THÈSE DE DOCTORAT ET DE DOCTORAT/PHD DE

L'UNIVERSITÉ DE NANTES ET DE L'UNIVERSITÉ DE DSCHANG

ECOLE DOCTORALE N° 596 DE NANTES **ET** ECOLE DOCTORALE DE DSCHANG
Matière, Molécules et Matériaux (3M) ***et*** *Dschang School of Science and Technology (DSST)*
Spécialité : Chimie Analytique et Radiochimie (Nantes) **et** Chimie Analytique (Dschang)

Par

Ranil Clément TONLEU TEMGOUA

Simulation des dégradations environnementales de quelques pesticides électroactifs par couplage électrochimie - spectrométrie de masse haute résolution - calculs théoriques *DFT*

Thèse présentée et soutenue à l'Université de Nantes, le 16 Novembre 2020

Unités de recherche : Laboratoire Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM) UMR 6230, CNRS **et** Unité de Recherche de Chimie des Nuisances et de Génie de l'Environnement (UR-CHINGE)

Rapporteurs avant soutenance :

Thierry NOGUER	Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France
Charles Péguy NANSEU NJIKI	Professeur, Université de Yaoundé I, Cameroun

Composition du Jury :

Président :	Jean-Michel BOULER	Professeur, Université de Nantes, France
Examinateurs :	Alain WALCARIUS	Directeur de Recherche, Université de Lorraine, France
	Thierry NOGUER	Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France
	Charles Péguy NANSEU NJIKI	Professeur, Université de Yaoundé I, Cameroun
Dir. de thèse :	Mohammed BOUJTITA	Maître de Conférences-HC/HDR, Université de Nantes, France
Co-dir. de thèse :	Ignas TONLE KENFACK	Professeur, Université de Dschang, Cameroun

Invitée

Christine THOBIE-GAUTIER — Maître de Conférences, Université de Nantes, France

Dédicace

☆ **À mes chers parents,**

M. Jean Olivier TONLEU et **Mme Véronique ASOKENG**

&

☆ **À mon adorable fille,**

Andréa Chloé TEMGOUA DJIGOUO

« La différence entre le possible et l'impossible se trouve dans la détermination »
Gandhi…

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (**CEISAM**) de l'Université de Nantes (France), en collaboration avec l'Unité de Recherche de Chimie des Nuisances et du Génie de l'Environnement (**URCHINGE**) de l'Université de Dschang (Cameroun), sous la codirection de messieurs **Mohammed BOUJTITA** et **Ignas TONLÉ KENFACK**. À l'issue de cette recherche, je suis convaincu que cette thèse est loin d'être un travail solitaire, car elle a bénéficié du soutien d'un grand nombre de personnes (physiques et morales) dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de mes travaux m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « *l'apprenti-chercheur* ». Je tiens à les remercier ici de façon originale.

✦ J'adresse mes vifs remerciements au **Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France au Cameroun**, au laboratoire **CEISAM** et au **CNRS** pour le soutien financier à moi accordé. Il m'est agréable de leur exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

✦ Je remercie M. **Jean Michel BOULER,** Professeur à l'Université de Nantes et Directeur du laboratoire CEISAM, pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans le laboratoire qu'il dirige. Mes remerciements vont également à l'endroit de M. **Bruno BUJOLI**, Directeur de Recherche au CNRS. Il m'a chaleureusement accueilli au CEISAM en novembre 2016 en tant que Directeur du laboratoire.

✦ Mes plus grands remerciements vont à l'endroit de mon directeur de thèse, M. **Mohammed BOUJTITA,** Maître de Conférences-HC/HDR à l'Université Nantes. Il a dirigé mes travaux de recherche avec un enthousiasme communicatif. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour l'orientation, la confiance, et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené à bon terme, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils. Cette thèse doit beaucoup à son soutien et à ses encouragements. *Merci à vous Hamada…à suivre…*

✦ Je tiens à remercier, et très chaleureusement M. **Ignas TONLÉ KENFACK**, Professeur à l'Université de Dschang et codirecteur de cette thèse, qui pour moi a été un directeur de thèse attentif, positif, encourageant et confiant. Je le remercie pour m'avoir tenue la main depuis le cycle de Master. Ses qualités, ses conseils et sa disponibilité sans faille ont significativement contribué à l'aboutissement de ce travail. Sa grande rigueur scientifique et sa bienveillance

resteront pour moi un exemple. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

✦ J'exprime mes sincères remerciements aux **rapporteurs** et aux **membres du jury** qui me font l'honneur d'examiner ce travail. Un vibrant merci à leur égard, car ils ont bien voulu prendre de leur temps pour lire et critiquer ce dernier afin d'en améliorer la qualité.

✦ Un grand remerciement est dédié à M. **Dimitri ALVAREZ-DORTA**, chercheur postdoctoral au laboratoire CEISAM, qui m'a guidé dans mes premiers pas au sein de ce laboratoire. Ses compétences scientifiques, son dévouement total pour la recherche, ses qualités humaines, ses précieux conseils ont été pour moi une source de réconfort et d'encouragement. Qu'il trouve dans ce manuscrit la modeste expression de ma reconnaissance et de mon éternelle gratitude. "*Gracias Dimi*".

✦ Je ne peux pas continuer ces remerciements sans parler de M. **Ugo BUSSY**, *Principal Scientist* chez *Mars Incorporated* (États-Unis d'Amérique), qui aura été une source à la fois de motivation, de conseils, et de soutien indéfectible pendant ma dernière année de thèse. Nos nombreux échanges scientifiques m'ont permis de franchir d'énormes difficultés rencontrées. Pour moi il est "*l'homme de la situation*". Un immense merci à toi Ugo.

✦ Un grand merci à M. **Nicolas GALLAND**, Maître de Conférences à l'Université de Nantes pour son aide en modélisation moléculaire (*DFT*). Je tiens à remercier également la plateforme AMaCC (Analyses par spectrométrie de Masse et Chromatographies du laboratoire CEISAM) à travers Mmes **Julie HÉMEZ**, **Laurence ARZEL** et **Isabelle LOUVET**. Elles m'ont été d'une aide précieuse pour les analyses en spectrométrie de masse et en chromatographie.

✦ Mes remerciements s'adressent aussi aux Docteurs **Christine THOBIE** et **Renaud BOISSEAU,** ainsi qu'à Mme **Nadine SZUWARSKI** pour leur intérêt dans mes travaux, leur expérience et leurs conseils durant ces années de thèse passées au laboratoire CEISAM.

✦ Un merci spécial à M. **Cyril DELACOTE**, il a été à l'origine de ma venue au laboratoire CEISAM à Nantes. Je le remercie très chaleureusement pour la confiance et la sympathie qu'il m'a témoignées lors de la rédaction et la soumission de mon projet de bourse.

✦ Je suis particulièrement reconnaissant envers Mme **Evangéline NJANJA épse BETNGA**, Maître de Conférences à l'Université de Dschang pour sa grande disponibilité, ses discussions scientifiques, sa gentillesse et ses judicieux conseils.

✦ Ils m'ont tenu la main durant mon parcours universitaire. Les uns m'ont guidé depuis le cycle de Licence et les autres m'ont encadré aux cycles Master et de Doctorat, et sont de ce fait à l'origine de mon envie de faire la recherche. Il s'agit des Docteurs **Ervice YMELE, Joseph TCHAMGOUE**, **Hubert NONO**, **Cédric DONGMO**, **Brice NGOUANA**, **Francis TCHIENO**, **Djimadoum TEADOUM**, **Donald TCHUIFON**, **Gabin BITCHAGNO** et **Patrice KENFACK**. Un grand merci à vous les chimistes.

✦ Je suis particulièrement reconnaissant envers tous les **thésards** (**Université de Nantes - France** et **Université de Dschang - Cameroun**) que j'ai côtoyés durant ces années, à la paillasse, pendant les échanges scientifiques, lors des pauses café/bière. Je les remercie pour leur sympathie et entrain. J'ai pu nouer avec eux durant ces années des amitiés qui j'en suis sûr dureront dans le temps.

✦ Bien évidemment, il est inconcevable pour moi de ne pas citer dans ces lignes les membres de l'**Équipe Matériaux et Électroanalyse pour la Protection de l'Environnement (EMEPE)** qui ont participé à ma vie au laboratoire. Plus particulièrement, merci aux Docteurs **Sherman Lesly JIOKENG**, **Léopoldine GUENANG**, **Serge MBOKOU** et **Marcel Cédrick NGAHA**. Merci également aux doctorant-e-s **Vidal Delmas EBUNANG**, **Julio NGOUOKO**, **Kevin TAJEU**, **Lydiane DJEMMOE**, **Liliane DONGMO**, **Martine YOUMOUE**, **Cyrille FOTSOP**, **Raïssa MASSAH**, **Gullit DEFFO**, **Gaël KAZE**, **Thierry TENE**, **Chancelin PECHEU**, **Ida KOUAM**, **Alex SOMBA** et **Honorine BOUGNA**. Nous avons passés de très beaux moments (paillasse, séminaires internes, fêtes).

✦ Ma profonde reconnaissance va à l'endroit de l'ensemble du **personnel du laboratoire CEISAM** et des **enseignants chercheurs du Département de Chimie de l'Université de Dschang** pour les efforts consentis pour mon encadrement et ma formation universitaire. Qu'ils trouvent ici toute mon estime et respectueuse gratitude.

✦ J'exprime particulièrement ma gratitude envers les professeurs **Théophile KAMGAING**, **Jean NGOUNE**, **Julius GHOGOMU** et **NJOYIM Estella épse TAMUNGANG** de l'Université de Dschang pour nos nombreuses discussions scientifiques et leurs motivations et encouragements sans faille tout au long de ces années de recherche.

✦ Mes amis sont cordialement pour leur patience et leurs encouragements les plus mélodieux. Je pense ainsi à **Alphonse KUESSOP**, **Bédier MEGUIANNI**, **Joël TADJUDJE** et **Aliance FOKOUA**. Je leur suis infiniment reconnaissant pour tous nos moments inoubliables passés ensemble. Ils ont été pour moi « *home when away from home* ».

✦ Mes camarades de promotion (***Promotion 2008***) sont tout particulièrement remerciés dans ce travail. Je pense aux Docteurs **Billy TOUSSIE**, **Francis NGOUAFONG, Aymard Didier TAMAFO**, **Ludovid NGOUO**, **Christian NGAKOU**, **Sorel DJEKOUA**, **Roméol KOAGNE**, **Yves Martial MBA**, **Borice TSAFACK** et **Raïssa NZOGONG**, ainsi qu'aux doctorants **Simon Yves DJOKO**, **Arnaud KAMDEM**, **Giscard DOUNGMO**, **François DAMEN**, **Hermann KUETE** et **Achile NANA**. Grandement merci pour votre soutien scientifique et moral qui fut indéfectible durant toutes ces années passées ensemble, et ce depuis nos premiers pas à l'Université ! *Une promotion c'est sacré, merci à vous tous pour tous ces moments !!!*

✦ Les Docteurs **Rufis TAGNE** et **Aurélien BOPDA**, ainsi que les doctorants **Brice ALONGAMO**, **Sédrick DJIOFACK**, **Cyrille ATEMKENG**, **Liouna AMOLA ADOUM**, **Serge NGOMADE** et **Yannick SAKAM**, recevez mes vifs remerciements mes bons grands et mes bons petits, avec vous j'ai passé un séjour agréable à l'URCHINGE. Bon courage et persévérance à ceux qui sont encore sur le chemin du Doctorat, c'est le travail qui paye les gars. Big up URCHINGE Family…Je vous portes en cœur….

✦ J'exprime profondément ma gratitude envers toute ma **famille**, pour son soutien moral et financier. Un immense merci à elle pour m'avoir accordé leur confiance et m'avoir permis de faire de longues études. Il serait injuste pour moi de ne pas citer mes sœurs ici. Il s'agit des **TONLEU** (**Ingrid**, **Yvette Alvine**, **Raïssa Irène**, **Anick**, **Fabiola** et **Davila)**. Elles m'ont permis d'achever cette thèse dans la joie et la bonne humeur. Je vous aime.

✦ Un merci tout particulier est adressé à ma nourrisse, maman **KENGMENI Elisabeth** à qui je dois une profonde reconnaissance pour son affection et ses efforts consentis pour mon épanouissement et ma réussite.

✦ À toi **Épiphanie Sidoine MATANG**, il n'y a pas des mots qui expliquent mes sentiments d'amour, de respect et d'appréciation. Je te remercie pour ta compréhension surtout ces derniers mois qui n'étaient pas du tout faciles. Que Dieu nous protège, notre petit ange également, la petite **Andréa Chloé**, certes, elle ne comprend rien maintenant mais j'espère qu'elle sera fière un jour de son père, comme je le suis du mien.

✦ Je prie toute personne qui a contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail de thèse de trouver ici, l'expression de ma profonde reconnaissance. Bien à vous.

Bonne lecture !!!



Le RCTT - L'Académicien

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes x

Glossaire xii

Introduction générale 1

Chapitre I. Généralités sur l'électrochimie et la spectrométrie de masse 5

I.1 Notions d'électrochimie : Théories, méthodes d'analyse et électrosynthèse organique .. 5

I.1.1 Réactions électrochimiques et processus aux électrodes 5

I.1.2 Mécanisme de transfert d'électron (s) et/ou de proton (s) 9

I.1.2.1 Généralités 9

I.1.2.2 Mécanisme général 10

I.1.3 Méthodes électrochimiques d'analyse en solution 11

I.1.3.1 La voltampérométrie cyclique (VC) et la voltampérométrie à balayage linéaire (VBL) 11

I.1.3.2 Chronoampérométrie (CA) et Chronocoulométrie (CC) : Electrolyse à potentiel contrôlé 14

I.1.4 Electrosynthèse organique : Définition et caractéristiques principales 15

I.2 Chromatographie en phase liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse (SM) : CL-SM 17

I.2.1 La spectrométrie de masse (SM) 17

I.2.1.1 Définition et principe général 17

I.2.1.2 Les sources d'ionisation 18

I.2.1.3 Les analyseurs de masse 20

I.2.1.3.1 Analyseur quadripolaire linéaire 21

I.2.1.3.2 Analyseur à Temps de Vol 22

I.2.1.4 Les détecteurs à ions 24

I.2.2 Spectrométrie de masse en tandem (SMSM ou SM^2) 24

I.2.3 Techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse 26

I.3 Couplage entre une cellule électrochimique (EC) et un spectromètre de masse (SM) : Voltampérométrie massique 28

I.3.1 Phénomènes électrochimiques *in-situ* des sources ESI 28

I.3.2 Principes et couplages à la SM 29

Chapitre II. Généralités sur les pesticides 33
II.1 Définition et classification 33
II.2 Toxicologie et écotoxicologie 35
II.2.1 Toxicologie : Impact sur l'Homme 35
II.2.2 Ecotoxicologie : Devenir/impact dans/sur l'environnement 37
II.3 Processus de dégradation des pesticides 38
II.3.1 La dégradation biotique 38
II.3.2 La dégradation abiotique 39
II.4 Réglementations 40
II.5 Pesticides étudiés et caractéristiques physico-chimiques 42
II.5.1 Les herbicides phénylurées 43
II.5.1.1 Structures chimiques 43
II.5.1.2 Mode d'action 44
II.5.1.3 Exemple de composé modèle : Le diuron 45
II.5.2 Les carbamates : La carbendazime (CBZ) 46

Chapitre III. Produits de transformation des pesticides - Aperçu des méthodes de simulation des dégradations environnementales 48
III.1 Méthodes de transformation et d'analyse des pesticides 50
III.1.1 Méthodes de métabolisme 50
III.1.2 Méthodes photochimiques 51
III.1.3 Méthodes Fenton 53
III.1.4 Méthodes électrochimiques et couplages EC-(CL)-SM 53
III.2 Techniques analytiques pour l'identification des PsT 55
III.3 Processus de transformation des pesticides 56

Chapitre IV. Mise en œuvre des méthodes analytiques et protocoles expérimentaux 62
IV.1 Mise en œuvre des couplages EC-SM et EC-CL-SM 62
IV.1.1 Types de cellules électrochimiques 62
IV.1.2 Types de couplages et paramètres expérimentaux 64
IV.1.2.1 Couplage EC-CL-SM 64
IV.1.2.2 Couplage EC-SM 64
IV.1.3 Paramètres expérimentaux 66
IV.1.4 Réactifs 67

IV.1.5 Matériel et méthodes expérimentales 67
IV.1.5.1 Voltampérométrie cyclique 67
IV.1.5.2 Electrolyse à potentiel contrôlé (en batch) : Couplage indirect EC-CL-SM . 68
IV.1.5.3 Voltampérométrie à balayage linéaire - électrolyse en flux : Couplage direct EC-SM 69
IV.1.6 Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse à haute résolution (CL-SMHR et CL-SM^{2}HR) 70
IV.1.7 Calculs de mécanique quantique 72
IV.1.7.1 DFT : Principes généraux 72
IV.1.7.2 Type de base et paramètres utilisés 74

Chapitre V. Résultats et discussion : Applications des couplages EC-SM et EC-CL-SM à la simulation de la dégradation environnementale de quelques pesticides électroactifs . 75

V.1 Comportement redox, dégradation oxydative et élucidation mécanistique de l'herbicide Diuron (DIU) par couplages EC-CL-SM et EC-SM 76
V.1.1 Comportement du diuron (DIU) en voltampérométrie et en spectrométrie de masse 76
V.1.1.1 Étude par voltampérométrie cyclique du comportement redox du DIU 76
V.1.1.2 Signaux en spectrométrie de masse du DIU 78
Diuron 78
V.1.2 Électrolyse à potentiel contrôlé du DIU 79
V.1.3 Analyses par CL-SMHR et CL-SMSMHR des solutions de DIU non oxydée et oxydées 80
V.1.3.1 Analyses préliminaires par CL-SMHR des solutions de DIU 80
V.1.3.2 Spectres de masse, composition élémentaire des produits d'oxydation électrochimique et voltampérométrie massique du DIU 82
V.1.3.2.1 Spectres de masse haute résolution des produits d'oxydation formés 82
V.1.3.2.2 Composition élémentaire du DIU et de ses produits d'oxydation 83
V.1.3.2.3 Voltampérométrie massique : Couplage direct EC-SM 84
V.1.4 Identification et élucidation structurale des produits d'oxydation du DIU 86
V.1.4.1 Composés aux *m/z* 215 (POD_1) et 213 (POD_2) $[M+H]^+$ 86
V.1.4.2 Composé au *m/z* 249 (POD_3) $[M+H]^+$ 90
V.1.4.3 Composés aux *m/z* 445 (POD_4) et 463 (POD_5) $[M+H]^+$: dimères 93
V.1.4.4 Composé au *m/z* 161,99 (DCA) $[M+H]^+$ 94

V.1.4 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale (biotique et abiotique)..... 95
V.1.5 Voies de dégradation du DIU après oxydation électrochimique..... 96
V.2 Dégradation environnementale et identification des produits de transformation de quelque herbicides phénylurées par couplages EC-CL-SM-*DFT* : Tendance générale..... 99
V.2.1 Etude par voltampérométrie cyclique du comportement électrochimique de différents herbicides..... 100
V.2.2 Identification des produits de dégradation : Composition élémentaire..... 102
V.2.3 Identification des produits de dégradation : Elucidation structurale..... 105
V.2.4 Mécanisme général de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées 109
V.2.5 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale des herbicides phénylurées..... 114
V.3 Comportement électrochimique, identification des produits générés et élucidation du mécanisme de dégradation de la Carbendazime (CBZ) par EC-CL-SM et EC-SM..... 116
V.3.1 Comportement redox de la CBZ..... 116
V.3.2 Identification des produits de dégradation de la CBZ..... 117
V.3.2.1 Formation des composés PDC_1, PDC_2 et PDC_3..... 118
V.3.2.2 Formation du composé PDC_6 : dimère..... 121
V.3.2.3 Formation du composé PDC_4..... 123
V.3.2.4 Formation du composé PDC_5..... 129
V.3.2 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale de la CBZ..... 129
V.3.3 Voies de dégradation proposées pour la CBZ..... 130

Conclusion générale..... 132

Annexes..... 135
Production scientifique et congrès..... 142
Liste des illustrations (figures, tableaux et schémas)..... 144
Références bibliographiques..... 150

Liste des abréviations et acronymes

AOEL : Dose d'exposition acceptable pour l'applicateur (de l'anglais ***A**cceptable **O**perator **E**xposure **L**evels*)

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique (de l'anglais ***A**tmospheric **P**ressure **C**hemical **I**onization*)

API : Ionisation à pression atmosphérique (de l'anglais ***A**tmospheric **P**ressure **I**onization*)

BDD : Carbone diamant dopé au bore (de l'anglais ***B**oron-**D**oped **D**iamont*)

CBZ : Car**B**enda**Z**ime

CE : **C**ellule **E**lectrochimique

CG : **C**hromatographie en phase **G**azeuse

CID : Dissociation induite par collisions (de l'anglais ***C**ollision **I**nduced **D**issociation*)

CIT : **C**ourant **I**onique **T**otal

CL : **C**hromatographie en phase **L**iquide

CPET : Transfert concerté d'électron et de proton (de l'anglais ***C**oncerted **P**roton-**E**lectron **T**ransfer*)

CV : **C**arbone **V**itreux

CYP450 : **CY**tochrome **P450**

DESI : Ionisation par désorption *Electrospray* (de l'anglais ***D**esorption **E**lectro**S**pray **I**onization*)

DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité (de l'anglais ***D**ensity **F**unctional **T**heory*)

DIU : **D**iuron

DJA : **D**ose **J**ournalière **A**dmissible

EC : **E**le**C**trochimie

ECS : **E**lectrode au **C**alomel **S**aturé en KCl

EPC : **E**lectrolyse à **P**otentiel **C**ontrôlé

ESI : Ionisation par électronébulation (de l'anglais ***E**lectro**S**pray **I**onization*)

FAB : Bombardement d'atomes rapides (de l'anglais ***F**ast **A**tom **B**ombardment*)

FT-ICR : Spectrométrie de masse à résonance d'ion cyclotronique et transformée de Fourier (de l'anglais ***F**ourier **T**ransform **I**on **C**yclotron **R**esonance mass spectrometry*)

FWHM : Largeur à mi-hauteur du maximum du pic (de l'anglais ***F**ull **W**idth at **H**alf **M**aximum*)

GSH : **G**lutathion

HAT : Transfert d'un atome d'hydrogène (de l'anglais ***H**ydrogen **A**tom **T**ransfer*)

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (de l'anglais ***H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

IC : **I**onisation **C**himique

IE : **I**mpact **E**lectronique

LMR : **L**imite **M**aximale de **R**ésidus

LTQ : Piège à ions quadripolaire linéaire (de l'anglais ***L**inear **T**rap **Q**uadrupole*)

***m/z* :** Rapport masse sur charge

MALDI : Désorption ionisation par laser assistée par matrice (de l'anglais ***M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onisation*)

MRM : Suivi des réactions multiples (de l'anglais ***M**ultiple **R**eaction **M**onitoring*)

PCET : Transfert conjoint d'un électron et d'un proton (de l'anglais ***P**roton **C**oupled **E**lectron **T**ransfer*)

PsT : **P**roduits de **T**ransformation

RP : Phase inversée (de l'anglais ***R**everse **P**hase*)

S/B : Rapport **S**ignal/**B**ruit

SET : Transfert d'un électron seul (de l'anglais ***S**ingle **E**lectron **T**ransfer*)

SM : **S**pectrométrie de **M**asse

SMHR : **S**pectrométrie de **M**asse à **H**aute **R**ésolution

SMSM ou **SM^2 :** Spectrométrie de masse en tandem, deux dimensions

TOF : Analyseur à temps de vol (de l'anglais ***T**ime **O**f **F**light*)

TQ : Piège à ions quadripolaire (de l'anglais ***T**rap **Q**uadrupole*)

TQ ou QqQ : Triple quadripôle (de l'anglais ***T**riple **Q**uadrupole*)

t_R : **T**emps de **R**étention

UHPLC : Chromatographie liquide à ultra-haute performance (de l'anglais ***U**ltra-**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

UPLC : Chromatographie liquide à ultra performance (de l'anglais ***U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography*)

VBL : **V**oltampérométrie à **B**alayage **L**inéaire

VC : **V**oltampérométrie **C**yclique

Glossaire

Ce glossaire explicite succinctement les termes en relation avec les pesticides et leurs transformations (réactions). Il rappelle également quelques termes liés à la toxicologie/écotoxicologie et la réglementation sur les pesticides.

Adventice : Espèce végétale étrangère à la flore indigène d'un territoire dans lequel elle est accidentellement introduite et peut s'installer (*botanique*) ou terme désigne une plante herbacée ou ligneuse indésirable à l'endroit où elle se trouve (*agronomie*). Il est aussi utilisé comme synonyme de mauvaise herbe.

Biodégradation : Décomposition partielle ou totale d'un produit par un agent biologique et qui conduit à l'élimination complète avec comme seuls rejets des produits simples tels H_2O, CO_2, CH_4, H_2, chlorures (pour un organochloré), ou encore de l'acétate et d'autres produits de fermentation. On parle de **biodégradabilité** si le composé à dépolluer est accessible, dans certaines conditions, à au moins une microflore.

Biotransformation : Transformation chimique d'un composé par un agent biologique. Cette notion implique généralement un métabolisme incomplet du substrat et non une véritable assimilation. Une oxydation, une hydrolyse, une déshalogénation, un méthylation, etc…, sont des biotransformations quand elles sont réalisées par un microorganisme.

Ces réactions peuvent consister dans le remplacement de l'halogène : soit par un ion H (**déshalogénation réductive**), soit par un ion OH (**déshalogénation hydrolytique**) : Elles peuvent également résulter dans l'enlèvement de l'halogène et d'un H adjacent (**deshydrodéhalogénation**)

Concentration létale 50 : La CL 50 par inhalation est la dose ou concentration du produit qui tue 50% des animaux d'expériences après une seule exposition dans des conditions d'études normalisées.

Conjugaison : Ce sont des réactions qui associent un composé courant des voies métaboliques à un composé toxique dont elles provoquent l'inactivation. Certains organismes peuvent conjuguer un fongicide de la famille des dithicarbamates avec de l'acide butyrique produisant une conjugaison moins toxique que le fongicide.

Déhalogénation ou déshalogénation : Élimination d'un (ou plusieurs atomes) d'halogène (Fluor, Chlore, Brome et Iode) d'un composé. Cette réaction détoxifie généralement certains

organochlorés, mais peut aussi conduire à la production de composés plus dangereux encore, tel le chlorure de vinyle.

Déméthylation et autres déalkylations : De nombreux pesticides contiennent des radicaux méthyl ou alkyl liés à un N- ou un O-. Une déalkylation du N- ou du O- généralement inactive ces pesticides. Dans le cas du Diuron, l'enlèvement d'un premier radical méthyl conduit au dérivé monométhylé nettement moins actif comme herbicide que le Diuron. L'enlèvement du second radical méthyl rend la molécule complètement inefficace.

Demi-vie : La demi-vie d'un composé dans un environnement donné est le temps nécessaire pour que sa concentration diminue de moitié. Cette valeur varie suivant les conditions physico-chimiques du biotope et en particulier suivant que le produit est placé en anaérobiose ou en aérobiose.

Dépollution : Élimination ou inactivation spontanée ou intentionnelle d'un polluant par des agents physiques, chimiques ou biologiques.

Détoxification : Destruction ou inactivation, spontanée ou provoquée, d'un composé toxique.

DL_{50} (en anglais LC_{50}) : Concentration moyenne d'un polluant (définie statistiquement) létale pour 50% des organismes exposés.

Dose Journalière Admissible : Quantité de substance qu'un être humain peut absorber quotidiennement sa vie durant sans effet néfaste pour sa santé. Elle s'exprime en mg/kg_poids_corporel/j. Elle est calculée en divisant la DES (Dose Sans Effet) par un coefficient de sécurité, en général de 100, pour tenir compte de la variabilité inter- et intra-espèce et, parfois, de 500 ou 1000 si des doutes sur la toxicité existent ; elle sert pour l'ensemble de la population.

Dose létale 50 : la DL 50 par mode d'absorption, orale ou cutané est la dose de produit qui tue 50 % des animaux d'expériences après une seule exposition dans des conditions d'études normalisées.

Dose Sans Effet observé : Quantité maximale de substance dont l'absorption quotidienne ne se traduit pas par des effets toxiques sur des animaux de laboratoire. Elle s'exprime en mg/kg_poids_corporel/j.

Fongicide : Pesticide destiné à lutter contre les parasites et les champignons pathogènes.

Herbicide : Pesticide destiné à éliminer les adventices des cultures.

Hydrolyse *:* Le clivage d'une liaison par addition d'eau est une réaction fréquente effectuée par les microorganismes et qui inactive un certain nombre de substances toxiques.

Hydroxylation : Addition d'un ion OH à une molécule. Cette réaction, appliquée à des composés aromatiques ou aliphatiques, les rend généralement moins toxiques.

Insecticide : Pesticide destiné à éliminer les insectes nuisibles.

Limite Maximale de Résidus (LMR) : Concentration maximale en résidus de produit phytopharmaceutique, officiellement fixée, tolérée dans une denrée alimentaire en l'état ou transformée, destinée à l'Homme ou aux animaux. Elle est exprimée en en mg/kg.

Log Kow : Le log Kow est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau). Il est égal au logarithme du rapport de la concentration de la substance étudiée dans l'octanol et l'eau. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. En effet, si le log Kow est positif et très élevé, cela exprime le fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile et inversement.

Minéralisation : Biodégradation dans laquelle l'étape ultime est la formation de CO_2. Cette notion implique généralement qu'une partie du composé a été assimilée par l'organisme concerné (et pour lequel il a constitué un substrat).

Persistance : Durée pendant laquelle les résidus d'un produit phytopharmaceutique sont détectables dans l'environnement.

Persistant (ou Récalcitrant) : Un composé est qualifié de récalcitrant ou de persistant quand son élimination par des voies biologiques est impossible (récalcitrant vrai), ou très lente … ou encore qu'il n'a pas encore été possible de mesurer sa vitesse de dégradation, tant elle est lente. Ces termes s'appliquent le plus souvent aux produits xénobiotiques, mais des composés naturels peuvent aussi être récalcitrants (exemple, l'humine). La persistance d'un composé est généralement estimée par le temps nécessaire pour que sa concentration initiale diminue de 90%. Cette valeur est approximativement égale à 3,5 fois la demi-vie.

Pesticide : Désignent l'ensemble des substances actives ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, de nuisibles et de champignons.

Pesticide de contact : Pesticide qui agit en surface.

Pesticide systémique : Pesticide qui agit après transfert à l'intérieur de la plante et diffusion par la sève.

Polluants émergents : Composés nouvellement détectés dans l'environnement, ils ne sont pas comme leur nom l'indique nouveaux.

Pollution (définition simplifiée) : Introduction dans un milieu de substances ou d'énergie susceptibles d'avoir des effets indésirables ou toxiques sur l'homme et son environnement. On distingue plusieurs types de pollution : **accidentelle** (déversement inhabituel - mais parfois volontaire - d'un produit indésirable) ; **cumulative** ("petits" déversements consécutifs dans le temps, conduisant à des teneurs finales dangereuses) ; **diffuse** (répartie sur une grande surface ou une grande profondeur ; inverse : ponctuelle : liée à une activité industrielle très localisée ou à un rejet non contrôlé).

Résidus de pesticides : Il s'agit d'une ou plusieurs substances présentes dans ou sur les végétaux ou produits d'origine végétale, des produits comestibles d'origine animale, ou ailleurs dans l'environnement et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leurs métabolites issus de la dégradation.

Toxicité aigüe : Effet résultant de l'administration d'une dose unique de la substance étudiée.

Toxicité chronique : Effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée longue, par exemple un ou deux ans.

Toxicité subaigüe : Effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée courte, par exemple une semaine.

Toxicité subchronique : Effet résultant de l'administration d'une dose ou de l'exposition quotidienne à une concentration de la substance étudiée pendant une durée moyenne, par exemple trois mois.

Xénobiotiques : (étrangers au monde vivant) désigne les composés qui ne sont pas représentés dans l'environnement ou chez les êtres vivants, en dehors de l'activité humaine. Composés organiques résultant de l'activité humaine (non naturel, et absent des biotopes naturels non pollués).

Introduction générale

Le devenir environnemental des xénobiotiques déversés dans l'environnement est une préoccupation récurrente depuis un certain nombre d'années. En particulier, les pesticides sont montrés du doigt chaque fois que des traces de telle ou telle molécule sont retrouvées dans les eaux, les sols, les sédiments, l'atmosphère, les aliments. Face à cette préoccupation, la loi conduisant à l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) des produits phytopharmaceutiques s'est très fortement durcie ces trente dernières années. Elle oblige entre autres les fabricants à réaliser de nombreux tests toxicologiques et éco-toxicologiques de ces derniers. Malgré la pertinence et l'intérêt de tels tests, ceux-ci ne sont pas encore à même de traduire toutes les situations environnementales ou de physiologie humaine, mais constituent tout de même une alternative certaine et probante, notamment dans la simulation et/ou la prédiction des dégradations environnementales des xénobiotiques. La mise sur le marché d'une nouvelle molécule (notamment un pesticide) formulée n'est donc pas des moindres pour les firmes actuelles et représente un engagement financier impressionnant de la part de ces derniers.

Les pesticides font partie des xénobiotiques qui sont largement utilisés dans le domaine agricole pour éliminer les mauvaises herbes, augmentant ainsi la disponibilité des cultures et diminuant le prix des aliments pour remédier aux pénuries alimentaires *(Ecobichon, 2001)*. Bien qu'ils aient de nombreux effets bénéfiques, leur mauvaise utilisation constitue un risque de contamination environnementale et une menace pour la santé humaine *(Bandžuchova et al., 2013)*. Une fois qu'ils sont introduits dans l'environnement et éventuellement dans les aliments, le composé d'origine peut être transformé en métabolites qui peuvent avoir des profils de toxicité différents. Cette transformation se déroule en deux étapes distinctes. La première étape (phase I) est celle où le composé xénobiotique est fonctionnalisé par oxydation, hydrolyse ou moins fréquemment réduction, conduisant à l'introduction par exemple des groupes hydroxyle, amino, carboxyle ou thiol dans la molécule (métabolites primaires). Dans la deuxième étape (phase II), ces métabolites primaires subissent des réactions de conjugaison avec des agents endogènes pour former des métabolites secondaires *(Levsen et al., 2005)*. Ces biotransformations, en particulier les réactions de phase I, ne conduisent pas toujours à l'inactivation (détoxification) du composé mais parfois à des composés plus actifs (bio-activation) ou encore plus toxiques (bio-toxification). En plus de la dégradation *in vivo* et environnementale, les activités humaines comme la cuisson des aliments et le traitement des eaux usées peuvent conduire à produire

des métabolites plus toxiques que le composé parent *(Zabaleta et al., 2018)*. Il est donc essentiel de prévoir ces dégradations, d'identifier les métabolites prédominants et de définir un marqueur représentatif pour suivre le devenir des pesticides dans l'environnement.

La méthode classique pour étudier les transformations de composés chimiques consiste à extraire les produits de dégradation provenant de l'humain/animal (*in vivo*), ou d'extraits cellulaires/microbiens (*in vitro*) et à les identifier *(Jahn et Karst, 2012)*. Comme toute analyse de matrice biologique, la préparation d'échantillons nécessaires pour l'indentification des métabolites est fastidieuse. De plus, les produits de dégradation peuvent être présents à une faible concentration, rendant plus difficile le travail d'identification et de caractérisation *(Wilber et Wang, 1997)*. Face à cette difficulté d'identification et de caractérisation des produits de dégradation, et en raison de la demande de techniques de criblage à haut débit pour la prédiction et la simulation du métabolisme des xénobiotiques, plusieurs alternatives aux matériaux biologiques ont été introduites *(Lohmann et Karst, 2008; Portychová et al., 2017)*. Parmi ces méthodes alternatives, l'électrochimie couplée à la chromatographie liquide et/ou à la spectrométrie de masse (EC-CL-MS et/ou EC-SM) a connu un regain d'intérêt ces dernières années. Les couplages EC-CL-SM et EC-SM peuvent fournir des informations rapides, fiables et détaillées sur les possibles métabolites, qui sont générés et identifiés dans le même système *(Faber et al., 2014; Jurva, 2004)*. Une détermination directe des intermédiaires et des métabolites instables à courte durée de vie est également possible sans interférence des matrices biologiques *(Büter et al., 2015; Lohmann et Karst, 2007)*. Ces méthodes offrent l'avantage de produire des molécules d'intérêt dans des matrices dites propres (ou simples) et permettent ainsi d'accéder à des quantités importantes de métabolites nécessaires aux analyses quantitatives ou toxicologiques. De plus, les techniques électrochimiques peuvent couvrir un large éventail de réactions grâce à l'utilisation de différents matériaux d'électrode et permettre une analyse rapide via un couplage en ligne et hors ligne (direct et indirect) à la spectrométrie de masse à ionisation par électronébulation *(Bussy et Boujtita, 2014; Faber et al., 2011; Johansson et al., 2007; Jurva et al., 2003; Nouri-Nigjeh et al., 2011)*.

Bien que les méthodes basées sur l'électrochimie ne simulent pas encore tous les processus identifiés *in vivo*, ces techniques offrent une grande vitesse d'analyse, une polyvalence vers l'automatisation et l'accessibilité à la fois financière et technique. Puisque les voies de dégradation par oxydation sont importantes aux niveaux microbien, humain et environnemental, les couplages EC-SM et EC-CL-SM sont donc une alternative permettant d'obtenir des produits de transformation par voie oxydative dans des solutions plus simples

(Diehl et Karst, 2002), facilitant ainsi l'interprétation et l'élucidation des structures chimiques *(Hoffmann et al., 2011)*. La plupart des travaux concernant le développement des méthodes EC-SM et EC-CL-SM sont consacrés au métabolisme oxydatif du foie des produits pharmaceutiques *(Bussy et al., 2015; Nowak et al., 2014)*. Leurs applications pour étudier le devenir des polluants environnementaux tels que les pesticides sont assez rares. Lohmann et co-auteurs ont simulé la substitution nucléophile de chlore et l'amination du pesticide boscalid *(Lohmann et al., 2009)*, ainsi que les métabolites conjugués de phase II (avec du glutathion). D'autres auteurs comme Mekonnen et collaborateurs *(Mekonnen et al., 2017, 2018a,b)* ont simulé les processus de biotransformation d'un fongicide (fluopyram) et d'un insecticide (chlorpyrifos) en utilisant la méthode EC-SM. Les travaux de Bussy et coauteurs quant à eux *(Bussy et al., 2014, 2015)* ont porté sur la simulation du métabolisme réductif en Phase I et phase II du pesticide TFM (3-trifluorométhyl-4-nitrophénol) par couplages EC-LC-SM.

Compte tenu des applications limitées que démontrent l'utilisation de l'électrochimie couplée à la spectrométrie de masse pour élucider le devenir environnemental des pesticides, ce travail vise à appliquer les techniques EC-SM et EC-CL-SM pour l'étude des produits de transformation des pesticides. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'exploitation de techniques analytiques et électroanalytiques, qui associées, autorisent l'élucidation des mécanismes redox de molécules d'intérêt agrochimiques. Par la génération électrochimique ("*online*" et/ou "*offline*") des produits d'oxydation de différentes molécules pesticides, suivie de leurs caractérisations et identifications par spectrométrie de masse, nous tentons d'apporter une réponse à certains défis posés. Ce travail de thèse consiste donc à démontrer, au moyen de l'étude de systèmes modèles, l'utilité et la complémentarité des techniques électroanalytiques hybrides dans la résolution des mécanismes oxydatifs relativement complexes, des substances agrochimiques susceptibles d'intervenir au niveau physiologique ou dans l'environnement. L'herbicide diuron (DIU) et d'autres herbicides de la même famille, ainsi que le fongicide carbendazime (CBZ) ont été choisi comme composés modèles pertinents pour estimer la capacité de l'électrochimie à simuler/mimer les dégradations environnementales. Une attention particulière a été accordée au piégeage et à l'identification d'intermédiaires réactifs (quinones, quinones imine, ions nitrenium, époxydes, arène oxydes), à l'identification des mécanismes de réactions et à la proposition des voies de dégradations oxydatives.

Les travaux de cette thèse sont présentés à travers cinq chapitres. Le premier chapitre présente les principes fondamentaux de l'électrochimie, les méthodes électrochimiques d'analyse en solution et l'électrosynthèse organique. Par la suite quelques notions essentielles en spectrométrie de masse seront abordées, notamment les sources d'ionisation, les types

d'analyseurs de masse et les détecteurs à ions. Enfin la spectrométrie de masse tandem (SMSM ou SM^2), les techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse ainsi que le couplage entre une cellule électrochimique et un spectromètre de masse seront également abordées.

Le second chapitre présente un état des connaissances organisées autour des pesticides de manière générale, et en particulier ceux retenus pour cette étude : les herbicides de la famille des phénylurées et les fongicides de la famille des carbamates et benzimidazoles. La nature des composés, l'étude des sources, de l'occurrence et du devenir de ceux-ci au sein des systèmes environnementaux seront détaillés afin de dégager les enjeux majeurs pour chaque famille de composés et d'inscrire ces travaux dans des éléments de contexte pertinents.

Le troisième chapitre se focalisera sur l'aperçu des méthodes de simulation des dégradations environnementales, à savoir les méthodes de métabolisme, les méthodes photochimiques et de Fenton, les méthodes électrochimiques. Les techniques couplages EC-SM (Électrochimie - Spectrométrie de Masse) et EC-CL-SM (Électrochimie - Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse) seront mis en exergue. Les techniques analytiques pour l'identification des produits de transformation ainsi que les processus de transformation des pesticides seront également décrits.

Dans le quatrième chapitre, les réactifs, le matériel et les détails méthodologiques des différentes techniques/méthodes instrumentales utilisés durant ce travail seront présentés et spécifiés. De plus, un bref rappel sera fait sur la mise en œuvre des couplages EC-SM et EC-CL-SM ainsi que des conditions expérimentales et paramètres expérimentaux adaptés tant au dispositif électrochimique qu'au spectromètre de masse.

Quant au cinquième chapitre, il sera entièrement consacré à l'interprétation et la discussion des résultats expérimentaux et théoriques, et comprendra dans l'ordre l'étude par voltampérométrie cyclique du comportement électrochimique de différents pesticides, l'électrosynthèse à travers la coulométrie à potentiel contrôlé, et enfin l'analyse des anolytes par spectrométrie de masse (simple et tandem). Le couplage en ligne EC-SM a permis de proposer des mécanismes de dégradation électrochimique plausible, et les études théoriques complémentaires ont été réalisées par des calculs *DFT* (théorie de la fonctionnelle de la densité, *Density Functional Theory*) pour appuyer les résultats obtenus. La dernière partie du manuscrit sera dédiée à la conclusion pouvant être tirée des différents résultats exposés ainsi qu'à la présentation de quelques perspectives.

Chapitre I. Généralités sur l'électrochimie et la spectrométrie de masse

I.1 Notions d'électrochimie : Théories, méthodes d'analyse et électrosynthèse organique

L'électrochimie est une discipline à l'interface entre la physique et la chimie qui étudie l'interconversion entre l'énergie électrique et l'énergie chimique par le biais des processus de transfert d'électrons principalement à l'interface de deux milieux. L'un de ces milieux est une électrode, la plupart du temps de nature métallique, tandis que l'autre peut varier de par sa nature (gaz, liquide ou solide). Elle a donc pour objet l'étude des phénomènes aux interfaces entre des conducteurs électroniques (métaux, polymères conducteurs) et des conducteurs ioniques (solutions électrolytiques, sels fondus, électrolytes solides) *(Bard et Faulkner, 2001a)*.

Avant d'explorer l'apport de l'électrochimie dans le domaine environnemental, et plus particulièrement dans l'étude des processus de transformations biotique et abiotique des pesticides, il est utile, dans un premier temps, de rappeler quelques concepts fondamentaux.

I.1.1 Réactions électrochimiques et processus aux électrodes

Une réaction électrochimique est une réaction d'échange d'électrons qui se déroule à la surface d'une électrode. Dans tous processus électrochimiques, on relève plusieurs types de phénomènes associés à un transfert de charges électriques aux interfaces électrodes (conduction électronique) - électrolyte (conduction ionique). Lors de ce transfert de charges, on assiste à une transformation chimique : l'oxydoréduction. Ces réactions d'oxydation et de réduction obéissent au schéma réactionnel suivant :

$$\mathrm{Re}\,d \underset{\mathrm{Re}\,duction}{\overset{Oxidation}{\rightleftarrows}} Ox + ne^{-}$$ ……..…...……..….***Equation I. 1***

Dans cette réaction, Ox et Red représentent respectivement les formes oxydée et réduite de l'espèce électroactive, e^- l'électron et n le nombre d'électrons échangés. Les électrons se déplacent entre les électrodes à travers un circuit extérieur et l'équilibre de charge est compensé par le mouvement d'ions dans la solution électrolytique *(Bard et Faulkner, 2001a)*.

Lors d'une réaction électrochimique, il s'établit un potentiel d'électrode. Son expression à l'équilibre thermodynamique $E_{éq}$ est donnée par la relation de Nernst :

$$E_{éq} = E^{0} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}^{Sol}}{C_{\mathrm{Red}}^{Sol}} \quad \text{……..…..…Equation I. 2}$$

E^0 est le potentiel standard du couple Ox/Red, R la constante des gaz parfaits (8,314 J/mol/K), T la température (en K), F la constante de Faraday (96485 C/mol), C_{Ox}^{Sol} et C_{Red}^{Sol} les concentrations en Ox et Red dans la solution respectivement.

Dans le cas particulier où des protons participent à la réaction (avec p le nombre de protons impliqués comme réactifs), E^0 est remplacé dans l'équation I.2 par le potentiel standard $E^{0'}$ et cette équation devient :

$$E_{éq} = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}^{Sol}}{C_{\mathrm{Red}}^{Sol}}; Avec \cdot E^{0'} = E^{0} - \frac{p}{n} \times \frac{RT}{F} pH \quad \text{…….……..Equation I. 3}$$

Le pH est donc une grandeur importante en électrochimie car il module le potentiel de ces réactions. De plus, certaines espèces électroactives possèdent également des propriétés acido-basiques et la proportion de chacune des formes est également modulée par le pH (en relation avec le pK_a du couple acido-basique) *(Wang, J., 2006a)*.

Le potentiel d'équilibre n'est mesurable que lorsque le courant I dans la solution est nul. Dès lors qu'il existe un courant dans la solution, le potentiel E ≠ Eéq et le système Ox/Red devient complet. L'existence d'une différence de potentiel à l'équilibre pour l'interface électrode/électrolyte est donc liée à la différence des niveaux de Fermi de l'électron à potentiel nul dans les deux milieux. Cela se traduit par une valeur particulière du potentiel d'électrode *Eéq* permettant de réaliser l'équilibre électrochimique, c'est-à-dire l'égalité des niveaux de Fermi de part et d'autre de l'interface : $E_{Fermi} = E_{Fermi}^{Redox}$. En ce qui concerne la réactivité nucléophile/électrophile, le caractère donneur ou accepteur d'électron d'une molécule est fortement dépendant de l'énergie des orbitales frontières, à savoir la HO (plus haute orbitale occupée) et la BV (plus basse orbitale vacante). De ce fait, si un potentiel est imposé à l'électrode, le niveau de Fermi de celle-ci va être modifié. On peut donc établir que le caractère oxydant est généralement associé à l'énergie de l'orbitale BV (il sera d'autant plus marqué lorsque la BV sera basse en énergie), et le caractère réducteur à l'énergie de l'orbitale HO (il sera plus marqué lorsque la HO sera haute en énergie) *(Miomandre et al., 2014a)*.

En électrochimie analytique et plus particulièrement en voltampérométrie, il est important de pouvoir interpréter les courbes courant-potentiel I = f(E) (ou densité de courant-

potentiel J = f(E)) en fonction de la composition de la cellule d'électrolyse. La loi de Faraday permet de relier la quantité de matière électrolysée Ni (en mol) à la quantité d'électricité Q (en Coulomb) avec F la constante de Faraday (96485 C/mol) et n le nombre (sans unité) d'électrons impliqués dans la réaction.

$$N_i = N_{Ox} = N_{Red} = \frac{Q}{nF} \quad \text{……..……..…..…}\textbf{\textit{Equation I. 4}}$$

Le courant I étant la quantité d'électricité par unité de temps (t), la vitesse globale de réaction électrochimique $v_{globale}$ peut être définie par l'équation I.5, avec A l'aire de l'électrode de travail et J la densité de courant.

$$v_{globale} = \frac{dN_i}{dt} = \frac{I}{nFA} = \frac{J}{nF} \quad \text{……...…....}\textbf{\textit{Equation I. 5}}$$

Différents facteurs (transfert de charge, transport de matières, réactions chimiques et de surface) influencent la vitesse de réaction électrochimique et donc le courant :

- Le transfert de charge (vitesse d'échange d'électrons au niveau de la surface de l'électrode) : Le transfert d'électrons de l'électrode vers les espèces électroactives ou inversement. Décrit par la loi de Butler-Volmer, ce phénomène implique que le courant évolue de façon exponentielle en fonction de la surtension appliquée à l'électrode de travail. Il dépend de la nature de l'électrode de travail *(Bard et Faulkner, 2001a ; Wang, J., 2006a)*.

- Le transport de masse (vitesse à laquelle sont renouvelées les espèces de la solution vers l'électrode) : Le transport des espèces électroactives vers l'interface électrode-électrolyte. Ce transport peut être assuré par :

- La migration : mouvement des espèces chargées sous l'influence d'un gradient de potentiel électrique (ou d'un champ électrique) ;

- La diffusion : mouvement d'une espèce sous l'influence d'un gradient de potentiel chimique (ou gradient de concentration). L'espèce se déplace des régions les plus concentrées vers les régions les moins concentrées. La réaction électrochimique modifie les concentrations en espèces actives au voisinage de l'électrode ;

- La convection : mouvement d'une espèce sous l'action de forces de pression, agitation ou transport hydrodynamique.

NB : 1- Le transport par migration n'est pas nécessairement un mode de transport important pour l'espèce électroactive en milieu aqueux malgré qu'elle soit chargée. Pour un électrolyte

relativement conducteur, le transfert de charges par migration au sein de la solution est donc principalement assuré par les espèces ioniques constituant l'électrolyte, plutôt, que par l'espèce électroactive, dont la contribution au flux de migration est rendue négligeable. Dès lors, le transfert de masse de l'espèce électroactive peut être considéré comme s'effectuant exclusivement par diffusion et convection.

2- Il est à noter qu'en voltammétrie le transport a lieu par diffusion (car la migration et la convection peuvent être négligées sous certaines précautions expérimentales) et il est décrit par les lois de Fick. Le courant est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce électroactive si la couche de diffusion est d'épaisseur constante (régime de diffusion stationnaire). En revanche, le courant décroit avec $t^{-1/2}$ dans le cas d'un régime de diffusion naturelle (loi de Cottrell) car l'épaisseur de la couche de diffusion est variable.

- Les réactions chimiques : Les réactions chimiques pouvant intervenir avant et/ou après la réaction électrochimique (complexation, protonation, échange ionique, oxydoréduction).

- Les réactions de surface : L'adsorption du réactif sur l'électrode et la désorption du produit de réaction, ou encore la cristallisation du produit de réaction sur l'électrode par exemple.

La figure I.1 ci-dessous résume les différentes étapes du processus électrochimique au niveau d'une électrode.

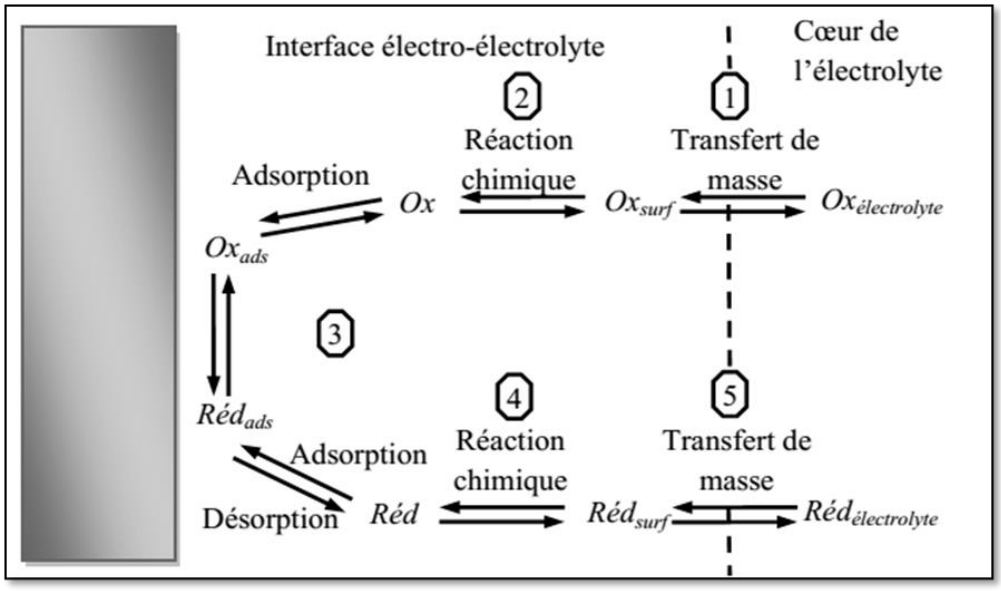


Figure I. 1: *Description des différentes étapes du processus électrochimique au niveau d'une électrode.*

La première étape **(1)** est le transfert de la matière électroactive, *Ox*, vers la surface de l'électrode. Lors de la deuxième étape **(2)**, l'espèce électroactive subit une désolvatation ou une décomplexation éventuelle. L'étape électrochimique **(3)** comprend alors, en général, plusieurs sous-étapes souvent difficilement identifiables de manière isolée, à savoir : l'adsorption sur électrode de l'entité qui va participer au transfert de charge, le transfert d'électrons proprement dit avec les modifications moléculaires que cela implique, les réarrangements qui peuvent, éventuellement, provenir du transfert de charge et la désorption du produit de la réaction électrochimique. La réaction éventuelle des produits de la réaction électrochimique constitue la quatrième étape (4). La dernière étape (5) consiste enfin au transfert de masse du produit depuis l'interface vers le cœur de l'électrolyte *(Miomandre et al., 2014a)*.

I.1.2 Mécanisme de transfert d'électron (s) et/ou de proton (s)

I.1.2.1 Généralités

Dans cette étude, nous étudions les réactions qui sont initiées par un transfert électronique. Ce transfert peut se faire de façon concertée ou non avec le transfert d'un proton, aboutissant ainsi à des espèces cationiques radicalaires, radicalaires ou tout simplement cationiques. Une connaissance de ce type de transfert est un plus pour l'élucidation du mécanisme de dégradation par voie électrochimie.

Le *PCET* (*Proton Coupled Electron Transfer*) est le terme générique désignant les réactions chimiques impliquant le transfert conjoint d'un électron et d'un proton, de façon concertée ou non.

Le *CPET* (*Concerted Proton-Electron Transfer*) désigne quant à lui, le processus concerté de transfert d'électron (*ET*, *Electron tranfer*) et de proton (*PT*, *Proton Transfer*). Lors de ce type de réaction, l'électron et le proton sont transférés au cours de la même étape cinétique. Contrairement à un mécanisme non concerté, le système ne passe pas par un intermédiaire radicalaire (résultant d'un transfert d'électron simple) ou ionique (résultant uniquement d'un transfert de proton) *(Hang et al., 2007)*.

