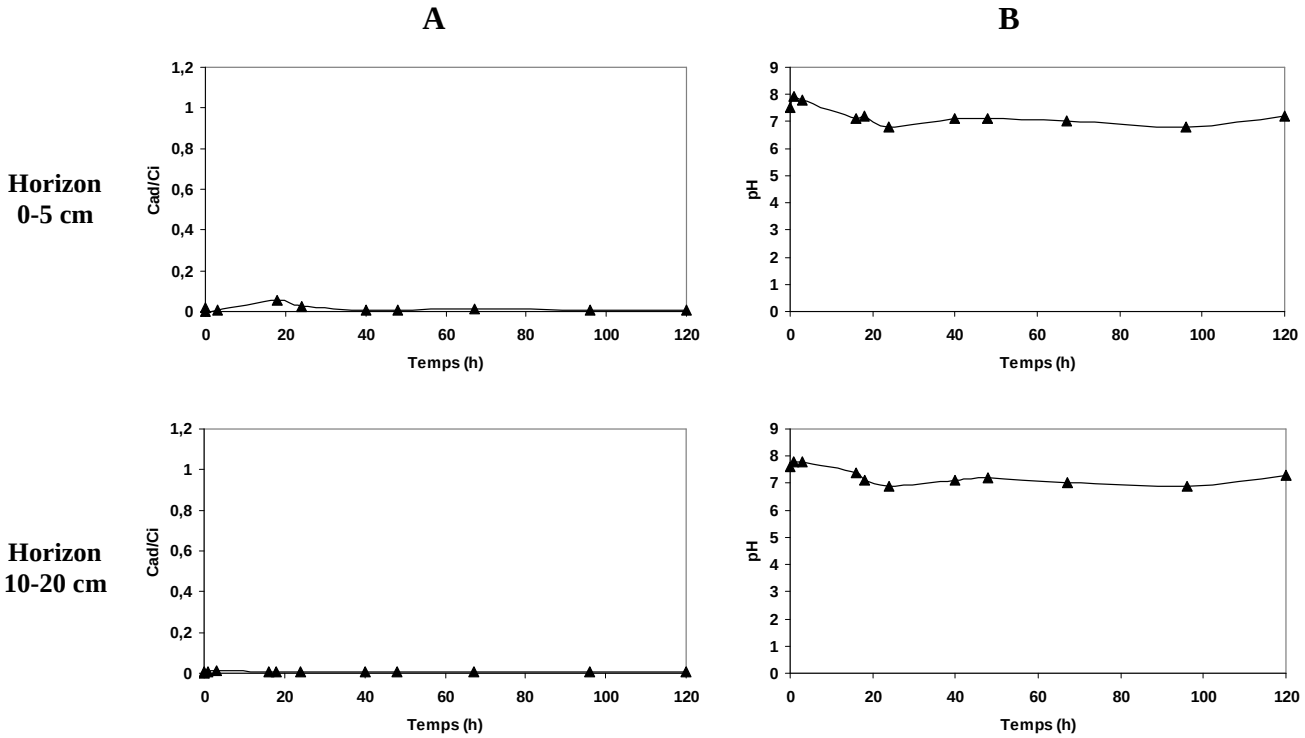


Figure 146 : A. Cinétiques d'adsorption de la mésotrione sur les deux horizons de sol dans le rapport 1/10. B. Suivi du pH du surnageant en fonction du temps.

Quel que soit l'horizon de sol testé, aucune adsorption de la mésotrione n'est observée, tout du moins dans les limites du détecteur UV. Le pH neutre des surnageants est proche de celui de la solution initiale de mésotrione.

Ce sol contient une forte proportion de fraction argileuse (37 %), notamment des montmorillonites, ainsi que des hydroxydes de fer, deux paramètres qui d'après la bibliographie générale, peuvent moduler l'adsorption. Or, aucune adsorption n'est observée dans nos échantillons. La matière organique présente dans le sol (2,46 %) ne semble pas non plus jouer de rôle dans une possible adsorption de la mésotrione, contrairement aux résultats de Dyson *et al.* (2002). Ces auteurs ont étudié l'adsorption de la mésotrione sur différents sols ayant des teneurs en matière organique allant de 0,6 à 3,35 %, et ont montré une corrélation entre l'adsorption de la mésotrione et le pourcentage en carbone organique. Cependant, ils ont travaillé avec une concentration très faible (0,4 mg/kg de mésotrione), 1000 fois plus faible que celle que nous avons utilisée.

Le pH du milieu reste proche de la neutralité. Il semble donc que le facteur pH soit, une fois encore, un facteur clef de l'adsorption de la mésotrione. D'autre part, il faut souligner

que toutes nos expériences ont été réalisées dans l'eau déionisée sans apport d'électrolyte contrairement aux expériences de Dyson *et al.* (2002). Chaabane *et al.* (2005) ont montré que cet électrolyte pouvait avoir une influence sur l'adsorption de la sulcotrione (analogue chloré de la mésotrione) sur un sol légèrement alcalin (pH = 8). La sulcotrione ne montrait aucune adsorption sur ce sol en milieu aqueux mais par l'ajout de $CaCl_2$, une faible adsorption a pu être constatée (5 %). La présence de $CaCl_2$ peut former des « ponts ioniques » entre la charge négative de la sulcotrione et la fraction argileuse ou la matière organique du sol permettant l'adsorption.

En résumé, nous avons montré l'adsorption de la mésotrione sur deux montmorillonites possédant un caractère acide (K10 et KSF). Cette adsorption est fortement dépendante du pH, la mésotrione étant plus facilement adsorbée sous sa forme moléculaire. Ce paramètre est le critère majeur régissant les phénomènes d'adsorption. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dyson *et al.* (2002). Le fer semblerait également jouer un rôle dans l'adsorption de la mésotrione. Toutefois, des études supplémentaires sur d'autres matrices devront être réalisées pour confirmer son rôle.

Le taux d'adsorption le plus élevé est obtenu pour l'argile KSF avec un K_d d'environ 1100 L/Kg pour un rapport solide/liquide 1/200. Des analyses du solide en fin d'expérience après séchage, par spectroscopie ATR-FTIR (pastille KBr à 1 % en échantillon à analyser), ne nous ont pas permis de mettre en évidence le type de liaisons mises en jeu dans ce mécanisme d'interaction. En effet, la plupart des modes de vibration de la mésotrione sont masqués par ceux de l'argile (Tableau 26), dont la caractérisation par IR a été réalisée récemment par Bekçi *et al.* (2006).

Tableau 26 : Caractérisation par IR de l'argile KSF et de la mésotrione

Bandes caractéristiques de l'argile KSF issues de la littérature (Bekçi *et al.*, 2006)	**Bandes caractéristiques de la mésotrione en solide**
υ = 1633 cm^{-1}, « mode de déformation de l'eau de structure »	υ = 1658 cm^{-1}, $\upsilon_{C=O}$
υ = 1043 cm^{-1}, υ_{Si-OH}	υ = 1597 cm^{-1}, $\upsilon_{C=C}$, $\upsilon_{C=O}$
υ = 529 cm^{-1}, $\upsilon_{Si-O-Al}$	υ = 1560 cm^{-1}, $\upsilon_{C=O}$, $\upsilon_{C=C}$
υ = 479 cm^{-1}, $\upsilon_{Si-O-Si}$	υ = 1530 et 1355 cm^{-1}, υ_{C-NO2}
	υ = 1409 cm^{-1}, υ_{CH}
	υ = 1321 et 1148 cm^{-1}, $\upsilon_{R-SO2-R'}$
	υ = 750-800 cm^{-1}, $\upsilon_{C=C}$

Plus particulièrement, l'étude de la zone centrée vers 1650-1670 cm^{-1} aurait pu nous permettre de confirmer la formation de complexes entre les fonctions cétone et/ou énol et un métal tel que le fer (complexation supposée provoquer le changement de couleur observé lors des expériences d'adsorption). Cependant, cette zone correspond, selon Bekçi *et al.* (2006), à des modes de déformation de l'eau de structure présente dans la montmorillonite. Les autres bandes des fonctions potentiellement impliquées dans les interactions avec la matrice solide sont également masquées par les signaux de l'argile.

Nous avons de ce fait enregistré les spectres RAMAN de ces matériaux, les modes de vibration de l'eau (des fonctions hydroxyle en général) étant le plus souvent moins importants. Cependant, les spectres des argiles testées sont tous dominés par un signal de fluorescence, masquant considérablement les signaux RAMAN. Nous n'avons donc pas poursuivi dans cette voie.

ADSORPTION DU GLYPHOSATE

I ADSORPTION SUR LES ARGILES CATIONIQUES COMMERCIALES

I.1 Cinétiques d'adsorption

Le même protocole que celui utilisé pour l'étude de l'adsorption de la mésotrione a été appliqué pour le glyphosate. Le premier rapport solide/liquide testé est 1/200 (50 mg d'argile mis en contact avec 10 mL d'une solution aqueuse de glyphosate à 1 mM, pH 7). En cas d'adsorption du glyphosate, le rapport solide/liquide 1/3 a été testé (3,33 g d'argile pour 10 mL d'une solution de glyphosate). La Figure 147 présente les différentes cinétiques d'adsorption du glyphosate sur les montmorillonites K10, KSF, SWy-2 et la kaolinite ainsi que l'évolution du pH du surnageant au cours des expériences.

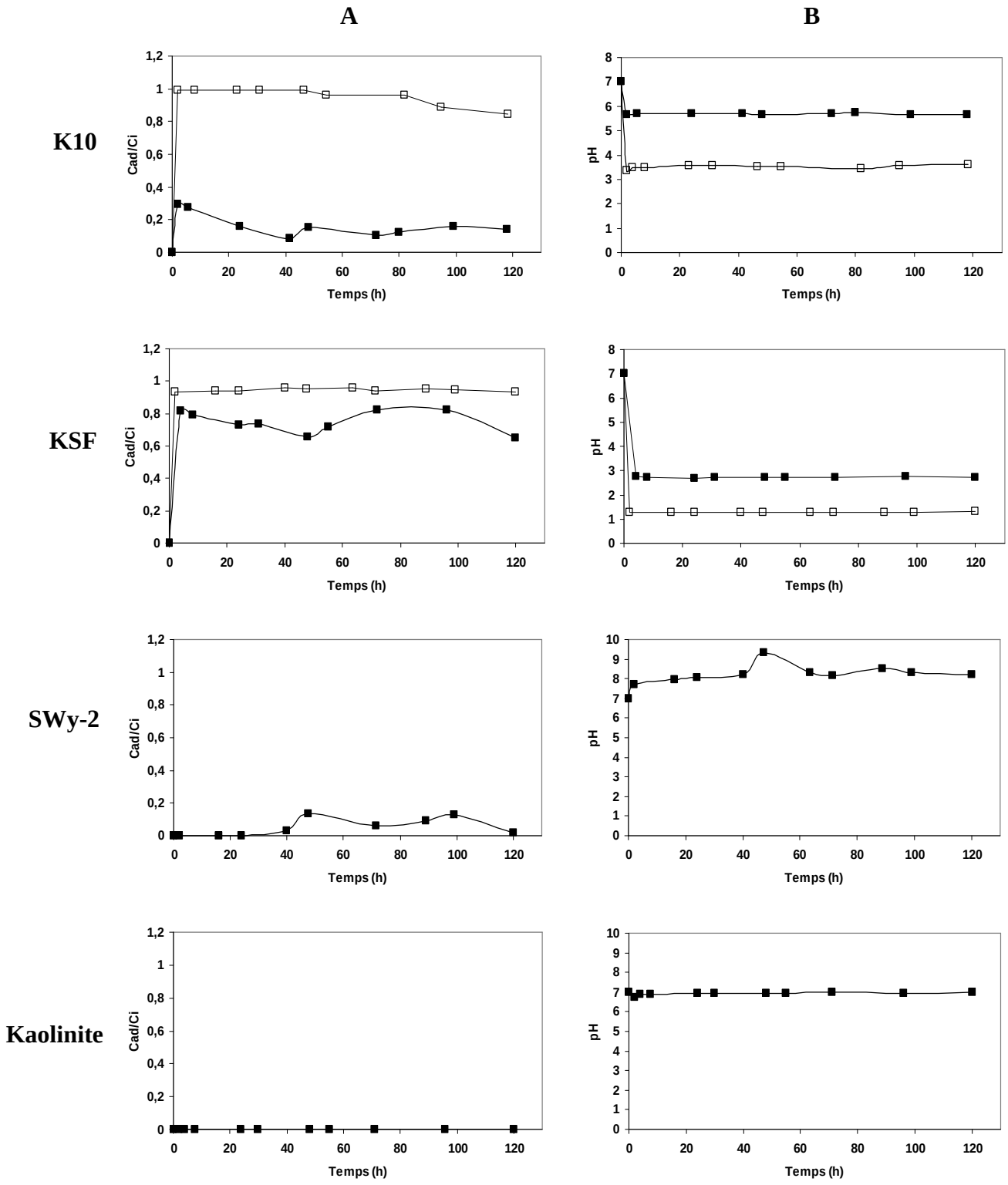


Figure 147 : A) Cinétiques d'adsorption du glyphosate sur les argiles K10, KSF, SWy-2 et la kaolinite dans des rapports solide/liquide 1/200 (■) et 1/3 (□). B) pH des surnageantscorrespondants.

Seule la kaolinite n'adsorbe pas du tout le glyphosate. Ce résultat est un peu surprenant, puisque toutes les études réalisées jusqu'alors ont montré une adsorption souvent faible (Glass, 1987 ; Dion *et al*., 2001) mais parfois forte (Sprankle *et al*., 1975b) du glyphosate sur cette argile. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : une différence

de pureté et d'origine de la kaolinite, des cinétiques d'adsorption réalisées dans l'eau déionisée et non dans une solution d'électrolyte, une gamme de concentrations testées beaucoup plus fortes que dans les travaux de la littérature. D'autre part, d'après les données de la littérature, l'adsorption du glyphosate sur la kaolinite est maximale à pH = 4-5 (Gerritse *et al.,* 1996). Or notre surnageant est à pH = 7. A ce pH, la kaolinite présente une charge de surface légèrement négative, et le glyphosate est, lui, fortement chargé négativement, ce qui pourrait expliquer l'absence d'adsorption.

La montmorillonite SWy-2 présente un phénomène particulier, puisqu'une faible adsorption de 10 % du glyphosate apparaît après 50 h de mise en contact pour le rapport 1/200. Nous n'avons pas eu le temps de multiplier les essais, ni de tester l'adsorption pour le rapport solide/liquide supérieur 1/3.

Comme lors de l'étude de l'adsorption de la mésotrione, seules les montmorillonites KSF et K10 permettent une adsorption du glyphosate. L'équilibre est atteint immédiatement quel que soit le rapport solide/liquide testé. Cependant, il faut noter l'apparition d'une légère désorption au cours du temps dans le cas de l'argile K10, notamment pour le rapport 1/200 où après avoir atteint un taux d'adsorption immédiat de 30 %, ce taux n'atteint plus que 10 % après 5 jours d'incubation.

Le taux d'adsorption du glyphosate pour l'argile K10 est de 20 % et de 99 % pour les rapports solide/liquide 1/200 et 1/3, respectivement, après 24 h d'équilibre. Le taux d'adsorption pour l'argile KSF est de 80 % et de 95 % pour ces mêmes rapports dans les mêmes conditions. Il augmente donc avec le rapport solide/liquide. Le pH des surnageants s'acidifie avec la quantité d'argile présente dans le milieu : de faiblement (5,7 ; rapport 1/200) à moyennement acide (3,5 ; rapport 1/3) dans le cas de l'argile K10 ; de moyennement (2,8 ; rapport 1/200) à fortement acide dans le cas de l'argile KSF (1,2 ; rapport 1/3).

L'étude des isothermes d'adsorption du glyphosate a donc été réalisée uniquement pour les argiles KSF et K10. Un temps d'équilibre de 24 h a été choisi pour réaliser les isothermes d'adsorption.

I.2 Isothermes d'adsorption

Les trois rapports solide/liquide ont été testés : 1/200 (50 mg d'argile pour 10 mL de solution de glyphosate de 0,2 à 4 mM), 1/10 (1 g de solide pour 10 mL de solution de

glyphosate de 0,2 à 4 mM) et 1/3 (3,33 g d'argile pour 10 mL de solution de glyphosate de 0,2 à 4 mM). Avant de réaliser les analyses par HPLC, le pH des surnageants est mesuré. Les échantillons sont ensuite dilués, filtrés puis dérivés. Les isothermes directs (Cad/m = f(Ce)) sont tout d'abord représentés pour mettre en évidence les mécanismes d'adsorption impliqués. D'après le type d'isothermes obtenus, nous avons appliqué soit le modèle de Freundlich, soit le modèle de Langmuir (isotherme du type « H ») afin d'obtenir les paramètres d'adsorption tels que les capacités d'adsorption maximales.

I.2.1 Etude avec la montmorillonite K10

La Figure 148 présente les isothermes d'adsorption du glyphosate sur la montmorillonite K10 selon le modèle direct. Le pH de la solution initiale en pesticide est de 6,9. Le pH des surnageants est représenté en fonction de la concentration à l'équilibre en glyphosate.

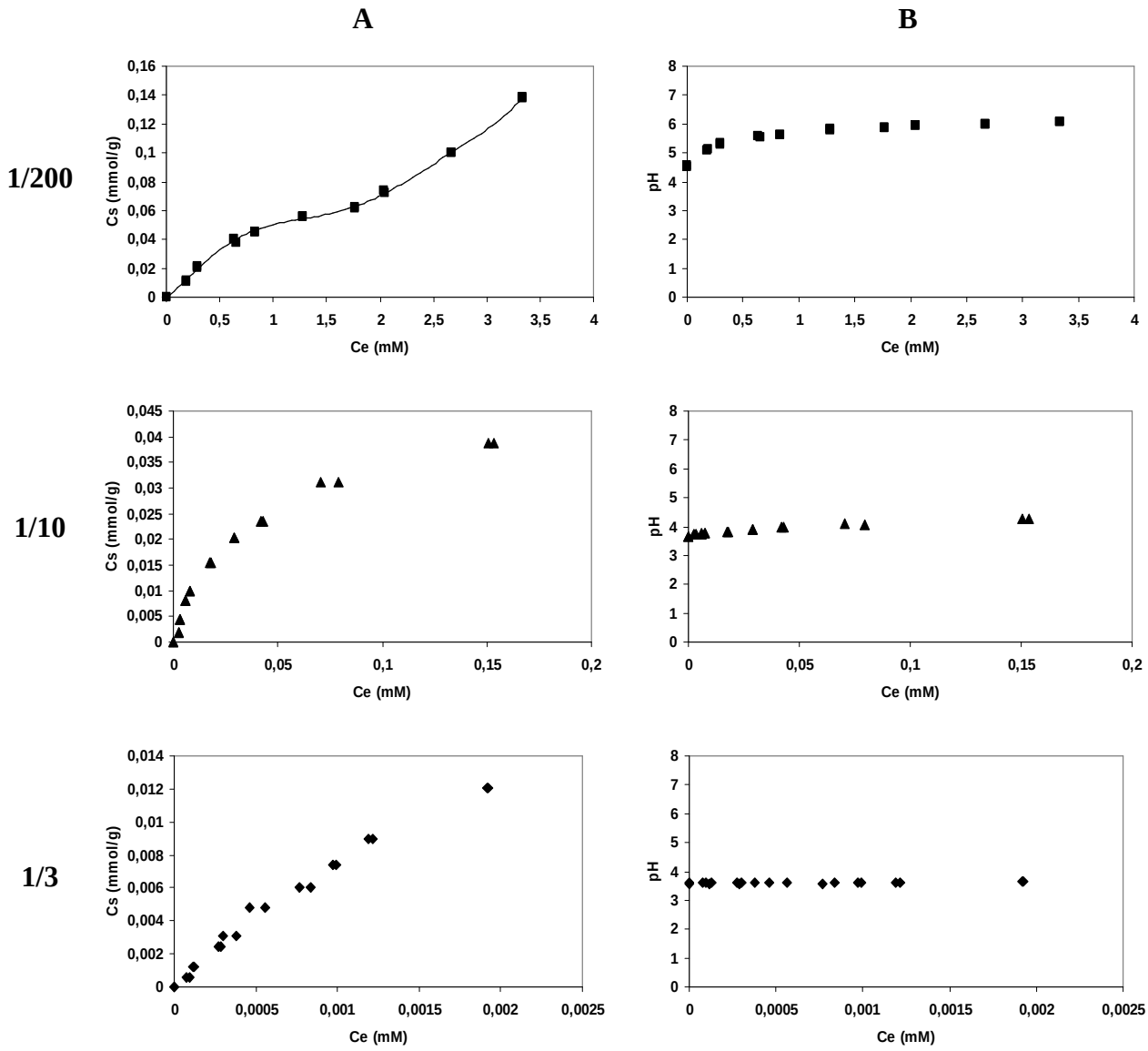


Figure 148 : Isothermes d'adsorption du glyphosate sur l'argile K10 (A) et évolution du pH en fonction de la concentration à l'équilibre (B) pour les rapports solide/liquide 1/200, 1/10 et 1/3.

L'isotherme pour le rapport solide/liquide (1/200) présente deux domaines ; un premier correspondant à un isotherme du type L, puis pour une Ce supérieure à 1,8 mM, le deuxième domaine montre une ré-augmentation de la concentration adsorbée après un quasi-plateau. Ce deuxième domaine peut correspondre soit à la constitution de couches supplémentaires de molécules adsorbées à la surface de l'argile sur d'autres sites, soit à un phénomène d'intercalation du glyphosate dans le domaine interlamellaire, comme cela a déjà été montré par Damonte *et al.* (2006) pour une bentonite par comparaison d'échantillons normaux et calcinés. Pour le rapport 1/10, l'adsorption est du type H, ce qui montre une forte affinité de l'adsorbant pour l'adsorbat. Ceci suggère qu'il n'existe qu'un nombre limité de sites d'adsorption. Lorsque ces sites sont remplis, il devient de plus en plus difficile pour les molécules de soluté de trouver un site vacant disponible. Enfin pour le rapport 1/3,

l'isotherme d'adsorption est plus difficile à définir : il peut être du type C mais le dernier point serait, dans ce cas, erroné ; or les résultats sont dupliqués et identiques. Il peut aussi être du type L sans atteinte d'un réel plateau. Ce type d'adsorption est caractéristique d'une diminution de la disponibilité des sites d'adsorption avec l'augmentation de la quantité de pesticide présent. Il faut noter que pour l'analyse de cet isotherme, la concentration des surnageants était tellement faible (très forte adsorption) que les échantillons n'ont pas été dilués par 100 comme dans les autres cas. Malgré cette analyse sans dilution avant dérivation, les concentrations à l'équilibre trouvées sont faibles. Chaque échantillon a été dérivé un à un et analysé immédiatement. Les analyses des dupliquats donnent des résultats relativement similaires.

Le Tableau 27 rassemble les constantes de Freundlich obtenues pour les isothermes du glyphosate sur la montmorillonite K10. Pour le rapport 1/200, le modèle de Freundlich a été appliqué pour des Ce < 1,5 mM. L'isotherme du rapport solide/liquide 1/3 a été considéré comme linéaire (le dernier point a été éliminé).

Tableau 27 : Constantes de Freundlich pour l'adsorption du glyphosate sur l'argile K10

	Rapport 1/200	**Rapport 1/3**
K_f (mmol/g)	0,05	5,88
n_f	1,21	1,05
r^2	0,966	0,973

Les valeurs obtenues pour les coefficients de corrélation (0,97) montrent que le modèle de Freundlich est juste satisfaisant. Nous pouvons remarquer que la capacité d'adsorption augmente fortement avec la masse d'argile. Dans ce cas, des agrégats ne semblent pas se former contrairement à ce qui avait été observé dans le cas de la mésotrione. Cette argile adsorbe fortement le glyphosate. Le pH des surnageants est voisin de 4. Ces valeurs seront comparées à celles obtenues avec l'argile KSF.

Pour le rapport 1/10, l'isotherme est du type H, normalement modélisé selon l'équation de Langmuir (Figure 149).

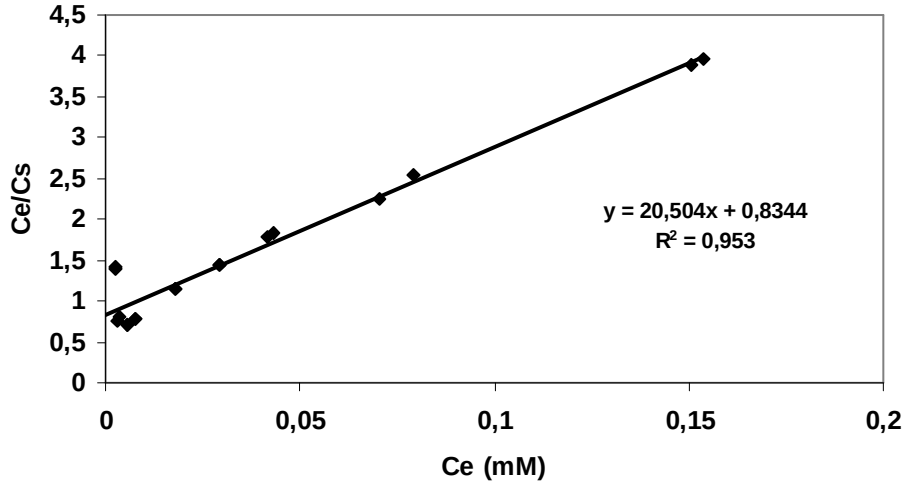


Figure 149 : Adsorption du glyphosate sur l'argile K10 dans le rapport solide/liquide 1/10 selon lemodèle de Langmuir

D'après l'équation de la droite, nous obtenons une capacité maximale d'adsorption de 0,05 mmol/g et une énergie d'adsorption de 24,5 L/mmol (r^2 = 0,953). Ces valeurs ne peuvent pas être directement comparées aux précédentes du fait de l'utilisation d'un modèle différent.

I.2.2 Etude de la montmorillonite KSF

La Figure 150 présente les isothermes d'adsorption du glyphosate sur la montmorillonite KSF selon le modèle direct. Le pH de la solution initiale en pesticide est de 6,9. Le pH des surnageants est représenté en fonction de la concentration à l'équilibre en glyphosate.

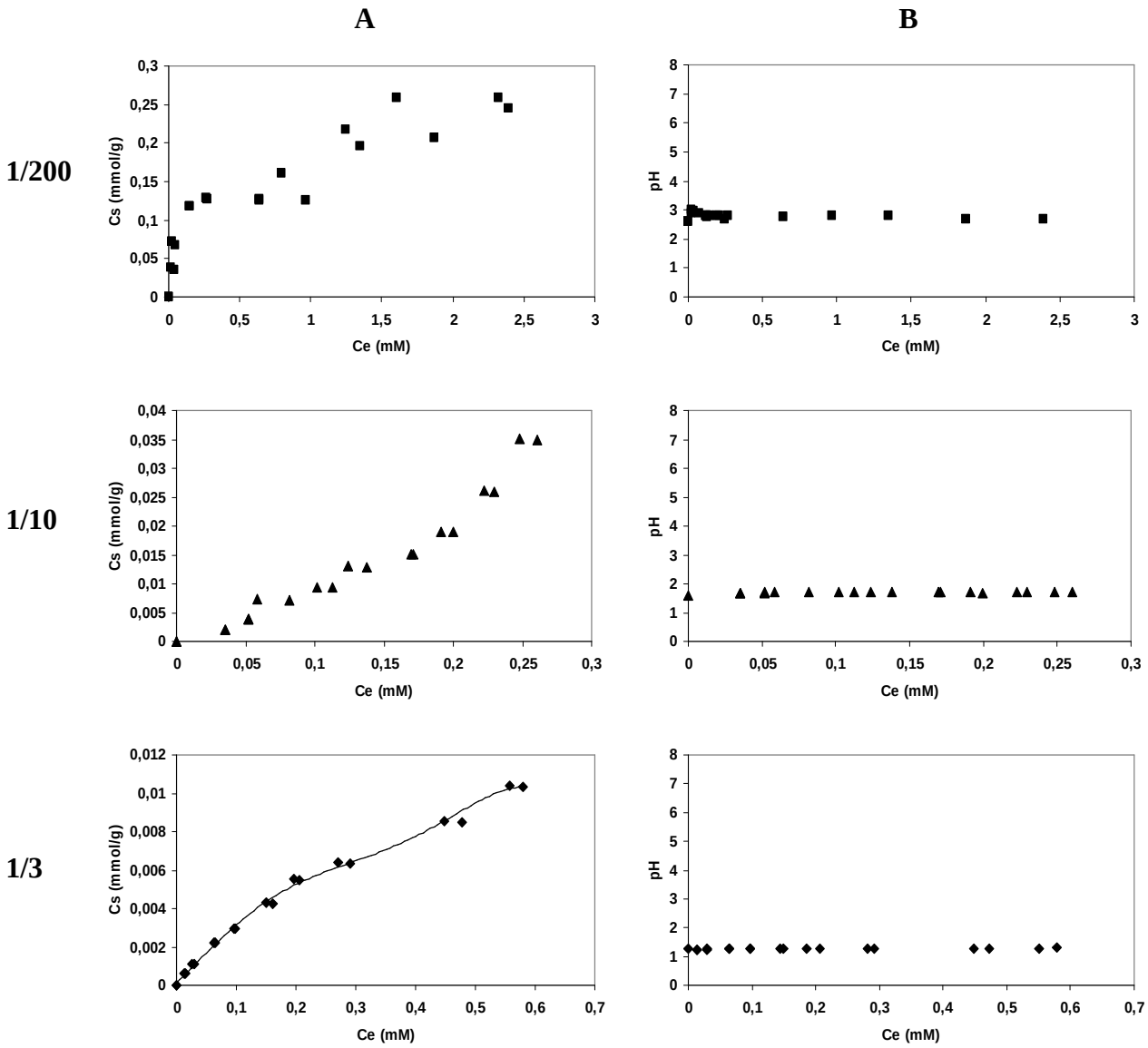


Figure 150 : Isothermes d'adsorption du glyphosate sur l'argile KSF (A) et évolution du pH en fonction de la concentration à l'équilibre (B) pour les trois rapports solide/liquide 1/200, 1/10 et 1/3.

Les types d'isothermes d'adsorption sont différents selon le rapport solide/liquide testé. Le rapport 1/200 montre une adsorption de type H sur un premier domaine, sans atteindre toutefois une saturation de l'argile, qui est immédiatement suivi par une deuxième phase d'adsorption de mécanisme différent pouvant correspondre à l'intercalation du glyphosate dans l'argile. L'isotherme du rapport 1/10 est de type S. L'adsorption selon le type H correspond à une très forte affinité du soluté pour la surface de l'adsorbant, celle du type S présente une affinité de la surface pour le soluté plus petite que pour le solvant aux petites concentrations. Cette affinité augmente au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité adsorbée en raison de l'apparition d'interactions latérales entre les molécules adsorbées. Le rapport solide/liquide 1/3 présente une adsorption en deux domaines, le premier du type L caractéristique d'une diminution des sites d'adsorption avec l'augmentation de la

concentration du soluté. Le second domaine peut être du à de l'intercalation ou à la mise en place de couches supplémentaires de molécules de glyphosate à la surface d'argile. Le pH des surnageants est très acide, le glyphosate dans ces conditions est sous une forme neutre ou cationique.

Le Tableau 28 rassemble les valeurs des constantes K_f et n_f issues du modèle de Freundlich pour l'étude de l'adsorption du glyphosate sur l'argile KSF dans les rapports 1/10 et 1/3 (pour des Ce < 0,3 mM).

Tableau 28 : Constantes de Freundlich issues de l'isotherme d'adsorption du glyphosate sur l'argile KSF

	Rapport 1/10	**Rapport 1/3**
K_f (mmol/g)	0,18	0,02
n_f	0,77	1,28
r^2	0,967	0,997

La modélisation de l'adsorption du glyphosate sur KSF est satisfaisante, le coefficient de corrélation variant de 0,97 à 0,99. La capacité maximale d'adsorption diminue quand la masse d'argile augmente. Ce phénomène avait été observé dans le cas de l'adsorption de la mésotrione pour cette argile. Il serait intéressant de confirmer ces résultats par granulométrie laser.

Pour l'isotherme du type H, le modèle approprié est celui de Langmuir. Les valeurs pour les capacités maximales d'adsorption et d'énergie d'adsorption sont respectivement : 0,14 mmol/g et 23,7 L/mmol (r^2 = 0,987).

Nous avons vu que le rapport solide/liquide testé joue un rôle non négligeable sur les valeurs de K_f et n_f obtenues. Pour pouvoir comparer nos valeurs de K_f avec celles de la littérature, nous devons nous référer à des études qui ont été réalisées dans les mêmes conditions. Seuls Dion *et al.* (2001) ont testé l'adsorption du glyphosate dans un rapport solide/liquide comparable au nôtre (1/10). Ces auteurs ont travaillé sur différentes fractions argileuses extraites de sol, et trouvent, en utilisant le modèle de Langmuir, une valeur de C_m de 87,7 mmol/kg (R^2 = 0,991) pour la fraction argileuse riche en smectites. Nos résultats sont en accord avec ceux de Dion *et al.* (2001) puisque la valeur de C_m obtenue avec la montmorillonite K10 pure est de 50 mmol/kg (R^2 = 0,953).

Dans le but de mieux comparer les adsorptions du glyphosate sur ces argiles, les valeurs de K_d ont été calculées comme précédemment d'une part en prenant lorsque cela était possible la partie linéaire des isothermes (K_{d1}) et d'autre part, en la calculant pour une concentration particulière en glyphosate de 1 mM (K_{d2}) (Tableau 29).

Tableau 29 : Tableau récapitulatif comparatif des essais d'adsorption du glyphosate

Adsorbants	**K10**	**KSF**	**SWy-2**	**Kaolinite**
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/200	60 / 50	- / 450	0	0
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/10	1290 / 1008	90 / 90	0	0
K_{d1} / K_{d2} (L/kg) 1/3	**7730 / 8360**	30 / 30	0	0
% Fe	1,97	2,41	2,41	0,31
% Al	6,98	7,39	8,9	18,06
% Si	31,79	21,19	25,84	22,89
% Na	0,30	0,13	1,03	0,10
% K	1,58	0,60	0,64	1,40
% Ca	0,25	1,20	1,07	0,11
% Mg	0,83	2,00	1,35	0,14
Surface spécifique (m^2/g)	220-270	10	25	40
pH du surnageant	Acide	Acide	Basique	Neutre
CEC (meq/100 g)	11,04	168,55	87,49	3,29
% CO	0,52	0,52	0,52	0

L'argile permettant la plus forte adsorption est l'argile K10 (rapport 1/3) avec un K_d d'environ 8000 L/kg. Cette valeur est particulièrement importante montrant une adsorption extrêmement forte. Les principaux facteurs intervenant dans l'adsorption du glyphosate, d'après la littérature, sont la concentration en oxydes de fer et d'aluminium et le pH. De nombreux auteurs ont également montré une forte capacité d'adsorption de différentes argiles. Glass (1987) a classé quelques argiles selon leur taux d'adsorption en glyphosate décroissant : montmorillonite > illite > kaolinite. Nos résultats concorderaient avec ceux de cet auteur. Toutefois, la montmorillonite SWy-2 ne permet que très peu d'adsorption, mais le pH du surnageant est dans ce cas neutre.

En effet, dans notre étude, seules les deux montmorillonites acides montrent une forte affinité pour le glyphosate. Il semble donc que l'effet pH l'emporte sur la teneur en fer ou en aluminium, ou encore sur le type d'argile (montmorillonite ou kaolinite). En effet, l'argile SWy-2 contient le plus fort pourcentage de fer et d'aluminium et n'adsorbe que très peu le glyphosate dans nos conditions (10 % après 50 h de mise en contact). Un pH acide semble donc favoriser l'adsorption du glyphosate, ce qui est en accord avec les résultats de Miles et Moye (1988), qui ont montré que l'adsorption du glyphosate augmente lorsque le pH diminue. Cependant, lorsque le pH est très acide et que le glyphosate est sous forme cationique ou neutre (à pH entre 1,5 et 2,5 comme dans le cas de l'argile KSF), l'adsorption est moindre qu'à pH moins acide, où le glyphosate est sous forme monoanionique ($3,5 < pH < 5$, argile K10). Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux de Damonte *et al.* (2006), qui ont montré d'une part que l'espèce monoanionique était celle qui avait le plus tendance à s'adsorber et d'autre part, qu'à $pH < 3$, l'adsorption devenait plus faible du fait de phénomènes de répulsion entre les deux entités chargées toutes les deux positivement.

D'après nos résultats, le pH du milieu est le facteur majeur influençant l'adsorption du glyphosate sur les argiles cationiques. Grâce à l'utilisation de modèles d'argiles « simples », nous avons pu confirmer plusieurs des données de la littérature.

II ADSORPTION SUR LE SOL AGRICOLE

Cette étude a été réalisée au cours du stage de recherche de Master 2 de Mohamed Ettaoussi. Des cinétiques d'adsorption du glyphosate (solution à 1 mM) ont été réalisées avec les deux horizons de sol (0-5 cm et 10-20 cm) dans un rapport solide/liquide 1/10 en utilisant une solution de pH = 3,6 et une solution ajustée à pH = 7,0. Les résultats obtenus avec la solution non ajustée sont présentés sur la Figure 151.