Suivant les systèmes, les directions de propagation de l'électron et du proton peuvent être différentes. Le *PCET* peut être orthogonal (les accepteurs de proton et d'électron sont différents et la charge négative de l'électron n'est pas compensée par l'arrivée de proton) *(Mayer, 2004)* ou convergeant (les directions de propagation sont les mêmes, l'accepteur de

proton et d'électron est la même molécule). Ce processus de *PCET* convergeant est également appelé *HAT* (*Hydrogen Atom Transfert*) *(Mayer, 2011)*.

I.1.2.2 Mécanisme général

Le *PCET* est formellement la combinaison du transfert de deux particules chargées, un électron (charge négative) et un proton (charge positive) au sein d'un système moléculaire. La modification de la structure électronique de ce système suite à ces transferts entraine des changements importants au niveau de sa réactivité. Pour un *PCET*, le mouvement du proton va altérer les potentiels d'oxydo-réduction, et le mouvement de l'électron va, quant à lui, fortement influencer les propriétés acido-basiques du système.

Une fois ces possibilités d'altération comprises, le mécanisme *PCET* peut être décrit de manière exhaustive. Le diagramme dit « diagramme en carré » (figure I.2) est alors utilisé. Formellement ce diagramme montre toutes les possibilités de réaction avec un transfert d'électron et de proton. Les voies passant par les côtés du carré représentent les possibilités de transférer les particules l'une après l'autre. Dans ce cas, un intermédiaire réactionnel radicalaire pour un transfert initial d'électron, et ionique pour un transfert initial de proton sera identifiable.

En opposition, la diagonale du carré ne permet pas d'identifier les intermédiaires résultant du transfert d'une des deux particules. Le double transfert suivant cette diagonale se déroule donc de façon synchronisée. Il existe deux types de diagramme suivant que l'accepteur de proton et d'électron soit la même molécule (figure I.2a) ou non (figure I.2b).

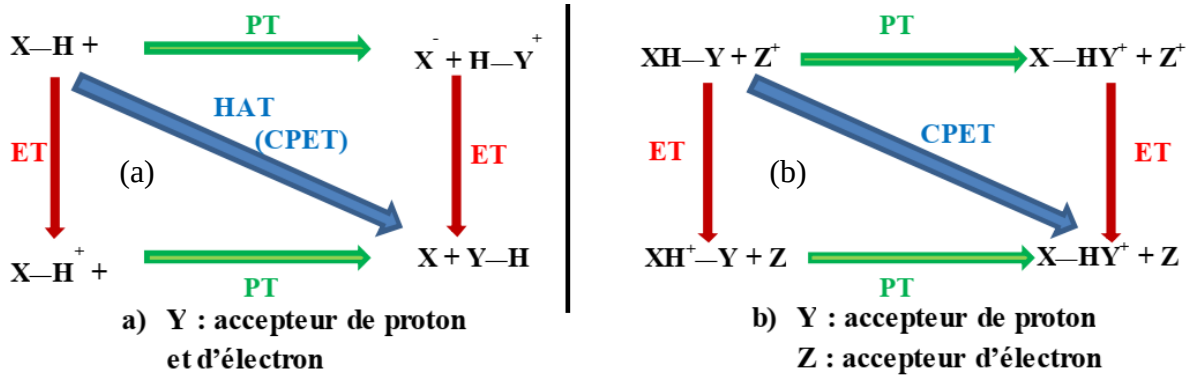


Figure I. 2: *Schéma des mécanismes limites pour un transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et un CPET (Mayer, 2004).*

Ce schéma établi, les énergies des différents intermédiaires radicalaires et ioniques peuvent être calculées. Le résultat de ces estimations montre que, dans beaucoup de cas, l'énergie nécessaire au *CPET* (le chemin concerté) est inférieure aux chemins non concertés.

Toutefois, lors d'un *PCET*, les propriétés acido-basique et oxydo-réductrice sont fortement affectées *(Mayer, 2004 ; Mayer et Rhile, 2004)*.

I.1.3 Méthodes électrochimiques d'analyse en solution

Lors de cette étude, différentes techniques électrochimiques ont été utilisées. Cette section sert de référence quant à l'utilisation de ces techniques, leurs principes ainsi que les calculs associés. Pour ces différentes techniques électrochimiques employées, on utilise un montage à trois électrodes (soit à un seul compartiment, soit à deux compartiments), lesquelles sont reliées à un potentiostat. Ce montage comprend une électrode de travail (électrode indicatrice ou de mesure), une électrode de référence et une contre-électrode (électrode auxiliaire). En fonction du paramètre qui est contrôlé et de celui qui est mesuré, on peut ainsi distinguer plusieurs méthodes, mais seules celles utilisées dans le cadre de cette étude seront présentées :

- La voltampérométrie ou voltammétrie : Le potentiel est balayé en fonction du temps et le courant est mesuré en fonction du potentiel (ou du temps), les deux (potentiel et temps) étant reliés par la vitesse de balayage) *(Bard et Faulkner, 2001b)*.

- La chronocoulométrie et chronoampérométrie (électrolyse à potentiel contrôlé) : le potentiel est maintenu constant et le courant est mesuré en fonction du temps, permettant de déterminer la charge électrique échangée *(Bard et Faulkner, 2001c)*.

I.1.3.1 La voltampérométrie cyclique (VC) et la voltampérométrie à balayage linéaire (VBL)

La voltampérométrie cyclique ou voltammétrie cyclique, ou encore cyclovoltammétrie fait partie des méthodes électrochimiques les plus couramment utilisées. C'est une technique expérimentale permettant l'étude de systèmes électrochimiques en régime de diffusion pure (la solution n'étant pas agitée) ou celle d'espèces adsorbées. Elle constitue une méthode de choix pour acquérir simplement et rapidement des informations sur les processus redox, la cinétique des réactions de transfert de charge ou la réversibilité d'un système électrochimique. Elle permet également d'approfondir les mécanismes des réactions, notamment en mettant en évidence la présence d'une espèce adsorbée ou en étudiant l'effet d'une réaction chimique couplée *(Zoski, 2007)*.

Le principe de la voltampérométrie est d'imposer une rampe linéaire de potentiel à la surface de l'électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le balayage de potentiel s'effectue linéairement entre deux valeurs de potentiel : de Ei, potentiel initial,

jusqu'à Ef, potentiel limite/final, suivi d'un retour au potentiel initial. La réponse des espèces électroactives à cette rampe de potentiel génère un courant qui sera mesuré entre l'électrode de travail et la contre électrode. L'analyse de ce courant peut nous renseigner sur la cinétique du transfert électronique à l'interface électrode/solution. Dans le cas d'un système réversible pour lequel le transport de matière est assuré seulement par la diffusion, on obtient un voltampérogramme (I = f(E)) caractéristique présenté sur la figure I.3 *(Wang, J., 2006b)*.

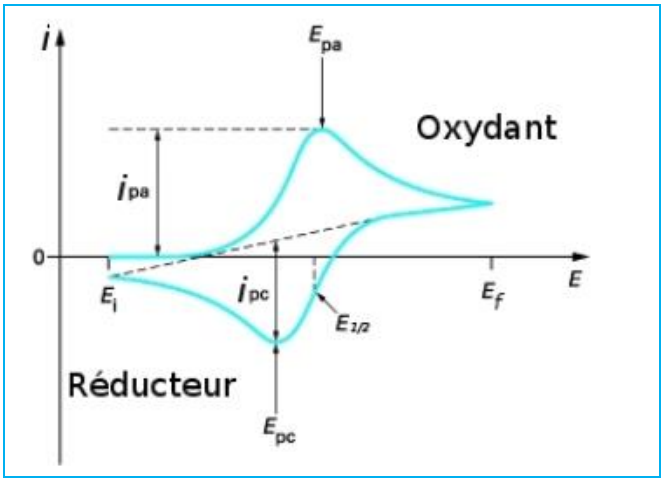


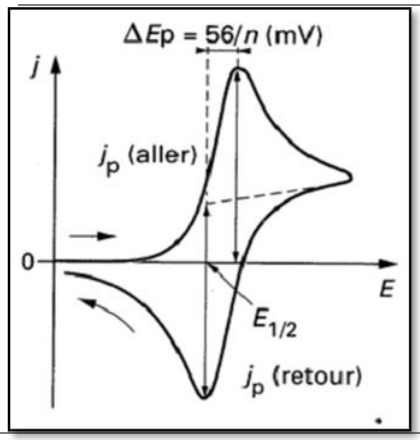
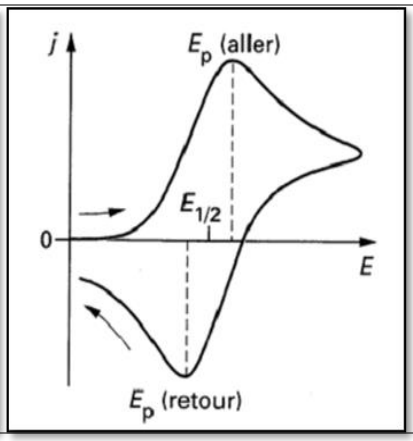
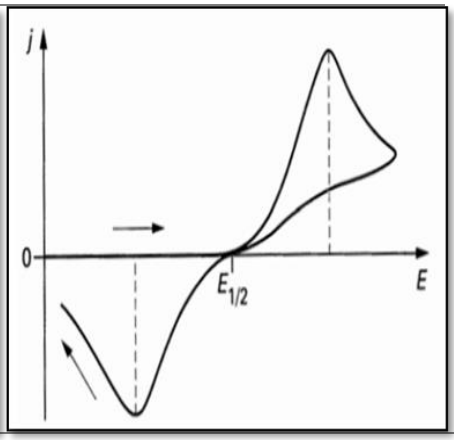
Figure I. 3: *Allure typique d'un voltampérogramme cyclique annoté avec ses valeurs caractéristiques.*

Les valeurs de potentiel associées aux pics d'oxydation i_{pa} et de réduction i_{pc} sont dénommées E_{pa} et E_{pc}. La moyenne algébrique de ces deux valeurs permet de déterminer $E_{1/2}$, qui est le potentiel caractéristique du couple oxydant/réducteur étudié. Si l'on considère une espèce Ox présente en solution au départ, le pic de courant obtenu au balayage aller traduit la réduction de Ox en Red avec $i < 0$. Quant au balayage retour, il traduit l'oxydation de l'espèce Red en Ox avec $i > 0$.

En diffusion naturelle pure, l'augmentation du potentiel provoque une hausse du courant, qui se traduit par une augmentation du gradient de concentration en espèces électroactives à la surface de l'électrode. Cependant, ici la couche de diffusion n'est pas contrôlée et évolue naturellement durant la réaction électrochimique. Lorsque le courant atteint un pic maximum, cela signifie que le gradient de concentration est maximal et qu'ainsi la concentration en espèces électroactives est nulle à la surface de l'électrode. Suite à ce pic, la diminution du courant s'explique par l'influence du phénomène de diffusion, qui s'avère être le facteur limitant ici. Toutefois, l'évolution du courant avant d'atteindre le pic est très influencée par la cinétique électronique, ce qui nous permet de caractériser le système en mesurant la valeur de k^0 (constante de vitesse hétérogène). Le balayage retour nous permet de

caractériser la réversibilité électrochimique du système étudié *(Bard et Faulkner, 2001b ; Wang, J., 2006b)*.

L'allure et la forme du voltampérogramme cyclique dépendent de la nature et de la rapidité du système électrochimique considéré (rapide, quasi-rapide ou lent). Il existe des critères permettant de différencier ces différents systèmes en voltampérométrie cyclique *(Zoski, 2007)*.

Système rapide	**Système quasi-rapide**	**Système lent**
		
• ΔEp = Epa – Epc = 59/n (mV); n est le nombre d'électrons échangés Epa et Epc sont indépendants de la vitesse de balayage v Jpa/Jpc = 1 ; Jp varie en $v^{1/2}$ Randles-Sevcik: $Jp = (2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}v^{1/2}C^*$	• ΔEp = Epa – Epc > 59/n (mV) et augmente avec v jp augmente avec v mais n'est pas proportionnel à $v^{1/2}$ Randles-Sevcik: $Jp = (2,69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Kv^{1/2}C^*$	• Epa et Epc sont fonction de v et ΔEp augmente avec cette vitesse de balayage v Jpa/Jpc ≠ 1 ; Jp varie en $v^{1/2}$ Randles-Sevcik: $Jp = (2,99 \times 10^5)\alpha^{1/2}n^{3/2}AD^{1/2}v^{1/2}C^*$

Avec C* : concentration de l'espèce électroactive en solution (mmol/L) ; A : surface de l'électrode (cm^2) et D : coefficient de diffusion ($cm^2 \cdot s^{-1}$) ; α : coefficient de transfert ; K : constante de vitesse

Figure I. 4: *Allure typique des voltampérogrammes cycliques à différents systèmes (rapide, quasi-rapide ou lent) et critères permettant de les différencier.*

NB : La voltampérométrie à balayage linéaire (VBL) à un principe semblable à celui de la voltampérométrie cyclique, la seule différence est qu'au cours de la VBL il n'y a pas retour de potentiel vers le potentiel initial Ei.

En voltampérométrie, le potentiel mesuré au niveau de l'intensité maximale du courant est appelé potentiel de pic. Cette valeur est assimilée au potentiel de réduction (ou d'oxydation) de la molécule et donc au potentiel à appliquer en électrosynthèse.

I.1.3.2 Chronoampérométrie (CA) et Chronocoulométrie (CC) : Electrolyse à potentiel contrôlé

La chronoampérométrie est une électrolyse, qui consiste en l'application d'un potentiel constant sur l'électrode de travail immergée dans une solution et à l'enregistrement de la variation de courant obtenue au cours du temps. Si une espèce électroactive s'oxyde ou se réduit au potentiel appliqué, une décroissance de la densité de courant avec le temps est observée. Dans le cas d'un régime de diffusion pure et pour des durées de manipulation de quelques dizaines de secondes, cette décroissance de courant suit la loi de Cottrell (équation I.6). Dans ce cas, la concentration en solution de l'espèce oxydée ou réduite est invariable (microélectrolyse).

$$i = \frac{nFD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad \text{.....Equation I. 6}$$

Dans cette équation. i : densité de courant ($A.cm^{-2}$), n : nombre d'électrons échangés, F : constante de Faraday 96485 (C.As), D: coefficient de diffusion ($cm^2.s^{-1}$), C: concentration ($mole.cm^{-3}$) et t: temps (s).

Au contraire, l'application d'un potentiel durant une longue période (macroélectrolyse) entraîne une modification de la composition de la solution. La concentration de l'espèce en solution diminue en fonction du temps, la loi de Cottrell n'est alors plus applicable. Cette technique peut donc être utilisée pour suivre les variations de concentration d'une espèce, dans une cellule en flux ou à deux compartiments par exemple *(Bard et Faulkner, 2001c ; Wang, J., 2006b)*. Dans notre cas, cette technique nous permet de réaliser une électrolyse à un potentiel donné pendant un temps défini.

La chronocoulométrie est en fait la même technique mais avec le suivi de la charge électrique échangée en fonction du temps, ce qui revient à tracer l'intégration du courant car I = dQ/dt. A des temps d'électrolyse suffisamment longs ou dans le cas où le ratio de l'aire

de l'électrode de travail sur le volume de la solution électrolytique est suffisamment important, l'espèce est consommée significativement et le courant décroit en fonction du temps. Ainsi la coulométrie totale, c'est-à-dire la consommation par électrolyse de toute l'espèce dans la solution, est une manière usuelle de déterminer soit le nombre d'électrons échangés lors de la réaction, soit la concentration initiale de l'espèce par application de la loi de Faraday (équation I.4). En théorie, l'électrolyse est totale lorsque la charge échangée Q n'évolue plus (ce qui revient à I = 0). En pratique, I revient rarement à 0 à cause du courant résiduel subsistant. Une correction de la charge échangée prise en compte pour les calculs est alors réalisée par soustraction de la charge due au courant résiduel. La mesure de Q permet ainsi d'atteindre le nombre d'électrons échangés (ne) en opérant sur une masse connue de substrat, ou encore la masse du substrat si le nombre d'électrons échangés est connu *(Bard et Faulkner, 2001c)*.

I.1.4 Electrosynthèse organique : Définition et caractéristiques principales

L'électrosynthèse organique est une technique qui permet de préparer une grande diversité de molécules organiques par des réactions de réduction (à la cathode) et d'oxydation (à l'anode). C'est une méthode qui présente de nombreux avantages en synthèse. Tout d'abord, c'est une technique sélective ; en effet, pour une molécule possédant plusieurs groupements réductibles ou oxydables, le contrôle du potentiel correspondant à l'oxydation ou la réduction de la fonction ciblée est possible alors qu'il pourra être plus difficile de trouver un oxydant ou réducteur chimique sélectif. De même, si un composé possède plusieurs degrés d'oxydation ou de réduction accessible, il sera beaucoup plus facile par voie électrochimique de générer un état d'oxydation ou de réduction précis que par une voie plus classique. Un autre facteur qui peut être vu comme un avantage est la possibilité d'avoir un contrôle de la cinétique d'une réaction par modulation du potentiel appliqué à l'électrode de travail. Au lieu d'augmenter la température du milieu réactionnel, on pourra, par exemple, pour accélérer une réaction de réduction appliquer un potentiel plus négatif (cathodique) ou pour une réaction d'oxydation, un potentiel plus positif (anodique) que celui de la liaison ou fonction à réduire ou oxyder. Par la quantification possible du nombre d'électrons introduits (ou ôtés) à un système, il est envisageable de pouvoir déduire le nombre et la nature des étapes nécessaires à une transformation chimique *(Chaussard, 1991; Miomandre, 2014b)*.

Les espèces formées peuvent réagir soit sur elles-mêmes, soit sur le substrat de départ, soit sur les constituants du milieu (solvant, acide, base), soit sur des réactifs spécialement ajoutés (électrophiles, nucléophiles), pour conduire à des produits stables intéressants. Elles

peuvent aussi être l'objet de nouveaux transferts électroniques. La composition du milieu (électrodes incluses) doit donc répondre à deux exigences. D'une part, être compatible avec le processus électrochimique proprement dit (c'est-à-dire ne pas être plus facilement réductible ou oxydable que le substrat à traiter), d'autre part, orienter le mécanisme dans le sens de l'obtention du dérivé souhaité *(Chaussard, 1991)*.

Bien que performante, cette méthode présente également quelques limites. Malgré son grand spectre de composés oxydables ou réductibles, il faut que leurs potentiels restent dans la gamme des potentiels accessible dans les solvants, et qui soit toléré par les électrodes. Les groupements ne rentrant pas dans cette fenêtre ne pourront pas subir une réaction électrochimique, bien qu'un choix judicieux du solvant permette de réaliser des réactions à des potentiels fortement cathodiques ou anodiques. Une autre limitation de cette méthode réside dans le fait que l'on réalise des réactions de surface. Cela peut avoir plusieurs conséquences préjudiciables ; Premièrement, pour la montée en échelle d'une réaction, il faudra augmenter la taille de l'électrode, qui à grande échelle pourrait apparaitre problématique ; Une solution pourrait être apportée par l'usage d'électrodes poreuses ; Deuxièmement, des phénomènes d'absorption peuvent être constatés ce qui peut avoir un effet sur une réactivité ; Et enfin, dans le cas d'une réaction où un radical intermédiaire serait plus facile à oxyder ou à réduire que le substrat, celui-ci serait directement réduit ou oxydé de façon à former une espèce potentiellement inactive ou ayant une réactivité non désirée ; Une solution pourrait être apporté par l'emploi d'un médiateur redox ou par la modification de la surface des électrodes *(Chaussard, 1991 ; Miomandre, 2014b)*.

L'électrochimie est une bonne méthode pour étudier des réactions faisant intervenir des transferts électroniques car permet d'obtenir des espèces oxydées ou réduites sans ajout d'agent oxydant ou réducteur. Cependant, les méthodes électrochimiques seules (voltampérométrie cyclique, chronoampérométrie, chronocoulométrie), si elles renseignent sur les transferts électroniques, ne permettent pas d'obtenir des informations structurales sur les espèces intermédiaires. Les techniques analytiques telles que la chromatographie et la spectrométrie de masse permettent de résoudre de façon significative ce problème.

I.2 Chromatographie en phase liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse (SM) : CL-SM

Le couplage CL-SM est un outil analytique qui permet l'analyse simultanée de plusieurs composés présents dans un échantillon donné. Les techniques d'ionisation à pression atmosphérique eu rendu possible le couplage entre CL et SM, permettant l'analyse des composés peu polaires et peu volatils *(Fenn, 2001)*. CL-SM est depuis devenu l'outil d'analyse de choix des chimistes et des biochimistes. Dans cette partie, sera tout d'abord abordé la description de la SM, tant au niveau des sources que des analyseurs et détecteurs. Une brève description de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM ou SM^2) sera faite par la suite, puis nous terminerons par le couplage des méthodes séparatives (notamment la CL) avec la SM.

I.2.1 La spectrométrie de masse (SM)

I.2.1.1 Définition et principe général

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection de molécules d'intérêt ionisées. L'ionisation des molécules d'intérêt est donc nécessaire en amont de l'analyseur par spectrométrie de masse. Dans cette partie nous nous concentrerons sur les techniques d'ionisation dites douces ou à pression atmosphérique. Pendant ces processus, la formation d'un ion peut être initiée par l'addition d'un autre ion (H^+, Na^+, K^+, NH_4^+), d'un électron, la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé (hydrure ou proton). Cet ion est appelé ion pseudo-moléculaire ou ion moléculaire.

La spectrométrie de masse a pour but de permettre l'identification et la mesure simultanée de molécules à analyser (petites molécules, molécules volatiles, protéines, principes actifs pharmaceutiques) avec une bonne résolution et sensibilité. Le mode de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur la production des ions ($m^{\pm ze}$) à partir d'un échantillon et de les séparer en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) et de leur abondance. Un spectromètre de masse est composé sous sa forme simple SM (ionisateur, analyseur et détecteur) et sa forme tandem SM/SM (collecteur d'ions et un deuxième analyseur en plus de la partie simple SM). Fondamentalement, un spectromètre de masse se présente selon la figure I.5 *(Rouessac et al., 2016a)*.

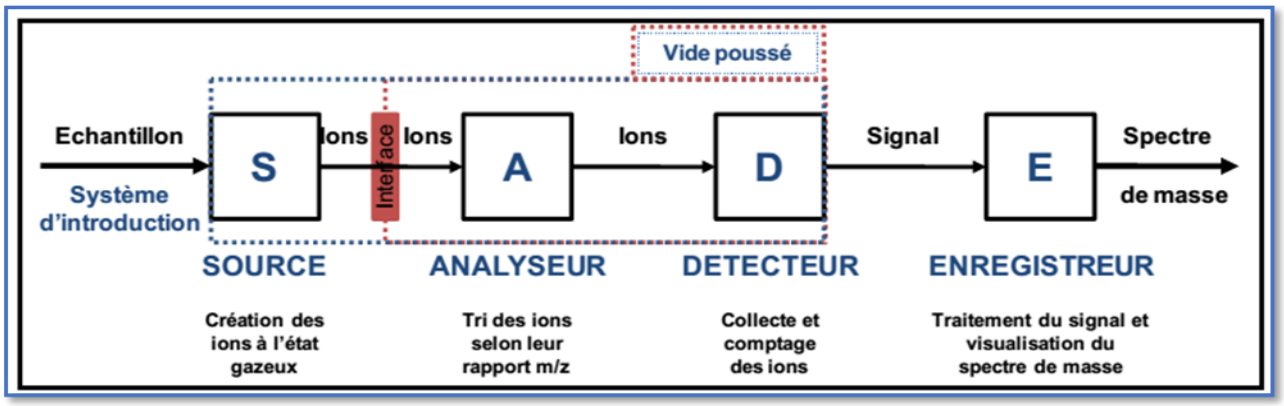


Figure I. 5: *Description schématique des éléments constituant un SM et différentes étapes réalisées lors d'une analyse par SM.*

I.2.1.2 Les sources d'ionisation

La source est l'élément du spectromètre de masse qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physico-chimiques des molécules à étudier et des renseignements désirés. L'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC) à pression réduite sont les plus anciennes et sont réservées aux composés facilement volatilisables, de faible masse moléculaire. D'autres sources d'ionisation dites « douces » développées depuis une vingtaine d'années permettent l'ionisation de molécules sans provoquer (ou peu) leur fragmentation. La désorption et ionisation par impulsion laser et assistées par une matrice (source *MALDI* pour « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* ») est fréquemment couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (*TOF* pour « *Time Of Flight* ») pour l'analyse de molécules présentant une masse moléculaire élevée et non volatiles (au moins supérieure à 500 Da). L'électronébulisation (*ESI* pour « *ElectroSpray Ionization* ») et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (*APCI* pour « *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* ») font partie des méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (*API* pour « *Atmospheric Pressure Ionization* ») et sont idéalement utilisées pour l'ionisation de molécules de faible masse, en couplage avec la chromatographie en phase liquide *(Rouessac et al., 2016a)*.

Dans la suite nous discuterons seulement de l'électronébulisation, souvent utilisée pour les matrices liquides et en couplages avec la chromatographie en phase liquide (aucun autre mode d'ionisation n'a été utilisé durant ces travaux).

Initialement développée pour l'analyse des protéines, l'utilisation de l'électronébulisation s'est toutefois rapidement étendue à l'analyse de petites molécules (*m/z*

> 1000 Da). A pression atmosphérique, un fort champ électrique est appliqué à un liquide traversant un capillaire (débits de l'ordre de 0,005 à 1,0 mL/min), ce qui permet son ionisation. Le champ électrique entre le capillaire et une contre-électrode permet la formation d'ions chargés positivement ou négativement selon la polarité de la tension appliquée. Un gaz (azote) de nébulisation favorise la formation d'un spray de gouttelettes multichargées (cône de Taylor contenant les analytes d'intérêt et le solvant). Le gaz de désolvatation (azote) permet l'évaporation du solvant, provoquant une augmentation de la densité de charge à la surface des gouttelettes produites. Lorsque cette densité de charge atteint une certaine limite (la limite de Rayleigh), les forces de répulsion entre les charges deviennent plus fortes que les forces de cohésion du liquide, provoquant une explosion coulombienne. Ce phénomène d'évaporation-fission se répète jusqu'au transfert des substances ionisées en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transmis et focalisés par un système optique vers l'analyseur de masse (figure I.6) *(Hoffman et Stroobant, 2007a ; Rouessac et al., 2016a)*.

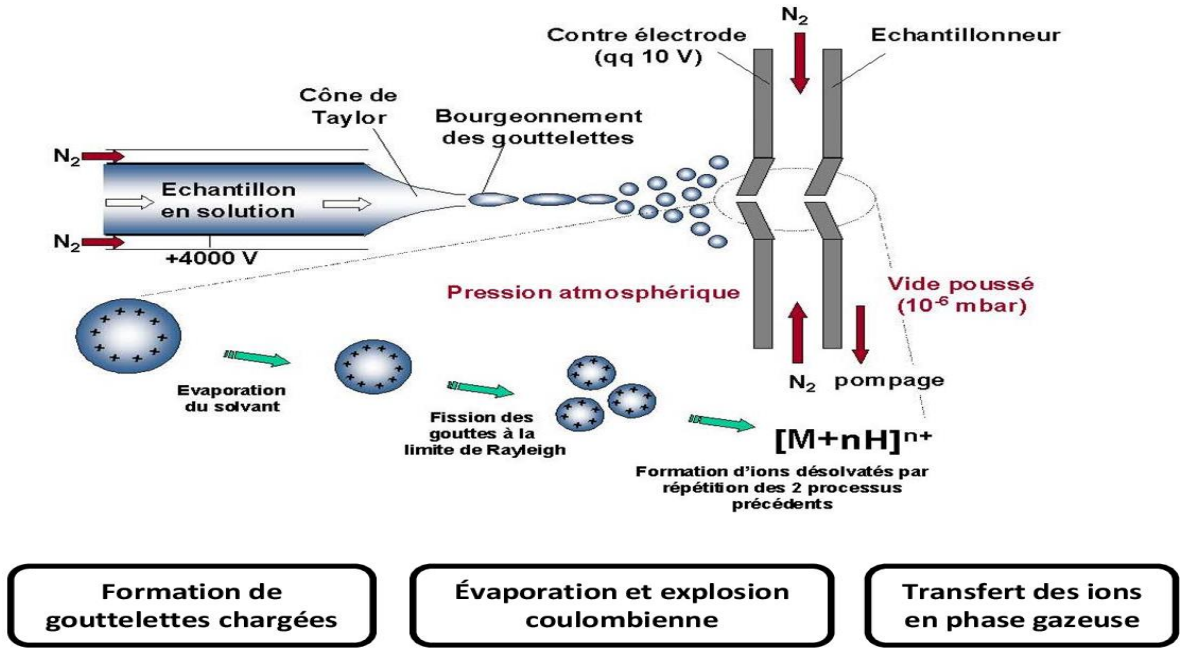


Figure I. 6: *Vue schématisée d'une source ESI et du principe d'ionisation en mode positif.*

L'*electrospray* permet donc l'ionisation et le transfert en phase gazeuse des espèces neutres ou chargées présentes dans l'échantillon. Les ions sont formés, soit par oxydation/réduction à partir de réactions à l'intérieur des gouttelettes, soit à partir de transferts de protons en phase gazeuse entre les ions libérés des gouttelettes. Cela conduit *in fine* à la formation d'ions $[M+H]^+$ en mode positif et $[M-H]^-$ en mode négatif dans le cas de l'analyse de petites molécules, mais aussi à la formation d'espèces multichargées ($[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$) dans le cas de macromolécules. La formation d'adduits (exemple : adduits

sodium $[M+Na]^+$, potassium $[M+K]^+$, ammonium $[M+NH_4]^+$ en mode positif; adduits $[M+Cl]^-$, $[M-H-CO_2]^-$ en mode négatif) est aussi régulièrement observée et peut aider à l'ionisation de certains composés manquant de sites ionisables *(Menet, 2011)*.

Plusieurs propriétés physicochimiques du liquide influent sur la qualité du nébulisât, en particulier la pression de vapeur saturante, la température d'ébullition, la tension superficielle, la conductivité des solvants et électrolytes. Les liquides et additifs de phase mobiles introduits dans la source *ESI* doivent être facilement volatilisables, les tampons minéraux (phosphate) sont en principe à proscrire. C'est-à-dire que pour les solvants présentant la plus faible tension superficielle, le cône de Taylor apparaîtra le plus facilement et la nébulisation sera la meilleure (méthanol, acétonitrile, isopropanol) ; Ce n'est pas le cas des solvants riches en eau. Dans le cas de la conductivité, si elle est trop élevée, un arc électrique peut apparaître avec pour conséquence une baisse de la sensibilité ; si elle est trop faible le cône de Taylor sera trop court (cas de l'hexane et du cyclohexane, non utilisables lors de l'ionisation par *ESI*) *(Menet, 2011 ; Rouessac et al., 2016a)*.

D'autres paramètres, comme le pH du solvant et la présence ou non de contre ions en solution conjointement aux molécules, interviennent dans le degré d'ionisation des molécules. De plus, la présence de contre ions influe sur l'intensité du signal, sur l'état de charge moyen ainsi que sur la répartition des charges. En effet, des paires d'ions neutres se forment en solution avec neutralisation, par le contre ion négatif, des sites chargés positivement de la molécule à analyser. La stabilité de la paire d'ion neutre dépend de la nature et la concentration du contre ion, c'est ainsi que sa concentration conseillée est inférieure à 0,1 % (v/v) alors que celle en acide formique ou acétique peut dépasser 1 % (v/v) *(Rondeau, 2017a)*.

I.2.1.3 Les analyseurs de masse

Après ionisation, les ions formés sont transférés vers l'analyseur de masse qui va les séparer, selon leur valeur de *m/z*, avant leur détection. Il en existe différents types et leur utilisation pour la détection dépend de leur polyvalence et de leur performance. Les caractéristiques d'un analyseur vont dépendre de sa gamme de masse, sa précision, sa résolution, sa vitesse de balayage et sa transmission *(Hoffman et Stroobant, 2007b)*. Le tableau I.1 ci-dessus compare les performances relatives des analyseurs *(Rondeau, 2017a)*.

Tableau I. 1: *Comparaison des performances relatives des analyseurs.*

Méthodes de détection	**Spectromètres de masse à faisceau d'ions**				**Spectromètres de masse à piégeage d'ions**			
	Balayage de m/z		**Sans balayage de m/z**		**Balayage de m/z**		**Sans balayage de m/z**	
Analyseurs	**Magnéto-électrostatique**	**Quadripôle**	**Temps de vol (TOF)**	**Spiral-TOF**	**Piège 3D**	**Piège linéaire (2D)**	**FT-Orbitrap**	**FT-ICR**
Gamme de m/z	2500 à 15000**	1000 à 4000*	15000** à 500000***	10 à 30000**	1000 à 4000*	1000 à 4000*	1000 à 4000*	5000** à 60000***
Pouvoir de résolution	10^4 à 10^5****	Unitaire	40000 à 60000***	>60000***	1000* à 10000**	1000* à 10000**	>10^5****	10^6****
Précision de mesure (ppm)	1 à 5	~ 100	~ 1***	~ 1	100* à 50**	100* à 50**	~ 1	< 1
Gamme dynamique (m/z)	10^9	10^7	10^2 à 10^6	10^2 à 10^6	10^2 à 10^5	10^2 à 10^5	10^3 à 10^4	10^2 à 10^5
Vitesse d'acquisition (Hz)	0,1 - 20	1 - 20	10^1 à 10^6	10^4 à 10^5	1 - 30	1 - 300	10^{-1} à 10^2	10^{-2} à 10^1
Pression (mbar)	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6} à 10^{-7}	10^{-7}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-10}	10^{-10}

**Faible ; **Moyenne ; ***Élevé ; ****Très élevé*

Nous ne discuterons ici que des analyseurs quadripolaires et à temps de vol car seuls ceux-ci ont été utilisés tout au long de ce travail.

I.2.1.3.1 Analyseur quadripolaire linéaire

Un quadripôle est un filtre de masse constitué de quatre barres parallèles de section hyperbolique (figure I.7a). Un potentiel continu (*DC*) et un potentiel radiofréquence (*RF*) sont appliqués entre les quatre barres. Selon le choix des valeurs de masse et de potentiel appliqué, certains ions seront éjectés ou entreront en contact avec les barres (ions non résonnant, trajectoire instable) et d'autres par contre passeront entre les barres du quadripôle (ions résonnant, trajectoire stable) et seront détectés (figure I.7b). Le quadripôle est donc un appareil qui utilise des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport *m/z* *(Rouessac et al., 2016a)*. La stabilité des ions avec un *m/z* donné dans l'analyseur quadripolaire est décrite par les équations de Mathieu.

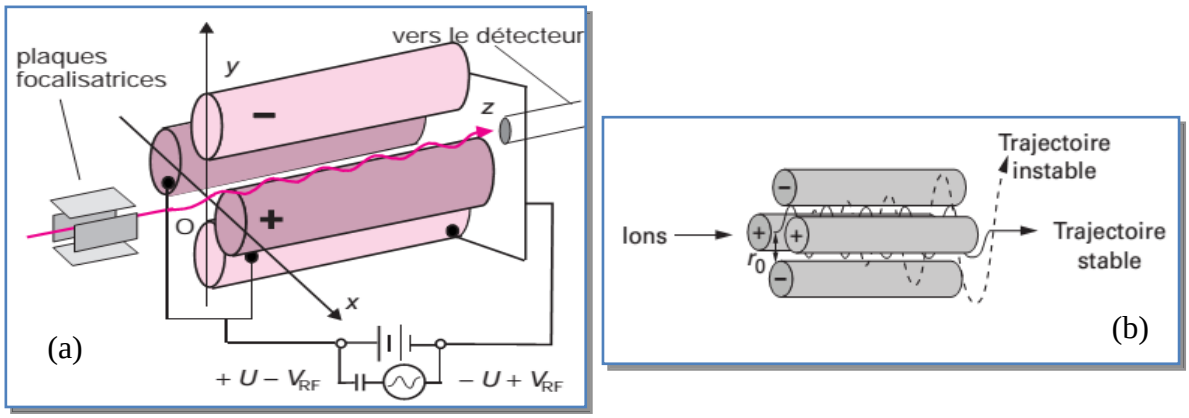


Figure I. 7: *Schématisation d'un analyseur quadripolaire linéaire.*

Dans ce type d'analyseur, les espèces ionisées générées dans la source et arrivant dans le quadripôle sont soumises à un champ électrique oscillant. Sous l'effet du champ électrique, la trajectoire sinusoïdale prise par les ions dépendra, d'une part, de la valeur des tensions entre les barres et, d'autre part, du rapport *m/z* des ions. Le choix des valeurs de tension va donc permettre de sélectionner les ions d'un rapport *m/z* donné qui seront transmis jusqu'au détecteur, et d'écarter les ions de rapport *m/z* non sélectionné. Ce type d'analyseur couvre généralement une gamme de masse allant jusqu'à 4000 Da, avec une résolution unitaire (séparation de M et M+1). Le quadripôle est donc un analyseur de masse à basse résolution, c'est-à-dire qu'il permet de mesurer la masse nominale des composés *(Rouessac et al., 2016a)*.

I.2.1.3.2 Analyseur à Temps de Vol

Le principe des spectromètres à temps de vol (en anglais *TOF, Time of Flight*), repose sur la relation entre masse et vitesse des ions. L'instrument mesure le temps nécessaire aux ions, formés par un procédé impulsionnel, pour parcourir dans le vide une distance L à champ nul (figure I.8). Son fonctionnement est basé sur l'accélération des particules sous l'action d'un champ électrique. En effet, des ions de masse *m* et de charge *z* accélérés par une différence de potentiel ou tension accélératrice notée *U*, acquièrent une énergie cinétique E_c. La relation fondamentale des appareils *TOF* à parcours linéaire est donnée par l'équation I.7 *(Rouessac et al., 2016a)*.

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eU}{L^2}\right)t^2 \qquad \text{……..Equation I. 7}$$

Pour évaluer les masses avec précision, les dispersion énergétique et spatiale initiales des ions sont exploitées. Afin que les ions démarrent tous au même instant, on provoque une

excitation quasi instantanée (quelques nanosecondes avec un laser par exemple), répétée un grand nombre de fois. Pour neutraliser la dispersion énergétique des ions d'une même masse, beaucoup d'appareils comportent un réflecteur (figure I.8).

Les ions les plus rapides pénètrent plus avant dans la zone de champ de ce miroir électrostatique et sont donc plus fortement repoussés vers le collecteur d'ions. Ce dispositif permet de faire parvenir des ions d'énergies cinétiques différentes mais de même masse, simultanément sur le détecteur, en améliorant ainsi la résolution. Les ions d'une même masse sont ainsi refocalisés *(Rouessac et al., 2016a ; Rondeau, 2017b)*.

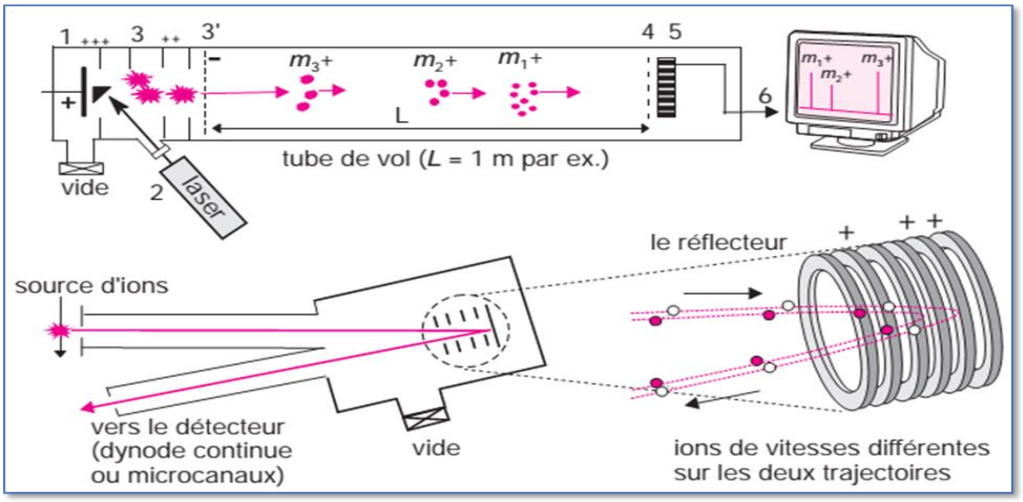


Figure I. 8: *Spectromètre à temps de vol à parcours direct et principe du réflecteur d'ions.*

1) Échantillon et porte-échantillon ; 2) dispositif d'ionisation ; 3 et 3') grilles d'extraction et d'accélération (ddp 5 000 V) ; 4) grille de contrôle ; 5) collecteur plan à microcanaux ; 6) sortie du signal.

Le dessin du bas représente un réflectron dont le « miroir électrostatique » égalise les temps de vols (quelques ms) des ions de même masse mais dont les énergies initiales diffèrent. Les largeurs de pics sont de l'ordre de 10^{-9} s et la résolution atteint désormais 15 à 20 000 *(Rouessac et al., 2016a)*.

L'analyseur à temps de vol fait ainsi partie des analyseurs les plus utilisés au vu de sa résolution nettement supérieure à celle d'un analyseur quadripolaire (20 000 pour le TOF contre 2000 pour un quadripôle). Une telle résolution permet la détermination de masses exactes, offrant l'avantage d'associer une formule brute à un *m/z* donné *(Rondeau, 2017b)*. Quadripôle et analyseur à temps de vol peuvent être utilisés en série et ainsi donner naissance à un appareil dit « hybrides » qui sera utilisé dans le cadre de ce travail.

I.2.1.4 Les détecteurs à ions

Le détecteur sert à amplifier le nombre d'électrons pour atteindre un signal détectable et ensuite à mesurer ce signal. Ensuite le signal est enregistré et un spectre de masse est produit. La détection en spectrométrie de masse est basée sur la mesure des charges transportées par les ions. Ordinairement le nombre d'ions individuels d'une même espèce est très grand, de sorte que le signal est de type analogique, mais certains modèles ont un tel pouvoir d'amplification qu'ils peuvent repérer l'impact d'un seul ion. On distingue les multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées, les multiplicateurs d'électrons à dynodes continue (channeltron®) et les détecteurs à microcanaux *(Rouessac et al., 2016a)*.

Notons que l'essentiel des spectromètres de masse haute résolution d'aujourd'hui utilise un photomultiplicateur comme détecteur. Une fois les ions séparés, ils possèdent des énergies cinétiques importantes, et en allant heurter une plaque métallique plusieurs électrons sont libérés. Les électrons ainsi éjectés vont à leur tour heurter une autre plaque, provoquant l'éjection d'un nombre plus important d'électrons. Ce processus est répété plusieurs fois, permettant d'accroître l'intensité du signal mesuré et d'aboutir à ce qu'on appelle le courant ionique total (CIT). Finalement, par l'utilisation d'un traitement du signal adapté, il sera possible d'extraire un *m/z* donné du CIT donnant accès au courant ionique extrait (CIE) *(Menet, 2011)*.

I.2.2 Spectrométrie de masse en tandem (SMSM ou SM^2)

La spectrométrie de masse en tandem est l'acquisition et l'étude du spectre des produits ou précurseurs électriquement chargés d'un ou de plusieurs ions de rapport *m/z* sélectionnés, ou d'ions précurseurs d'une perte de masse neutre sélectionnée. Pour obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments issus de la décomposition des composés moléculaires introduits, on fait donc appel à des spectromètres de masse comportant au minimum trois analyseurs en série. Il ne s'agit pas de la mise bout à bout d'appareils distincts, mais de l'association dans un appareil hybride soit d'un secteur magnétique suivi d'un quadripôle, soit de deux quadripôles, soit d'un *TOF* avec un second quadripôle (ou l'inverse). Entre les deux analyseurs est placée une chambre de collision (figure I.9) *(Rouessac et al., 2016a)*.

L'objectif de la SMSM a été, dans un premier temps, d'obtenir des informations structurales sur les molécules ionisées par des techniques dites douces. En effet, pour des techniques d'ionisation dures, telles que l'ionisation électronique qui apporte assez d'énergie

interne aux molécules pour se fragmenter, une seule analyse en masse permet d'obtenir de nombreuses informations structurales et d'élucider la structure de la molécule. En revanche, les techniques d'ionisation douces telles que l'*ESI*, le *MALDI* et autre *FAB* génèrent essentiellement dans la source des espèces protonées ou déprotonées avec pas ou peu de fragmentation. Les informations structurales apportées par une analyse en masse unique sont donc très limitées. L'idée a été de trouver un moyen d'exciter hors de la source les ions stables afin d'accroître leur énergie interne et, ainsi, de provoquer leurs fragmentations.

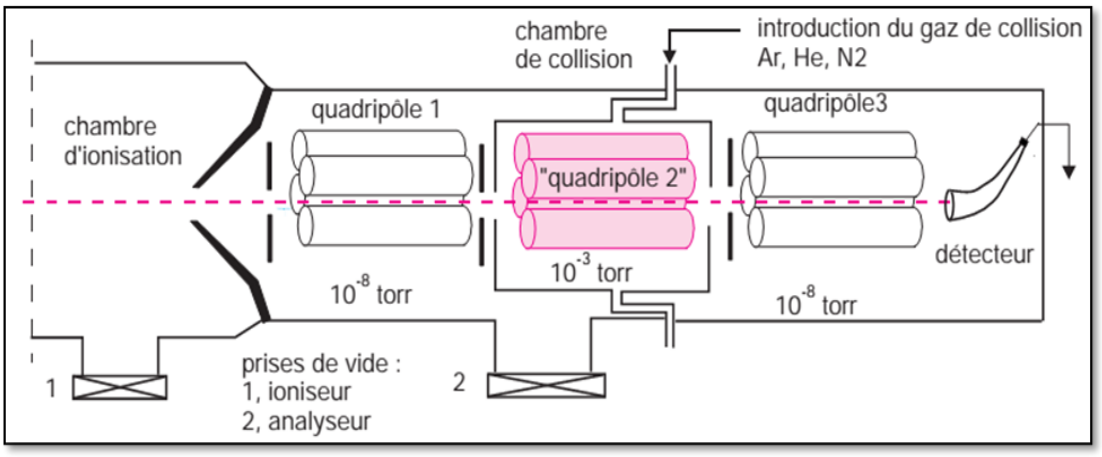


Figure I. 9: *Principe d'un appareil SMSM à 3 quadripôles en série.*

Dans ce montage appelé QqQ, le quadripôle central a un simple rôle focalisateur. Situé dans la chambre de collision, il est alimenté par une tension alternative uniquement (absence de tension continue). La pression à cet endroit de l'appareil est plus élevée. Avec ces instruments on peut étudier des mélanges comme on le ferait avec la technique CG/SM. Les applications sont devenues très nombreuses sachant que les coûts de ces appareils ont beaucoup diminué *(Rouessac et al., 2016a)*.

Il existe plusieurs façons d'utiliser de tels appareils *(Hoffman et Stroobant, 2007c, Rondeau, 2017b)*.

- Une première technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport *m/z* choisi au moyen du premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre. Ces ions traversent ensuite la chambre de collision (*CID, Collision Ionic Dissociation*) dans laquelle on fait arriver un gaz (argon la plupart du temps). Il s'ensuit un impact entre les molécules de gaz neutre et les molécules cibles ionisées qui conduit à leur fragmentation. Les ions fils issus de la fragmentation poursuivent leur course vers le second analyseur, utilisé en mode normal, ce qui conduit à un spectre donnant des informations de structure de l'ion *m/z* sélectionné en

amont, à l'exclusion des autres ions formés dans la source de l'appareil (recherche de filiations).

- Dans une autre technique on règle le second analyseur pour qu'il ne laisse passer que les ions d'un même rapport *m/z* et on fait un balayage des masses avec le premier analyseur. On repère ainsi tous les ions donnant le même fragment (recherche des ions parents).

- Enfin on peut faire un double balayage synchrone des deux analyseurs avec un décalage correspondant à une masse donnée (exemple : un fragment neutre tel CO ou C_2H_2). On repérera alors les ions de la source qui se décomposent en éliminant le fragment en question (recherche des neutres).

Le mode d'acquisition le plus utilisé pour la quantification par SMSM est le mode *MRM* (*Multiple Reaction Monitoring*). Ce mode consiste en la sélection d'un *m/z* appelé ion parent ou ion précurseur par le premier quadripôle, puis en sa fragmentation dans la cellule de collision, pour finir par la détection d'un seul ion issu de la fragmentation (ion fils ou ion produit). Cette configuration améliore significativement la sensibilité et la résolution des expériences vis-à-vis d'autres modes tels que le mode balayage par exemple. Cependant l'aspect quantitatif de ce mode de détection nécessite l'optimisation des paramètres tels que l'énergie de collision et la sélection d'une ou plusieurs fragmentations par analyte. Ces optimisations sont généralement réalisées sur des standards. C'est pourquoi dans le cas de métabolites inconnus, son application est limitée *(Rouessac et al., 2016a)*. La technique SMSM utilisée dans le cadre de ce travail est la spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol (QqTOF). Ce SM hybride a permis de détecter et d'identifier les molécules par mesure de leur ratio masse/charge. Le premier quadripôle procure une grande efficacité au processus SMSM. Le TOF quant à lui apporte sa grande sensibilité, sa grande rapidité d'analyses et sa grande résolution et précision.

I.2.3 Techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique permettant la séparation des constituants d'un mélange, en utilisant la différence d'affinité des substances à analyser vis à vis de deux phases, l'une mobile, et l'autre fixe ou stationnaire. Cette technique se décline sous de nombreuses formes selon la nature des phases (gazeuse, supercritique et liquide) et des phénomènes mis en jeu (adsorption, partages sur phases greffées ou gels, exclusion par taille, échanges d'ions) *(Claude et Jardy, 1999)*. Cette partie a pour objectif de décrire synthétiquement la chromatographie, et plus particulièrement la chromatographie en

phase liquide (utilisée dans le cadre de ce travail), ceci dans le but de cerner les principaux éléments intervenant dans son couplage avec la source *electrospray* et ses conséquences sur la mise au point d'une méthode analytique CL-*ESI*/SM.

La chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse est apparue plus tardivement que la chromatographie en phase gazeuse (CG) en raison de contraintes technologiques. La principale limite était la nécessité d'évaporer la phase mobile chromatographique afin de faire passer les analytes en phase gazeuse avant leur introduction dans le spectromètre de masse *(Arpino, 2009)*. Ces problèmes ont été résolus avec le développement de méthodes d'ionisation à pression atmosphérique telles que l'*electrospray*. La CL présente l'avantage d'être plus polyvalente que la CG du fait de l'interaction de trois composantes (soluté, phase mobile, phase stationnaire) contre seulement deux pour la CG (soluté, phase stationnaire). Ainsi, la CL complète le pouvoir résolutif amené par la spectrométrie de masse. Son principal intérêt est de séparer les composés qui ne sont pas séparés par la SM et entre-autre limiter les interférences des matrices ou d'analogues structuraux qui peuvent interférer avec l'analyse. Elle permet également de limiter le phénomène de suppression d'ionisation observé avec les sources *ESI* et lié à la complexité des matrices analysées. Enfin, elle permet généralement de séparer les molécules isobares et surtout les isomères (isomères de positions, énantiomères, diastéréoisomères) qui sont par définition indissociables avec la spectrométrie de masse, même en haute résolution car ces molécules ont la même formule brute *(Hoffman et Stroobant, 2007d)*.

En chromatographie liquide, on distingue les systèmes à haute (*HPLC*, de l'anglais *High Performance Liquid Chromatography*) et ultra-haute performance (*UHPLC*, de l'anglais *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*). D'apparition plus récente *(Swartz, 2005)*, les systèmes de type *UHPLC* reposent sur l'utilisation de particules de phase stationnaire de diamètre réduit (< 2 µm) supportant de plus hautes pressions, et donc des débits plus élevés, permettant ainsi des séparations plus rapides. Les pics chromatographiques élués sont donc plus fins et plus intenses, ce qui augmente le rapport signal/bruit, la capacité de pics et l'efficacité de la colonne. En revanche, ces colonnes nécessitent des pompes très haute pression qui permettent de faire migrer la phase mobile jusqu'à des pressions pouvant atteindre 1000 bars (comparativement, la pression exercée dans un autocuiseur est de 2 - 3 bars). Ainsi, le système analytique est très sollicité ce qui tend à augmenter les pannes et les fuites. De plus, la finesse observée des pics doit être compatible avec la vitesse d'acquisition des analyseurs *(Claude et Jardy, 1999)*.

Par ailleurs, différents mécanismes de rétention chromatographiques sont possibles et vont conditionner le choix de la nature de la phase stationnaire ainsi que les solvants constituants la phase mobile. Dans le domaine de l'analyse de résidus de polluants environnementaux, la chromatographie à polarité de phase inversée (*RP* de l'anglais *Reverse Phase*) est extrêmement utilisée. La silice contenue dans la colonne est fonctionnalisée avec des chaînes aliphatiques de type C_8 ou C_{18} (plus utilisée) ce qui rend la phase stationnaire hydrophobe et compatible avec de solvants aqueux et organiques [généralement de l'acétonitrile (CH_3CN) ou du méthanol (MeOH)]. Il est alors possible d'appliquer un gradient croissant de phase organique afin de jouer sur la solubilité des composés apolaires dans la phase mobile et d'éluer les composés en fonction de leur polarité. Les méthodes *RP* sont également adaptées à la détection SM ce qui en fait une méthode de choix pour un couplage avec la spectrométrie de masse. Elles sont également hautement reproductibles et leurs mécanismes de séparation sont bien connus *(Hoffman et Stroobant, 2007d)*.

Au même titre que la chromatographie en phase gazeuse, la CL est une méthode incontournable pour l'analyse de polluants dans l'environnement. Elle s'est développée avec la venue des sources *ESI* permettant un couplage aisé entre ce type de chromatographie et la spectrométrie de masse offrant un large choix d'analyse ainsi qu'une sensibilité inégalée pour un détecteur couplée à la CL. La mise au point d'une méthode d'analyse par CL-*ESI*/SM nécessite donc de prendre en compte un nombre conséquent de paramètres liés, pour la plupart, les uns aux autres, complexifiant d'autant son développement. On peut citer entre autres les dimensions de la colonne, taille des particules, porosités des particules, taille des pores, modification de la phase stationnaire, le débit de la phase mobile, la composition des phases mobiles, la température, le gradient d'élution et le solvant d'injection *(Rouessac et al., 2016b)*.

I.3 Couplage entre une cellule électrochimique (EC) et un spectromètre de masse (SM) : Voltampérométrie massique

I.3.1 Phénomènes électrochimiques *in-situ* des sources ESI

Une étude réalisée en 1992 par van Brekel et collaborateurs s'est focalisée sur les phénomènes électrochimiques dans les sources *ESI* des spectromètres de masse (SM) *(Van Berkel et al., 1992)*. Ce principe a suscité une discussion plus large entre six éminents scientifiques dans le domaine, qui doivent encore parvenir à un accord *(De-la-Mora et al., 2000)*. Tel que rapporté par Girault et collaborateurs *(Girault et al., 2010)*, l'application d'une

haute tension pendant l'*ESI* fait que l'émetteur agit comme une électrode de travail (*WE, working electrode*), par laquelle les réactions redox se produisent radialement et peuvent être de nature électrochimique ou photoélectrochimique. Ce concept a inspiré l'idée d'utiliser la source *ESI* pour l'investigation *in-situ* des processus, en particulier le métabolisme redox. Par exemple, dans les systèmes *ESI*-SM pour l'étude des peptides, le marquage électrochimique des cystéines par oxydation *in-situ* de l'hydroquinone en benzoquinone a été largement discuté *(Roussel et al., 2004; Dayon et al., 2014)*. Le suivi *in-situ* de l'interface électrode-électrolyte est très prisé pour une meilleure compréhension des processus redox en temps réel.

Lu, Hua et Long ont passé en revue les méthodes d'analyse *in-situ* possibles au niveau de l'interface *ESI* et les différentes conceptions pour les cellules EC, qui pourraient être configurées ensemble dans la chambre *ESI (Lu et al., 2017)*. De plus, Wang et collaborateurs ont développé une méthode appelée spectrométrie de masse des ions secondaires liquides *in-situ* (SIMS, *in-situ liquid secondary ion mass spectrometry*) en utilisant un dispositif EC microfluidique compatible avec le vide *(Wang, Z. et al., 2017)*. De toute évidence, comprendre les processus électrochimiques inhérents sont très importants pour l'étude des espèces réactives oxydatives ; cependant, le défi consiste à contrôler le potentiel. Ainsi, les cellules EC *ex-situ* (séparées de ESI) contrôlés par leur propre potentiostat sont actuellement disponibles.

I.3.2 Principes et couplages à la SM

En fonction de l'énergie d'activation des liaisons chimiques, les composés organiques sont oxydés/réduits lors de l'application d'énergie potentielle (Figure I.10a, b). Le courant I est généré par le mouvement des ions et des électrons à travers la solution et l'électrode, respectivement. Par conséquent, le courant global qui passe à travers le système dépend de la vitesse de la réaction (Red → Ox, échange d'électrons entre la surface de l'électrode et les composés) et le transport de masse (lié au débit). De plus, le courant I est augmenté en corrélation avec la surface de l'électrode de travail (plus la surface est grande, plus il y a de produits).

$$I = nFAK[Red] \quad \textbf{Equation I. 8}$$

Où, I est le courant, n le nombre d'électrons transférés, F la constante de Faraday, A la surface de l'électrode, K la constante de vitesse, [Red] la concentration du réactif.

De plus, la composition et le pH de la phase mobile, le modificateur organique et la vitesse de balayage jouent rôles importants dans le type des produits d'oxydation et les interférences formées. Bien que la méthode EC-SM qui est basée l'identification des

métabolites est généralement propre, des produits d'artefacts interférents, tels que les dimères, trimères et adduits liés aux protons sont très courants *(Briuns, 2015)*.

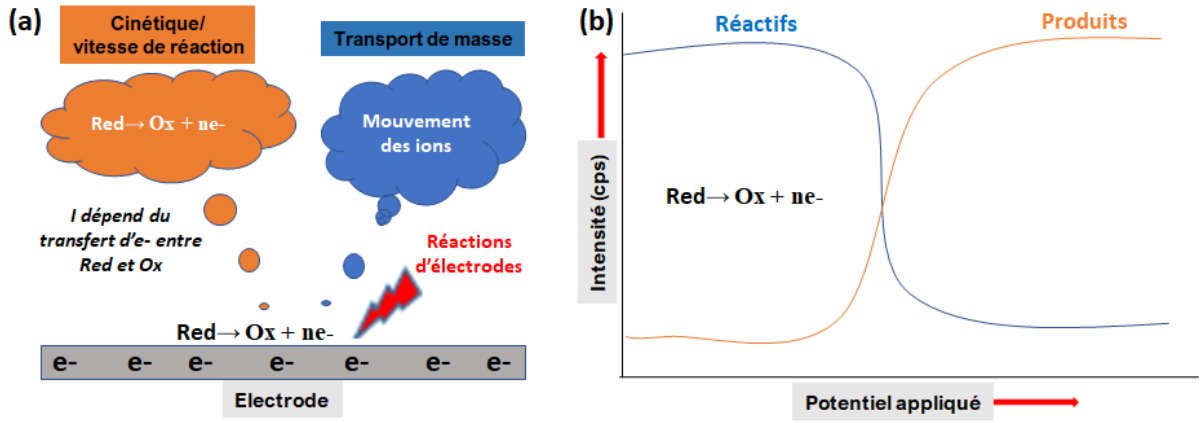


Figure I. 10: *(a) Diagramme schématique de la réaction à la surface de l'électrode et (b) intensité du réactif et du produit vs le potentiel appliqué (voltampérogramme massique).*

La SM est la technique la plus largement appliquée pour la caractérisation et l'identification des molécules dans les matrices biologiques et environnementales. En particulier, la SM a une applications dans le domaine de la «*-omique*» *(Di Girolamo et al., 2013)*. Par conséquent, le couplage de EC à la SM crée une opportunité pour approfondir la compréhension des processus naturels. En règle générale, un composé avec un modificateur organique approprié et une solution d'électrolyte (par exemple un sel ou un acide) sont infusés dans un cellule électrochimique constituée d'une électrode de travail *WE* couplé à la SM ou CL-SM en ligne (Figure I.11a). Les produits d'oxydation et autres sous-produits sont transférés en ligne à la source ESI du SM pour caractérisation. En général, deux types de modifications électrochimiques peuvent être appliqués au composé d'intérêt : direct (entre la surface de l'électrode et la molécule d'intérêt) ou indirecte (entre des intermédiaires générés par EC ; par exemple $HO^{\bullet}$, H^{+} et des molécules organiques).

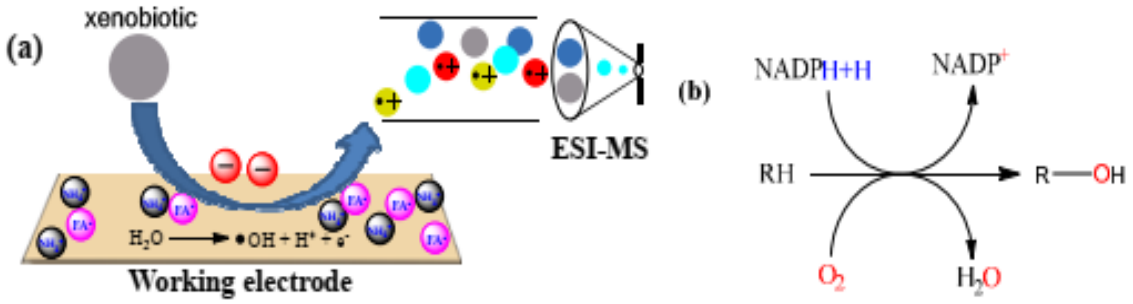


Figure I. 11: *(a) Diagramme schématique de la réaction EC-SM en ligne et (b) du métabolisme oxydatif basé sur le CYP450.*

L'oxydation anodique de l'eau à partir de la perte d'un électron conduit à la formation des radicaux hydroxyles d'adsorbés ($^{\bullet}OH_{ads}$) à la surface de *WE* (Equation I.9).

$$H_2O \rightarrow {}^{\bullet}OH_{ads} + H^+ + e^- \quad \textbf{Equation I. 9}$$

(ou) formation d'oxyde supérieur par *WE* actif (Equation I.10).

$$^{\bullet}OH_{ads} \rightarrow O_{ads} + H^+ + e^- \quad \textbf{Equation I. 10}$$

Cet oxyde supérieur médie l'oxydation des composés organiques comme (Equation I.11) :

$$O_{ads} + R \rightarrow RO \quad \textbf{Equation I. 11}$$

L'oxyde supérieur peut également se décomposer sous forme de $2O_{ads} \rightarrow O_2$. Sur les électrodes non actives, comme le diamant dopé au bore (BDD), l'interaction entre la surface de l'électrode de travail et le radical $HO^{\bullet}$ ou un autre ROS (espèce réactive de l'oxygène, *Reactif Oxygen Species*) est beaucoup plus faible. Par conséquent, l'oxydation des composés organiques par une électrode BDD peut être directement médiée par ROS. Cela offre un avantage encore meilleur, en ce sens que les radicaux actifs peuvent réagir avec des molécules qui ne sont pas sujettes au transfert d'électrons réactions telles que les hydrocarbures polyaromatiques non substitués *(Faber et al., 2014)*.

Par conséquent, l'hydroxylation des réactions comme celles catalysées par le CYP450 (Figure I.11b) peuvent se produire sur la surface *WE*. Cependant, son principal inconvénient est que la minéralisation complète (formation de CO_2 et H_2O) de certains des composés organiques pourraient se produire selon le potentiel appliqué et les conditions expérimentales (Equation I.12).

$$^{\bullet}OH_{ads} + R \rightarrow mH_2O + nCO_2 + H^+ + e^- \quad \textbf{Equation I. 12}$$

Il peut également y avoir une réaction compétitive comme $^{\bullet}OH_{ads} \rightarrow 1/2O_2 + H^+ + e^-$. Il est donc crucial optimiser soigneusement le potentiel appliqué et le type de modificateurs organiques appliqués, à l'instar de la production de gaz CO_2, O_2 et/ou H_2 (par électrolyse de l'eau et minéralisation de molécules organiques) qui entraîne un flux de courant très instable.

En plus du couplage SM en ligne, la configuration EC-CL-SM devient de nos jours un concept. Cela permet la génération, la séparation et la détection de produits d'oxydation en ligne, qui fournit des informations structurelles supplémentaires (temps de rétention des adduits et isotopes). En règle générale, une vanne externe est utilisée pour séparer le débit de l'étape de réaction EC de la séparation CL, qui nécessite un débit très faible (10-50 µL/min pour une durée plus longue de l'interaction de surface l'analyte-*WE*). Le développement récent de systèmes HPLC, tels que la nano-HPLC, permet l'accouplement sans soupape externe *(Wigger et al., 2017; Baumann et al., 2013)*. Différents types de cellules à flux continu

pouvant traiter des échantillons de 175 nL à 80 mL peuvent être trouvés commercialement. De même, il existe différents types de *WE* disponibles dans le commerce, y compris BDD, carbone vitreux poreux (GC), platine (Pt) et or (Au). Habituellement, une cellule à trois électrodes, une référence (généralement Pd/H_2 ou Ag/AgCl) et une électrode auxiliaire ou contre-électrode (des métaux comme Pt, Ti) sont utilisés *(Antec, 2019)*.

Pour rappel, les expériences EC-SM sont réalisées sans problèmes éthiques, relativement peu coûteux, en utilisant des matrices propres et en peu de temps par rapport aux approches enzymatiques conventionnels dans les essais biologiques. Cependant, comme elle n'est pas enzymatique, la méthode EC-SM est moins spécifique et non stéréosélective que les approches *in vitro* et *in vivo*. Évidemment, pas tous les produits issus de EC-SM seront des métabolites et ceux-ci ne pourront pas être mimés dans une seule expérience EC-SM. La génération électrochimique en ligne de métabolites de pesticides, au centre de cette thèse, est un domaine qui pourrait mériter d'autres recherches dans un proche avenir. En plus de la prédiction du métabolisme oxydatif, EC-SM pourrait être utilisé pour améliorer la détection de nombreux composés qui sont difficiles à ioniser en *ESI*-SM par oxydation ou ajout d'étiquettes électrochimiquement actives. De plus, l'équipement EC est peu coûteux et facile à utiliser. Nous envisageons plus d'applications de EC-LC-SM, en particulier pour déterminer le devenir des xénobiotiques en stress oxydatif et production d'étalons de références.

Avant d'aborder les méthodes de simulation des dégradations environnementale des pesticides, nous ferons tout d'abord un point sur les pesticides, notamment les carbamates et les phénylurées. Nous discuterons principalement de leurs devenirs et de leurs effets sur la santé et l'environnement.

Chapitre II. Généralités sur les pesticides

Les pesticides sont des sujets de discussion incontournables de la société actuelle. Si, auparavant, ces termes étaient associés à la maîtrise de la production agricole et la garantie de ressource alimentaire suffisante, ils sont désormais souvent associés à un problème de santé publique. En l'espace de quelques années, les pesticides sont en effet passés du rang de produits révolutionnaires et bienfaiteurs au rang de produits néfastes dont il faut se « débarrasser ». La cause est probablement une utilisation abusive et déraisonnée de ces substances depuis le milieu du XXème siècle conduisant à une pollution généralisée de l'environnement. Depuis près de cinquante ans, ils ont été mis en évidence dans tous les compartiments de l'environnement, que ce soit dans les eaux de rivières, de pluie et nappes phréatiques, dans l'air et dans les denrées alimentaires *(Chevreuil et al., 1996 ; Chernyak et al., 1996)*.

Si la problématique « pesticides » est à la fois d'ordre environnemental avec la contamination de la faune et de la flore, elle est aussi d'ordre sanitaire. En effet, de par leurs propriétés toxiques, les pesticides représentent un réel danger pour l'Homme lorsqu'ils ne sont pas utilisés dans des conditions appropriées. Pourtant, même s'ils sont très controversés, il semble compliqué de s'en priver dans un futur proche tant notre société dépend des pesticides, que ce soit dans l'usage agricole ou non agricole. La tendance actuelle est de convaincre les agriculteurs, les jardiniers et services municipaux à une utilisation rationnelle des pesticides. Ajouté à cela, il faut également noter que beaucoup de recherches plus fondamentales restent à effectuer pour comprendre en détail les mécanismes des différents processus qui régissent leur devenir environnemental et *in vivo* en fonction du milieu, d'identifier les produits de dégradation potentiellement formés et d'évaluer la toxicité de l'ensemble de ces composés dans différentes situations.

II.1 Définition et classification

Le mot pesticide provient de l'association du mot anglais *pest* (animal, insecte ou nuisible), lequel provenant du latin *pestis* (fléau, calamité) et du suffixe - *cide* ((latin - *cida*, du verbe latin *caedo, caedere*, « tuer »). Bien que communément appelés « pesticides » par le grand public, les termes utilisés par la législation française relative à la protection des cultures sont « produits phytopharmaceutiques », « produits phytosanitaires », « produits agrochimiques », « produits agropharmaceutiques » ou encore « produits antiparasitaires à usage agricole ». Un pesticide peut donc être défini comme une substance destinée à

repousser ou à combattre toute espèce indésirable végétale ou animale, pendant la production, le stockage, le transport, la distribution ou la transformation des denrées destinées à l'alimentation humaine ou animale. Ce terme désigne aussi toute substance destinée à servir comme régulateur de la croissance, défoliant ou dessiccateur *(Carter, 2000)*.

De manière générale, on peut admettre une classification selon la nature chimique, le mode et le type d'action, la nature de l'espèce à combattre, l'effet obtenu, la toxicité, le moment d'application ou bien même le lieu d'application. Selon les organismes visés (classification biologique), trois grandes classes de pesticides représentant 90 % des produits phytosanitaires se distinguent *(Aubertot et al., 2005 ; Carter, 2000)* :

- Les insecticides, destinés à éliminer les insectes nuisibles. Ce sont principalement des composés chlorés, des organophosphorés, des carbamates, des pyréthrénoïdes, des produits botaniques et biologiques ;

- Les herbicides, destinés à éliminer les adventices des cultures, sont des phénoxydes, des triazines, des amides, des carbamates, des dinitro-anilines dérivés d'urée, des sulfonylurées et uraciles ;

- Les fongicides, destinés à lutter contre les parasites et champignons pathogènes. Ce sont principalement des composés inorganiques, des dithiocarbamates, des benzimidazoles, des triazoles ou diazoles, des diazines et des morphines.

D'autres classes mineures correspondent à des substances actives destinées à combattre des cibles spécifiques : acaricides (acariens), nématicides (nématodes), corvicides (oiseaux ravageurs), rodonticides (rongeurs) et molluscicides (limaces et escargots). Le tableau II.1 ci-après donne la classification et les caractéristiques de quelques groupes de pesticides les plus usités.

Tableau II. 1: *Classification et caractéristiques de quelques groupes de pesticides (Aubertot et al., 2005 ; Carter, 2000).*

	Classes	Exemples	Utilisations/Actions	Caractéristiques
Insecticides	Organochlorés	DDT, Aldrine Lindane, Chlordane	Paralysie et mort des insectes	-Bioaccumulation -Bioamplification
	Organophosphorés	Parathion Diazinone Malathion	Neurotoxique	-Persistances dans les milieux -Hydrosolubles
	Carbamates	Carbaryl Aldicarbe	Neurotoxique	Hydrosolubles
Herbicides	Triazines	Atrazine Simazine	Agit sur la photosynthèse Utilisé dans les cultures de maïs	-Très hydrosoluble -Toxique pour le phytoplancton et les algues d'eau douce
	Dérivés des pyridines	Paraquat Diquat	Désherbant de la vigne	Lésions pulmonaires irréversibles
	Urées substituées	Diuron Linuron Isoproturon	Inhibiteur de la photosynthèse	Toxicité faible pour l'Homme
	Acides organiques	Glyphosate Glyphosinate	Désherbant total	Toxicité faible due à la pénétration difficile dans les feuilles
Fongicides	Triazoles	Triadiméfone	Tue les champignons lignivores	Hautement toxique pour l'Homme
	Benzimidazoles	Carbendazime	Inhibe la formation des microtubules	Très toxique pour les organismes vivants

Malgré leur rôle très important en raison de leur capacité à limiter les insectes, les mauvaises herbes et les autres parasites, la plupart des pesticides présentent un risque potentiel pour l'environnement, la santé humaine et animale.

II.2 Toxicologie et écotoxicologie

L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le danger et la nocivité des produits phytosanitaires et de leurs métabolites sur la santé et l'environnement.

II.2.1 Toxicologie : Impact sur l'Homme

L'Homme et les animaux en général, absorbent les pesticides et leurs produits dérivés via les aliments, l'eau, par contact avec la peau et les cuticules, ou encore par inhalation. Une

étude a d'ailleurs mis en évidence la présence de résidus de pesticides dans différentes matrices tels que l'urine, le sang, les tissus adipeux et même le lait maternel *(Chernyak et al., 1996)*.

En dépit de leur sélectivité et mode d'action spécifique, les pesticides exercent leur nocivité envers les organismes involontairement exposés, suite à la contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire. Les résultats issus de différentes études indiquent que les pesticides sont cytotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes. Ils exercent leur action toxique par génotoxicité directe, en subissant une activation métabolique et en formant des intermédiaires électrophiles capables d'interagir avec les acides nucléiques ; Ou par d'autres moyens indirects tel que le stress oxydatif, l'inhibition de la communication intercellulaire, la formation de récepteurs activés ou autres. A titre d'exemples, des études ont montré que certains pesticides et leurs produits de dégradation ont été identifiés comme des agents susceptibles de nuire à la fertilité masculine en particulier via une toxicité testiculaire *(Sánchez-Peña et al., 2004)*. Il a été effectivement mis en évidence qu'une exposition à certaines substances pouvait entrainer un dérèglement du système immunitaire *(Rekha et al., 2006)*. Certains pesticides sont aussi considérés comme étant des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire qu'ils interfèrent avec les hormones en simulant leur action *(Lintelmann et al., 2006)*.

Il faut également noter que les effets produits par la combinaison de plusieurs matières actives sont supérieurs aux effets individuels additionnés à cause de l'interaction entre les molécules simultanément présentes. Ainsi, le penconazole stimule la toxicité des organophosphorés envers les mammifères, ceci résulterait de la réaction d'activation des organophosphorés en leur métabolite toxique l'oxon *(Levine et Oris, 1999)*. Pareillement, le propiconazole augmente l'action toxique du parathion en activant la formation du paraoxon ; la toxicité des pesticides organophosphorés envers des organismes non ciblés serait donc induite par une exposition antérieure au propiconazole *(Levine et Oris, 1999)*. Aussi, le mélange diméthoate, azinphos-méthyle, diazinon, pyrimiphos-méthyle, et bénomyl exerce une toxicité très élevée par rapport aux substances testées individuellement sur des cellules humaines ; les concentrations habituellement trouvées dans les fruits (0,4 à 100 ppm) entraînent une inhibition de l'acétylcholine estérase et de la synthèse protéique, et l'effet du mélange ne peut pas être estimé à partir des tests réalisés séparément pour chaque matière active *(Marinovich et al, 1996)*.

Il s'est également avéré que des produits de dégradation des pesticides peuvent être

aussi toxiques, ou même plus toxiques, que la molécule d'origine. Par exemple, les dérivés du chlorpyrifos et du malathion ont été cent fois au moins plus toxiques que les composés parents, et les dérivés de diazinon sont dix fois plus toxiques *(Jokanović, 2001 et 2009 ; Kamel et al., 2009)*.

II.2.2 Ecotoxicologie : Devenir/impact dans/sur l'environnement

Après épandage, les pesticides subissent deux grands types de processus : le transport/transfert entre les trois compartiments de l'environnement (l'air, l'eau et le sol) et les transformations. Le transport des pesticides dépend de leurs caractéristiques : la volatilisation dans l'air, la solubilité dans l'eau, les processus d'adsorption-désorption dans le sol contrôlant leur infiltration jusqu'aux nappes phréatiques. Les processus de transformation comprennent les réactions déclenchées par la lumière solaire (photodégradation), l'absorption et la métabolisation par les organismes vivants, principalement les microorganismes (biodégradation) *(Jokanović, 2001)*.

La plupart des pesticides arrive sur le sol où ils sont soumis à un ensemble de processus qui conditionnent leur devenir et leur dispersion vers les autres compartiments de l'environnement. Les pesticides peuvent être métabolisés au grès de transformations abiotiques (photolyse, catalyse) ou biologiques/biotiques (via des microorganismes), ou ils peuvent être retenus par la plante (absorption) ou par le sol via des processus physico-chimiques conduisant à des liaisons plus ou moins réversibles entre les éléments constitutifs du sol et les pesticides *(Jokanović, 2001 ; Zacharia et Tano, 2011)*. Enfin, ils peuvent être transportés par lessivage (transport par infiltration de particules solides potentiellement contaminées), ruissellement (transport de surface) ou lixiviation (transport par infiltration de matière dissoute dans l'eau) ce qui conduit à la contamination des eaux de drainage, des eaux de surface et des nappes phréatiques. En proportion, le ruissellement emporte (suivant la saison) en moyenne 2% d'un pesticide appliqué sur le sol, rarement plus de 5 à 10% *(Leonard, 1990)*. Les pertes par lessivage et lixiviation sont généralement moins importantes *(Schiavon et al., 1995)*. En revanche, on a parfois constaté des pertes par volatilisation de 80 à 90 % du produit appliqué, quelques jours après le traitement *(Glotfelty et al., 1984 ; Taylor et Spencer, 1990)*.

En moyenne, de 25 à 80% des pesticides pulvérisés sont, selon les conditions d'applications, perdus via ces différents phénomènes. Une fois les pesticides dans l'eau et malgré la quantité disponible sur la planète (71% de la surface totale), il existe un phénomène de concentration plus ou moins important lié au cycle hydrologique. En effet, de l'eau chargée

en substances polluantes peut s'infiltrer dans la terre jusqu'à la nappe phréatique, puis être pompée par l'agriculteur pour irriguer son champ. La parcelle peut alors se charger de tous ces produits polluants *(Carsel et Smith, 1987)*. Nous décrivons ci-dessous de façon succincte les processus de dégradation des pesticides dans l'environnement, car dans ce travail nous développons une méthode pour la simulation de la dégradation environnementale des pesticides.

II.3 Processus de dégradation des pesticides

Dès leur application, les pesticides sont soumis à des processus de dégradations abiotiques (physico-chimiques) ou biotiques (biologiques). Les processus de dégradations abiotiques les plus courants sont l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction, la décarboxylation, l'isomérisation et la photodégradation. La biodégradation des pesticides peut être aérobie ou anaérobie et conduire à la production de métabolites jusqu'à la minéralisation *(Colin, 2000)*. La représentation des cinétiques de dégradation des pesticides dans l'environnement est généralement fondée sur une loi de décroissance exponentielle avec un pas de temps journalier, où la vitesse est donnée par le temps de demi-vie (DT_{50}). La DT_{50} est une propriété déterminée en laboratoire en conditions standardisées et au champ dans le cadre de la procédure d'homologation des pesticides.

II.3.1 La dégradation biotique

La dégradation biotique ou biodégradation d'une substance se définit comme le processus de transformation, voire de destruction partielle ou totale de celle-ci par des micro-organismes tels que des bactéries, des champignons ou d'autres agents biologiques. Cette capacité à dégrader les pesticides est étroitement dépendante de l'humidité et de la température (à moins de 10 °C, l'activité est ralentie, à plus de 50 °C une partie de la microflore perd de sa viabilité) *(Soulas, 1999)*.

La biodégradation requiert un consortium complexe de micro-organismes spécialisés et dotés de système enzymatique spécifique d'une réaction de la chaîne métabolique *(Barriuso et al, 1996)*. Les réactions de dégradations prépondérantes sont l'hydrolyse, l'oxydation puis la déshalogénation qui conduisent à la minéralisation. Les micro-organismes ont la capacité de s'adapter au xénobiotique et produire des enzymes capables de le dégrader *(Fournier, 1989)*. De plus, ils ont la faculté d'augmenter leur capacité de dégradation en fonction des quantités croissantes de pesticides épandues. Utilisant comme source de carbone et d'énergie les substances qu'ils dégradent, ils se développent avec la fréquence des apports réalisés.

II.3.2 La dégradation abiotique

Les transformations abiotiques sont dues à des réactions chimiques qui ne sont pas catalysées par des systèmes enzymatiques/biologiques. C'est une voie importante d'élimination ou de transformation des pesticides dans l'environnement. La dégradation abiotique comprend la transformation chimique (en absence de la lumière) et la transformation photochimique (en présence de la lumière). Parmi les principaux processus chimiques observés dans un environnement aqueux, on peut citer l'hydrolyse, la substitution nucléophile et les réactions d'oxydoréduction *(Schwarzenbach et al., 1993)*. L'hydrolyse est souvent considérée comme le plus important d'entre eux, tandis que les transformations photochimiques nécessitent de la lumière.

L´hydrolyse est due à la réaction d'une molécule d´eau avec une molécule organique, elle conduit à la coupure de celle-ci et au remplacement d'un atome ou d'un groupe d'atomes par un groupe hydroxyle OH. C'est une réaction importante qui a lieu spontanément sous l'effet de variations de la température, du pH et de la salinité ou de la teneur en matière organique de l´eau qui augmente la solubilité des pesticides notamment par complexation avec les substances humiques. Les processus de transformation que subissent les pesticides sont donc déterminés par leurs structures, les conditions environnementales et le type de transport (figure II.1).

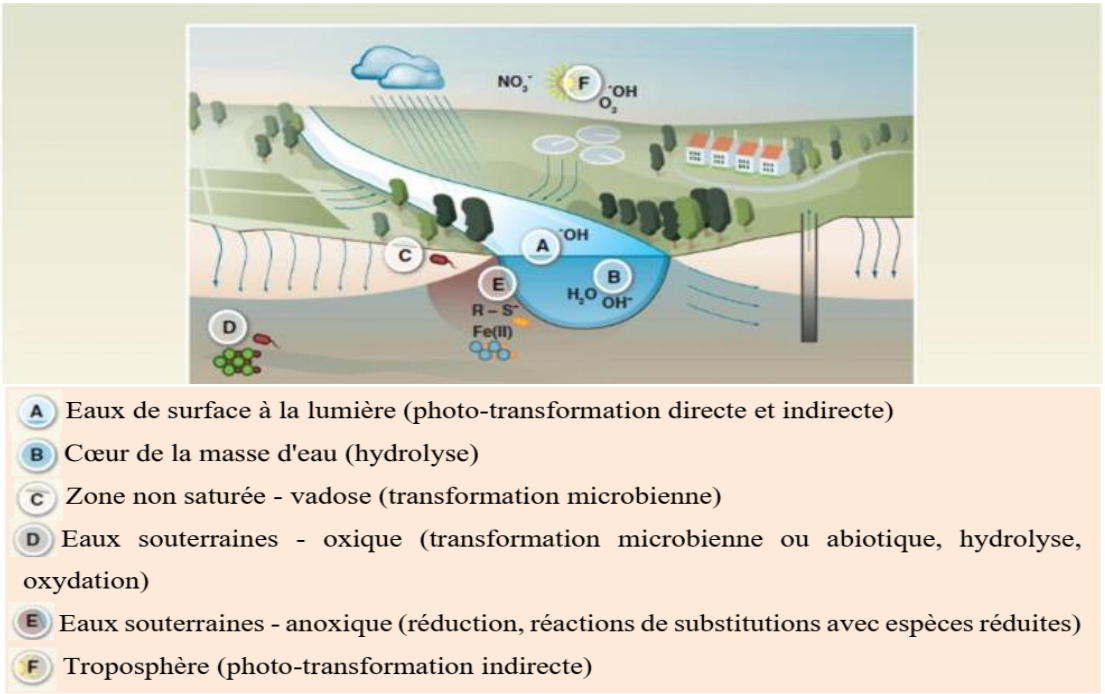


Figure II. 1: *Exemple de transformations des pesticides dans l'environnement (Fenner et al., 2013).*

Les études des impacts possibles des pesticides sur les organismes vivants nécessitent des mesures fiables des niveaux d'exposition de ces organismes pour faire évaluer le lien entre les effets biologiques mesurés et la contamination des milieux par les pesticides.

II.4 Réglementations

A travers différentes études citées dans les paragraphes précédents, il est clair que les pesticides constituent un danger sanitaire réel et peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine. La protection contre les pesticides constitue donc un enjeu majeur de santé publique. C'est pourquoi, des réglementations portant sur les pesticides ont été mises en place par les différentes autorités gouvernementales.

Depuis le début des années quatre-vingt, l'Union Européenne a progressivement encadré l'utilisation des pesticides par diverses réglementations visant à réduire les impacts avérés pour l'environnement et les risques plausibles pour la santé humaine. La directive 91/414/CE adoptée en 1991 par le conseil européen, vise à évaluer les risques pour la santé et l'environnement des pesticides utilisés en agriculture afin d'optimiser la protection de l'Homme et des milieux. Parmi les mesures adoptées figurent l'évolution européenne des substances actives, ainsi qu'une revue d'ensemble des substances actives existant sur le marché en 1993. Ce programme a été organisé en phases successives et entraîne la disparition d'un certain nombre de substances actives. Les principales causes de non inscription et de retrait d'une substance peuvent être diverses : les propriétés toxicologiques, écotoxicologiques ou environnementales ne correspondent plus aux normes actuelles qui ont beaucoup évolué, surtout sur le plan environnemental *(UE, 2008)*.

La commercialisation et la distribution des produits phytosanitaires étant soumises à la demande d'une autorisation de mise sur le marché, le conseil de l'Union Européenne a harmonisé les conditions d'obtention pour les états membres dans la directive CE 1107/2009. Pour obtenir l'autorisation, le produit devra subir une évaluation de sa substance active suivant différents critères *(Aubertot et al., 2005)*, à savoir :

- Les propriétés physico-chimiques : Inflammabilité, explosivité, solubilité dans l'eau et les solvants, pression de vapeur saturante ;

- L'évaluation de la toxicité sur l'Homme : Profils de pénétration et d'élimination de la substance dans l'organisme, mesure de la toxicité aiguë, du risque allergique, de la toxicité subaiguë sur des mammifères pour y tester la tératogénèse, du pouvoir mutagène et cancérogène. Ces différentes études permettront de définir une Dose Journalière Admissible

(DJA, exprimée en µg/kg/jour) ainsi qu'une dose d'exposition acceptable pour l'applicateur (*AOEL* de l'anglais *Acceptable Operator Exposure Levels*) ;

- L'évaluation des résidus dans les végétaux, produits de transformations et les denrées alimentaires destinées aux animaux. Cela comprend l'étude du métabolisme des plantes destinées à être traitées ainsi que le suivi des potentiels résidus dans les végétaux traitées et les denrées alimentaires produits à partir de ces plantes. Ces études servent à définir les limites maximales de résidus (LMR) ;

- L'évaluation du devenir de la substance et de son comportement dans l'environnement. Ces études comprennent la dégradation dans l'eau, l'air, les sols, à la lumière, la migration de la substance ou de ses métabolites dans les eaux de surface et souterraines ainsi que sa rémanence ;

- L'évaluation de la toxicité sur la faune et la flore. Les études comprennent la toxicité sur les oiseaux, les organismes aquatiques (poissons, crustacés, algues), les mammifères terrestres, les reptiles, les bactéries du sol, les insectes et en particulier les abeilles ;

- L'évaluation de l'efficacité, incluant la prise en compte de la résistance des agresseurs visés, l'incidence sur le rendement des cultures, la qualité des végétaux produits, l'innocuité sur les cultures voisines ainsi que sur les animaux non visés (dommages collatéraux).

Pour donc protéger le consommateur et l'utilisateur, la loi française impose un délai entre l'épandage et la récolte de deux jours minimum, mais selon l'insecticide, ce délai peut être étendu jusqu'à 45 jours comme c'est le cas pour les insecticides systémiques. Ce délai permet de respecter les limites maximales de résidus dans des conditions normales d'utilisation. Ces LMR correspondent au niveau maximum de résidus de pesticides (ou de leurs métabolites) que l'on peut trouver dans un produit alimentaire. Exprimées en mg/kg, elles sont indiquées après utilisation d'un pesticide conformément aux bonnes pratiques agricoles pour les denrées végétales, les denrées animales et l'eau consommable. Le JO L70/4 a fixé une LMR à 0,01 $mg.kg^{-1}$ de denrée en substance active, dans le cas général. La directive 98/83/CE stipule que la teneur en pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine ne doit pas être supérieure à 0,1 $\mu g.L^{-1}$ pour chaque pesticide (sauf pour quatre composés : l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'époxyde d'heptachlore, pour lesquelles la limite applicable est de 0,03 $\mu g.L^{-1}$) et 0,5 $\mu g.L^{-1}$ pour l'ensemble des pesticides détectés et quantifiés. Pour une eau brute, la teneur en pesticides ne doit pas dépasser 2 $\mu g.L^{-1}$ pour chaque pesticide et 5 $\mu g.L^{-1}$ pour le total des substances mesurées. La Directive Cadre Eau

(2000/60/CE) désigne, dans la liste de substances prioritaires à rechercher, des pesticides comme le diuron et l'atrazine pour déterminer le bon état chimique de l'eau. La convention de Rotterdam en 1998 a mis en place des processus d'importation, en connaissance de causes, afin d'aller vers une homogénéisation des interdictions des produits toxiques dans les pays industrialisés comme dans les pays en développement. Cela implique que le pays exportateur informe le pays importateur de la classification du produit en termes de toxicité notamment *(Even et al., 2002 ; UE, 2008)*. Ainsi, la détection et le dosage de résidus de pesticides présentent des enjeux importants pour le contrôle et le respect des réglementations.

II.5 Pesticides étudiés et caractéristiques physico-chimiques

Les pesticides étudiés et leurs propriétés physico-chimiques sont détaillés dans cette partie. En général, les caractéristiques essentielles pour étudier le devenir et le transport d'un pesticide dans l'environnement sont classées à deux niveaux différents *(Himel et al., 1990)* :

• Au niveau physique :

- La solubilité (en $mg.L^{-1}$ à une température donnée), dans l'eau généralement, qui est un des paramètres de la lessivabilité des pesticides ;

- La pression de vapeur saturante (en unité de pression à une température donnée) renseignant sur la volatilité d'un produit ;

- La constante associée de Henry (en $Pa.m^3.mol^{-1}$ à une température donnée) évaluant la répartition d'un produit entre la solution du sol et l'atmosphère ;

- Le coefficient de distribution dans le sol K_d, normalisé par le pourcentage massique de carbone organique pour les molécules non ionisées (K_{oc} en $cm^3.g^{-1}$), utilisés respectivement, pour prévoir la répartition des pesticides entre la solution et la fraction organique insoluble du sol (K_{oc}) ou simplement entre la solution et une masse de sol (K_d), globalement il est le paramètre évaluant la capacité d'adsorption.

• Au niveau chimique :

- Les états ioniques (cationique, anionique, basique ou acide) ;

- Les caractères hydrophiles/hydrophobes ;

- La réactivité chimique, photochimique et biologique (constante de transformation de premier ordre par exemple).

Ces propriétés, combinées avec le taux de pesticides appliqué et entrant dans

l'environnement peuvent déterminer sa distribution dans les différents compartiments de l'environnement (sol, solution du sol, air, végétaux) et donc leur potentialité à être transportés le long de chaque voie de transport (atmosphère, eau superficielle). La persistance environnementale du pesticide est également reliée aux propriétés de celui-ci *(Carsel et Smith, 1987)*.

Une brève description (utilisations et principales caractéristiques physico-chimiques) des différents composés étudiés (carbendazime, diuron et autres herbicides de la famille des phénylurées) est faite à la suite de cette partie.

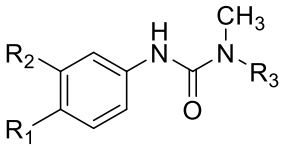
II.5.1 Les herbicides phénylurées

Les herbicides phénylurées sont quelques-unes des matières actives utilisées par les collectivités ou les services de l'État pour le désherbage des bordures de voirie ou des voies ferrées et aussi utilisées par les agriculteurs *(Cluzeau, 1997 ; Torstenson et al., 2003)*. Leur présence a été mise en évidence dans les eaux de surface et de ruissellement urbaines, parfois à des concentrations de plusieurs microgrammes par litre *(Cohen et al., 1986)*.

II.5.1.1 Structures chimiques

Les composés de type phénylurées sont des molécules dérivées de l'urée ($H_2N–CO–NH_2$). Ils ont en commun une fonction phényle sur l'un des azotes. Ils sont différents entre eux par la nature des substituants portés soit par le deuxième atome d'azote soit par le cycle aromatique. Leur nomenclature se termine par le suffixe « uron ». Deux principaux groupes peuvent être distingués, ils recouvrent les composés présentant une fonction *N* terminale substituée par deux fonctions méthyle ou par une fonction méthyle et une fonction méthoxy respectivement (tableau II.2).

Tableau II. 2: *Structure des pesticides de la famille phénylurées (Salvestrini et al., 2002).*



Noms usuels	R_1	R_2	Noms chimiques
	$R_3 = CH_3$		
Fénuron	H	H	3-phényl-1,1-diméthylurée
Monuron	Cl	H	3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée
Diuron	Cl	Cl	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
Fluométron	H	CF_3	3-(3-trifluométhylphényl)-1,1-diméthylurée
Chlorotoluron	CH_3	Cl	3-(3-chloro-4-methylphényl)-1,1-diméthylurée
Métoxuron	CH_3O	Cl	3-(3-chloro-4-methoxylphényl)-1,1-diméthylurée
Chloroxuron	Cl-(C_6H_4)-O	H	3-(4-[4-chlorophénoxy]phényl)-1,1-diméthylurée
Isoproturon	ipr	H	3-(4-isopropylphényl)-1,1-diméthylurée
	$R_3 = OCH_3$		
Monolinuron	Cl	H	3-(4-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée
Linuron	Cl	Cl	3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée
Métobromuron	Br	H	3-(4-bromophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée
Chlorbromuron	Br	Cl	3-(4-bromo-3-chlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée

II.5.1.2 Mode d'action

L'absorption des phénylurées est essentiellement racinaire, ils sont véhiculés par la sève brute, pour s'accumuler dans les feuilles où ils inhibent la photosynthèse. Les molécules d'herbicide pénètrent dans les chloroplastes et bloquent le transfert électronique au niveau du photosystème II *(Cluzeau, 1997)*.

La sélectivité d'un pesticide est liée aux phénomènes de pénétration dans la plante et de transport vers les sites cibles ainsi qu'à l'aptitude de la plante à le métaboliser en composés inactifs. Les phénylurées sont généralement dégradées au sein des plantes par des réactions d'oxydations concernant principalement la fonction alkyle portée par le cycle ou l'azote terminal. Les produits formés correspondent à des composés *N*- désubstitués *(Giocomazzi et*

Cochet, 2004).

II.5.1.3 Exemple de composé modèle : Le diuron

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi principalement comme composé modèle le « diuron ». Cependant, dans l'optique d'avoir une idée générale en ce qui concerne la dégradation électrochimique des phénylurées, d'autres composés de la même famille ont également été étudiés. Il s'agit principalement de l'isoproturon, du fénuron, du monuron, du linuron, du monolinuron, du métoxuron et du chlortoluron.

Le diuron est un herbicide appartenant à la famille des urées et précisément au sous-groupe des phénylurées *(Ramirez-Zamora et Seux, 1999)*. Cette urée substituée se présente sous la forme d'un solide incolore, inodore et peu soluble dans l'eau. Son taux d'hydrolyse est négligeable à pH neutre mais augmente dès que les conditions deviennent fortement acides ou basiques *(Salvestrini et al., 2002)*. Ses caractéristiques principales sont données dans le tableau II.3.

Tableau II. 3: *Propriétés physico-chimiques du diuron (Giocomazzi et Cochet, 2004).*

Nom (IUPAC)	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée
Formule brute	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$
Masse molaire (g /mol)	233,09
Pression de vapeur	0,01 mPa à 25 °C
Température de fusion	158 °C
Température d'ébullition	Décomposition à 180 °C
Solubilité dans l'eau	35 mg/L à 20 °C ; 42 mg/L à 25 °C
Loc $K_{oct\text{-}eau}$	2,9
Koc	480 cm^3/g
DL50 rat ingestion	3400 mg/kg
DJA	2 µg/kg/jour

La pollution des sols et des systèmes aquatiques par les produits chimiques utilisés dans l'agriculture est l'un des problèmes majeurs actuels. Le diuron, considéré comme fortement toxique et persistant *(El-Madani et al., 2006)*, fait partie de ces produits. Sa demi-vie est estimée à plus de 300 jours *(Malato et al., 2003)*. Cette persistance est nécessaire pour réaliser l'activité herbicide désirée pendant la germination de la graine. En effet, selon un rapport de l'Association de Coordination Technique Agricole (ACTA) publié en 2004 *(ACTA, 2004)*, cet herbicide agit sur les processus de photosynthèse. Son action est exclusivement de contact et s'exerce sur toutes les parties vertes des végétaux, et plus particulièrement des dicotylédones. Son mode d'action particulier lui confère une propriété desséchante. C'est

pourquoi, il est également utilisé dans l'entretien des voiries et des espaces verts. En raison de son emploi fréquent dans l'agriculture et pour l'entretien des voies de transport et des espaces urbains, le risque de contamination des eaux superficielles est élevé. En effet, c'est un composé persistant et très mobile dans les sols. Des concentrations de plusieurs $\mu g.L^{-1}$ en diuron ont ainsi été fréquemment relevées à travers le monde *(Giocomazzi et Cochet, 2004)*.

II.5.2 Les carbamates : La carbendazime (CBZ)

La carbendazime fait partie des fongicides les plus utilisés dans l'agriculture *(Mazelier et al., 2003)*. Encore connue sous le nom de méthyle benzimidazole-2-ylcarbamate, la carbendazime est une substance active de produits phytosanitaires, qui présente un effet fongicide, et qui appartient à la famille des benzimidazoles et des carbamates. Elle se présente sous forme de cristaux incolores ou de poudre grise à blanche *(Yaser et al., 2011)*. Il s'agit en fait d'un fongicide à large spectre d'action dont l'activité systémique inhibe la formation des microtubules dans le fuseau achromatique (ou fuseau mitotique) des cellules fongiques, ce qui se traduit par une incapacité pour les spores de croître et de se diviser *(Stephen et al., 2005 ; Yaser et al.,2011)*. La CBZ est également le produit de décomposition de deux autres pesticides à savoir le bénomyl et le méthylthiophanate *(Gonzalez et al., 2000)*.

La structure de la carbendazime est donnée au schéma II.1 ci-dessous.

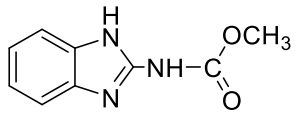


Schéma II. 1: *Structure de la carbendazime (Bonnard et al., 2009).*

Les propriétés physico-chimiques de la carbendazime sont regroupées dans le tableau II.4 ci-dessous :

Tableau II. 4: *Propriétés physico-chimiques de la carbendazime (Bonnard et al., 2009).*

Nom (IUPAC)	Méthyl benzimidazol-2-ylcarbamate
Formule brute	$C_9H_9N_3O_2$
Masse molaire (g /mol)	191,18
Pression de vapeur	$<10^{-5}$ Pa à 20 °C
Température de fusion (°C)	302 - 307 (avec décomposition)
Solubilité dans l'eau à 24 °C	0,008 g/L
Solubilité dans les solvants organiques	0,3 g/L dans l'acétone ou méthanol 5 g/L dans le diméthylformamide
Coefficient de partage octanol / eau	1,52

La carbendazime est un polluant très toxique pour les organismes vivants (aquatiques et humains), chez qui elle entraîne des effets néfastes à court et à long terme. Dans les eaux, la concentration létale est de 0,87 mg/L pour les poissons et 0,34 mg/L pour les algues. La dose supérieure à 10 g/kg est aussi létale pour les rats. La dose journalière acceptable de la carbendazime pour l'Homme est de 0,03 mg/kg/jour *(Bonnard et al., 2009)*. Des effets cancérigènes, génotoxiques et sur la reproduction ont également été observés sur deux des trois souches de souris étudiées *(Nakai et al., 1992)*. Les lettres N et T sont portés sur tous les emballages de ce produit et sur toutes les fiches de sécurité. La lettre N explique le danger que représente ce produit pour l'environnement et T, sa toxicité. La carbendazime est nocive pour l'Homme, elle bloque la division cellulaire et nucléaire dans les organismes vivants. Elle peut provoquer des altérations génétiques héréditaires, altérer la fertilité et avoir des effets néfastes sur l'embryon *(Bonnard et al., 2009 ; Jiangyuan et Yongmin, 2009)*.

Lorsqu'un pesticide se retrouve dans l'environnement, il se dégrade et génère plusieurs sous-produits appelés produits de dégradations ou métabolites, et éventuellement du dioxyde de carbone et de l'eau. Chacun de ces métabolites possède ses propres propriétés chimiques incluant toxicité, capacité d'adsorption et résistance à la dégradation. Dans certains cas les métabolites peuvent être plus toxiques et/ou persistants que le pesticide lui-même. Dans la plupart des cas, la nature de ces métabolites est largement inconnue.

Le chapitre qui suit fait un point sur les méthodes généralement utilisées pour la simulation de la dégradation environnementale des pesticides. Une attention particulière est portée sur l'utilisation de ces couplages EC-SM (Électrochimie - Spectrométrie de Masse) et EC-CL-SM (Électrochimie - Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse) pour l'élucidation des mécanisme redox des pesticides dans l'environnement.

Chapitre III. Produits de transformation des pesticides - Aperçu des méthodes de simulation des dégradations environnementales

Introduction

Les produits de transformation (PsT) des pesticides sont des intermédiaires structurellement divers qui sont formés via différents mécanismes et sont présents dans plusieurs matrices à travers le monde. La connaissance des voies de transformation et d'identification de ces PsT est importante dans plusieurs domaines de recherche, notamment dans le domaine de la santé, de l'alimentation et de l'environnement. La recherche sur le métabolisme et l'étude des effets des PsT sont à la base, par exemple, du développement des xénobiotiques (pesticides, médicaments) ou des stratégies pour éviter ou réduire les PsT nocifs pour l'environnement *(Bletsou et al., 2015 ; Zhang, Z. et Tang, 2018)*. La figure III.1 donne un aperçu des processus de transformation. Il est à noter que les PsT sont appelés métabolites ou produits de dégradation, selon l'origine. Ainsi, les métabolites sont formés par des processus de biotransformation dans les organismes vivants, tandis que les produits de dégradation sont formés par divers processus microbiens, biotiques et abiotiques dans l'environnement.

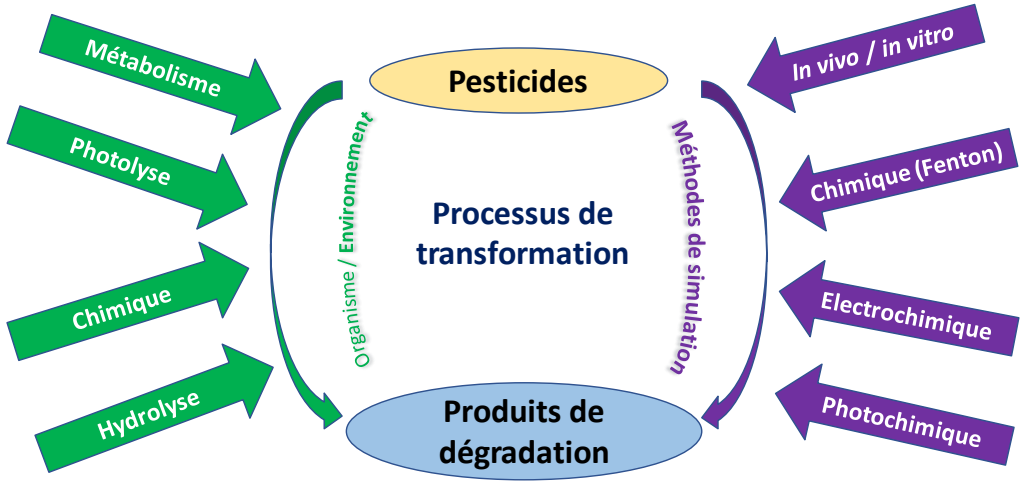


Figure III. 1: *Aperçu schématique des processus de transformation des pesticides. Du côté gauche, les processus de transformations naturelles dans les organismes et l'environnement, du côté droit, les méthodes de simulation les plus courantes.*

Tous ces processus engendrent la formation des PsT à partir des pesticides ou tout autre composés exogènes. Généralement les processus de détoxication naturels visent à générer des PsT facilement dégradables et inoffensifs. Cependant, il arrive que certains de ces PsT soient plus persistants, (bio) actifs ou nocifs et toxiques par rapport au composé parent

(Bletsou et al., 2015 ; Pico et Barcelo, 2015 ; Speight, 2017). A cet effet, ils doivent être étudiés en fonction de leur mode de formation et de leur structure. Les premières recherches sur l'identification des PsT des pesticides ont été effectuées dans des matrices telles que l'eau, le sol et l'atmosphère. Cependant, leur identification dans des échantillons réels est souvent difficile en raison des effets de dilution. De plus, l'identification de ces PsT et les études sur leurs processus de formation pourraient être entravées par la complexité des matrices. L'application de différentes méthodes pour simuler les PsT permet de s'affranchir des problèmes mentionnés ci-dessus. Il faut ajouter que ces méthodes sont plus rapides et peu couteuses *(Lohmann et Karst, 2009)*. Un autre avantage est la production des PsT en plus grandes quantités avec une grande pureté *(Bletsou et al., 2015)*. Cela offre la possibilité d'évaluer les risques, comme les tests de toxicité ou d'utiliser les PsT isolés comme matériau de référence (standards). Tous les processus de transformation sont basés sur des réactions chimiques simples comme l'oxydation, la réduction, l'hydroxylation, l'hydrolyse, le clivage et la désalkylation *(Bletsou et al., 2015 ; Hubner et al., 2015)*. Ces réactions correspondent aux réactions de phase I du métabolisme et sont également des réactions qui ont lieu dans l'environnement. D'autres réactions typiques de phase II comme la conjugaison ou la méthylation sont également impliquées dans le processus de métabolisme.

En principe, les xénobiotiques, particulièrement les pesticides ne sont homologués et utilisés que s'il y a démonstration de leur non rémanence dans l'environnement au-delà de leur durée de vie (temps de demi-vie dans le sol de l'ordre de quelques jours à quelques semaines). Tout au long du chapitre II, il a été démontré que les pesticides sont présents dans l'environnement et qu'ils peuvent contaminer des zones très étendues loin de leurs lieux d'épandage. Il existe trois grands générateurs de diversité chimique : l'environnement, les stations d'épuration et l'Homme. Dans l'environnement, il peut se produire des phénomènes de dégradation des pesticides lors de processus biologiques par des micro-organismes, des plantes, ou lors de processus abiotiques tels que des réactions chimiques et photochimiques. Les processus de transformation que subissent les pesticides sont déterminés par leurs structures, les conditions environnementales et le type de transport *(Gomez et al., 2012)*.

D'une manière générale, les PsT, quels qu'ils soient, contribuent significativement au risque posé par les molécules mères *(Escher et Fenner, 2011)* s'ils sont formés avec un haut rendement, s'ils sont plus persistants ou plus disponibles que les molécules parentes ou s'ils sont plus toxiques (effet cumulé d'un couple parent-métabolite) *(Neuwoehner et al., 2009, 2010)*. Certains articles montrent qu'une partie des PsT, généralement la grande majorité sont

clairement plus toxiques que la molécule mère. Par conséquent, ce sont bien des milliers voire des dizaines de milliers de métabolites potentiels, provenant de la dégradation des molécules parents, qui pourraient être créés dans l'environnement et qui ne sont peu ou pas suivies à ce jour par les méthodes de références. Avant d'aborder la description des processus de transformation des pesticides, il nous a semblé important de faire un bref rappel sur et les méthodes de transformation et d'analyse de ces derniers. Une attention particulière a été porté sur les méthodes de couplages électrochimie-chromatographie liquide-spectrométrie de masse (EC-CL-SM) et électrochimie-spectrométrie de masse (EC-SM), car celles-ci ont été utilisé dans le cadre de ce travail.

III.1 Méthodes de transformation et d'analyse des pesticides

III.1.1 Méthodes de métabolisme

Les modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* sont des approches utiles pour identifier les principales voies métaboliques *(Lohmann et Karst, 2009 ; Zhang, Z. et Tang, 2018)*. Le métabolisme des composés exogènes (organismes vivants) est également connu sous le nom de processus de biotransformation et se déroule principalement dans le foie. Le processus de biotransformation dont l'objectif est d'augmenter la polarité du composé pour permettre l'élimination de l'organisme est divisé en deux phases. Dans la phase I, l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse se produisent principalement et elles sont catalysées par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) *(Sono et al., 1996 ; Prost et Thormann, 2003 ; Lynch et Anita, 2007)*. Les métabolites de phase I peuvent être excrétés ou subir une autre réaction de conjugaison (phase II) avec des biomolécules telles que l'acide glucuronique ou le glutathion *(Brandon et al., 2003 ; Lohmann et Karst, 2009 ; Portychova et Schug, 2017)*. Il existe de nombreux modèles de tests disponibles avec des complexités différentes, qui vont des expériences dans les éprouvettes jusqu'aux cultures cellulaires, aux animaux, aux sujets humains sains et aux essais cliniques *(Zhang, D. et al., 2012)*. Différents modèles de foie humain *in vitro* ont été développés, notamment les supersomes, les microsomes, les fractions S9, les lignées cellulaires, les lignées cellulaires transgéniques, les hépatocytes primaires, les tranches de foie et le foie perfusé *(Brandon et al., 2003)*. Pour ces méthodes, une substance d'essai faiblement concentrée peut être utilisée et, par conséquent, moins de métabolites sont générés. Le processus de biotransformation est initié par un transfert d'électron unique (*SET, Single Electron Transfer*) ou un transfert d'atome d'hydrogène (*HAT, Hydrogen Atom Transfer*) impliquant un complexe fer-oxygène *(Lecours et al., 2018)*. Les principales réactions catalysées par le CYP450 sont des oxydations comme l'hydroxylation du carbone, la

désalkylation des hétéroatomes, l'oxygénation des hétéroatomes, l'oxydation des liaisons, la désaturation des hydrocarbures, la déhalogénation et l'époxydation *(Guengerich, 2001 ; Portychova et Schug, 2017 ; Zhang, Z. et Tang, 2018)*. Une autre méthode de métabolisme couramment utilisée est l'incubation de composés cibles avec des microsomes hépatiques humains (*HLM, Human Liver Microsomes*) ou de rats (*RLM, Rat Liver Microsomes*). La figure III.2 présente un aperçu du parcours d'un xénobiotique au sein de l'organisme au travers des différentes phases de son métabolisme.