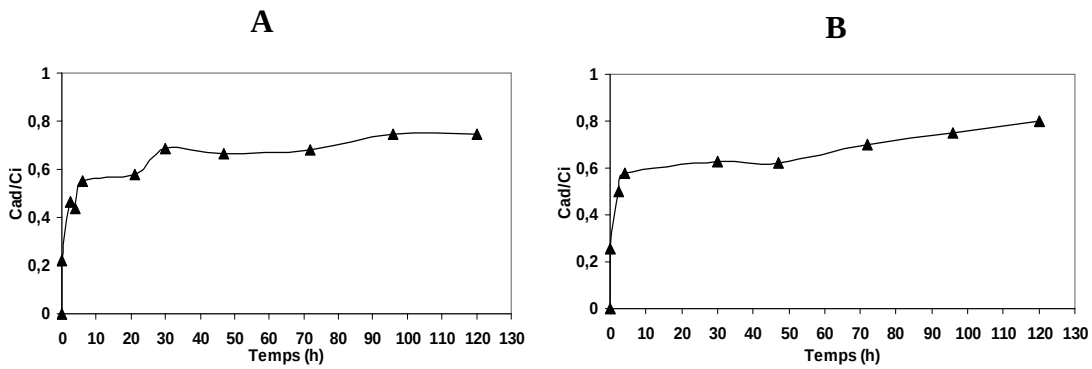


Figure 151 : Cinétiques d'adsorption du glyphosate sur les deux horizons (A : horizon 0-5 cm ; B : horizon 10-20 cm) de sol dans le rapport solide/liquide 1/10.

L'allure des cinétiques est identique quel que soit l'horizon de sol testé. Une forte adsorption du glyphosate est observée dans les dix premières heures de contact, puis elle continue à augmenter lentement même après 120 h. L'équilibre ne semble pas atteint. Sprankle *et al.* (1975b) ont observé le même phénomène sur un sol limono-sableux : une adsorption très rapide pendant la première heure, puis une adsorption beaucoup plus lente mais continue pendant les 96 h de mise en contact étudiées. Le pH des surnageants varie beaucoup de 3,6 (pH de la solution initiale de glyphosate) à 6,5 (stabilisation rapide à ce pH).

Nous avons renouvelé l'expérience avec une solution de glyphosate à 1 mM, dont le pH est neutralisé, sur un temps plus long de 10 jours de mise en contact. Il s'agissait de déterminer le temps d'équilibre, afin de pouvoir réaliser les isothermes d'adsorption (Figure 152). L'expérience a été réalisée uniquement sur l'horizon 0-5 cm.

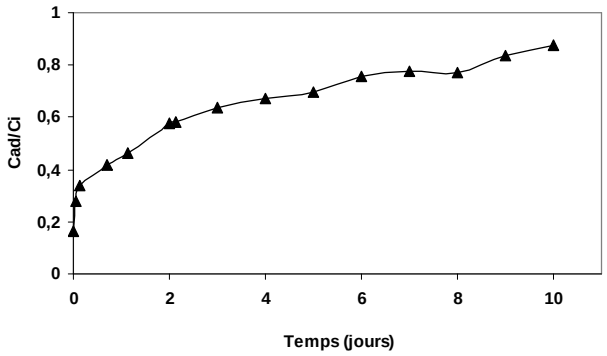


Figure 152 : Cinétique d'adsorption du glyphosate sur l'horizon de sol 0-5 cm dans le rapport solide/liquide 1/10.

L'équilibre ne semble toujours pas atteint. Comme dans le cas précédent, l'adsorption est rapide sur les dix premières heures, puis elle ne cesse d'augmenter lentement ensuite. Le pH des surnageants atteint alors une valeur proche de 8. La petite différence entre ces deux essais est le taux d'adsorption du glyphosate observé après 24 h de contact, temps classique

d'équilibre choisi généralement dans la littérature : il est de 60 % dans le cas d'une solution de glyphosate dont le pH n'est pas ajusté contre 35 % dans le cas où le pH de la solution est ajusté. Cette différence peut être attribuée à l'effet du pH sur l'adsorption du glyphosate sur le sol.

Le temps d'équilibre n'ayant pas pu être déterminé, aucun isotherme d'adsorption du glyphosate sur le sol n'a été réalisé.

Un fort pourcentage d'adsorption du glyphosate est obtenu sur ce sol (jusqu'à 90% au bout de 10 jours de contact). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées : (i) Ce sol contient une forte teneur en fraction argileuse (37 %), constituée essentiellement de montmorillonites. C'est justement sur ce type d'argiles que de fortes adsorptions du glyphosate ont été obtenues. (ii) La présence d'oxydes de fer et de titane dans le sol étudié, caractéristiques de cendres volcaniques, pourrait influencer l'adsorption du glyphosate. La littérature montre l'importance de ce type de composés pour les phénomènes d'adsorption du glyphosate. (iii) Le pH du milieu joue un rôle, puisqu'un meilleur pourcentage d'adsorption est observé dans les premières 24 h lorsque le pH est plus acide. D'autre part, la désorption de certains constituants du sol par lixiviation au bout de plusieurs heures de contact, libérant ainsi des sites accessibles au glyphosate, pourrait expliquer l'allure des cinétiques.

Après étude de la littérature, l'adsorption du glyphosate semble principalement liée au pH, à la teneur en fraction argileuse et en oxydes de fer et d'aluminium. Etudier chaque fraction du sol purifiée sera nécessaire pour pouvoir véritablement conclure sur le facteur majeur impliqué. Des mesures de teneur en phosphore seraient également intéressantes, sachant que le glyphosate se lie préférentiellement sur les matrices par l'intermédiaire du groupe phosphonate et qu'il peut y avoir compétition sur les sites avec les phosphates.

III ADSORPTION SUR DES FRACTIONS ARGILEUSES NATURELLES EXTRAITES DE SOL

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Prof. Juan Cornejo de l'Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia (CSIC, Séville) au cours d'un stage d'un mois dans son laboratoire. Les quatre fractions argileuses, extraites de différents sols, nommées Askov, Borris, P2 et Kettering, sont des matériaux sur lesquels l'adsorption du glyphosate a été évaluée. Durant ce stage, des isothermes d'adsorption du glyphosate sur

chaque fraction argileuse ont été réalisées pour un rapport solide/liquide de 1/100 (Figure 153). Les pH des différentes solutions de glyphosate initiales utilisées (0,03, 0,06, 0,150 et 0,3 mM) n'ont pas été ajustés (pH = 4).

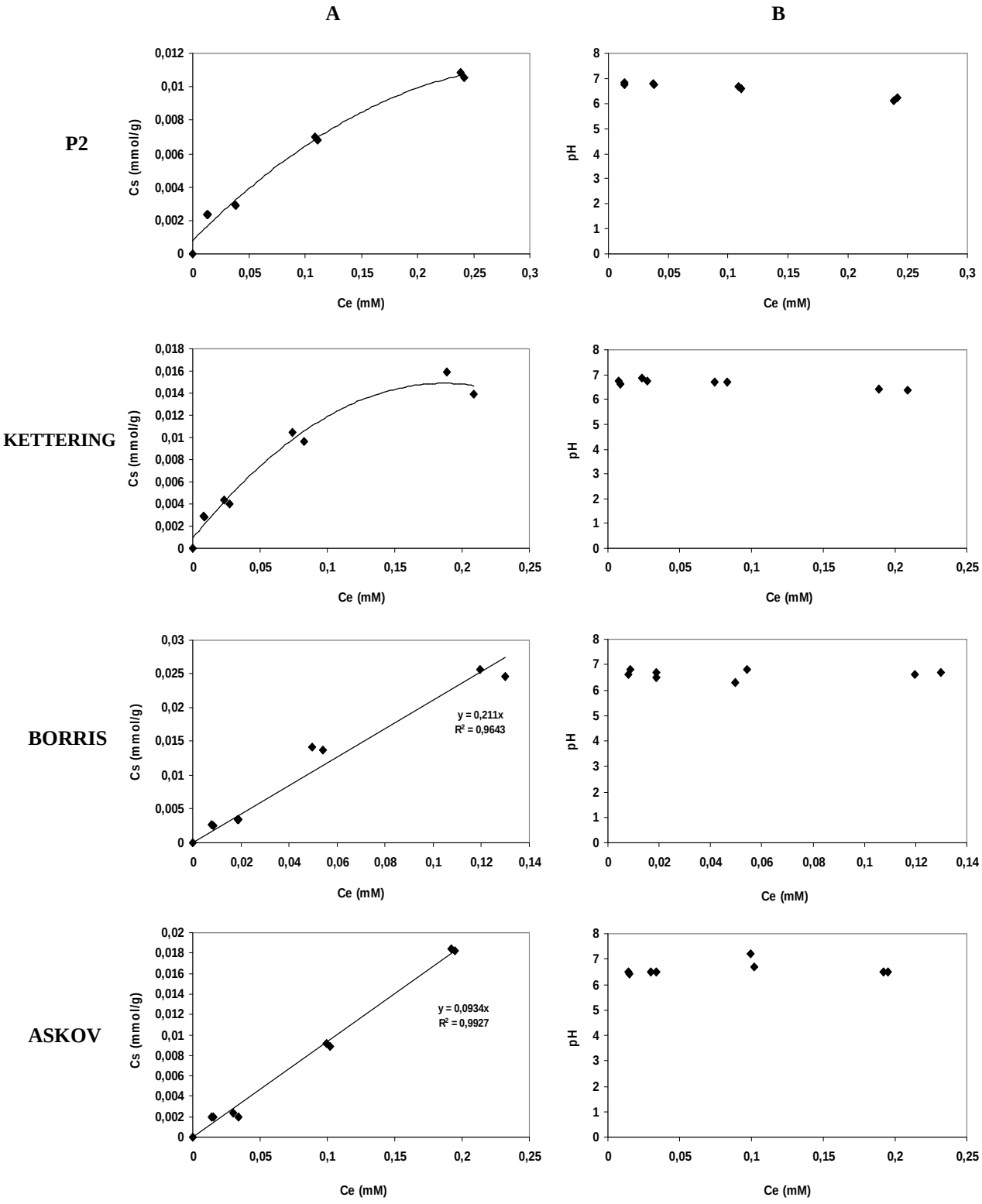


Figure 153 (A) Isothermes d'adsorption du glyphosate sur quatre fractions argileuses extraites de sol. (B) pH des surnageants en fonction de la concentration en glyphosate à l'équilibre

Les isothermes directs obtenus peuvent être classés selon le type C pour les fractions argileuses Askov et Borris. Cette adsorption n'est pas spécifique et il existe une répartition constante du soluté entre l'adsorbant et la phase liquide. Les isothermes d'adsorption du glyphosate sur les fractions argileuses P2 et Kettering appartiennent au type L. Toutefois des

points supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier qu'un palier est bien atteint (preuve d'une saturation des matrices P2 et Kettering). Ce type d'isotherme correspond à une diminution de la disponibilité des sites d'adsorption quand la concentration de l'adsorbat augmente. Ce type d'adsorption est caractéristique d'une sorption de surface. Quelle que soit la matrice solide testée, le pH des surnageants augmente par rapport à la solution initiale de glyphosate. Le Tableau 30 résume les constantes de Freundlich obtenues lors de la modélisation des isothermes d'adsorption du glyphosate sur chacune de ces quatre fractions argileuses.

Tableau 30 : Constantes de Freundlich obtenues pour les isothermes d'adsorption du glyphosate sur les fractions argileuses P2, Kettering, Borris et Askov.

	P2	**Kettering**	**Borris**	**Askov**
K_f (mmol/g)	0,02	0,04	0,17	0,07
n_f	1,81	1,85	1,11	1,09
r^2	0,950	0,960	0,955	0,935

La modélisation de l'adsorption du glyphosate sur ces quatre argiles selon le modèle de Freundlich est satisfaisante, car les coefficients de corrélation obtenus varient de 0,94 à 0,96. L'adsorption du glyphosate sur ces fractions argileuses est du même ordre de grandeur que sur les argiles cationiques pures testées précédemment. La plus forte adsorption est obtenue avec la fraction argileuse Borris. Nous ne pouvons pas cependant comparer ces quatre argiles entre elles uniquement selon ce modèle, car l'affinité du glyphosate n'est pas la même pour chacune d'elle (n_f différent).

Nous avons donc calculé les coefficients de partage K_d (Cs/Ce) de ces différentes fractions argileuses, uniquement pour une concentration initiale en glyphosate de 150 µM, le nombre faible de points de ces isothermes ne permettant pas les deux approches habituelles. Quelques caractéristiques de ces quatre fractions argileuses sont également reportées dans le Tableau 31, afin de proposer un éventuel mécanisme d'adsorption du glyphosate.

Tableau 31 : Caractéristiques des quatre fractions argileuses étudiées et constantes d'adsorption du glyphosate sur chacune d'elles

Adsorbants	Carbone organique (%)	Matière organique (%)	Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	Minéralogie	Teneur en fer (%)	K_d (L/kg)
P2	0,99	1,7	109	M (62 %), K (22 %), I (15 %)	2,7	60
Kettering	3,3	5,7	57	K (80 %), I (10 %), M (10 %)	4,4	130
Borris	**23,9**	**41,2**	**12**	**K, Traces de I**	**2,6**	**270**
Askov	6,4	11	28	K (38 %), I (24 %), M/V (37 %)	2,1	90

M : montmorillonite, K : kaolinite, I : illite ou mica, V : vermiculite

La fraction argileuse donnant la plus forte adsorption du glyphosate est Borris, viennent ensuite par ordre décroissant Kettering, Askov et P2. Borris est la fraction argileuse possédant la plus faible surface spécifique, mais les teneurs les plus élevées en carbone organique et matière organique. D'autre part, elle ne contient pas de montmorillonite contrairement aux trois autres fractions argileuses. Il a été montré que la teneur en matière organique n'était pas un des facteurs majeurs de l'adsorption du glyphosate (Mamy *et al*., 2005). Ce facteur ne semble effectivement pas être l'unique facteur responsable de l'adsorption du glyphosate, car la fraction Askov possède une teneur supérieure à la fraction Kettering et pourtant le taux d'adsorption du glyphosate est légèrement plus élevé en présence de Kettering. Le seul facteur qui évolue dans le même sens que le taux d'adsorption du polluant est la teneur en kaolinite, résultats contradictoires avec ceux de Glass (1987). Mais il est difficile de savoir quelle est la véritable argile impliquée car plus le pourcentage de kaolinite augmente, plus le taux de montmorillonite diminue, et plus le glyphosate est adsorbé. Les résultats observés ne sont pas forcément en désaccord avec les résultats précédents, car il existe plusieurs montmorillonites de provenance et de pureté diverses. Selon les résultats, la présence de fer ne semble pas influencer non plus l'adsorption de l'herbicide, car l'argile contenant le plus de fer ne permet pas la plus forte adsorption.

IV ADSORPTION SUR LES COMPLEXES ARGILO-HUMIQUES

Lors du stage dans le laboratoire du Prof. Juan Cornejo, nous avons également essayé de mettre en évidence plus spécifiquement le rôle de la matière organique et du fer dans l'adsorption du glyphosate, qui sont considérés dans la littérature comme des facteurs majeurs. Pour ce faire, des essais d'adsorption du glyphosate sur la montmorillonite Wyoming SWy-2 différemment chargée en fer, ainsi que sur six complexes argilo-humiques synthétisés à partir de cette argile ayant une teneur en fer plus ou moins importante ont été effectués. Le Tableau 32 présente la composition de chaque complexe obtenu selon le protocole décrit par Celis *et al.* (1998). Les acides humiques sont extraits de sol, la ferrihydrite est un oxy-hydroxyde de fer et la montmorillonite est brute, donc riche en ions sodium.

Tableau 32 : Composition des différents complexes synthétisés à partir de la montmorillonite Wyoming

Adsorbants	Teneur en montmorillonite (%)	Teneur en ferrihydrite (%)	Teneur en acides humiques (%)
SWy-2	100	0	0
SW-Fe_0	100	0	0
SW-Fe_{30}	70	30	0
SW-HA_0	100	0	0
SW-HA_4	96	0	4
SW-Fe-HA_0	85	15	0
SW-Fe-HA_4	81	15	4

Les deux complexes SW-Fe_0 et SW-HA_0 constituent des témoins pour la préparation des complexes SW-Fe_{30} et SW-HA_4.

Les matrices étant disponibles uniquement en petites quantités, seuls les coefficients de partage (K_d = Cs/Ce) ont été calculés pour une solution de glyphosate à 150 µM (pH = 4) dans un rapport solide/liquide (1/200). La Figure 154 rassemble les coefficients de partage obtenus, afin de comparer l'adsorption du glyphosate sur chaque matrice.

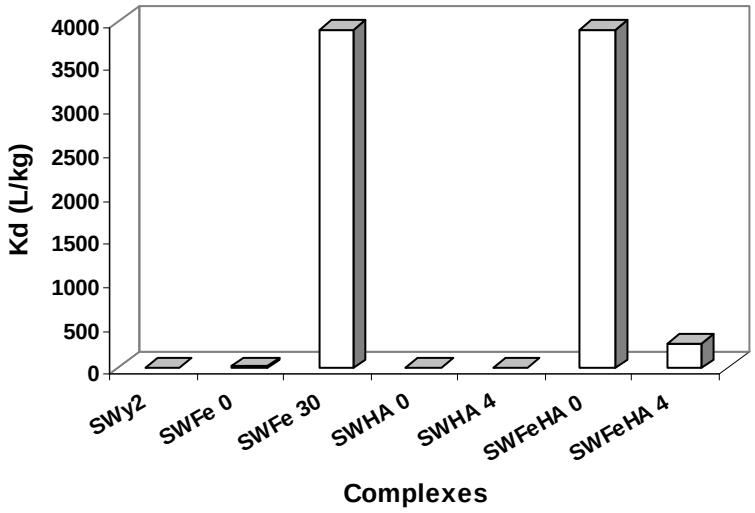


Figure 154 : Coefficients de partage du glyphosate sur chaque complexe argilo-humique

Comme il a été précédemment observé lors de l'étude de l'adsorption du glyphosate sur les argiles cationiques commerciales, l'adsorption du glyphosate sur la montmorillonite Wyoming brute (SWy-2) est très faible (K_d = 6 L/kg). Ce taux augmente fortement en présence de fer, les complexes SW-Fe_{30} et SW-Fe-HA_0 donnant une valeur de K_d égale à 4000 L/kg. Nous pouvons aussi remarquer que la teneur en fer dans ces deux complexes (SW-Fe_{30} : 30 % et SW-Fe-HA_0 : 15 %) ne semble pas augmenter le pourcentage d'adsorption du glyphosate qui est égal dans les deux cas à 95 %. Les acides humiques semblent, contrairement au fer, ne jouer aucun rôle dans l'adsorption du polluant. En effet le complexe SW-HA_4 nous a permis de calculer un coefficient de partage égal à 6 L/kg, qui est très faible et égal à celui obtenu pour l'argile brute. Cependant, en comparant l'adsorption du polluant sur les complexes SW-Fe-HA_0 (K_d = 4000 L/kg) et SW-Fe-HA_4 (K_d = 400 L/g), contenant la même teneur en fer soit 15 %, nous pouvons remarquer que la valeur est multipliée par 10 pour le complexe SW-Fe-HA_0 qui ne contient pas d'acides humiques. La présence d'acides humiques semble donc empêcher l'adsorption du glyphosate. Les mesures de pH de chaque surnageant après 24 h de mise en contact avec les solides sont présentées Figure 155.

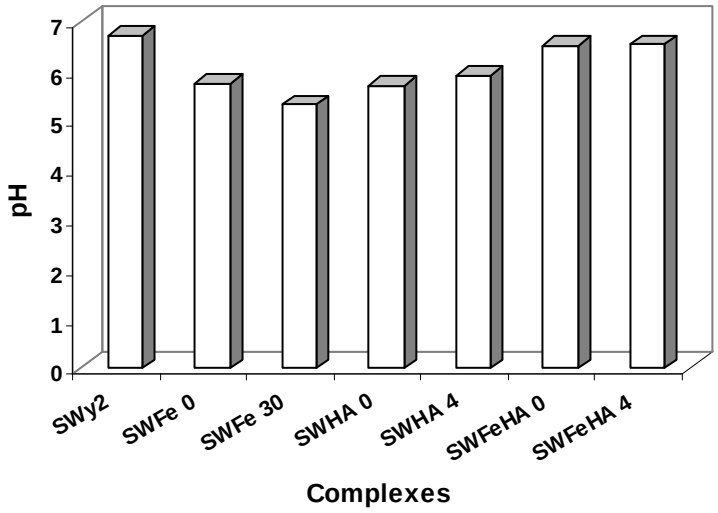


Figure 155 : Evolution du pH des surnageants lors des essais d'adsorption du glyphosate sur chaque matrice

Le pH des solutions initiales de glyphosate n'a pas été ajusté à 7 (pH = 4). Quelle que soit la matrice testée, nous pouvons remarquer que le pH du surnageant a fortement augmenté. La gamme de pH mesurée est relativement étroite et s'étend de 5,3 (SW-Fe30) à 6,7 (SWy-2). Dans cette gamme de pH, le glyphosate est sous sa forme anionique.

Afin de comprendre le mécanisme d'adsorption du glyphosate sur les complexes contenant du fer, nous avons comparé certains paramètres caractéristiques de chaque matrice (Tableau 33).

Tableau 33 : Quelques caractéristiques des complexes argilo-humiques synthétisés

Adsorbants	**pH**	**Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)**
SWy-2	7,0	25
SW-Fe_0	6,3	25
SW-Fe_{30}	6,0	83
SW-HA_0	6,5	43
SW-HA_4	5,2	4
SW-Fe-HA_0	5,2	82
SW-Fe-HA_4	5,8	57

Le pH de la matrice contenant un pourcentage en fer le plus élevé (SW-Fe_{30}, pH = 6) est d'une unité plus faible que celui de l'argile brute initiale (montmorillonite Wyoming, SWy-2, pH = 7), mais il diminue davantage avec l'ajout d'acides humiques (SW-HA_4, pH = 5,2). Le pH ne semble pas responsable de l'adsorption du glyphosate, car le complexe SW-Fe-HA_0 présente en solution un pH de 5,2 qui est le même que celui des complexes argile-acides humiques (SW-HA_4, pH = 5,2) et pourtant, le taux d'adsorption du glyphosate observé est de 95 %.

La surface spécifique de l'argile brute est de 25 $m^2.g^{-1}$. Elle augmente fortement quand des oxydes de fer sont ajoutés (83 $m^2.g^{-1}$) et diminue en présence d'acides humiques, qui sont des macromolécules bloquant tous les sites d'adsorption (4 $m^2.g^{-1}$). Des études par diffraction des RX ont permis de constater que le fer, comme les acides humiques, ne pénètrent pas dans l'espace interlamellaire de l'argile durant la synthèse des complexes. L'augmentation de la surface spécifique en présence de fer (SW-Fe_{30} et SW-Fe-HA_0) semble expliquer l'augmentation du taux d'adsorption du glyphosate : les sites d'adsorption sont plus nombreux et ils sont plus attractifs. De plus, la présence de fer engendre des charges de surface positives et le polluant, dans ces conditions, est sous forme anionique. L'adsorption du glyphosate est donc favorisée sur ces complexes et pourrait s'expliquer par des interactions électrostatiques. Plusieurs travaux sont en accord avec ces données. Piccolo *et al.* (1994) ont mis en évidence l'influence de la présence des oxydes de fer et d'aluminium sur l'adsorption du glyphosate par un mécanisme qui peut être réversible. Gerritse *et al.* (1996) ont, eux, montré que l'adsorption de cet herbicide augmentait avec la teneur en cations métalliques, et diminuait quand la teneur en matière organique augmentait. D'après nos résultats, nous avons pu constater que les acides humiques empêchent l'adsorption du polluant. En effet, les acides humiques peuvent former des complexes avec les oxydes de fer. Ils diminuent ainsi le nombre de sites d'adsorption disponibles pour le glyphosate qui ne peut plus interagir avec les oxydes de fer. En absence de fer et en présence de 4 % d'acides humiques (SWHA_4), il est raisonnable de conclure à un effet répulsif des charges négatives du glyphosate et des acides humiques, d'où une diminution de l'adsorption. Etant donné que les complexes préparés ont pu être lavés (purifiés), ils ne comportent pas (ou peu) de métaux qui pourraient servir de « pont ionique » et accroître l'adsorption. Ces expériences donnent ainsi une image relativement fidèle de l'effet des acides humiques sur l'adsorption, contrairement aux études sur des sols entiers, riches en différents ions métalliques potentiellement « promoteurs » d'adsorption.

Nous avons ensuite étudié le complexe SW-Fe30 saturé en glyphosate (permettant une très bonne adsorption de l'herbicide), séché à l'étuve pour réaliser des analyses du solide par spectroscopie IR afin de connaître quelle est la fonction chimique responsable des interactions glyphosate-fer. Malheureusement, aucune différence entre le spectre IR du complexe pur et du complexe saturé en glyphosate n'a pu être mise en évidence. Ces deux solides ont aussi été analysés par diffraction des RX pour savoir si le glyphosate était intercalé entre les feuillets de l'argile, mais une fois de plus, nous n'avons pas observé de différence. Le taux d'adsorption du glyphosate est élevé (95 %), mais il reste encore faible pour nous permettre des analyses par spectroscopie IR ou par diffractions des RX, la capacité d'adsorption de ce complexe pour le glyphosate n'étant que de 0,03 mmol/g soit 5,1 mg/g.

V ADSORPTION SUR UNE ARGILE ANIONIQUE (HDL)

En collaboration avec le Prof. Claude Forano du Laboratoire des Matériaux Inorganiques (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand), nous avons testé l'adsorption du glyphosate sur une argile anionique de type HDL (Mg_2-Al-NO_3), matrice synthétisée et caractérisée dans ce laboratoire. Le choix de cette matrice a été motivé par la faible affinité des ions nitrates pour les HDL, permettant, le cas échéant, un échange total avec le glyphosate lors de l'adsorption. A des pH proches de ceux trouvés dans des sols (pH = 4-6), le glyphosate se trouve sous forme anionique. Par conséquent, nous pouvons envisager une adsorption forte sur des argiles anioniques en favorisant l'intercalation de ce pesticide par substitution avec les anions présents dans l'espace interlamellaire.

Nous avons réalisé uniquement les isothermes d'adsorption du glyphosate et de la formulation commerciale (Roundup®) sur cette matrice. Le temps d'équilibre avait été déterminé précédemment : l'adsorption étant immédiate, le temps d'équilibre a été fixé comme dans les autres cas, à 24 h. Le protocole utilisé est différent de celui utilisé jusque là. Le rapport solide/liquide testé est très éloigné des conditions environnementales : 1/1000 (50 mg d'argile sont mis en contact avec 50 mL d'une solution de glyphosate ou de Roundup® contenant 68 % de matière active). Ce rapport a été choisi afin de minimiser les phénomènes d'agrégation de colloïdes ; sur d'autres phases et d'autres polluants organiques, de fortes adsorptions ont été observées facilitant *a priori* les analyses et la modélisation. Les concentrations des solutions de glyphosate (pur et dans la formulation) couvrent une gamme de 0,2 à 4 mM, le pH des solutions est ajusté à 7. Ce mélange est versé dans un godet de

centrifugation en verre de 100 mL, installé dans un bain thermostaté à 24 °C et agité à l'aide d'un barreau aimanté sur un agitateur magnétique. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés, leurs pH sont mesurés, puis ils sont analysés par HPLC. Les solides sont séchés à l'étuve à 60 °C et analysés par RMN du solide. La Figure 156 rassemble les résultats des isothermes d'adsorption du glyphosate pur et en solution dans le produit commercial, ainsi que l'évolution du pH des surnageants en fonction de la concentration à l'équilibre du polluant.

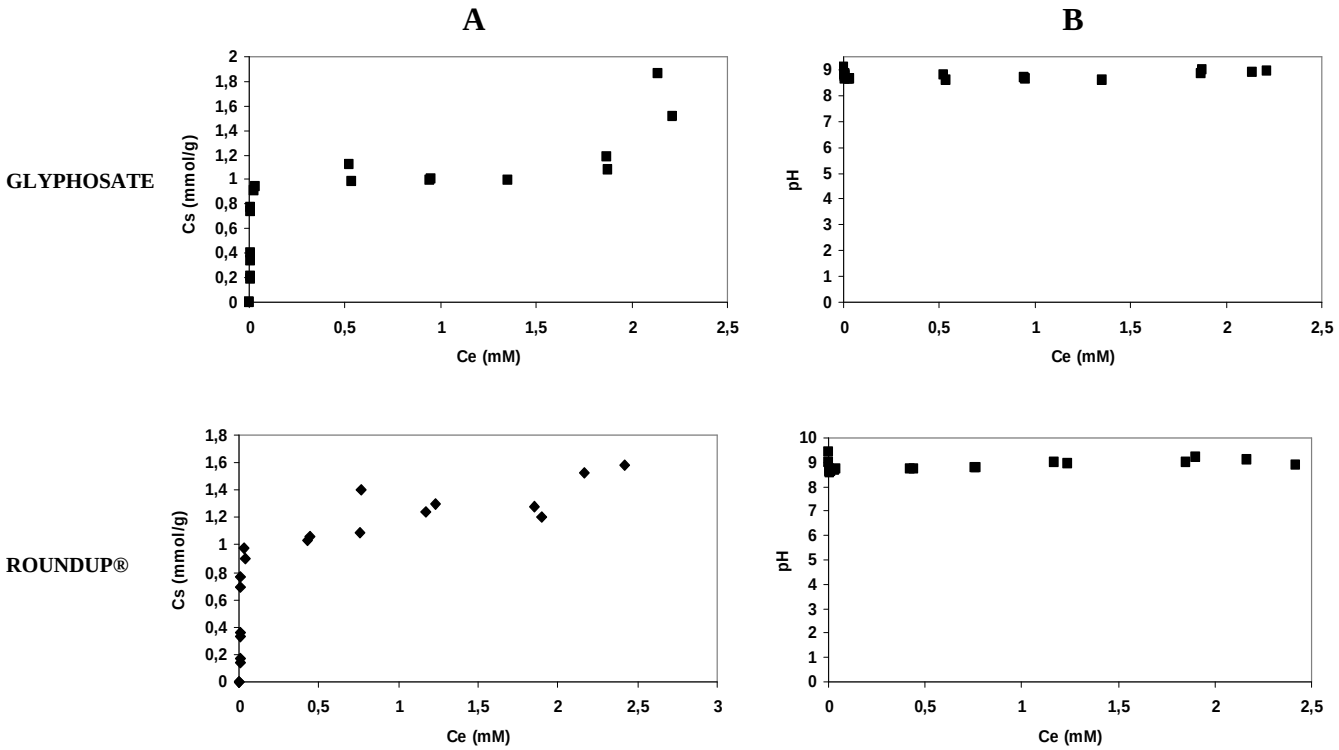


Figure 156 : Isothermes d'adsorption du glyphosate pur et formulé (Roundup®) (A) et évolution du pH des surnageants en fonction de la concentration à l'équilibre du glyphosate (B)

Les deux isothermes directs obtenus sont de type H. Un palier est atteint dans le cas du glyphosate pur. Dans le cas du produit formulé (Roundup®), des points supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer l'allure en H de l'isotherme direct. L'adsorption du glyphosate semble plus facile quand la concentration en soluté augmente dans la phase liquide. Ce type d'adsorption (H) est observé pour des molécules de soluté ayant une grande affinité pour la matrice. Suite à cette première zone, la capacité d'adsorption augmente fortement pour les concentrations les plus élevées en glyphosate (pur ou en formulation). Ceci pourrait traduire un phénomène d'intercalation du pesticide. En effet, l'intercalation du glyphosate à partir de Ce = 2 mM a été confirmée par une augmentation de la distance interlamellaire par diffraction des RX. Après contact avec les HDL, le pH des surnageants est voisin de 9. Ces argiles ont un caractère basique, ce qui explique cette valeur. Le glyphosate est alors sous forme dianionique. Le Tableau 34 reporte les valeurs des constantes obtenues d'après le modèle de Langmuir approprié pour cet isotherme jusqu'à une Ce inférieure à 1,5 mM.

Tableau 34 : Constantes de Langmuir obtenues pour les isothermes d'adsorption du glyphosate pur et commercial sur les HDL.

	GLYPHOSATE PUR	**GLYPHOSATE (ROUNDUP®)**
C_m (mmol/g)	1,01	1,23
L (L/mmol)	206,3	35
r^2	0,998	0,974

La modélisation par l'équation de Langmuir est satisfaisante (R^2 = 0,97-0,99). La capacité maximale d'adsorption (C_m) est légèrement plus élevée pour le glyphosate en formulation (1,23 mmol/g) que pour le produit pur (1,01 mmol/g), l'adjuvant de formulation semblant donc intervenir dans l'adsorption et jouer un rôle positif. Ce phénomène peut être problématique, car cela signifie que sur certaines matrices, le Roundup® peut avoir un caractère rémanent dans l'environnement. Ces isothermes modélisés par le modèle de Langmuir avec une très bonne corrélation permettent de dire que : (i) la fixation du glyphosate se fait en couche monomoléculaire par échange des anions de surface. (ii) L'adsorption est réalisée en sites localisés et n'autorise pas la fixation d'autres solutés sur un site déjà occupé. (iii) L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence de particules adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et pas d'interactions entre les particules adsorbées). De plus, l'observation des isothermes permet de constater que pour les fortes concentrations en glyphosate, la quantité de glyphosate adsorbée augmente. Il ne peut pas y avoir *a priori* formation de plusieurs couches de glyphosate supplémentaires à la surface de l'argile, ceci laisse donc supposer qu'il y a un phénomène d'intercalation qui se produit. Des analyses supplémentaires telles que la spectroscopie IR, la diffraction des RX ou la RMN du solide seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Li *et al.* (2005) ont étudié l'adsorption du glyphosate pur sur ces matrices. Ils ont obtenu des isothermes similaires aux nôtres (de type H). Par des analyses complémentaires, telles que l'IR, ils ont pu constater qu'aux faibles concentrations, le glyphosate s'adsorbe à la surface de la matrice tandis qu'aux plus fortes concentrations (Ce = 2,9 mM), il s'intercale entre les feuillets de l'argile (diffraction des RX).

Aucune comparaison n'est possible avec les argiles cationiques, car les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes.

Afin de tenter au mieux d'expliquer les mécanismes mis en jeu dans l'adsorption de chaque polluant sur chaque matrice, nous avons réalisé des analyses par RMN de chacun des solides obtenus à partir des isothermes. La technique par RMN HR-MAS ^{1}H est tout d'abord évaluée dans cette application, puis quelques spectres par RMN du solide sont présentés.

LA RMN, UN OUTIL POUR ETUDIER LES INTERACTIONS SOL – PESTICIDE ?

Le nombre de travaux publiés faisant appel à la RMN pour des problématiques environnementales ne cesse de croître. Ceci est raisonnablement dû au fait que la RMN présente plusieurs avantages : i) elle donne une vision à l'échelle moléculaire des phénomènes d'adsorption/désorption et ii) elle peut être utilisée de façon quantitative sous certaines conditions. La plupart des études relatant l'utilisation de la RMN en chimie environnementale concernent l'étude des substances humiques. Le groupe de Schmidt-Rohr est relativement actif dans ce domaine (Mao *et al.*, 2001 ; Mao et Schmidt-Rohr, 2003). Dans cette optique, la RMN a été beaucoup employée pour corréler les propriétés d'adsorption de polluants organiques avec la teneur et la composition de la matière organique des sols (Golding *et al.*, 2005). Pour cela, les analyses ont été effectuées le plus souvent sur des échantillons solides secs par RMN du carbone 13 et au moyen de la séquence Cross Polarization Magic Angle Spinning (CP-MAS). En ce qui concerne le comportement de polluants organiques dans des modèles de sol, la plupart des travaux publiés font appel à des composés enrichis en ^{2}H, ^{13}C et/ou ^{15}N (Nanny *et al.*, 1998 ; Delort *et al.*, 2004 ; Combourieu *et al.*, 2005). L'enrichissement permet de pallier en partie au manque de sensibilité relative de la RMN. Le groupe de Maciel a beaucoup œuvré dans ce domaine (Xiong *et al.*, 1999 ; Seger et Maciel, 2006). Nous citerons également pour exemple les travaux de H. Knicker sur les interactions entre le TNT enrichi en ^{15}N et des substances humiques marquées au ^{13}C (Knicker *et al.*, 1999 ; Knicker, 2003). La formation d'une liaison covalente entre une fonction nitro (réduite en amine) et une fonction méthoxy de la matière organique a été mise en évidence par des expériences de double polarisation croisée ($^{1}H \rightarrow {}^{13}C \rightarrow {}^{15}N$). Mais cette approche séduisante nécessite un double enrichissement ^{13}C, ^{15}N souvent très onéreux dans le cas des xénobiotiques. Quelques articles de synthèse existent sur les interactions « sols-polluants organiques » vues par RMN (Nanny *et al.*, 1998 ; Delort *et al.*, 2004).