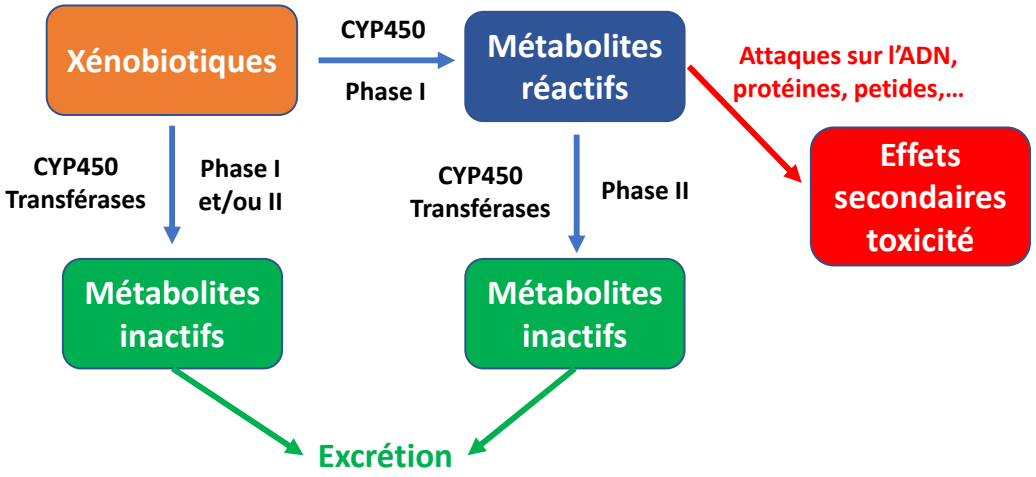


Figure III. 2: *Schématisation des différentes phases du métabolisme in vivo d'un xénobiotique.*

En effet, durant le parcours d'un xénobiotique dans l'organisme plusieurs chemins peuvent s'offrir à lui : soit il peut être directement distribué sur son site d'activité thérapeutique, puis excrété, soit le xénobiotique est métabolisé en métabolites stables, qui seront ensuite excrétés, soit il est métabolisé en une ou plusieurs espèces instables, qui peuvent endommager l'organisme par le biais de liaisons covalentes avec des biomolécules. Après incubation, les métabolites sont isolés et analysés par des techniques chromatographiques couplées à la détection de spectrométrie de masse, à barrettes de diodes (*DAD, Diode Array Detector*) ou à fluorescence (*FLD, Fluorescence Detector*) *(Portychova et Schug, 2017)*.

III.1.2 Méthodes photochimiques

La photolyse est généralement un clivage photo-induit d'une liaison chimique dans une molécule. Les processus photolytiques se produisent dans l'atmosphère et à la surface de l'eau et du sol, et le processus de transformation est initié par l'absorption de la lumière *(Bletsou et al., 2015)*. La photolyse peut être directe ou indirecte. Celle directe se produit lorsque le

composé d'intérêt absorbe la lumière, puis le processus de transformation est engendré, entrainant ainsi la rupture des liaisons. La photolyse indirecte quant à elle se produit lorsqu'une deuxième molécule supplémentaire, d'origine naturelle (comme l'acide humique ou le nitrate), absorbe la lumière et génère de fortes espèces réactives de l'oxygène (oxygène singulet, radicaux hydroxyle ou radicaux alkyle peroxyle). Ces radicaux initient le processus de transformation du composé cible *(Fatta-Kassinos et al., 2011 ; Santos et al., 2016)*. En général, le taux de photolyse dépend de nombreux facteurs chimiques et environnementaux, notamment les propriétés d'absorption de la lumière, la réactivité du composé et l'intensité de l'irradiation solaire. Les substances comportant des doubles liaisons ou hétéroatomes peuvent absorber la lumière entre 200 nm et 800 nm selon les propriétés structurales actuelles *(Kosjeck et Heath, 2015)*. Les processus photolytiques naturels sont simulés dans des conditions de laboratoire pour étudier l'influence de différents paramètres sur la photolyse et les PsT qui en résultent. Pour les expériences de photolyse, les composés d'intérêt sont irradiés pendant un temps déterminé avec une lumière d'une certaine longueur d'onde. Les groupes fonctionnels de ces composés absorbent alors la lumière de la zone UV entre 100 nm et 400 nm, avec différentes sources de lumière disponibles, divisées en monochromes ou polychromes. Avec les sources de lumières polychromatiques, une plage de longueurs d'onde définie est utilisée pour l'irradiation et la plage est sélectionnée par des filtres. La lumière du soleil est la principale source d'irradiation dans l'environnement, car elle est responsable de la photolyse qui se produit. Elle peut être simulée par des sources de lumière polychromatiques comme une lampe Xénon. D'autres méthodes de simulation sont des méthodes photocatalytiques, avec du TiO_2 comme catalyseur le plus courant *(Fujishima et al., 2008)*. Ici la molécule de catalyseur absorbe l'irradiation électromagnétique et le TiO_2 excité produit des radicaux oxydants ou réducteurs (par exemple, des radicaux hydroxyles), qui participent au processus de transformation du composé. Les réactions simulées sont entre autres l'hydroxylation, la déshydrogénation et/ou la désalkylation des hétéroatomes *(Ruokolainen et al., 2016)*. On peut également utiliser les photo-oxydants tels que l'ozone (ozonation) et le dichlore (chloration) qui après irradiation déclenchent le processus de transformation *(Gligorovski et al., 2015 ; Menz et al., 2017)*. Ces méthodes (ozonation et chloration) sont souvent utilisées dans le traitement des eaux usées, avec pour objectif d'éliminer les substances organiques. Principalement, des processus d'oxydation avancés (POA) ou de désinfection (par chloration, ozonation ou irradiation UV) sont couramment utilisés, mais la possibilité de générer de nouveaux PsT par ces techniques n'est pas exclue *(Hubner et al., 2015 ; Menz et al., 2017)*.

III.1.3 Méthodes Fenton

Le réactif de Fenton contient du peroxyde d'hydrogène et des ions fer(II) *(Gligorovski et al., 2015)*. Il s'agit d'un processus chimique, où le sel de fer agit comme catalyseur pour la décomposition du peroxyde d'hydrogène. La décomposition du peroxyde d'hydrogène génère des radicaux hydroxyles très réactifs qui déclenchent le processus de transformation du composé d'intérêt *(Gligorovski et al., 2015)*. Le réactif de Fenton classique est généralement utilisé pour la transformation en milieu aqueux. Elle peut cependant être combinée avec des méthodes électrochimiques ou assistées par photolyse *(Soo-Myung et Alfons, 1998 ; Ventura et al., 2002 ; Brillas et al., 2009 ; Gligorovski et al., 2015 ; Ruokolainen et al., 2016)*. Ici, le réactif de Fenton est produit soit électrochimiquement (le peroxyde d'hydrogène est généré simultanément par l'impact d'un potentiel d'application) ou photochimiquement (les complexes de fer absorbent la lumière UV).

III.1.4 Méthodes électrochimiques et couplages EC-(CL)-SM

L'électrochimie (EC) et de manière générale les techniques électroanalytiques offrent la possibilité d'étudier les propriétés redox des composés chimiques *(Lohmann et Karst, 2009 ; Jahn et Karst,, 2012 ; Mandic, 2017 ; Portychova et Schug, 2017)*. La transformation électrochimique peut se faire de façon directe ou indirecte. Dans le cas de la transformation électrochimique directe, le produit est formé par un transfert d'électrons entre l'électrode et le composé. En mode indirect, les réactifs ou médiateurs sont générés électrochimiquement et initient la transformation du composé d'intérêt *(Mandic, 2017)*. Il existe différentes techniques électroanalytiques à l'instar de la potentiométrie (la différence de potentiel entre deux électrodes est mesurée), la coulométrie (la charge est déterminée), l'ampérométrie (le courant est mesuré) et la voltampérométrie (un courant est mesuré tout en variant le potentiel d'une électrode). Les expériences électroanalytiques peuvent être effectuées facilement à l'aide d'une cellule électrochimique typique composée de deux ou trois électrodes et d'un potentiostat. L'oxydation électrochimique qui se produit par application d'un potentiel, conduit à des réactions comparables à celles de la phase I du processus de biotransformation. En somme, l'EC mime les réactions initiées par un transfert à un seul électron comme la N-désalkylation, la S et la P-oxydation, l'oxydation de l'alcool, les réactions de déshydrogénation, l'hydroxylation des composés aromatiques activés et la déshalogénation *(Jahn et Karst, 2012 ; Martin et al., 2017 ; Lecours et al., 2018)*. La rapidité des résultats générés et l'absence de matrices complexes sont les avantages de l'EC. Le réacteur électrochimique équipé d'une cellule en flux en couche mince présente l'avantage d'un

couplage en ligne avec différents appareils comme la CL-DAD/FLD, CL-SM ou des détecteurs de SM *(Jahn et Karst, 2012 ; Bruins, 2015 ; Portychova et Schug, 2018)*. La génération et l'identification des PsT sont possibles avec un seul système, ce qui permet d'identifier des PsT de courte durée. En plus de la simulation des réactions de phase I (oxydations ou réductions), le couplage EC-SM pourrait être utilisé pour simuler les réactions de phase II. À cette fin, les espèces réactives générées à partir de EC sont piégées par des biomolécules sélectionnées telles que l'acide glucuronique ou le glutathion avant d'être analysées par les techniques de SM par exemple.

Unies pour la première fois au début des années septante, l'électrochimie (EC) et la spectrométrie de masse (SM) connurent une lente évolution. L'intention de combiner la capacité de l'électrochimie à imiter/mimer les réactions de métabolisme et les performances analytiques de la spectrométrie de masse, stimula peu à peu la recherche dans cette voie. Une instrumentation de qualité insuffisante initialement et l'engouement des scientifiques envers les techniques de biologie moléculaire rendirent difficile sa popularisation. Les derniers développements technologiques et les nouveaux défis de la recherche pharmaceutique actuelle revoient à la hausse les techniques instrumentales hybrides dans l'étude fondamentale des mécanismes de métabolisation *(Jurva et al., 2000 ; Jurva et al., 2003 ; Van Berkel, 2004)*. Diverses équipes ont proposé différents dispositifs électrochimiques d'oxydation du/des composé(s) sous étude : cellule électrochimique construite "maison", en couche mince ou *Coulochem*[1] et intégrée dans divers schémas de montage *(Jurva et al., 2000 ; Jurva, 2004 ; Schofield et al., 2000 ; Gamache et al., 2004 ; Jurva et al., 2002)*. L'opportunité de combiner "*online*" une cellule électrochimique et la spectrométrie de masse offre la possibilité de l'identification de produits d'oxydation avec un maximum de certitude. Différentes associations alternatives apparaissent : EC-SM, EC-CL-SM et CL-EC-SM *(Blankert et al., 2005 ; Van Leeuw et al., 2005)*. Grâce à un volume mort faible, un temps de résolution court et la compatibilité avec la spectrométrie de masse, ces techniques hybrides autorisent l'identification des produits d'oxydation mais aussi d'éventuelles espèces instables.

En aucun cas capable de simuler l'intégralité des réactions biologiques, l'association EC-(CL)-SM vient se placer en soutien des méthodes existantes d'étude de métabolisme. La facilité de mise en œuvre, le coût relativement peu onéreux de l'électrochimie et la rapidité de

[1] *Coulochem*® : dénomination commerciale de différentes cellules électrochimiques de design varié et pour applications multiples (http://www.esainc.com).

réponse installent le couplage EC-(CL)-SM dans une position stratégique en tant qu'outil de prédiction et de filtration précoce, compétent dans l'établissement et le choix des directions à suivre pour l'exploration des voies métaboliques inconnues d'un xénobiotique *(Jurva et al., 2000 ; Jurva, 2004 ; Gamache et al., 2003a ; Gamache et al., 2003b ; Jurva et al., 2003)*.

III.2 Techniques analytiques pour l'identification des PsT

Les techniques analytiques sont indispensables pour l'identification des PsT. De nos jours, les techniques analytiques les plus couramment utilisées pour les études d'identification des PsT sont basées sur la séparation chromatographique, de préférence en phase gazeuse *(Hao et al., 2007 ; Chauhan et al., 2014 ; Portoles et al., 2014)* ou liquide avec des performances de séparation élevées *(Hao et al., 2007 ; Petrovic et Barceló, 2007 ; Pica et Barcelo., 2015)*. Les systèmes de chromatographie en phase liquide sont de puissants outils pour la détermination rapide, précise, sensible et sélective des traces d'échantillons étudiés. Le développement ultérieur de la chromatographie liquide à haute performance (*HPLC, High-Performance Liquid Chromatography*) à la chromatographie liquide à ultra haute performance (*UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography*) a conduit à un temps d'analyse plus court, une sensibilité plus élevée et une répétabilité améliorée. Ces avantages contribuent à une identification plus rapide et plus fiable des PsT *(Churchwell et al., 2005 ; Gumustas et al., 2013)*. La spectrométrie de masse a acquis une importance croissante pour la détection ces dernières années en raison de technologies fortement améliorées et d'une large applicabilité. Avant la détection par le biais de la SM, les composés séparés doivent être ionisés, ce qui est de préférence réalisé par ionisation par électronébulation (*ESI, ElectroSpray Ionisation*) ou ionisation chimique à pression atmosphérique (*APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) *(Awad et al., 2014 ; Gilbert-López et al., 2017)*. Alors que la technique *ESI* est principalement appliquée aux substances polaires (moyennes), l'*APCI* est plutôt utilisée pour les substances non polaires. En raison d'une augmentation de polarité habituelle lors de la transformation de la substance mère en PsT, l'*ESI* est couramment utilisée pour l'analyse des PsT *(Awad et al., 2014 ; Gilbert-López et al., 2017)*. Différentes techniques d'analyse de masse sont connues : simple et triple quadripôle (*QqQ, Triple Quadrupole*), temps de vol (*TOF, Time Of Flight*), piège à ions (*IT, Ion Trap*), résonance cyclotron ionique à transformée de Fourier (*FT-ICR, Fourrier Tranform-Ion Cyclotron Resonance*) et *Orbitrap (Bletsou et al., 2015 ; Gilbert-López et al., 2017)*. En plus de l'utilisation classique de la SM pour la détermination quantitative des analytes ciblés, des PsT suspects et inconnus peuvent également être identifiés. Le mode haute résolution des techniques de *FT-ICR, Orbitrap MS*

et *TOF-MS* (*TOF, Time Of Flight-Mass Spectrometer*) permet de mesurer la masse moléculaire précise des PsT, ce qui permet de déterminer une formule empirique *(Marshall et Hendrickson, 2008 ; Pico et Barcelo, 2015 ; Bletsou et al., 2015)*. Parmi les systèmes de haute résolution, celui de *FT-ICR* révèle les performances les plus élevées en ultra-haute résolution et précision de mesure de masse *(Nikolaev et al., 2016 ; Shaw et al., 2016)*. De plus, les configurations hybrides sont bien établies comme le quadrupôle à temps de vol (*Q-TOF*), le piège à ions quadripolaires (*Q-IT, Quadrupole-Ion Trap*), le piège linéaire quadripolaire *Orbitrap* (*LTQ-Orbitrap, Linear Trap Quadrupole-Orbitrap*) ou le piège linéaire quadripôle *FT-ICR* (*LTQ-FTICR*). Le couplage permet l'obtention des spectres de masse de plusieurs ions produits avec des mesures de masse précises *(Bletsou et al., 2015 ; Gilbert-López et al., 2017)*. Les approches basées sur la SM des dépistages suspects ou non ciblés sont également utiles pour l'identification des PsT inconnus *(Zedda et Zweiener, 2012 ; Bletsou et al., 2015 ; Schymanski et al., 2015 ; Wang, X. et al., 2016 ; Du et al., 2017)*. En dehors de la SM, d'autres techniques comme la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) *(Maggio et al., 2014 ; Bletsou et al., 2015)* ou l'analyse par cristallographie aux rayons X (*XRC, X-Ray Christallography*) sont également des outils puissants pour l'identification structurale des PsT. Ces techniques sont souvent utilisées en plus des méthodes chromatographiques et spectrométriques de masse.

III.3 Processus de transformation des pesticides

Pendant de nombreuses décennies, les pesticides ont été parmi des résidus largement réglementés dans le monde. Cependant, en raison de leurs contacts directs avec les animaux et les plantes terrestres, ils demeurent une préoccupation majeure pour la sécurité sanitaire des aliments. De plus, les composés parents se dégradent en de nombreux PsT par le métabolisme dans les organismes vivants (plantes, animaux et microbes) ou par d'autres processus de dégradation dans l'environnement (par exemple, dégradation thermique ou UV). Cependant, plusieurs réglementations n'exigent pas l'inclusion des limites maximales de résidus (LMR) de PsT dans les évaluations des risques alimentaires et environnementaux. Par conséquent, il n'existe presque pas d'informations sur les PsT et leurs mécanismes de formation, malgré leur présence fréquente dans les produits alimentaires *(Bauer et al., 2018 ; Mekonnen et al., 2018c)*, les nappes d'eau *(Rousis et al., 2017)* et les animaux *(Fine et al., 2017 ; Negreira et al., 2017)*. L'une des nombreuses raisons est le manque de standards authentiques des PsT. Par exemple, Bauer et collaborateurs ont détecté de nombreux PsT d'azoxystrobine, de difénoconazole et de thiaclopride dans les légumes *(Bauer et al., 2018)*. Cependant, ils n'ont

pu confirmer que trois PsT de la thiaclopride (thiaclopride-amide, thiaclopride-O-analogue et 4-hydroxythiaclopride) en raison du manque de standards disponibles dans le commerce. Zhang et collaborateurs ont également mené des études sur la N-désalkylation, la substitution nucléophile du chlore et de nombreux métabolites de glucuronidation du forchlorfenuron (avec un total de 17 PsT) dans les jus de fruits par une approche de SM non ciblée *(Zhang, Z. et al., 2017)*. Le plus souvent, des approches métabolomiques basées sur la SM des composés suspects et non ciblés, similaires aux études de Zhang et collaborateurs *(Zhang, Z. et al., 2017)*, Du et collaborateurs *(Du et al., 2017)*, Wang et collaborateurs *(Wang, X. et al., 2016)* ou Choudhury *(Choudhury, 2017)*, ont été utilisées pour contourner la rare disponibilité de standards authentiques. Cependant, une confirmation fiable par RMN ou standard authentique est encore envisageable. A côté de cela, la complexité des matrices, l'instabilité (dégradation immédiate ou conjugaison) et la variation de concentration dans une matrice spécifique sont toujours un défi analytique pour l'investigation des PsT dans des échantillons réels *(Du et al., 2017)*.

D'autre part, plusieurs méthodes de simulation visant à prédire ou à synthétiser les PsT des pesticides ont été développées avec succès. Comme pour les produits pharmaceutiques, la recherche sur le devenir des pesticides dans les organismes vivants en utilisant les méthodes conventionnelles *in vitro* et *in vivo* a été utilisée comme pratique courante. De toute évidence, la plupart des produits formés par ces méthodes sont des métabolites et utilisent des enzymes stéréosélectives. Cependant, les méthodes *in vitro* et *in vivo* sont entravées par le coût des matériaux biologiques, les considérations éthiques, la complexité des matrices et les temps d'analyse qui sont assez longs *(Jurva et Weidolf, 2015)*. Pour surmonter certains de ces défis, les méthodes dites « d'organe sur puce, *organ-on-a-chips* » sont de récents développements importants basés sur la microfluidique, qui permettent de prédire des produits de biotransformation sans matrices biologiques *(Kimura et al., 2018)*. D'un autre côté, la transformation des systèmes abiotiques est encore plus difficile à prévoir, car le pesticide parent pourrait s'exposer à des facteurs multi-stress. Toutefois, différents mécanismes de simulation à l'échelle du laboratoire sont couramment utilisés depuis des décennies *(Von Gunten, 2018)*. Par exemple la photolyse (UV et lumière visible), les systèmes photochimiques, de Fenton et d'oxydation avancés (par exemple O_3, O_3/H_2O_2, O_3/UV, sonolyse, permanganate et traitements électrochimiques) ont été largement utilisés pour étudier la cinétique, les mécanismes ou les types de PsT des pesticides *(Dong et Hu, 2016 ; Liao et al., 2016 ; Nicol et al., 2016 ; Berberidou et al., 2017 ; Negreira et al., 2017)*. Negreira et collaborateurs *(Negreira et al., 2017)* ont oxydé l'éthoxyquine en utilisant

H_2O_2/2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle. Ils ont prédit les réactions telles que la N-oxydation, l'hydroxylation, O-dealkylation, la dimérisation, l'époxydation avec formation de quinone. De plus, Berberidou et collaborateurs *(Berberidou et al., 2017)* ont prédit des PsT de dimérisation, de N-dealkylation et de cyclisation de l'herbicide bentazol en utilisant des méthodes de simulation photocatalytique TiO_2 et ZnO. Certains PsT pourraient être simulés par de telles méthodes à l'échelle du laboratoire. Cependant, l'un des grands défis de ces méthodes est de savoir dans quelle mesure les mécanismes de transformation et le type de PsT représentent les véritables processus de transformation abiotique.

De nombreuses méthodes d'oxydation avancées utilisent des agents oxydants puissants qui conduisent à de multiples hydroxylations et réactions radicalaires ou à une minéralisation complète du composé cible. A côté de cela, la photolyse et les méthodes photocatalytiques sont plus sujettes à une substitution nucléophile des halogènes et à la polymérisation *(Dong et Hu, 2016)*. En plus de l'efficacité des méthodes de simulation, les effets des PsT devraient également être examinés. Par exemple, des processus chimiques comme la chloration peuvent produire des sous-produits désinfectants cancérigènes *(Pico et Barcelo, 2015 ; Von Gunten, 2018)*. Les efforts récents visant à étudier les PsT des pesticides dans différentes matrices, les méthodes de prédiction et les principaux mécanismes de transformation sont résumés dans le tableau III.1.

Tableau III. 1: *Méthodes de prédiction des produits de transformation de quelques pesticides.*

Noms des composés	**Type de pesticides**	**Prédiction des PsT / Méthodes d'authentification**	**Mécanismes de transformation**	**Références**
Azoxystrobine	Fongicide	Criblage suspect, fragmentation *in silico* et standards authentiques	Hydrolyse, hydroxylation, déalkylation (O-, N-, et S-), déshydrogénation, glucuronidation, estérification	*Bauer et al., 2018*
Difénoconazole	Fongicide			
Thiaclopride	Insecticide			
Chlorpyrifos	Insecticide	Synthèse par UV et EC et utilisation criblage ciblé	P-oxydation, O-déalkylation, Hydrolyse, -Cl, +H	*Mekonnen et al., 2018c*
Éthoxyquine	Régulateur de croissance	Synthèse par les réactifs chimiques (H_2O_2 et DPPH) et utilisation pour authentification	N-oxydation, hydroxylation, O-déalkylation, dimérisation, époxydation, formation de quinone	*Nigreira et al., 2017*
Forchlorfénuron	Régulateur de croissance	Comparaison avec les standards authentiques	+OH, -Cl+H, N-déalkylation, -Cl+OH, glucuronidation	*Zhang, Z. et al., 2017*
Isoproturon	Herbicide	UV et lumière du soleil (composés non ciblés)	Hydroxylation, N-déalkylation	*Choudhury, 2017*
Bentazone	Herbicide	Photocatalyse (TiO_2, ZnO)	N-déalkylation, hydroxylation, dimérisation	*Berberidou et al., 2017*
Cyprodinil	Fongicide	UV-VIS	Isomérisation, cyclisation, hydroxylation	*Nicol et al., 2016*
Méthyl parathion	Insecticide	Chimique (MnO_2)	P-oxydation, hydrolyse, déalkylation,	*Liao et al., 2016*
Fluopyrame	Herbicide	UV et lumière du soleil (non ciblé)	-Cl+H, -Cl+OH, cyclisation via -HCl	*Dong et Hu, 2016*
Fluopyrame	Herbicide	Microsomes de foie et EC	Hydroxylation, N-déalkylation, époxydation, -Cl+H, -Cl+OH, déshydrogénation	*Mekonnen et al., 2018a*
Chlorpyrifos	Insecticide	Microsomes de foie et EC	P-oxydation, hydrolyse, O-déalkylation, -Cl+H	*Mekonnen et al., 2017*
Metribuzine	Herbicide	Comparaison avec les standards authentiques	Déamination, désulfuration oxydative	*Xie et al., 2017*
Flonicamide	Insecticide	Comparaison avec les standards authentiques	Hydrolyse des amides, déamination par hydrolyse	*Lopez-Ruiz et al., 2017*
Quinoxifène	Fongicide	UV et composés non ciblés	-Cl+OH, Hydroxylation, cyclisation (-H_2O, -HCl), hydrolyse	*Ferri et al., 2017*
DDT	Insecticide	Comparaison avec les standards authentiques	Oléfine via -HCl, -Cl+OH	*Mackintosh et al., 2016*

À côté de cela, l'EC couplée à la CL-SM a reçu une attention particulière dans le cadre des études des processus de biotransformation des pesticides. En 2009, Lohmann et collaborateurs *(Lohmann et al., 2009)* ont utilisé le couplage EC-CL-SM pour prédire l'hydroxylation, la substitution nucléophile du chlorure et l'amination du pesticide boscalide. Dans ce travail, ils ont également été capables de prédire les métabolites conjugués de phase II (avec le glutathion). Typiquement, un composé avec un modificateur organique approprié et une solution d'électrolyte a été introduite (à l'aide d'un pousse seringue) dans une cellule électrochimique constituée de l'électrode de travail couplée à la SM en ligne ou à la CL-SM.

Les travaux de Mekonnen et collaborateurs *(Mekonnen et al., 2017, 2018b)* ont porté sur l'étude des processus de biotransformation d'un fongicide (fluopyram) et d'un insecticide (chlorpyrifos) en utilisant les couplages EC-SM et EC-CL-SM en comparaison avec des microsomes hépatiques de rats et de humains disponibles dans le commerce. Plusieurs PsT du chlorpyrifos et du fluopyram via l'hydroxylation, la P-oxydation, la désalkylation (O- et N-) et la substitution nucléophile des halogènes ont été identifiés par HRMS et CL-SM/SM. De nombreux mécanismes de réaction de biotransformation (tableau III.1) pourraient être facilement simulés par des réactions redox basées sur l'EC. De plus, le temps de synthèse, l'élucidation des mécanismes et l'automatisation (synthèse en ligne, séparation et identification des PsT) pourraient être considérablement améliorés par EC couplé à la SM.

Récemment, une revue de Mohle et collaborateurs *(Mohle et al., 2018)* a discuté de l'extension possible de l'EC pour la synthèse des produits biologiques à valeur ajoutée. Par exemple, la synthèse du benzaldéhyde à partir de la diméthoxylation du 4-tert-butyltoluène et la réduction de l'acrylonitrile en adipontrile pour la production de polyamide sont des procédés à l'échelle industrielle utilisant l'électrochimie organocatalytique. Au lieu d'utiliser des réactifs, appliquer de l'électricité pour la production chimique est une approche verte (car aucun déchet généré) et économiquement viable.

En outre, l'EC utilise des réactifs respectueux de l'environnement à l'instar de l'eau comme source d'hydrogène ou d'hydroxyle, d'oxygène moléculaire pour l'oxydation ou du CO_2 pour les processus de carboxylation *(Mohle et al., 2018)*. À cet égard, Mekonnen et collaborateurs *(Mekonnen et al., 2018a)* ont synthétisé des étalons de référence des PsT (non fractionnés) en utilisant une électrode DDB (diamant dopé au bore) pour une authentification impartiale des métabolites du chlorpyrifos dans les denrées alimentaires. Cependant, l'approche EC-SM a des limites sur la stéréosélectivité et la représentation de tous les processus enzymatiques *(Jurva et Weidolf, 2015)*. Cette méthode pourrait tout de même être

un avantage à l'avenir pour synthétiser à la fois des métabolites et des étalons de référence des PsT abiotiques *(Mekonnen et al., 2018a)*.

Conclusion

En résumé, les études sur les PsT des pesticides dans les échantillons de denrées alimentaires et d'environnement sont très rares et limitées uniquement aux PsT dont les standards sont disponibles dans le commerce. D'un autre côté, il n'existe pas de méthodes de prédiction communes pour les processus de transformation biotiques ou abiotiques des pesticides. Malgré de nombreuses méthodes instrumentales et de simulation développées jusqu'à présent, la quantification et l'identification impartiale des PsT des pesticides dans les échantillons alimentaires et environnementaux sont encore des défis analytiques de base. Il convient de noter que les expériences de dégradation ont été le plus souvent réalisées par des expériences photochimiques et des études du métabolisme par des expériences *in vitro* ou *in vivo*. L'électrochimie est principalement utilisée pour des expériences de métabolisme, mais son utilisation pour la simulation des produits de dégradation est d'ores et déjà d'actualité. L'utilisation générale de toutes méthodes de simulation disponibles devrait être plus ciblée, dépendamment du domaine de recherche et de la classe de composés. Les méthodes de simulation peuvent ainsi aider non seulement à étudier les processus de transformation et à identifier de nouveaux PsT, mais aussi à produire des PsT en plus grande quantité pour des investigations ultérieures (par exemple, toxicité ou criblage réel). L'électrochimie (EC) est devenue de nos jours l'une des méthodes les plus importantes pour la simulation des produits de transformation (PsT), ceci au vu du nombre croissant de publications ces dernières années. Les processus d'oxydation et de réduction peuvent être étudiés très simplement, y compris la variation des paramètres expérimentaux, qui aident à ajuster les conditions réelles. L'EC peut être utilisée comme méthode de simulation pour les processus de biotransformation ainsi que pour les processus environnementaux, avec une sélectivité de génération de PsT spécifiques améliorée. En outre, le couplage en ligne de l'électrochimie à la spectrométrie de masse (haute résolution) facilite l'identification sans ambiguïté des PsT instables. La large applicabilité, y compris une unité de synthèse de PsT, augmentera à l'avenir l'importance des couplages EC-SM et EC-CL-SM comme méthode de simulation pour les composés toxicologiques pertinents. Le chapitre qui suit décrit les réactifs, le matériel et les détails méthodologiques des différentes techniques instrumentales utilisés dans le cadre de ce travail. Un accent sera mis sur la mise en œuvre des couplages EC-SM (Électrochimie - Spectrométrie de Masse) et EC-CL-SM (Électrochimie - Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse).

Chapitre IV. Mise en œuvre des méthodes analytiques et protocoles expérimentaux

Les réactifs, le matériel et les détails méthodologiques des différentes techniques/méthodes instrumentales utilisés durant ce travail sont présentés et spécifiés dans ce chapitre. Mais avant, un bref rappel est fait sur la mise en œuvre des couplages EC-SM (Électrochimie - Spectrométrie de Masse) et EC-CL-SM (Électrochimie - Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse) ainsi que les conditions expérimentales et paramètres expérimentaux adaptés tant au dispositif électrochimique qu'au spectromètre de masse.

IV.1 Mise en œuvre des couplages EC-SM et EC-CL-SM

IV.1.1 Types de cellules électrochimiques

Bons nombres de travaux qui font état d'une étude EC-CL-SM utilisent une cellule électrochimique indépendante de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Les études se basent principalement sur l'utilisation de deux configurations de cellules électrochimiques. La première configuration est basée sur la circulation de la solution électrolytique à travers une électrode de travail poreuse, tandis que la seconde configuration met en œuvre la circulation de la solution en couche mince à la surface des électrodes. Toutefois, il est important de noter que ces deux configurations reposent sur une circulation hydrodynamique de la solution électrolytique (le volume interne des cellules n'excède pas deux cent microlitres). Le volume interne ainsi que le débit d'injection de la solution électrolytique doivent être adaptés afin de permettre l'observation par spectrométrie de masse de la variation d'un paramètre électrochimique sur le signal étudié et des produits de réactions électrochimiques. De plus, des débits non adaptés peuvent engendrer une influence non négligeable sur la couche de diffusion et la conversion électrochimique.

Dans la cellule électrochimique à électrode poreuse, la solution traverse une électrode de travail (ET) en carbone poreux. Les électrodes de référence et contre électrode sont toutes deux constituées de Palladium et doublées (placées de part et d'autre de l'électrode de travail), ainsi le phénomène de chute ohmique est limité durant la réaction électrochimique. Cette cellule est maintenue fermée par une résine *PEEK* (*Poly-Ether-Ether-Ketone*) et ne peut pas être démontée pour la maintenance ou l'échange d'électrode. Ce type de cellule présente de nombreux avantages vis-à-vis des cellules à couche mince. En effet, l'ensemble de la cellule étant constitué par un polymère rigide, elle est rarement sujette aux fuites, ce qui permet de

travailler à des débits et pressions plus élevés. De plus, avec ce genre de dispositif le taux de conversion électrochimique est plus important, dû à une plus grande interaction entre la surface de l'électrode de travail et la solution électrolytique.

La cellule électrochimique à couche mince est vraisemblablement la configuration la plus simple pour la mise en œuvre d'un système électrochimique lors d'expériences hydrodynamiques. La solution est injectée dans la cellule par le biais d'un capillaire en *PEEK* afin d'arriver face à l'électrode de travail (ET). Par la suite la circulation de la solution au sein de la cellule s'effectue sous la forme d'une couche mince, guidée à la surface des électrodes. Le volume interne de la cellule est régi par l'utilisation d'espaceurs métalliques qui ne sont pas en contact avec la solution. La proximité spatiale de l'ensemble des électrodes limite le phénomène de chute ohmique. L'avantage principal de cette cellule est la possibilité d'accéder aux différentes électrodes, ce qui facilite son nettoyage après chaque expérience. De plus, elle offre la possibilité d'utiliser plusieurs types d'électrodes de travail avec différents matériaux tels que l'Or (Au), le Platine (Pt), le Carbone vitreux (CV) ou bien du carbone diamant dopé au bore (« *Boron-Doped Diamond* » BDD). Certains de ces matériaux permettent d'étendre la fenêtre d'électroactivité et ainsi de travailler à des potentiels plus élevés. Il existe différentes configurations de cellules électrochimiques et la figure IV.1 ci - dessous présente quelque unes.

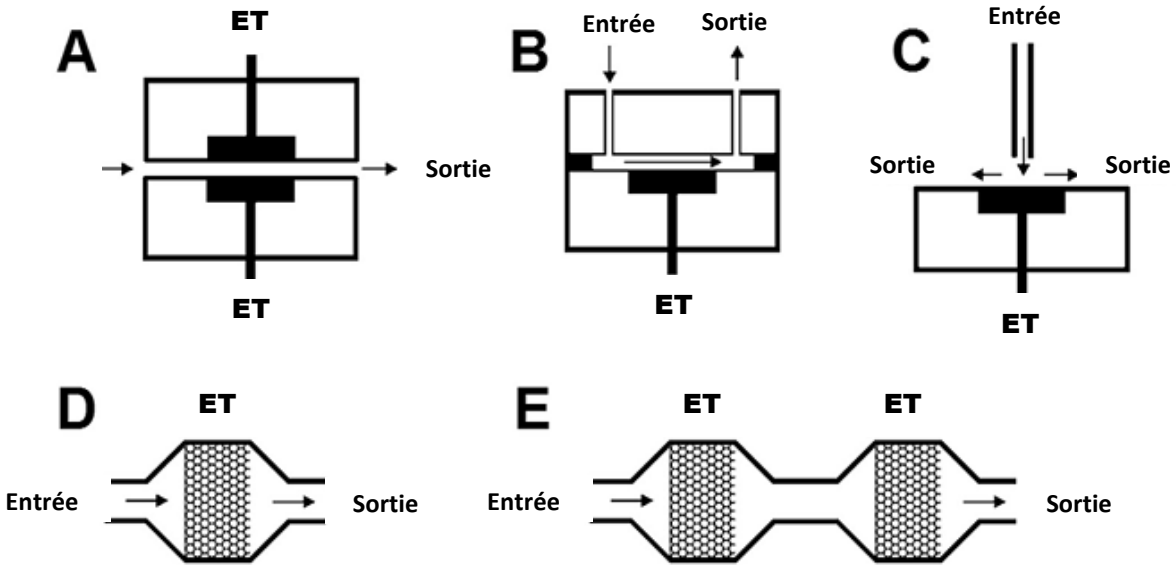


Figure IV. 1: *Configurations de cellules électrochimiques: (A) Tubulaire (tubular); (B) Couche mince (thin-layer); (C) Jet (wall-jet); (D) Flux (flow-through); and (E) Double flux (dual working flow-through) (Antec, 2016).*

IV.1.2 Types de couplages et paramètres expérimentaux

IV.1.2.1 Couplage EC-CL-SM

Ces cellules, qui peuvent être dites de synthèse, sont utilisées pour la production en grande quantité de produit(s) de réaction redox. Une fois les espèces générées et collectées, une séparation par chromatographie liquide suivie d'une détection par spectrométrie de masse assistée d'une ionisation par *electrospray* est réalisée (figure IV.2). Toutefois, deux approches expérimentales se distinguent, d'une part la production électrochimique d'échantillon suivie de son analyse par CL-SM, d'autre part l'association directe d'une cellule électrochimique avec le dispositif d'injection de la chromatographie liquide. Ce dernier protocole permet l'automatisation des analyses EC-CL-SM par la connexion du flux en aval de la cellule électrochimique à une boucle d'injection.

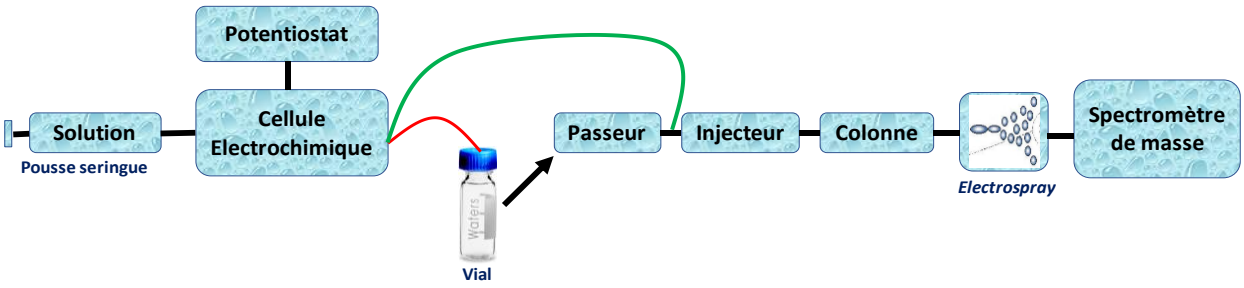


Figure IV. 2: *Schéma de principe du couplage EC-CL-SM. En rouge, l'association pour l'injection des espèces électro générées se fait par le passeur d'échantillon de la chromatographie liquide. En vert, la sortie de la cellule électrochimique est connectée à la boucle d'injection du chromatographe.*

La première approche (en rouge sur la figure IV.2) ne nécessite pas de modifications sur l'appareillage de chromatographie liquide. Néanmoins l'utilisation d'une cellule directement connectée en amont du circuit chromatographique peut permettre une automatisation des expériences.

IV.1.2.2 Couplage EC-SM

L'association EC-SM peut aussi se faire en marge d'une séparation chromatographique. En effet, l'approche dite EC-SM correspond comme son nom l'indique au couplage direct entre le flux sortant du dispositif électrochimique et la source d'ionisation en amont du spectromètre de masse (figure IV.3).

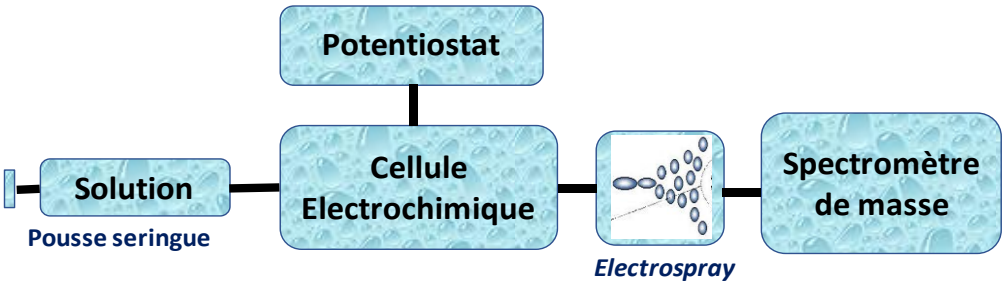


Figure IV. 3: *Représentation schématique du couplage EC-SM.*

Dans un premier temps, la solution électrolytique circule dans la cellule électrochimique constituée de trois électrodes. Ici, l'élimination de bulles d'air est primordiale afin de limiter les interférences à la surface de l'électrode de travail. Les espèces électrochimiquement générées sont véhiculées par le flux de solution directement vers l'entrée de la source d'ionisation du spectromètre de masse, comme l'indique la figure IV.3.

Lors d'une expérience de couplage EC-SM, l'électrode de travail, qui est placée au cœur même de la cellule, peut subir un balayage linéaire lent (typiquement 2-5 $mV.s^{-1}$) de potentiel croissant (oxydation), ou décroissant (réduction) induisant ainsi des réactions électrochimiques à l'interface électrode/solution de façon progressive. Les espèces ainsi générées sont ionisées avant que leurs rapports de masse *m/z* ne soient mesurés par l'analyseur. Le résultat est l'enregistrement d'un voltampérogramme massique. La voltampérométrie massique permet, comme la voltampérométrie cyclique, d'observer le comportement électrochimique d'une espèce électroactive en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. De plus, l'intérêt majeur de cette technique réside dans la possibilité d'observer de façon quasi-instantanée les espèces générées durant la réaction électrochimique (à condition que ces espèces générées soient sensibles vis-à-vis de la technique d'ionisation utilisée). Le délai entre la production électrochimique d'analytes et leur détection permet néanmoins la dégradation des espèces les plus réactives. Ce délai peut être minimisé par l'utilisation de systèmes électrochimiques miniaturisés. Le couplage direct EC-SM facilite l'interprétation du comportement électrochimique de l'espèce considérée lors d'une réaction électrochimique.

Le couplage EC-SM fait ainsi partie des outils de tout premier plan pour l'élucidation mécanistique des réactions induites par un transfert électrochimique. Toutefois, la mise en pratique de ce couplage nécessite des conditions expérimentales adaptées tant à l'électrochimie qu'a la spectrométrie de masse.

IV.1.3 Paramètres expérimentaux

Pour réaliser un couplage EC-SM il est primordial d'établir un compromis sur les conditions expérimentales pour favoriser la mise en œuvre de chacune des techniques. La principale contrainte présente dans cette méthodologie est la matrice dans laquelle l'échantillon est placé. La concentration en analyte doit être minimisée afin d'obtenir le meilleur rendement électrochimique tout en produisant une quantité de métabolites suffisantes pour être détectée par *ESI*-SM. De plus, une concentration excessive en analytes peut engendrer des phénomènes de polymérisation, d'absorption ou de passivation d'électrode ainsi qu'une pollution importante du spectromètre de masse. Il en est de même pour la concentration en électrolyte support nécessaire à tout processus d'électrochimie. En effet, pour réaliser une expérience d'électrochimie, la concentration en électrolyte support doit être suffisamment importante (de l'ordre de 100 mM) pour limiter le phénomène de chute ohmique et permettre une bonne conversion électrochimique. Cependant, la présence de cet électrolyte en grande quantité dans la solution induit des perturbations lors de l'acquisition des spectres de masse (augmentation du bruit de fond, phénomène de suppression ionique). Usuellement, afin de satisfaire aux exigences des deux techniques, la concentration de travail en électrolyte support varie entre 10 mM et 30 mM.

Si les premiers couplages EC-SM ont été rapportés avec l'utilisation d'ionisation *thermospray*, les études les plus récentes rapportent l'utilisation d'une ionisation *electrospray*. Les performances de cette technique d'ionisation sont améliorées lorsque le milieu est protique (formation d'ion $[M+H]^+$), mais également grâce à l'utilisation d'un solvant organique volatil afin de faciliter la désolvatation au sein de la source. L'utilisation d'un solvant organique a un autre avantage non négligeable qui est d'améliorer la solubilité des analytes et ainsi limiter le phénomène d'adsorption de molécules organiques à la surface de l'électrode de travail. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, on choisira un mélange de solvants (en proportions équivalentes la plupart du temps) eau/acétonitrile ou eau/méthanol, auquel on ajoute un électrolyte support volatil de type acétate d'ammonium (CH_3-COO^-; NH_4^+) ou formiate d'ammonium (H-COO^-; NH_4^+), facilement éliminé durant les étapes d'évaporation et d'ionisation de la solution.

Pour finir, la source d'ionisation par *electrospray* fait intervenir des tensions importantes afin de pouvoir effectuer une bonne ionisation des molécules. C'est pourquoi, lors du couplage direct EC-SM, il est nécessaire de connecter la sortie de la cellule

électrochimique à la prise de terre du spectromètre de masse, afin d'éviter toute réaction électrochimique non souhaitée par action des tensions présentes dans la source d'ionisation.

IV.1.4 Réactifs

Tous les produits chimiques et réactifs étaient de qualité analytique et utilisés sans aucune purification. La carbendazime (CBZ), le diuron (DIU), l'isoproturon (ISO), le fénuron (FENU), le monuron (MONU), le linuron (LINU), le monolinuron (MONO), le métoxuron (METOX), le chlortoluron (CHLORTO), l'acétate d'ammonium (≥ 98%), le glutathion, GSH (98-100%) et l'acétonitrile de qualité *HPLC* ont été achetés chez *Sigma-Aldrich* (France). Le principal métabolite de la CBZ, à savoir le 2 aminobenzimidazole, 2-AB (99%) a été acheté chez *Acros Organics*. Le pH des solutions a été ajusté par de l'ammoniaque (28% min., *Prolabo*) et de l'acide formique (pour CL-SM, *Fisher Chemical*). Toutes les solutions aqueuses ont été préparées en utilisant de l'eau ultra pure.

IV.1.5 Matériel et méthodes expérimentales

Trois techniques électrochimiques ont été utilisées au cours de ce travail pour l'étude des composés d'intérêts. Il s'agit de la voltampérométrie cyclique (VC), la voltampérométrie à balayage linéaire (VBL) et de l'électrolyse à potentiel contrôlé (EPC). Elles utilisent des outils d'analyses classiques, sont simples d'emploi et adaptées pour l'étude des propriétés redox des composés électroactifs. Cependant, les méthodes électrochimiques seules (VC, VBL et CPC), si elles renseignent sur les transferts électroniques, elles ne permettent pas d'obtenir des informations structurales sur les espèces stables et intermédiaires. Les techniques analytiques telles que la chromatographie liquide (CL) et la spectrométrie de masse (SM) ont été couplées aux techniques électrochimiques pour permettre de résoudre ce problème. Nous présentons dans cette partie le matériel et le déroulement des manipulations (électrochimiques, chromatographiques et par spectrométrie de masse).

IV.1.5.1 Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique précède l'électrolyse à potentiel contrôlée, en ce sens qu'elle permet de déterminer les potentiels d'oxydation des différents composés devant être fixé lors de ladite électrolyse. Les expériences/mesures de VC ont été réalisées dans un régime de diffusion pure, donc en solutions non agitées. Ces mesures ont été effectuées via un potentiostat VSP piloté par le logiciel *EC-lab* V10.40 de *Bio-Logic* (*Bio-Logic Science Instruments*, France). La cellule électrochimique utilisée au cours de la voltampérométrie cyclique est constituée d'un système à trois électrodes :

- Une électrode de travail en carbone vitreux (CV, diamètre du disque de 2,0 mm, surface géométrique de 0,031 cm^2) ;

- Une contre-électrode métallique : acier inoxydable ;

- Une électrode de référence au calomel saturé (ECS).

Ces électrodes plongent dans une cellule en verre, et l'ensemble est relié au potentiostat comme l'indique la figure IV.4. Toutes les expériences ont été effectuées dans de l'acétate d'ammonium 0,1 M (pH 3,5 ; 7,4 et 10) servant d'électrolyte support dans de l'eau/acétonitrile (1:1, v:v), et des voltampérogrammes cycliques (VC) ont été enregistrés à une vitesse de balayage de 50 $mV.s^{-1}$. Les analytes modèles (pesticides phénylurées et carbamates) ont été dissous pour atteindre des concentrations de 1 mM. Des expériences supplémentaires ont été effectuées en présence d'un excès (10 mM) de glutathion (GSH). Bien que n'étant pas présent dans l'environnement, la fonction thiol du glutathion peut être utilisée comme modèle pour l'addition/piégeage nucléophile d'entités électrophiles.

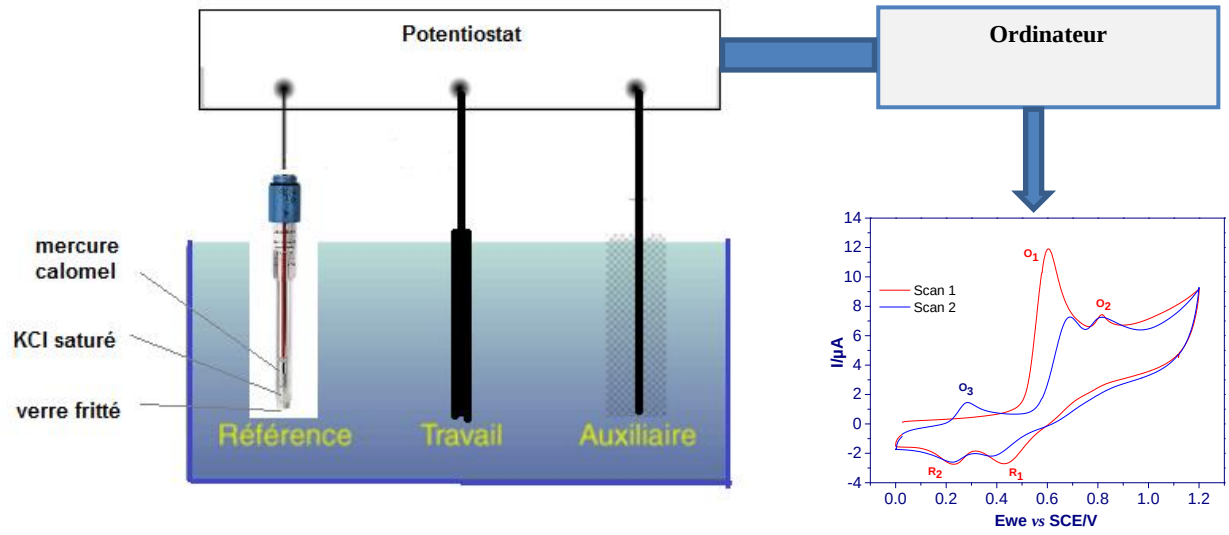


Figure IV. 4: *Montage réalisé pour les tracés voltampérométriques utilisant la voltampérométrie cyclique.*

IV.1.5.2 Electrolyse à potentiel contrôlé (en batch) : Couplage indirect EC-CL-SM

L'électrolyse à potentiel contrôlé a été réalisée sur un potentiostat VSP avec un système à trois électrodes et une cellule électrochimique à deux compartiments. Le système comprend :

- Un creuset cylindrique en carbone graphite servant d'électrode de travail (surface géométrique active 9,5 cm^2) ;

- Une électrode de référence au calomel saturé (ECS) ;

- Une électrode auxiliaire métallique (acier inoxydable) à large surface placée dans un compartiment cathodique séparé de la partie anodique par un fritté.

Les solutions d'électrosynthèse sont constituées de 1 mM de composés d'intérêts (pesticides) et 0,1 M d'acétate d'ammonium, dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). Une autre solution contenant en plus 10 mM de glutathion a été également électrolysée. L'électrolyse a été réalisée dans un premier temps à un potentiel fixe d'électrode de travail pour chaque composé pendant 6 h. Dans un second temps, des solutions contenants les analytes et le glutathion ont également été électrolysée dans les mêmes conditions. Les produits d'oxydation ont été collectés dans un vial de 2 mL et entreposés à -18 °C à l'abri de la lumière en vue d'analyses CL-SM et CL-SM^2.

Les solutions ont été agitées pendant les expériences d'électrolyse dans un volume total de 10 mL, cela s'est fait dans l'optique d'augmenter l'apport en composé électroactif à la surface de l'électrode de travail et favoriser un taux de conversion plus élevé. Pour ne pas risquer d'abîmer le capillaire de Luggin, l'utilisation d'un petit barreau magnétique de type « grain de riz » est privilégiée. Il est à noter que l'acétate d'ammonium (sel volatil) a été choisi comme électrolyte support pour satisfaire aux exigences expérimentales de l'électrochimie et de la spectrométrie de masse.

IV.1.5.3 Voltampérométrie à balayage linéaire - électrolyse en flux : Couplage direct EC-SM

La solution est injectée continuellement dans la cellule électrochimique *µPrepCell*^{TM} (*Antec, Zoeterwoude, The Netherlands*) à l'aide d'un pousse seringue (*gas tight syringe 549-0538, VWR Collection,* France) au débit de 25 µL.min^{-1}. Les manipulations électrochimiques ont été pilotées par un potentiostat portable de marque *EmStat* de chez *Palmsens*, contrôlé par le logiciel *PSTrace* V 5.3 (*PalmSens, Randhoeve, The Netherlands*). La cellule à couche mince *µPrepCell*^{TM} est une cellule de synthèse avec un volume interne de 33 µL (correspondant à un espaceur de 150 µm). L'électrode de travail est en Carbone Diamant dopé au Bore (*BDD*, surface géométrique active de 1,9 cm^2), un bloc de Titane fait office de contre électrode et la pseudo référence est en Palladium (*HyREF*^{TM}, Pd/H_2).

Lors de ces expériences de couplage en ligne EC-SM, on applique un balayage linéaire de potentiel allant de 0 à 2 V *vs* Pd/H_2 par pas de 2 $mV.s^{-1}$. Les produits d'oxydation sont directement injectés dans l'entrée de la source d'ionisation du spectromètre de masse. Les

résultats obtenus lors de ces analyses correspondent à des voltampérogrammes massiques (intensités des *m/z* en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail). La solution d'électrosynthèse est constituée de 0,1 mM de pesticide et 20 mM d'acétate d'ammonium, dans un mélange eau/acétonitrile (50/50). Une autre solution contenant en plus 1 mM de glutathion a été également électrolysée, l'objectif étant de piéger les espèces intermédiaires réactives telles que les quinones, les quinones imine, les époxydes, les ions nitrenium et les arènes oxydes, si présents.

Le Montage réalisé pour les expériences de couplages EC-SM et EC-CL-SM est présenté ci-dessous.