D'autre part, plusieurs équipes ont montré qu'il était possible de différencier par RMN des fractions de polluants adsorbés sur les matrices solides en fonction de leur mobilité dans le solide (éventuellement hydraté) (Kohl *et al.*, 2000; Combourieu *et al.*, 2005 ; Feng *et al.*, 2005). L'utilisation de la RMN du proton (ce noyau est celui le plus « facilement » détecté *a priori* par RMN) s'est avérée particulièrement prometteuse dans cette approche (Combourieu

et al., 2001 ; Simpson *et al.*, 2001 ; Feng *et al.*, 2005). On s'affranchit ainsi du problème d'enrichissement isotopique de xénobiotiques, rarement commercialisés marqués ou alors à des prix prohibitifs.

Nous nous sommes ainsi intéressés à la RMN ^{1}H MAS pour l'analyse d'échantillons solides et/ou hydratés, mais aussi à la RMN du carbone 13 pour l'analyse d'échantillons non hydratés. Nous avons évalué le potentiel de la RMN dans les cas de la mésotrione et du glyphosate sur quelques argiles cationiques et anioniques présentées précédemment.

I LA TECHNIQUE MAS (MAGIC ANGLE SPINNING) ET LES PROBLEMATIQUES ENVIRONNEMENTALES

Les différentes interactions anisotropes inhérentes à la RMN, principalement l'anisotropie de déplacement chimique et les interactions dipolaires homo et hétéro-nucléaires, sont à l'origine d'un élargissement important des raies sur un spectre de poudre. A titre d'exemple, la largeur des signaux en phase liquide atteint au maximum 200 Hz (interactions scalaires ^{1}H-^{13}C) contre 40 à 50 kHz en phase solide (valeur moyenne des interactions dipolaires homonucléaires). Ces interactions dépendent d'un angle θ, plus précisément d'un facteur en $(3\cos^2\theta - 1)$ entre la direction du champ magnétique B_0 et le vecteur directionnel inter spins (Figure 157).

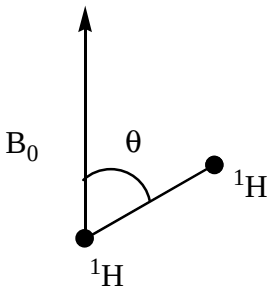


Figure 157 : Angle θ entre le champ magnétique B_0 et le vecteur inter spins.

Pour éliminer l'anisotropie de déplacement chimique et les interactions dipolaires homonucléaires, ce facteur doit être nul. Par conséquent, l'angle θ doit être égal à 54,7°, appelé l'angle magique. L'échantillon, placé dans un 'rotor' en oxyde de zirconium, est positionné à l'angle magique (54,7°). De surcroît, l'échantillon doit être mis en rotation à une vitesse très rapide pour moyenner les interactions anisotropes qui ne sont pas totalement supprimées par la mise en place de l'échantillon à l'angle magique.

Nous verrons dans ce manuscrit que l'un des problèmes majeurs des matrices environnementales est qu'elles ne sont pas du tout préparées pour des analyses par RMN. Outre la présence de composés paramagnétiques (susceptibles de détruire le signal de RMN), d'hétérogénéités et d'anisotropies importantes, les matrices environnementales (sols entiers, fractions argileuses, etc.) comportent des « bains » de protons très importants, provenant à la fois de la MO présente dans le solide, mais surtout de protons de structure des argiles (hydroxydes métalliques) et de l'eau physi et chimisorbée. La présence de cette quantité de protons importante entraine des interactions dipolaires homonucléaires qui nuisent à la qualité (résolution) des spectres de RMN ^{1}H MAS. Des vitesses de rotation à l'angle extrêmement élevées ne suffiraient pas à compenser ces effets.

Aussi, même si l'enregistrement de spectres de RMN ^{1}H MAS sur des échantillons solides peut fournir des informations intéressantes, l'hydratation des matrices solides peut s'avérer être une alternative séduisante. En effet, en « gonflant » la matrice solide, les distances entres spin sont augmentées et les interactions dipolaires *a priori* minimisées. De plus, l'hydratation des échantillons peut, dans certains cas, mimer davantage des conditions environnementales. On parlera dans ce cas de RMN HR-MAS pour High Resolution Magic Angle Spinning. En résumé, par HR-MAS et contrairement à la RMN du solide, c'est la partie liquide d'un milieu hétérogène solide/liquide qui est analysée, donc une fraction de l'échantillon naturellement plus mobile. Aussi, il est *a priori* possible de différentier des fractions de polluants organiques selon leur mobilité (Combourieu *et al.*, 2001 ; Simpson *et al.*, 2001 ; Feng *et al.*, 2005). Il est préférable de noter que les sondes de mesure peuvent être identiques, ce qui facilite la comparaison des résultats.

Enfin, lorsqu'on souhaite enregistrer un spectre ^{13}C en abondance naturelle sur des échantillons solides, il est souhaitable d'utiliser des séquences de RMN les plus sensibles, l'abondance naturelle du carbone 13 n'étant que de 1,1 %. La séquence de polarisation croisée associée à la rotation de l'échantillon à l'angle magique (CP-MAS) permet de transférer une partie de l'aimantation (signal) du proton (noyau le plus sensible) vers le carbone 13, d'où une augmentation de sensibilité. Cette technique est relativement robuste et ne nécessite que peu de réglages.

Feng *et al.* (2005) ont utilisé à la fois la RMN sur des échantillons solides et des échantillons hydratés, en parallèle à la réalisation d'isothermes, afin d'étudier le mécanisme d'adsorption d'acides humiques extraits de tourbes sur des argiles cationiques : une kaolinite

et une montmorillonite. Ils ont pu constater que ce type d'adsorption est sélectif en fonction de l'argile testée. Ces acides humiques se fixent préférentiellement sur la kaolinite grâce à la présence des chaînes aliphatiques, tandis que dans le cas de la montmorillonite, ce sont les groupements aromatiques qui favorisent cette adsorption. Wang et Xing (2005) ont démontré (pas par RMN) des résultats partiellement contradictoires : les chaînes aliphatiques des acides humiques sont responsables de leur adsorption sur une montmorillonite et une kaolinite. En fonction de la composition de la fraction argileuse présente dans un sol, ces résultats peuvent servir à prédire le comportement d'un polluant organique dans ce sol, il sera préférentiellement retenu s'il possède un noyau aromatique et si l'argile prédominante est une montmorillonite. Toutefois, il est clair que la RMN ne permettra pas de s'affranchir des problèmes liés à la diversité des caractéristiques des sols, etc.

Notre principal objectif en utilisant ces approches par RMN MAS est de les évaluer dans l'étude de la mobilité de polluants organiques (mésotrione et glyphosate) au contact d'une matrice solide (argiles cationiques et anioniques), puis de quantifier la fraction de polluant libre ou faiblement adsorbé par comparaison avec une technique plus classique qui est l'isotherme d'adsorption.

II SUIVI DU COMPORTEMENT DE LA MESOTRIONE ET DU GLYPHOSATE DANS LES MATRICES MINERALES. APPROCHE QUALITATIVE.

L'objectif de ce chapitre est tout à fait exploratoire. Nous n'avons pas pu, faute de temps, tester toutes les matrices minérales étudiées lors des études d'adsorption.

II.1 Mise en place du protocole expérimental

La quantification par RMN MAS et plus particulièrement par HR-MAS sur des échantillons hydratés dépend naturellement du nombre de spins par unité de volume soit, en d'autres termes, de la quantité d'échantillon dans le rotor. Avant de quantifier la fraction de pesticide présente réellement en solution, nous avons commencé à réaliser des mises en contact entre des solutions de mésotrione ou de glyphosate et une matrice solide (montmorillonites K10, KSF et kaolinite). D'une manière générale, la mise en contact a été réalisée dans un eppendorf pour différents rapports solide/liquide. Lors des premiers essais, 16 µL de ce mélange hétérogène ont été prélevés et introduits directement (et rapidement)

dans le rotor. Au-dessus de l'échantillon, un insert est positionné de manière à ce que la cavité contenant l'échantillon soit réduite à 12 µL. L'introduction d'un volume supérieur permet de s'assurer qu'*a priori* la cavité est pleine. Nous avons ensuite réalisé l'acquisition d'un spectre de RMN ^{1}H à l'angle magique de ce mélange, en introduisant une étape de présaturation en début de séquence pour éliminer la résonance de l'eau. L'ensemble de la séquence a été synchronisé avec la vitesse de rotation du rotor, fixée au départ arbitrairement à 5 kHz.

Dans ces conditions, nous avons tout d'abord voulu valider le volume d'échantillon à introduire dans le rotor, à la fois pour s'affranchir des problèmes éventuels de fuites et évaluer les limites de détection, le tout avec une résolution satisfaisante.

Ces essais ont été effectués sur un échantillon liquide en absence d'une matrice solide. La Figure 158 présente les spectres de RMN ^{1}H du glyphosate (4 mM), enregistrés dans un rotor, en fonction du volume d'échantillon introduit.

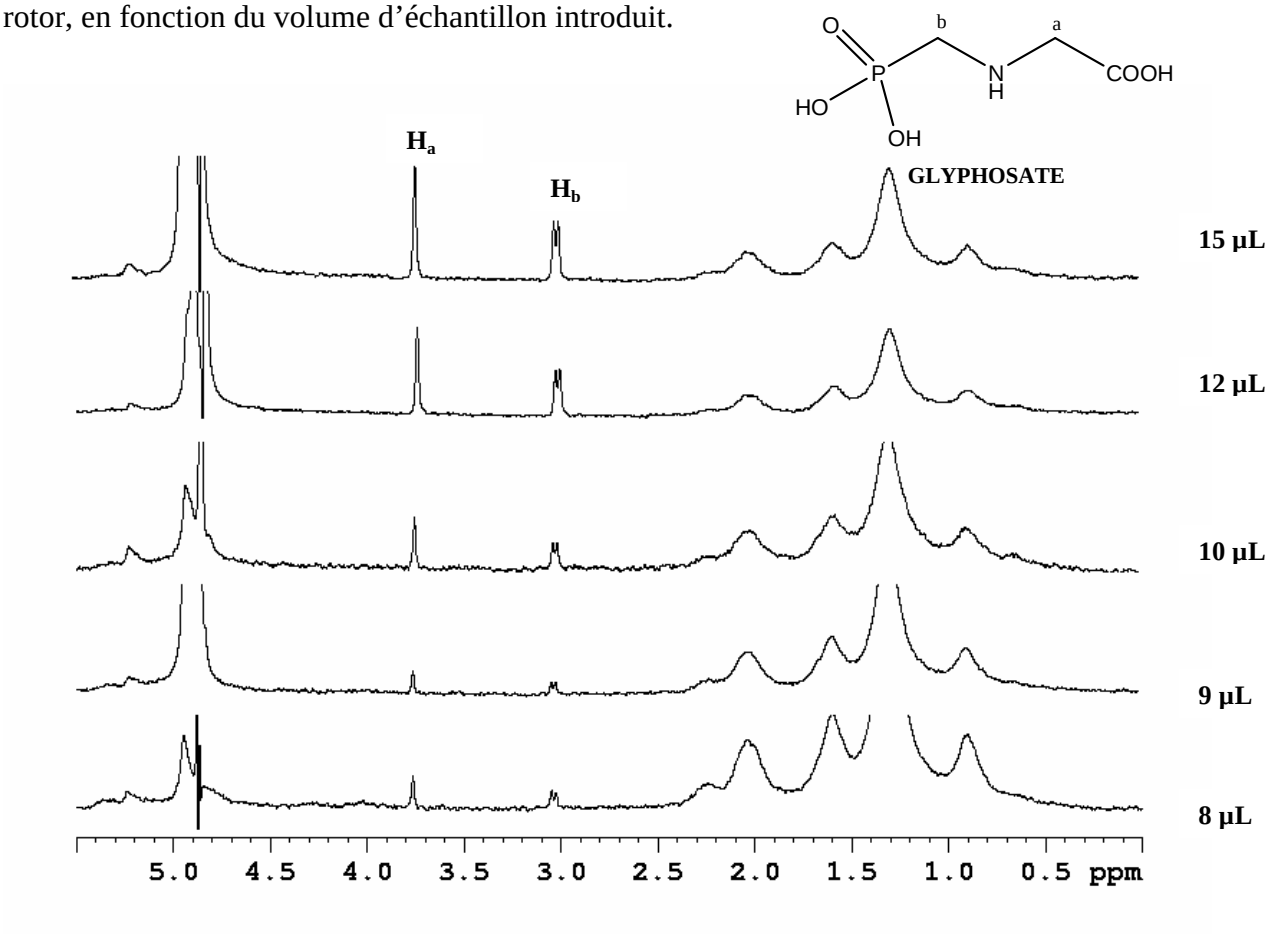


Figure 158 : Spectres ^{1}H HR-MAS du glyphosate 4 mM

Les deux groupements méthylène du glyphosate résonnent à 3,09 et 3,81 ppm. La constante de couplage $^{2}J_{^{1}H-^{31}P}$ est également observée. Les différentes résonances dans la

gamme 0,8-1,2 ppm correspondent à la fois aux protons résiduels du téflon des inserts et à certains constituants de la sonde. Ces « pollutions » montrent d'ores et déjà les difficultés à observer de faibles concentrations par cette technique et à étudier des polluants possédant des protons aliphatiques dans cette zone de déplacement chimique. En dessous de 10 µL d'échantillon dans le rotor, le rapport signal sur bruit diminue de façon importante, le nombre d'acquisitions (scans) étant constant par ailleurs. Le rapport signal sur bruit risque d'être encore plus faible en présence de matrices minérales. Ce volume ne doit donc pas être inférieur à 10 µL. Au-dessus de 10 µL, la qualité des spectres est satisfaisante. Le volume de 10 µL, inférieur au volume nécessaire pour remplir le rotor permet de minimiser les fuites. Par la suite toutes les expériences seront réalisées en introduisant ce volume dans le rotor qui constitue un bon compromis entre une résolution satisfaisante sur les spectres et une minimisation des fuites.

Nous avons ensuite déterminé la vitesse de rotation optimale pour nos échantillons, compte-tenu du volume d'échantillon introduit. Différents essais ont montré qu'entre 3 et 6 kHz, il n'y avait pas d'amélioration du signal. En dessous de 3 kHz, les raies deviennent de plus en plus larges au fur et à mesure que la vitesse de rotation de l'échantillon diminue, pour atteindre des largeurs de raies proches de celles observées par RMN du solide (soit plusieurs ppm !). Au-delà de 6 kHz, des problèmes d'échauffement de l'échantillon et de fuites au niveau des inserts en Téflon peuvent se produire.

Deux méthodes permettant de quantifier la fraction de pesticide en solution peuvent être envisagées. Une nécessite l'introduction d'une référence chimique interne, subissant de fait les mêmes contraintes que l'échantillon à analyser (point positif et négatif à la fois), l'autre nécessite l'envoi d'un signal de référence électronique, il s'agit de la méthode ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentration). Dans le cadre de cette première approche, nous n'avons utilisé que la méthode par étalon interne.

II.2 Application au cas de la mésotrione

Deux argiles ont pu être testées avec une solution de mésotrione à 3,7 mM : la montmorillonite K10 et la kaolinite. Différentes mises en contact ont été effectuées selon les rapports solide/liquide suivants : 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 et 1/200. Le rapport 1/5 est le rapport le plus proche des conditions environnementales que nous avons pu effectuer. Les mélanges sont réalisés en eppendorf, la référence interne (DMSO à 2 mM) est rajoutée puis 10 µL du

mélange sont introduits dans le rotor. Le DMSO a été choisi pour différentes raisons. Il résonne dans une zone de déplacement chimique proche des signaux du glyphosate, sans qu'il n'y ait de superpositions avec les signaux de l'herbicide ou des « pollutions » dues aux inserts et à la sonde. De plus, il est suffisamment visqueux pour être prélevé précisément. Enfin, des études préalables ont montré que des références internes communément utilisées en RMN du liquide, telles que le $TSPd_4$, étaient susceptibles de s'adsorber sur les matrices solides. Toutes les acquisitions ont été réalisées au moyen d'une impulsion simple précédée d'une présaturation, l'ensemble étant synchronisé avec la vitesse de rotation de l'échantillon (5 kHz).

II.2.1 Montmorillonite K10

La Figure 159 présente les spectres obtenus lors de la mise en contact d'une solution de mésotrione 3,7 mM et de la Montmorillonite K10 dans différents rapports solide/liquide.

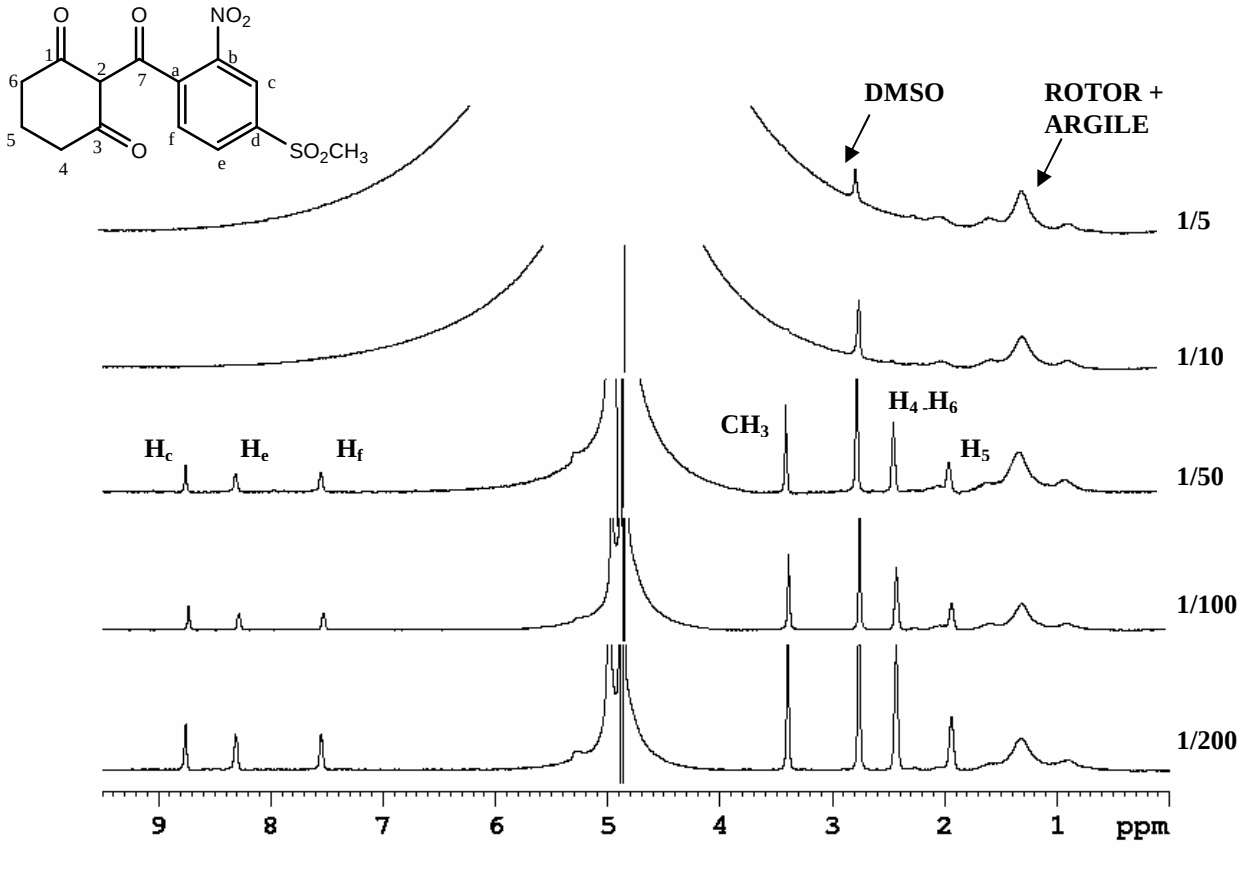


Figure 159 : Spectres ^{1}H HR-MAS de mise en contact de la mésotrione avec l'argile K10 dans différents rapports solide/liquide

Pour les rapports solide/liquide 1/200 à 1/50, les signaux de la mésotrione et du DMSO sont aisément observables. Pour des rapports de 1/5 et 1/10, seul le DMSO est (objectivement) visible. Notons un élargissement important de la résonance de l'eau et du

DMSO dû à la présence massive de protons 'moins mobiles' de l'argile dans ces faibles rapports.

Plusieurs résultats peuvent être extraits de ces spectres.

- Les déplacements chimiques de la mésotrione et la multiplicité des différents signaux sont quasiment identiques à ceux observés en solution aux mêmes pH. Ceci suggère que la forme tautomère de la mésotrione est *a priori* identique au contact de l'argile et en solution pour une gamme de pH comprise entre 3,5 et 9 ppm.
- L'intensité relative des signaux de la mésotrione par rapport au signal du DMSO décroit avec le rapport solide/liquide.
- Le signal du DMSO est toujours visible pour des rapports de 1/10 et 1/5. Ceci suggère que le volume de liquide dans le rotor est toujours suffisant pour observer des résonances. Toutefois, aucun des signaux de la mésotrione n'est visible. L'herbicide n'est plus présent en solution et est en majorité adsorbé sur la matrice. En d'autres termes, l'intensité des signaux de la mésotrione diminue alors que celle du DMSO demeure quasiment constante relativement.

D'après les cinétiques d'adsorption, nous avions pu constater que cette argile permet une forte adsorption de la mésotrione atteignant des taux de 99 % pour un rapport solide/liquide 1/3. Ces résultats concordent car pour le rapport 1/5, nous ne distinguons plus de mésotrione en solution alors que les signaux de la référence ont toujours la même intensité relative. Ces résultats confirment l'adsorption de la mésotrione et montre que le DMSO n'est pas ou peu absorbé. Enfin, la surface spécifique de l'argile ne semble pas être réduite par la formation d'agrégats pour les rapports solide/liquide élevés.

Le pH des échantillons analysés varie de 6 à 3,5 selon le rapport solide/liquide testé. Plus la quantité d'argile est forte et plus le pH est faible. Ceci conforte une fois encore les résultats de l'adsorption montrant une adsorption plus importante de la mésotrione quand le pH diminue. D'autre part, nous avons vu au chapitre 4 de l'étude bibliographique que le pH local à la surface de l'argile pouvait varier de 2 unités par rapport au pH de la solution, entraînant une protonation accrue de la mésotrione. Toutefois, les déplacements chimiques des différents signaux de la mésotrione en présence de K10 ne sont pas modifiés par rapport à ceux obtenus en liquide. (La matrice solide n'influe pas sur les déplacements chimiques de la mésotrione). Ceci semble indiquer qu'à l'échelle de temps de la RMN, il n'y a pas de

modification significative du pH à la surface de l'argile par rapport au pH mesuré pour la suspension. Le Tableau 35 résume les taux d'adsorption de la mésotrione sur K10 en fonction du rapport solide liquide.

Tableau 35 : Taux d'adsorption de la mésotrione sur l'argile K10 d'après les spectres ^{1}H HR-MAS

Rapport solide liquide	Taux d'adsorption (%)
1/200	17,5 ± 1,5
1/100	49,5 ± 25,8
1/50	54,6 ± 8,3
1/10	/
1/5	/

Nous retrouvons des informations obtenues lors des études en batch à savoir, plus la masse de solide augmente et plus le taux d'adsorption augmente. Toutefois, il est difficile de les comparer aux résultats des isothermes d'adsorption car les concentrations initiales ne sont pas identiques. De plus, l'erreur relative est très importante pour le rapport solide/liquide 1/100. Nous n'avons pour l'heure pas d'explication concernant ce manque de reproductibilité.

II.2.2 Kaolinite

La même expérience est réalisée pour des mises en contact entre la mésotrione (3,7 mM) et la kaolinite (Figure 160).

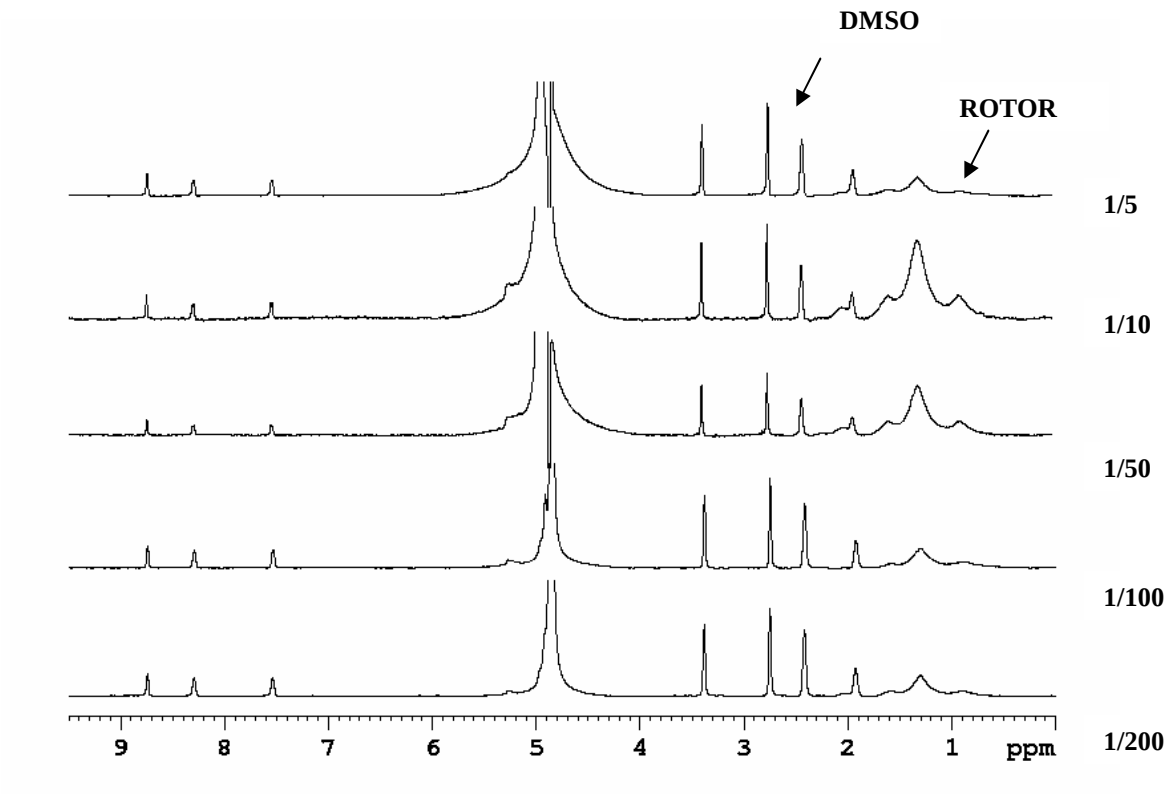


Figure 160 : Spectres ^{1}H HR-MAS de mise en contact de la mésotrione avec la kaolinite dans différents rapports solide/liquide

Quels que soient les rapports solide/liquide, les signaux de la mésotrione sont toujours visibles. Il semble donc que ce pesticide soit mobile et ait peu d'affinité pour ce solide. Le Tableau 36 rassemble les taux d'adsorption de la mésotrione sur la kaolinite.

Tableau 36 : Taux d'adsorption de la mésotrione sur l'argile kaolinite d'après les spectres ^{1}H HR-MAS

Rapport solide liquide	Taux d'adsorption (%)
1/200	8,8
1/100	8,7
1/50	12,4
1/10	15,4
1/5	15,3

La mésotrione semble s'adsorber, même faiblement, sur la kaolinite contrairement aux résultats issus des techniques d'adsorption classique. L'explication la plus plausible concerne la vitesse de rotation du rotor. En effet, il est raisonnable de penser qu'en rotation à l'angle

magique (5000 tours par seconde), un phénomène de diffusion pourrait permettre à la mésotrione d'atteindre des sites non accessibles par la méthode en batch préconisée par l'OECD.

Nous pouvons également remarquer que pour les rapports riches en solide, l'allure du spectre n'est pas modifiée (même nombre de signaux, même multiplicité). En revanche, par rapport au spectre de la mésotrione en solution à pH 7,5, de légères variations de déplacements chimiques sont observées en présence de cette matrice. Le pH des échantillons, situé entre 7 et 8, n'est donc pas à l'origine de ces variations. La kaolinite semble donc interagir avec ce pesticide, même si l'adsorption apparaît comme faible.

II.2.3 Saturation de l'argile KSF par une solution de mésotrione

Des expériences de saturation de la montmorillonite KSF ont été effectuées à partir d'une solution de mésotrione à 8 mM. Deux cycles ont été réalisés afin de saturer complètement l'argile. L'objectif était d'obtenir des matrices avec les plus fortes teneurs possibles en mésotrione afin d'enregistrer des spectres de RMN ^{13}C CPMAS. La Figure 161 présente les spectres de RMN ^{13}C CPMAS de la mésotrione pure et de l'argile saturée.

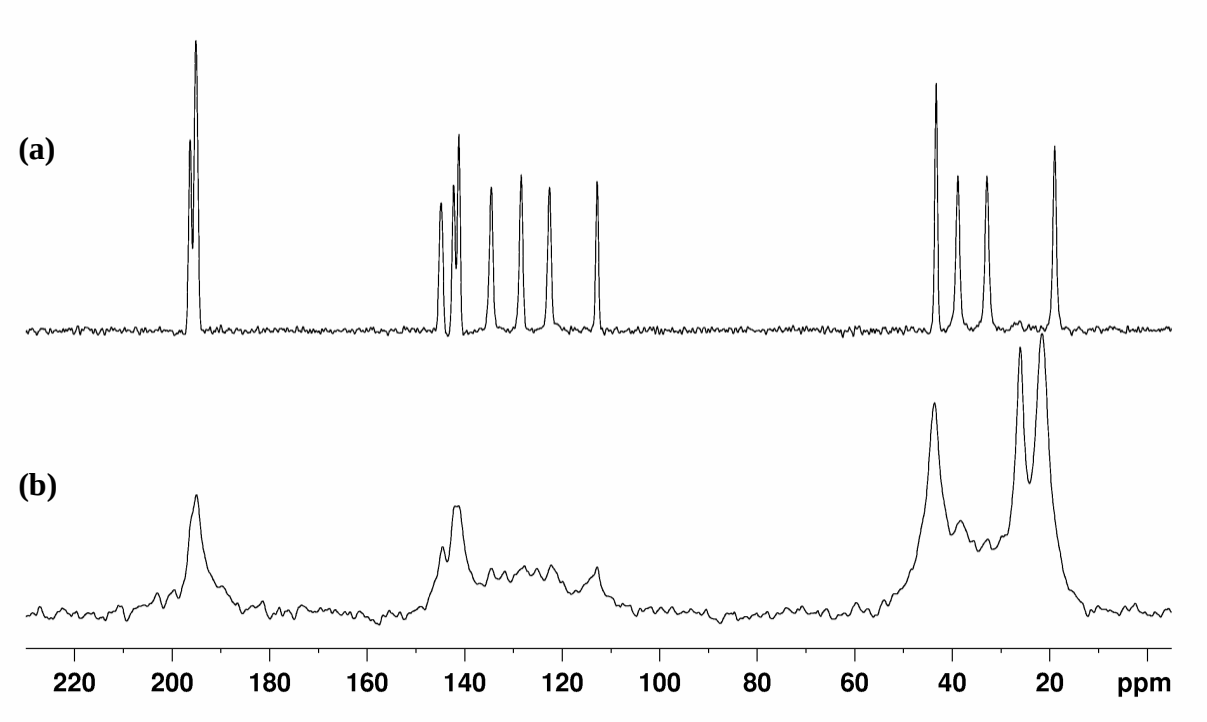


Figure 161 : Spectres de RMN ^{13}C CP-MAS (a) de la mésotrione pure sous forme solide et (b) de la mésotrione saturant la surface de la montmorillonite KSF.

Les données révèlent qu'il n'y a pas de modifications notables des déplacements chimiques, donc pas de modification de la structure chimique de l'herbicide. Toutefois, l'élargissement des signaux dû à une distribution de sites (cette anisotropie est due à la présence de plusieurs « espèces de mésotrione » à la surface du solide) limite considérablement l'interprétation des résultats. Certains commentaires peuvent néanmoins être faits. Il n'y a pas de modification des déplacements chimiques des fonctions carbonyle (~194,5 ppm) par rapport au composé pur en phase solide, variations qui auraient pu signifier la formation de complexes organo-métalliques avec la surface. La perte de résolution ne permet toutefois pas de distinguer les différentes fonctions carbonyle et énol dans cette zone. Entre 120 et 145 ppm, la zone des carbones aromatiques n'est que peu modifiée suite à l'adsorption. Sur le spectre de l'herbicide adsorbé, au moins trois C-H aromatiques sont visibles, suggérant une fois encore la présence de plusieurs types de mésotrione, positionnés différemment à la surface du solide. En effet, des mouvements de rotation de groupements phényle sont assez fréquents en phase solide, ces mouvements correspondant à une contrainte thermodynamique et cristallographique majeure : minimiser l'occupation de l'espace.

Les mêmes remarques pourraient être faites pour la partie aliphatique entre 18 et 50 ppm. Toutefois, la présence des six signaux très intenses à 23,5, 26,0 et 43,5 ppm est assez

surprenante. Ces signaux pourraient correspondre aux groupements méthyle de deux types de molécules de mésotrione, mais cette hypothèse n'a pu être vérifiée.

D'une manière générale, la présence de signaux beaucoup plus intenses que les autres permet d'émettre deux hypothèses concernant le comportement des fonctions correspondantes :

- ces fonctions sont plus proches de la surface de l'argile, le transfert d'aimantation inhérent à la séquence CP-MAS étant alors favorisé (et l'intensité du signal plus importante),
- ces fonctions sont moins mobiles, car en interaction avec la surface. En effet, plus les molécules étudiées seront mobiles, moins le transfert d'aimantation sera efficace (et l'intensité du signal moins importante). Ceci s'explique par le fait qu'une molécule mobile est soumise à des mouvements de rotation globalement aléatoires. Cette distribution aléatoire d'orientation pour les molécules va générer une annulation (minimisation) des interactions dipolaires hétéronucléaires à l'origine du transfert d'aimantation en CP-MAS.

Des expériences bidimensionnelles en phase solide ainsi que des études de dynamique du polluant (mesures de temps de relaxation, etc.) seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ces hypothèses et mieux appréhender la nature des interactions mises en jeu.

Dans la suite du chapitre, nous ne présenterons, par souci de lisibilité, que les résultats obtenus par RMN ^{1}H HR-MAS, même si des résultats similaires ont été obtenus par RMN ^{13}C CP-MAS sur le glyphosate et d'autres matrices.

En conclusion, il apparaît que la RMN du carbone 13 à l'abondance naturelle n'apporte aucune information nouvelle sur le comportement de l'herbicide à la surface de l'argile. Compte-tenu du manque de sensibilité inhérent à la détection de ce noyau, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

II.3 Application au cas du glyphosate

Trois argiles cationiques (K10, KSF et kaolinite) ont été testées dans les mêmes conditions que précédemment avec une solution de glyphosate à 4 mM. Le mélange

glyphosate, argile et référence interne (DMSO à 4mM) est préparé dans un eppendorf, puis 10 µL sont introduits dans le rotor.

II.3.1 Montmorillonite K10

La Figure 162 présente les spectres obtenus avec la montmorillonite K10.

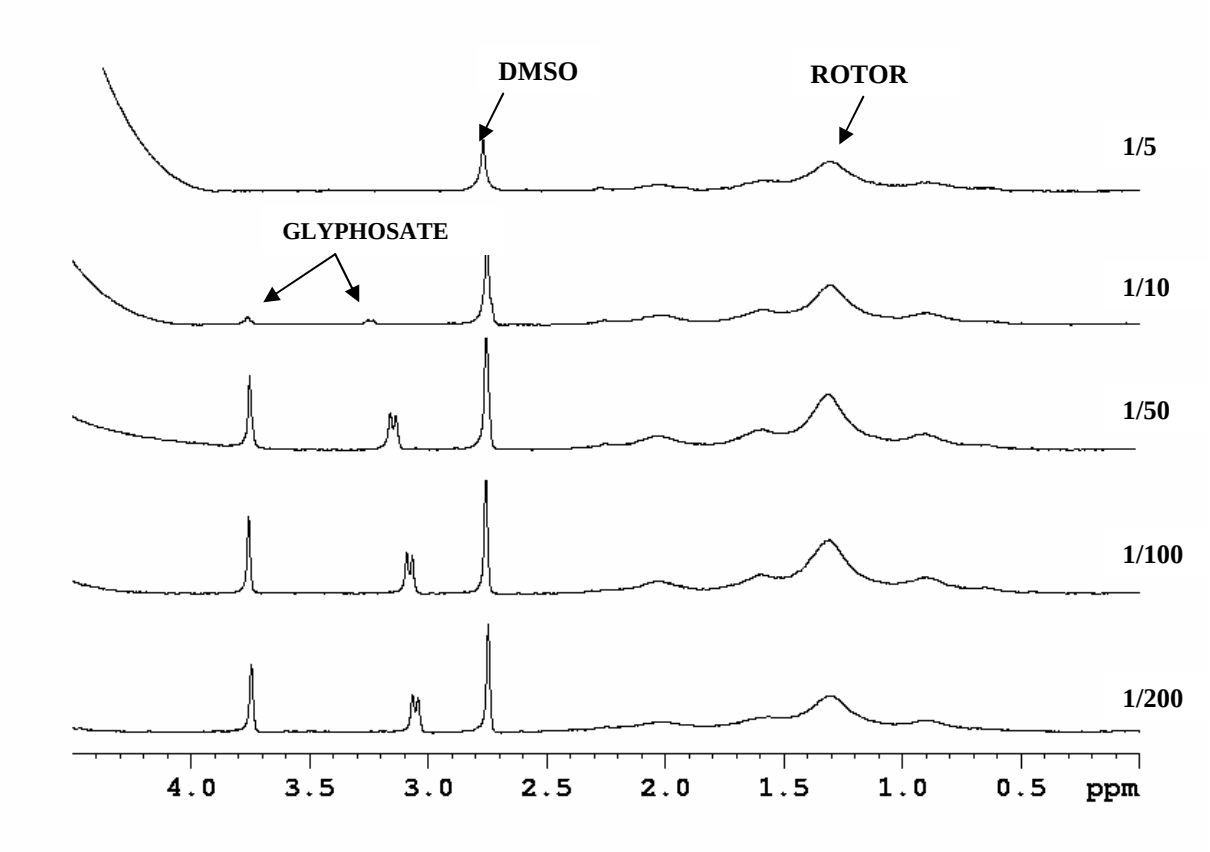


Figure 162 : Spectres ^{1}H HR-MAS de mise en contact du glyphosate avec l'argile K10 dans différents rapports solide/liquide

Comme dans le cas de la mésotrione, seuls les trois premiers rapports sont exploitables pour réaliser la quantification de la fraction non adsorbée. Pour les rapports 1/5 et 1/10, le glyphosate semble peu mobile et par conséquent adsorbé sur K10. L'intensité relative importante du signal du DMSO, même pour le rapport 1/5, confirme qu'il ne s'adsorbe pas ou peu. Nous avions remarqué que le glyphosate s'adsorbait sur cette argile lors des essais d'adsorption classique, 99 % du glyphosate était adsorbé pour le rapport 1/3.

Le Tableau 37 rassemble les taux d'adsorption du glyphosate sur cette matrice.

Tableau 37 : Taux d'adsorption du glyphosate sur l'argile K10 d'après les spectres ^{1}H HR-MAS

Rapport solide liquide	Taux d'adsorption (%)
1/200	13,2 ± 18,9
1/100	17,0 ± 6,4
1/50	32,4 ± 5,2
1/10	/
1/5	/

Le taux d'adsorption du glyphosate pour le rapport 1/200 est voisin de celui obtenu pour l'essai des cinétiques d'adsorption (10 %). Un résultat similaire avait été obtenu sur les isothermes d'adsorption. Les résultats obtenus par cette approche RMN sont donc vérifiés pour ce rapport. Le taux d'adsorption augmente avec le rapport solide/liquide, au point de ne plus pouvoir détecter les signaux du glyphosate pour le rapport 1/5 (même de faible intensité, les signaux du glyphosate sont visibles pour le rapport 1/10 mais pas quantifiables). Une fois de plus, l'erreur relative est élevée.

Le pH des échantillons varie entre 3,5 et 6 selon le rapport solide/liquide testé. Le déplacement chimique du CH_2-P (proche de 3 ppm) varie avec le rapport solide/liquide. Ce signal est déblindé, suggérant que l'adsorption de glyphosate se fait par l'intermédiaire de la fonction phosphonate. Des expériences par RMN ^{31}P sur les échantillons solides permettraient peut-être de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

II.3.2 La montmorillonite KSF

La Figure 163 présente les spectres obtenus avec la montmorillonite KSF.

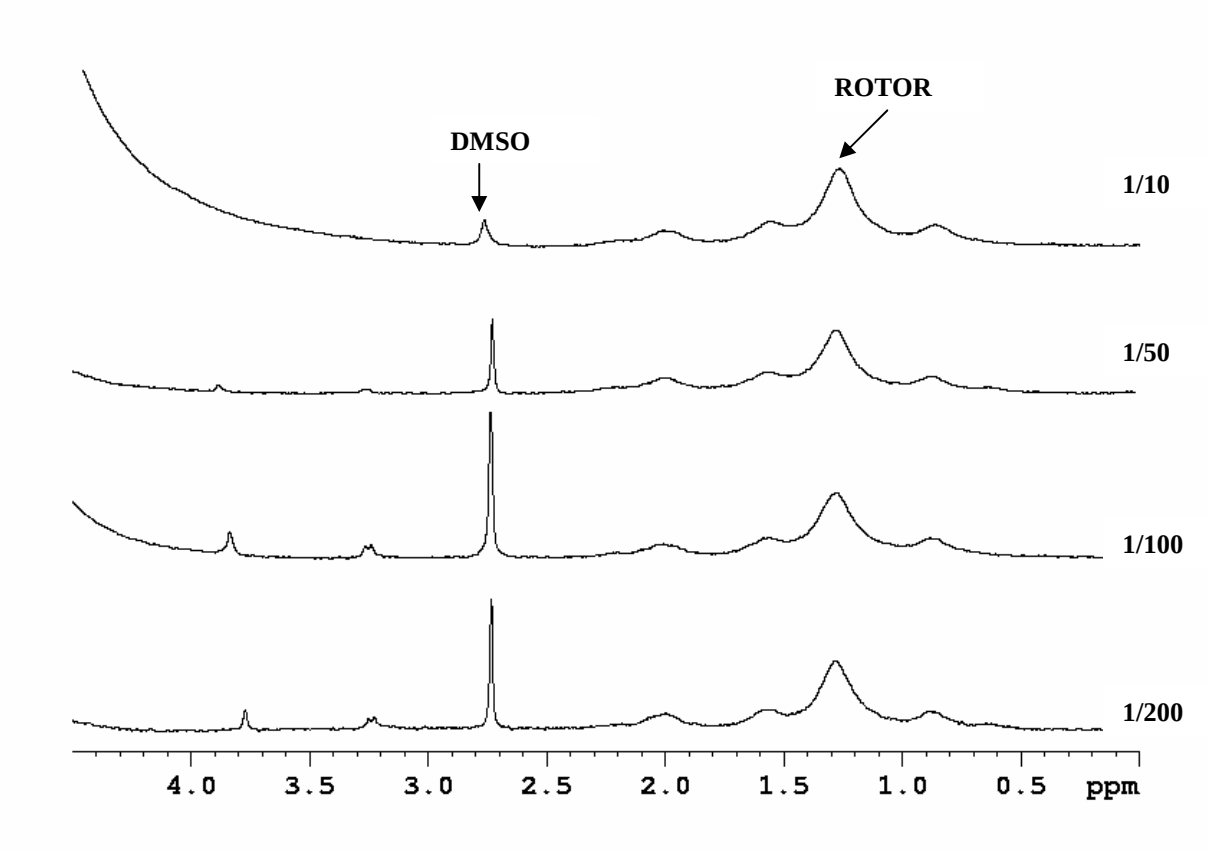


Figure 163 : Spectres ^{1}H HR-MAS de mise en contact du glyphosate avec l'argile KSF dans différents rapports solide/liquide

Tous les rapports testés permettent de constater que le glyphosate est très peu mobile. Le rapport 1/5 a été réalisé mais les signaux sont très larges, proche d'un spectre solide. Par conséquent, aucun des signaux de l'herbicide n'est visible. Le glyphosate serait donc bien adsorbé sur l'argile, ce qui a été vérifié par les cinétiques d'adsorption. En effet, lors de la cinétique d'adsorption dans le rapport 1/200, 80 % de glyphosate s'adsorbait, ce qui est confirmé d'après les spectres de RMN. La diminution relative de l'intensité des signaux du glyphosate par rapport à celle du DMSO confirme sans ambigüité l'adsorption de l'herbicide. Les interactions entre l'argile et l'herbicide sont vraisemblablement très fortes car l'intensité des signaux du glyphosate est très faible, même pour les rapports solide/liquide 1/100 et 1/200. Enfin, une légère adsorption du DMSO n'est pas à exclure cette fois, l'intensité du DMSO semblant diminuer relativement pour des rapports élevés. Des liaisons hydrogène entre l'argile et la fonction sulfone du DMSO pourraient expliquer cette observation.

Le Tableau 38 rassemble les taux d'adsorption du glyphosate sur cette matrice.

Tableau 38 : Taux d'adsorption du glyphosate sur l'argile KSF d'après les spectres ^{1}H HR-MAS

Rapport solide liquide	Taux d'adsorption (%)
1/200	70,8 ± 2,4
1/100	75,9 ± 5,7
1/50	78,1
1/10	/
1/5	/

Ces résultats sont proches de ceux obtenus lors des essais d'adsorption. La cinétique et l'isotherme d'adsorption montraient un taux d'adsorption proche de celui observé par RMN (80 %). Nos résultats RMN sont vérifiés pour le premier rapport.

Le pH des échantillons varie de 1,3 à 2,8 selon les rapports testés, c'est-à-dire dans des zones encadrant la valeur du pKa de la deuxième acidité du groupement phosphonate du glyphosate. Ces valeurs sont très inférieures au pKa de l'acide carboxylique, qui est de fait majoritairement sous sa forme acide. Des variations de déplacements chimiques du glyphosate sont imputables à ces variations de pH. Toutefois, le singulet à 3,7 ppm (CH_2-C) subit de plus grandes variations que le doublet à 3 ppm (CH_2-P). La fonction acide carboxylique pourrait également, dans ces conditions, être impliquée dans le mécanisme d'adsorption du glyphosate sur la montmorillonite KSF. Il est également possible d'envisager que la forte teneur en métaux de cette argile, notamment le fer, le calcium et le magnésium joue un rôle dans l'adsorption. Soit une simple complexation des métaux relargués en solution suffit à faire varier le déplacement chimique du méthylène adjacent au groupement acide carboxylique, soit les métaux permettent l'adsorption du glyphosate par les deux fonctions acides, les métaux jouant le rôle pont ionique. Cette dernière hypothèse est moins probable car à ces pH, la charge nette globale du glyphosate est positive. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier ces différentes hypothèses.

Pour tenter de mieux appréhender les problèmes de quantification et les mécanismes mis en jeu, nous avons enregistré les spectres proton des différents points de l'isotherme réalisé dans un rapport solide/liquide 1/200 (Figure 164). Les spectres des échantillons hydratés (200% w/w) ont été comparés à ceux obtenus sur des échantillons solides par RMN

^{1}H MAS et une séquence d'écho de Hahn synchronisée avec la vitesse de rotation de l'échantillon (Figure 164).

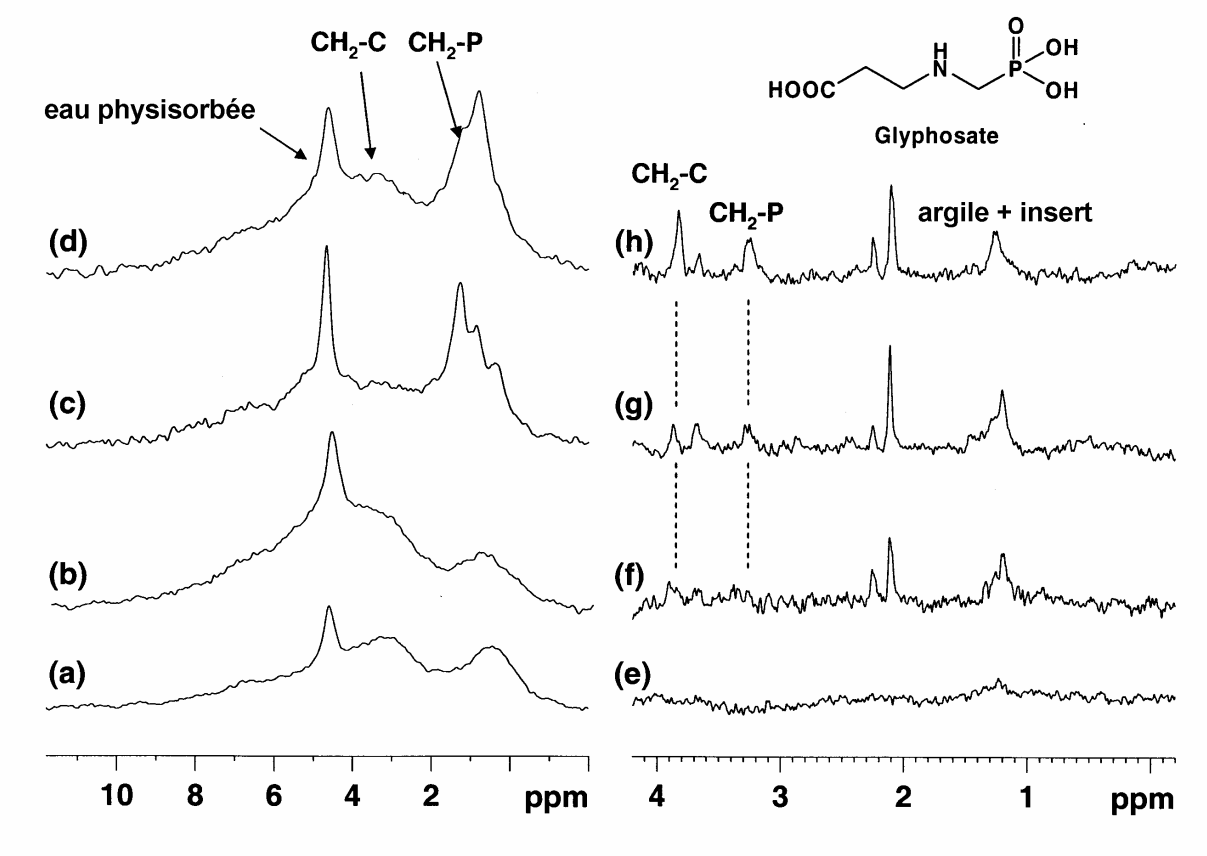


Figure 164 : Spectres ^{1}H MAS du glyphosate adsorbé sur la montmorillonite KSF pour un rapport solide/liquide de 1/200. Spectres d'écho de Hahn enregistrés sur des échantillons secs : (a) KSF pure, (b-d) après adsorption du glyphosate, (e-h) spectres HR-MAS obtenus après hydratation (200 % w/w) (fréquence de rotation : 3 kHz). Du bas vers le haut : Cs = 0,12 ; 0,16 et 0,29 mmol/g

L'avantage de la séquence d'écho de Hahn est de pouvoir obtenir des spectres de RMN ^{1}H MAS de relative haute résolution (par rapport aux expériences d'impulsion simple, dans lesquelles une seule résonance d'environ 15-20 ppm est observée en raison des fortes interactions dipolaires homonucléaires). Différentes valeurs d'écho ont été testées pour au final retenir une valeur de 1 ms. En-dessous, les signaux ne sont pas résolus et au-delà, l'intensité des signaux risque de ne plus être quantitative.

Les spectres obtenus sur les échantillons solides par la séquence d'écho de Hahn sont présentés sur les Figure 164a, b, c et d pour des valeurs de Cs de 0,12, 0,16 and 0,29 mmol g^{-1} respectivement. Pour une valeur d'écho de 1 ms, il apparaît que la composante large des spectres a fortement diminué, laissant apparaître différentes résonnances. Ces spectres sont dominés par la résonnance relativement fine de l'eau physisorbée. On retrouve ici la relation entre largeur de raie et « mobilité » moléculaire, l'eau physisorbée étant relativement mobile.

Plusieurs résonnances larges ont été attribuées à des espèces de type hydroxyde. D'autres travaux effectués au laboratoire ont permis de déterminer les signaux du glyphosate en phase solide. Le CH_2-C résonne vers 3,8 ppm et est masqué sur la Figure 164 par la présence de nombreux signaux provenant de l'argile. Le CH_2-P est observable vers 1,6 ppm. Cependant, même s'il apparaît que l'intensité des signaux du glyphosate augmente avec le Cs, la faible résolution des spectres ne permet pas une quantification précise.

Aussi, chaque échantillon a été hydraté à 200% en masse et analysé par RMN ^{1}H HR-MAS selon le même protocole que celui décrit précédemment. Les spectres correspondant sont présentés sur les Figure 164e à h. La première observation est une largeur de signaux fortement réduite par rapport aux analyses des solides. L'augmentation des degrés de liberté du glyphosate est à l'origine de ce résultat, permettant d'observer précisément les deux résonances du glyphosate à 3,24 et 3,82 ppm. La constante de couplage ^{1}H-^{31}P est toujours visible, comme dans le cas des mises en contact. Cette faible largeur de raies est compatible avec une forte mobilité du glyphosate. Contrairement aux spectres de la Figure 163, le rapport solide/liquide est constant, seul le Cs varie. Les spectres montrent clairement une augmentation de l'intensité des deux résonances du glyphosate avec le Cs. Ces résultats complètent et confortent ceux obtenus pour différents rapports solide/liquide : l'intensité des signaux observés par RMN ^{1}H HR-MAS est bien proportionnelle à la quantité de polluant en interaction avec la surface du solide, seule la fraction suffisamment mobile pouvant être observée par cette technique. Les composantes « immobiles » ne peuvent *a priori* qu'être observées par RMN sur des échantillons solides, à la condition exclusive que la résolution soit suffisante ce qui, nous l'avons vu, est difficilement envisageable sur des matrices environnementales.

II.3.3 La kaolinite

Après cette analyse de l'isotherme d'adsorption sur la montmorillonite KSF, nous avons repris notre étude comparative par les mises en contact du glyphosate et de la kaolinite. La Figure 165 présente les spectres obtenus.

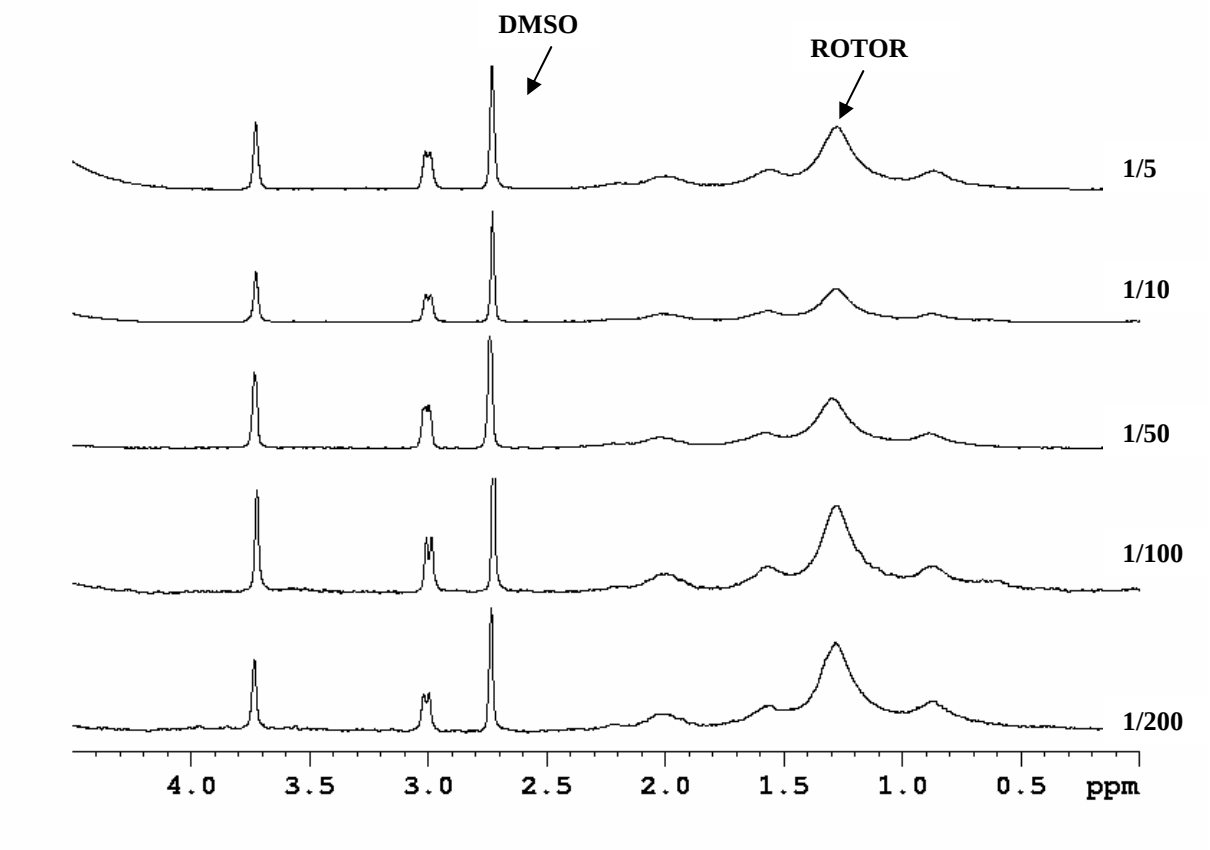


Figure 165 : Spectres ^{1}H HR-MAS de mise en contact du glyphosate avec la kaolinite dans différents rapports solide/liquide

Quel que soit le rapport solide/liquide, les signaux du glyphosate sont parfaitement observables. Le glyphosate semble mobile et donc pas ou peu adsorbé sur l'argile. Lors des essais d'adsorption en batch du glyphosate sur cette matrice, nous n'avions pas constaté d'adsorption du glyphosate.

Le Tableau 39 rassemble les taux d'adsorption du glyphosate sur cette matrice.

Tableau 39 : Taux d'adsorption du glyphosate sur la kaolinite d'après les spectres ^{1}H HR-MAS

Rapport solide liquide	Taux d'adsorption (%)
1/200	0
1/100	0
1/50	0
1/10	4,5 ± 2,4
1/5	6,4 ± 3,4

Ces résultats obtenus par RMN indiquent qu'une très faible adsorption est possible. Or, aucune adsorption n'avait été mise en évidence par la méthode batch. Il ne peut s'agir d'un problème de limite de détection différente puisque l'analyse effectuée en batch consistait à dériver le glyphosate et à le quantifier par fluorimétrie dont les limites de détection sont au minium 1000 fois plus basses que celle envisageables par RMN. A nouveau, l'explication qui peut être avancée est le phénomène de diffusion favorisé dans le rotor par la vitesse de rotation. Ceci confirme que tous les sites d'adsorption ne sont pas atteints par la méthode batch, ne donnant *a priori* qu'une vision minimale des capacités d'adsorption d'une matrice solide. Toutefois, l'erreur relative lors de la détermination du taux d'adsorption est beaucoup trop élevée pour que cette méthode puisse être utilisée de façon exclusive.

D'autre part, le pH des échantillons varie entre 7 et 8. Les déplacements chimiques du glyphosate ne devraient donc pas varier *a priori*, ce qui est le cas. Ceci suggère qu'il n'y a que de très faibles interactions (voire pas du tout !) entre le glyphosate et cette matrice.

II.3.4 Phase HDL Mg_2AlNO_3

Afin de mieux appréhender le potentiel de la RMN MAS dans ce type d'approche, nous avons ensuite opté pour des matrices modèles *a priori* plus simples : des hydroxydes doubles lamellaires (HDL), et plus particulièrement une phase Mg_2AlNO_3. Ce travail s'inscrit dans la continuité d'études commencées il y a quelques années au laboratoire sur ces matrices. Plusieurs points ont motivé notre choix pour cette argile : i) il s'agit, nous l'avons vu, d'argiles de synthèse dont la pureté peut être davantage contrôlée que celle d'argiles naturelles, même purifiées. Nous pouvions ainsi *a priori* espérer nous affranchir des problèmes de résonances parasites attribuées à des impuretés ; ii) de forte capacité d'échange anionique, cette matrice montre une très forte affinité pour le glyphosate avec des Cs proches du milli mole par gramme d'argile (cf. Tableau 34), ce qui doit faciliter l'observation par RMN d'espèces de glyphosate quel que soit le point de l'isotherme analysé.

Nous avons donc repris l'analyse d'échantillons hydratés (200 % w/w) par RMN ^{1}H HR-MAS. Ces études ont été menées parallèlement sur le glyphosate pur et sa formulation (Roundup®), les résultats étant quasiment identiques. Les spectres de RMN ^{1}H HR-MAS correspondant à deux points de l'isotherme d'adsorption du glyphosate formulé réalisé dans un rapport solide/liquide 1/200 sont présentés Figure 166.

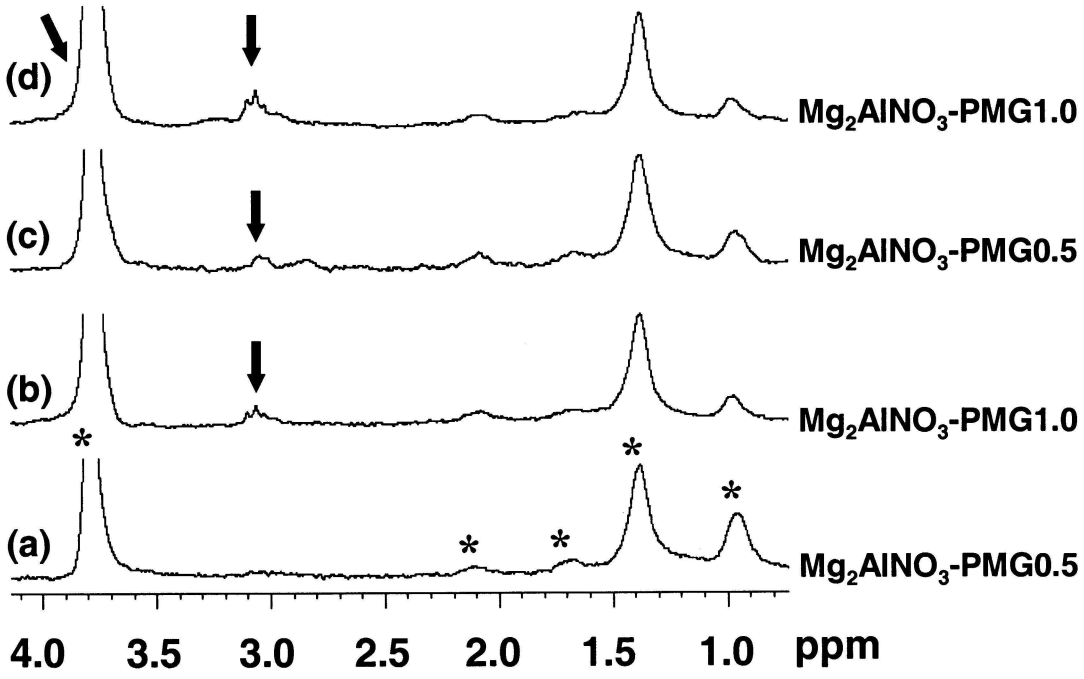


Figure 166 : Spectres de RMN ^{1}H HR-MAS d'échantillons hydratés (200 % w/w) correspondant à deux points de l'isotherme (a) Cs = 0,5 mmol/g et (b) Cs = 1,0 mmol/g. Les spectres (c) et (d) correspondent aux mêmes échantillons hydratés par une solution de glyphosate en lieu et place d'eau. La flèche indique la position des signaux du glyphosate, les astérisques les résonances de la formulation

Nous voyons clairement qu'à 0,5 mmol/g, aucune résonance du glyphosate n'est observée. Seules les résonances de la formulation sont visibles. Les isothermes montrent (Figure 156) que pour une telle valeur de Cs, la surface n'est pas saturée. Le glyphosate doit interagir fortement avec la surface, devient beaucoup moins mobile (voire immobile) et n'est donc pas observable par RMN HR-MAS pour des raisons de dynamique (échelle de temps). Pour des Cs voisins de 1 mmol/g, les isothermes montrent clairement une saturation de tous les sites d'échanges. Les différents modèles décrits dans la littérature suggèrent la formation d'édifices multicouches. Il devient alors raisonnable de penser que les espèces constituants les couches les plus éloignées de la surface interagissent moins avec celle-ci et sont donc plus mobiles, donc observables par RMN HR-MAS.

Lorsque les échantillons sont hydratés non plus par de l'eau mais par une solution de glyphosate à 100 mM et de pH 7,2, la résonance du méthylène CH_2-P apparaît pour l'échantillon de Cs = 0,5 mmol/g et augmente pour celui de Cs = 1,0 mmol/g. Ceci s'explique si l'on considère qu'une hydratation à 200 % en masse avec une solution à 100 mM sature approximativement tous les sites d'échange présents à la surface. Ainsi, sur de la Figure 166b, nous nous retrouvons pratiquement dans le cas de la Figure 166d.

Un travail réalisé par ailleurs dans l'équipe RMN Métabolique et Environnement par RMN du ^{31}P tend à confirmer ces hypothèses. Plus particulièrement, la présence d'espèces interagissant plus ou moins fortement avec la matrice (et donc plus ou moins contraintes à la surface de l'argile) suivant la valeur du Cs a été démontré.

En conclusion, la RMN ^{1}H HR-MAS permet de retrouver les mêmes comportements en terme d'adsorption, que ce soit pour le glyphosate ou la mésotrione, que ceux observés par les méthodes d'adsorption en batch et quantification par HPLC. Ceci est particulièrement vrai pour la matrice KSF et le glyphosate, où nous retrouvons les mêmes taux d'adsorption. La même conclusion peut être faite pour la montmorillonite K10. Cependant, dans le cas de la kaolinite, une adsorption très faible a été observée par RMN, alors qu'aucune adsorption n'était mesurable par la méthode en batch. Il semble que la rotation à l'angle magique force la diffusion des pesticides et leur permette d'atteindre des sites inaccessibles par les méthodes d'agitation classiquement utilisées en batch (que ce soit agitateur orbital ou agitateur magnétique). Il est à noter que la différence faible (< 15 %) ne remet aucune des approches en cause, d'autant plus que l'approche par RMN souffre d'un manque de reproductibilité. Une des raisons à ce manque de reproductibilité est la difficulté à prélever des échantillons par nature hétérogènes. De nouveaux rotors ont été mis sur le marché fin 2006. Ils nous permettraient de réaliser la mise en contact directement dans l'insert et d'introduire ce dernier dans le rotor, sans avoir de fait à prélever d'échantillon hétérogène (liquide+solide). L'autre raison (non exclusive de la précédente) pourrait provenir des interactions (adsorption, diffusion moléculaire, relaxation RMN, etc.) entre la référence et la matrice solide. Il nous a donc semblé opportun d'approfondir ces aspects de quantification et d'essayer de trouver une autre référence que l'étalon chimique interne.

III APPROCHE QUANTITATIVE DES PHENOMENES D'ADSORPTION PAR RMN MAS.

III.1 Référence interne

Note importante : cette étude comparative de différentes références internes a été effectuée de manière préalable aux expériences par RMN HR-MAS. Sa place dans ce

paragraphe est censée faciliter la comparaison avec la deuxième méthode de référence interne évaluée.

Comme évoqué précédemment, la référence interne, soluble dans l'eau, ne doit pas s'adsorber sur les matrices testées ; de plus, son empreinte ne doit pas chevaucher celle du pesticide étudié. Les signaux de cette référence doivent aussi être éloignés du signal de l'eau et de ceux du rotor de manière à éviter des erreurs d'intégration et par conséquent de quantification.

Nous avons choisi trois références dont les empreintes protons satisfont *a priori* à ces critères : l'acétone, le diméthylsulfoxide (DMSO) et le $TSPd_4$. Nous avons vérifié leur adsorption sur les montmorillonites KSF, K10 et la kaolinite. Seules ces trois matrices ont pu être testées pour la mésotrione et le glyphosate, faute de temps. Afin de vérifier l'adsorption de ces trois références sur ces solides, nous avons utilisé le même protocole que celui employé pour la réalisation d'isotherme d'adsorption. Nous avons mis en contact durant 24 h les solutions de chaque référence (10 mL à 2 mM) avec les argiles (rapports solide/liquide : 1/200 et 1/5) dans un tube de centrifugation. Le mélange est ensuite centrifugé puis les surnageants ainsi que les solutions initiales d'acétone, DMSO et $TSPd_4$ sont analysés par COT-mètre. Les concentrations initiales théoriques d'acétone, DMSO et $TSPd_4$ sont respectivement : 72,07, 48,04 et 144,13 mg/L (carbone total). Des blancs constitués de 10 mL d'eau avec chaque argile selon le rapport solide/liquide testé sont réalisés et analysés. En soustrayant la concentration en carbone organique, mesurée dans le témoin, à celle obtenue pour l'échantillon constitué de la référence à étudier avec l'argile, nous devons retrouver les concentrations théoriques. Ceci est valable uniquement si aucune adsorption de la référence n'est observée. Le Tableau 40 rassemble les taux d'adsorption calculés pour chaque référence sur chaque matrice.

Tableau 40 : Taux d'adsorption de chaque référence sur chaque argile dans les rapports solide/liquide 1/200 et 1/5

ARGILE	% adsorption acétone	% adsorption DMSO	% adsorption TSPd4
Rapport solide/liquide 1/200			
KSF	6,2	0	6,9
K10	0	0	0
Kaolinite	0,3	7	5,9
Rapport solide/liquide 1/5			
KSF	54,6	47,5	51,6
K10	22,9	16,2	28,9

Dans le rapport solide/liquide le plus faible (1/200), seul le DMSO ne s'adsorbe que sur une argile, le $TSPd_4$ s'adsorbant sur deux des trois argiles avec un taux de 6-7 %. L'acétone s'adsorbe sur la montmorillonite KSF avec un taux de 6,2 %, et le DMSO s'adsorbe sur la kaolinite avec un taux de 7 %.

Dans le rapport le plus élevé, chaque référence s'adsorbe sur les deux matrices testées. Le DMSO reste la référence permettant le plus faible taux d'adsorption.

L'acétone et le DMSO donnent des résultats proches. Toutefois nous avons choisi de travailler avec le DMSO pour des raisons pratiques, l'acétone étant difficilement manipulable en raison de sa forte tension de vapeur. Or, la référence choisie doit être fiable, car elle va nous permettre de doser la fraction non adsorbée sur l'argile.

III.2 Référence électronique : ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentration)

Cette technique a été conçue afin d'éviter l'ajout contraignant d'une référence interne. Le choix de cette référence interne est difficile, voire impossible dans l'absolu, si l'on souhaite répondre à tous les critères nécessaires pour une référence idéale. La méthode ERETIC consiste à générer électroniquement un signal radiofréquence (rf) qui peut être utilisé pour déterminer des concentrations de produits dans l'échantillon. Ce signal radiofréquence est émis soit par une antenne (bobine rf) annexe, soit par la même antenne que celle permettant l'excitation et la détection des noyaux. Dans les deux cas, le signal rf est recueilli lors de l'acquisition de la FID de l'échantillon. Ce signal de référence correspond à une pseudo-FID qui a toutes les caractéristiques d'un signal RMN classique (fréquence, amplitude, phase, T2). Ces caractéristiques peuvent être réglées et modifiées par l'opérateur sur la console électronique du spectromètre. Le canal par lequel transite le signal ERETIC est différent de celui de l'observation ; il est par conséquent important que les deux types de signaux soient « synchronisés » ou en phase du point de vue électronique, car le signal ERETIC et les signaux RMN sont simultanément détectés. Dans notre cas, lors de l'acquisition des spectres ^{1}H, le signal ERETIC est émis à la sortie du synthétiseur de fréquences vers le canal X (^{13}C) par l'intermédiaire d'un coupleur directionnel relié à l'amplificateur. Ce signal ERETIC est émis pendant toute la durée de l'acquisition. A la fin de l'acquisition, la transformation de Fourier est appliquée (à la fois sur les signaux provenant de l'échantillon et sur le signal ERETIC), le signal ERETIC donne alors naissance à un pic

supplémentaire sur le spectre. Cette technique a plusieurs avantages par rapport à une quantification par référence interne :

- Pas d'adsorption de la référence sur le solide introduit dans l'échantillon.
- Pas de chevauchement de signaux car nous choisissons librement la fréquence à laquelle nous souhaitons que le signal ERETIC apparaisse sur le spectre. Nous choisissons également l'amplitude de ce signal (ce qui équivaut à choisir la concentration de la référence interne).
- Pas de problème de solubilité de la référence dans le milieu.
- Pas de problème de temps de relaxation de la référence qui, dans le cas d'une référence interne, doit être proche voire inférieur à celui du composé à doser pour permettre la quantification.