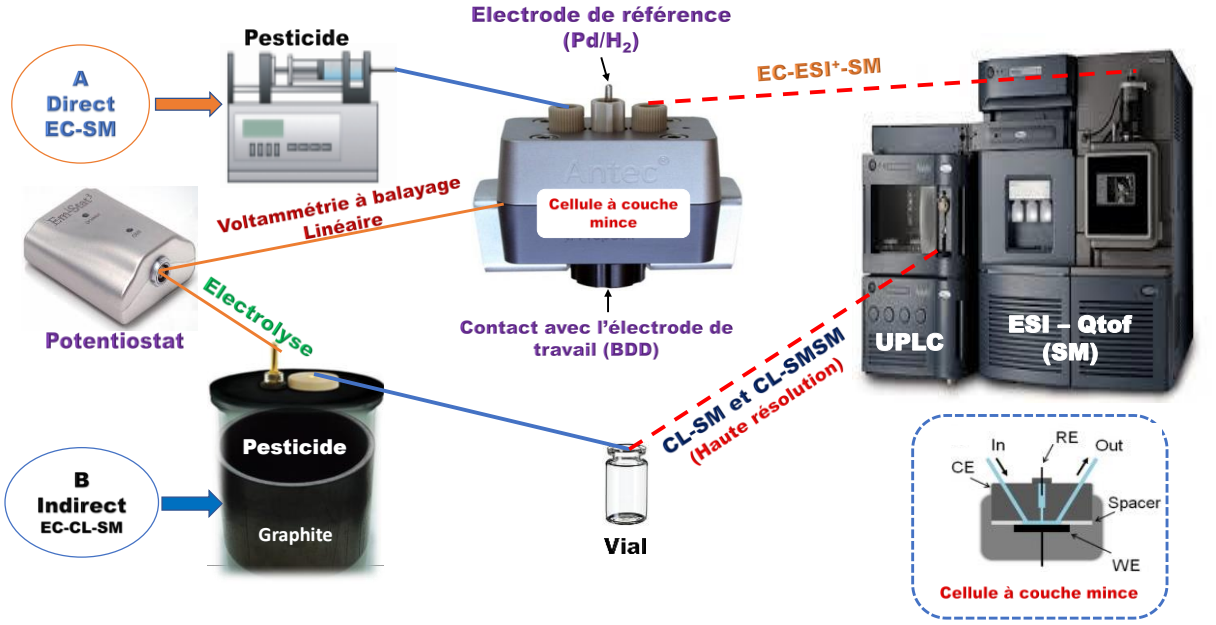


Figure IV. 5: *Montage réalisé pour les couplages direct et indirect : EC-SM et EC-CL-SM.*

IV.1.6 Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse à haute résolution (CL-SMHR et CL-SM^{2}HR)

Les analyses CL-SMHR et CL-SM^{2}HR ont été réalisées à l'aide d'un système couplant une Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance (CLUHP) de la société *Waters* (*Waters, Guyancourt,* France) et un spectromètre de masse *Xevo G2-XS QToF* (*Waters, Guyancourt,* France) équipé d'un quadripôle/analyseur à temps de vol. Le spectromètre de masse est équipé d'une source d'ionisation par *electrospray* (*Z-Spray*). Le système CL-SMHR utilisé est entièrement piloté par le logiciel *MassLynx* 4.1 (*Waters*).

Deux microlitres (2 µL) d'échantillons (pesticides) ont été séparés sur une colonne de chromatographie liquide de phase inverse greffée C_{18} (*Acquity® BEH*, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm) maintenue à une température constante de 25 °C. Un gradient binaire à 0,4 mL/min, entre les solvants A (eau + acide formique à 0,1%) et B (acétonitrile + acide formique à 0,1%) a été utilisé pour la séparation chromatographique. Les conditions initiales (95% de A) ont été maintenues pendant 2 min, puis le solvant A a baissé de 40% sur une période de 2 min et de 40 à 0% en 1 min. Un taux de 100% de solvant B a été maintenu pendant 1 min avant de revenir aux conditions initiales en 0,1 min. Les conditions initiales ont été maintenues pendant 2 minutes pour permettre l'équilibrage de la colonne. Le tableau IV.1 ci-dessous présente la composition du gradient en voies A et B utilisé. Il constitue la composition du gradient en voies A et B utilisé pour la séparation chromatographique de différents pesticides et leurs produits d'oxydations.

Tableau IV. 1: *Composition du gradient en voies A et B.*

Temps (minutes)	0	0,4	4	5	6	6,5	8
%A (H_2O + HCOOH 0,1%)	95	95	40	40	0,0	95	95
%B (CH_3CN + HCOOH 0,1%)	5	5	60	60	100	5	5

Concernant les paramètres de la source d'ionisation par *electrospray*, il a été choisi d'utiliser le mode d'acquisition positif donnant accès aux ions $[M+H]^+$, le mode d'acquisition négatif $[M-H]^-$ n'ayant pas donné des résultats probants. Il faut cependant noter que le mode d'analyse est tout aussi important. Son choix dépend des fonctions présentes sur la molécule. Les molécules avec les fonctions acides sont plus accessibles en mode d'ionisation négatif et celles faites de fonctions basiques le sont en mode d'ionisation positif. Bien évidemment les fragmentations ne sont pas les mêmes et on n'en tire pas forcément les mêmes informations.

Les paramètres de la source ont été réglés afin d'obtenir le meilleur rapport résolution/sensibilité pour les analyses. Les paramètres de l'*électrospray* en mode positif étaient donc les suivants : tension capillaire 0,5 kV, tension du cône 3 V, décalage de source 80 V, débit de gaz de désolvatation (N_2) 600 L/h, débit de gaz de cône (N_2) 80 L/h, température de désolvatation de 350 °C et température de source 150 °C. Les données ont été acquises pour des *m/z* compris entre 50 et 800 Da en mode centroïde. La leucine enképhaline (LeuEnk) à la concentration de 50 pg/µL (masse exacte de 556,2771 Da $[M+H]^+$) a été utilisée comme « *lock-mass* » à un débit de 10 µL/min et acquise pendant 0,5 s toutes les 10 s.

Un spectre de 0,3 s a été acquis toutes les 15 s et a permis une détermination exacte de la masse lors des expériences CL-SMHR et CL-SM^2HR.

Des expériences CL-SMSMHR ont été réalisées avec une énergie de collision allant de 10 à 40 V, et le gaz induisant la fragmentation de l'ion parent est de l'Argon. Les rapports de masse de masse ont été extraites pour chaque molécule ciblée avec une fenêtre absolue de 0,01 Da. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel *MassLynx* 4.1 (*Waters*).

IV.1.7 Calculs de mécanique quantique

De nos jours, les propriétés électroniques d'un système moléculaire sont calculables avec une très grande précision. L'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs, l'amélioration des algorithmes, la mise au point d'approches originales dans les méthodes de résolution numériques des équations de la mécanique quantique permettent d'obtenir des résultats très comparables à ceux mesurés lors des expériences. Il est possible d'avoir accès avec une très grande précision à l'ensemble des propriétés électroniques des systèmes chimiques et de calculer leurs variations le long des chemins de réaction. C'est ainsi qu'il est envisageable de réaliser des expériences dites "*in silico*" dans lesquelles les réactions chimiques sont simulées sur ordinateurs, et de pouvoir visualiser les réactifs, les produits, leur trajectoire d'approche, ou encore l'état de transition. Il est également possible de calculer les énergies de différentes formes moléculaires qui composent les chemins de réactions, et ceci même dans le cas des états électroniques excités. Par conséquent, les surfaces d'énergie potentielle sont visualisables, et les énergies des états de transitions sont comparables, ce qui permet de calculer différentes constantes de vitesse. Toutes les phases physico-chimiques sont accessibles aux études. À l'aide des méthodes dites de continuums polarisables, ou en incluant explicitement les molécules de solvant, les réactions chimiques des espèces dissoutes sont modélisables. Il existe plusieurs méthodes quantiques qui donnent accès à de tels résultats. Nous ne présenterons que très sommairement la méthode de la *DFT*, car étant utilisée dans le cadre de ce travail.

IV.1.7.1 DFT : Principes généraux

La théorie de la fonctionnelle de la densité (*DFT*, sigle pour *Density Functional Theory*) est une méthode de calcul quantique permettant l'étude de la structure électronique, en principe de manière exacte. Son concept fondamental repose sur le fait que l'énergie d'un système électronique peut être exprimée en fonction de sa densité. C'est en fait une idée ancienne datant principalement des travaux de Thomas *(Murakata et al., 1990)* et Fermi

(Galiano-Roth et al., 1991). L'utilisation de la densité électronique comme variable fondamentale pour décrire les propriétés du système a toujours existé en refrain depuis les premières approches de la structure électronique de la matière, mais n'a obtenu de preuve que par la démonstration des deux théorèmes de Kohn et Sham *(Sahni et Slamet, 1999)*. L'intérêt d'utiliser la densité électronique provient du fait qu'elle ne dépend que des 3 coordonnées spatiales, ou à la limite de 6 coordonnées si l'on considère deux populations de spin (↑ et ↓) pour décrire les systèmes magnétiques. En revanche, si l'on s'en tient à la description d'un système avec la fonction d'onde à plusieurs électrons, pour N électrons celle-ci dépendrait de 3N variables pour un système à spin dégénéré et de 6N variables pour un système magnétique, tâche impraticable. La théorie de Thomas et Fermi est une véritable théorie de la fonctionnelle de la densité dans la mesure où toutes les contributions à l'énergie électronique totale (cinétique aussi bien qu'électrostatique) sont exprimées en termes de la densité électronique. La *DFT* fournit une base théorique principale pour le calcul de structure de bandes d'énergie. Il a été démontré que la densité électronique d'un système permet d'aboutir à toutes ses propriétés dans un état fondamental. La densité est calculée à partir d'un déterminant de Slater, ce qui nécessite une base d'orbitales atomiques. Une variante de la *DFT* fondamentale est la *DFT* conceptuelle (méthode utilisée dans ce travail), dont le but est de donner un cadre théorique et des définitions précises à des concepts largement utilisés par les chimistes expérimentateurs (réactivité chimique). A travers les dérivées successives de l'énergie dans l'ensemble canonique $[N,v(r)]$, de nombreux descripteurs de réactivité ont pu être proposés et des significations physiques ont émergé.

Des approximations sont nécessaires pour le calcul de l'énergie. Dans une première approximation appelée *LDA* (*Local Density Approximation*), les électrons sont considérés localement comme un gaz homogène. Cette approximation ne peut pas s'appliquer à des systèmes fortement inhomogènes, tels que les atomes ou les petites molécules, ni à des systèmes dont les densités varient lentement. D'autres approximations plus récentes, telles que la *GEA* (*Gradient Expansion Approximation*) *(Slamet et Sahni, 1992)* ou la *GGA* (*Generalized Gradient Approximation*) *(Langreth et Perdew, 1982)*, ne se limitent pas à un calcul de la densité en un point mais font également intervenir un gradient de densité électronique autour du point considéré. Les fonctionnelles les plus couramment utilisées pour évaluer l'énergie d'échange et de corrélation sont *B3P86*, *B3LYP* et *BMK*. Dans ces groupes de lettres utilisés (souvent les initiales des auteurs), la première partie désigne la méthode de calcul et la deuxième celle de la corrélation. Ces méthodes *DFT* ont connu un succès

foudroyant. En particulier, la méthode *BMK* (méthode utilisée dans ce travail) s'est avérée très efficace pour un grand nombre de systèmes organiques. Elle est considérée comme étant la plus adaptée à l'étude de la réactivité chimique.

IV.1.7.2 Type de base et paramètres utilisés

L'ensemble des calculs théoriques a été effectué en collaboration avec l'équipe ModES (Modélisation et Spectroscopie) du laboratoire CEISAM à Nantes-France. Les résultats ont été obtenus par le programme *Gaussian16* utilisant les algorithmes, procédures et seuils de convergence par défaut *(Frisch et al., 2016)*. Dans un premier temps, la structure moléculaire a été optimisée à partir de la structure cristallographique de la molécule, en utilisant la fonctionnelle *BMK* (*Boese and Martin for Kinetic*) *(Boese et Martin, 2004)* et la base de fonctions atomiques 6-31G(d). Par la suite, les fréquences de vibration ont été calculées pour vérifier la nature des structures obtenues (minima *vs* états de transition), ainsi que pour le calcul des enthalpies libres. L'influence du solvant a été prise en compte à l'aide du modèle de continuum *SMD* (*Solvation Model Density*), qui fournit des estimations précises de l'impact des interactions entre le soluté et le solvant *(Marenich et al., 2009)*. Pour finir, le modèle *NPA* (*Natural Population Analysis*) *(Reed et al., 1988)* a été utilisé pour analyser les densités *SMD-BMK*/6-311++G(d,p) en termes de (i) densités de spin, et (ii) d'indices de nucléophilicité selon la théorie *CDFT* (*Conceptual Density Functional Theory*) *(Geerlings et al., 2003)*.

Dans la suite de ces travaux nous allons présenter les résultats obtenus lors de l'étude du diuron (DIU, herbicide phénylurées), de sept autres herbicides de la famille des phénylurées et de la carbendazime (CBZ, fongicide carbamates) et par couplages EC-MS et EC-CL-SM. L'objectif visé étant une meilleure compréhension de la dégradation environnementale/oxydative de ces pesticides par l'observation et la caractérisation de leurs produits d'oxydation, ainsi que l'élucidation mécanistique de l'oxydation de ces derniers. Il faut noter que les études entreprises sur la simulation de la dégradation environnementale de sept autres herbicides de la famille des phénylurées avaient pour objectif de décrire tout ou partie des mécanismes de dégradation oxydative pouvant avoir lieu dans cette famille de composés.

Chapitre V. Résultats et discussion : Applications des couplages EC-SM et EC-CL-SM à la simulation de la dégradation environnementale de quelques pesticides électroactifs

Introduction

L'étude du comportement électro-oxydatif des composés d'intérêt agrochimiques (pesticides) à l'aide de la voltampérométrie cyclique délivre des données de haute utilité d'un point de vue mécanistique. L'opportunité de combiner une cellule électrochimique (EC) à un spectromètre de masse (SM) et/ou à un chromatographe (CL) offre aujourd'hui la possibilité d'identifier les produits d'oxydation avec un maximum de certitude. Deux principales combinaisons sont possibles : EC-CL-SM (indirecte) et EC-SM (direct). Par un volume mort faible, un temps de résolution court et la compatibilité avec la spectrométrie de masse, les techniques hybrides EC-SM et EC-LC-MS autorisent l'identification des produits d'oxydation mais aussi des espèces instables. Les couplages EC-LC-MS et EC-SM sont mis en œuvre dans cette partie pour l'étude *in vitro* du comportement électro-oxydatif de quelques pesticides modèles électroactifs (carbendazime, diuron et autres herbicides de la famille des phénylurées). Une bonne connaissance des mécanismes oxydatifs peut en effet apporter des éclaircissements quant au devenir métabolique des molécules pesticides et permettre une recherche et une identification plus aisées des différents produits de dégradation ainsi que des espèces intermédiaires réactives.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode EC-CL-SM pour la simulation de la dégradation de ces pesticides, ainsi que l'identification des espèces (stables et intermédiaires) formés au cours de leurs dégradations oxydative. Cette étude a porté sur l'étude du comportement électrochimique, la localisation des sites électroactifs (étude théorique par la méthode *DFT*), et la prédiction de la formation d'adduits sur les espèces intermédiaires réactives en vue de la simulation de leurs dégradations dans des matrices environnementales.

Dans un deuxième temps, une fois les différents produits d'oxydation identifiés, nous avons utilisé le couplage direct EC-SM afin d'apporter une meilleure compréhension du mécanisme de dégradation oxydative de ces pesticides. Les résultats expérimentaux ont été confirmés par la mise en œuvre de calculs théoriques sur les molécules de pesticides oxydées ($-e^-,-H^+$; $-2e^-,-H^+$), conduisant ainsi à une détermination sans équivoque des sites radicalaires et électrophiles.

V.1 Comportement redox, dégradation oxydative et élucidation mécanistique de l'herbicide Diuron (DIU) par couplages EC-CL-SM et EC-SM

V.1.1 Comportement du diuron (DIU) en voltampérométrie et en spectrométrie de masse

V.1.1.1 Étude par voltampérométrie cyclique du comportement redox du DIU

Le comportement redox du DIU a été étudié à l'aide d'une cellule électrochimique classique à trois électrodes, avec du carbone vitreux (CV) comme électrode de travail. La figure V.1 ci-dessous présente les voltampérogrammes cycliques d'une solution de DIU 1 mM enregistrés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant 0,1 M d'acétate d'ammonium (pH 7,4) comme électrolyte support.

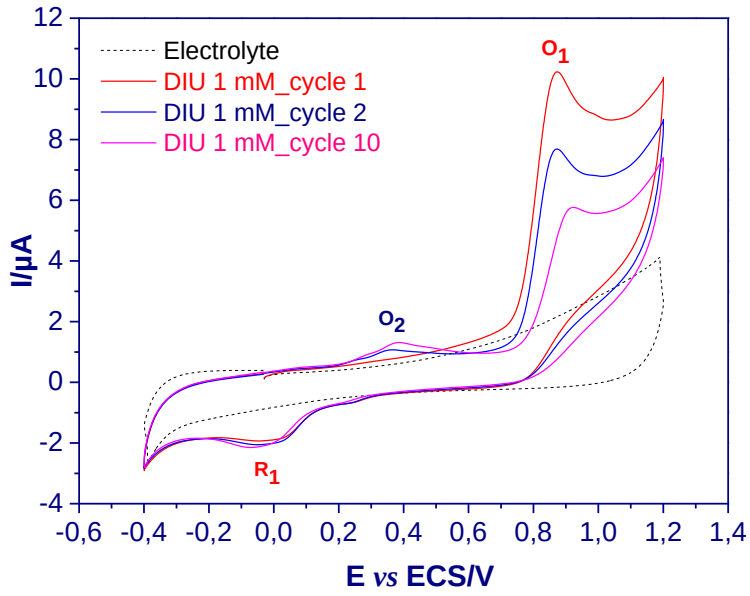


Figure V. 1: *Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Le balayage de potentiel se fait de - 0,4 V à 1,2 V vs ECS à la vitesse de 50 mV.s^{-1}.*

Les voltampérogrammes cycliques représentés à la figure V.1 mettent en évidence le caractère électroactif du DIU. En effet, au cours du premier cycle de balayage de potentiel, un pic d'oxydation O_1 est observé autour de 0,9 V *vs* ECS. Durant le balayage retour du premier cycle, un pic de réduction R_1 est observé au potentiel d'environ - 15 mV *vs* ECS. Toutefois, ce pic de réduction R_1 est associé au deuxième pic d'oxydation O_2 qui apparaît au cours du deuxième cycle de balayage à un potentiel proche de 0,4 V *vs* ECS. O_2/R_1 constituerait donc

un système redox quasi-réversible (écart de potentiel de 385 mV *vs* ECS) attribué à la formation d'une entité chimique après l'oxydation irréversible du DIU au potentiel de 0,9 V *vs* ECS. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Veerappan et collaborateurs *(Veerappan et al., 2015)*. Ils ont montré que la diffusion du diuron était réduite en une réaction d'oxydation irréversible en une étape à la surface de l'électrode de carbone vitreux, et que cette oxydation se fait par échange d'un électron - un proton pour produire un radical intermédiaire avec dimérisation. On peut donc à ce niveau d'étude envisager un mécanisme EC2 ou DIM (dimérisation), qui suggère que le transfert d'électrons est suivi d'une réaction chimique du deuxième ordre *(Miomandre et al., 2014c)*. Il faut également noter que la différence de courant de pic (relativement faible) entre le premier et le second cycle (2,534 µA ; soit 25% de courant perdu), et entre le premier et le dixième cycle (4,458 µA ; soit 44% de courant perdu) suggère une passivation quasi-lente de l'électrode de travail à cette concentration. La même tendance a été observée pour les concentrations de DIU à 5 mM et 0,1 mM. Dans l'état, le phénomène de passivation de l'électrode est un frein majeur pour la synthèse électrochimique (en mode stationnaire et en flux), car il empêche le déroulement de l'expérience sur plusieurs heures. Le choix a été porté sur 1 mM de DIU pour l'électrosynthèse en mode stationnaire, et 0,1 mM pour l'électrosynthèse en flux.

À noter qu'un comportement similaire a été observé lorsque les expériences ont été effectué en milieux acide (pH 3,5) et basique (pH 10) (figure V.2).

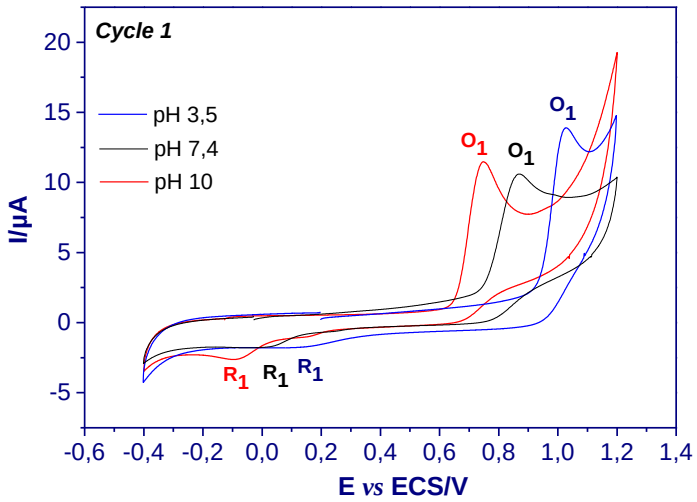


Figure V. 2: *Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM à différents pH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure V.1.*

L'on constate sur cette figure que l'augmentation du pH déplace le potentiel des pics d'oxydation et de réduction vers les valeurs plus basses, ce qui traduit l'implication des protons dans le mécanisme redox du DIU. Pour le prouver, Mugadza et Nyokong *(Mugadza et Nyokong, 2010)* ont effectué l'oxydation du DIU à différents pH compris entre 1 et 11. La pente du tracé du pH en fonction du courant de pic d'oxydation a été de 56,8 mV/pH, indiquant ainsi que l'oxydation du DIU s'effectue suivant un processus de transfert d'un électron - un proton, au mieux le nombre d'électron (s) échangé (s) au cours de la réaction est égal au nombre de proton (s).

V.1.1.2 Signaux en spectrométrie de masse du DIU

Une analyse préliminaire d'une solution de DIU non oxydée a été réalisée afin d'observer son comportement en spectrométrie de masse. En effet, la présence d'atomes de Chlore engendre l'apparition sur le spectre de masse d'un amas isotopique caractéristique. L'atome de Chlore possède 24 isotopes connus, de nombres de masse variant entre 28 à 51. Parmi eux, les deux principaux sont les isotopes stables ^{35}Cl (75,77%) et ^{37}Cl (24,23%), présents en proportion relative 37,885:12,115 respectivement, permettant d'attribuer au Chlore une masse atomique standard de 35,453 u. Le signal en spectrométrie de masse d'un composé à deux atomes de Chlore comme le DIU apparaît donc sous la forme d'un massif isotopique (figure V.3).

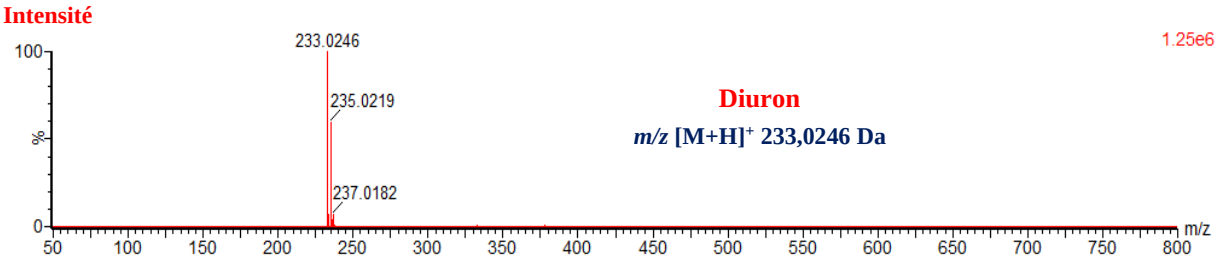


Figure V. 3: *Spectre de masse electrospray du DIU correspondant à l'ion $[M+H]^+$*

Dans le cas du DIU, la présence de deux atomes de Chlore engendre un amas isotopique composé de trois signaux d'intensités respectives 9/6/1. Les pics aux *m/z* 233,0246 Da, 235,0216 Da et 237,0182 Da correspondent ainsi aux pics mono-isotopiques du DIU non oxydé. Afin de faciliter l'analyse par les expériences EC-SM et EC-CL-SM, nous avons choisi de ne prendre en compte que le pic mono-isotopique (constitué uniquement de ^{35}Cl) de chaque molécule. Néanmoins, l'allure du massif isotopique de chaque produit d'oxydation étudié sera comparée au massif théorique attendu en fonction de sa formule brute (nombre d'atome de Chlore principalement).

V.1.2 Électrolyse à potentiel contrôlé du DIU

Dans un premier temps les conditions d'électrolyse ont été déterminées de telle sorte qu'une seule réaction électrochimique (oxydation dans notre cas) soit mise en jeu (rendement en courant de 100%). Connaissant les courbes i = f(E) à une électrode donnée relatives au comportement redox du DIU, ce potentiel a été judicieusement choisit. Afin que tout le courant soit utilisé pour effectuer cette réaction, il faut imposer et maintenir constant le potentiel de l'électrode, ce qui nécessite l'utilisation d'un potentiostat et d'un montage à trois électrodes *(Miomandre et al., 2014d)*.

Ainsi dans l'optique d'identifier les réactions associées aux pics O_1, R_1, et O_2, nous avons réalisés des expériences d'électrolyse à potentiel contrôlé (0,85 V ; 1 V et 1,15 V pour les pH 3,5 ; 7,4 et 10 respectivement) du DIU en milieu stationnaire dans une cellule électrochimique à compartiments séparés. Avant tout, nous avons réalisé des expériences de voltampérométrie cyclique en limitant la fenêtre de potentiel entre -0,4 V et 0,7 V, ceci dans le but de s'assurer que tous les produits formés proviennent de l'oxydation électrochimique du DIU au potentiel choisi. L'on a constaté effectivement qu'aucune réaction électrochimique ne se produit en deçà de 0,8 V. La figure V.4 ci-dessous donne la variation de la charge Q en fonction du temps, après 6 heures d'électrolyse en mode stationnaire en milieu neutre.

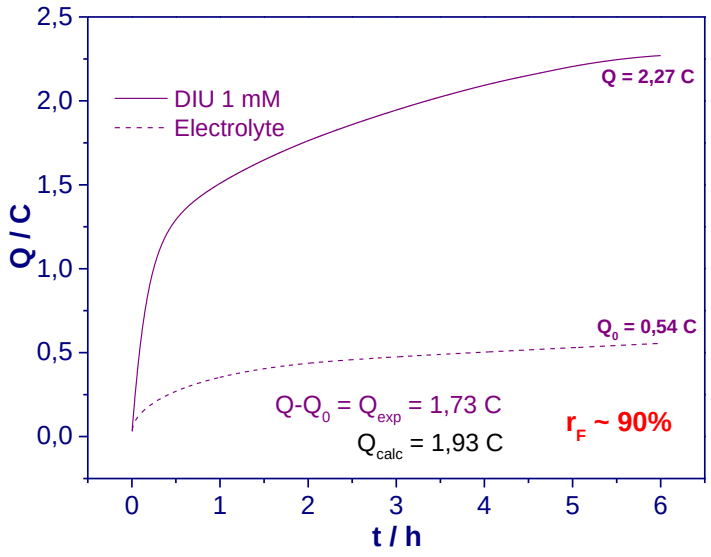


Figure V. 4: *Variation de la charge Q en fonction du temps t après 6 h d'électrolyse en milieu neutre, en mode stationnaire. Q_{calc}: Charge calculée; Q_{exp}: Charge expérimentale; r_F: Rendement de Faraday (Q_{exp}/Q_{calc}).*

De l'observation de la figure V.4, il apparaît de façon claire que la charge Q croit rapidement au début de l'expérience et tend à se stabiliser pour des temps élevés d'électrolyse, confirmant ainsi l'électrolyse préparative que nous avons entrepris. La charge théorique est donnée par $Q_{calc} = n_e.n.F$, où n_e est le nombre d'électrons (processus à 2 électrons), n le nombre de moles et *F* la constante de Faraday. Une valeur élevée (~90%) du rendement de Faraday (ou efficacité de Coulomb) a été observée à cette concentration, ce qui indique l'absence de passivation de surface pendant l'expérience.

L'électrolyse à potentiel contrôlé permet de synthétiser les produits de dégradation du DIU. La voltampérométrie cyclique quant à elle, si elle renseigne sur les transferts électroniques et sur la formation des possibles produits d'oxydation à travers l'apparition de nouveaux pics, elle ne permet pas d'obtenir des informations structurales sur les espèces formées (stables ou intermédiaires). Les techniques analytiques telles que la chromatographie liquide (CL) et la spectrométrie de masse (SM), via notamment le couplage CL-SM, permettent donc de s'affranchir de cette difficulté.

V.1.3 Analyses par CL-SMHR et CL-SMSMHR des solutions de DIU non oxydée et oxydées

L'identification d'un composé moléculaire à partir du chromatogramme est quelquefois aléatoire. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit par exemple, un chromatographe et un second appareil en ligne tel un spectromètre de masse. Ces méthodes couplées du second ordre (ou bidimensionnelles) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de rétention et spectre). On peut alors déterminer avec certitude la composition des mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir des quantités de l'ordre du nanogramme. Cette partie est dédiée à l'utilisation du couplage CL-SMHR et CL-SMSMHR pour l'identification et l'élucidation structurale des produits d'oxydation électrochimique du DIU.

V.1.3.1 Analyses préliminaires par CL-SMHR des solutions de DIU

Les expériences ont été menées en milieux neutre, acide et basique et les espèces générées au cours de l'oxydation électrochimique du DIU ont été identifiées par CL-SMHR. Un seul pic au *m/z* 233,0246 Da (t_R = 4,12 min), attribué au DIU $[M+H]^+$ a été observé en CL-SMHR lorsque le potentiel a été fixé à 0 V *vs* ECS (figure V.5a). Lorsque ce potentiel a été fixé à une valeur de 1 V *vs* ECS en milieu neutre (0,85 V *vs* ECS et 1,15 V *vs* ECS en milieux basique et acide respectivement), l'analyse par CL-SMHR indique l'apparition de

nouveaux pics chromatographiques à différents temps de rétention (figure V.5b). Ces pics indépendants représentent les entités chimiques formées après oxydation électrochimique ou hydrolyse chimique du DIU, l'apparition de ces entités étant corrélée avec la disparition progressive du pic du DIU. Étant donné que le pH n'influence que l'intensité des ions, et non sur la production/génération de nouvelles entités, tous les travaux d'élucidation structurelle ont été effectués après oxydation à pH neutre.

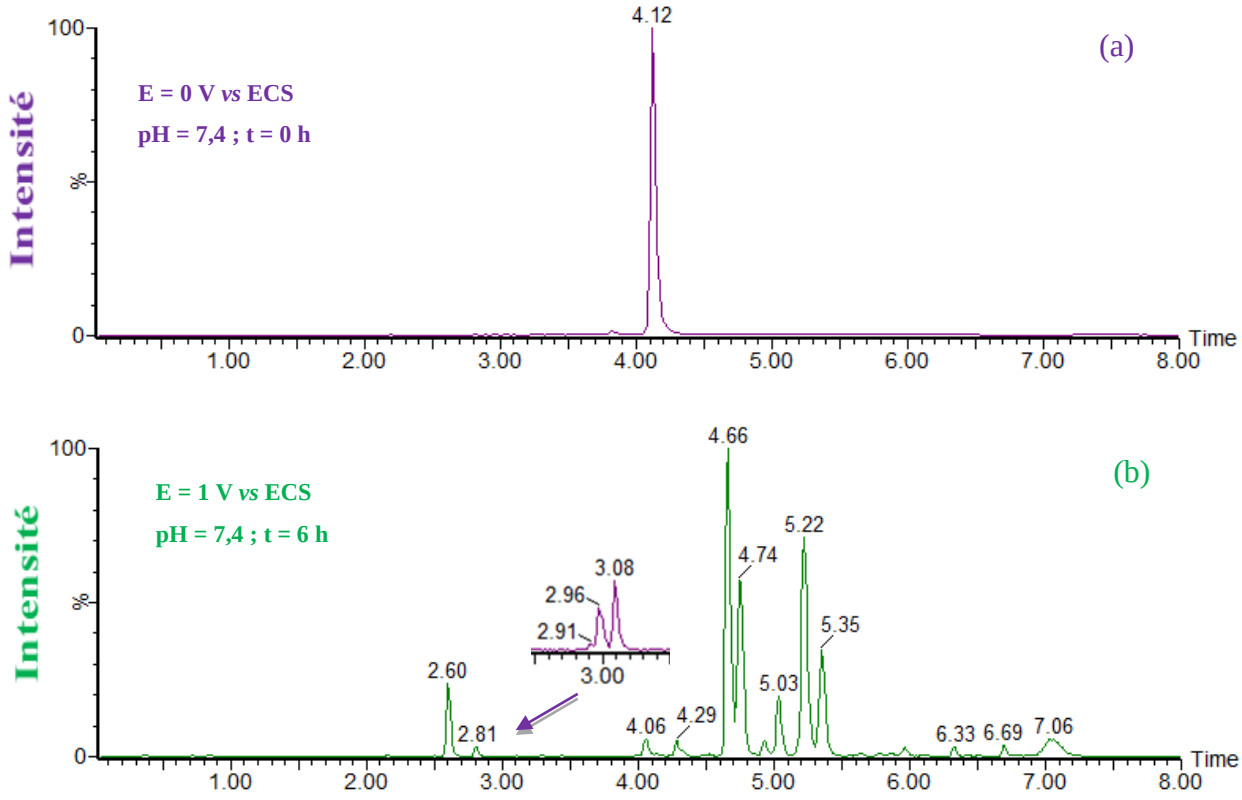


Figure V. 5: *Chromatogrammes UPLC des solutions de DIU : (a) non oxydé et (b) oxydé électrochimiquement en milieu neutre.*

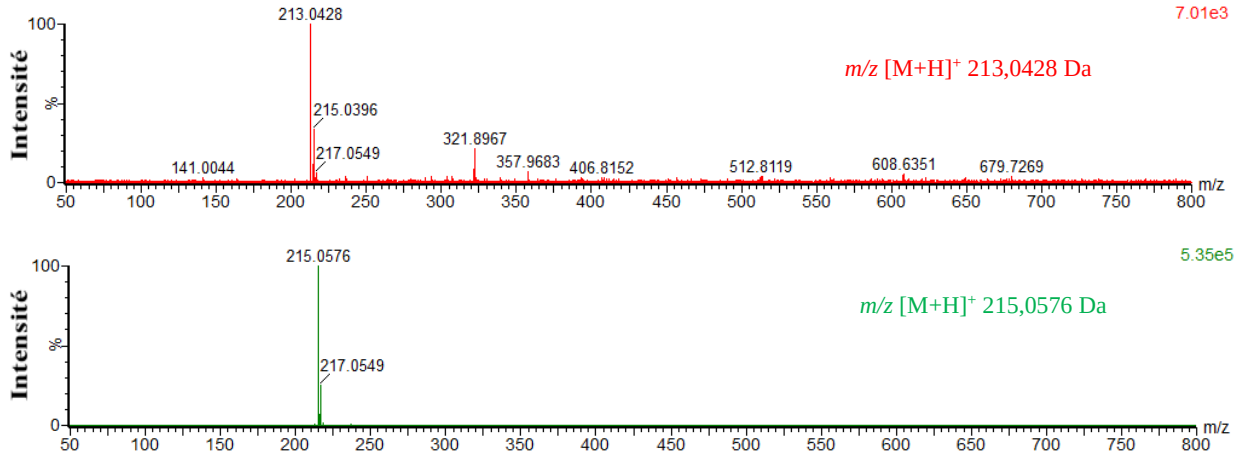
Une analyse minutieuse des chromatogrammes ci-dessus nous permet d'identifier les différents produits d'oxydation électrochimique du DIU, et si possible proposer/établir un mécanisme de dégradation oxydatif de ce dernier. Pour ce faire, l'obtention de la composition élémentaire ainsi que des analyses CL-SM^2HR sont nécessaires. Toutefois, de possibles espèces intermédiaires réactives peuvent être formées sans pour autant être détectées en SM. Ces espèces peuvent être stabilisées et observées grâce à des réactions de piégeage chimique.

V.1.3.2 Spectres de masse, composition élémentaire des produits d'oxydation électrochimique et voltampérométrie massique du DIU

Une entité chimique est caractérisée par son temps de rétention t_R, qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Le chromatogramme quant à lui est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. L'identification des produits d'oxydation a été réalisée dans un premier temps par l'extraction des chromatogrammes correspondant au pic mono-isotopique de chaque entité formée (figure V.6), puis dans un deuxième temps par l'obtention de leur composition élémentaire sur le pic mono-isotopique à travers leur spectre de masse (tableau V.1). Pour des raisons pratiques, nous appellerons par la suite POD_n (POD = Produit d'Oxydation du Diuron ; $n \in \mathbb{N}^*$) les produits d'oxydation du DIU formés. Les temps de rétention sont compris entre 0 et 8 minutes avec une séparation satisfaisante entre les pics, hormis un chevauchement de pics observé en milieu neutre entre 4,64 et 4,74 min.

V.1.3.2.1 Spectres de masse haute résolution des produits d'oxydation formés

Le résultat obtenu d'une analyse par spectrométrie de masse est un spectre de masse représentant les rapports *m/z*, où *m* représente la masse et *z* la valence (ou *m/q*, q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées. A cet effet, en intégrant chaque pic du chromatogramme obtenu par analyse CL-SMHR, on obtient un spectre de masse caractéristique du composé cherché. Ci-dessous sont donnés quelques spectres de masse *electrospray* (les plus illustratifs) des molécules oxydées, enregistré en mode d'ionisation positive (*ESI*$^+$).



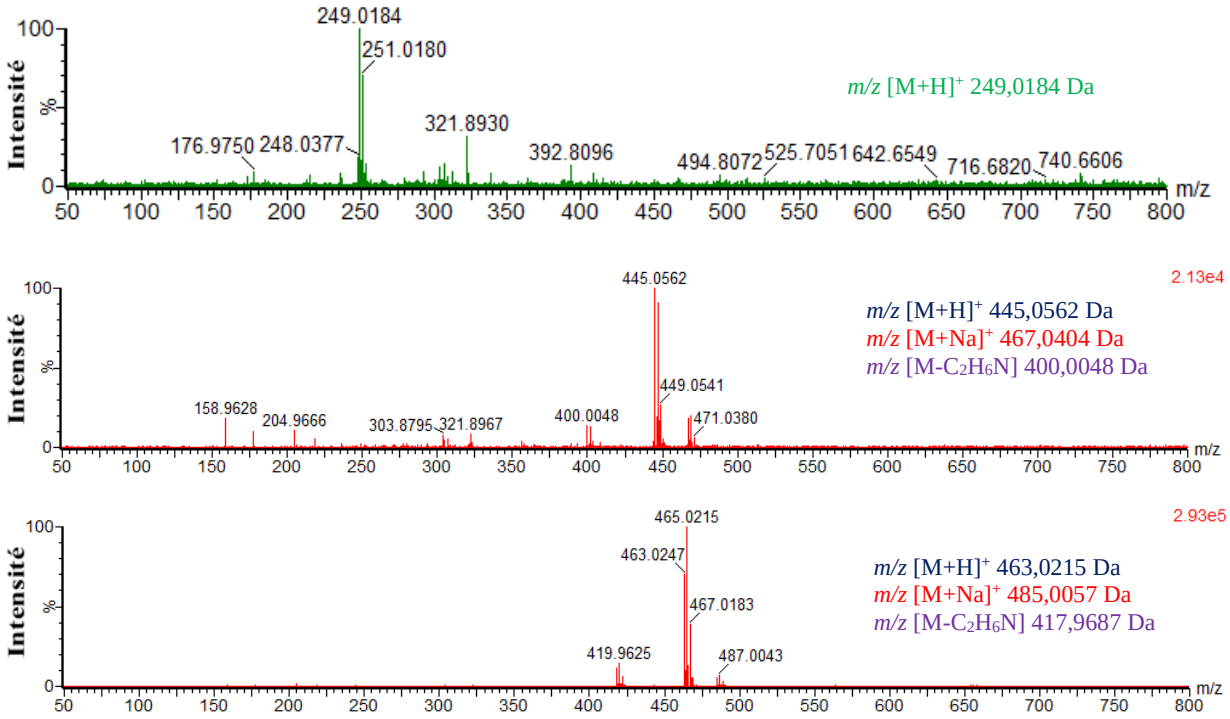


Figure V. 6: *Spectres de masse haute résolution de quelques produits d'oxydation, enregistrés en mode d'ionisation positive.*

V.1.3.2.2 Composition élémentaire du DIU et de ses produits d'oxydation

L'identification structurale a été réalisée dans un premier temps par l'obtention de leur composition élémentaire sur le pic mono-isotopique. Pour des raisons de comparaison, l'oxydation a été reprise en milieu neutre à bas potentiel (0,85 V *vs* ECS) et à potentiel élevé (1,4 V *vs* ECS) pendant 6 h, l'idée étant de voir si certaines réactions sont favorables à bas potentiels ou à potentiels élevés. Une analyse des chromatogrammes obtenus n'a mis en évidence la présence d'aucun produit d'oxydation additionnel. Le tableau V.1 ci-après résume les espèces identifiées après oxydation électrochimique du DIU. Les masses exactes, les temps de rétention, les erreurs et les formules brutes associées à chacun de ces métabolites y sont rapportés. Des produits d'oxydation nommés DCA (Dichloroaniline), POD_1, POD_2, POD_3, POD_4 et POD_5 ont été obtenus.

Tableau V. 1: *Composition élémentaire du DIU et de ses produits d'oxydation.*

Composés	m/z_{calc} (Da) $[M+H]^+$	m/z_{exp} (Da) $[M+H]^+$	t_R (min)	$\Delta_{m/z}$ (mDa)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Formule brute $[M+H]^+$	Transformations Chimiques
DIU	**233,0248**	**233,0252**	**4,12**	**0,4**	**1,7**	**$C_9H_{11}Cl_2N_2O$**	**Parent**
Monomères							
POD_1	215,0587	215,0590	2,60	0,3	1,4	$C_9H_{12}ClN_2O_2$	Déchlorination hydrolytique
POD_2 (QID_1)	213,0431	213,0432	2,81	0,1	0,5	$C_9H_{10}ClN_2O_2$	Déhydrochlorination
POD_{3a}	249,0198	249,0205	2,96	0,7	2,8	$C_9H_{11}Cl_2N_2O_2$	hydroxylation Aromatique
POD_{3b}		249,0196	3,08	- 0,2	- 0,8		
DCA	161,9877	161,9904	4,14	2,7	16,7	$C_6H_6Cl_2N$	Hydrolyse
Dimères (majoritaires)							
POD_{4a}	445,0594	445,0592	4,06	- 0,2	- 0,4	$C_{18}H_{20}Cl_3N_4O_3$	Dimérisation (hétéro)
POD_{4b}		445,0594	4,66	-0,0	0,0		
POD_{5a}	463,0256	463,0258	4,74	0,2	0,4	$C_{18}H_{19}Cl_4N_4O_2$	Dimérisation (homo)
POD_{5b}		463,0258	5,03	0,2	0,4		
POD_{5c}		463,0262	5,22	- 0,6	- 1,3		
POD_{5d}		463,0256	5,35	0,0	0,0		
POD_{5e}		463,0262	6,33	- 0,6	- 1,3		

POD = Produit d'Oxydation du Diuron ; QID = Quinone Imine issue du Diuron ; $m/z_{théo}$ *=* $m/z_{théorique}$ *;* m/z_{exp} *=* $m/z_{expérimentale}$ *;* t_R *= temps de rétention*

V.1.3.2.3 Voltampérométrie massique : Couplage direct EC-SM

Généralement pour élucider le mécanisme réactionnel lors d'une oxydation/réduction électrochimique, des expériences mettant en œuvre une cellule électrochimique en couplage direct avec un spectromètre de masse sont réalisées. De plus les calculs théoriques sont souvent effectués pour apporter les arguments complémentaires au mécanisme suggéré.

Les résultats de l'expérience EC-SM en ligne permettent de corréler l'intensité d'un ion *m/z* donné en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. L'évolution de cette intensité nous apporte des informations essentielles sur l'aspect mécanistique et cinétique de la réaction électrochimique. La figure V.7 ci-dessous montre les voltampérogrammes massiques du DIU et de ses produits d'oxydation (POD_n), ainsi que les spectres de masse haute résolution enregistrés à différents temps et potentiels (10 min pour 0,8 V et 12 min pour 1,0 V).

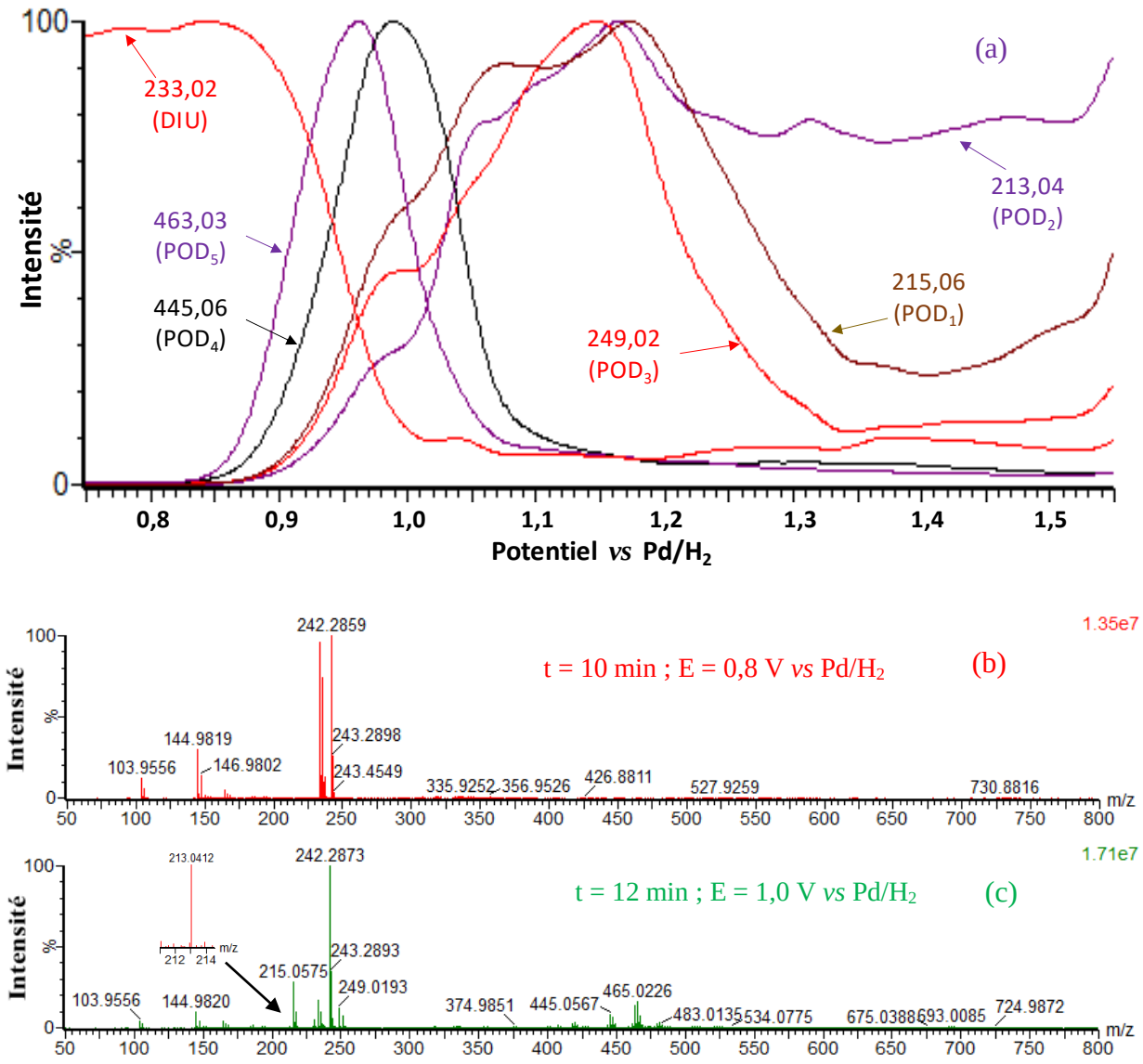


Figure V. 7: *En (a) voltampérogrammes massiques 2D du DIU 0,1 mM et de ses produits d'oxydation (POD_n) dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 20 mM (v = 2 $mV.s^{-1}$), sur électrode de carbone diamant dopé au bore (BDD). (b,c) : spectres de masse haute résolution enregistrés à différents temps (10 min et 12 min). Les pics aux m/z 213, 215, 249, 445 et 465 sont présents uniquement en (c).*

Comme le montre la figure V.7a, le voltampérogramme massique du *m/z* 233,0252 associé au pic mono-isotopique du DIU décroît significativement avec l'augmentation du potentiel à l'électrode de travail, confirmant ainsi son oxydation. Cette diminution débute autour de 0,9 V *vs* Pd/H_2 avant d'atteindre un plateau vers 1,1 V *vs* Pd/H_2. Sur cette même figure, on note l'apparition de différents produits d'oxydation POD_n (autour de 0,9 V *vs* Pd/H_2) en corrélation avec la diminution d'intensité du signal du DIU, ce qui suggère une corrélation entre leur formation et l'oxydation électrochimique du DIU. On peut également

remarquer sur la figure V.7c l'apparition des produits d'oxydation au fur et à mesure que le temps (potentiel) augmente, contrairement de la figure V.7b où sont présents uniquement les pics des solvants et de l'électrolyte support utilisé en électrochimie.

Dans l'état, l'analyse élémentaire seule ne permet pas de donner une structure moléculaire fiable pour les produits d'oxydation. Toutefois, la comparaison des compositions élémentaires entre les produits d'oxydation et la molécule mère permet d'orienter l'identification structurale. De plus, en s'appuyant à la fois sur les analyses CL-SM^2HR tandem avec l'interprétation des différentes fragmentations ainsi que la littérature nous avons pu élucider la structure chimique de chacun des produits d'oxydation.

V.1.4 Identification et élucidation structurale des produits d'oxydation du DIU

A ce niveau d'étude il est commode de faire appel à la spectrométrie de masse tandem (SMSM ou SM^2). Cette technique tient une place centrale en chimie analytique et structurale. A cet effet, l'ensemble des structures chimiques des produits d'oxydation du DIU ont été élucidées par l'interprétation des spectres de fragmentations SM^2HR en accord avec les compositions élémentaires. Tout en rappelant ici que les expériences CL-SM^2HR ont été réalisées avec une énergie de collision allant de 10 V à 40 V, et/ou à potentiel fixe de 30 V le cas échéant.

La détermination des structures ainsi que de leurs formations a été rendue possible grâce aux analyses de spectrométrie de masse tandem (SM^2HR), par voltampérométrie massique (EC-SM) et par calculs de mécanique quantique (méthode *DFT*).

V.1.4.1 Composés aux *m/z* 215 (POD_1) et 213 (POD_2) $[M+H]^+$

La différence de composition élémentaire (Δm = 17,9661) entre le DIU et le POD_1 correspond à la substitution d'un atome de chlore par un groupement hydroxyle (-OH). La formation de POD_1 a été confirmée par le profil isotopique (amas isotopique composé de deux signaux d'intensités respectives 3/1) correspondant à une molécule contenant un seul atome Chlore. Le spectre SM^2HR montre un pic au *m/z* 72,0453, ce qui correspond au fragment - C_3H_6NO provenant de la dissociation induite par collisions de la liaison N-CO de la fonction urée. Le spectre de masse tandem du composé au *m/z* 215 est donné à la figure V.8a. La réaction de déhydrochlorination donne le composé au *m/z* 213. Ceci conduit probablement à la formation d'un composé de type quinone-imine comme le montre le spectre SM^2HR de la figure V.8b. La voltampérométrie massique (figure V.7a) montre clairement la formation des composés POD_1 et POD_2, indiquant que ces deux composés sont formés par une réaction

électrochimique, et non une simple réaction chimique. Étant donné que les quinones imines sont des espèces intermédiaires hautement réactives qui se forment souvent lors de la dégradation des xénobiotiques *(Madsen et al., 2007 ; Bussy et al., 2013)*, l'oxydation du DIU a été réalisée en présence de glutathion pour confirmer l'hypothèse de leur formation. La figure V.8c montre le spectre obtenu après la dissociation induite par collisions de l'ion *m/z* 520,12 $[M+H]^+$, ainsi que l'attribution des différents fragments observés.

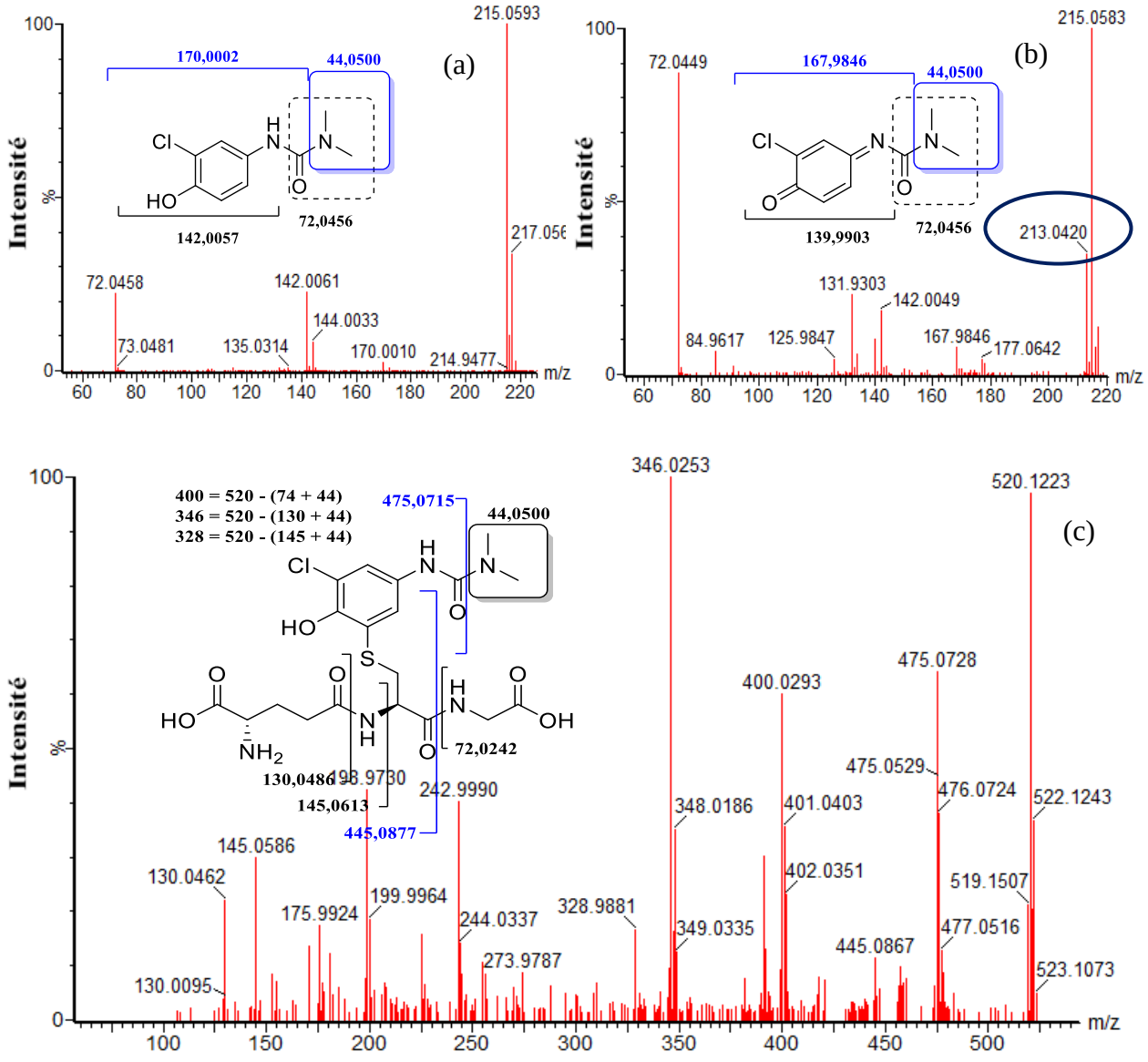


Figure V. 8: *Spectres SM²HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 215,06 correspondant au produit d'oxydation POD_1 (a) ; de l'ion observé au m/z 213,05 correspondant au produit d'oxydation POD_2 (b) et de l'ion observé au m/z 520,12 correspondant au produit d'oxydation QID_1 (c).*

Les expériences de SM^2HR effectuées sur cet adduit ont permis de valider la structure proposée pour l'espèce observée au *m/z* 520,12. En effet, la perte de molécules neutres telles que la γ-glu-ala-gly (-275), la glycine (-75), la glutamine (-146) ainsi que l'acide pyroglutamique (-129) sont des caractéristiques de la fragmentation SM^2 d'un adduit glutathion en ionisation positive *(Levsen et al., 2005; Ma et al., 2006)*. L'analyse élémentaire a montré une excellente concordance entre la masse expérimentale et celle théorique pour le composé conjugué (Δm = -1,2 ppm ; $C_{19}H_{27}ClN_5O_8S$). La formation de quinone imines lors de l'oxydation électrochimique du DIU met en évidence la réactivité de ses produits de dégradation et souligne une éventuelle toxicité *in vivo*. En effet, les quinones et les quinones imines sont connues pour leur forte interaction avec des biomolécules telles que l'ADN ou les protéines *(Bolton et al., 2000; Klopčič et Dolenc, 2019)*.