Avant d'utiliser cette méthode il faut calibrer le signal ERETIC de manière à définir la « concentration » de cette référence. Pour cela il faut réaliser des spectres de standards pour résoudre l'équation suivante :

$$[\text{ERETIC}] = [\text{REF}] \times (A_{\text{ERETIC}} / A_{\text{REF}})$$

- [ERETIC] est la "concentration du signal ERETIC"
- [REF] est la concentration de l'échantillon standard analysé
- A_{ERETIC} est la surface du signal ERETIC
- A_{REF} est la surface du pic du standard

Après avoir réalisé cette calibration, la concentration de n'importe quel composé est obtenue par cette seconde équation :

$$[\text{Comp}] = k \times [\text{ERETIC}] \times (A_{\text{Comp}} / A_{\text{ERETIC}})$$

- [Comp] est la concentration du composé à déterminer
- k est le nombre de proton du signal RMN étudié
- A_{Comp} est la surface du signal RMN étudié

Le groupe de Serge Akoka à Nantes, concepteur d'ERETIC (Akoka *et al.*, 1999), a évalué cette méthode en RMN ^{1}H du liquide par rapport à l'utilisation d'une référence interne. Ils ont constaté que la différence entre la concentration réelle d'un produit et celle trouvée par la méthode ERETIC est plus faible que celle trouvée par l'emploi d'une référence interne. De plus, ils ont démontré que cette technique est stable et qu'elle ne nécessite une calibration qu'une fois par mois. Cette méthode peut aussi être employée en RMN du solide avec une précision de l'ordre de 1 % (Ziarelli et Caldarelli, 2006). Toutefois, de nombreuses précautions doivent être prises en phase solide avec ce système, telles qu'une calibration rigoureuse des impulsions radiofréquences utilisées et, dans une moindre mesure, la température des échantillons (les propriétés de certains hétéronoyaux sont très sensibles à des variations de température). La méthode ERETIC est également employée dans les expériences 2D homo et hétéronucléaires en phase liquide (Michel et Akoka, 2004). Cette méthode peut être appliquée sur des échantillons biologiques qui ne permettent pas toujours l'introduction d'une référence interne.

Nous souhaitons quantifier la fraction de pesticide non adsorbée par la technique ^{1}H HR-MAS. Avant d'évaluer le potentiel d'ERETIC pour l'HR-MAS, nous avons souhaité valider cette approche (non commerciale) sur les mêmes sondes de mesure que celles utilisées par le groupe d'Akoka (sondes pour la RMN en phase liquide). Nous avons réalisé ces essais avec différentes solutions de glyphosate (1 – 4,5 mM) et de mésotrione (1 – 4 mM) et nous avons comparé nos résultats avec la méthode classique par introduction d'une référence interne ($TSPd_4$ à 5 mM). La concentration équivalente pour le signal ERETIC a été calculée par rapport à la plus forte concentration de chaque solution de pesticide.

Pour le glyphosate, nous avons raisonné arbitrairement sur le signal à 3,73 ppm. Nous avons trouvé une valeur de concentration pour le signal ERETIC de 3,13 mM. Les pourcentages indiqués dans le Tableau 41 résument les taux d'erreur moyens obtenus avec chaque méthode et la même séquence (impulsion simple précédée d'une présaturation pour éliminer le signal de l'eau) pour les concentrations mesurées en glyphosate par rapport à la valeur réelle.

Tableau 41 : Pourcentage et écart type pour les concentrations en glyphosate mésurées par les deux méthodes

Valeurs réelles	**% erreur par rapport à la valeur réelle**		**Concentrations mesurées ± écart type (mM)**	
	$TSPd_4$	*ERETIC*	*$TSPd_4$*	*ERETIC*
4,59 mM	11,30	0,01	5,12 ± 0,06	4,59 ± 0,17
3,68 mM	13,90	1,22	4,21± 0,28	3,72 ± 0,15
2,30 mM	10,33	2,22	2,53 ± 0,10	2,35 ± 0,01
1,15 mM	17,02	- 2,57	1,34 ± 0,04	1,12 ± 0,01

L'écart type comme le pourcentage d'erreur par rapport à la valeur 'vraie' sont beaucoup plus faibles en utilisant la référence électronique. La méthode ERETIC apparaît comme fidèle mais surtout plus juste que la méthode par référence chimique. Ceci confirme les résultats de Akoka *et al.* (1999).

Nous avons réalisé les mêmes essais avec la mésotrione en raisonnant sur le signal à 8,7 ppm. Nous avons trouvé une valeur pour la « concentration du signal ERETIC » de 7,48 mM. Le Tableau 42 rassemble les résultats obtenus.

Tableau 42 : Pourcentage et écart type pour les concentrations en mésotrione mésurées par les deux méthodes

Valeurs réelles	**% erreur par rapport à la valeur réelle**		**Concentrations mesurées ± écart type (mM)**	
	$TSPd_4$	*ERETIC*	*$TSPd_4$*	*ERETIC*
4,05 mM	-5,12	1,66	3,84 ± 0,06	4,12 ± 0,04
3,24 mM	5,18	2,38	3,41 ± 0,08	3,32 ± 0,08
2,03mM	- 4,82	1,13	1,93 ± 0,08	2,05 ± 0,09
1,01 mM	-4,86	3,28	0,96 ± 0,01	1,04 ± 0,05

Une fois encore, nous pouvons constater que la méthode ERETIC est plus juste que la méthode classique par introduction d'une référence interne. Les pourcentages d'erreur comme l'écart type sont beaucoup plus faibles en employant cette référence électronique.

En résumé, la méthode ERETIC apparaît comme une méthode quasi idéale pour quantifier des métabolites par RMN en phase liquide.

Nous l'avons ensuite appliqué aux échantillons analysés par RMN ^{1}H HR-MAS. 10 µL des échantillons précédents ont été prélevés puis introduits dans un rotor. Aucun solide n'est présent, l'objectif étant uniquement de valider la méthode avec notre sonde HR-MAS. La vitesse du rotor est fixée à 5 kHz. La séquence utilisée est toujours une impulsion simple précédée d'une présaturation, le signal ERETIC étant appliqué durant toute la durée de l'acquisition. Toutefois, il ne nous a pas été possible de synchroniser la séquence avec la vitesse du rotor pour des raisons d'électronique. La même séquence a été utilisée avec les contrôles utilisant une référence interne ($TSPd_4$ à 5 mM).

Remarque : le Tableau 43 présente les résultats obtenus sur une référence interne à l'aide d'une séquence synchronisée.

Tableau 43 : Pourcentage et écart type pour les concentrations en glyphosate mésurées par la présence d'une référence interne avec une séquence synchronisée avec la vitesse du rotor en RMN HR-MAS

Valeurs réelles	**% erreur par rapport à la valeur réelle**	**Concentrations mesurées ± écart type (mM)**
4,59 mM	-10,92	4,09 ± 0,17
3,68 mM	-4,05	3,53 ± 0,43
2,30 mM	-23,22	1,76 ± 0,22
1,15 mM	-3,83	1,10 ± 0,06

Comme dans le cas précédent, nous avons raisonné à partir du signal à 3,73 ppm. La valeur de la « concentration du signal ERETIC » est de 9,44 mM. Le Tableau 44 rassemble les résultats obtenus.

Tableau 44 : Pourcentage et écart type pour les concentrations en glyphosate mésurées par les deux méthodes en RMN HR-MAS

Valeurs réelles	**% erreur par rapport à la valeur réelle**		**Concentrations mesurées ± écart type (mM)**	
	$TSPd_4$	*ERETIC*	*$TSPd_4$*	*ERETIC*
4,59 mM	-18,45	1,13	3,75 ± 0,34	4,65 ± 0,71
3,68 mM	-14,03	-16,98	3,16 ± 0,27	3,05 ± 0,17
2,30 mM	-15,20	-15,80	1,95 ± 0,20	1,93 ± 0,25
1,15 mM	-22,37	22,15	0,89 ± 0,41	1,40 ± 0,02

De manière générale, les résultats sont beaucoup moins bons qu'avec l'autre sonde, quelle que soit la référence utilisée. Les concentrations mesurées sont très éloignées des valeurs réelles. La référence électronique dans ce cas n'est pas plus précise que la référence interne. Nous pouvons remarquer que les concentrations mesurées sont toujours plus faibles que les concentrations réelles. Ceci pourrait s'expliquer par des fuites du liquide qui s'échapperait de la cavité. Cette ambigüité devrait pouvoir être levée par l'utilisation de nouveaux rotors plus adaptés.

Remarque : les concentrations mesurées sont plus précises lors de l'acquisition de spectres avec une séquence synchronisée avec la vitesse du rotor (Tableau 43).

Toutefois, il est important de noter qu'il existe une différence majeure entre les deux sondes testées. La sonde liquide dispose de deux bobines rf physiquement distinctes, une dédiée aux signaux des protons « réels », l'autre au signal ERETIC. La sonde HR-MAS, quant à elle, ne dispose que d'une seule bobine rf, par laquelle transitent simultanément les signaux du canal proton et ceux du canal ^{13}C, dédié dans notre étude à ERETIC. Or, le signal ERETIC dépend de façon très importante de l'accord du circuit électronique, donc de chaque échantillon. Avec la sonde liquide, seul l'accord de la bobine ^{1}H est ajusté à chaque échantillon, il n'y a donc pas (ou très peu) de perturbations au niveau de l'autre bobine dédiée à ERETIC. Avec la sonde HR-MAS, l'accord du circuit, effectué sur chaque échantillon, perturbe de façon inévitable le signal ERETIC. Ceci pourrait en partie expliquer les résultats.

Nous n'avons pas eu le temps de reproduire cette expérience avec les solutions de mésotrione.

En conclusion, la référence électronique constitue un choix quasi idéal pour les mesures réalisées par RMN du liquide, avec une sonde équipée de deux bobines rf distinctes. Pour la RMN (et la sonde) HR-MAS, la quantification est beaucoup plus problématique. Tout d'abord, les fuites éventuelles au niveau des inserts du rotor peuvent entrainer une modification du signal ERETIC. En contre partie, la présence de la référence électronique peut constituer un moyen idéal de déceler des fuites dans le rotor. Mais surtout, la présence d'une bobine rf unique pour l'émission des champs rf destinés à exciter l'échantillon et celui du signal ERETIC, entraine une erreur importante dans la calibration du signal ERETIC à chaque accord de sonde, donc à chaque échantillon. Une solution, en apparence simple, consisterait à inverser le coupleur directionnel et à introduire le signal ERETIC directement au niveau du préamplificateur, dans le sens de retour du signal RMN. Le signal de RMN (FID) et le signal ERETIC seraient donc couplés, sans que le signal ERETIC n'ait transité par la sonde (donc par les bobines rf).

Faute de temps, nous n'avons malheureusement pas eu le temps de valider cette approche. Tant que ces différents problèmes ne sont pas réglés, il ne semble pas opportun de tester la méthode ERETIC en présence des matrices solides. Mais, si le nouveau montage s'avère opérationnel et fiable, l'approche ERETIC pourrait être d'une aide précieuse pour appréhender les mécanismes d'adsorption par RMN.

PARTIE III

Biodégradation de la mésotrione en présence de matrices solides

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE D'ARGILES CATIONIQUES

La décomposition par voie biologique d'un polluant organique dans un sol est fonction de trois facteurs :

- la quantité et la diversité de microorganismes présents dans le sol.
- l'activité microbienne indigène, qui est fortement liée aux caractéristiques du sol : le taux d'humidité, la teneur en matière organique et fraction argileuse, la température, le pH, le potentiel rédox, l'aération, la teneur en nutriments. Tous ces paramètres vont moduler l'activité microbienne.
- la biodisponibilité du polluant. La biodégradation d'un polluant organique dans les sols est couramment associée à sa biodisponibilité, et donc à son adsorption sur les sols. Cependant, quelques études ont mis en évidence une biodégradation du polluant adsorbé (Park *et al.*, 2003 ; Huesemann *et al.*, 2004). D'autre part, l'adsorption de certains métabolites pourrait également entraîner des phénomènes de régulation de l'activité microbienne ou des modulations de vitesse de biodégradation de la molécule parent.

L'existence de micro et macroporosité dans les sols, qui sont rarement homogènes, va également pouvoir moduler l'effet de chacun des trois facteurs, en créant par exemple, des niches riches en microorganismes ou au contraire des zones complètement inaccessibles.

Afin d'essayer de répondre à la question « la biodisponibilité limite t-elle la biodégradation ? », nous avons comparé des cinétiques de biodégradation obtenues en présence et en absence de matrices solides. Le caractère homogène des matrices solides étudiées permet de plus *a priori* de s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité rencontrés dans les sols. Compte tenu des problèmes analytiques observés avec le glyphosate lors des études de biodégradation par les souches fongiques en « simple » milieu aqueux, nous avons réalisé nos études uniquement avec la mésotrione. Le sol naturel étudié est riche en fraction argileuse (37 %), contenant principalement des montmorillonites, ainsi que des traces de kaolinite. Par conséquent, les argiles choisies dans cette étude ont été la kaolinite et les deux

montmorillonites qui avaient montré une adsorption vis-à-vis de la mésotrione : la KSF et la K10.

Les expériences ont été réalisées en deux étapes, afin d'essayer de bien dissocier les deux processus d'adsorption et de biodégradation. La première étape consiste en la mise en contact de la matrice solide et d'une solution de mésotrione pendant 24 heures. Elle correspond à l'étape d'adsorption du pesticide sur la matrice (notée phase de pré-incubation). La deuxième étape correspond à l'addition de la suspension bactérienne dans le milieu et donc véritablement, à l'éventuelle biodégradation de la mésotrione (phase d'incubation).

Les cinétiques de disparition de la mésotrione ont été suivies, ainsi que celles des différents métabolites, et ceci d'un point de vue qualitatif et quantitatif, afin d'obtenir une image globale du devenir de la mésotrione.

I CINETIQUES DE BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE DE KAOLINITE

Deux rapports solide/liquide ont été testés pour ces essais : 1/10 et 1/3, de manière à se rapprocher le plus possible des conditions environnementales. Par contre, la technique RMN du ^{1}H apparaissant comme un outil analytique très informatif, notamment pour le suivi des métabolites, nous avons travaillé avec une solution de mésotrione à une concentration de 1 mM.

La première matrice solide testée a été la kaolinite. En effet, aucune adsorption de la mésotrione n'a été observée sur cette argile lors de la cinétique d'adsorption. La mésotrione devrait donc être biodisponible et être dégradée de la même façon que dans les conditions de biodégradation standard. D'autre part, le pH des surnageants mesuré lors des essais d'adsorption est voisin de 7 – 7,5. Ces valeurs de pH sont optimales pour une bonne activité microbienne de la souche *Bacillus* sp. 3B6.

Nous avons suivi le pH des échantillons, prélevés du milieu d'incubation, au cours des cinétiques de biodégradation de la mésotrione, en présence et en absence de kaolinite, ainsi que ceux des témoins cellules dans les mêmes conditions (Figure 167).

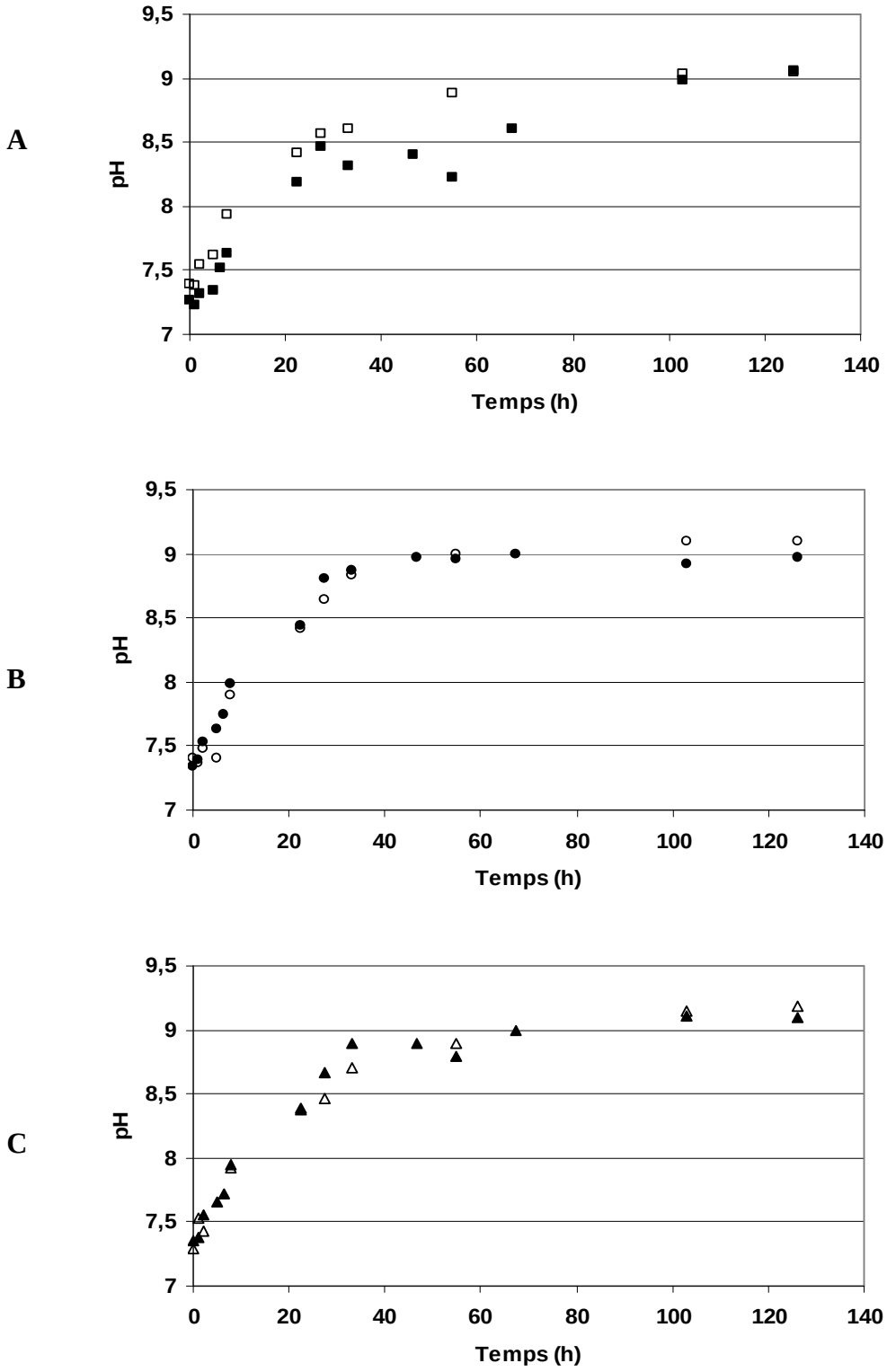


Figure 167 : Suivi du pH des échantillons des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 : A) en absence de kaolinite (■) et le témoin cellules (□) ; B) en présence de kaolinite dans le rapport 1/10 (●) et le témoin cellules (○), C) en présence de kaolinite dans le rapport 1/3 (▲) et le témoin cellules (△)

Le pH des échantillons, réalisés en présence de kaolinite, devient basique un peu plus rapidement que celui des échantillons en absence d'argile. Il est voisin de 9 après 31 h

d'incubation, alors qu'en l'absence d'argile, ce pH n'est atteint qu'après 100 h d'incubation. Cependant, les pH dans tous les cas sont très voisins.

Nous avons ensuite comparé les cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence et en absence de kaolinite (Figure 168).

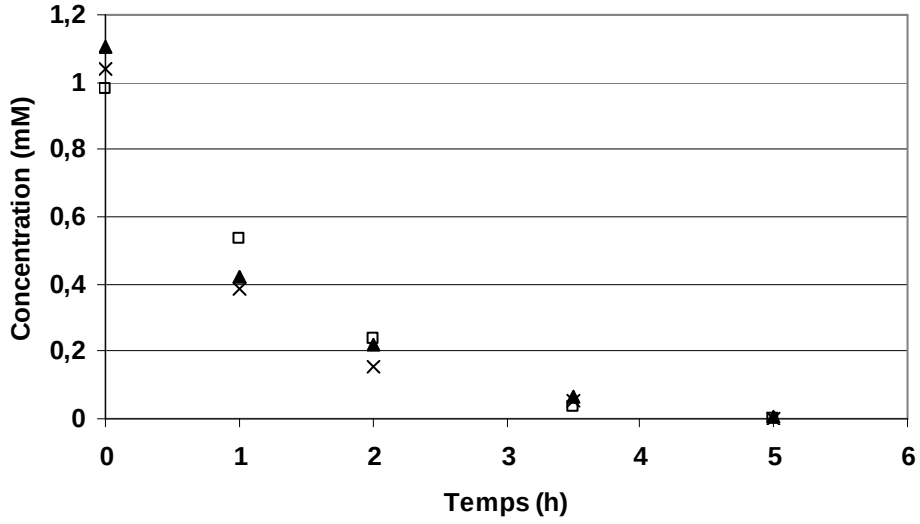


Figure 168 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en absence de kaolinite (□) et en présence de kaolinite dans les rapports solide/liquide 1/10 (x) et 1/3 (▲)

La concentration initiale de mésotrione observée (environ 1 mM) est bien en accord avec une absence complète d'adsorption. Le suivi de la concentration en mésotrione pendant les 24 h de la phase de pré-incubation ne montre aucun changement. Quelle que soit l'expérience, la mésotrione disparaît après 5 h d'incubation. La présence de kaolinite ne modifie pas significativement la cinétique de biodégradation de la mésotrione. Les cinétiques de disparition de la mésotrione peuvent être considérées comme étant d'ordre 1 (exponentielle). Le calcul de la constante de vitesse de disparition de la mésotrione montre un léger ralentissement, d'autant plus important que la quantité d'argile dans le milieu est important ($k = 0,90\ h^{-1}$ $r = 0,9807$; $k_{kaolinite\ (1/10)} = 0,86\ h^{-1}$ $r = 0,9955$; $k_{kaolinite\ (1/3)} = 0,78\ h^{-1}$ $r = 0,9957$).

Cependant, les différences sont minimes. La faible influence de la kaolinite sur la mésotrione était attendue, puisque aucune adsorption n'a été observée sur cette argile : l'herbicide est donc biodisponible.

En parallèle, nous avons observé l'apparition de signaux, absents des témoins cellules, à la fois sur les chromatogrammes HPLC et sur les spectres de RMN ^{1}H. Nous avons tout d'abord comparé la cinétique de biodégradation de la mésotrione dans les conditions standard avec celle obtenue en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide 1/10 (Figure 169).

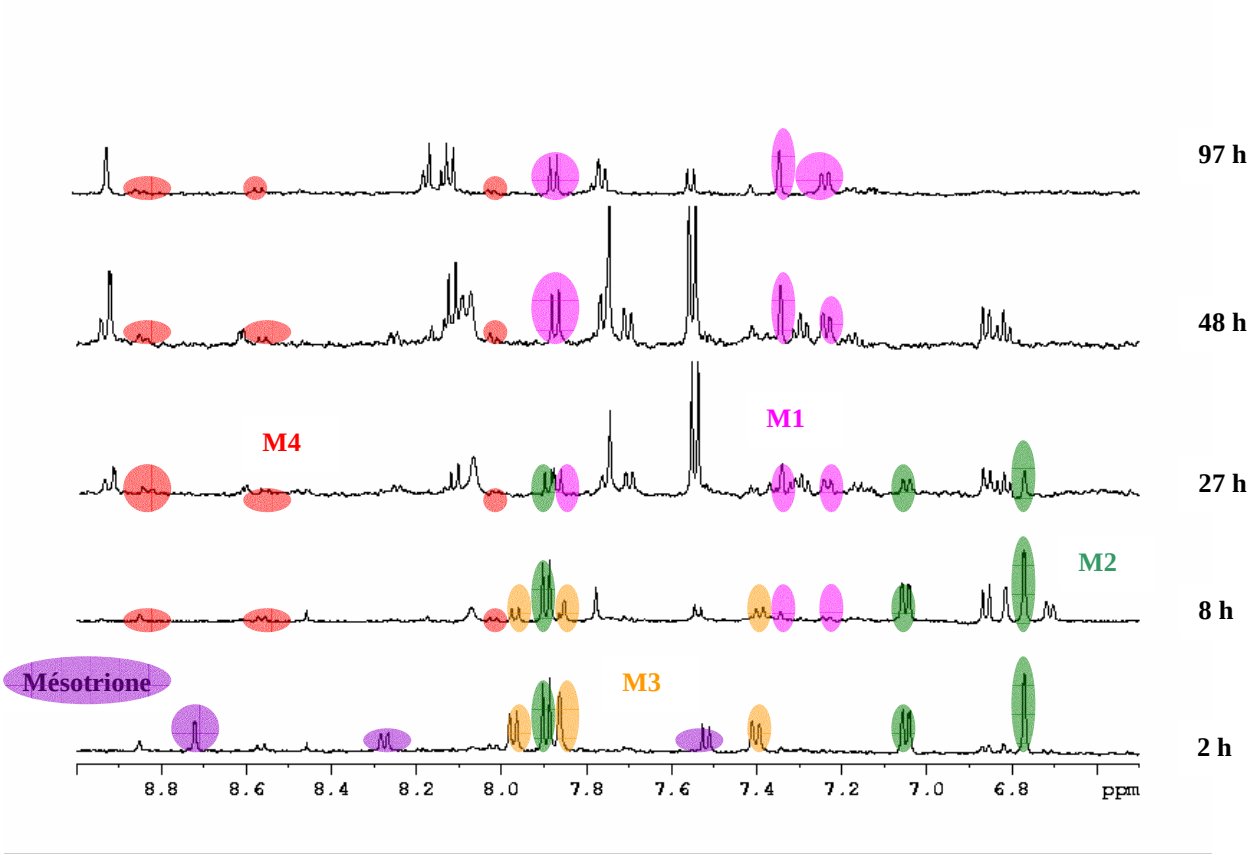


Figure 169 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide 1/10

Les métabolites formés sont les mêmes que ceux observés et identifiés dans les cinétiques précédentes de biodégradation dans les conditions standard. M2 et M3 apparaissent dès le début de la cinétique et disparaissent après 33 et 27 h d'incubation. M1 et M4 apparaissent après quelques heures d'incubation et s'accumulent dans le milieu. La cinétique de biodégradation de la mésotrione en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide 1/3 est également présentée (Figure 170).

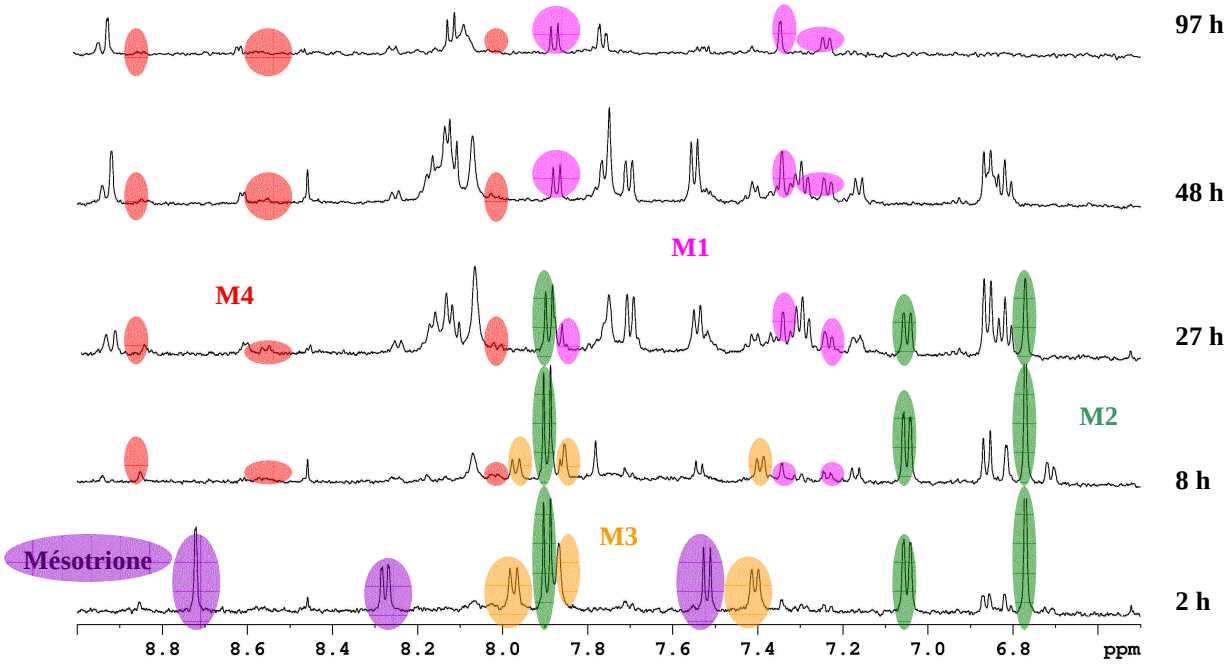
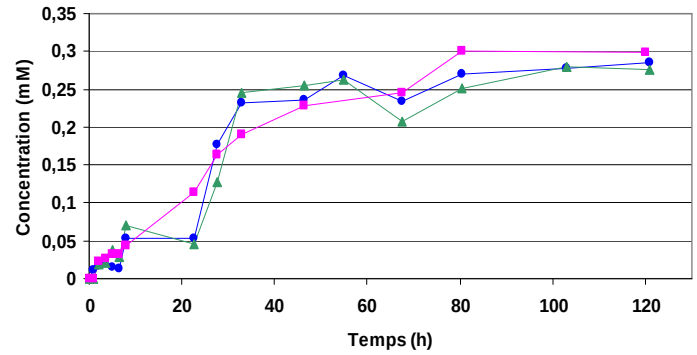
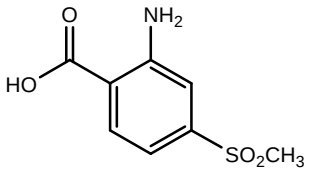


Figure 170 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide 1/3

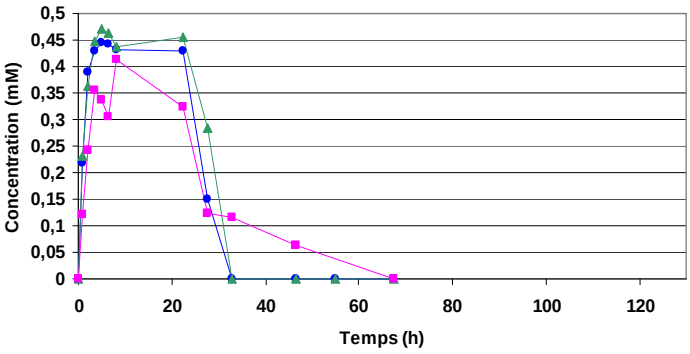
Les cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide 1/3 et 1/10 donnent des résultats très similaires. Les métabolites M2 et M3 apparaissent et disparaissent aux mêmes temps d'incubation ; de même les métabolites M1 et M4 sont présents dans les surnageants aux mêmes temps d'incubation et s'accumulent dans le milieu.

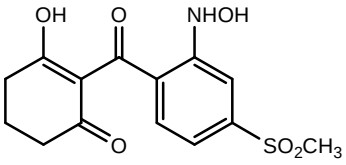
L'évolution de la concentration de chaque métabolite a également été suivie et comparée de manière quantitative au cours du temps en absence et en présence de kaolinite (Figure 171).



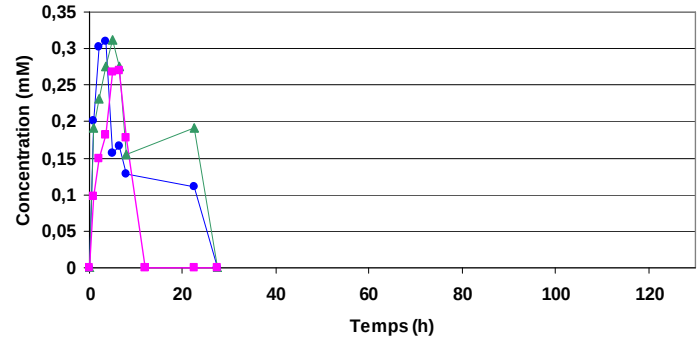


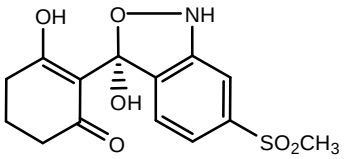
M1 (AMBA)



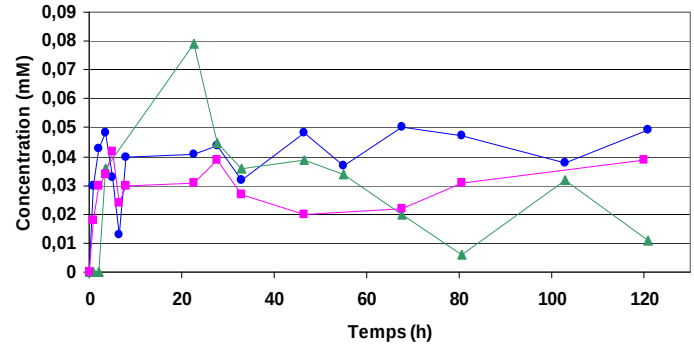


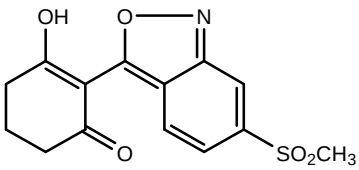
M2





M3





M4

Figure 171 : Suivi quantitatif des métabolites M1, M2, M3 et M4 au cours des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 sans kaolinite (■), en présence de kaolinite dans le rapport solide/liquide1/10 (●) et 1/3 (▲)

Les métabolites M2 et M3 se forment dès le début de la cinétique en présence comme en absence de kaolinite, et sont majoritaires. La voie principale de dégradation de la

mésotrione, correspondant à la réduction du groupement nitro en fonction hydroxylamine, semble donc conservée. Les concentrations maximales obtenues sont identiques quelle que soit l'expérience : 40 % de la mésotrione sont transformés en M2 et 30 % en M3. Une différence est toutefois à noter : une concentration plus élevée en M2 et M3 est observée en début de cinétique (jusqu'à 5 h d'incubation pour M3 et 22 h pour M2) lorsque l'incubation a lieu en présence de kaolinite. Quelles que soient les conditions, M3 est dégradé plus rapidement que M2 du fait de sa plus grande instabilité. La présence d'argile va accélérer la disparition de M2 et au contraire, stabiliser M3.

La transformation de M3 en M4 n'est pas significativement modifiée par la présence d'argile. M4 est toujours minoritairement formé et ne représente que 4 % de la transformation de la mésotrione. Comme précédemment, la concentration du métabolite M1 (AMBA) est triplée dans le milieu d'incubation à la disparition du métabolite M3. En présence d'argile, la concentration de M1 augmente après 27 h, temps qui correspond à la disparition de M3, contre une quinzaine d'heures dans les conditions standard. M3, en se dégradant, se transforme donc en M1, en présence comme en absence de kaolinite. La concentration maximale de M1 dans toutes les expériences est identique, indiquant que 30 % de la mésotrione est dégradée en M1.

La cinétique de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 ne semble donc pas fortement modifiée par la présence de kaolinite. Il ne semble pas non plus y avoir de modifications majeures des voies métaboliques empruntées, notamment de la voie majoritaire conduisant à M2 et M3, métabolites dégradés ensuite en M1 et M4. Seul l'équilibre de M2 et M3 semble légèrement modifié avec une disparition plus rapide de M2 (31 h contre 68 h sans argile) et plus lente de M3 (27 h contre une quinzaine d'heures sans argile). L'hypothèse d'une possible adsorption transitoire des métabolites sur l'argile, empêchant leur dégradation abiotique, semble peu probable, car il n'y a pas de raison qu'elle ait lieu uniquement en fin de cinétique, et les concentrations optimales observées sont du même ordre de grandeur en présence ou en absence d'argile. La présence d'ions libérés par l'argile dans le milieu, déplaçant l'équilibre M2 – M3, ou le pH du milieu légèrement plus basique pourraient expliquer ces légères différences.

II BIODEGRADATION EN PRESENCE DE MONTMORILLONITES

II.1 La montmorillonite K10

Les cinétiques d'adsorption de la mésotrione sur la montmorillonite K10 nous ont montré une adsorption de 99,5 % pour un rapport solide/liquide 1/3, l'équilibre étant atteint immédiatement. Nous avons réalisé des cinétiques de biodégradation de la mésotrione (1 mM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de K10 avec les mêmes rapports solide/liquide que précédemment. Il est rappelé que le pH des surnageants mesuré lors des isothermes d'adsorption variait de 3,5 à 3,9 selon le rapport solide/liquide testé, conditions relativement acides pour la souche bactérienne. La Figure 172 présente le suivi du pH des différents échantillons réalisés lors de la biodégradation de la mésotrione en présence d'argile K10.

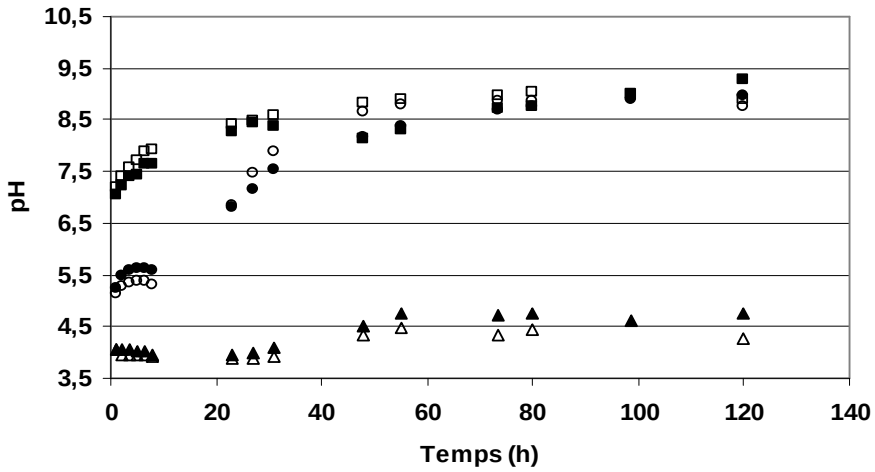


Figure 172 : Suivi du pH des échantillons des cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en absence d'argile (■) et le témoin cellules (□), en présence de K10 dans le rapport 1/10 (●) et le témoin cellules (○), en présence de K10 dans le rapport 1/3 (▲) et le témoin cellules (△)

Lors de la phase de pré-incubation (mésotrione + argile K10), le pH du milieu est acide (3,45 – 3,9). Après addition de la suspension bactérienne, le pH augmente légèrement pour les échantillons contenant l'argile K10 dans le rapport solide/liquide 1/3 après 48 h d'incubation, et atteint un pH de 4,5. Par contre, dans le cas du rapport 1/10, le pH des échantillons augmente fortement après une période de latence d'une dizaine d'heures, pour atteindre, en fin de cinétique, une valeur de pH égale à celle obtenue sans argile (pH = 9). Les cellules sont donc capables dans une certaine mesure, de réguler le pH du milieu d'incubation. Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux observés lors de l'étude de l'influence du

pH sur la biodégradation. Les deux tampons testés (phoshate et borate) ne permettaient pas de compenser l'effet tampon des la suspension cellulaire, comme c'est ici le cas en présence d'argile.

Nous avons ensuite comparé les cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence et en absence d'argile K10 (Figure 173). Cette comparaison n'a pu être réalisée qu'à partir des résultats HPLC, car les analyses par RMN ^{1}H ne sont pas suffisamment sensibles dans le cas d'une forte adsorption de la mésotrione (rapport solide/liquide 1/3).

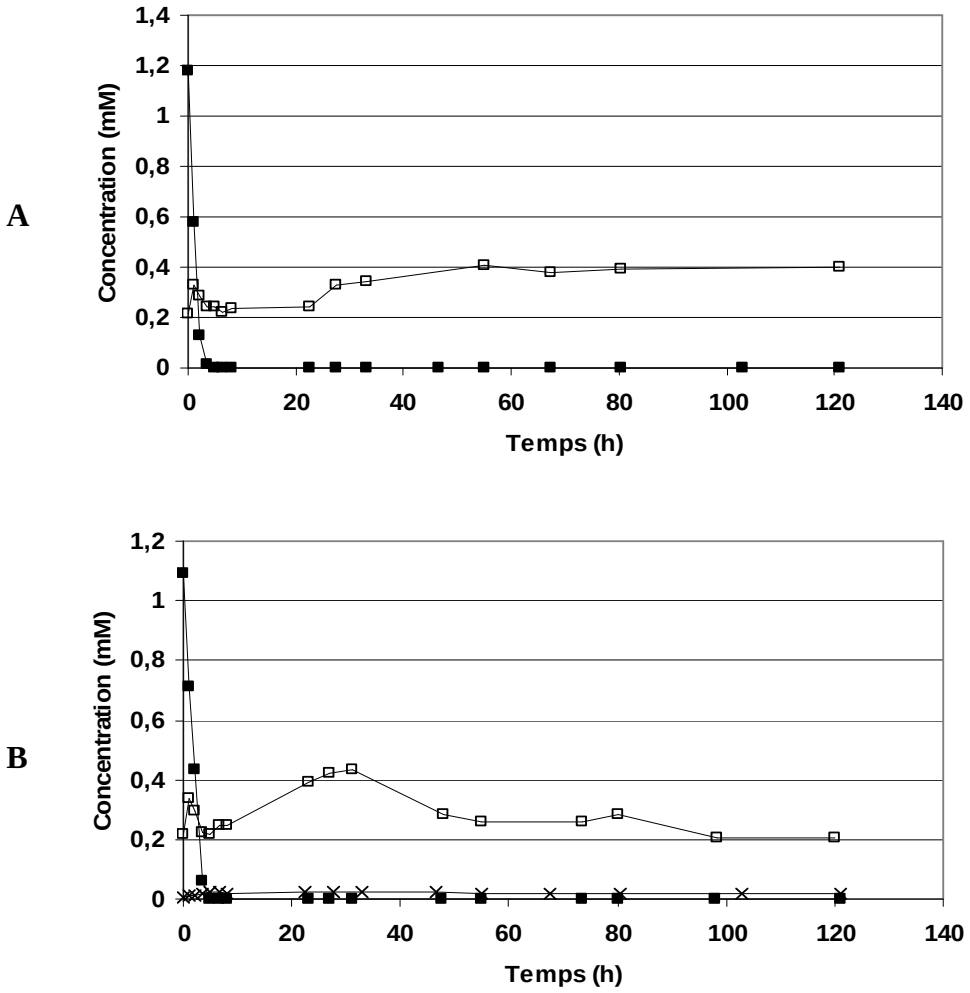


Figure 173 : A) Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en absence de K10 (■), en présence de K10 dans le rapport 1/10 (□) par RMN ^{1}H ; B) Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en absence de K10 (■), en présence de K10 dans le rapport 1/10 (□) et 1/3 (x) par HPLC

Pendant la phase de pré-incubation, une forte adsorption de la mésotrione est observée sur l'argile K10 : 80 % de la mésotrione initiale est adsorbée dans le cas du rapport

solide/liquide 1/10 et 99,5 % dans le cas du rapport 1/3. Ces valeurs sont en accord avec celles enregistrées lors des cinétiques d'adsorption.

L'étape d'incubation montre que la mésotrione n'est pas totalement transformée en présence d'argile K10, même après 120 h d'incubation. Il reste environ 30 % de mésotrione dans le milieu d'incubation contenant l'argile avec un rapport solide/liquide 1/10 et 1,5 % dans le cas du rapport 1/3. La Figure 174 présente un agrandissement de la cinétique obtenue en présence de l'argile K10 dans le rapport solide/liquide 1/3.

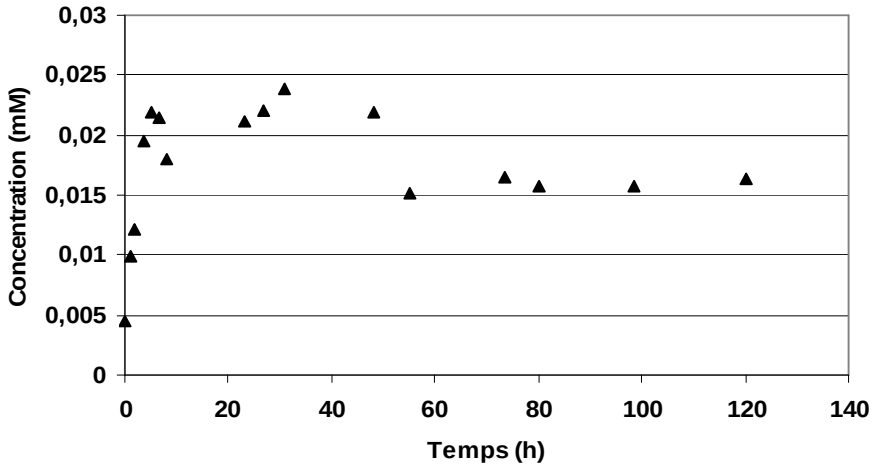


Figure 174 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de K10 dans le rapport 1/3 (▲)

Quelle que soit la teneur en argile dans le milieu, une augmentation de la concentration en mésotrione est observée immédiatement après l'ajout de la suspension bactérienne, augmentation qui se poursuit pendant les premières 48 h, et qui ne peut que correspondre à une désorption. Cette désorption peut être liée à une augmentation de pH dans le milieu, puisque nous avons montré que l'adsorption diminue lorsque le pH augmente. Cependant, le pH n'augmente significativement que pour des temps plus longs (Figure 172). Plusieurs hypothèses peuvent être émises : (i) soit les cellules vont relarguer plus ou moins rapidement des métabolites intrinsèques, qui vont entrer en compétition avec la mésotrione sur les sites d'adsorption et vont donc entraîner la désorption de l'herbicide ; (ii) soit les échanges ioniques créés par les cellules pour essayer de rétablir leur pH vont changer la force ionique du milieu et donc modifier les interactions mésotrione-argile ; (iii) soit la biodégradation a effectivement lieu. L'élimination du milieu de la mésotrione va entraîner un déplacement de l'équilibre mésotrione en solution - mésotrione adsorbée, entraînant une désorption progressive. Ses différentes hypothèses ne sont pas exclusives et pourraient

expliquer les différentes variations observées. En tout cas, les cellules jouent bien un rôle, direct ou indirect, sur le relarguage de la mésotrione, puisque sans cellules, l'équilibre d'adsorption est atteint immédiatement et qu'il n'y a pas de désorption observée, même après cinq jours de contact entre l'argile K10 et la mésotrione.

Après les premières 48 h, la concentration de mésotrione semble décroître avant de se stabiliser. Une dégradation semble donc bien avoir lieu. Le plateau observé en fin de cinétique, qui correspond à une concentration supérieure ou égale à la concentration initiale, pourrait correspondre soit à un « épuisement » des cellules, soit au fait que la vitesse de dégradation est alors égale à la vitesse de désorption.

Nous avons ensuite cherché à suivre les éventuels métabolites formés en présence de cette argile, afin de savoir si véritablement une biodégradation de la mésotrione avait lieu. Seule la cinétique réalisée en présence d'argile K10 dans le rapport 1/10 a pu être suivie par RMN ^{1}H (Figure 175).

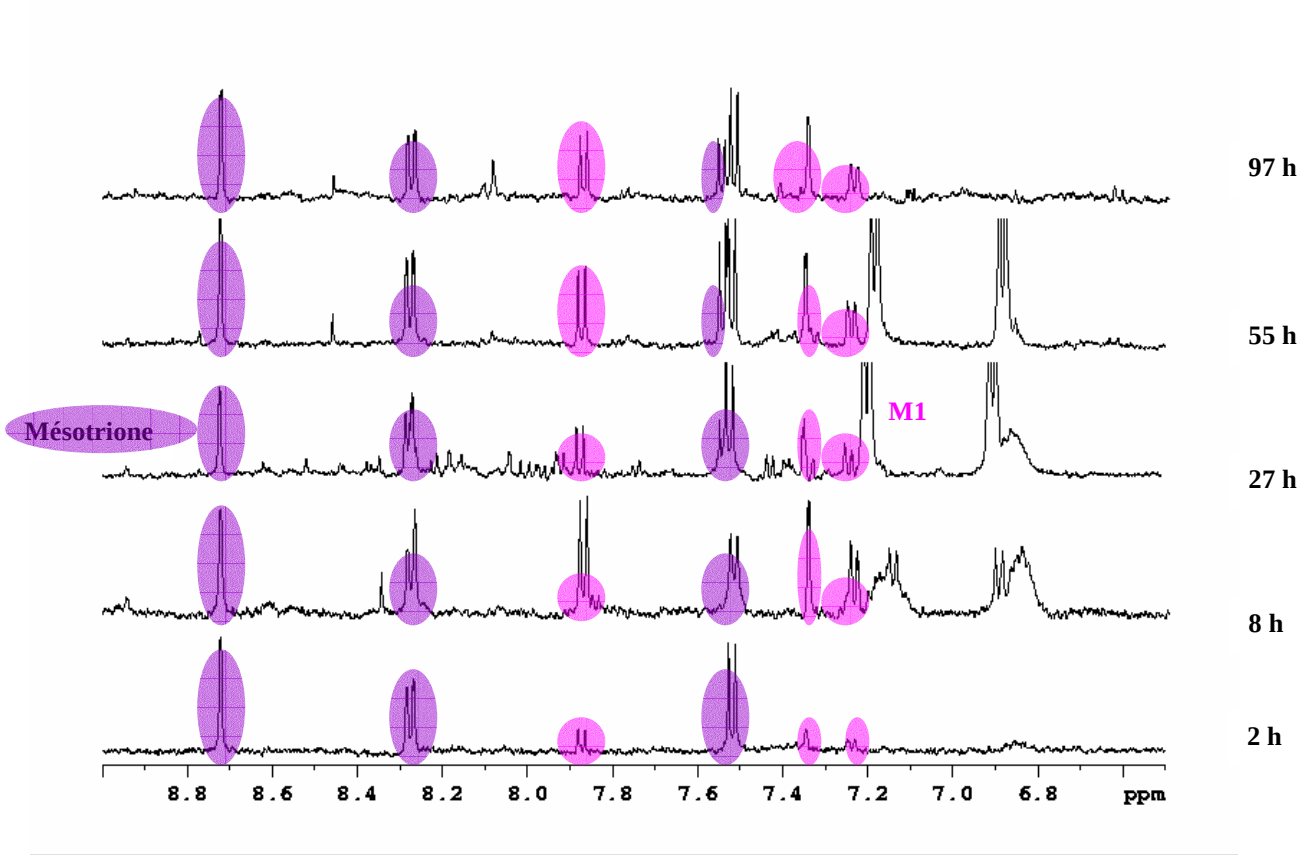


Figure 175 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de K10 dans le rapport solide/liquide 1/10

Contrairement aux conditions standard, sur cette cinétique, seul le métabolite M1 (AMBA) est visible. Il apparaît dès le début de la cinétique et s'accumule dans le milieu d'incubation. Il faut noter qu'en présence d'argile, sa vitesse de formation est fortement accélérée dans les 10 premières heures d'incubation, et que sa concentration reste plus élevée pendant les 30 premières heures par rapport à une incubation sans argile. En fin de cinétique, M1 atteint une concentration maximale de 0,27 mM en présence d'argile K10, la concentration maximale de ce composé lors des cinétiques de biodégradation de la mésotrione sans argile étant de 0,30 mM (Figure 176). Les concentrations maximales obtenues sont donc très proches, alors que la mésotrione n'est pas totalement transformée (20 % restante) en présence d'argile.

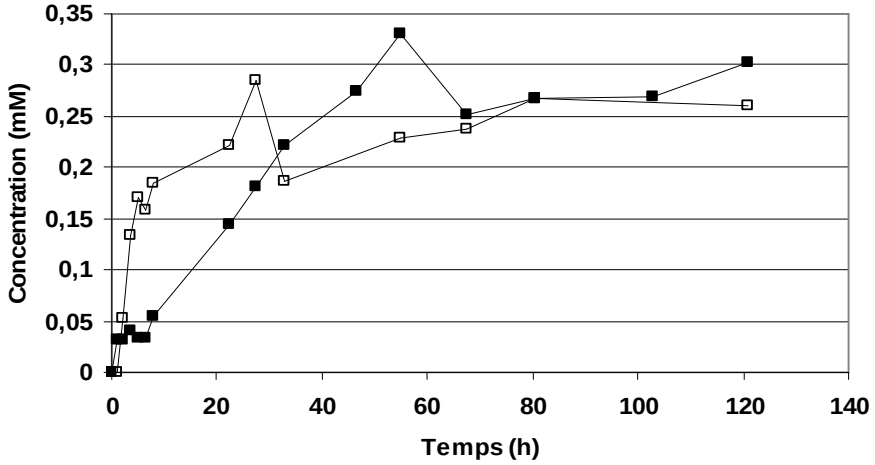
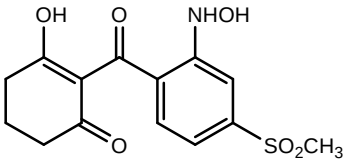


Figure 176 : Suivi par RMN ^{1}H de la concentration du AMBA (M1) produit lors des cinétiques de biodégradation de la mésotrione sans argile (■) et en présence d'argile K10 dans le rapport solide/liquide 1/10 (□)

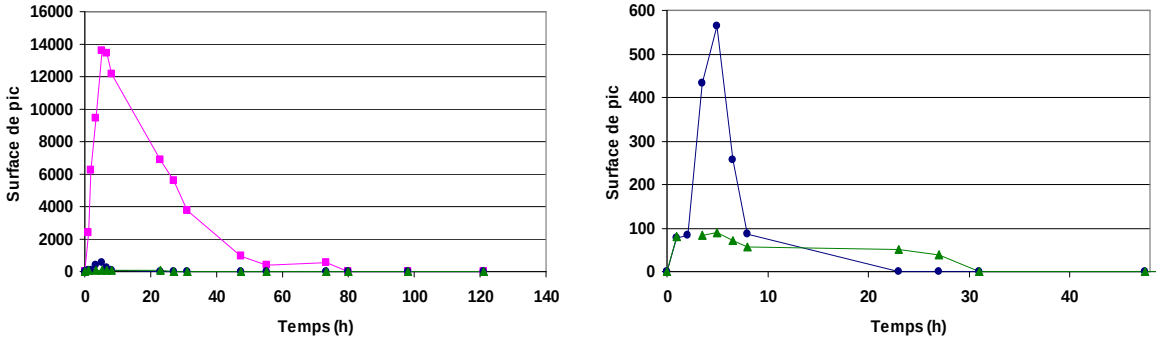
Nous pouvons donc envisager soit que les métabolites M2 et M3 ont été formés et transformés en AMBA très rapidement ; soit que la voie de dégradation majoritaire correspond à une dégradation *via* le MNBA en AMBA. Les résultats obtenus par HPLC pour cette expérience concordent avec ceux de RMN.

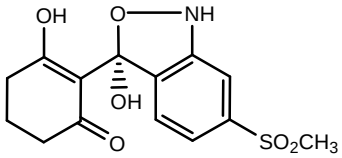
Nous avons donc suivi cette cinétique, ainsi que celle réalisée avec le rapport solide/liquide 1/3 par HPLC. Les métabolites M2 et M3 sont présents mais en très faibles concentrations (estimées à environ 5 µM), permettant d'expliquer l'absence des signaux de M2 et M3 sur les spectres de RMN ^{1}H du fait du manque de sensibilité de cette technique. Nous avons suivi l'évolution de l'aire des pics correspondant à ces produits au cours des différentes cinétiques (Figure 177). M1 est également observé dans les deux cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence de K10, mais pour le rapport solide/liquide 1/3, sa concentration est tellement faible qu'il a été observé uniquement avec le détecteur à fluorescence.



M2

A **B**





M3

A **B**

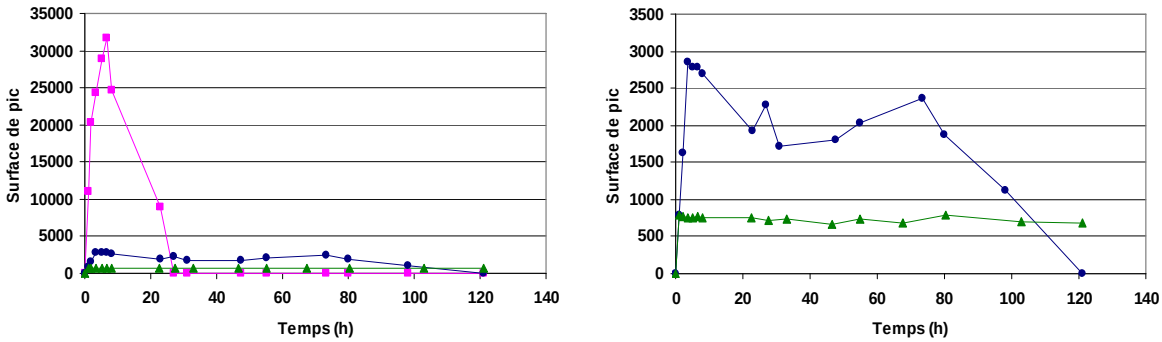


Figure 177 : A) Suivi quantitatif des métabolites M2 et M3 au cours des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 sans K10 (■), en présence de K10 dans le rapport 1/10 (●) et 1/3 (▲) ; B) Agrandissement de la figure A pour le suivi des métabolites M2 et M3 en présence de K10 dans le rapport 1/10 (●) et 1/3 (▲)

Sur ces cinétiques contrôlées par HPLC, nous avons pu observer la formation des métabolites M1, M2 et M3. Les métabolites M2 et M3 sont présents dès le début de la cinétique, M2 disparaît après 9 et 31 h d'incubation pour les rapports solide/liquide 1/10 et

1/3, respectivement. M3 s'accumule dans le milieu d'incubation pour le rapport 1/3 et disparaît après 120 h d'incubation pour le rapport 1/10. Les concentrations de ces métabolites sont bien plus faibles, et ont été estimées, par comparaison des aires HPLC observées dans les conditions standard avec les concentrations obtenues par RMN, à 20 µM (1/10) et 3 µM (1/3) pour M2 et 25 µM (1/10) et 7 µM (1/3) pour M3 en présence d'argile K10. M2 disparaît beaucoup plus vite alors que M3 reste présent plus longtemps dans le milieu. Toutefois, la concentration maximale de M1, atteinte au bout de 120 h d'incubation, est la même en absence ou en présence d'argile, et la vitesse initiale de formation de M1 est beaucoup plus importante en présence d'argile.

Il semble donc que la vitesse initiale de biotransformation de la mésotrione soit beaucoup plus rapide en présence d'argile K10 (rapport solide/liquide 1/10). Une première hypothèse pourrait être la mise en place, dans ces conditions, d'une voie majoritaire de dégradation directe mésotrione – AMBA sans passer par les métabolites M2 et M3. Cependant, ceux-ci sont bien formés. Cette accélération pourrait être alors due soit à une transformation beaucoup plus rapide de M2 et M3, soit à une adsorption de ces deux métabolites, qui seraient relargués petit à petit dans le milieu. M4 n'est pas observé par HPLC.

Pour le rapport 1/3, la concentration maximale de M1 dans le milieu est extrêmement faible puisqu'il n'a été détecté que par fluorescence ce qui suggère que la mésotrione resterait préférentiellement adsorbée et ne serait que très faiblement dégradée (environ 0,01 mM de dégradation observée sur la Figure 174). L'activité de la bactérie doit être fortement inhibée par le pH du milieu, très acide.

Pour confirmer toutes ces hypothèses, des extractions de la matrice solide devraient être réalisées, au moins en fin de cinétique, pour essayer de contrôler sa teneur en mésotrione et AMBA, les autres métabolites n'étant pas suffisamment stables pour résister à un tel protocole. Il serait également possible d'envisager, afin de suivre point par point les concentrations de mésotrione et d'AMBA, d'utiliser un système miniaturisé de biodégradation dans des piluliers, chaque pilulier étant sacrifié à un temps d'incubation donné.

II.2 La montmorillonite KSF

Les cinétiques d'adsorption ont montré que la mésotrione a une très grande affinité pour la montmorillonite KSF : 97,5 % d'adsorption sont obtenus en quelques minutes pour un rapport solide/liquide de 1/3. Cependant, le pH des surnageants varie avec cette argile entre 1,5 et 1,7 selon le rapport solide/liquide testé. Ce pH est très acide. Nous avons cependant testé la biodégradation de la mésotrione (0,9 mM) en présence de cette matrice avec les deux rapports solide/liquide 1/10 et 1/3. Le pH des échantillons prélevés au cours de la cinétique de biodégradation de la mésotrione a été suivi (Figure 178).

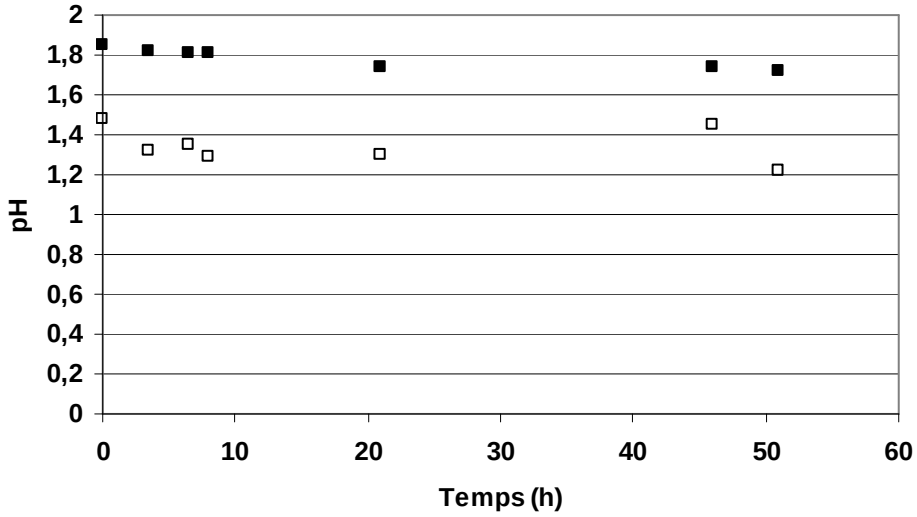


Figure 178 : Suivi du pH au cours de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 0,9 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de la montmorillonite KSF dans les rapports solide/liquide 1/10 (■) et 1/3 (□)

La suspension obtenue lors de la phase de pré-incubation (mésotrione + argile KSF) est très acide (pH 1,5-1,8). L'addition de la suspension bactérienne n'a provoqué aucun changement de pH du milieu d'incubation, qui est proche de 1,3 pour le rapport 1/3 et de 1,8 pour le rapport 1/10. Dans ces conditions, les cellules sont incapables de réguler le pH. Aucune cinétique témoin de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en milieu aqueux n'a été réalisée dans ces mêmes conditions acides.

Les résultats de la biodégradation de la mésotrione en présence de montmorillonite KSF sont présentés sur la Figure 179.

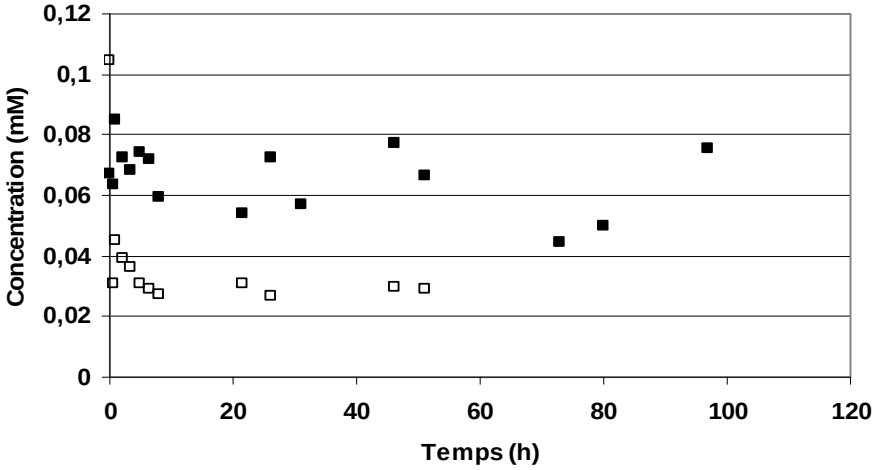


Figure 179 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 0,9 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de KSF dans les rapports solide/liquide 1/10 (■) et 1/3 (□)

La concentration initiale observée, très faible, est en accord avec le pourcentage d'adsorption attendu. Après la phase de pré-incubation, il ne reste en solution que 7 % et 5 % de mésotrione pour un rapport solide/liquide de 1/10 et 1/3 respectivement. Au cours de la phase d'incubation, la concentration de mésotrione reste relativement stable au cours du temps. L'activité bactérienne semble complètement inhibée à ce pH. Ces cinétiques n'ont pas pu être analysées par RMN ^{1}H vu les faibles concentrations de mésotrione. Les analyses HPLC montrent un seul pic d'intensité très faible correspondant au AMBA (M1). Cette observation pourrait signifier qu'une faible activité microbienne est possible dans ces conditions extrêmes. Cependant, il est également possible qu'il s'agisse d'une dégradation chimique partielle de la mésotrione. Des spectres RMN du ^{1}H de la mésotrione, réalisés à ce pH, ont montré sa stabilité dans de telles conditions. Cependant, un possible effet catalytique de l'argile acide pourrait exister. Ce paramètre devra être vérifié.

BIODEGRADATION DE LA MESOTRIONE EN PRESENCE DU SOL NATUREL

Nous avons réalisé le même type d'expériences avec les deux horizons (0-5 cm et 10-20 cm) du sol testé. Chaque fraction correspondant à un horizon du sol a été séchée à l'air, tamisée à 1 mm et utilisée comme les argiles précédentes. Ces deux sols n'ont pas été autoclavés, mais l'incubation avec une suspension très dense en cellules de *Bacillus* sp. 3B6 et un temps d'incubation relativement court (5 jours) ne devraient pas permettre une activité des microorganismes autochtones. Pour s'en assurer, des témoins ont été réalisés en incubant uniquement le sol et la mésotrione.

Ces deux horizons de sol n'ont montré aucune adsorption de la mésotrione. Lors des essais d'adsorption, le pH des surnageants était voisin de 7,1-7,6. Cette gamme de pH devrait permettre une biodégradation optimale de la mésotrione. Des cinétiques de biodégradation de la mésotrione en présence de sol des deux horizons ont donc été réalisées uniquement dans le rapport 1/10. La Figure 180 présente le suivi du pH des échantillons au cours des cinétiques.

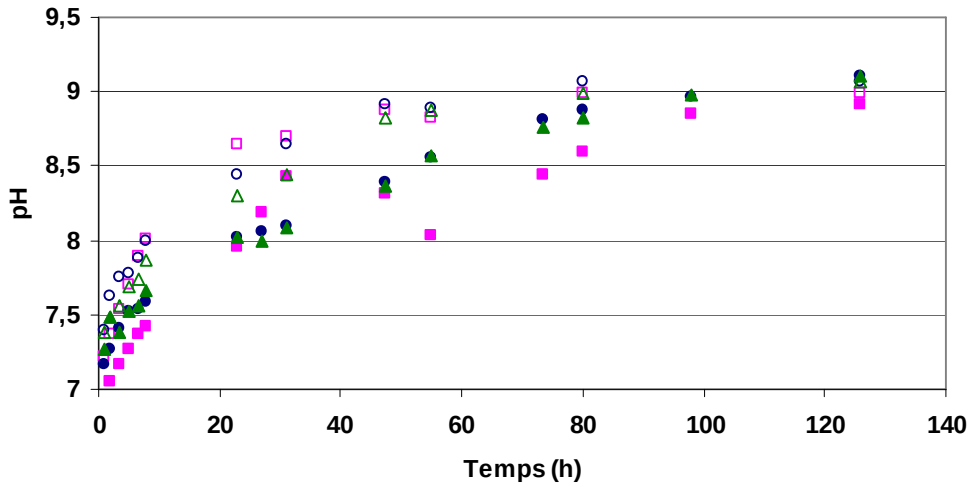


Figure 180 : Suivi du pH des échantillons des cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (■) et témoin cellules correspondant (□) en absence de sol, en présence de sol pour l'horizon 0-5 cm (●) et le témoin cellules (○), en présence de sol pour l'horizon 10-20 cm (▲) et le témoin cellules (△)

Quelles que soient les conditions d'incubation, nous pouvons remarquer que le pH augmente de manière relativement similaire en présence comme en absence de sol pour atteindre une valeur limite de 9. Il n'y a pas de différence notable entre les deux horizons.

Les cinétiques de biodégradation de la mésotrione, en présence et en absence sol, ont été comparées (Figure 181).

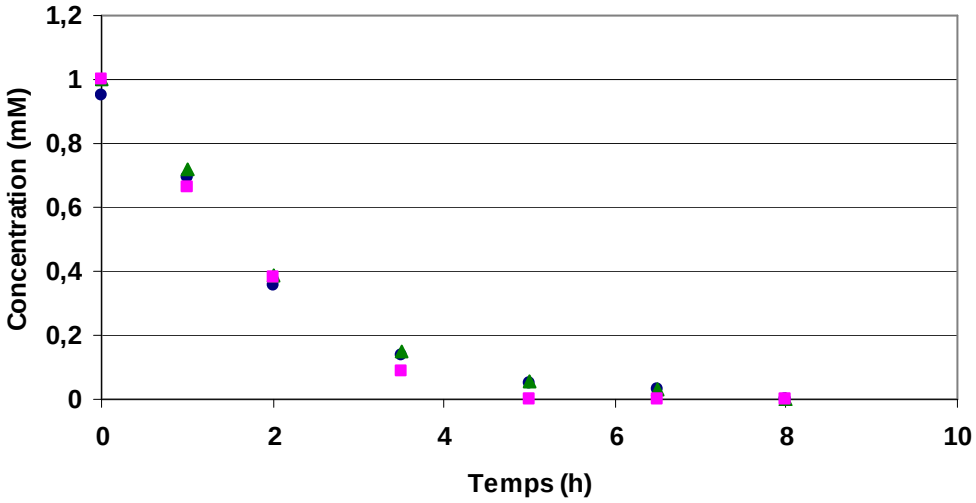


Figure 181 : Cinétiques de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en absence de sol (■), en présence de sol (horizon 0-5 cm) (●) et (horizon 10-20 cm) (▲)

Aucune différence significative dans la cinétique de dégradation de la mésotrione n'est observée en présence de ces deux horizons de sol. Le calcul des constantes de vitesse, en admettant une cinétique d'ordre 1, montre un très léger ralentissement de la biodégradation en présence de sol (k_{sol} = 0,59 h^{-1} r = 0,9918 ; $k_{sans\ sol}$ = 0,70 h^{-1} r = 0,9584).

Les métabolites formés ont également été suivis pour mettre en évidence d'éventuelles modifications qualitatives ou quantitatives. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux horizons de sol choisis. Leur composition, très proche, ne permet pas d'observer de différence. Nous présentons donc ici plus en détails uniquement les cinétiques obtenues lors de l'incubation de la mésotrione en présence de l'horizon 0-5 cm (Figure 182).

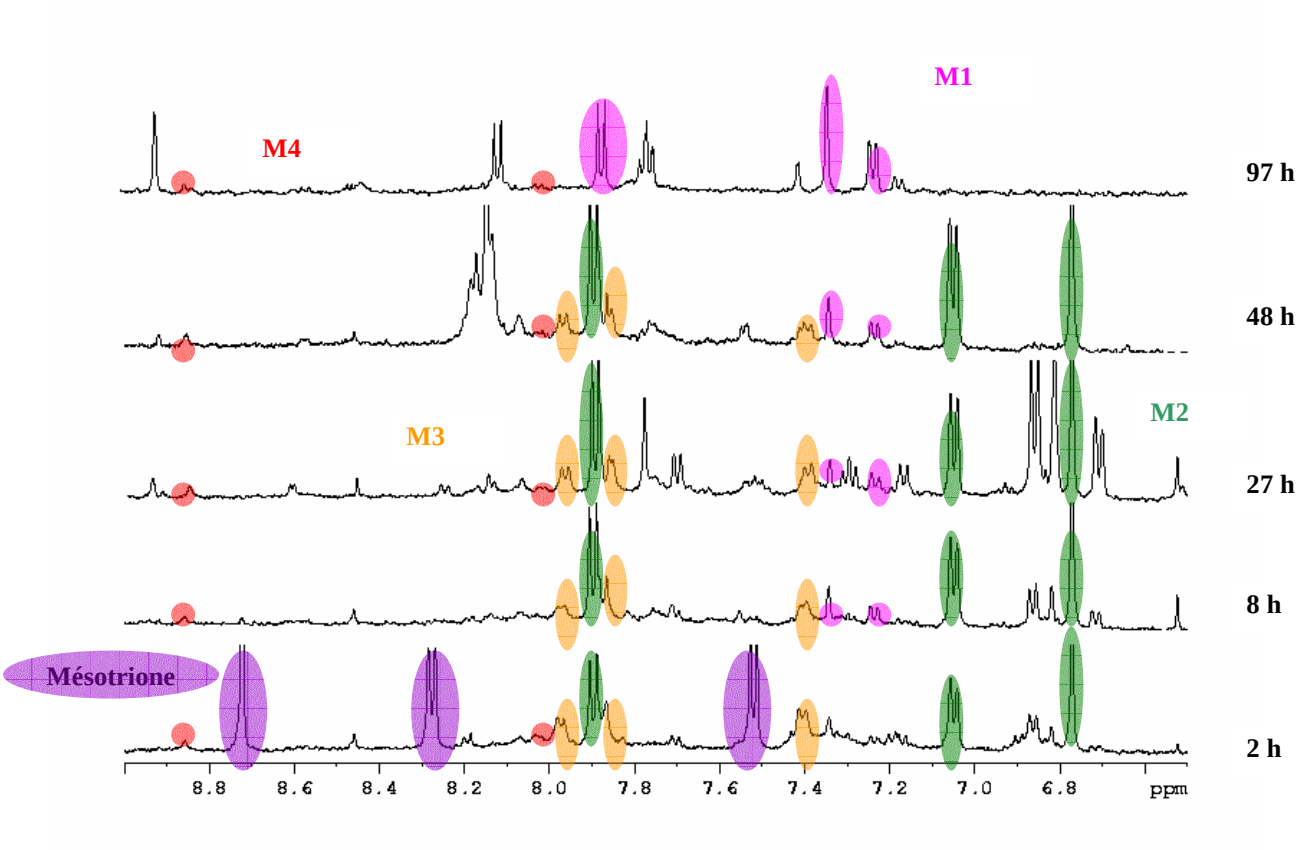
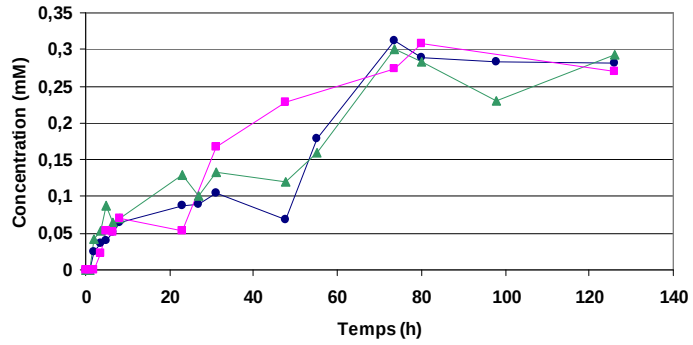
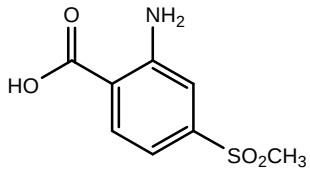


Figure 182 : Cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de l'horizon 0-5 cm du sol.