Afin d'obtenir des informations complémentaires sur le mécanisme d'oxydation électrochimique, la voltampérométrie cyclique du DIU a été réalisée en présence de glutathion à pH 7,4 (figure V.9).

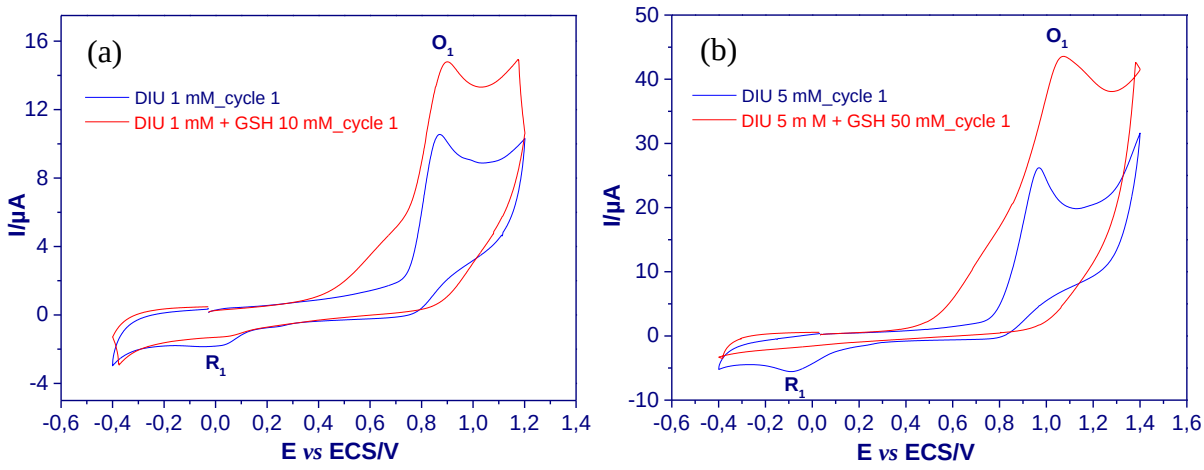


Figure V. 9: *Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM (a) et 5 mM (b), en absence et en présence d'un excès de GSH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure V.1.*

Au regard de la figure V.9, la première observation est la modification des courbes voltampérométriques après ajout du GSH (oxydation du GSH autour de 0,4 V *vs* ECS). En effet, il est connu que lorsqu'une espèce électroactive peut subir une ou plusieurs réactions chimiques précédant ou suivant le transfert électronique, cela modifie de manière appréciable les réponses courant/potentiel obtenues par les techniques voltampérométriques *(Miomandre et al., 2014c)*. De plus, comme on peut le constater à la figure V.9a, la présence du GSH conduit à la disparition du pic de réduction R_1 précédemment observé à la figure V.1. Pour ce profil de voltampérométrie cyclique, il apparaît qu'en présence d'un excès de GSH,

l'hydroxylation est très faiblement observée, ce qui est en accord avec les interprétations EC-CL-SM. Ce phénomène est très bien observé lorsqu'on augmente les concentrations en DIU et en GSH (figure V.9b). Sur la base de ces résultats, l'apparition du couple redox O_2/R_1 (figure V.1) peut être attribuée aux dérivés DIU hydroxylés oxydés en structure quinone imines, le groupe hydroxyle étant préférentiellement situé sur le cycle, ce qui facilite la formation de la structure quinone imine et une ré-aromatisation du cycle. Le mécanisme dans ce cas de figure peut être qualifié de mécanisme Électrochimie - Chimie (EC : La réaction chimique de premier ordre suit le transfert électronique). Ces informations confirment que le GSH piège rapidement les espèces de DIU oxydées en solution, donnant des formes conjuguées, qui sont potentiellement oxydables à des potentiels plus positifs que celui du DIU.

Des calculs théoriques *DFT* ont été effectués afin de localiser et de quantifier les principaux sites radicalaires et électrophiles, ce dans le but de proposer un mécanisme de dégradation plausible du DIU. A cet effet, les géométries des espèces étudiées ont été optimisées à partir de la structure du DIU cristallisé *(Pfefer et Boistelle, 1996)*. En utilisant les densités électroniques totales calculées sur le DIU oxydé ($-2e^-$, $-H^+$), nous avons obtenu la fonction f^+ de Fukui qui révèle deux sites électrophiles (sites d'attaques nucléophiles) principaux. Il faut rappeler que la fonction de Fukui renseigne sur l'indice d'électrophilicité locale au sein d'une molécule. La figure V.10a ci-dessous montre les sites d'attaque nucléophile possible sur la molécule de DIU oxydée, représentés par les indices de Fukui.

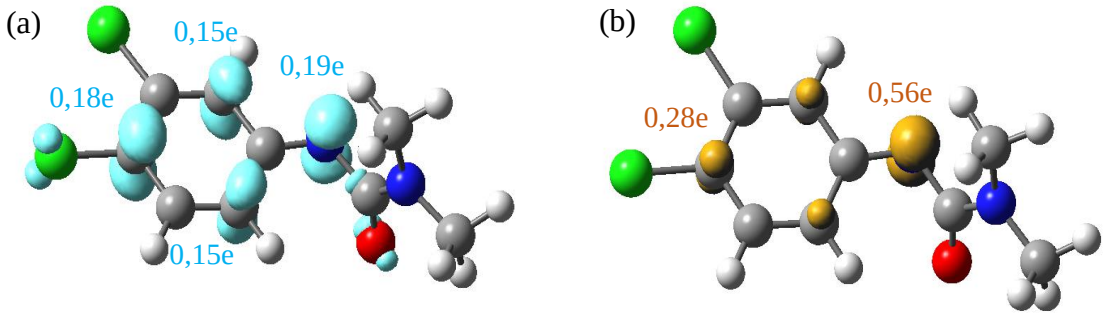


Figure V. 10: *(a) fonction f^+ de Fukui calculée pour le cation DIU oxydé ($-2e^-$, $-H^+$) et (b) Densité de spin calculée du radical DIU oxydé ($-e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes orange (bleu ciel) sont plus sujets aux attaques radicalaires (respectivement nucléophiles).*

Comme le montre la figure V.10a, l'atome d'azote lié au cycle phényle et l'un des carbones aromatiques liés au Chlore représentent les sites les plus puissants. Leurs indices d'électrophilicités condensés en atome sont entre 0,18e et 0,19e. Selon ces résultats, le

carbone aromatique susmentionné est particulièrement sujet à une attaque nucléophile d'une molécule de solvant telle que l'eau, conduisant ainsi à la substitution de l'atome de Chlore et à la formation de POD_1 (schéma V.1). Il faut rappeler que la valeur élevée de 0,19e au niveau de l'atome d'azote lié au cycle phényl n'est pas tout aussi significative. Ce site ayant perdu un proton, cette valeur peut être justifiée. Expérimentalement ce site n'est pas sujet à une attaque nucléophile à proprement parler.

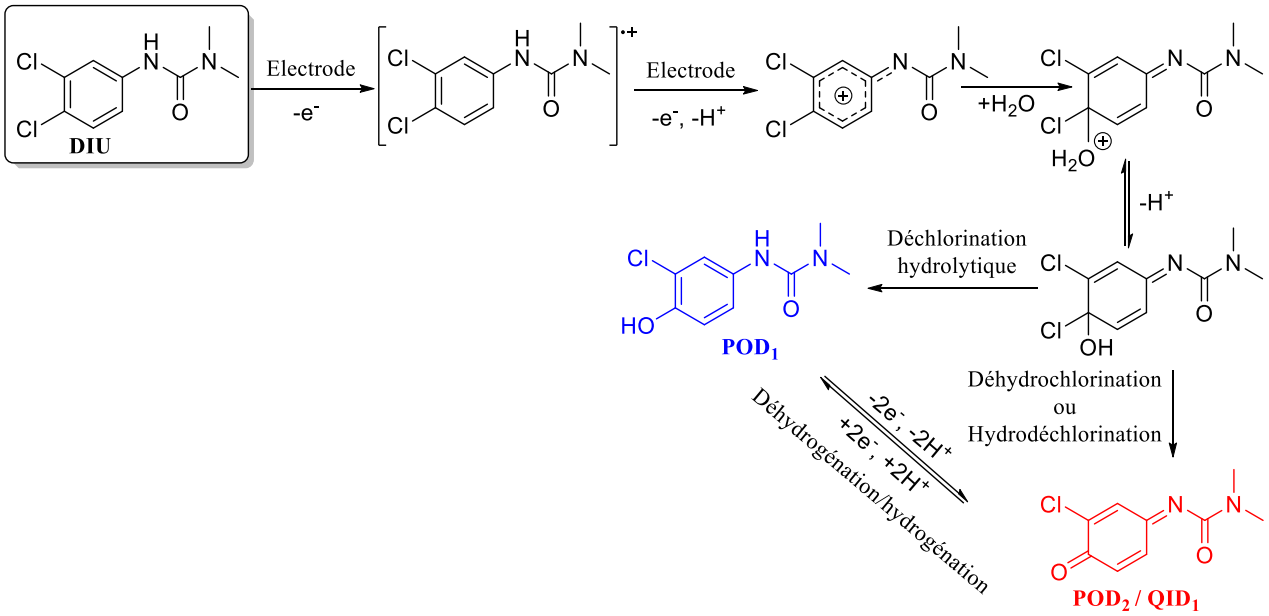


***Schéma V. 1**: Mécanisme électrochimique de formation de POD_1 et POD_2 (QID_1).*

V.1.4.2 Composé au *m/z* 249 (POD_3) $[M+H]^+$

Il existe une différence de composition élémentaire (Δm = 16 Da) entre la molécule de DIU et le composé POD_3, ce qui correspond à l'insertion d'un atome d'Oxygène. La présence de cet atome d'Oxygène est due à l'hydroxylation de l'une des positions aromatiques, avec deux isomères, comme le montre le profil chromatographique (figure V.5). Le spectre SM^2HR de POD_3 est donné sur la figure V.11.

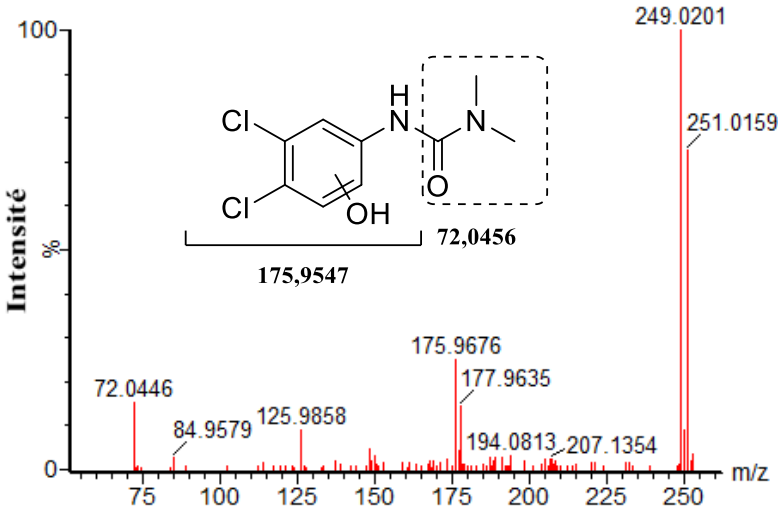


Figure V. 11: *Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 249,02 correspondant au produit d'oxydation POD_3.*

Le comportement en voltampérométrie massique (figure V.7a) du POD_3 fournit des informations utiles sur le mécanisme d'oxydation électrochimique du DIU. Le processus d'oxydation n'est pas aussi rapide comme dans le cas des dimères (*m/z* 445 et 463) (figure V.7a). Le temps mis à la surface de l'électrode peut engendrer des réactions chimiques et/ou électrochimiques ultérieures. En effet la présence de fonction phénol sur le squelette de ce composé rend possible un second processus d'oxydation. Théoriquement, la déshydrogénation anodique peut être envisagée, où le POD_3 perd deux atomes d'Hydrogène pour former des composés de type les quinones imines, comme dans le cas de certains principes actifs pharmaceutiques tels que le paracétamol *(Lohmann et Karst, 2006)*, l'amodiaquine *(Johansson et al., 2008)*, la phénacétine *(Nouri-Nigjeh et al., 2011)* et le diclofénac *(Faber et al., 2012)*. On s'attendrait pour POD_3 au composé avec un *m/z* 247,0036 $[M+H]^+$ (composé non observé directement). Pour mieux illustrer la formation de la quinone imine, une expérience supplémentaire a été réalisée en présence d'un excès de GSH. L'analyse élémentaire a ainsi montré une excellente concordance entre la masse expérimentale et la masse théorique du composé conjugué (Δm = 0,2 ppm ; $C_{19}H_{26}Cl_2N_5O_8S$). La figure V.12 ci-après montre le spectre obtenu après la dissociation de l'ion au *m/z* 554,09 $[M+H]^+$, induit par collisions au cours de l'expérience, ainsi que l'attribution des différents fragments observés qui confirment la structure *(Levsen et al., 2005)*.

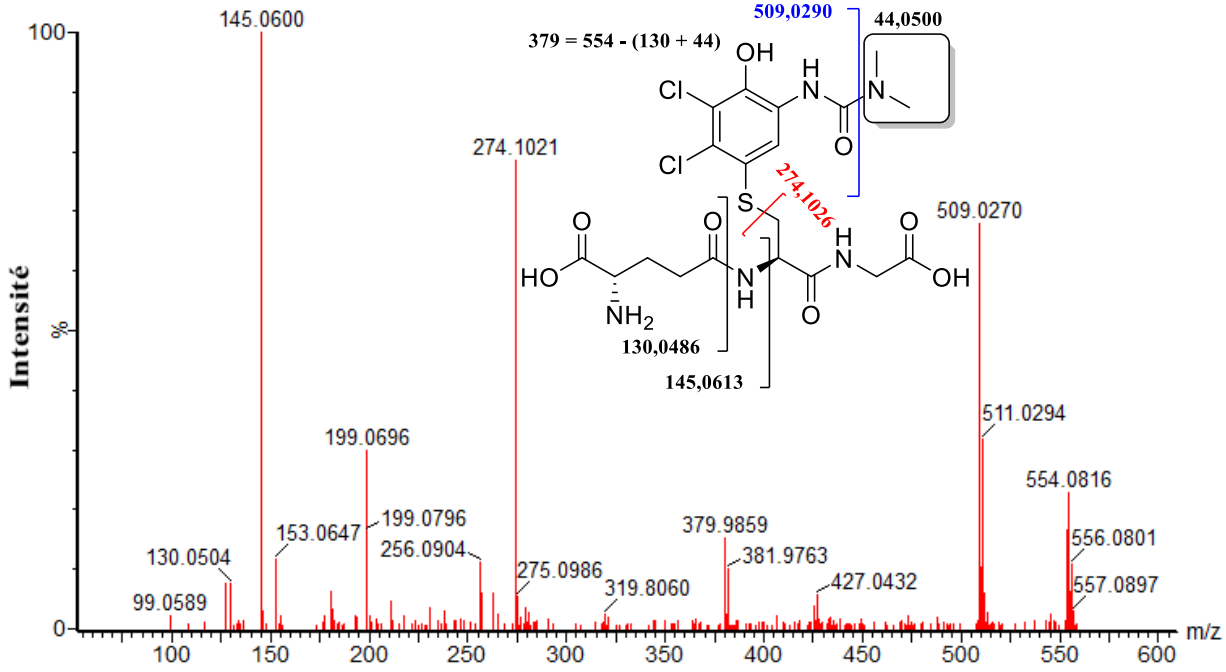


Figure V. 12: *Spectre SM²HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 554,09 $[M+H]^+$ correspondant au produit d'oxydation QID_2.*

Il est à noter que la fonction f^+ de Fukui précédemment calculée pour le cation DIU déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$), révèle également des électrophilicités notables pour deux Carbones aromatiques (figure V.10a), non liés aux atomes de Chlore (les indices d'électrophilicités condensés en atome sont d'environ 0,15e). Ainsi, les calculs *DFT* confirment les hydroxylations au niveau de ces deux atomes de Carbones aromatiques, selon le mécanisme de formation des composés hydroxylés illustré par le schéma V.2.

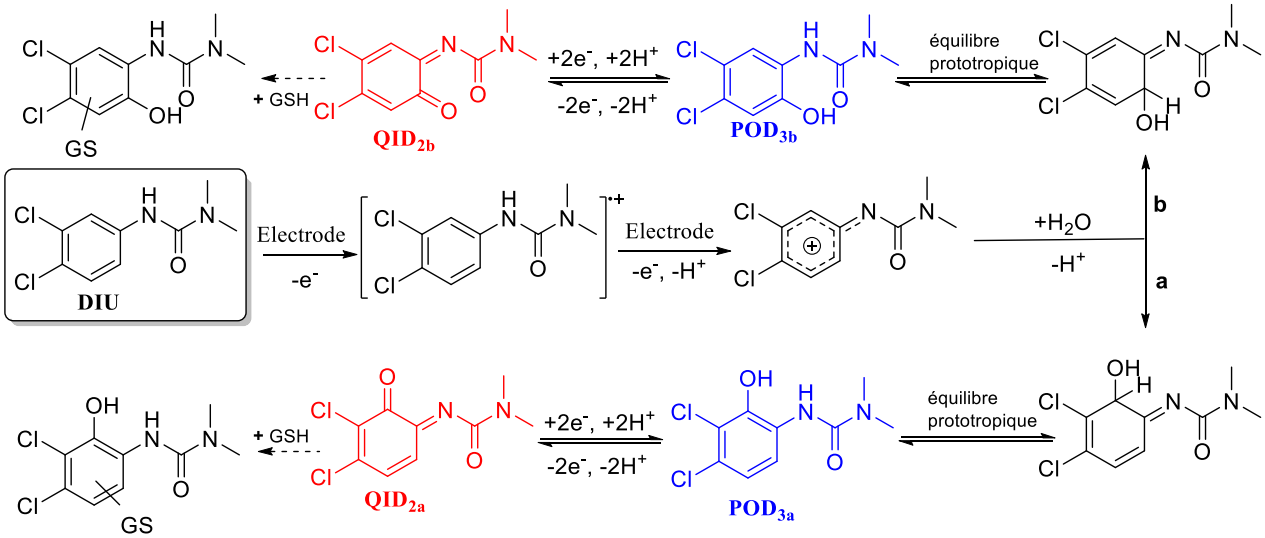


Schéma V. 2: *Mécanisme électrochimique de formation de $POD_{3a,b}$ et $QID_{2a,b}$.*

V.1.4.3 Composés aux *m/z* 445 (POD_4) et 463 (POD_5) $[M+H]^+$: dimères

L'analyse de la solution de DIU par CL-SMHR après électrolyse a permis d'identifier des dimères majoritaires, à savoir deux isomères correspondant au *m/z* 445, et cinq isomères correspondant à *m/z* 463. Ces dimères pourraient provenir du couplage d'intermédiaires réactifs formés par des réactions aux électrodes du DIU et/ou ses produits d'oxydation monomères. La détermination de la composition élémentaire et des données collectées à partir des spectres SM^2HR a permis d'identifier des dimères de type DIU-POD_1 pour le *m/z* 445 et DIU-DIU pour le *m/z* 463. Le nombre important d'isomères pour ces dimères suggère la délocalisation d'électrons célibataires sur les espèces intermédiaires formées par oxydation électrochimique du DIU. Cependant, sur la base des spectres SM^2HR de l'ion au *m/z* 455, la présence du fragment au *m/z* 400 (fragment résultant de la perte du groupement $-C_2H_6N$) suggère que la liaison n'est pas établie entre deux groupes méthyle de fonction urée lors de la formation des dimères POD_4. Quant à l'ion au *m/z* 463, les spectres SM^2HR des isomères montrent deux pics aux *m/z* 417 et 373 (juste pour certains isomères), qui correspondent aux fragments résultant de la perte d'un groupement $-C_2H_6N$, et de deux groupement $-C_2H_6N$ respectivement. On peut donc envisager que les dimères POD_5 se forment sans établir de liaisons avec les deux groupes méthyles des fonctions urée. Tous ces résultats ont été appuyés par les calculs *DFT* sur la molécule de DIU oxydé ($-e^-$, $-H^+$), qui ont permis la localisation de l'électron célibataire (figure V.10b). En effet, la probabilité de trouver l'électron célibataire est particulièrement élevée au niveau de l'atome d'azote lié au cycle phényle et de trois des Carbones aromatiques, dont un lié au Chlore. Par conséquent, l'atome d'azote lié au cycle phényle (densité de spin atomique de 0,56e) est particulièrement sujet aux attaques radicalaires impliquées dans la formation de dimères. Outre les dimères mentionnés ci-dessus, d'autres structures dimères et trimères ont été observées, principalement dans des solutions basique et neutre, à l'instar de ceux avec les *m/z* 487 et 693 $[M+H]^+$. Étant donné que la formation de structures dimères est largement accrue par une concentration élevée en analyte, il est peu probable d'observer la dimérisation du DIU lors de la dégradation dans l'environnement. Par conséquent, la présence de dimères a été constatée lors de l'oxydation électrochimique du DIU mais leur élucidation structurelle ne représente pas un intérêt significatif.

Bien que les radicaux soient connus pour leurs instabilités élevées et leurs attaques non sélectives, à partir des densités de spin précédemment calculées du DUI oxydé (figure V.10b), nous pouvons attribuer la formation de dimères principalement à l'atome d'azote lié

au cycle phényle et aux deux Carbones aromatiques. Toute attaque impliquant le Carbone aromatique portant un atome de Chlore étant peu probable en raison d'un transfert intramoléculaire défavorable des atomes de Chlore, par rapport à celui des hydrogènes libérés par la rupture de la liaison Carbone-Hydrogène. A ce jour, seul le dimère 463 (avec deux isomères obtenus par réarrangement de Fries) a été rapporté dans la littérature par Macounova et collaborateurs *(Macounova et al., 1998)* lors de l'oxydation anodique du diuron assistée par ultrasons.

La voltampérométrie massique (figure V.7a) montre clairement que ces deux composés ne se forment pas au même potentiel d'oxydation, ce qui justifie la formation légèrement plus rapide d'homodimères (DIU-DIU), puis celle d'hétérodimères (DIU-POD_1) par la suite. De plus, on peut observer sur les voltammogrammes massiques la formation de ces dimères à des potentiels plus faibles que d'autres POD. Les radicaux formés à la surface de l'électrode diffusent immédiatement vers la solution et se dimérisent, ceci avec l'augmentation du potentiel d'oxydation. A ce niveau, on peut conclure qu'après déprotonation de DIU, le mécanisme DIM (ou EC2) est celui qui prédomine (le transfert d'électrons est suivi d'une réaction de second ordre).

V.1.4.4 Composé au *m/z* 161,99 (DCA) $[M+H]^+$

Il est connu de la littérature que la N-déméthylation successive du DIU suivie d'une hydrolyse conduit à la formation du DCA, un composé très toxique *(Sørensen et al., 2003; Giacomazzi et Cochet, 2004)*. Nous avons effectué l'électrolyse de DIU à différents pH et nous avons recherché ce métabolite de chimio-dégradation. Au cours de ces travaux, la réaction d'hydrolyse conduisant au DCA a été mimée, bien qu'elle n'ait pas conduit à des proportions significatives de ce métabolite bien connu du DIU. La variation du pH a mis en évidence la formation de ce composé majoritairement en milieu acide, comme indiqué à la figure V.13. L'hydrolyse du DIU, qui est une réaction chimique, et non électrochimique, est donc plus favorable en milieu acide, la génération d'espèces réactives lors de l'électrolyse pouvant catalyser cette réaction. Laudien et collaborateurs ont déjà rapporté le mécanisme d'hydrolyse chimique des phénylurées en milieux basiques *(Laudien et al., 2001a)* et acides *(Laudien et al., 2001b)*.

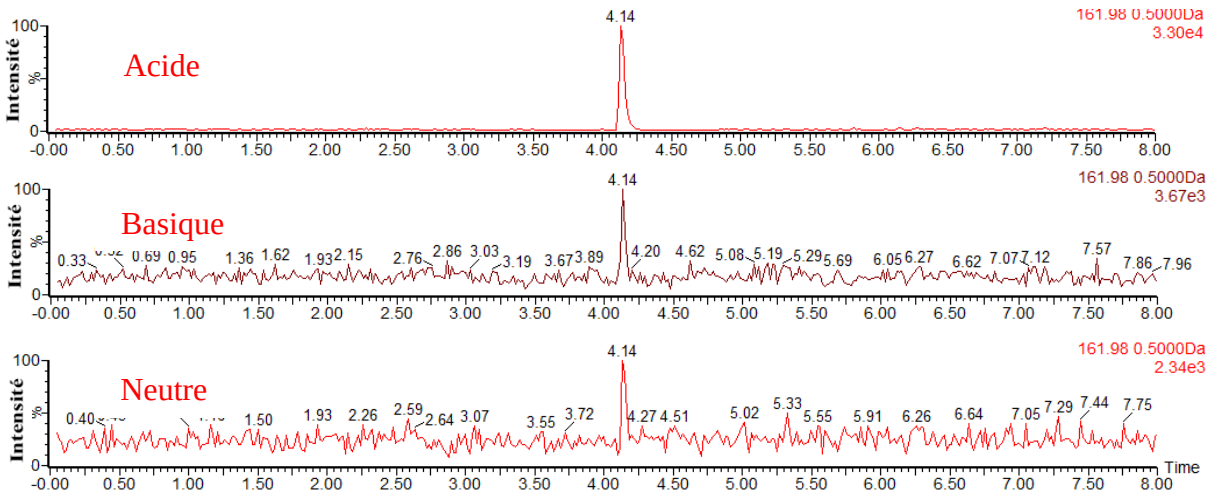


Figure V. 13: *Profils chromatographiques du composé au m/z 161,98 (DCA) à différents pH.*

V.1.4 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale (biotique et abiotique)

Dans les sols et les milieux aquatiques, l'herbicide DIU peut être transformé en produits de dégradation ou même être complètement minéralisé via des processus abiotiques (photo-décomposition) *(Tixier et al., 2001; Giacomazzi et Cochet, 2004; Hussain et al., 2015)* et biotiques (microbiens, bactériens, fongiques… etc.) *(Sørensen et al., 2003; Badawi et al., 2009; Ellegaard-Jensen et al., 2013; Sørensen et al., 2013; Ellegaard-Jensen et al., 2014; Hussain et al., 2015)*. Les analyses CL-SMHR d'un échantillon de DIU oxydé électrochimiquement ont permis de mettre en évidence la formation de différents produits de dégradation. Certains sont communs à ceux observés lors de la dégradation dans l'environnement, et d'autres sont nouvellement observés lors de ces travaux. La figure V.14 montre les principales espèces obtenues lors des dégradations du DIU. QID_1, $QID_{2a,b}$ et l'hétérodimère de *m/z* 444 ont été observés pour la première fois au cours de cette étude.

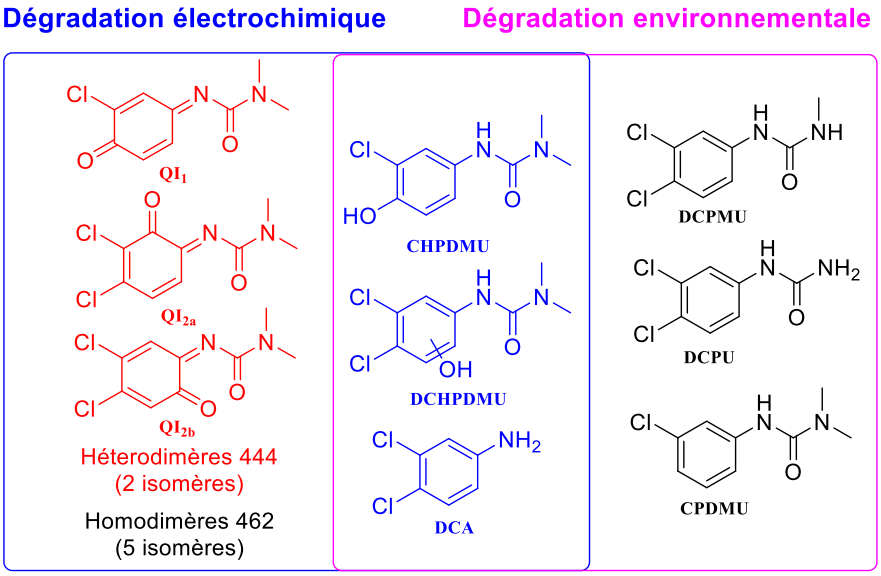


Figure V. 14: *Comparaison entre la dégradation électrochimique et environnementale du DIU.*

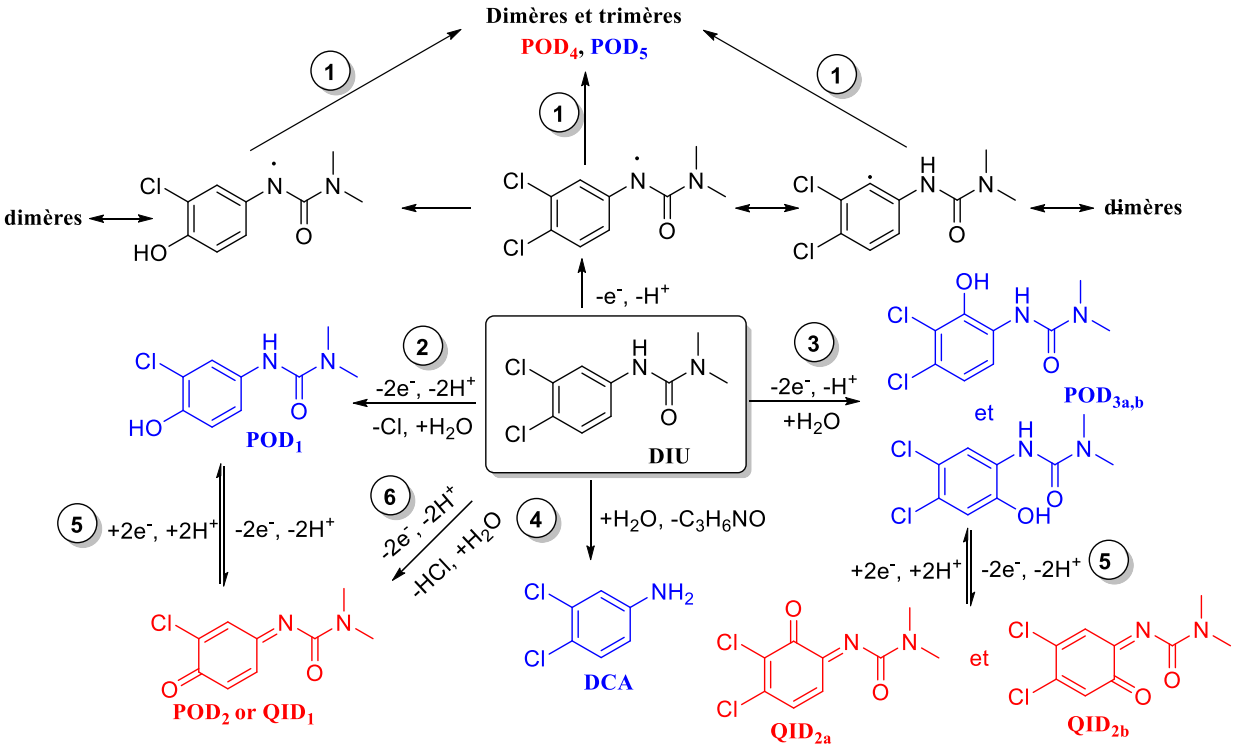
DCPMU : dichlorophénylméthylurée ; DCPU : dichlorophénylurée ;

CPDMU : chlorophényldiméthylurée ; CHPDMU : chlorohydroxyphényldiméthylurée ;

DCHPDMU : dichlorohydroxyphényldiméthylurée ; DCA : Dichloroaniline.

V.1.5 Voies de dégradation du DIU après oxydation électrochimique

Les techniques EC-SM et EC-CL-SM ont permis au cours de cette étude de proposer un mécanisme de dégradation électrochimique de l'herbicide DIU. Le schéma V.3 illustre ce mécanisme. Deux autres produits de dégradation bien connus, à savoir le DCPMU et le DCPU n'ont pas été observés lors de cette étude. Bussy et collaborateurs *(Bussy et al, 2013)* ont rapportés lors de leurs études sur deux β-bloquants (acébutolol et alprénolol) que l'électrochimie pouvait mimer les réactions de N-désalkylation à condition qu'elles ont lieux à un potentiel d'oxydation inférieur aux autres réactions pouvant se produire sur la molécule. Dans notre cas, la déhydrochlorination (ou hydrodéchlorination) et la déchlorination hydrolytique sont les réactions prédominantes, ce qui pourrai ainsi expliquer l'absence de la réaction de N-désalkylation. À notre connaissance, aucune étude sur le comportement électrochimique des phénylurées ne fait état de la N-déméthylation de la fonction urée, en dehors des méthodes de POA (Procédés d'Oxydation Avancées) telles que l'électro-Fenton *(Oturan et al., 2008 ; Oturan et al., 2011 ; Khongthon et al., 2016)*, qui produisent des radicaux hydroxyles hautement réactifs, favorisant ainsi des attaques non ciblées.



1 *= dimérisation ;* ***2*** *= déchlorination hydrolytique (substitution -Cl/-OH) ;* ***3*** *= hydroxylation aromatique ;* ***4*** *= hydrolyse ;* ***5*** *= déshydrogénation anodique / hydrogénation cathodique ;* ***6****= déhydrochlorination ou hydrodéchlorination.*

Schéma V. 3: *Mécanisme de dégradation électrochimique du DIU.*

Les produits d'oxydation ainsi obtenus sont nommés :

DCA : 3,4-dichloroaniline ;

DOP$_1$: N-(3-chloro-4-hydroxyphényl)-N',N'-diméthylurée;

DOP$_2$ (QID$_1$) : N-(N',N'-diméthylformamide)-3-chloro-*p*-benzoquinone imine ;

DOP$_{3a}$: N-(3,4-dichloro-2-hydroxyphényl)-N',N'-diméthylurée;

DOP$_{3b}$: N-(4,5-dichloro-2-hydroxyphényl)-N',N'-diméthylurée;

QID$_{2a}$: N-(N',N'-diméthylformamide)-3,4-dichloro-*o*-benzoquinone imine ;

QID$_{2b}$: N-(N',N'-diméthylformamide)-4,5-dichloro-*o*-benzoquinone imine.

Conclusion partielle

Le mécanisme d'oxydation électrochimique du diuron (DIU) a été élucidé pour mieux illustrer et comprendre la capacité des techniques basées sur l'électrochimie à simuler la dégradation environnementale des pesticides. La complémentarité des techniques électroanalytiques hybrides (EC-CL-SM et EC-SM) a amélioré la résolution des mécanismes

oxydatifs complexes des produits agrochimiques, susceptibles de se produire *in vivo* ou dans l'environnement. La possibilité de générer les produits d'oxydation par voie électrochimique (en particulier les intermédiaires hautement réactifs) à partir d'une matrice simple facilite l'élucidation structurelle par SM^2HR par rapport aux matrices biologiques ou environnementales. Les mécanismes d'oxydation intéressants du DIU ont été la déchlorination hydrolytique (substitution -Cl/-OH), la déhydrochlorination et l'hydroxylation aromatique, qui ont à cet effet conduit à la formation de quinone imines (espèces hautement réactives vis-à-vis des réactifs nucléophiles) qui sont généralement associées à une toxicité *in vivo*. À notre connaissance, aucune étude n'a encore rapporté la formation d'espèce réactive telle qu'une quinone imine au cours du métabolisme du DIU. Nous pouvons affirmer que la conjonction des résultats issus des techniques EC-CL-SM et EC-SM permet d'identifier des métabolites de phase I et II (en absence et en présence de GSH) du DIU mais non de manière exhaustive.

Dans la suite de ce travail, nous tendons de simuler le mécanisme général de dégradation des herbicides de la famille des phénylurées. Cela s'est fait en étudiant sept autres pesticides de la même famille.

V.2 Dégradation environnementale et identification des produits de transformation de quelque herbicides phénylurées par couplages EC-CL-SM-*DFT* : Tendance générale

Découvertes dans les années 1950, les phénylurées ont des propriétés herbicides. La variété des substituants introduits dans leur structure permet d'obtenir des produits sélectifs. Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi huit herbicides phénylurées. Le premier groupe est constitué d'herbicides N,N-diméthylés et varient par la nature des substituants du cycle : fénuron (non substitué), monuron (1 Cl substitué), diuron (2 Cl substitués), isoproturon (1 groupement isopropyle, -C_3H_7 substitué), chlortoluron (1 Cl et 1 -CH_3 substitués) et le métoxuron (1 Cl et 1 -OCH_3 substitués). Le deuxième groupe (herbicides N-Méthoxy-N-méthylés) quant à lui est constitué de monolinuron (1 Cl substitué) et de linuron (2 Cl substitué), qui possèdent tous deux une fonction méthoxyle (-OCH_3) en bout de chaine. Les structures de ces différents herbicides sont données au schéma V.4 ci-dessous.

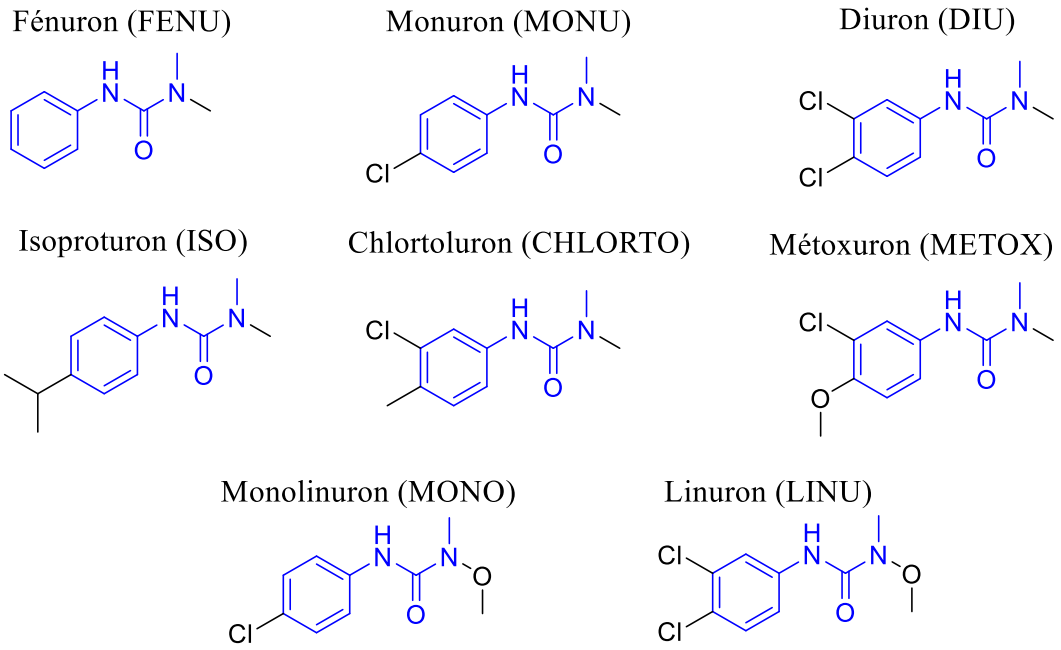


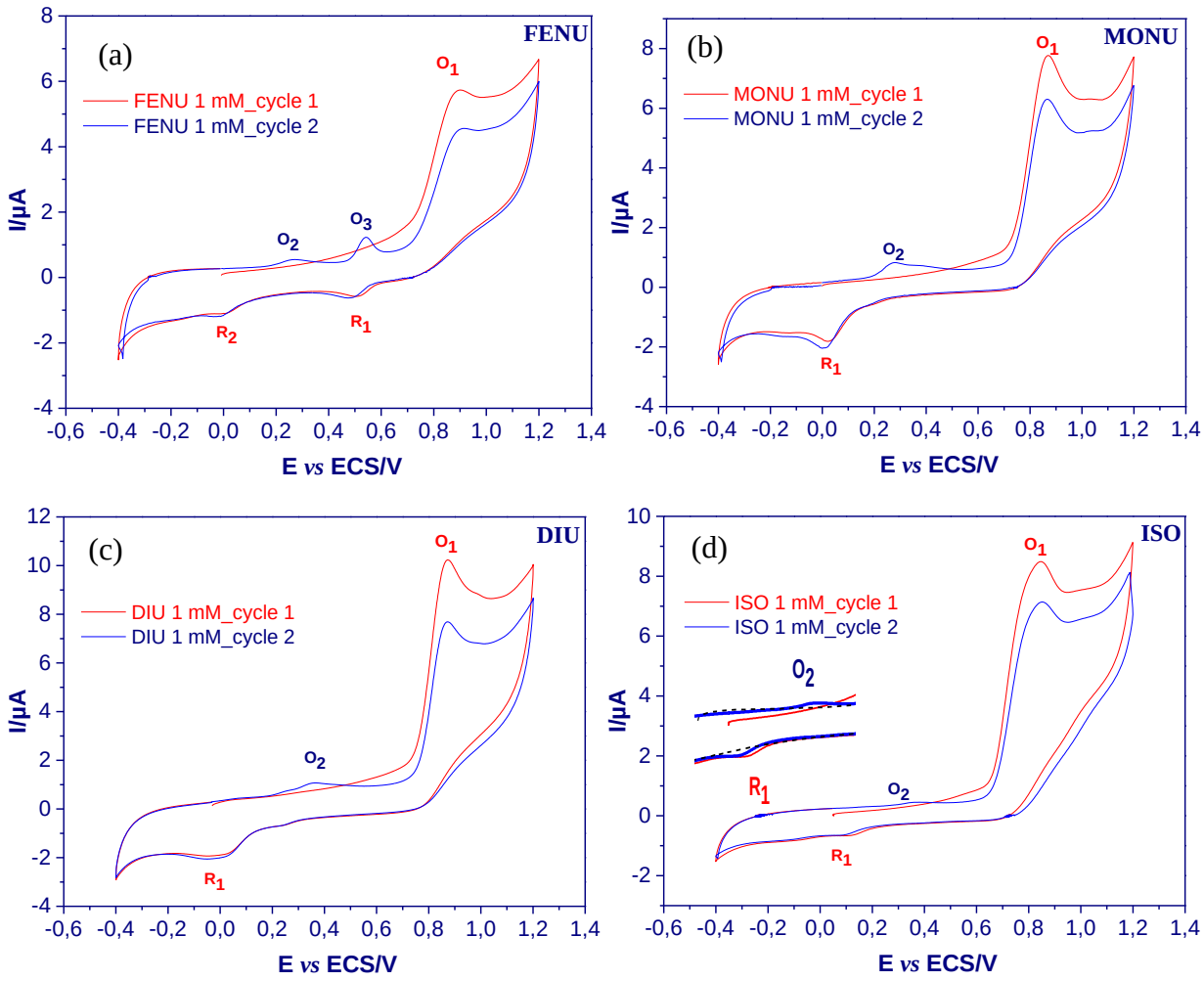
Schéma V. 4: *Structures des herbicides phénylurées étudiés (le squelette en bleu est commun à toutes le structures).*

Dans cette partie, l'objectif est d'identifier pour chacun de ces herbicides, les produits de dégradation stables et instables, et de proposer un mécanisme général de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées. La voltampérométrie cyclique a permis d'étudier le comportement redox de ces herbicides. Les couplages entre une cellule électrochimique, un spectromètre de masse et/ou un chromatographe (EC-SM et EC-CL-SM) a permis la

préparation, la séparation, la détection, l'identification et l'observation en fonction du temps des produits de dégradation formés à l'électrode de travail. De plus les calculs théoriques à travers la méthode *DFT* ont permis d'identifier les différents sites d'attaques nucléophiles de chaque produit d'oxydation, facilitant ainsi l'élucidation structurale des molécules. Il est à rappeler que l'étude approfondie menée sur le diuron, DIU (partie V.1) donne un nombre considérable d'informations pouvant aider à conclure sur la dégradation oxydative des composés en "*uron*" (herbicides phénylurées).

V.2.1 Etude par voltampérométrie cyclique du comportement électrochimique de différents herbicides

Dans un premier temps, le comportement redox de ces herbicides a été étudié par voltampérométrie cyclique sur une électrode de travail en carbone vitreux. L'ensemble des voltammogrammes obtenus est donné à la figure V.15.



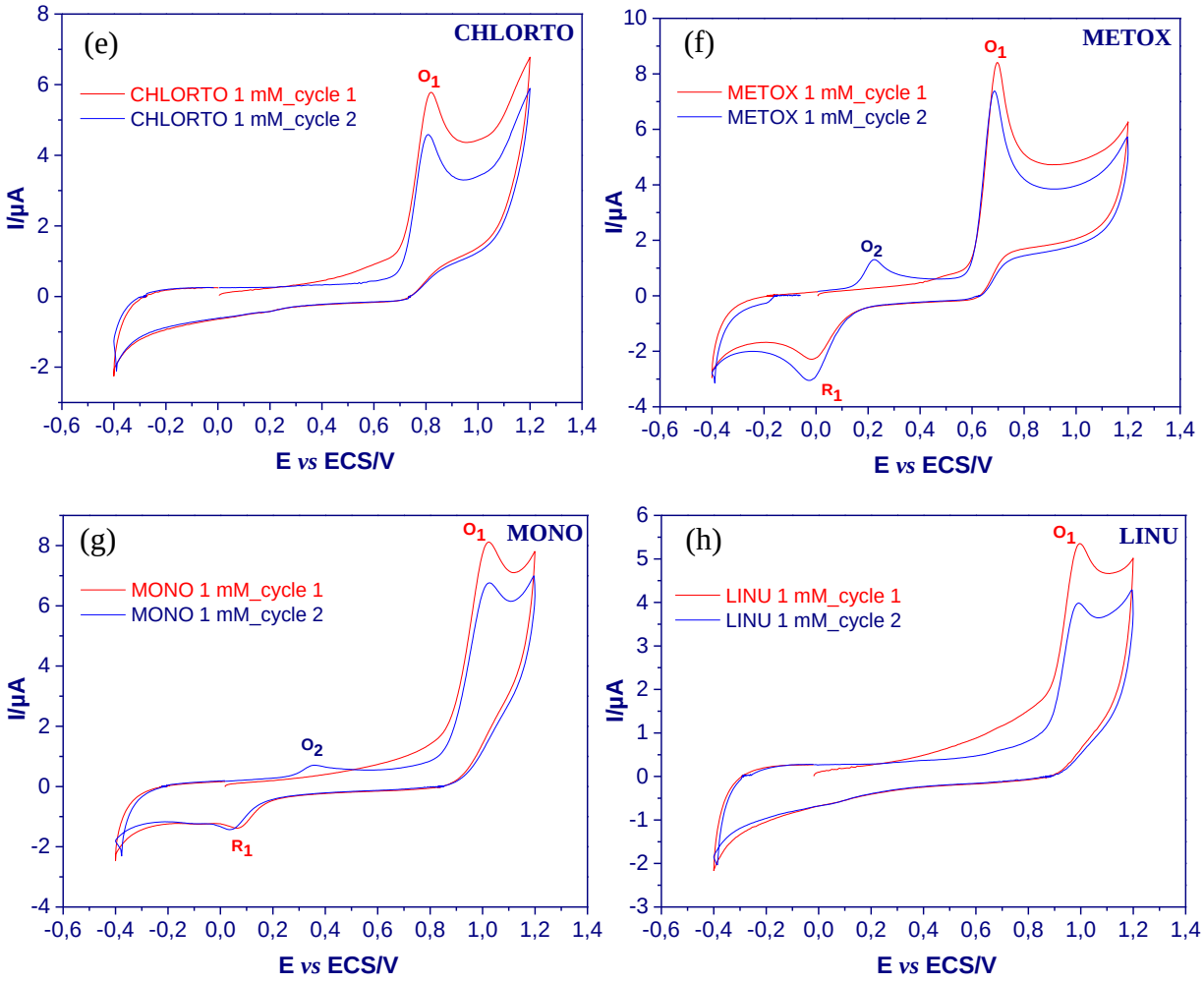


Figure V. 15: *Voltammogrammes cycliques de 1 mM de différents herbicides phénylurées (FENU, MONU, DIU, ISO, CHLORTO, METOX, MONO et LINU); dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s.*

Les voltampérogrammes cycliques représentés à la figure V.15 mettent en évidence le caractère électroactif de tous ces herbicides. MONU, DIU, ISO, METOX et MONO ont quasiment le même comportement électrochimique au vu de l'allure de leurs voltammogrammes. Tout comme nous l'avons décrit dans la première partie lors des travaux sur le DIU, il apparait deux pics d'oxydation O_1 et O_2, et un pic de réduction R_1. En effet, au cours du premier cycle de balayage de potentiel, un pic seul d'oxydation O_1 est observé. Durant le balayage retour du premier cycle, il apparait un pic de réduction R_1 qui est associé à un deuxième pic d'oxydation O_2 qui apparaît au cours du deuxième cycle de balayage. O_2/R_1 constitue donc un système redox quasi-réversible attribué à la formation d'une entité chimique après l'oxydation irréversible de ces différentes molécules herbicides.

Les voltammogrammes du CHLORTO et du LINU présentent un seul pic d'oxydation O_1, preuve du caractère irréversible de ces derniers. Quant au FENU, son comportement électrochimique est tout à fait particulier et différent de tous les autres. En effet, la réponse électrochimique du FENU à la surface de l'électrode de carbone vitreux a donné lieu à un pic anodique O_1 bien défini au premier balayage. Le balayage retour a ensuite entraîné l'apparition de deux pics cathodiques R_1 et R_2. Au cours du second balayage, il est apparu deux pics anodiques O_2 et O_3. Les pics O_2 et R_2 sont liés et constituent de ce fait un système redox quasi-réversible. O_3/R_1 constitue quant à lui un système redox réversible au vu de l'écart de potentiel. L'étude par voltampérométrie cyclique du comportement redox de ces herbicides a également été effectuée en présence d'un excès de glutathion, ce dans l'optique de piéger les intermédiaires hautement réactifs (quinones et quinone imines par exemple) si existantes, ou encore de confirmer la présence de certains composés hydroxylés difficiles à observer directement. Le piégeage de ces intermédiaires confirmerait ainsi la formation des quinones imines lors de la dégradation électrochimique de cette famille de composés.

La connaissance des courbes i = f(E) à une électrode donnée relatives aux comportements redox de ces herbicides a permis de déterminer le potentiel d'électrolyse (1,0 V *vs* ECS pour FENU, MONU, DIU, ISO et CHLORTO ; 0,8 V *vs* ECS pour METOX ; 1,15 V *vs* ECS pour MONO et LINU). Après la synthèse électrochimique par électrolyse à potentiel contrôlé, des techniques analytiques telles que la chromatographie liquide (CL) et la spectrométrie de masse (SM), via notamment le couplage CL-SM, ont permis d'identifier les différents produits de dégradations électrochimiques.

V.2.2 Identification des produits de dégradation : Composition élémentaire

L'électrolyse des différentes solutions d'herbicides (1 mM ; pH 7,4) a été effectuée pendant 6 h et l'analyse de solutions oxydées par CL-SMHR a permis d'identifier les différents produits de dégradation générés électrochimiquement. L'identification structurale a été réalisée par l'obtention de leurs compositions élémentaires sur les pics mono-isotopiques. Le tableau V.2 résume l'essentiel des espèces identifiées après oxydation électrochimique de ces herbicides. Les masses exactes ainsi que les erreurs sur ces masses, les temps de rétention, les formules brutes et les transformations chimiques associées à chacun de ces produits de dégradation y sont rapportés. Nous appellerons POH_n (POH = Produit d'Oxydation de l'Herbicide ; $n \in \mathbb{N}^*$) les produits d'oxydation formés. Nous aurons donc à cet effet POF_n (FENU), $POMu_n$ (MONU), POD_n (DIU), POI_n (ISO), POC_n (CHLORTO), $POMx_n$

(METOX), $POMo_n$ (MONO) et POL_n (LINU). De la même manière, les adduits au GSH des quinone imines ont été nommés $AGQIH_n$ (AGQIH = Adduit au Glutathion de la Quinone Imine issue de l'Herbicide ; $n \in \mathbb{N}^*$). Il est important de rappeler ici que nous ne nous intéresseront pas aux structures dimères et/ou trimères dans cette partie d'étude. Comme nous l'avons souligné dans la première partie des résultats sur l'étude du DIU (partie I.V), la formation de ce type de structures est largement accrue par une concentration élevée en analyte, et il est peu probable d'observer la dimérisation/trimérisation lors de la dégradation dans l'environnement. Par conséquent leur élucidation structurelle ne représente pas un intérêt significatif pour notre étude. Aussi nous décrivons dans le cadre de cette étude uniquement les produits d'oxydation électrochimique, et en fonction de l'observation aisée ou pas des intermédiaires réactifs, nous présenterons les structures des composés hydroxylés, des quinones imines (QIH) et/ou des adduits au GSH (AGQIH) des produits d'oxydation. Les produits de dégradation obtenus par réactions chimiques (hydrolyse chimique par exemple) ne sont pas mis en exergue dans cette partie du travail, l'objectif étant de simuler la dégradation électrochimique, réactions initiées par un transfert d'électrons.