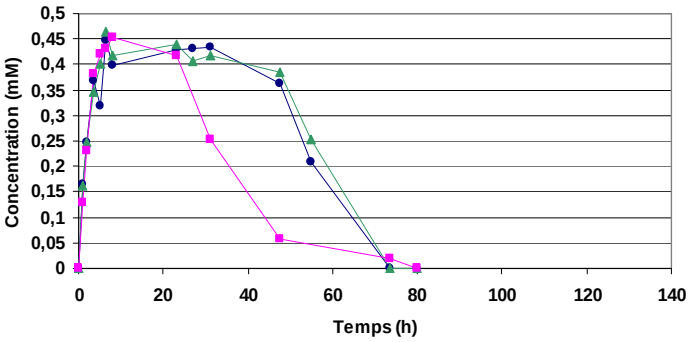
La mésotrione disparaît après 8 h d'incubation. En parallèle, M2 et M3 sont formés dès le début de la cinétique, puis disparaissent après 73 et 55 h d'incubation respectivement. M1 est présent dès le premier prélèvement et s'accumule dans le milieu d'incubation. M4, quant à lui, apparaît aussi dès le début de la cinétique mais reste en quantité très faible, et s'accumule dans le milieu.

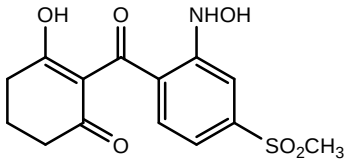
Nous avons suivi la concentration de chaque métabolite au cours du temps pour les différentes cinétiques (Figure 183).



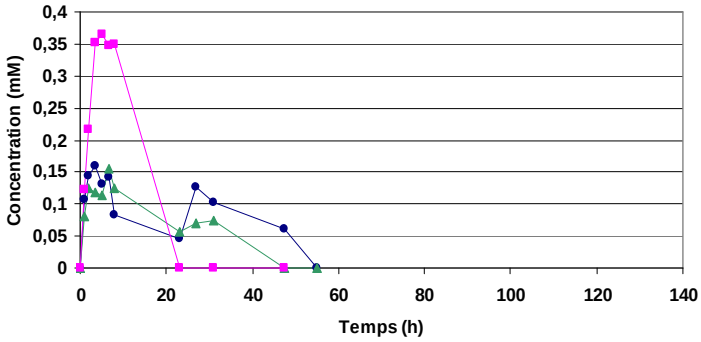


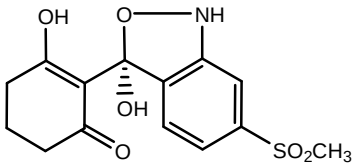
M1 (AMBA)



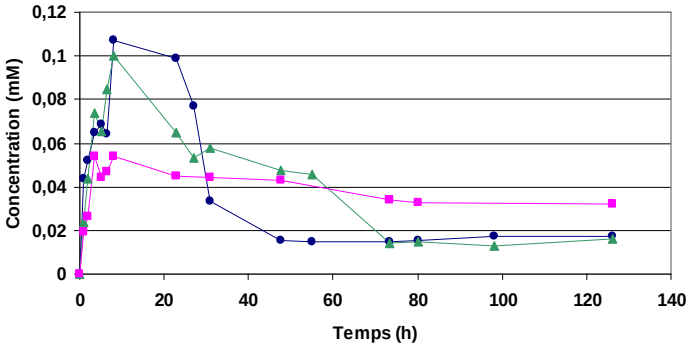


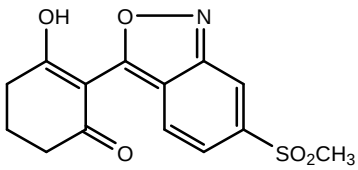
M2





M3





M4

Figure 183 : Suivi quantitatif des métabolites M1, M2, M3 et M4 au cours des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 sans sol (■), en présence de sol dans l'horizon 0-5 cm (●) et l'horizon 10-20 cm (▲)

Quelles que soient les conditions d'incubation, la concentration maximale de M1 (AMBA) observée est la même. 30 % de la mésotrione est transformée en AMBA. Cette

concentration augmente fortement à la disparition de M3, soit après 22 h d'incubation en absence de sol, et 55 h en présence de sol. Le métabolite M2 est présent plus longtemps dans le milieu d'incubation à sa concentration maximale, et le métabolite M3, stable lui aussi plus longtemps, est présent en très faible concentration en présence de sol.

Le métabolite M3 est en concentrations plus faible dans le milieu en présence de sol sans modification de la concentration maximale en métabolite M2. Leur transformation en M1 (AMBA) ne semble pas pouvoir expliquer cette diminution, puisque la concentration de M1 reste faible jusqu'à la disparition totale de M3. Par contre, la concentration maximale de M4 est doublée en présence de sol (0,11 mM au lieu de 0,055 mM dans les conditions standard) : cette voie semble donc privilégiée. Cependant, cette transformation n'explique pas totalement la différence de concentration du métabolite M3 entre les différents essais. Deux hypothèses peuvent être envisagées : (i) l'équilibre M2-M3 est déplacé, dans ces conditions, en faveur de M2, et M2 est rapidement transformé en M5 (métabolite non suivi du fait de problème analytique); (ii) le métabolite M3 s'adsorbe partiellement sur le sol. Cette dernière hypothèse peut être étayée par le fait que l'augmentation de concentration du métabolite M1 augmente fortement (environ 0,2 mM) à la disparition de M3, qui n'est présent, dans le milieu, qu'à environ 0,1 mM. Il semblerait donc que le métabolite M3 ait été formé en quantité plus importante que celle visible dans le milieu. Nous pouvons également remarquer que la concentration de M4 diminue plus rapidement et plus fortement en présence de sol, montrant une activation de sa dégradation. D'autre part, au contact de la surface du sol, l'oxygénation pourrait être moindre et expliquer ainsi la plus grande stabilité des métabolites M2 et M3 dans le milieu (cf. essais précédents en anaérobie).

En résumé, nous avons pu constater que lorsque la mésotrione est fortement adsorbée, elle n'est pas totalement transformée après 5 jours d'incubation, au pH imposé par la présence du solide. Celui-ci n'est cependant pas toujours compatible avec une activité biologique optimale. En tout cas, lorsqu'il y a biodégradation, les voies métaboliques ne semblent pas modifiées. En présence de matrices n'ayant aucune interaction avec cet herbicide, aucun changement significatif dans la cinétique de biodégradation de la mésotrione n'a été observé. Biodisponible, elle est biodégradée. Des modulations sont, par contre, constatées sur les vitesses d'apparition et de disparition des différents métabolites, ainsi que sur leur concentration relative. Les équilibres chimiques (M2-M3), ainsi que les mécanismes biologiques, peuvent être perturbés en fonction du pH ou des composés relargués par les

matrices. D'autre part, des interactions entre les métabolites et la matrice semblent pouvoir exister.

Pour confirmer ces hypothèses, des expériences complémentaires seraient nécessaires comme des extractions de la matrice solide au cours des cinétiques de biodégradation de la mésotrione pour connaître son contenu et mettre en évidence l'existence de possibles résidus liés, ainsi que des essais d'adsorption des métabolites sur les différentes matrices testées. Ces expériences nécessiteraient la synthèse préalable des métabolites M2 et M3, en travaillant dans des conditions où ils pourraient être stables.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

L'objectif de notre travail de thèse était d'étudier les interactions sol-herbicide (mésotrione, glyphosate) et d'évaluer leurs conséquences sur la biodégradation de ces herbicides. Pour mener à bien ce projet, il nous a fallu, dans un premier temps, étudier la biodégradation de ces herbicides en milieu aqueux, puis leur adsorption sur différents constituants du sol ainsi que sur un sol entier, avant de réellement évaluer qualitativement et quantitativement l'effet de ces interactions sur la biodégradation de l'herbicide et de ses métabolites.

Conclusion sur l'étude de la mésotrione : Aspect biodégradation et adsorption

- Un large criblage de souches nous a permis de mettre en évidence pour la première fois, une souche bactérienne capable de dégrader efficacement la mésotrione dans nos conditions de laboratoire : il s'agit de la souche *Bacillus* sp. 3B6, isolée de l'eau de condensation des nuages au sommet du Puy de Dôme (Durand *et al.*, 2006a). Au cours de ce criblage, nous n'avons trouvé que 9 bactéries capables de dégrader complètement la mésotrione dans nos conditions (dont plusieurs du genre *Bacillus*), soit 6 % des souches testées.

- L'utilisation d'outils analytiques complémentaires (HPLC-UV, LC/MS, RMN, LC/RMN) nous a permis de réaliser le suivi qualitatif et quantitatif de la mésotrione et de ses métabolites au cours des cinétiques. En effet, des problèmes analytiques, liés sans doute à la matrice biologique, nous ont donné, dans le cas de certains métabolites, des résultats contradictoires avec les différentes techniques utilisées, qui auraient pu nous conduire à des conclusions erronées si nous n'avions utilisé qu'une seule technique. Seule la complémentarité des techniques HPLC et RMN ^{1}H *in situ* nous a permis de réaliser des suivis quantitatifs de façon fiable.

- Plusieurs métabolites formés au cours de la biodégradation de la mésotrione ont pu être identifiés et un schéma métabolique de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 a pu être proposé (Figure 184). Il s'agit du premier schéma métabolique complet pour cet herbicide, 5 des métabolites n'ayant jamais été identifiés auparavant (Durand *et al.*, 2006b).

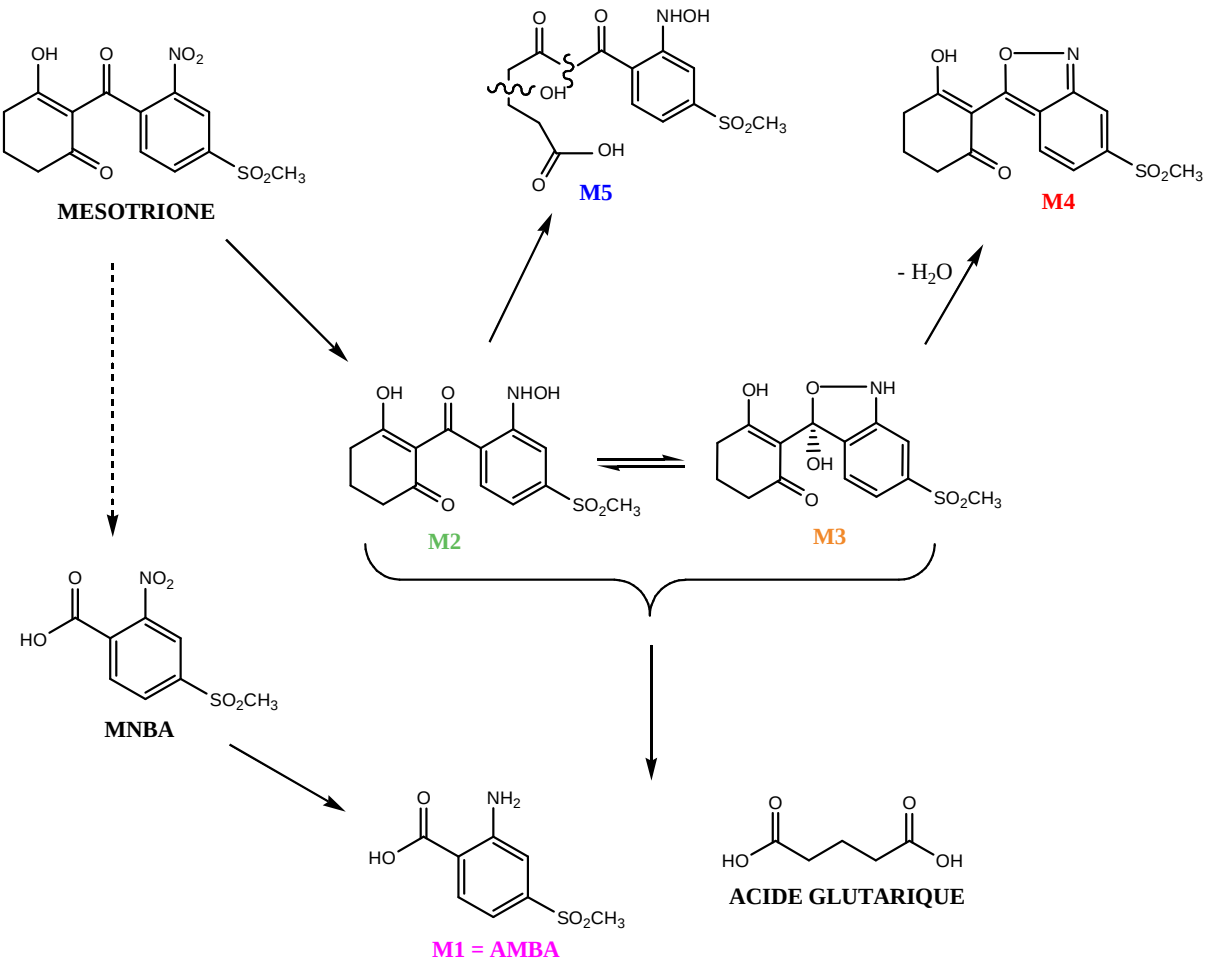


Figure 184 : Schéma métabolique proposé pour la biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Deux voies métaboliques ont pu être mises en évidence : la première voie, majoritaire, débute par une réduction du groupement nitro de la mésotrione en fonction hydroxylamine donnant le métabolite M2. Un équilibre s'établit entre l'hydroxylamine (M2) et l'isoxazol-3-ol (M3), formé par addition nucléophile intramoléculaire de la fonction OH de l'hydroxylamine sur la fonction carbonyle exocyclique. M3, relativement instable, conduit à l'isoxazole (M4) par perte d'une molécule d'eau. En parallèle, le métabolite M2 peut subir une rupture oxydative de la partie cyclohexane-1,3-dione pour former M5. Cependant, M2 et M3, relativement instables en conditions aérobies, se dégradent principalement en AMBA (M1). La deuxième voie, minoritaire, correspond à une rupture oxydative de la mésotrione en MNBA, ce composé subissant ensuite une réduction du groupement nitro pour donner le AMBA (M1). La formation de glutarate a pu aussi être mise en évidence. Sa provenance peut être multiple, elle est sans doute essentiellement due à la rupture oxydative de la cyclohexane-1,3-dione « modifiée » libérée lors de la dégradation de la mésotrione et/ou de M2 et/ou de M3, mais également éventuellement à partir de M5.

Les bilans quantitatifs nous ont permis de mettre en évidence une minéralisation partielle de la mésotrione, même si les métabolites M1 et M4 s'accumulent dans le milieu. D'autre part, des essais en conditions anaérobies nous ont montré que la souche *Bacillus* sp. 3B6 possède une nitroréductase de type I capable de réduire le groupement nitro de la mésotrione en fonction hydroxylamine (M2).

- Les essais d'adsorption de la mésotrione sur différentes matrices naturelles (argiles, sol) nous ont permis de mettre en évidence que le facteur majeur, responsable de l'adsorption de la mésotrione, est le pH du milieu. En effet, plus le pH est acide plus l'adsorption est forte, ce qui avait déjà été observé par Dyson *et al.* (2002). La présence de fer dans la matrice semble également jouer un rôle mais l'influence de ce paramètre devra être confirmé. La plupart de ces résultats ont été confortés par une nouvelle approche analytique par RMN ^{1}H HR-MAS, réalisée directement sur les matrices solides hydratées. Cette méthode, dont nous devions évaluer le potentiel, nous a permis de quantifier la fraction mobile de la mésotrione dans différentes argiles. L'intensité et la forme des raies semblent bien corrélées avec la force de l'interaction entre le pesticide et la matrice solide. Il est à noter que cette approche conduit à une adsorption légèrement supérieure à celle mesurée en batch par des méthodes chromatographiques. La diffusion moléculaire du polluant vers des sites non accessibles en batch, du fait de la rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique, a été envisagée. Enfin, l'utilisation d'une référence électronique (en remplacement d'une référence interne) pourrait s'avérer très intéressante pour quantifier la fraction mobile de polluant adsorbée sur la matrice.

Conclusion sur l'étude du glyphosate : Aspect biodégradation et adsorption

- Aucune norme de dosage du glyphosate n'existe à ce jour et les méthodes issues de la littérature sont nombreuses. L'optimisation de la méthode de dosage par dérivation pré-colonne par un dérivé fluorophore, le chloroformate de 9-fluorényle méthyle, a été réalisée. Cependant, des problèmes analytiques, liés à la matrice biologique, nous ont permis de montrer les limitations de la méthode.

- Les capacités dégradatives vis-à-vis du glyphosate de deux souches fongiques ont été testées après croissance sur différents milieux de culture: *Fusarium solani* PB1 et *Trametes versicolor* T2. Le milieu de culture influe beaucoup sur le taux de disparition du glyphosate,

alors que nous travaillons avec des cellules au repos métabolique. Seul le champignon *Trametes versicolor* T2 permet une dégradation quasi-totale du glyphosate. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de manière certaine les voies métaboliques empruntées du fait de problèmes analytiques liés à la matrice biologique.

- L'analyse de nos résultats d'adsorption du glyphosate sur les différentes matrices testées montre que le principal facteur régissant ce processus est, une fois encore, le pH. Ce paramètre est un de ceux cités dans la littérature avec la teneur en oxydes métalliques. Comme dans le cas de la mésotrione, la RMN ^{1}H HR-MAS a été évaluée comme moyen complémentaire d'investigation des interactions sol-pesticide. Même si certains résultats obtenus par RMN sont en accord avec ceux obtenus en batch par des méthodes chromatographiques, des différences dans les pourcentages d'adsorption ont été observées. Outre le phénomène de diffusion moléculaire mentionné précédemment, qui modulerait de quelques pourcents les taux d'adsorption par rapport aux expériences en batch, il semble que la méthode ne soit pas pour le moment totalement reproductible, quelle que soit la matrice minérale testée. L'utilisation de la référence ERETIC permettrait, à terme, d'améliorer cette reproductibilité, comme l'utilisation de nouveaux rotors HR-MAS pour pallier aux problèmes éventuels rencontrés lors de l'échantillonnage.

La dernière partie, correspondant en quelque sorte à la synthèse des deux premières, portait sur les effets de l'adsorption d'un herbicide sur sa biodégradation. Ces travaux n'ont pu être réalisés que sur la mésotrione, suite aux problèmes analytiques rencontrés avec le glyphosate.

Deux cas de figure ont pu être mis en évidence : i) soit la mésotrione ne s'adsorbe pas sur la matrice (kaolinite et sol, pH alcalin) : aucun changement n'est observé dans la cinétique de biodégradation de la mésotrione, mais des modulations sont observées dans celles d'apparition et de disparition des différents métabolites, ii) soit la mésotrione s'adsorbe sur la matrice (K10): la mésotrione n'est alors plus complètement dégradée et des changements sont observés dans les concentrations des métabolites. Cependant, dans ce cas, les conditions de pH du milieu peuvent également expliquer une activité biologique moins efficace. Quel que soit le cas, aucun changement de voies métaboliques n'a été observé par rapport à celles identifiées en milieu aqueux. Cependant, l'évolution des métabolites (temps d'apparition et de disparition, concentration maximale atteinte) a souvent été modifiée par la présence d'une

matrice solide. Des conditions de pH différentes ou bien une possible adsorption d'un métabolite sur la matrice peuvent expliquer ces différences.

Certes cette étude est réalisée en conditions de laboratoire et ne reflète peut-être pas exactement ce qui pourrait se produire dans l'environnement mais elle permet d'obtenir des informations sur les éventuels métabolites pouvant se former. Ceci permet ensuite d'avoir une idée de leur toxicité. Ce paramètre n'est pas à négliger étant donné que les sous-produits ont un risque d'être plus toxiques que la molécule mère.

L'ensemble de ces résultats ouvre de nombreuses perspectives.

PERSPECTIVES

Les perspectives envisagées pour compléter mon travail de thèse concernent les trois grands thèmes abordés : la biodégradation de la mésotrione et du glyphosate, leur adsorption sur différentes matrices et enfin leur biodisponibilité.

L'étude du métabolisme de la mésotrione par d'autres souches capables de la transformer totalement nous permettra d'obtenir une vision plus large du comportement de l'herbicide dans l'environnement. L'utilisation de consortia de microorganismes est également envisagée dans cette optique. Ces approches ont pour but de se rapprocher d'études en mésocosmes et *in situ* actuellement en cours au laboratoire. Les premiers essais réalisés conjointement avec le laboratoire de Biologie des Protistes de notre Université (thèse d'Olivier Crouzet) indiquent une transformation de la mésotrione (2 mg/kg de sol) d'environ 40 % en 40 jours par les microorganismes autochtones d'un horizon superficiel du sol agricole de la Plaine de Limagne. Ces premiers résultats ont été obtenus pour une humidité relative de 40%. L'analyse des populations microbiennes responsables de cette activité dégradative est en cours.

Des études sur le phénomène de biosorption de l'herbicide par la souche *Bacillus* sp. 3B6 devraient aussi être envisagées afin de voir s'il est responsable de la transformation de la mésotrione.

D'un point de vue analytique, les effets de la matrice biologique rencontrés lors des analyses par HPLC des cinétiques de transformation de la mésotrione, nous ont amenés à nous focaliser davantage sur les résultats obtenus par RMN ^{1}H. Même si cette technique nous a permis de proposer un schéma relativement complet de dégradation de la mésotrione, il serait intéressant de développer une approche analytique permettant d'atteindre des limites de détection et de quantification plus basses. L'arrivée programmée d'une plateforme de criblage LC-RMN-MS au laboratoire devrait nous permettre de déceler et d'appréhender plus rapidement des effets de matrice éventuels. L'utilisation de méthodes d'extraction solide-liquide (SPE) en ligne est également envisagée.

Concernant l'étude de la biodégradation du glyphosate, les nombreux problèmes analytiques rencontrés ne nous ont pas permis de proposer un schéma métabolique. Les

résultats issus de la RMN ^{1}H et de la HPLC sont difficilement exploitables. Des analyses par LC/MS, technique très sensible, sont envisagées avec et sans dérivation des échantillons. Ce développement analytique assez contraignant conditionne l'obtention de résultats fiables dans des matrices biologiques. Comme dans le cas de la mésotrione, l'utilisation de cartouches SPE est envisagée. Elle permettrait l'élimination des sucres présents dans le milieu d'incubation, facilitant les analyses par RMN ^{1}H *in situ*. Une fois ce travail analytique achevé, il sera intéressant de réaliser un large criblage de microorganismes capables de dégrader le glyphosate, comme nous l'avons fait pour la mésotrione.

Enfin, que ce soit pour la mésotrione ou le glyphosate, l'étude de l'impact des herbicides sur le métabolisme central des microorganismes isolés permettrait de mieux comprendre les paramètres biochimiques à l'origine des capacités dégradatives des microorganismes. A long terme, cette vision intégrée du métabolisme de microorganismes permettrait peut-être d'identifier des biomarqueurs caractéristiques d'une pollution à la mésotrione ou au glyphosate.

Le second thème, consacré aux études d'adsorption, pourrait être complété, dans le cas de la mésotrione, par l'utilisation d'autres matrices minérales ou d'autres sols naturels plus riches en fer, tout en imposant un pH acide afin de vérifier si ce facteur est responsable de l'adsorption de ce polluant. L'étude de la formulation commerciale Callisto® pourrait aussi être envisagée, ceci permettrait d'observer l'influence de l'adjuvant sur l'adsorption. Dans le cas du glyphosate, il faudrait aussi envisager de travailler sur des complexes argilo-humiques. Nous avons vu que cette approche permet de discriminer pas à pas les effets de chaque constituant d'un sol sur l'adsorption de l'herbicide. Tous les essais d'adsorption seront à nouveau réalisés en présence d'un électrolyte tel que $CaCl_2$. En effet, les données de la littérature sur la sulcotrione ont montré que cet apport d'ions (présents le plus souvent naturellement dans les sols) modulait l'adsorption du polluant.

Il sera nécessaire de travailler sur chaque fraction du sol purifiée si nous souhaitons comprendre les mécanismes d'interaction sol-pesticide au niveau moléculaire et interpréter les résultats obtenus sur le sol agricole. Que ce soit sur des matrices « commerciales » ou des fractions purifiées, des essais de désorption sont envisagés pour évaluer la persistance des deux herbicides dans l'environnement.

Du point de vue analytique, l'approche par RMN ^{1}H HR-MAS couplée à l'utilisation de la référence électronique ERETIC semble prometteuse. L'évaluation et le développement de cet outil seront donc poursuivis pour approfondir les mécanismes d'adsorption/désorption des pesticides et conforter les résultats obtenus au laboratoire sur d'autres polluants organiques.

Le dernier thème est consacré aux études de biodisponibilité. Les résultats obtenus avec la mésotrione seront poursuivis par des cinétiques de biodégradation en milieu aqueux dans les conditions standard ou à pH légèrement acide (pH = 4-5) voire très acide (pH = 1,5-2). Les objectifs de ces études sont de voir :

- si une activité bactérienne est possible en pH très acide.
- si des modifications sont apportées au schéma métabolique de la mésotrione.

Enfin, des études de biodégradation sur chaque fraction de sol purifiée devraient nous permettre de mieux appréhender le devenir de l'herbicide. De plus, des essais d'adsorption des métabolites identifiés sur les matrices testées devraient aussi être réalisés pour conforter nos hypothèses (les cas de l'isoxazol-3-ol et de l'hydroxylamine sont difficilement envisageables du fait de leur instabilité). En effet, ceci permettrait de comprendre les différences observées sur leur cinétique en présence de kaolinite et du sol naturel. Ces études seront ensuite étendues à d'autres matrices minérales et aux différentes fractions du sol purifiées. Une fois encore, il sera nécessaire de résoudre les différents problèmes analytiques rencontrés avec le glyphosate avant d'envisager d'étendre les études d'adsorption à d'autres matrices. Ce travail devrait nous permettre, à terme, de mieux interpréter l'impact écotoxicologique des herbicides sur différents écosystèmes par une ré-évaluation de la 'biodisponibilité' des herbicides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agritox (2007) Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques http://www.inra.fr/agritox

Akoka, S., Barantin, L. and Trierweiler, M. (1999) Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. Anal. Chem. **71** : 2554-2557.

Alferness, P. and Wiebe, L. (2002) Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Agric. Food Chem. **50** : 3926-3934.

Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G. and Delort, A.M. (2005) Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme : Implications for the chemistry of clouds. Atmos. Environ. **39** : 4143-4153.

Anton, F.A., Cuadra, L.M., Gutierrez, P., Laborda, E. and Laborda, P. (1993) Degradational behavior of the pesticides glyphosate and diflubenzuron in water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **51** : 881-888.

Aquino, A.J.A., Tunega, D., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H. and Lischka, H. (2007) Quantum chemical adsorption studies on the (110) surface of the mineral Goethite. J. Phys. Chem. C **111 :** 877-885.

Autio, S., Siimes, K., Laitinen, P., Rämo, S., Oinonen, S. and Eronen, L. (2004) Adsorption of sugar beet herbicides to Finnish soils. Chemosphere **55** : 215-226.

Baer, U. and Calvet, R. (1997) Simulation and prediction of dissipation kinetics of two herbicides in different pedo-climatic situations. Intern. J. Environ. Anal. Chem. **68** : 213-237.

Baer, U. and Calvet, R. (1999) Fate of soil applied herbicides : experimental data and prediction of dissipation kinetics. J. Environ. Qual. **28** : 1765-1777.

Balthazor, T.M. and Hallas, L.E. (1986) Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. **51** : 432-434.

Barja, B.C. and dos Santos Afonso, M. (2005) Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto Goethite: A comparative study. Environ. Sci. Technol. **39** : 585-592.

Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M. and Soulas, G. (1996) Les pesticides et les polluants organiques des sols. Etude et gestion des sols **3** : 279-295.

Barriuso, E., Houot, S. and Serra-Wittling, C. (1997) Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. Pestic. Sci. **49** : 65-75.

Barth, A., Corrie, J.E.T., Gradwell, M.J., Maeda, Y., Mantele, W., Meier, T. and Trentham D.R. (1997) Time-resolved infrared spectroscopy of intermediates and products from photolysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphates : reaction of the 2-nitrosoacetophenone by-product with thiols. J. Am. Chem. Soc. **119** : 4149-4159.

Bauer, K.H., Knepper, T.P., Maes, A., Schatz, V. and Voihsel, M. (1999) Analysis of polar micropollutants in water with ion chromatography-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A **837** : 117-128.

Bekçi, Z., Seki, Y. and Yurdakoç, M.K. (2006) Equilibrium studies for trimethoprim adsorpiton on montmorillonite KSF. J. Hazard. Mater. **B133** : 233-242.

Bellamy, F.D. and Ou, K. (1984) Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. Tetrahedron Lett. **25** : 839-842.

Bennett, A.E., Rienstra, C.M., Auger, M., Lakshmi, K.V. and Griffin, R.G. (1995) Heteronuclear decoupling in rotating solids. J. Chem. Phys. **103** : 6951-6958.

Béraud, J.M., Compagnon, J.M. and Kay, F. (2001) La mésotrione : herbicide sélectif du maïs. Phytoma La défense des végétaux **542** : 41-44.

Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P. and Abbondandolo, A. (1997) Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. J. Agric. Food Chem. **45** : 1957-1962.

Bonin, J.L. and Simpson, M.J. (2007). Variation in phenanthrene sorption coefficients with soil organic matter fractionation: The result of structure or conformation? Environ. Sci. Technol. **41** : 153 -159.

Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M. and Bohatier, J. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione. *Soumise à Environmental Toxicity*.

Boopathy, R. and Kulpa, C.F. (1992) Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulphate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. Curr. Microbiol. **25** : 235-241.

Boopathy, R. and Melancon, E. (2004) Metabolism of compounds with nitro-functions by *Klebsiella pneumoniae* isolated from a regional wetland. Int. Biodeter. Biodegr. **54** : 269-275.

Boucard, T.K., Parry, J., Jones, K. and Semple, K.T. (2004) Effects of organophosphate and synthetic pyrethroid sheep dip formulations on protozoan survival and bacterial survival and growth. FEMS Microb. Ecol. **47** : 121-127.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72** : 248-254.

Brownlee, J.M., Johnson-Winters, K., Harrison, D.H.T. and Moran, G.R. (2004) Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. Biochemistry **43** : 6370-6377.

Buffle, J. (1988) Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach. New York, Ellis Horwood, John Wiley and Sons, 692 p

Caballero A., Lazaro, J.J., Ramos, J.L. and Esteve-Nunez, A. (2005) PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain from *Pseudomonas putida* JLR11. Environ. Microbiol. **7** : 1211-1219.

Calvet, R. (1989) Adsorption of organic chemicals in soils. Environmental Health Perspectives **83** : 145-147.

Calvet, R. (2003) Le sol : propriétés et fonctions, Tome 1 : Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Edition France Agricole, Dunod.

Carlisle, S.M. and Trevors, J.T. (1988) Glyphosate in the environment. Water, Air, Soil Pollut. **39** : 409-420.

Carrizosa, M.J., Hermosin, M.C., Koskinen, W.C. and Cornejo, J. (2004) Interactions of two sulfonylurea with organoclays. Clays Clay Miner. **52** : 643-649.

Cartigny, B., Azaroual, N., Imbenotte, M., Mathieu, D., Vermeersch, G., Goullé, J.P. and Lhermitte, M. (2004) Determination of glyphosate in biological fluids by ^{1}H and ^{31}P NMR spectroscopy. Forens. Sci. Inter. **143** : 141-145.

Cartwright, N.J. and Cain, R.B. (1959) Bacterial degradation of the nitrobenzoic acids. Biochem. J. **71** : 248-261.

Celis, R., Cornejo, J., Hermosin, M.C. and Koskinen, W.C. (1998) Sorption of atrazine and simazine by model associations of soil colloids. Soil Sci. Soc. Am. **62** : 165-171.

Chaabane, H., Cooper, J.F., Azouzi, L. and Coste, C.M. (2005) Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. J. Agric. Food Chem. **53** : 4091-4095.

Chaabane, H., Vulliet, E., Joux, F., Lantoine, F., Conan, P., Cooper, J.F. and Coste, C.M. (2007) Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. Water Res. **41** : 1781-1789.

Chamayou, H et Legros, J.P (1989) Les bases physiques, chimiques et minéralogiques de la science du sol. Techniques du vivant, 586 p.

Charnay, M.-P., Mougin, C., Farrugia, A. and Barriuso, E. (2004) Incorporation of pesticides by soil micro-organisms as a way of bound residues formation. Environ. Chem. Lett. **2** : 27-30.

Chauhan, A., Chakraborti, A.K. and Jain, R.K. (2000) Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **270** : 733-740.

Cherlet, M., Croubels, S. and De Becker, P. (2006) Quantitative determination of chlortetracycline content in animal plasma at controlled keto-enol tautomerism by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. J Chromatogr. A **1102** : 116-124.

Cherrier, R., Perrin–Ganier, C. and Schiavon, M. (2004) Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters. Agronomie **24** : 29-33.

Cherrier, R., Boivin, A., Perrin-Ganier, C. and Schiavon, M. (2005) Comparaison of the leaching behaviour of two maize herbicides : atrazine and sulcotrione. Agron. Sustain. Dev. **25** : 293-299.

Clausen, L. Fabricius, I. and Madsen, L. (2001) Adsorption of pesticides onto quartz calcite, kaolinite, and alpha-alumina. J. Environ. Qual. **30** : 858-869.

Colin, R., Le Fur, E., Charrêteur, C., Dufau, C. and Péron, J.J. (2000) Determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid (AMPA) in water by liquid chromatography and fluorescence detection. Part II: Direct determination using pre-column derivatization with NBD-Cl. Analusis **28** : 819-824.

Combourieu, B., Inacio, J., Delort, A.M. and Forano, C. (2001) Differentiation of mobile and immobile pesticide on anionic clays by ^{1}H-HR MAS NMR spectroscopy. Chem. Commun. **21** : 2214-2215.

Combourieu, B., Inacio, J., Taviot-Gueho, C., Forano, C. and Delort, A.M. (2005) Pesticides Mobility Studied by Nuclear Magnetic Resonance. In "Environmental Chemistry. Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems", Editeurs : Lichtfouse, Eric; Schwarzbauer, Jan; Robert, Didier. Springer-Verlag, XXVI, Chapter 42, 463-472.

Cornejo, J., Celis, R., Cox, L. and Hermosin, M.C. (2004) Pesticide-clay interactions and formulations. In "Clay surfaces, fundamentals and applications", Editeurs : F. Wypych & K.G. Satyanarayana, 247-266.

Cox, C. (2004) Glyphosate : Herbicide Factsheet. J. Pesticide Reform. **24** : 10-15.

Creech, J.E., Monaco, T.A. and Evans, J.O. (2004) Photosynthetic and growth responses of *Zea mays* L and four weed species following post-emergence treatments with mesotrione and atrazine. Pest. Manag. Sci. **60** : 1079-1084.

Csutoras, C. and Kiss, A. (2007) Efficient method for the characterization of the interaction of pesticides with different soil samples. Microchem. J. **85** : 21-24.

Damonte, M., Torres Sanchez, R.M., dos Santos Afonso, M. (2006) Some aspects of the glyphosate adsorption on montmorillonite and its calcined form. Appl. Clay Sci. **36** : 86-94.

Dayan, F.E., Duke, S.O., Sauldubois, A., Singh, N., McCurdy, C. and Cantrell, C. (2007) *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β-triketones from *Leptospermum scoparium*. Phytochemistry **68** : 2004-2014.

De Jonge, H. and de Jonge, L.W. (1999) Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. Chemosphere **39** : 753-763.

De Jonge, H., de Jonge, L.W., Jacobson, O.H., Yamaguchi, T. and Moldrup, P. (2001) Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. Soil Sci. **166** : 230-238.

Delort, A.M., Combourieu, B. and Haroune, N. (2004) Nuclear Magnetic Resonance studies of interactions between organic pollutants and soil components: a review. Environ. Chem. Lett. **1** : 209-213.

De Stefanis, A. and Tomlinson, A.A.G. (2006) Towards designing pillared clays for catalysis. Catalysis Today **114** : 126-141.

Dick, R.E. and Quinn, J.P. (1995) Glyphosate-degrading isolates from environmental samples : occurrence and pathways of degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43** : 545-550.