Tableau V. 2: *Produits de dégradation détectés, avec leurs masses exactes, temps de rétention, erreurs, formules moléculaires et transformations chimiques.*

Composés	m/z_{calc} (Da) $[M+H]^+$	m/z_{exp} (Da) $[M+H]^+$	t_R (min)	$\Delta_{m/z}$ (mDa)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Formule brute $[M+H]^+$	Transformations Chimiques
FENU	**165,1028**	**165,1024**	**2,69**	**-0,4**	**-2,4**	**$C_9H_{13}N_2O$**	**Parent**
POF_1	181,0977	181,0962	1,92	-1,5	-8,3	$C_9H_{13}N_2O_2$	Hydroxylation aromatique
POF_2 (QIF)	179,0821	179,0805	2,17	-1,6	-8,9	$C_9H_{11}N_2O_2$	Déhydrogenation du POF_1
POF_3	197,0926	197,0903	2,14	-2,3	-11,7	$C_9H_{13}N_2O_3$	Hydroxylation aromatique
AGQIF	486,1659	486,1652	1,48	-0,7	-1,4	$C_9H_{28}N_5O_8S$	Conjugaison
MONU	**199,0638**	**199,0652**	**3,50**	**1,4**	**7,0**	**$C_9H_{12}ClN_2O$**	**Parent**
$POMu_1$	181,0977	181,0991	1,91	1,4	7,7	$C_9H_{13}N_2O_2$	Déchlorination hydrolytique
$POMu_2$ ($QIMu_1$)	179,0821	179,0821	2,16	0,0	0,0	$C_9H_{11}N_2O_2$	Déhydrochlorination
$POMu_3$	215,0587	215,0599	2,58	1,2	5,6	$C_9H_{12}ClN_2O_2$	Hydroxylation aromatique

AGQIMu	520,1269	520,1272	2,22	0,3	0,6	$C_{19}H_{27}ClN_5O_8S$	Conjugaison
DIU	**233,0248**	**233,0252**	**4,12**	**0,4**	**1,7**	**$C_9H_{11}Cl_2N_2O$**	**Parent**
POD_1	215,0587	215,0590	2,60	0,3	1,4	$C_9H_{12}ClN_2O_2$	Déchlorination hydrolytique
POD_2 (QID_1)	213,0431	213,0432	2,81	0,1	0,5	$C_9H_{10}ClN_2O_2$	Déhydrochlorination
$AGQID_1$	520,1260	520,1263	4,3	-0,6	-1,2	$C_{19}H_{27}ClN_5O_8S$	Conjugaison
POD_3	249,0198	249,0205	2,96	0,7	2,8	$C_9H_{11}Cl_2N_2O_2$	hydroxylation Aromatique
$AGQID_2$	554,0876	554,0880	2,73	0,1	0,2	$C_{19}H_{26}Cl_2N_5O_8S$	Conjugaison
ISO	**207,1497**	**207,1486**	**4,10**	**-1,1**	**-5,3**	**$C_{12}H_{19}N_2O$**	**Parent**
POI_1	181,0977	181,0954	1,92	-2,3	-12,7	$C_9H_{13}N_2O_2$	Substitution (-C_3H_7 / +OH)
POI_2	223,1447	223,1435	3,24	-1,2	-5,4	$C_{12}H_{19}N_2O_2$	hydroxylation Aromatique
POI_3(QII_1)	221,1290	221,1276	3,61	-1,4	-6,3	$C_{12}H_{17}N_2O_2$	Déhydrogenation du POI_2
POI_4	205,1341	205,1327	6,32	-1,4	-6,8	$C_{12}H_{17}N_2O$	Élimination
POI_5	223,1447	223,1443	2,65	-0,4	-1,8	$C_{12}H_{19}N_2O_2$	hydroxylation de carbone alkyle
$AGQII_2$	528,2128	528,2133	2,61	0,5	0,9	$C_{22}H_{34}N_5O_8S$	Conjugaison
CHLORTO	**213,0795**	**213,0797**	**3,93**	**0,2**	**0,9**	**$C_{10}H_{14}ClN_2O$**	**Parent**
POC_1	215,0587	215,0611	2,58	2,4	11,2	$C_9H_{12}ClN_2O_2$	Déméthylation hydrolytique
POC_2	229,0744	229,0753	2,60	0,9	3,9	$C_{10}H_{14}ClN_2O_2$	hydroxylation Aromatique
POC_3	211,0638	211,0642	4,68	0,4	1,9	$C_{10}H_{12}ClN_2O$	Élimination
POC_4	229,0744	229,0764	3,81	2,0	8,7	$C_{10}H_{14}ClN_2O_2$	hydroxylation de carbone alkyle
$AGQIC_1$	534,1425	534,1428	2,62	0,3	0,6	$C_{20}H_{29}ClN_5O_8S$	Conjugaison
METOX	**229,0744**	**229,0750**	**3,34**	**0,6**	**2,6**	**$C_{10}H_{14}ClN_2O_2$**	**Parent**
$POMx_1$	215,0589	215,0592	2,60	0,5	2,3	$C_9H_{12}ClN_2O_2$	Déméthoxylation hydrolytique
$POMx_2$ ($QIMx_1$)	213,0431	213,0433	2,81	0,5	2,3	$C_9H_{10}ClN_2O_2$	Déhydro-méthoxylation
$AGQIMx_1$	520,1269	520,1263	2,39	-0,6	-1,2	$C_{19}H_{27}ClN_5O_8S$	Conjugaison
$POMx_3$	245,0693	245,0698	2,94	0,5	2,0	$C_{10}H_{14}ClN_2O_3$	hydroxylation Aromatique

$AGQIMx_2$	550,1375	550,1384	2,49	0,9	1,6	$C_{20}H_{29}ClN_5O_8S$	Conjugaison
MONO	**215,0587**	**215,0591**	**4,12**	**0,4**	**1,9**	**$C_9H_{12}ClN_2O_2$**	**Parent**
$POMo_1$	197,0926	197,0929	2,44	0,3	1,5	$C_9H_{13}N_2O_3$	Déchlorination hydrolytique
$AGQIMo_1$	502,1608	502,1609	2,23	0,1	0,2	$C_{19}H_{28}ClN_5O_9S$	Conjugaison
$POMo_3$	231,0536	231,0533	3,18	-0,3	-1,3	$C_9H_{12}ClN_2O_3$	hydroxylation Aromatique
$AGQIMo_2$	536,1218	536,1215	2,54	-0,3	-0,6	$C_{19}H_{27}ClN_5O_9S$	Conjugaison
LINU	**249,0198**	**249,0183**	**4,7**	**-1,5**	**-6,0**	**$C_9H_{11}Cl_2N_2O_2$**	**Parent**
POL_1	231,0536	231,0524	3,06	-1,2	-5,2	$C_9H_{12}ClN_2O_3$	Déchlorination hydrolytique
$AGQIL_1$	570,0828	570,0824	3,01	-0,4	-0,7	$C_{19}H_{26}Cl_2N_5O_9S$	Conjugaison

POD = Produit d'Oxydation de l'Herbicide ; AGQIH = Adduit au Glutathion de la Quinone Imine issue de l'Herbicide ; QID = Quinone Imine issue de l'Herbicide ; $m/z_{théo}$ = $m/z_{théorique}$; m/z_{exp} = $m/z_{expérimentale}$; t_R = temps de rétention

V.2.3 Identification des produits de dégradation : Elucidation structurale

L'élucidation structurale a été rendue possible grâce aux analyses CL-SMHR et par calculs de mécanique quantique (*DFT*). A cet effet, les calculs *DFT* ont été effectués afin de localiser et de quantifier les sites électrophiles (sites d'attaques nucléophiles). La géométrie des espèces étudiées a été optimisée à partir des structures des herbicides cristallisés. En utilisant les densités électroniques totales calculées sur les cations oxydés ($-2e^-$, $-H^+$), nous avons obtenu la fonction f^+ de Fukui qui révèle les sites électrophiles principaux. Il faut rappeler ici que la fonction de Fukui renseigne sur l'indice d'électrophilicité locale au sein d'une molécule. La figure V.16 ci-dessous montre les sites d'attaques nucléophiles possibles sur différentes molécules herbicides, représentés par les indices de Fukui.

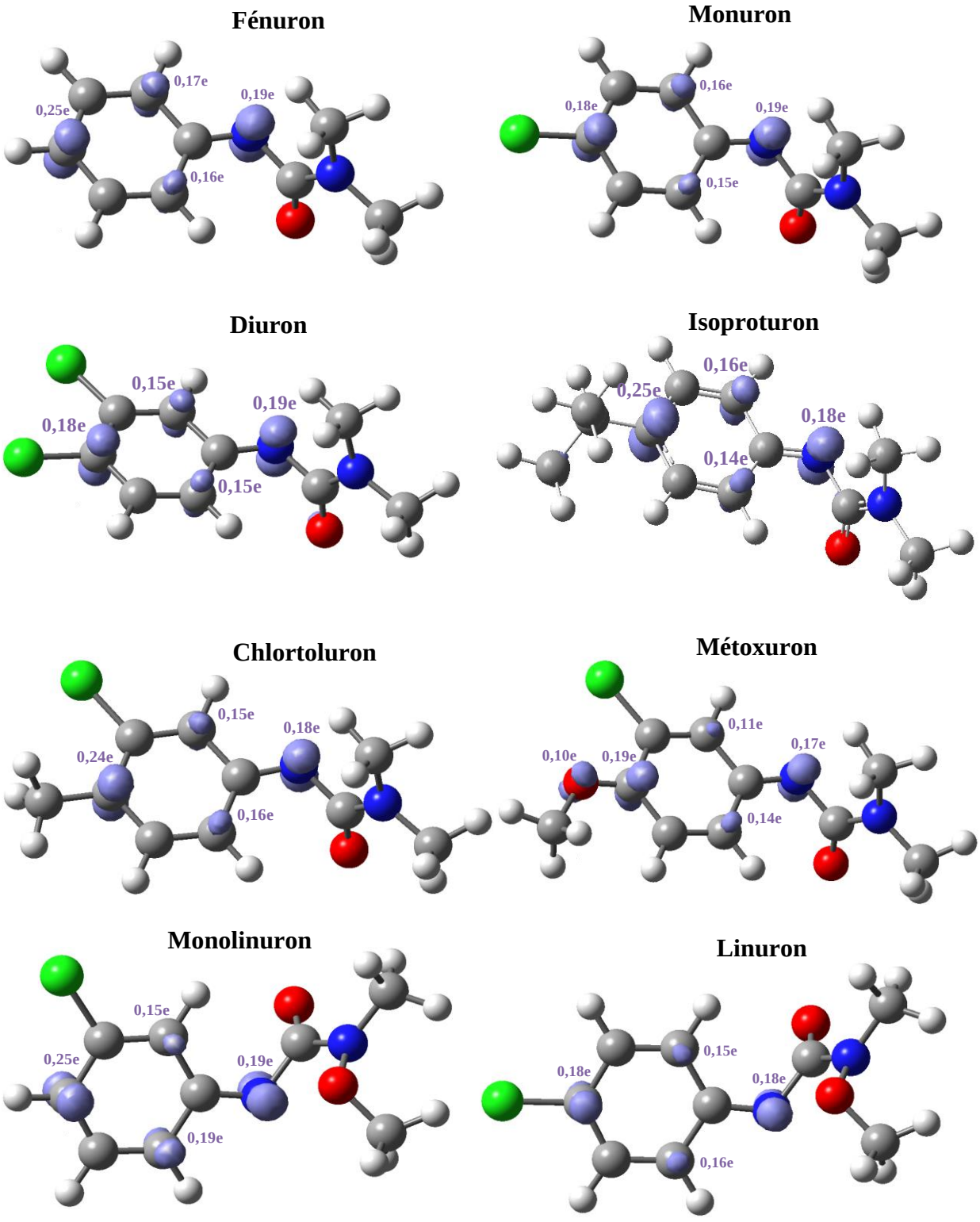
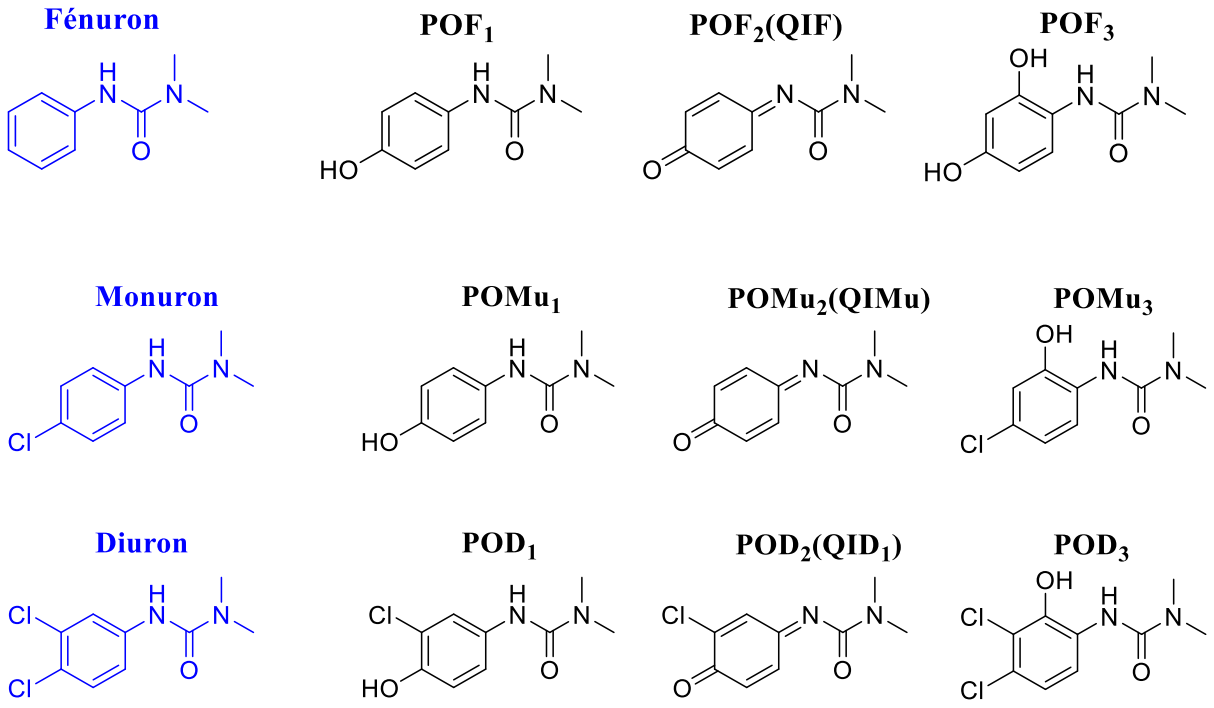


Figure V. 16: *Fonctions f^+ de Fukui calculées pour différents herbicides phénylurées déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes violette sont plus sujets aux attaques nucléophiles.*

Comme le montre la figure V.16, la fonction f^+ de Fukui calculée pour les cations déprotonés de ces herbicides révèle des électrophilicités notables beaucoup plus au niveau de trois Carbones aromatiques. Les valeurs des indices condensés en atome sont situées entre 0,11e et 0,25e. Les calculs *DFT* soutiennent donc l'hydroxylation notable au niveau de ces atomes de Carbone aromatiques. Il est à noter que les grandes valeurs des indices d'électrophilicités (entre 0,17e et 0,20e) au niveau des atomes d'azote liés aux cycles ne sont pas tout à fait significatives et ne seront pas pris en compte dans le cas des réactions électrochimiques. En effet ces atomes ont perdu leurs protons lors de la formation des cations, ce qui pourrait expliquer ces valeurs élevées. En fait tout site qui se verra privé d'un proton aura théoriquement un indice condensé en atome élevé.

Le schéma V.5 récapitule les différents produits d'oxydation formés (ceux étant observés directement, et éventuellement ceux issus des adduits) au cours de la dégradation électrochimique de ces herbicides. Évidement l'élucidation structurale a été appuyée par les calculs *DFT*. Il est à noter que certains produits d'oxydation possèdent plusieurs isomères (isomères de position de fonction), nous ne représenterons que les majoritaires, ce moyennant les valeurs des indices condensés en atome calculées. Les spectres SM^2HR de différents produits d'oxydation sont donnés en annexe de ce document (figures A-1 à A-8).



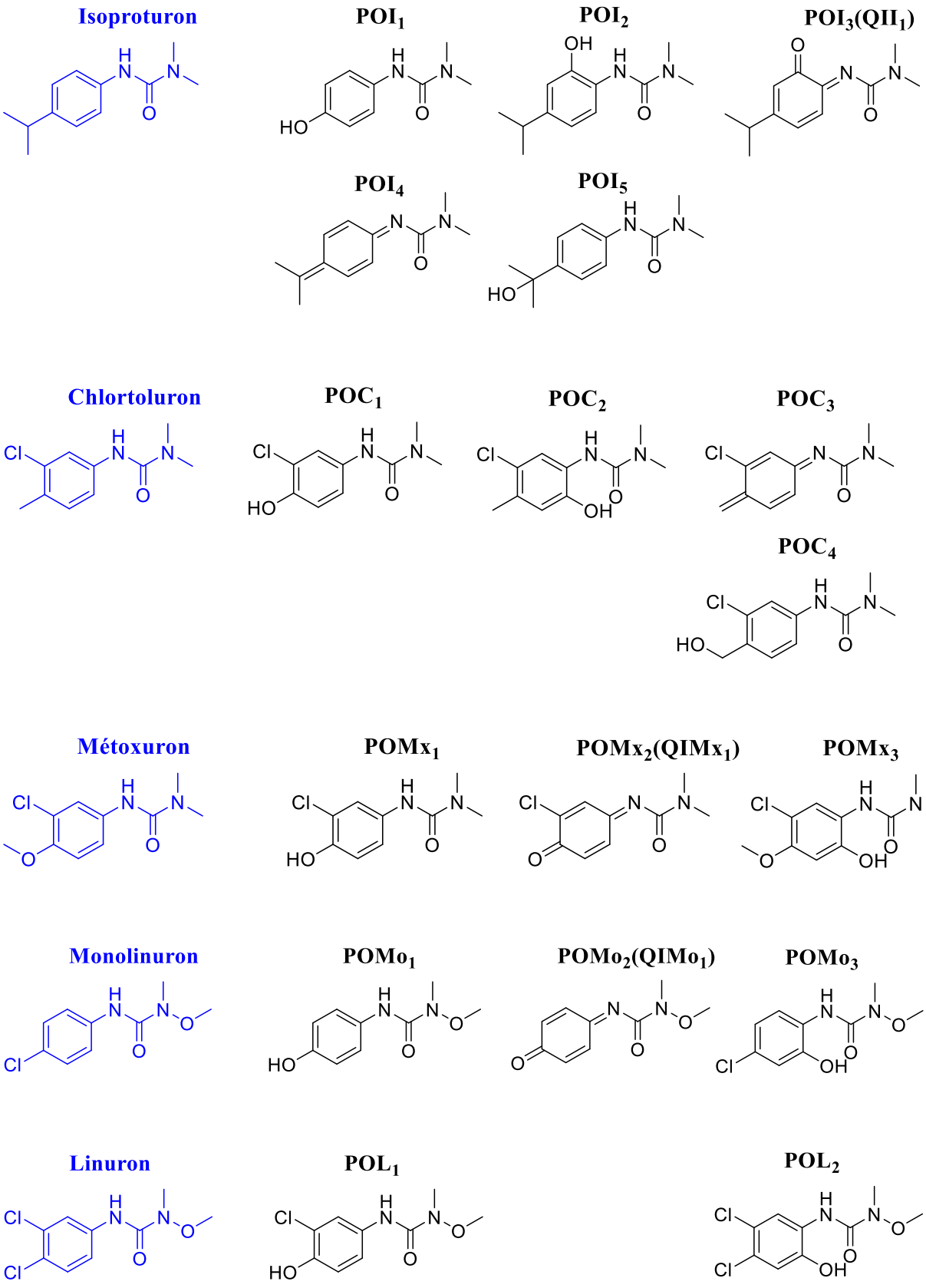


Schéma V. 5: *Structures des différents herbicides phénylurées ainsi que leurs principaux produits d'oxydation.*

Comme observé au schéma V.5, les principaux produits d'oxydation sont les composés hydroxylés (substitutions et additions) et les quinones imines instables, certains sont directement observés et d'autres sont piégés par le GSH. Cependant, l'absence de quinone imines est constatée pour les herbicides CHLORTO et LINU. Les résultats de la voltampérométrie cyclique (figure V.15e,h) de ces deux herbicides ne présentent pas les pics de réduction, leurs systèmes sont irréversibles. L'absence de formation de quinone imines lors de l'oxydation électrochimique de ces dernières est donc justifiée, selon ces résultats.

V.2.4 Mécanisme général de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées

Dans cette étude, nous avons clairement observé que la plupart des transformations électrochimiques (réactions initiées par un transfert d'électrons) finissent par se produire sur le cycle après délocalisation de la charge de sur ce dernier. Afin de s'assurer que les produits de transformation sont réellement générés par l'électrochimie, la voltampérométrie massique (EC-SM en ligne) a été réalisée sur quelques herbicides modèles (FENU, DIU, ISO et LINU). Généralement, pour élucider le mécanisme réactionnel lors d'une oxydation/réduction électrochimique, une expérience utilisant une cellule électrochimique directement couplée au spectromètre de masse est réalisée. Les résultats des expériences EC-SM en ligne permettent de corréler l'intensité d'un ion *m/z* donné en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. L'évolution de cette intensité nous donne des informations essentielles sur l'aspect mécanistique et cinétique de la réaction électrochimique. La figure V.17 montre les voltammogrammes massiques de quatre herbicides ainsi que leurs produits d'oxydation électrochimique (POHn).

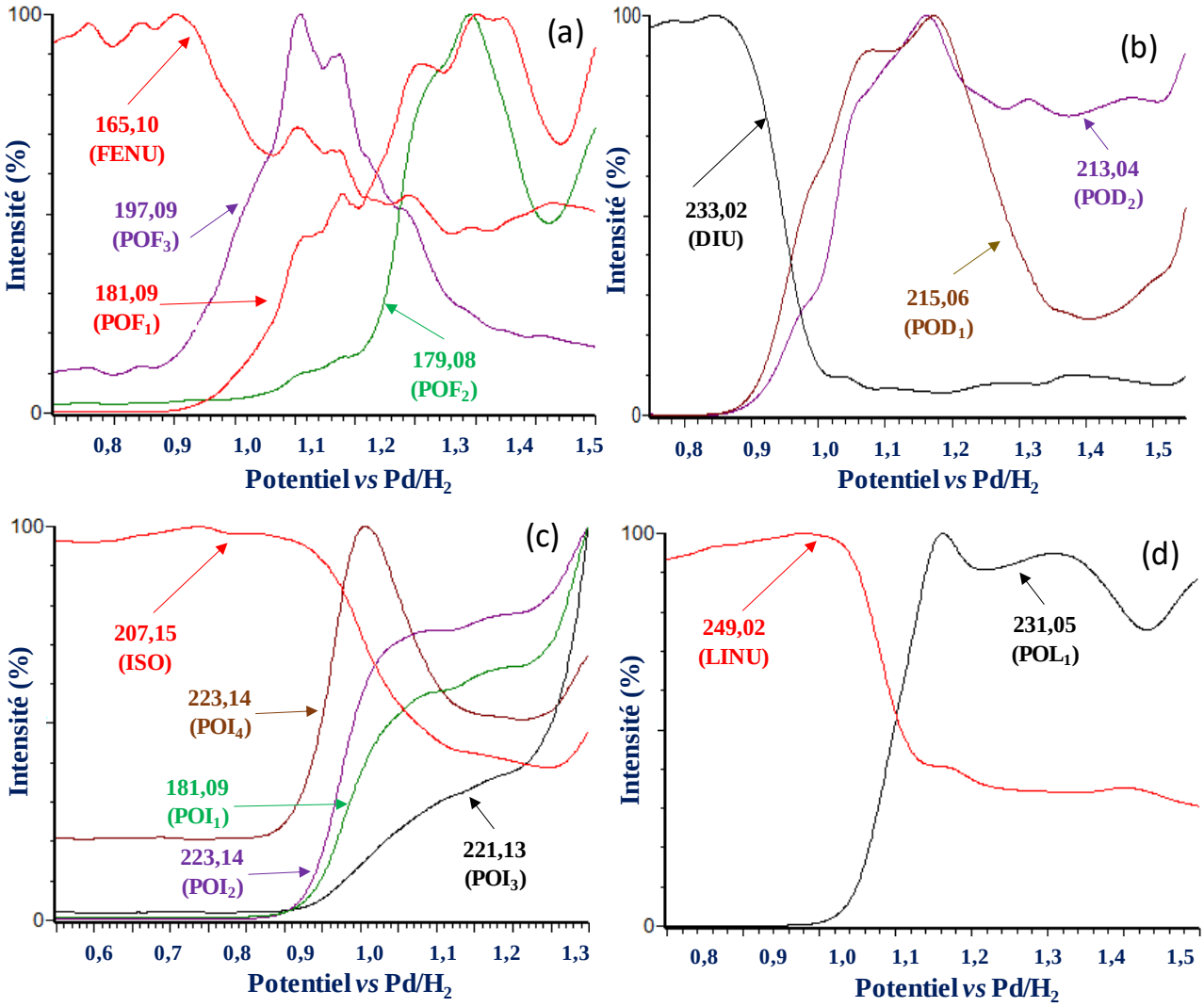
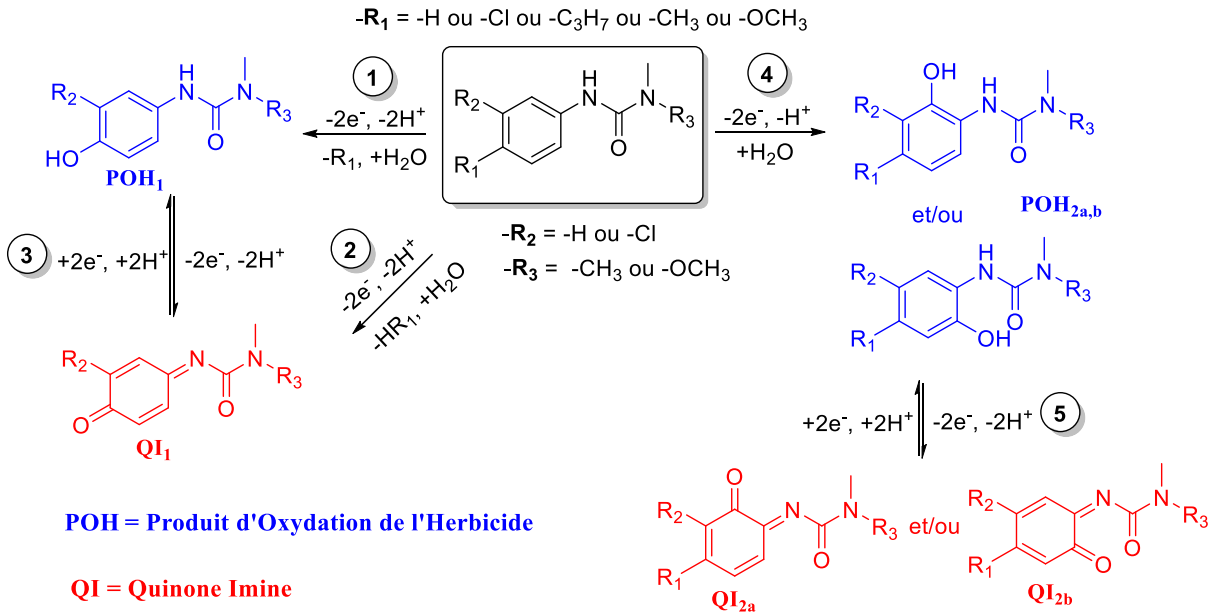


***Figure V. 17**: Voltammogrammes massiques 2D de quatre herbicides phénylurées (FENU, DIU, ISO et LINU) et leurs produits d'oxydation (POHn) dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium à 20 mM. Le balayage de potentiel se fait de 0,0 V à 2 V vs Pd/H₂ à la vitesse de balayage de 2 mV/s.*

Comme le montre la figure V.17, le voltammogramme massique du pic mono-isotopique *m/z* de chacun des herbicides (FENU, DIU, ISO et LINU) diminue considérablement autour de 0,9 V *vs* Pd/H_2, et ce avec l'augmentation du potentiel à l'électrode de travail, confirmant ainsi leur oxydation. Sur ces mêmes figures, on remarque l'apparition de différents produits d'oxydation (POF_1, POF_2, POF_3, POD_1, POD_2, POI_1, POI_2, POI_3, POI_4, POL_1) en corrélation avec la baisse des intensités du signal de ces herbicides phénylurées, ce qui suggère une corrélation entre leur formation et l'oxydation électrochimique de tels herbicides. Il est également à remarquer que deux composés d'oxydation, à savoir POF_3 (pour FENU) et POI_4 (pour ISO) obtenus par des réactions

d'élimination ont le même comportement en voltampérométrie massique. Ce comportement semblable traduirait alors le même type de réaction d'oxydation. Le mécanisme d'oxydation électrochimique proposé pour les herbicides phénylurées est donné par le schéma V.6 ci-dessous.



1 *= Substitutions -Cl/+OH ou -C_3H_7/+OH ou -CH_3/+OH ou -OCH_3/+OH ;*

2 *= Déhydrochlorination ou déhydrométhylation ou déhydrométhoxylation ;*

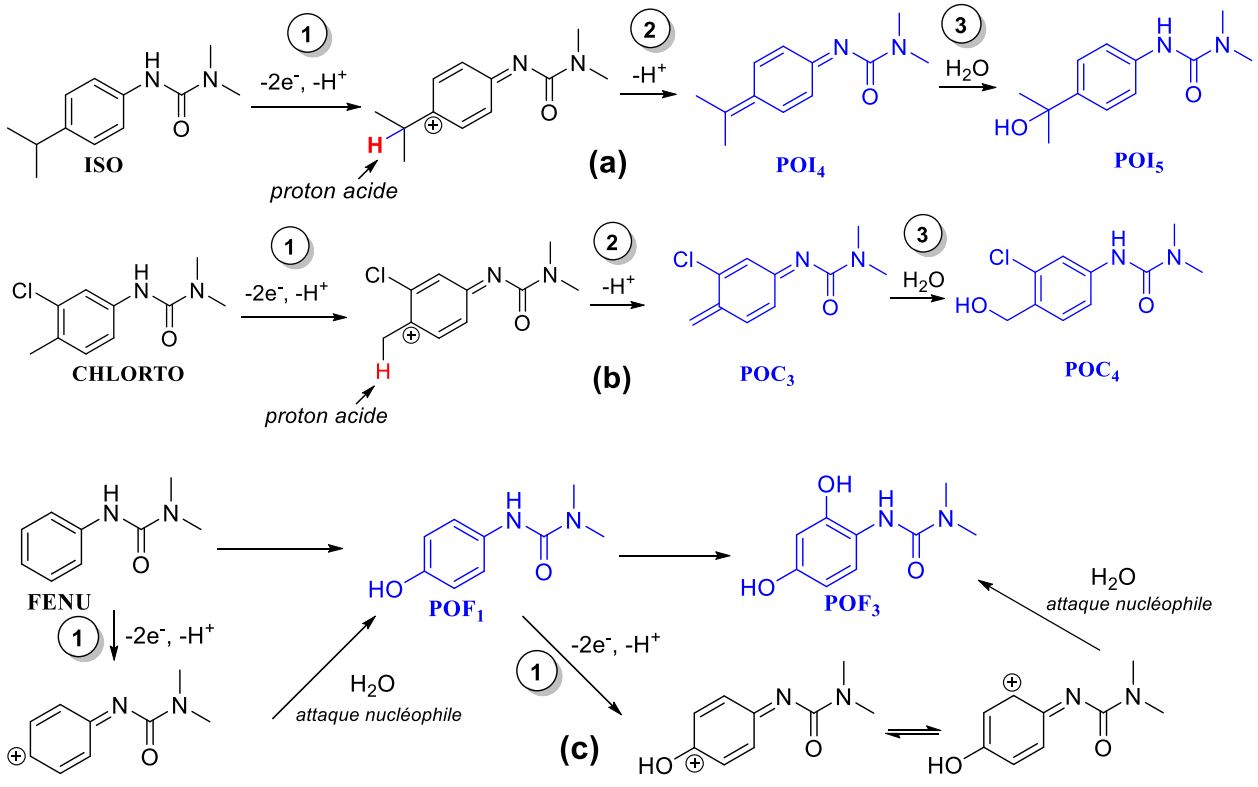
3 *= **5** Déshydrogénation / hydrogénation ; **4** = hydroxylation aromatique.*

Schéma V. 6: *Mécanisme général de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées.*

On peut identifier sur le schéma V.6, quatre principaux mécanismes de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées, tous se produisant sur le cycle phényl. Il convient de noter que les réactions de dimérisation et d'hydrolyse chimique ont également été mimées, comme dans le cas de la simulation de la dégradation électrochimique de l'herbicide diuron *(Temgoua et al., 2020)*. Toutefois, aucune réaction sur la chaîne latérale n'a été mimée par l'électrochimie. Ces réactions sont potentiellement des réactions initiées par le transfert d'un atome d'hydrogène (*HAT, Hydrogen Atom Transfer*). Jusqu'ici, l'outil électrochimique a montré son incapacité à mimer ce type de réaction *(Bussy et al., 2015; Hofmann et al., 2011)*. Les molécules ne subissent pas une hydrolyse au niveau du premier atome d'azote N (atome d'azote lié au cycle phényle) en raison de l'absence d'atome d'hydrogène en position alpha *(Bussy et Boujtita, 2014)*. Le deuxième atome d'azote N (azote en bout de chaîne) pourrait

être désalkylé par EC, mais probablement en concurrence avec d'autres réactions qui se produisent à un potentiel d'oxydation plus faible *(Bussy et al., 2013)*. Le verrou pourrait être levé en utilisant les électrodes modifiées par exemple.

Plus intéressant, l'herbicide ISO contenant un substituant alkyle sur le cycle aromatique peut subir une réaction d'élimination après oxydation électrochimique pour générer POI_4 et POI_5 (schéma V.7a). En effet, après l'oxydation, la charge positive peut être localisée au niveau du groupement isopropyl contenant le Carbone aromatique, conférant ainsi un caractère acide élevé au proton en position alpha. Ce mécanisme peut être étendu à d'autres cycles aromatiques alkylés comme CHLORTO, entraînant la formation des métabolites POC_3 et POC_4 (schéma V.7b). On peut également mettre en évidence une double hydroxylation de l'herbicide FENU (schéma V.7c). Cette double hydroxylation est en accord avec les résultats obtenus par la voltampérométrie cyclique de la figure V.15.



1 = Oxydation pour former un cation ;

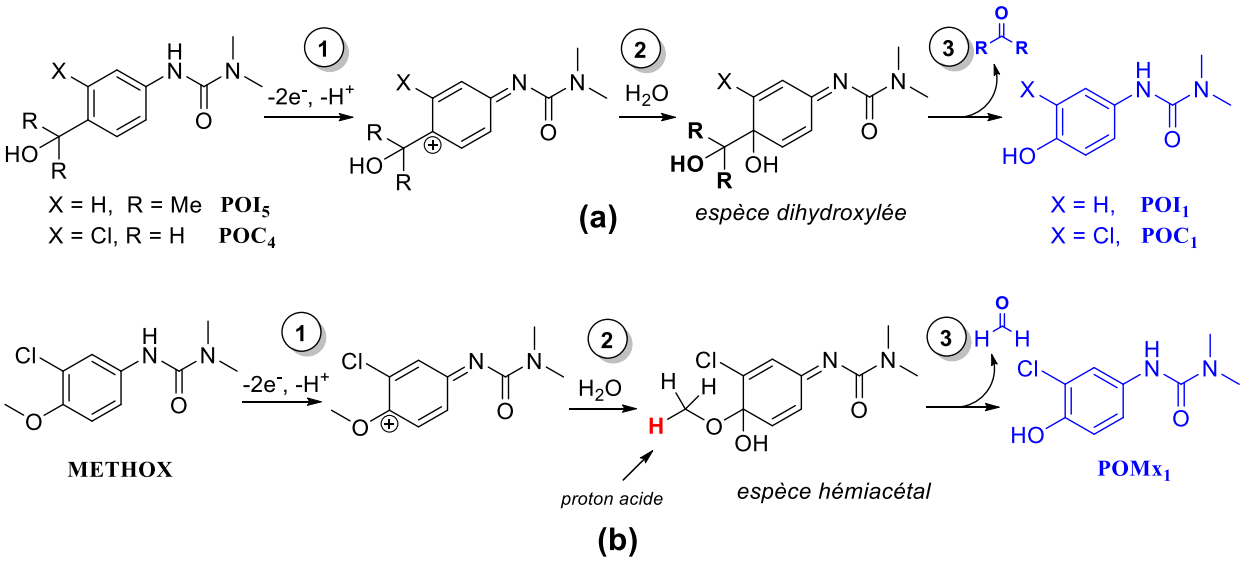
2 = Réaction d'élimination du proton en position alfa de charge positive ;

3 = Hydroxylation par attaque nucléophile de H_2O.

Schéma V. 7: *Mécanisme de génération électrochimique de (a) POI_4 et POI_5 ; (b) POC_3 et POC_4 et (c) POF_1 et POF_3.*

De plus, les intermédiaires POI_5 et POC_4 résultant de la réaction d'élimination peuvent réagir pour former des composés de désalkylation hydrolytiques (POI_1 et POC_1, respectivement, schéma V.8a). Nous pensons que ces intermédiaires hydroxylés peuvent à nouveau s'oxyder pour donner des espèces di-hydroxylées qui forcent la réaction de désalkylation en éliminant les fragments sous forme d'acétone (pour ISO) ou de formaldéhyde (pour CHLORTO). Cette espèce devient par la suite suffisamment stable comme le montrent les voltammogrammes massiques 2D de la figure V.17. Sur cette figure, on voit bien que l'intensité de POI_1 augmente tandis que celle de POI_4 diminue au cours du balayage de potentiel d'oxydation, ce qui signifie qu'une suroxydation de cet intermédiaire génère des produits de désalkylation via le mécanisme proposé au schéma V.8a.

Dans le cas de METOX, le processus de déméthoxylation est causé après une oxydation primaire, car l'hémiacétal formé après l'attaque de l'eau subit une dégradation en éliminant le formaldéhyde (schéma V.8b)



1 = oxydation pour former un cation ;

2 = Hydroxylation par attaque nucléophile de H_2O ;

3 = Réaction d'élimination de l'acétone (R = Me) ou du formaldéhyde (R = H).

Schéma V. 8: *a) Mécanisme de désalkylation hydrolytique d'ISO et de CHLORTO : génération de POI_1 et POC_1. b) Mécanisme de déméthoxylation hydrolytique de METOX : génération de $POMx_1$.*

V.2.5 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale des herbicides phénylurées

Les voies de transformations métaboliques des herbicides phénylurées ont été proposées dans la revue de Sørensen et coauteurs *(Sørensen et al., 2003)*. Dans le même ordre d'idées, Hussain et collaborateurs *(Hussain et al., 2015)* ont présenté dans un article de synthèse un aperçu des processus abiotiques et biotiques régissant le devenir environnemental des herbicides phénylurées après leur application dans les champs agricoles. Plus précisément, ils ont mis en évidence le rôle central de la biodégradation dans l'atténuation naturelle des pesticides dans les sols agricoles. Les progrès récents dans les aspects microbiens de leur dégradation sur le terrain ainsi que dans les cultures pures ont été présentés, y compris les voies métaboliques, les processus et les facteurs qui contrôlent la biodégradation des herbicides phénylurées.

Les voies métaboliques des différents herbicides phénylurées se sont révélées avoir des similitudes, deux processus étant observées: (i) le métabolisme des herbicides phénylurées substituées par N,N-diméthylurée se produit généralement par des réactions successives de N-déméthylation; (ii) Le métabolisme des phénylurées substituées par N-méthoxy-N-méthylurée se produit soit par des réactions de N-déméthylation, soit de N-déméthoxylation *(Pascal-Lorber et al., 2010)*. Dans presque tous les herbicides phénylurées étudiés, ces étapes de dégradation initiales sont suivies d'une hydrolyse de la chaîne latérale de l'urée, entraînant la formation des métabolites d'aniline correspondants, qui pourraient être métabolisés davantage *(Sørensen et al., 2003)*. Le schéma suivant est celui généralement rencontré lors de la dégradation environnementale de cette famille d'herbicides (schéma V.9).

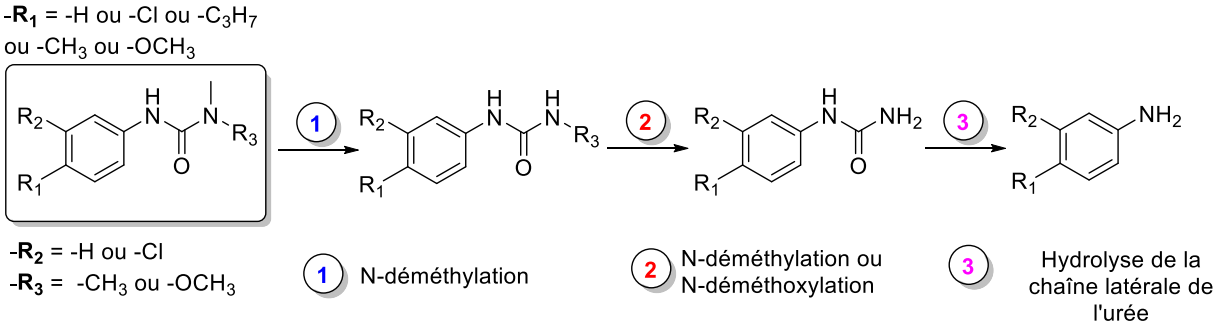


***Schéma V. 9**: Mécanisme général de dégradation environnementale des herbicides phénylurées.*

Le mécanisme du schéma V.9 généralement rencontré n'a pas été mimé dans cette étude par électrochimie. Les autres types de mécanismes illustrés dans cette étude, mis à part

ceux conduisant à la formation de quinone imines et quinone méthines, sont communs aux deux types de dégradation : électrochimique et environnementale. L'électrochimie (EC) ne simule pas tout type de réactions, mais grâce à des études comme celles-ci, il est possible de bien comprendre les mécanismes de réaction mis en jeu et de prédire quels métabolites se formeront. Comprendre ce que l'outil EC peut faire et ne peut pas faire est plus important qu'un outil qui peut tout faire de manière incohérente. Il ressort que tous ces herbicides ont été transformés par des réactions de substitution/désalkylation hydrolytique, d'hydroxylation aromatique, de déshydrochloration, de déshydrométhylation, de déshydrométhoxylation, de déshydrogénation et d'hydrogénation. Plus important encore, le métabolisme de ces herbicides semble avoir été initié par transfert d'électron seul (*SET, Single Electron Transfer*) à partir du groupe -NH-.

Pour mieux comprendre et étudier la capacité de l'électrochimie à mimer les réactions de dégradations environnementales, la suite de ce travail a porté sur l'étude cette fois ci d'un fongicide de la famille des carbamates et des benzimidazoles. Le composé modèle choisit est la carbendazime (CBZ), un fongicide très utilisé pour les cultures céréalières et fruitières.

V.3 Comportement électrochimique, identification des produits générés et élucidation du mécanisme de dégradation de la Carbendazime (CBZ) par EC-CL-SM et EC-SM

V.3.1 Comportement redox de la CBZ

Le comportement redox de la CBZ a d'abord été étudié par voltampérométrie cyclique sur une électrode de travail en carbone vitreux (figure V.18a).

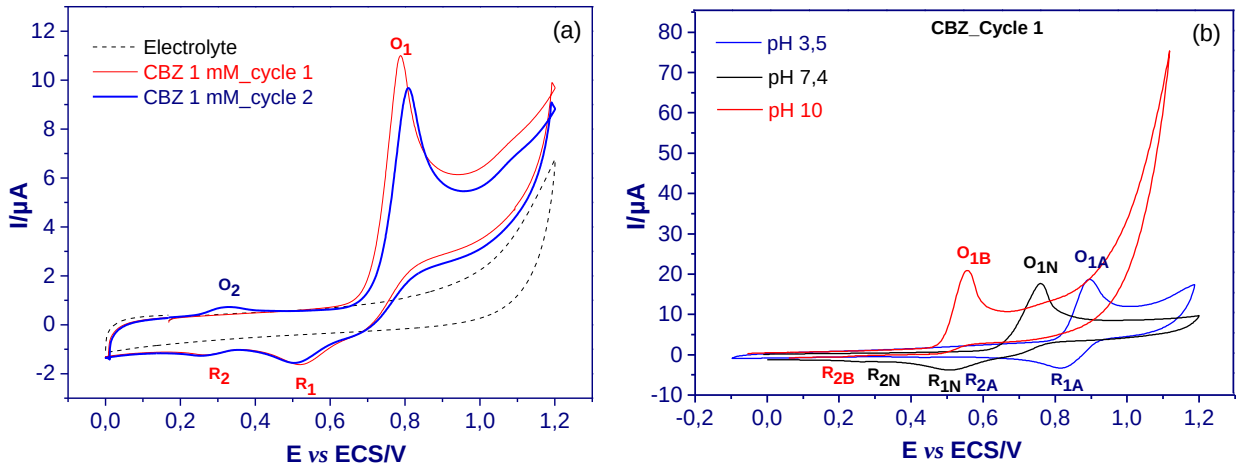


Figure V. 18: *(a) Voltammogrammes cycliques de 1 mM de CBZ dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s, et (b) voltampérogrammes cycliques de 1 mM de CBZ à différents pH.*

La réponse électrochimique de la CBZ sur la surface de l'électrode de carbone vitreux a donné lieu à un pic anodique bien défini à un potentiel d'environ 0,8 V *vs* ECS au premier balayage, le balayage retour a ensuite entraîné l'apparition de deux pics cathodiques à des potentiels proches de 0,5 V et 0,3 V respectivement, avec des intensités beaucoup plus faibles. Au cours du second balayage, un second pic anodique est apparu à un potentiel proche de 0,3 V et ayant une intensité beaucoup plus faible que ceux des signaux observés précédemment. Les pics O_1 et R_1 sont donc liés, ce qui suggère un système redox quasi-réversible. Le couple réversible O_2/R_2, situé à des potentiels moins positifs que la molécule mère (O_1/R_1), correspond au système redox d'une molécule plus facilement oxydable que la CBZ. Un comportement électrochimique similaire de la CBZ a déjà été rapporté dans la littérature *(Ashrafi et al., 2012 ; Teadoum et al., 2016)*. Des expériences supplémentaires ont été réalisées en milieu acide et basique, le même comportement a été observé, sauf en milieu basique où le pic R_1 est absent. Il convient de noter que l'augmentation du pH (figure V.18b) a

entraîné le déplacement des pics de potentiel d'oxydation et de réduction vers les valeurs plus basses, indiquant que la réaction d'oxydation électrochimique de la CBZ est dépendante du pH. Cette dépendance suggère que le mécanisme d'oxydation de la CBZ implique une étape de protonation. Elle peut être attribuée à la présence d'atomes d'azote au niveau de la molécule de CBZ *(Ribeiro et al., 2011)*.

Des informations complémentaires sur le schéma/mécanisme d'oxydation électrochimique du fongicide CBZ seront obtenues lors des analyses EC-SM et EC-CL-SM.

V.3.2 Identification des produits de dégradation de la CBZ

L'électrolyse de la CBZ a été effectuée comme décrit dans le chapitre IV, partie méthodes. L'analyse de solutions oxydées de CBZ à différents pH (3,5 ; 7,4 et 10) par CL-SMHR a permis d'identifier six produits de dégradation stables. Comme nous l'avons souligné plus haut sur l'étude de la dégradation électrochimique de l'herbicide diuron, le pH n'a d'influence que sur l'intensité des ions, et non sur la production/génération de nouvelles entités. Tous les travaux d'élucidation structurelle ont été effectués après oxydation de la CBZ à pH neutre. Les masses exactes, les temps de rétention, les erreurs et les formules brutes associées à chacun de ces produits de dégradation sont rassemblés dans le tableau V.3. Nous appellerons PDC_n (PDC = Produit de Dégradation de la Carbendazime ; $n \in \mathbb{N}^*$) les produits formés. Les résultats CL-SMHR, CL-SM^2HR et EC-SM ont indiqué la présence d'isocyanate de benzimidazole (PDC_1, *m/z* 160), de 2-aminobenzimidazole (PDC_2, *m/z* 134), d'hydroxy-2-aminobenzimidazole (PDC_3, *m/z* 150), d'hydroxycarbendazime (PDC_4, *m/z* 208), de monocarbométhoxyguanidine (PDC_5, *m/z* 118) et environ cinq isomères du dimère majoritaire (PDC_6, *m/z* 381).

Il faut cependant préciser que les formules brutes des produits d'oxydation ont été confirmées par SMHR. Les différences entre les *m/z* théorique et expérimental étaient de 1,6 mDa ou moins suggérant une bonne concordance entre la composition proposée pour les formules des produits de transformation de la CBZ et les *m/z* observés. L'erreur sur le *m/z* théorique et expérimental a été exprimée par rapport à la moyenne *m/z*. Dans ce cas, les structures de produits de dégradation plus petites (par exemple PDC_2 et PDC_5) conduisent intrinsèquement à un $\Delta_{m/z}$ plus élevé, bien que tous les *m/z* aient été déterminés avec une précision similaire.

Tableau V. 3: *Produits de dégradation de la CBZ détectés, avec leurs masses exactes, temps de rétention, erreurs, formules moléculaires et transformations chimiques.*

Composés	m/z_{calc} (Da) $[M+H]^+$	m/z_{exp} (Da) $[M+H]^+$	t_R (min)	$\Delta_{m/z}$ (mDa)	$\Delta_{m/z}$ (ppm)	Formules brutes $[M+H]^+$	Transformations Chimiques
CBZ	192,0773	192,0764	1,96	-0,9	-4,7	$C_9H_{10}N_3O_2$	Parent
PDC_1	160,0511	160,0518	1,96	0,7	4,4	$C_8H_6N_3O$	Elimination du MeOH
PDC_2	134,0718	134,0702	1,42	-1,6	-11,9	$C_7H_8N_3$	Hydrolyse
PDC_3	150,0667	150,0657	2,02	-1,0	-6,7	$C_7H_8N_3O$	Hydroxylation de PDC_2
PDC_4	208,0722	208,0720	1,74	-0,2	-1,0	$C_9H_{10}N_3O_3$	Hydroxylation
PDC_5	118,0617	118,0603	0,42	-1,4	-10,1	$C_3H_8N_3O_2$	
PDC_6	381,1311	381,1298	2,87	-1,3	-3,4	$C_{18}H_{17}N_6O_4$	Dimirisation

PDC = Produit de Dégradation de la Carbendazime ; $m/z_{théo}$ = $m/z_{théorique}$; m/z_{exp} = $m/z_{expérimentale}$; t_R = temps de rétention.

L'objectif n'étant pas de dégrader la CBZ jusqu'à minéralisation, mais plutôt de produire et d'identifier ses principaux produits de dégradation (stables et instables) et de proposer un mécanisme de dégradation électrochimique. Une durée de 6 h est appropriée pour générer suffisamment de produits de dégradation oxydative de la CBZ. La suite du travail est consacrée à la description de chaque produit de dégradation, ainsi que les adduits associés à ces produits.

V.3.2.1 Formation des composés PDC_1, PDC_2 et PDC_3

Les composés PDC_1 et PDC_2 sont des produits de dégradation de la CBZ qui sont formés avant l'électrolyse, car ils sont présents dans la solution analysée par CL-SMHR à t_0 (E = 0 V *vs* ECS). La grande pureté du pesticide utilisé ne nous permet pas d'attribuer ces produits de dégradation aux impuretés. Un test de pureté a été réalisé à cet effet sur chromatographie sur couche mince de gel de silice, en utilisant un mélange de dichlorométhane-éthanol (1:1) comme éluant, et les résultats concernant la pureté ont été concluants. Ces produits de dégradation pourraient donc se former, soit par des réactions chimiques telles que l'hydrolyse (PDC_2), soit par ionisation au sein de la source *electrospray* du spectromètre de masse (PDC_1, même temps de rétention que CBZ).

Au temps de rétention t_R = 1,96 min, le spectre masse a montré un pic d'ion mono-isotopique protoné au *m/z* 192 (CBZ) et un fragment ionique caractéristique au *m/z* 160 (PDC_1). Ce fragment est attribué au pic moléculaire qui se forme après la perte du CH_3OH, donnant une fonction isocyanate (schéma V.10).

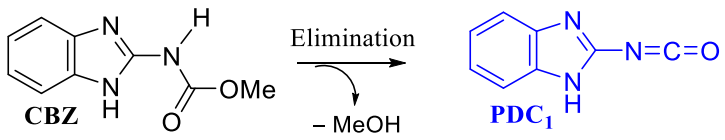


Schéma V. 10: *Mécanisme chimique de la formation de PDC_1.*

PDC_1 se forme probablement dans la source *electrospray* du spectromètre de masse, étant donné son temps de rétention identique à celui de la CBZ. L'analyse par EC-SM montre que PDC_1 et CBZ ont le même comportement en voltampérométrie massique. La figure V.19 montre que les voltammogrammes massiques des composés aux *m/z* 192 et 160 diminuent (autour de 0,85 V *vs* Pd/H_2) avec l'augmentation du potentiel à l'électrode de travail, confirmant ainsi leur présence avant l'électrolyse, mais aussi leur dégradation électrochimique. On peut également noter à la figure V.19 la faible conversion électrochimique de la CBZ (~30%). Cela pourrait donner des informations sur la persistance environnementale de la CBZ. Il est connu que la CBZ est un fongicide récalcitrant dans l'environnement en raison de son cycle benzimidazole qui résiste à la dégradation *(Singh et al., 2016)*. Les techniques EC-SM et EC-CL-SM pourraient alors être utilisées comme techniques de prédiction de la persistance des produits chimiques/polluants dans l'environnement, ce sur la base du potentiel d'oxydation/réduction, de la conversion électrochimique et même du temps d'électrolyse (potentiel d'oxydation/réduction élevé/faible, faible conversion électrochimique et temps d'électrolyse élevés pour les plus persistants).

.

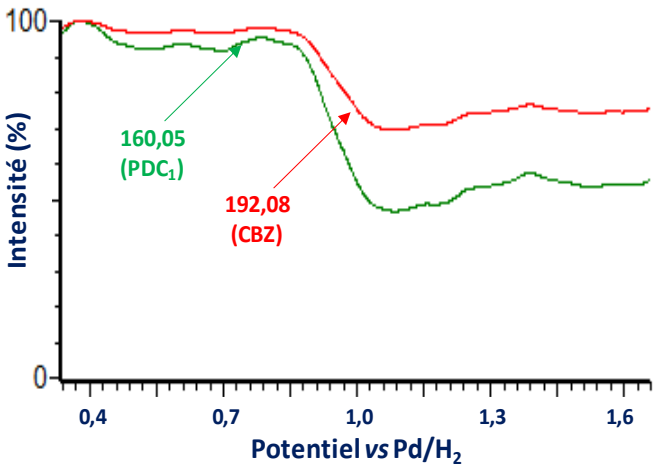


Figure V. 19: *Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_1 dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 20 mM. Le balayage de potentiel se fait de 0,0 V à 2 V vs Pd/H_2 à la vitesse de 2 $mV.s^{-1}$. L'électrode de travail est du carbone diamant dopé au bore (BDD).*

Les résultats obtenus montrent que la CBZ s'hydrolyse partiellement en milieu aqueux pour former du 2-AB (PDC_2). Son temps de rétention (t_R = 1,42 min) est différent de celui de la CBZ (t_R = 1,96 min), ce qui suggère que ce dernier ne se forme pas dans la source d'ionisation. La dégradation semble être déclenchée par une attaque initiale de la molécule d'eau au niveau de la liaison ester carbamique, pour ainsi libérer de l'hydrogénocarbonate de méthyle ($C_2H_4O_3$). L'injection d'un standard analytique de 2-AB et les données de SM^2HR (figure V.20a) ont confirmé la présence de PDC_2 en tant que produit de dégradation électrochimique de la CBZ.