Dickel, O., Haug, W. and Knackmuss, H. J. (1993) Biodegradation of nitrobenzene by a sequencial anaerobic–aerobic process. Biodegradation **4** : 187-194.

Dideriksen, K. and Stipp, S.L.S. (2003) The adsorption of glyphosate and phosphate to goethite: a molecular-scale atomic force microscopy study. Geochim. Cosmochim. Acta **67**: 3313-3327

Dion, H.M., Harsh, J.B. and Hill, H.H. Jr. (2001) Competitive sorption between glyphosate and inorganic phosphate on clay minerals and low organic matter soils. J. Radioanal. Nucl. Chem. **249** : 385-390.

don Wauchope, R., Yeh, S., Linders, J.B.H.J., Kloskowski, R., Tanaka, K., Rubin, B., Katayama, A., Kördel, W., Gerstl, Z., Lane, M. and Unsworth, J.B. (2002) Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. Pest Manag. Sci. **58** : 419-445.

Dubus, I.G., Barriuso, E. and Calvet, R. (2001) Sorption of weak organic acids in soils: Clofencet, 2,4-D and salicylic acid. Chemosphere **45** : 767-774.

Duran Meras, I., Galeano Diaz, T. and Alexandre Franco M. (2005) Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). Talanta **65** : 7-14.

Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.M., Combourieu, B. and Besse-Hoggan, P. (2006a) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. Lett. Appl. Microbiol. **43** : 222-228.

Durand, S., Legeret, B., Martin, A.S., Sancelme, M., Delort, A.M., Besse-Hoggan, P. and Combourieu, B. (2006b) Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a Bacillus strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **20** : 2603-2613.

Durham, N.N. (1958) Studies on the metabolism of *p*-nitrobenzoic acid. Can. J. Microbiol. **4** : 141-148.

Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D. and Lane, M.C.G. (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. J. Environ. Qual. **31** : 613-618.

Ellis, M.K., Whitfield, A.C., Gowans, L.A., Auton, T.R., McLean Provan, W., Lock, E.A. and Smith, L.L. (1995) Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. Toxicol. Appl. Pharmacol. **133**: 12-19.

Freitas, L.G., Götz, C.W., Ruff, M., Singer, H.P. and Müller, S.R. (2004) Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A **1028** : 277-286.

EPA 2007. Numeric criteria**.** ***http://oaspub.epa.gov/wqsdatabase/wqsi_epa_criteria.rep_parameter*****,*** remis à jour le 3 janvier 2007.

Esteve-Nunez, A and Ramos, J.L. (1998) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. Environ. Sci. Technol. **32** : 3802-3808.

Esteve–Nunez, A., Caballero, A. and Ramos, J.L. (2001) Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65** : 335–352.

Feng, X., Simpson, A.J. and Simpson, M.J. (2005) Chemical and mineralogical controls on humic acid sorption to clay mineral surfaces. Org. Geochem. **36** : 1553-1556.

Folmar, L.C., Sanders, H.O. and Julin, A.M. (1979) Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **8** : 269-278.

French, C.E., Nicklin, S. and Bruce, N.C. (1998) Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. Appl. Environ. Microbiol. **64** : 2864-2868.

Gamelin, L., Turcant, A., Ganière-Monteil, C. and Harry, P. (2006) Toxicité des tricétones : Rapport de 2 cas d'intoxication à la sulcotrione du CAP d'Angers et revue de la littérature. Infotox **23** : 3-5.

Gerritse, R.G., Beltran, J. and Hernandez, F. (1996) Adsorption of atrazine, simazine and glyphosate in soils of Gnangara Mound, Western Australia. Aust. J. Soil Res. **34** : 599-607.

Ghanem, A., Bados, P., Kerhoas, L., Dubroca, J. and Einhorn, J. (2007) Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. Anal. Chem. **79** : 3794-3801.

Gilcrease, P.C. and Murphy, V.G. (1995) Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. **61** : 4209-4214.

Giles, C.H., MacEwan, T.H., Nakhwa, S.N. and Smith, D. (1960) Studies in adsorption. Part XI : a system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. J. Chem. Soc. 3973-3993.

Gimsing, A.L. and Borggaard, O.K. (2001) Effect of KCl and $CaCl_2$ as background electrolytes on the competitive adsorption of glyphosate and phosphate on goethite. Clays Clay Miner. **49** : 270-275.

Glass, R.L. (1983) Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water samples. J. Agric. Food Chem. **31** : 280-282.

Glass, R.L. (1987) Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. J. Agric. Food Chem. **35** : 497-500.

Gledhill, A.J., Jones, B.K. and Laird, W.J.D. (2001) Metabolism of 2-(4-methylsulphonyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (mesotrione) in rat and mouse. Xenobiotica **31** : 733-747.

Golding, C.J., Smernik, R.J. and Birch G. (2005). Investigation of the role of structural domains identified in sedimentary organic matter in the sorption of hydrophobic organic compounds. Environ. Sci. Technol. **39** : 3925 -3932.

Gonen, Y. and Rytwo, G. (2007) A full analytical solution for the sorption-desorption kinetic process related to Langmuir equilibrium conditions. J. Phys. Chem. C. **111** : 1816-1819.

Groenewegen, P.E.J. and de Bont, J.A.M. (1992) Degradation of 4-nitrobenzoate *via* 4-hydroxylaminobenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. Arch. Microbiol. **158** : 381-386.

Grogan, G. (2005) Emergent mechanistic diversity of enzyme-catalysed beta-diketone cleavage. Biochem. J. **388** : 721-730.

Guo, Z.-X., Cai, Q. and Yang, Z. (2005) Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry detection. J. Chromatogr. A **1100** : 160-167.

Haefs, R., Schmitz-Eiberger, M., Mainx, H.G., Mittelstaedt, W. and Noga, G. (2002) Studies on a new group of biodegradable surfactants for glyphosate. Pest. Manag. Sci. **58** : 825-833.

Haghighi–Podeh, M.R. and Bhattacharya, S.K. (1996) Fate and toxic effects of nitrophenols on anaerobic treatment systems. Water Sci. Technol. **34** : 345-350.

Haïdour, A. and Ramos, J.L. (1996) Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Environ. Sci. Technol. **30** : 2365-2370.

Haigler, B.E. and Spain, J.C. (1991) Biotransformation of nitrobenzene by bacteria containing toluene degradative pathways. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 3156–3162.

Haigler, B.E. and Spain, J.C. (1993) Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. Appl. Environ. Microbiol. **59** : 2239-2243.

Haigler, B.E., Nishino, S.F. and Spain, J.C. (1994a) Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. strain DNT. J. Bacteriol. **176** : 3433-3437.

Haigler, B.E., Wallace, W.H. and Spain, J.C. (1994b) Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. Appl. Environ. Microbiol. **60** : 3466–3469.

Hall, B.J. and Brodbelt, J.S. (1999) Study of diketone/metal ion complexes by electrospray ionization mass spectrometry : influence of keto-enol tautomerism and chelation. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **10** : 402-413**.**

Hall, M.G., Wilks, M.F., McLean Provan, W., Eksborg, S. and Lumholtz, B. (2001) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. J. Clin. Pharmacol. **52** : 169-177.

Hallas, L.E. and Alexander, M. (1983) Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. Appl. Environ. Microbiol. **45** : 1234-1241.

Hance, R. J. (1976) Adsorption of glyphosate by soils. Pestic. Sci. **7** : 363-366.

Hang, S., Barriuso, E. and Houot, S. (2003) Bahavior of ^{14}C-atrazine in Argentinean top-soils under different cropping managements. J. Environ. Qual. **32** : 2216-2222.

Haynes, M.H.B. (1970) Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry. Residue Rev. **32** : 131-174.

He, Z., Nadeau, L.J. and Spain, J.C. (2000) Characterization of hydroxylaminobenzene mutase from pNBZ139 cloned from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. Eur. J. Biochem. **267** : 1110-1116.

Heiss, G. and Knackmuss, H.J. (2002) Bioelimination of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization. Curr. Opin. Microbiol. **5** : 282-287.

Hermosin, M. C. and Cornejo, J. (1989) Assessing factors related to pesticide adsorption by soils. Toxicol. Environ. Chem. **25** : 45-55.

Hidalgo, C., Rios, C., Hidalgo, M., Salvado, V., Sancho, J.V. and Hernandez, F. (2004) Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters. J. Chromatogr. A **1035** : 153-157.

Hoehle, S.I., Pfeiffer, E., Solyom, A.M. and Metzler, M. (2006) Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. J. Agric. Food Chem. **54** : 756-764.

Huesemann, M.H., Hausmann, T.S. and Fortman, T.J. (2004) Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. Biodegradation **15** : 261-274.

Ibanez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Lopez, F.J. and Hernandez, F. (2005) Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A **1081** : 145-155.

Ibanez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Lopez, F.J. and Hernandez, F. (2006) Re-evaluation of glyphosate determination in water by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A **1134** : 51-55.

Inacio, J., Taviot-Guého, C., Forano, C. and Besse, J.P. (2001) Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. Appl. Clay Sci. **18** : 255-264.

Inacio, J. (2002). Adsorption par les argiles anioniques [Mg-Al] et [Zn-Al] de molécules et macromolécules organiques intervenant dans l'environnement. Thèse de l'Université Blaise Pascal. N° DU 1345.

Jacob, G.S., Schaefer, J., Stejskal, E.O. and Mc.Kay, R.A. (1985) Solid-state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseudomonas* sp. J. Biol. Chem. **260** : 5899-5905.

Jacob, G.S., Garbow, J.R., Schaefer, J. and Kishore, G.M. (1987) Solid–state NMR studies of regulation of N-(Phosphonomethyl)glycine and glycine metabolism in *Pseudomonas* sp. strain PG2982. J. Biol. Chem. **262** : 1552-1557.

Jacob, G.S., Garbow, J.R., Hallas, L.E., Kimack, N.M., Kishore, G.M. and Schaefer, J. (1988) Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. strain LBr. Appl. Environ. Microbiol. **54** : 2953-2958.

Jain, R.K., Dreisbach, J.H. and Spain, J.C. (1994) Biodegradation of *p*-nitrophenol *via* 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. Appl. Environ. Microbiol. **60** : 3030-3032.

Jefford, C.W. and Cadby, P.A. (1981) Evaluation of models for the mechanism of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Experientia **37** : 1134-1137.

Johnson, G.R., Jain, R.K. and Spain, J.C. (2002) Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. J. Bacteriol. **184** : 4219-4232.

Kadiyala, V. and Spain, J.C. (1998) A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2479-2484.

Kah, M. and Brown, C.D. (2006) Adsorption of ionisable pesticides in soils. Rev. Environ. Contam. Toxicol. **188** : 149-217.

Kalafut, T., Wales, M.E., Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K. and Wild, J.R. (1998) Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. Curr. Microbiol. **36** : 45-54.

Khol, S.D., Toscano, P.J., Hou, W. and Rice, J.A. (2000) Solid-state ^{19}F NMR investigation of hexafluorobenzene sorption to soil organic matter. Environ. Sci. Technol. **34** : 204–210.

Khrolenko, M.V. and Wieczorek, P.P. (2005) Détermination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with *p*-toluenesulphonyl chloride. J. Chromatogr. A **1093** : 111-117.

Kiely, T., Donaldson, D. and Grube, A. (2004). Pesticides industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. US EPA. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Office of pesticide programs. Biological and economic analysis division. http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/01pestsales/table-of-contents2001.html, pp 14-15.

Kishore, G.M. and Jacob, G.S. (1987) Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 *via* a sarcosine intermediate. J. Biol. Chem. **262** : 12164-12168.

Kjær, J., Olsen, P., Ullum, M. and Grant, R. (2005) Leaching of glyphosate and amino-methylphosphonic acid from Danish agricultural field sites. J. Environ. Qual. **34** : 608–620.

Klimek, M., Lejczak, B., Kafarski, P. and Forlani, G. (2001) Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. Pest. Manag. Sci. **57** : 815-821.

Knicker, H., Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Von Low, E. and. Steinbach, K. (1999) Characterization of ^{15}N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ^{15}N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimisation of relevant NMR spectroscopic parameters. Environ. Sci. Technol. **33** : 343-349.

Knicker, H. (2003) Incorporation of ^{15}N-TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid state NMR spectroscopy. Sci. Total Environ. **308** : 211-220

Krzysko-Lupicka, T., Strof, W., Kubs, K., Skorupa, M., Wieczorek, P., Lejczak, B. and Kafarski, P. (1997) The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. Appl. Microbiol. Biotechnol. **48** : 549-552.

Kulshrestha, P., Giese, R.F. and Aga, D. (2004) Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter : Insights on factors affecting its mobility in soil. Environ. Sci. Technol. **38** : 4097-4105.

Kutty, R. and Bennett, G.N. (2005) Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Arch. Microbiol. **184** : 158-167.

Lagaly, G. (2001) Pesticide-clay interactions and formulations. Appl. Clay Sci. **18** : 205-209.

Le Bot, B., Colliaux, K., Pelle, D., Briens, C., Seux, R and Clément, M. (2002) Optimization and performance evaluation of the analysis of glyphosate and AMPA in water by HPLC with fluorescence detection. Chromatographia **56** : 161-164.

Le Fur, E., Colin, R., Charrêteur, C., Dufau, C. and Péron, J.J. (2000) Determination of glyphosate herbicide and aminomethylphosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling. Part I: Direct determination at the 0.1 µg/L level using FMOC. Analusis **28** : 813-818.

Lee, D.L., Knudsen, C.G., Michaely, W.J., Chin, H.L., Nguyen, N.H., Carter, C.G., Cromartie, T.H., Lake, B.H., Shribbs, J.M. and Fraser, T. (1998) The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. Pestic. Sci. **54** : 377-384.

Lee, E.A., Zimmerman, L.R., Bhullar, B.S. and Thurman, E.M. (2002) Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/ mass spectrometry for the analysis of glyphosate. Anal. Chem. **74** : 4937-4943.

Lerbs, W., Stock, M. and Parthier, B. (1990) Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes spec*. strain GL. Arch. Microbiol. **153**: 146-150.

Lewis, T.A., Goszczynski, S, Crawford, R.L., Korus, R.A. and Admassu, A. (1996) Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans.* Appl. Environ. Microbiol. **62** : 4669-4674.

Li, T.S. and Li, A.X. (1998) Montmorillonite clay catalysis. Part 10. K-10 and KSF-catalysed acylation of alcohols, phenols, thiols and amines: scope and limitation. J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1** : 1913-1918.

Li, F., Zhang, L., Evans, D.G., Forano, C. and Duan, X. (2004) Structure and thermal evolution of Mg-Al layered double hydroxide containing interlayer organic glyphosate anions. Thermochim. Acta. **424** : 15-23.

Li, F., Wang, Y., Yang, Q., Evans, D.G., Forano, C. and Duan, X. (2005) Study on adsorption of glyphosate (*N*-phosphonomethyl glycine) pesticide on MgAl-layered double hydroxides in aqueous solution. J. Hazard. Mat. **125** : 89-95.

Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E.A., Hjalmarson, O. and Strandvik, B. (1992) Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Lancet **340** : 822-823.

Liu, C.M., McLean, P.A., Sookdeo, C.C. and Cannon, F.C. (1991) Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 1799-1804.

Loiseau, L., Zegouagh, Y., Bardoux, G., Barriuso, E., Derenne, S., Mariotti, A., Chenu, C. and Largeau, C. (2002) Study of atrazine fate in silty loamy soils of the Paris Basin *via* a combination of isotopic and pyrolytic methods. Bull. Soc. Géol. Fr. **173** : 271-279.

Lovdahl, M.J. and Pietrzyk, D.J. (1992) Liquid chromatography and postcolumn indirect detection of glyphosate. J. Chromatogr. A **602** : 197-204.

Lund–Hoie, K. and Friestad, H.O. (1986) Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **36** : 723-729.

Lundgren, L.N. (1986) A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils. J. Agric. Food Chem. **34** : 535-538.

Maeda, T., Nagafuchi, N., Kubota, A., Kadokami, K. and Ogawa, H.I. (2006) One-step isolation and identification of hydroxylamino-dinitrotoluenes, unstable products from 2,4,6-trinitrotoluene metabolites, with thin-layer chromatography and laser time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr. Sci. **44** : 96-100.

Maeghe, L., Eelen, H. and Bulcke, R. (2002) Soil persistance of 4-HPPD-inhibitors in different soil types. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen) **67** : 383-391.

Mallat, E. and Barcelo, D. (1998) Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange

solid-phase extraction columns followed by ion chromatography-post-column derivatization with fluorescence detection. J. Chromatogr. A **823** : 129-136.

Mamy, L. (2001) Devenir des résidus de pesticides dans le sol dans les systèmes de culture employant des OGM résistants à ces molécules. Mémoire de DEA « Biosphère Continentale : Sols, écosystèmes, atmosphère ». INRA, Grignon, 54p.

Mamy, L. and Barriuso, E. (2005) Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. Chemosphere **61** : 844-855.

Mamy, L., Barriuso, E. and Gabrielle, B. (2005) Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate – resistant crops. Pest. Manag. Sci. **61** : 905-916.

Mamy, L. and Barriuso, E. (2007) Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils. European J. Soil Sci. **58** : 174-187.

Mao, J., Xing, B. and Schmidt-Rohr, K. (2001) New structural information on a Humic Acid from two-dimensional ^{1}H-^{13}C Correlation Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. Environ. Sci. Technol. **35** : 1928-1934.

Mao, J. and Schmidt-Rohr, K. (2003) Recoupled long-range C-H dipolar dephasing in solid-state NMR, and its use for spectral selection of fused aromatic rings. J. Magn. Reson. **162** : 217-227.

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. and Belle, R. (2002) Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. Chem. Res. Toxicol. **15** : 326-331.

Martinez, T.T. and Brown, K. (1991) Oral and pulmonary toxicology of the surfactant used in Roundup herbicide. Proc. West. Pharmacol. Soc. **34** : 43-46.

McConnell, J.S. and Hossner, L.R. (1985) pH-dependent adsorption isotherms of glyphosate. J. Agric. Food Chem. **33** : 1075-1078.

McCormick, N.G., Feeherry, F.E. and Levinson, H.S. (1976) Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. **31** : 949-958.

Meazza, G., Scheffler, B.E., Tellez, M.R., Rimando, A.M., Romagni, J.G., Duke, S.O., Nanayakkara, D., Khan, I.A., Abourashed, E.A. and Dayan, F.E. (2002) The inhibitory activity of natural products on plant *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Phytochemistry **59** : 281-288.

Michaely, W.J. and Kraatz, G.W. (1988) 2-(2-substituted benzoyl)-1,3-cyclohexanediones. Eur. Pat. Appl. (35p) EPXXDW EP 135191 A2 19850325. (1988) US Patent 4,780,127.

Michel, N. and Akoka, S. (2004) The application of the ERETIC method to 2D-NMR. J. Mag. Res. **168** : 118-123.

Miles, C.J. and Moye, H.A. (1988) Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. J. Agric. Food Chem. **36** : 486-491.

Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E.M., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K. and Wichert, R.A. (2001) Mesotrione : a new selective herbicide for use in maize. Pest. Manag. Sci. **57** : 120-128.

Moran, G.R. (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Arch. Biochem. Biophys. **433** : 117-128.

Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C. and Ramos, A. (2000) Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. Chemosphere **40** : 103-107.

Moye, H.A., Miles, C.J. and Scherer S.J. (1983) A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. J. Agric. Food Chem. **31** : 69-72.

Nadeau, L.J., He, Z. and Spain, J.C. (2003) Bacterial conversion of hydroxylamino aromatic compounds by both lyase and mutase enzymes involves intramolecular transfer of hydroxyl group. Appl. Environ. Microbiol. **69** : 2786-2793.

Nanny, M.A, Minear, R.A. and Leenheer, J.A. (1998) Nuclear magnetic resonance in environmental chemistry. Oxford University Press, New-York.

Nedelkoska, T.V. and Low, G.K.C. (2004) High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. Anal. Chim. Acta **511** : 145-153.

Neidig, M.L., Decker, A., Kavana, M., Moran, G.R. and Solomon, E.I (2005) Spectroscopic and computational studies of NTBC bound to the non-heme iron enzyme (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase : active site contributions to drug inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. **338** : 206-214.

Newcombe, D.A. and Crawford, R.L. (2007) Transformation and fate of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in anaerobic bioslurry reactors under various aeration schemes: implications for the decontamination of soils. Biodegradation DOI 10.1007/s10532-007-9103-0.

Nishino, S.F., Paoli, G.C. and Spain, J.C. (2000) Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 2139-2147.

Nomura, N.S. and Hilton, H.W. (1977) The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. Weed Res. **17** : 113-121.

Obojska, A., Lejczak, B. and Kubrak, M. (1999) Degradation of phosphonates by Streptomycete isolates. Appl. Microbiol. Biotechnol. **51** : 872-876.

Padda, R.S., Wang, C., Hughes, J.B., Kutty, R. and Bennett, G.N. (2003) Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. Environ. Toxicol. Chem. **22** : 2293-2297.

Pak, J.W., Knoke, K.L., Noguera, D.R., Fox, B.G. and Chambliss, G.H. (2000) Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 4742-4750.

Pakala, S.B., Gorla, P., Pinjari, A.B., Krovidi, R.K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick, M. and Siddavattam, D. (2007) Biodegradation of methyl parathion and *p*-

nitrophenol: evidence for the presence of a *p*-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram negative *Serratia* sp. strain DS001. Appl. Microbiol. Biotechnol. **73**: 1452-1462.

Park, J.-H., Feng, Y., Ji P., Voice, T.C. and Boyd, S.A. (2003) Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. Appl. Environ. Microbiol. **69** : 3288-3298.

Patsias, J., Papadopoulou, A. and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2001) Automated trace level determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line anion-exchange solid-phase extraction followed by cation-exchange liquid chromatography and post-column derivatization. J. Chromatogr. A **932** : 83-90.

Peixoto, F. (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. Chemosphere **61** : 1115-1122.

Pelmont, J. (2005) Biodégradations et métabolismes, les bactéries pour les technologies de l'environnement. Presse universitaire de Grenoble.

Peres, C.M., Russ, R., Lenke, H. and Agathos, S.N. (2001) Biodegradation of 4-nitrobenzoate, 4-aminobenzoate and their mixtures: new strains, unusual metabolites and insights into pathway regulation. FEMS Microbiol. Ecol. **37** : 151-159.

Piccolo, A. and Celano, G. (1994) Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. Environ. Toxicol. Chem. **13** : 1737-1741.

Piccolo, A., Celano, G., Arienzo, M. and Mirabella, A. (1994) Adsorption and desorption of glyphosate in some european soils. J. Environ. Sci Health B **29** : 1105-1115.

Piccolo, A., Gatta, L. and Campanella, L. (1995) Interactions of glyphosate herbicide with a humic acid and its iron complex. Ann. Chim. (Rome) **85** : 31-40.

Piccolo, A., Celano, G. and Conte, P. (1996) Adsorption of glyphosate by humic substances. J. Agric. Food Chem. **44** : 2442-2446.

Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S., Schaefer, J. and Kishore, G.M. (1987) Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1. Eur. J. Biochem. **165** : 267-273.

Pipke, R. and Amrhein, N. (1988) Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. Appl. Environ. Microbiol. **54:** 2868-2870.

Popesku, J.T., Singh, A., Zhao, J.S., Hawari, J. and Ward, O.P. (2004) Metabolite production during transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a mixed culture acclimated and maintained on crude oil-containing media. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65** : 739-746.

Race, P.R., Lovering, A.L., Green, R.M., Ossor, A., White, S.A., Searle, P.F., Wrighton, C.J. and Hyde, E.I. (2005) Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone: Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. J. Biol. Chem. **280** : 13256-13264.

Radosevich, M., Traina, S.J. and Tuovinen, O.H. (1996) Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm. Biodegradation **7** : 137-149**.**

Razo-Flores, E., Lettinga, G. and Field, J.A. (1999) Biotransformation and biodegradation of selected nitroaromatics under anaerobic conditions. Biotechnol. Prog. **15** : 358-365.

Reade, J.P.H. and Cobb, A.H. (2002) Herbicides : modes of action and metabolism. Weed Management Handbook. Naylor R.E.L. (ed), Blackwell Science, Oxford, pp 134-170.

Rios, L.A., Weckes, P.P., Schuster, H., Hausmann, H. and Hölderich, W.F. (2003) Modification and characterization of aluminosilicates used for nucleophilic addition of alcohols to epoxidized oils. Appl. Catalysis A : General **253** : 487-497.

Rouchaud, J., Thirion, A., Callens, D. and Bulcke, R. (1996) Soil dissipation of the post-emergence herbicide sulcotrione in maize crops treated with organic fertilizers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **57** : 398-405.

Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K. and Eelen, H. (1998a) Sulcotrione soil metabolism in summer corn crops. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **61** : 669-676.

Rouchaud, J., Neus, O., Callens, D. and Bulcke, R. (1998b) Sulcotrione soil persistence and mobility in summer maize and winter wheat crops. Weed Res. **38** : 361-371.

Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H. and Bulcke, R. (2000) Dissipation and mobility of the herbicide mesotrione in the soil of corn crops. Toxicol. Environ. Chem. **77** : 31-40.

Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J. and Marvel, J.T. (1977) Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food Chem. **25** : 517-528.

Sadi, B.B.M., Vonderheide, A.P. and Caruso, J.A. (2004) Analysis of phosphorus herbicides by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell. J. Chromatogr. A **1050** : 95-101.

Sancho, J.V., Hernandez, F., Lopez, F.J., Hogendoorn, E.A. and Dijkman, E. (1996) Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. J. Chromatogr. A **737** : 75-83.

Sannino, F., Filazzola, M.T. and Violante, A. (1999) Adsorption-desorption of simazine on montmorillonite coated by hydroxyl aluminium species. Environ. Sci. Technol. **33** : 4221-4225.

Sato, K., Jin, J.Y., Takeuchi, T., Miwa, T., Suenami, K., Takekoshi, Y. and Kanno, S. (2001) Integrated pulsed amperometric detection of glufosinolate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography. J. Chromatogr. A **919** : 313-320.

Schackmann, A. and Müller, R. (1991) Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34** : 809-813.

Schmitt, H., Altenburger, R., Jastorff, B. and Schüürmann, G. (2000) Quantitative structure-activity analysis of the algae toxicity of nitroaromatic compounds. Chem. Res. Toxicol. **13** : 441-450.

Schnürer, Y., Persson, P., Nilsson, M., Nordgren, A. and Giesler, R. (2006) Effects of surface sorption on microbial degradation of glyphosate. Environ. Sci. Technol. **40** : 4145-4150.

Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. and Imboden, D.M. (2003) Environmental organic chemistry, 2 edition, Wiley & Sons, New Jersey.

Seger, M.R. and Maciel, G.E. (2006) NMR investigation of the behavior of an organothiophosphate pesticide, chlorpyrifos, sorbed on soil components. Environ. Sci. Technol. **40** : 791-796.

Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A. and Harms, H. (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. Environ. Sci. Technol. 229A-231A.

Sheals, J., Sjöberg, S. and Persson, P. (2002) Adsorption of glyphosate on Goethite: Molecular characterization of surface complexes. Environ. Sci. Technol. **36** : 3090-3095.

Simpson, A.J., Kingery, W.L., Shaw, D.R., Spraul, M., Humpfer, E. and Dvortsak, P. (2001) The application of ^{1}H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and associations of organic components at the solid–aqueous interface of a whole soil. Environ. Sci. Technol. **35** : 3321–3325

Singh, B.K. and Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol. Rev. **30** : 428-471.

Sklenar, V., Piotto, M., Leppi,k R. and Saudek, V. (1993) Gradient tailored water suppression for ^{1}H-^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. J. Magn. Reson., Series A **102** : 241-245.

Smith, S.C., Ainsworth, C.C., Traina, S.J. and Hicks, R.J. (1992) Effect of sorption on the biodegradation of quinoline. Soil Sci. Soc. Am. J. **56** : 737-746.

Somerville, C.C., Nishino, S.F. and Spain, J.C. (1995) Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. J. Bacteriol. **177**: 3837-3842.

Sorensen, S.R., Schultz, A., Jacobsen, O.S. and Aamand, J. (2006) Sorption, desorption and mineralisation of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. Environ. Pollut. **141** : 184-194.

Spain, J.C. and Gibson, D.T. (1991) Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 812-819.

Spanggord, R.J., Spain, J.C., Nishino, S.F. and Mortelmans, K.E. (1991) Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 3200-3205.

Spark, K. M. and Swift, R. S. (2002) Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. Sci. Total Environ. **298** : 147-161.

Sprankle, P., Meggitt, W.F. and Penner, D. (1975a) Rapid inactivation of glyphosate in the soil. Weed Sci. **23** : 224-228.

Sprankle, P., Meggit, W.F. and Penner, D. (1975b) Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. Weed Sci. **23** : 229-234.

Stalikas, C.D. and Konidari, C.N. (2001) Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. J. Chromatogr. A **907** : 1-19.

Stenuit, B., Eyers, L. Rozenberg, R., Habib-Jiwan, J.L. and Agathos, S.N. (2006) Aerobic growth of *Escherichia coli* with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. Appl. Environ. Microbiol. **72** : 7945-7948.

Stenrod, M., Charnay, M.-P., Benoit, P. and Eklo, O.M. (2006) Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features. Soil Biol. Biochem. **38** : 962-971.

Stevenson, F.J. (1982) Humus chemistry : genesis, composition reactions. John Wiley and Sons, New York.

Stoob, K., Singer, H.P., Goetz, C.W., Ruff, M. and Mueller, S.R. (2005) Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. J. Chromatogr. A **1097** : 138-147.

Straganz, G., Brecker, L., Weber, H.J., Steiner, W. and Ribbons, D.W. (2002) A novel β-diketone-cleaving enzyme from *Acinetobacter johnsonii* : acetylacetone 2,3-oxygenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **297** : 232-236.

Strange-Hansen, R., Holm, P.E., Jacobsen, O.S. and Jacobsen, C.S. (2004) Sorption, mineralization and mobility of *N*-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate) in five different types of gravel. Pest. Manag. Sci. **60** : 570-578.

Suen, W.C. and Spain, J.C. (1993) Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. J. Bacteriol. **175** : 1831-1837.

Sutton, P., Richards, C., Buren, L. and Glasgow, L. (2002) Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. Pest. Manag. Sci. **58** : 981-984.

Sutton, R. and Sposito, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: The new view. Environ. Sci. Technol. **39** : 9009-9015.

Symons, Z.C. and Bruce, N.C. (2006) Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. Nat. Prod. Rep. **23** : 845-850.

Syngenta (2003) Fiche technique – CALLISTO. http://www.syngenta-agro.fr.

Szczecinski, P., Gryff-Keller, A. and Molchanov, S. (2006) ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, and computational DFT studies of the structure of 2-acylcyclohexane-1,3-diones and their alkali metal salts in solution. J. Org. Chem. **71** : 4636-4641.

Tan, S., Evans, R. and Singh, B. (2006) Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide–tolerant crops. Amino Acids **30** : 195-204.

Tao, T. and Maciel, G.E. (2002) Interaction of methyl bromide with soil. Environ. Sci. Technol. **36** : 603-607.

Tarr, J.B. (2000) Structure-activity relationships of triketone HPPD herbicides: Metabolism of sulcotrione and experimental herbicide SC-0774 in corn plants. Book of Abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, March 26-30 (2000).

Ter Halle, A., Drncova, D. and Richard, C. (2006) Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. Environ. Sci. Technol. **40** : 2989-2995.

Ter Halle, A. and Richard, C. (2006) Simulated solar light irradiation of mesotrione in natural waters. Environ. Sci. Technol. **40** : 3842-3847.

Tomlin, C. (2000) The pesticide manual, 12th edn BCPC publication, Surrey, U.K.

Tunega, D., Goodman, B.A., Haberhauer, G., Reichenauer, T.G., Gerzabek, M.H. and Lischka, H. (2007) *Ab initio* calculations of relative stabilities of different structural arrangements in dioctahedral phyllosilicates. Clays Clay Miner. **55** : 220-232.

Uncuta, C., Tudose A., Caproiu, M., Udrea, S. and Roussel, C. (2003) Correction to withdraw article cyclization products of δ-oxo-α, β-unsatured ketoxime during reaction with hydrochloric acid in anhydrous diethyl ether. Eur. J. Org. Chem. **9** : 1789-1795.

Vereecken, H. (2005) Mobility and leaching of glyphosate : a review. Pest. Manag. Sci. **61** : 1139-1151.

Verma, G., Kumar, A., Tomer, A. and Singh, K.K. (2005) Mobility of OP pesticides in soil as affected by physico chemical characteristics of soil. Pestic. Res. J. **17** : 97-103.

Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J.C. and Knackmuss, H.J. (1998) Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. **64** : 246-252.

Vreeken, R.J., Speksnijder, P., Bobeldijk-Pastorova, I. and Noij, Th.H.M. (1998) Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction - high-performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A **794** : 187-199.

Vyn, J.D., Swanton, C.J., Weaver, S.E. and Sikkema, P.H. (2006) Control of *Amaranthus tuberculatus* var. *rudis* (common waterhemp) with pre and post-emergence herbicides in *Zea mays* L. (maize). Crop Protection **25** : 1051-1056.

Wang, K. and Xing, B. (2005) Structural and sorption characteristics of adsorbed humic acid on clay minerals. J. Environ. Qual. **34** : 342-349.

Weber, J.R., Wilkerson, G.G. and Reinhardt, C.F. (2004) Calculating pesticide sorption coefficients (K_d) using selected soil properties. Chemosphere **55** : 157-166.

Wilson, J.S. and Foy, C.L. (1992) Influence of various soil properties on the adsorption and desorption of ICIA-0051 in five soils. Weed Technol. **6** : 583-586.

Won, W.D., DiSalvo, L.H. and Ng, J. (1976) Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl. Environ. Microbiol. **31** : 576-580.

Wu, C.S., Huang, J.L., Sun, Y.S. and Yang, D.Y. (2002) Mode of action of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibition by triketone-type inhibitors. J. Med. Chem. **45** : 2222-2228.

Xiong, J., Lock, H., Chuang, I., Keeler, C. and Maciel, G.E. (1999) Local motions of organic pollutants in soil components, as studied by ^{2}H NMR. Environ. Sci. Technol. **33** : 2224-2233.

Yabannavar, A.V. and Zylstra, G.J. (1995) Cloning and characterization of the genes for *p*-nitrobenzoate degaradation from *Pseudomonas pickettii* YH105. Appl. Environ. Microbiol. **61** : 4284-4290.

Ye, J., Singh, A. and Ward, O.P. (2004) Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. World J. Microb. Biotechnol. **20** : 117-135.

Yin, H., Wood, T.K. and Smets, B.F. (2005) Reductive transformation of TNT by *Escherichia coli*: pathway description. Appl. Microbiol. Biotechnol. **67** : 397-404.

Zboinska, E., Maliszewska, I., Lejczak, B. and Kafarski, P. (1992) Degradation of organophosphonates by *Penicillium citrinum*. Lett. Appl. Microbiol. **15** : 269-272.

Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C. and Liu, W. (1999) Determination of glyphosate by ion chromatography. J. Chromatogr. A **850** : 297-301.

Ziarelli, F. and Caldarelli, S. (2006) Solid-state NMR as an analytical tool : quantitative aspects. Solid State Nuclear Magn. Reson. **29** : 214-218.

RESUME

Ce travail porte sur l'étude des conséquences des interactions sol-herbicide sur la biodégradation de deux herbicides: la mésotrione, récemment mise sur le marché et le glyphosate (RoundUp®). En effet, phénomènes d'adsorption et de biodégradation vont influer sur le devenir des herbicides dans les sols.

L'utilisation d'outils analytiques complémentaires (LC/UV, LC/MS, RMN) nous a permis de proposer le premier schéma métabolique complet de dégradation de la mésotrione par une souche pure Bacillus sp. 3B6.

Des études d'adsorption des deux herbicides sur divers constituants du sol (argiles cationiques et anioniques, fractions argileuses, sol) ont montré le rôle majeur du pH du milieu sur ce phénomène.

La biodégradation de la mésotrione en présence d'une matrice solide n'entraîne pas de modifications des voies métaboliques mais peut, par contre, moduler les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites, ceux-ci pouvant interagir avec la matrice.

Mots clés : herbicides, mésotrione, glyphosate, métabolisme, *Bacillus* sp., adsorption, argiles, sol, RMN, LC/MS

ABSTRACT

This study deals with the consequences of soil-herbicide interactions on the biodegradation of two herbicides: mesotrione, which has recently been marketed as Callisto® and glyphosate (RoundUp®). Indeed, sorption-desorption phenomena and biodegradation can influence the fate of herbicides in the soil.

The use of complementary analytical tools (LC/UV, LC/MS, NMR) allowed us to propose the first complete biodegradative pathway of mesotrione by a pure bacterial strain Bacillus sp. 3B6.

Sorption studies of both herbicides on various soil components (cationic and anionic clays, clay fractions, soil) showed the major role of the medium pH on this phenomenon.

Biodegradation of mesotrione in the presence of a solid matrix did not lead to any change in the metabolic pathway but could, nevertheless modulate the kinetics of appearance and disappearance of metabolites. These metabolites can interact with the matrix.

Keywords : herbicides, mesotrione, glyphosate, metabolism, biodegradation, *Bacillus* sp., sorption, clays, soil, NMR, LC/MS