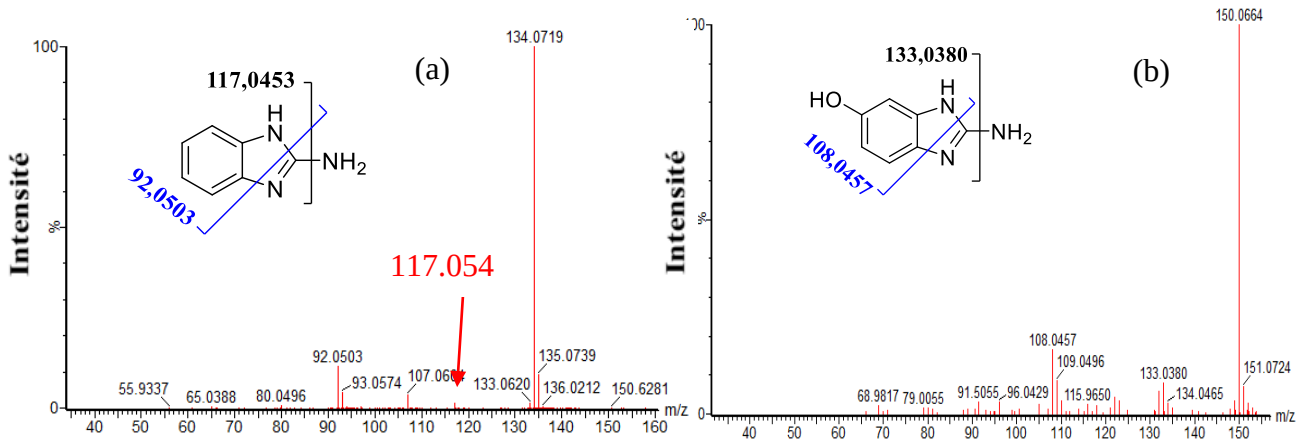


Figure V. 20: *(a) Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 134,07 correspondant au produit PDC_1 et (b) de l'ion observé au m/z 150,07 correspondant au produit d'oxydation PDC_2.*

Le produit de dégradation PDC_2 étant électroactif (figure V.21), son produit de dégradation électrochimique trouvé a été PDC_3 (composé résultant de l'hydroxylation aromatique du PDC_2, schéma V.11). L'obtention des données de SM^2HR (figure V.20b) et la composition élémentaire sur le pic mono isotopique permet d'attribuer PDC_3 à la forme hydroxylée de PDC_2.

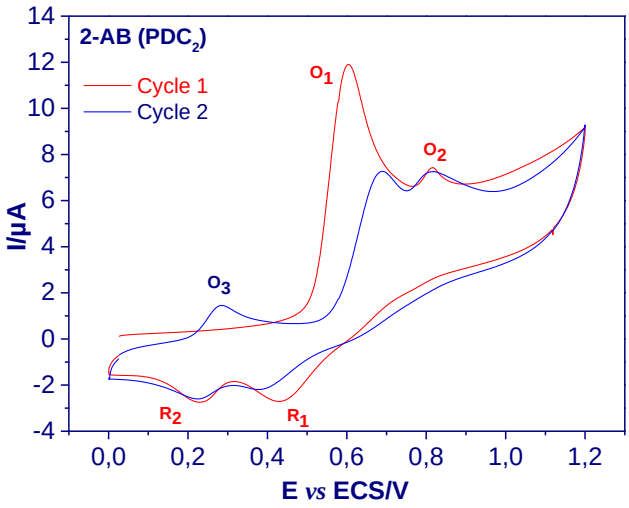


Figure V. 21: *Voltammogrammes cycliques de 1 mM de PDC_2 (2-AB) dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s.*

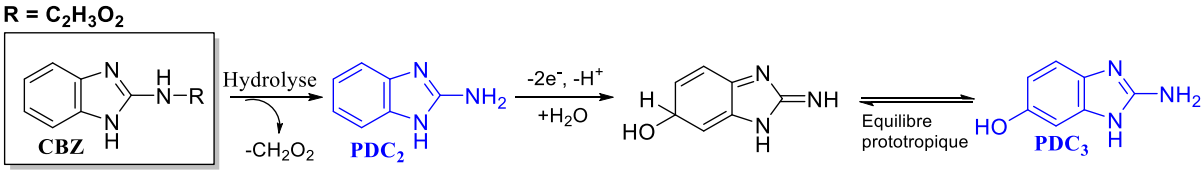


Schéma V. 11: *Mécanisme chimique de la formation de PDC_2 et son oxydation électrochimique pour former PDC_3.*

Bien que le comportement électrochimique de PDC_2 soit assez intéressant (figure V.21), nous ne nous sommes pas intéressés à l'étude de sa dégradation oxydative lors de ces travaux. Notre objectif étant principalement axé sur la recherche des produits de dégradation résultant directement de la molécule de CBZ, aussi nous pouvons ajouter la très faible utilisation (industrie, agriculture…etc.) du produit PDC_2.

V.3.2.2 Formation du composé PDC_6 : dimère

L'analyse de la solution de la CBZ par CL-SMHR après électrolyse a permis d'identifier environ cinq isomères correspondant au *m/z* 381. Ces dimères proviennent du couplage d'intermédiaires réactifs formés lors de la réaction d'oxydation de la CBZ. La

formation de dimères dépend de la présence de radicaux et de ce fait confirme que les réactions sont initiées par transfert d'un électron seul (*SET, Single Electron Transfer*). La détermination de la composition élémentaire et des données collectées à partir des spectres SM^2HR a permis d'identifier le dimère de type CBZ-CBZ. La voltampérométrie massique (figure V.22a) montre que le dimère CBZ-CBZ se forme à un potentiel plus faible que les autres PDC. Les radicaux formés à la surface de l'électrode diffusent immédiatement vers la solution pour se dimériser, ceci avec l'augmentation du potentiel d'oxydation. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'après déprotonation de la CBZ, le mécanisme EC2 est celui qui prédomine (le transfert d'électrons est suivi d'une réaction de second ordre). En accord avec les données SM^2HR (figure V.22b) et les travaux de la littérature *(Hernandez et al., 1996)* sur l'oxydation de la CBZ. Nous avons donc proposé la structure de la figure V.22b comme celle prédominante pour le dimère CBZ-CBZ.

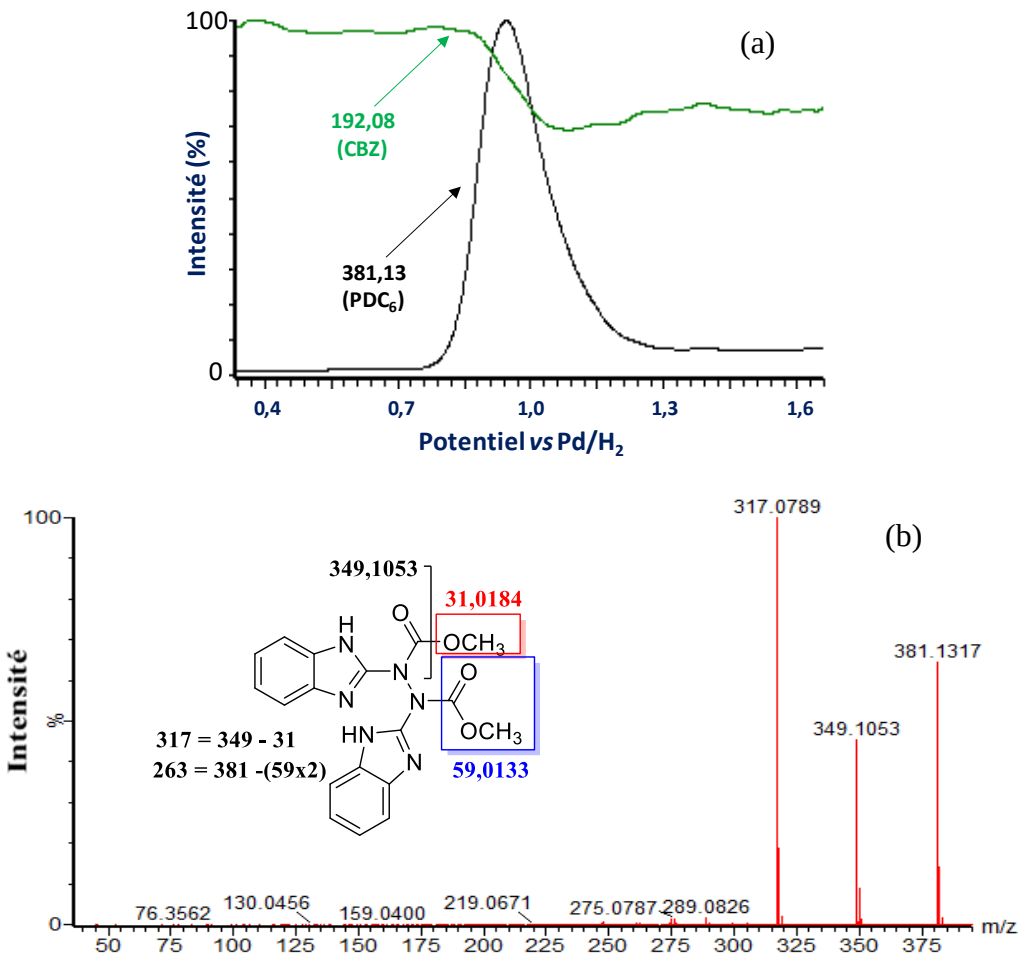


Figure V. 22: *(a) Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_6. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 381,13 correspondant au produit PDC_6.*

Dans l'optique de confirmer la structure du dimère CBZ-CBZ prédominant, des calculs *DFT* ont été effectués afin de localiser et de quantifier les principaux sites réactifs du radical CBZ déprotoné ($-e^-$, $-H^+$). La géométrie des espèces étudiées a été optimisée à partir de la structure de la CBZ cristallisé (code SEDZUW01 dans la "*Cambridge Structural Database*", version 5.40). En utilisant les densités d'électrons α et β, nous avons obtenu la densité de spin qui nous permet de localiser l'électron unique dans le radical CBZ déprotoné, comme indiqué à la figure V.23a. La probabilité de trouver l'électron célibataire est particulièrement élevée sur l'atome d'azote déprotoné (densité de spin atomique de 0,25e), et à un autre atome d'azote et deux Carbones aromatiques (densités de spin atomiques entre 0,21e et 0,24e). Par conséquent, l'atome d'azote déprotoné est particulièrement puissant pour les attaques radicalaires impliquées dans la formation des dimères, soutenant ainsi la structure proposée de la figure V.22b.

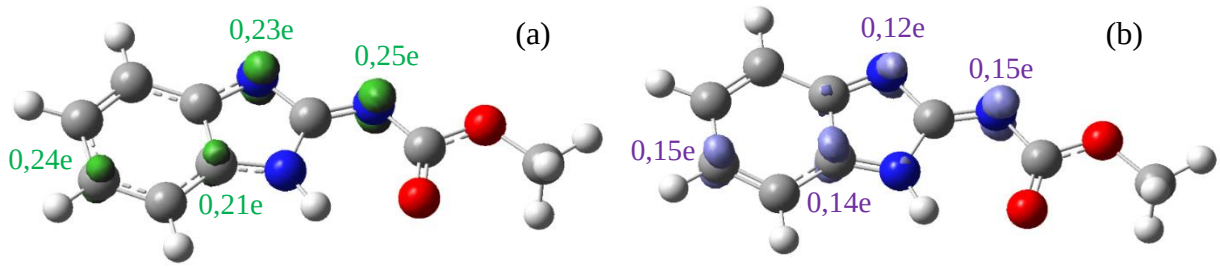


Figure V. 23: *(a) Densité de spin calculée du radical CBZ déprotoné ($-e^-$, $-H^+$) et (b) fonction f^+ de Fukui calculée pour le cation CBZ déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes vert (violet) sont plus sujets aux attaques radicalaires (respectivement nucléophiles), le site le plus important étant différencié par son indice calculé.*

V.3.2.3 Formation du composé PDC_4

Les réactions chimiques les plus importantes qui se produisent lors du métabolisme de la CBZ sont l'hydrolyse et l'hydroxylation. Dans cette étude, l'espèce chimique au *m/z* 208 (PDC_4) a été détectée comme un produit de dégradation oxydative de la CBZ. Le composé PDC_4 est formé par insertion d'un atome d'Oxygène. Sur la base du spectre de fragmentation SM^2HR (figure V.24) et conformément à la littérature *(Jia et al., 2003)*, PDC_4 a été attribuée à l'espèce hydroxylée aromatique.

Étant donné que l'objectif de ce travail était d'identifier les produits d'oxydation et de proposer un mécanisme plausible de dégradation électrochimique de la CBZ, des calculs *DFT* ont également été effectués afin de localiser et de quantifier les sites électrophiles. En utilisant les densités électroniques totales calculées sur le cation CBZ oxydé ($-2e^-$, $-H^+$), nous avons

obtenu la fonction f^+ de Fukui qui révèle quatre sites électrophiles principaux. Comme le montre la figure V.23b, la fonction f^+ de Fukui calculée pour le cation CBZ déprotoné révèle des électrophilicités notables pour deux Carbones aromatiques, le plus grand indice condensé en atome (0,15e) étant pour celui portant un atome d'Hydrogène. De plus, il est plus aisé de fixer le groupe hydroxyle sur ce Carbone aromatique car il sera facile de récupérer l'aromaticité de la molécule lors de cette fixation. Par conséquent, les calculs *DFT* soutiennent l'hydroxylation notable au niveau de cet atome de Carbone aromatique, selon le mécanisme de formation du composé hydroxylé proposé au schéma V.12.

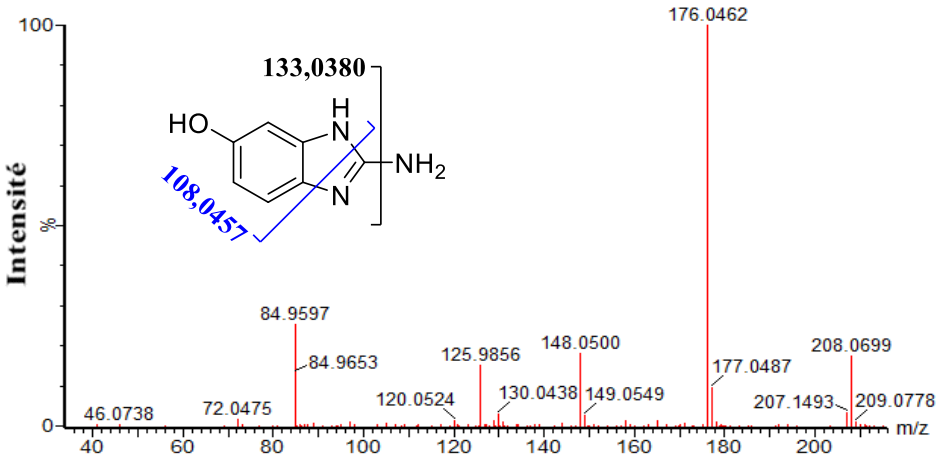


Figure V. 24: *Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 208,07 correspondant au produit d'oxydation PDC_4.*

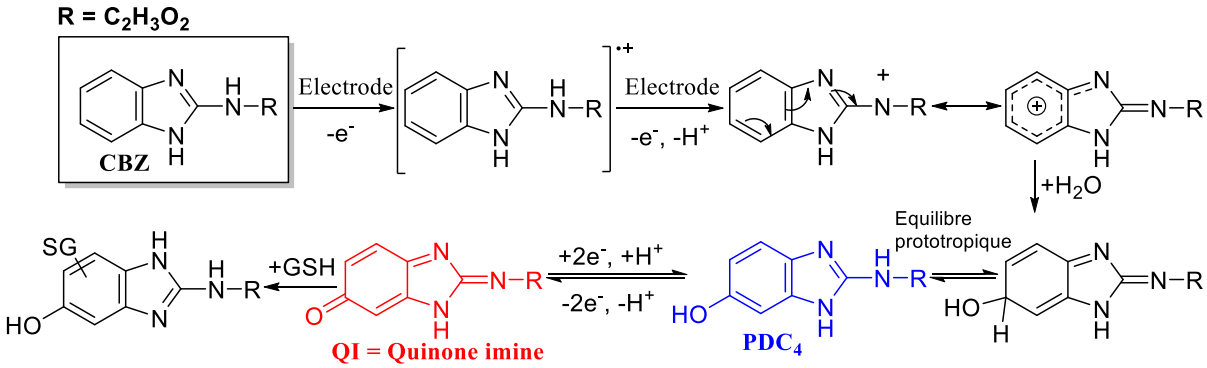


Schéma V. 12: *Mécanisme électrochimique de formation de PDC_4 et de la quinone imine (QI).*

Le comportement en voltampérométrie massique (figure V.25a) de PDC_4 fournit des informations utiles sur le mécanisme d'oxydation électrochimique de la CBZ. En effet, la présence de fonction phénol dans la structure de ce composé engendre un deuxième processus

d'oxydation, ce qui peut conduire éventuellement à la formation d'un intermédiaire réactif. Afin d'obtenir des informations complémentaires sur le schéma d'oxydation électrochimique, la voltampérométrie cyclique (figure V.25b), la voltampérométrie massique (figure V.27a) et l'électrolyse potentielle contrôlée (t = 2 h et t = 4 h si nécessaire) de la CBZ ont été réalisée en présence du glutathion. Un temps d'électrolyse élevé n'est pas nécessaire car l'idée est juste de piéger les espèces intermédiaires réactives lors de la dégradation électrochimique de la CBZ.

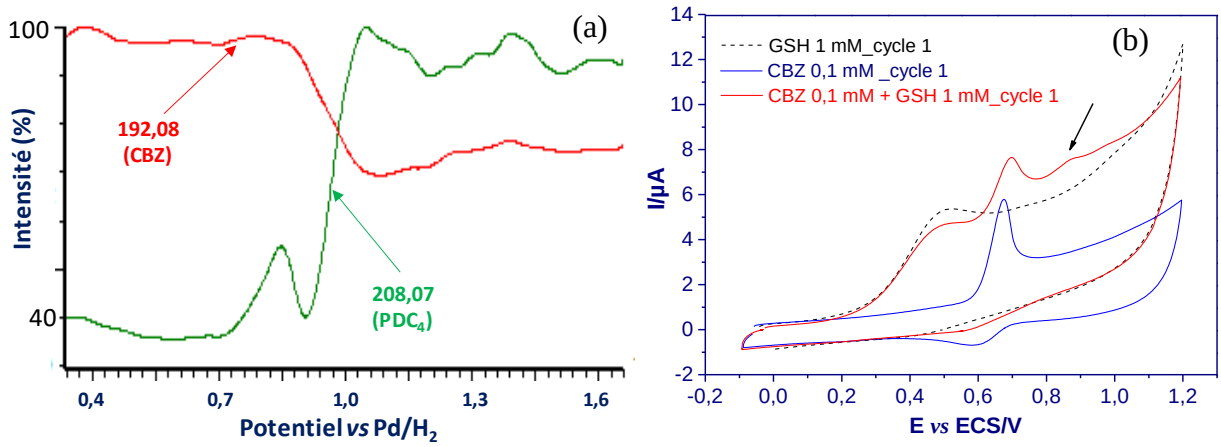


Figure V. 25: *(a) Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_4. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Voltampérogrammes cycliques de la CBZ à 0,1 mM, en absence et en présence d'un excès de GSH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure V.1. La flèche montre le pic anodique de l'adduit au GSH.*

Comme on peut le constater à la figure V.25a, le voltampérogramme massique du composé au *m/z* 192 associé au pic mono-isotopique de la CBZ diminue de manière significative (autour de 0,85 V *vs* Pd/H_2) avec l'augmentation du potentiel à l'électrode de travail, confirmant ainsi son oxydation électrochimique. L'apparition du produit d'oxydation PDC_4 en corrélation avec la baisse de l'intensité du signal de la CBZ suggère une corrélation entre sa formation et l'oxydation de cette dernière. Toutefois, nous n'avons pas pu déterminer avec exactitude la nature du pic qui se forme autour de 0,75 V. Ce pic peut être attribué à la formation d'un intermédiaire réactif, ou encore il est tout simplement un artefact dû à la manipulation, probablement un dysfonctionnement spontané du pousse-seringue utilisé.

En présence de GSH (figure V.25b), les pics de réduction R_1 et R_2 précédemment observés à la figure V.18 disparaissent progressivement avec l'augmentation de la concentration du GSH. Ces pics disparaissent presque complètement en présence d'un excès de GSH (concentration du GSH dix fois celle de la CBZ). Il apparaît donc qu'en présence d'un excès de GSH, l'hydroxylation est très faiblement observé, ce qui est en accord avec les

interprétations EC-CL-SM. Sur la base de ces résultats, l'apparition du couple redox O_2/R_2 (figure V.18) peut être attribuée au dérivé de la CBZ hydroxylée et oxydée en structure quinone imine (schéma V.12), le groupe hydroxyle étant situé préférentiellement sur le cycle, ce qui faciliterait la formation de la structure quinone imine après ré-aromatisation. L'analyse de la composition élémentaire montre une excellente concordance entre la masse expérimentale et la masse théorique du composé conjugué (Δm = 1,6 ppm ; $C_{19}H_{25}N_6O_9S$). La figure V.26 montre le spectre SM^2HR obtenu après la dissociation de l'ion au *m/z* 513,14 $[M+H]^+$, induit par collision au cours de l'expérience, ainsi que l'attribution des différents fragments observés qui confirment la structure de la quinone imine. Ces informations confirment que le GSH piège rapidement les espèces de CBZ oxydées en solution, donnant des formes conjuguées, qui sont potentiellement oxydables à des potentiels plus positifs que ce dernier, probablement les ions nitrenium.

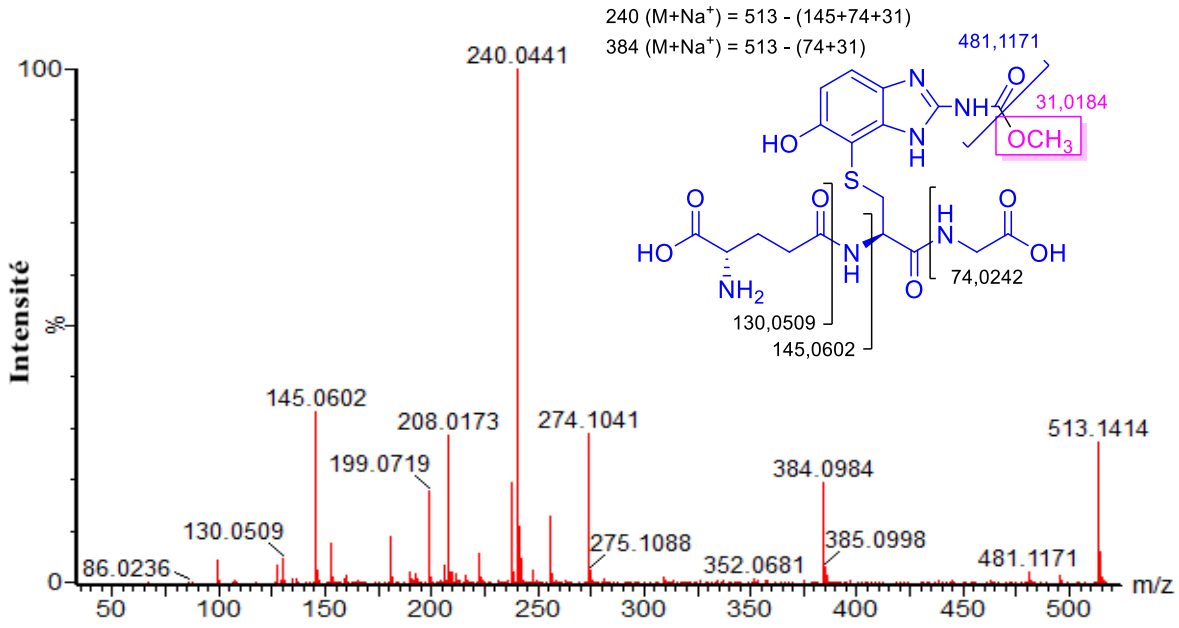


Figure V. 26: *Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 513,1414 $[M+H]^+$ correspondant à l'adduit au GSH de la quinone imine (QI).*

La figure V.26 montre des pertes de molécules neutres de γ-glu-ala-gly (-274), de glycine (-75), de glutamine (-145) et d'acide pyroglutamique (-130). Ces pertes sont caractéristiques des fragmentations SMSM des adduits au glutathion en mode d'ionisation positive *(Levsen et al., 2005 ; Ma et al., 2006)*.

Fait intéressant, lors de l'augmentation de la concentration en GSH, un nouveau pic qui est marqué par une flèche à la figure V.25b apparaît à un potentiel plus positif que O_1

(0,86 V *vs* ECS). Ce pic correspondrait probablement à l'oxydation d'un adduit thiolé de la CBZ identifié par EC-SM en ligne. O_1/R_1 (figure V.18) pourrait alors être attribuée à l'oxydation quasi-réversible de la CBZ pour donner un cation nitrenium (Δm = -1,6 ppm ; $C_{19}H_{25}N_6O_8S$). La figure V.27 ci-dessous montre les voltammogrammes massiques des ions aux *m/z* 513,14 et 497,14 $[M+H]^+$, ainsi que les spectres de masse haute résolution enregistrés à différents temps (7,5 min pour 0,7 V et 11,80 min pour 1,1 V).

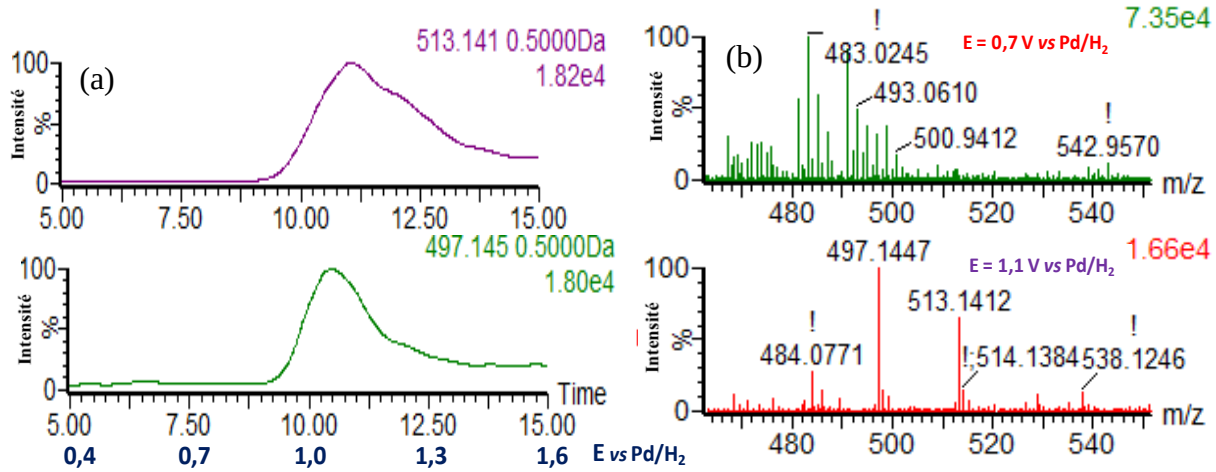


Figure V. 27: *(a) Voltampérogrammes massiques 2D correspondants aux ions aux m/z 513,14 et 497,14 $[M+H]^+$. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Spectres SMHR enregistrés à différents potentiels d'oxydations (0,7 V et 1,1 V).*

Comme observé à la figure V.27a, lorsque le potentiel augmente, on note l'apparition de deux nouveaux signaux aux *m/z* 513,14 et 497,14 $[M+H]^+$. Ces signaux sont absents lorsque l'expérience est réalisée en l'absence de GSH. Cette observation confirme la formation des produits de conjugaison associés aux structures de quinone imine (schéma V.12) et de cation nitrenium (schéma V.13). Une observation similaire a été faite par Van Leeuven et coauteurs *(Van Leeuven et al., 2005)* lors de leur étude sur la prédiction du métabolisme de la clozapine par couplage EC-SM en ligne. Ainsi pour confirmer davantage la présence de l'ion nitrenium au cours de ce travail, une électrolyse à potentiel contrôlé de la CBZ a été réalisée en présence du GSH à un potentiel fixé à 0,75 V *vs* ECS. La figure V.28 montre le spectre SM^2HR obtenu après la dissociation de l'ion au *m/z* 497,14 $[M+H]^+$, induite par collisions au cours de l'expérience, ainsi que l'attribution des différents fragments observés qui confirment la structure de l'adduit au GSH de l'ion nitrenium. Il convient de noter que cet adduit n'a pas été observé lorsque l'électrolyse a été effectuée au-dessus de 0,85 V *vs* ECS. On peut donc conclure que l'électrolyse à potentiel élevé conduirait à la dégradation du cation nitrenium,

conformément à la figure V.25b.

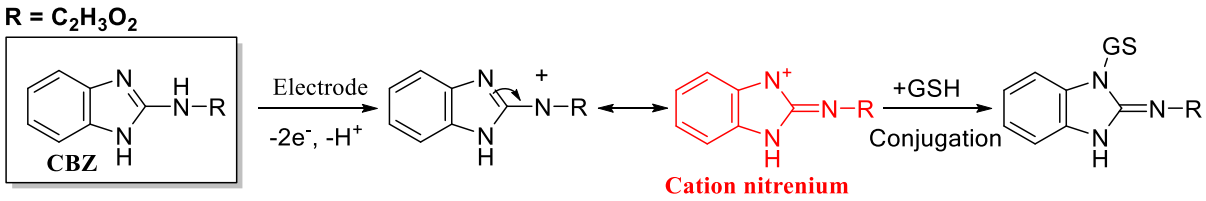


Schéma V. 13: *Mécanisme électrochimique de la formation du cation nitrenium et de l'adduit au GSH.*

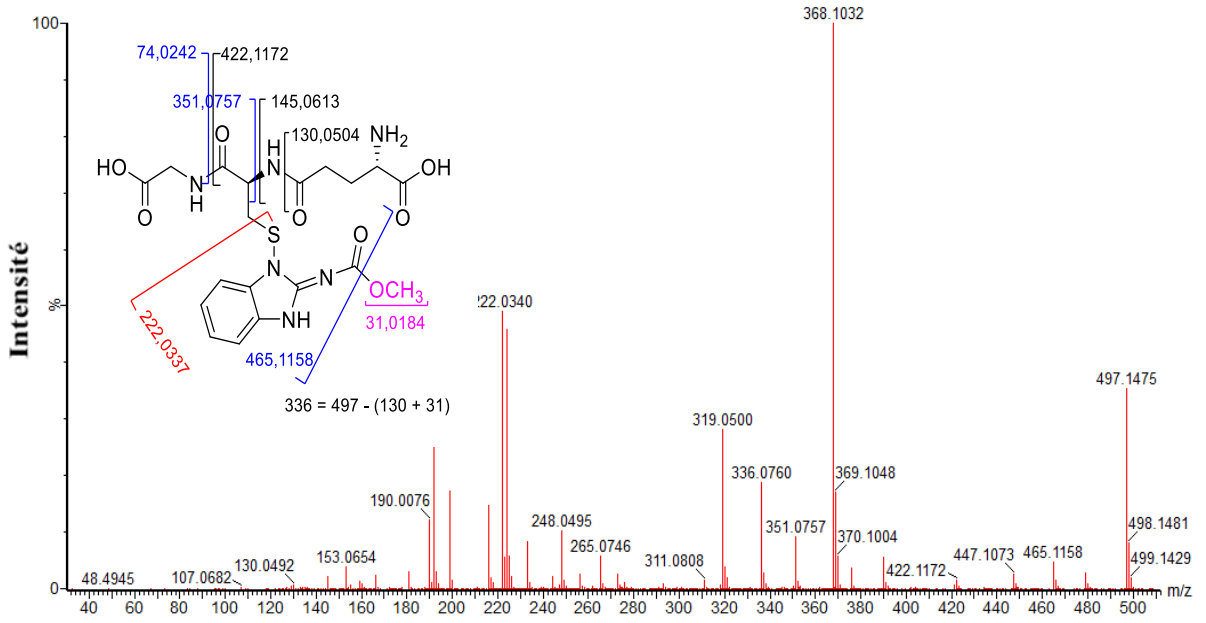


Figure V. 28: *Spectre de fragmentation SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 497,1475 $[M+H]^+$ correspondant à l'adduit au GSH du cation nitrenium.*

La formation du cation nitrenium a été confirmée par les calculs *DFT* sur le cation de CBZ oxydé ($-2e^-$, $-H^+$), car la fonction f^+ de Fukui précédemment calculée révèle des électrophilicités notables pour deux atomes d'azote (figure V.23b). Les indices condensés en atomes sont de 0,15e pour celui du groupe carbamate et de 0,12e pour celui du cycle benzimidazole. Nous avons choisi de former l'adduit à partir de l'azote situé sur le cycle, mais la possibilité de se former à partir de l'atome d'azote du groupe carbamate n'est pas exclue.

Toutes les informations ci-dessus confirment que le GSH piège rapidement les espèces de CBZ oxydées en solution, résultant en des formes conjuguées. La formation de quinone imine et d'ion nitrenium lors de l'oxydation électrochimique de la CBZ met en évidence la réactivité de ses produits de dégradation et la possibilité d'une toxicité *in vivo*. En effet, les quinones, les quinones imines, l'ion nitrenium, les époxydes, les oxydes d'arène et les

halogénures d'alkyle sont connus pour leur forte interaction avec des biomolécules telles que l'ADN ou les protéines *(Enoch et al., 2010, 2011)*.

V.3.2.4 Formation du composé PDC_5

PDC_5 a montré un pic d'ion moléculaire au *m/z* 118 $[M+H]^+$, un fragment de pic au *m/z* 86 (qui correspond à la perte du fragment $-OCH_3$) et un autre au *m/z* 101 (qui correspond à la perte du fragment $–NH_2$). Le temps de rétention court (0,42 min) est compatible avec la polarité de ce produit et les fragments de pics aux *m/z* 86 et 101 sont en accord avec la structure envisagée. Le spectre SM^2HR de PDC_5 est donné dans la figure V.29. Abdou et coauteurs *(Abdou et al., 1985)* ont proposé un mécanisme avec les espèces radicalaires ou bi-radicalaires issues du clivage du cycle benzimidazole, générant une molécule de benzène. La possibilité de formation de PDC_5 par l'hydrolyse de la quinone imine n'est pas exclue, à condition que l'oxydation ultérieure ait lieu.

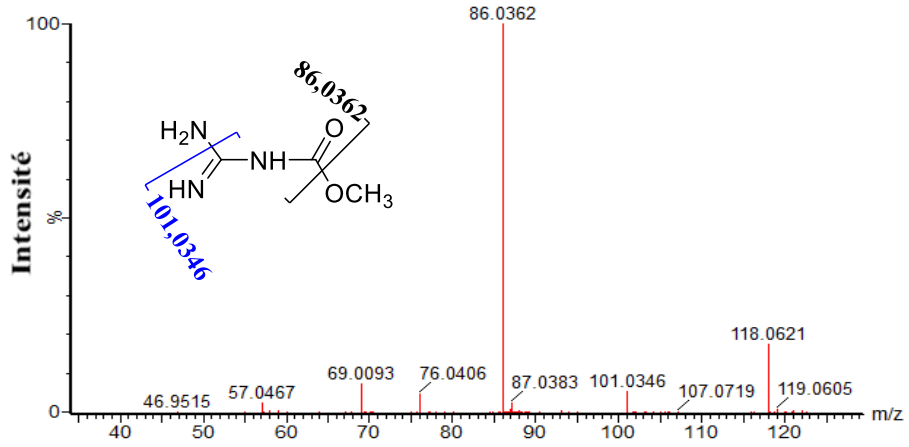


Figure V. 29: *Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 118,06 correspondant au produit d'oxydation PDC_5.*

V.3.2 Dégradation électrochimique *vs* dégradation environnementale de la CBZ

L'utilisation intensive en agriculture et en foresterie facilitent l'entrée de la CBZ dans les systèmes aquatiques, les sols et les aliments. La CBZ peut être transformée en métabolites ou même être complètement minéralisée grâce à une gamme de processus abiotiques (photolytiques, Fenton) *(Abdou et al., 1985 ; Panadés et al., 2000 ; Mazellier et al., 2002 ; Boudina et al., 2003 ; Yang et al., 2017 ; Da Costa et al., 2019)* et biotiques (microbiens, bactériens, fongiques… etc.) *(Jia et al., 2003 ; Jing-Liang et al., 2006 ; Singh et al., 2016 ; Wang et al., 2010 ; Bai et al., 2017 ; Lei et al., 2017)*. Les analyses par couplages EC-CL-SM et EC-SM ont permis de mettre en évidence la formation de produits de dégradation de la

CBZ. Certains sont communs à ceux observés lors de la dégradation de l'environnement, et d'autres ont été récemment observés lors de ces travaux. La figure V.30 montre les principaux produits de transformation obtenus lors des dégradations de la CBZ. La quinone imine et l'ion nitrenium ont été observés pour la première fois dans cette étude.

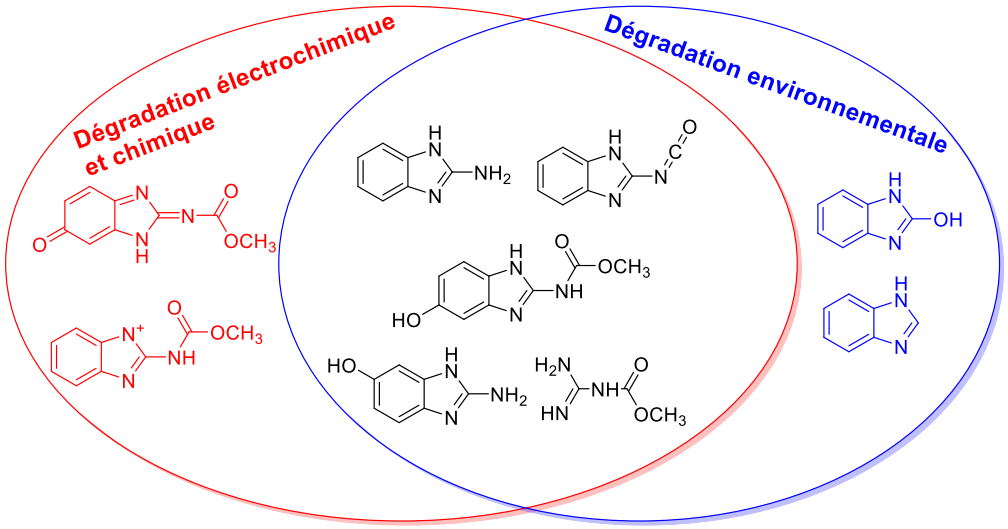


Figure V. 30: *Comparaison entre la dégradation électrochimique, chimique et environnementale de la CBZ.*

V.3.3 Voies de dégradation proposées pour la CBZ

L'électrochimie en combinaison avec des techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse a permis au cours de cette étude de proposer un mécanisme de dégradation du fongicide CBZ. Le schéma V.14 illustre ce mécanisme.

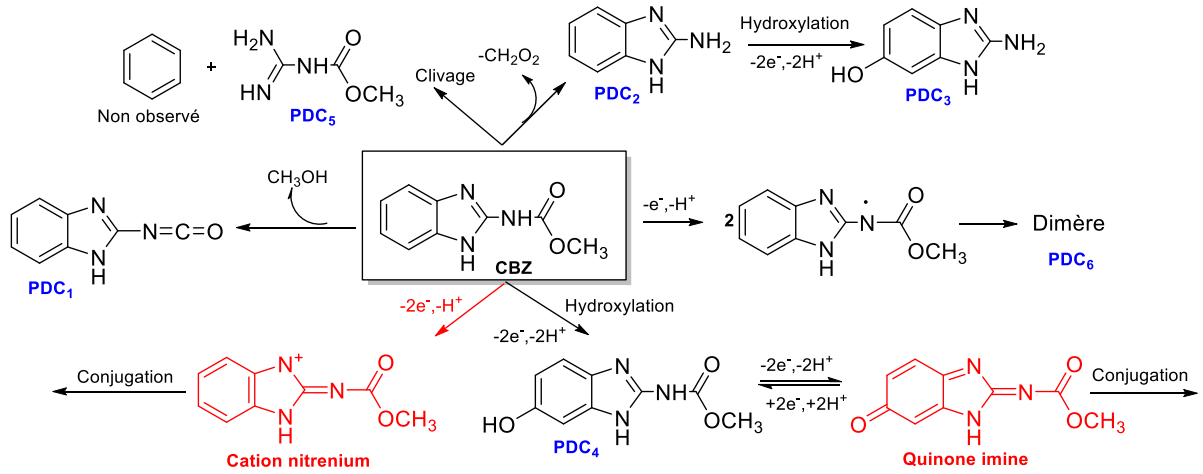


Schéma V. 14: *Mécanisme de dégradation chimique et électrochimique de la CBZ.*

Conclusion partielle

Grâce à l'association EC-SM en ligne et EC-CL-SM hors ligne, nous avons simulé la dégradation environnementale du fongicide CBZ. La génération et l'identification des principaux métabolites des phases I et II a illustré un certain mimétisme avec les microsomes hépatiques, et de ce fait a permis de confirmer de nombreuses données issues de la littérature concernant la dégradation environnementale de la CBZ. Les réactions chimiques les plus importantes qui se produisent lors du métabolisme de la CBZ sont l'hydrolyse et l'hydroxylation. Lors du couplage direct EC-SM en présence du GSH, le spectre de masse montre un pic correspondant à un intermédiaire à courte demi-vie qui est particulièrement difficile à mettre en évidence : le cation nitrenium. Cette espèce très réactive vis-à-vis des fonctions thiol des petites molécules et protéines, est très régulièrement tenue pour responsable principale de la toxicité de diverses molécules. La voltampérométrie cyclique effectuée sur la CBZ en présence de glutathion suggère la formation distincte du cation nitrenium et d'une nouvelle espèce facilement électro-réduite, à savoir une structure quinone imine. L'ajout du GSH entraîne la disparition des pics de réduction de la CBZ. Ce comportement en voltampérométrie cyclique corrobore les interprétations résultant des mesures par couplage EC-CL-SM.

Conclusion générale

Le présent travail était focalisé sur la mise en exergue de l'efficience de la mise en œuvre des techniques hybrides associant l'électrochimie (EC) aux performances analytiques de la chromatographie liquide (CL) et/ou de la spectrométrie de masse (SM) (couplages EC-CL-SM et EC-SM). Notre champ d'investigation s'est plus spécifiquement focalisé sur deux familles de pesticides, celle des herbicides phénylurées (Diuron, DIU et dérivés de la même famille) et celle des fongicides carbamates (carbendazime, CBZ). Les informations fournies par ces couplages, jointes aux résultats des mesures par voltampérométrie cyclique sur électrodes solides, ainsi que ceux des calculs théoriques *DFT*, ont permis une bonne compréhension mécanistique du devenir oxydatif de substances agrochimiques étudiées.

La première partie a permis de mettre en avant les capacités du couplage entre l'électrochimie et la spectrométrie de masse pour élucider le mécanisme de dégradation par voie électrochimique du diuron (DIU). Dans un premier temps, la voltampérométrie cyclique du DIU à mis en avant le caractère électroactif de cet herbicide et a permis d'identifier les différents pics d'oxydation et de réduction. Par la suite, la génération par voie électrochimique de ces produits d'oxydation à partir d'une matrice simple (solvant et électrolyte support) a facilité l'élucidation structurale par CL-SMHR et CL-SM^2HR. Les mécanismes d'oxydation intéressants du DIU ont été la déchlorination hydrolytique (substitution -Cl/-OH), la déhydrochlorination et l'hydroxylation aromatique. Les réactions de dimérisation et d'hydrolyse chimique ont été également mimées. Les quinones immines distinctement déterminées sont des espèces hautement réactives vis-à-vis des réactifs nucléophiles. Leurs formations suggèrent des voies d'explication de la toxicité connue du diuron. Cette étude a donc permis de faire un pas supplémentaire vers la capacité de simulation de l'outil électrochimique.

Une étude générale sur les herbicides de la famille des phénylurées a été faite dans la deuxième partie. En plus du diuron, sept autres herbicides (fénuron, monuron, isoproturon, chlortoluron, métoxuron, monolinuron, linuron) ont fait l'objet d'études pour la simulation des dégradations environnementales. Le couplage entre une cellule électrochimique, un chromatogramme et un spectromètre de masse (EC-LC-SM) a permis la préparation, la séparation, la détection, l'identification et l'observation en fonction du temps des produits de dégradation formés à l'électrode de travail. De plus les calculs théoriques à travers la méthode *DFT* ont permis d'identifier et quantifier les différents sites d'attaques nucléophiles de chaque

molécule herbicide, facilitant ainsi l'élucidation structurale des produits d'oxydation. À l'issue de cette étude, quatre mécanismes principaux de dégradation électrochimique ont pu être identifiés. Il s'agit entre autres des réactions de substitutions (-Cl/+OH ; -C_3H_7/+OH ; -CH_3/+OH ; -OCH_3/+OH), de déhydrochlorination / déhydrométhylation / déhydrométhoxylation, de déshydrogénation et d'hydroxylation aromatique. À noter que toutes ces réactions se sont déroulées au niveau de cycle aromatique.

En dernier point, les couplages EC-CL-SM et EC-SM ont permis d'élucider cette fois ci le comportement redox de la carbendazime (CBZ), un fongicide. La voltampérométrie cyclique d'un échantillon de CBZ à mis en avant son caractère électroactif. Après électrolyse à potentiel contrôlé, les analyses CL-SMHR et CL-SM^2HR ont permis d'identifier six entités issues de l'oxydation électrochimique de la CBZ, à savoir l'isocyanate de benzimidazole, le 2-aminobenzimidazole, l'hydroxy-2-aminobenzimidazole, l'hydroxycarbendazime, la monocarbométhoxyguanidine et environ cinq isomères du dimère majoritaire. Dans l'optique de confirmer l'aspect mécanistique de l'oxydation électrochimique de la CBZ, le couplage direct EC-SM a été utilisé. Ce couplage a permis d'observer en ligne l'influence du potentiel appliqué à l'électrode de travail sur les différentes espèces. De plus, ceci a rendu possible l'observation d'espèces réactives à très courte durée de vie (quinone imine et ion nitrenium). Les performances des couplages EC-CL-SM et EC-SM pour élucider à la fois les structures et les mécanismes mis en œuvre lors de l'oxydation électrochimique de la CBZ ont donc été démontrées. L'outil électrochimique a également démontré son intérêt pour simuler le devenir environnemental de ce fongicide. En effet, l'observation de nombreux métabolites communs aux différentes voies en est le parfait exemple.

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude ont démontré que l'oxydation électrochimique couplée aux méthodes analytiques (CL et SM) et théoriques (*DFT*), est capable de révéler les groupements réactifs dans les molécules biologiquement actives, et de fournir des informations précieuses sur les intermédiaires formés lors de la transformation métabolique. La qualité, la reproductibilité et la similarité avec les dégradations environnementales des résultats générés par EC-CL-SM suggèrent que cette technique est un outil de prédiction/simulation à fort potentiel. Au-delà de l'élucidation de l'oxydation électrochimique de ces pesticides, ce travail ouvre la voie à l'étude des mécanismes d'oxydation d'autres composés structurellement apparentés et d'autres composés bioactifs. La méthode présentée pourrait également s'étendre à la synthèse des normes de produits de transformation et comme référence pour l'étude de ces pesticides, ainsi que les résidus de

leurs produits de transformation dans des échantillons réels. Elle pourra également permettre la synthèse d'espèces intermédiaires en quantité suffisante, notamment pour la réalisation d'analyses structurales ou encore les tests pharmacologiques et/ou toxicologiques. Cette étude a donc démontré que les techniques électrochimiques couplées à la spectrométrie de masse fournissent des informations essentielles dans l'identification des métabolites contaminants tout en découvrant de nouvelles approches d'analyse quantitative en produisant un étalon par électrosynthèse.

Au terme de ce travail, nous espérons avoir illustré, par l'étude de quelques pesticides modèles, l'intérêt de la mise en œuvre des techniques électrochimiques couplées à la chromatographie liquide et à la spectrométrie de masse pour la simulation des dégradations environnementales des pesticides. Des améliorations au niveau de la cellule électrochimique sont envisageables par l'emploi d'électrodes modifiées (par porphyrines, les enzymes, microorganismes), elles laissent entrevoir la possibilité de mimer totalement le système CYP450 et le système microbien. Les résultats fournis par ces techniques hybrides, par voltampérométrie cyclique et par calculs théoriques *DFT* sont complémentaires, ils procurent un éventail d'informations d'une utilité estimable pour une application dans des études prédictives précoces de candidats pesticides.

Annexes

Spectres SM^2HR (Spectrométrie de Masse tandem Haute Résolution) des herbicides phénylurées (FENU, MONU, DIU, ISO, CHLORTO, METOX, MONO et LINU).

1- FENU

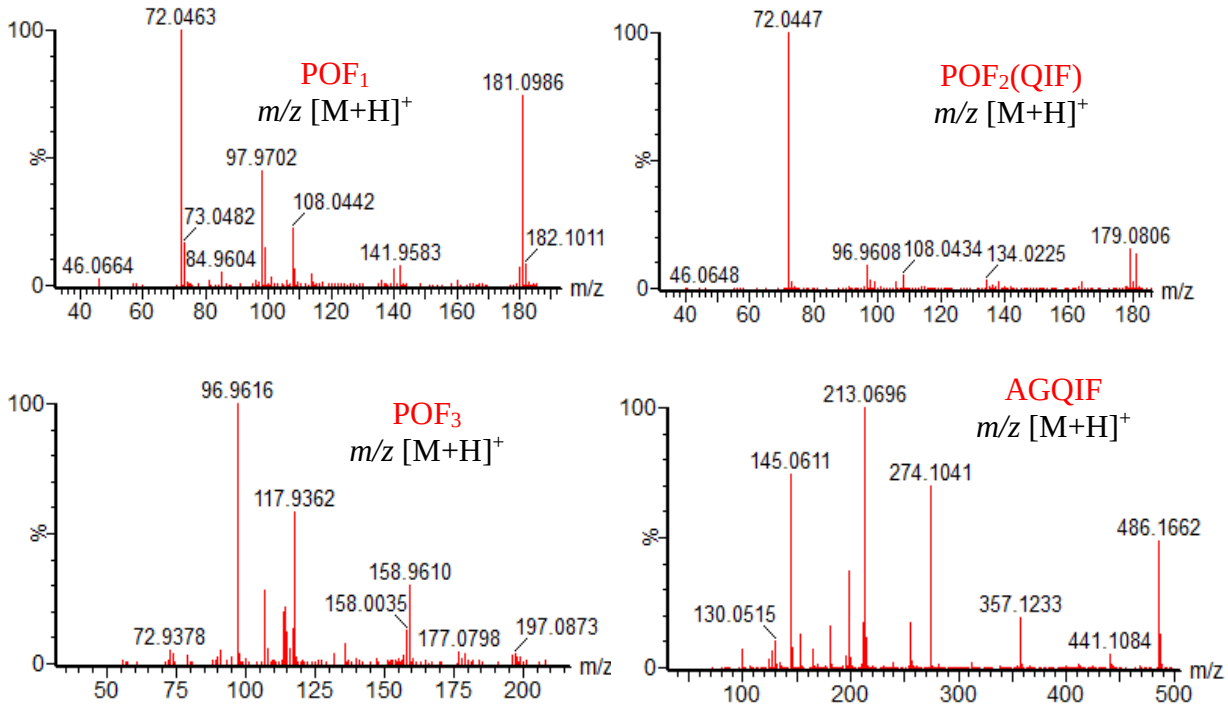


Figure A-1. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 181,09; 179,08; 197,09 et 486,17 correspondant aux produits d'oxydation POF_1, POF_2, POF_3 and AGQIF.

2- MONU

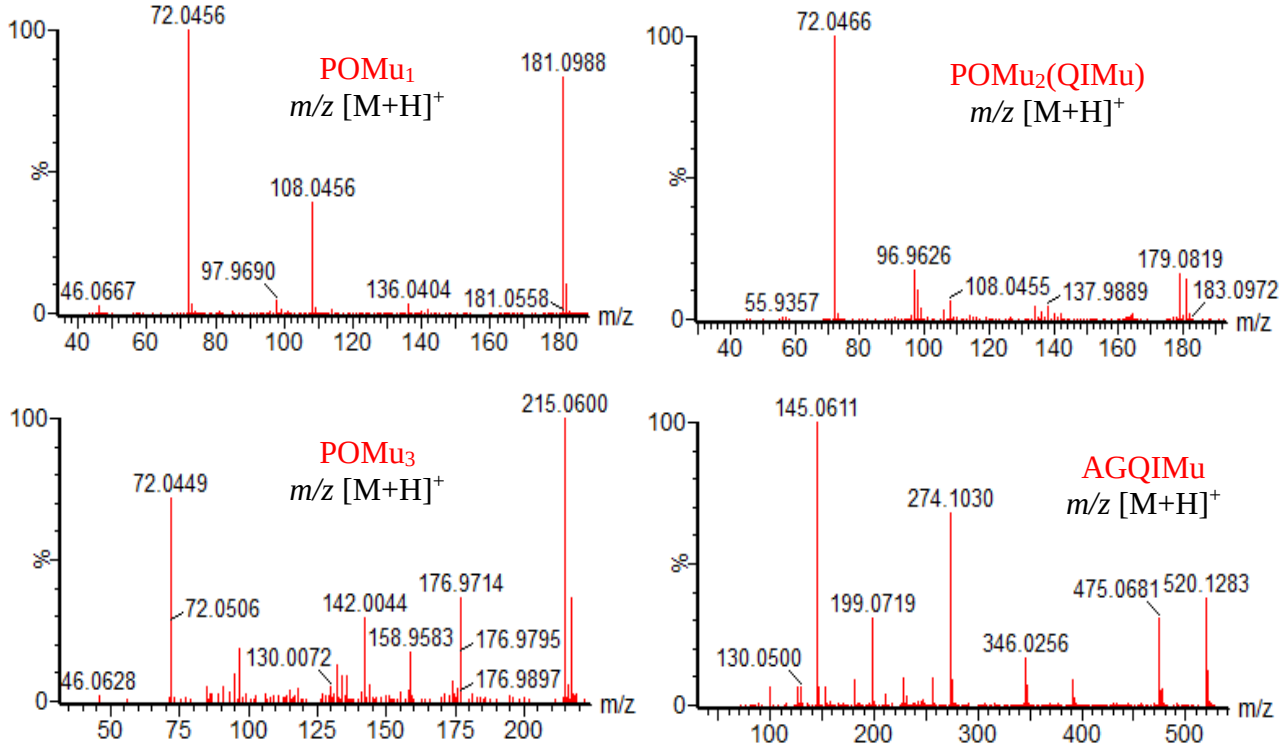


Figure A-2. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 181,09; 179,08; 215,05 et 520.12 correspondant aux produits d'oxydation $POMu_1$, $POMu_2$, $POMu_3$ and AGQIMu.

3- DIU

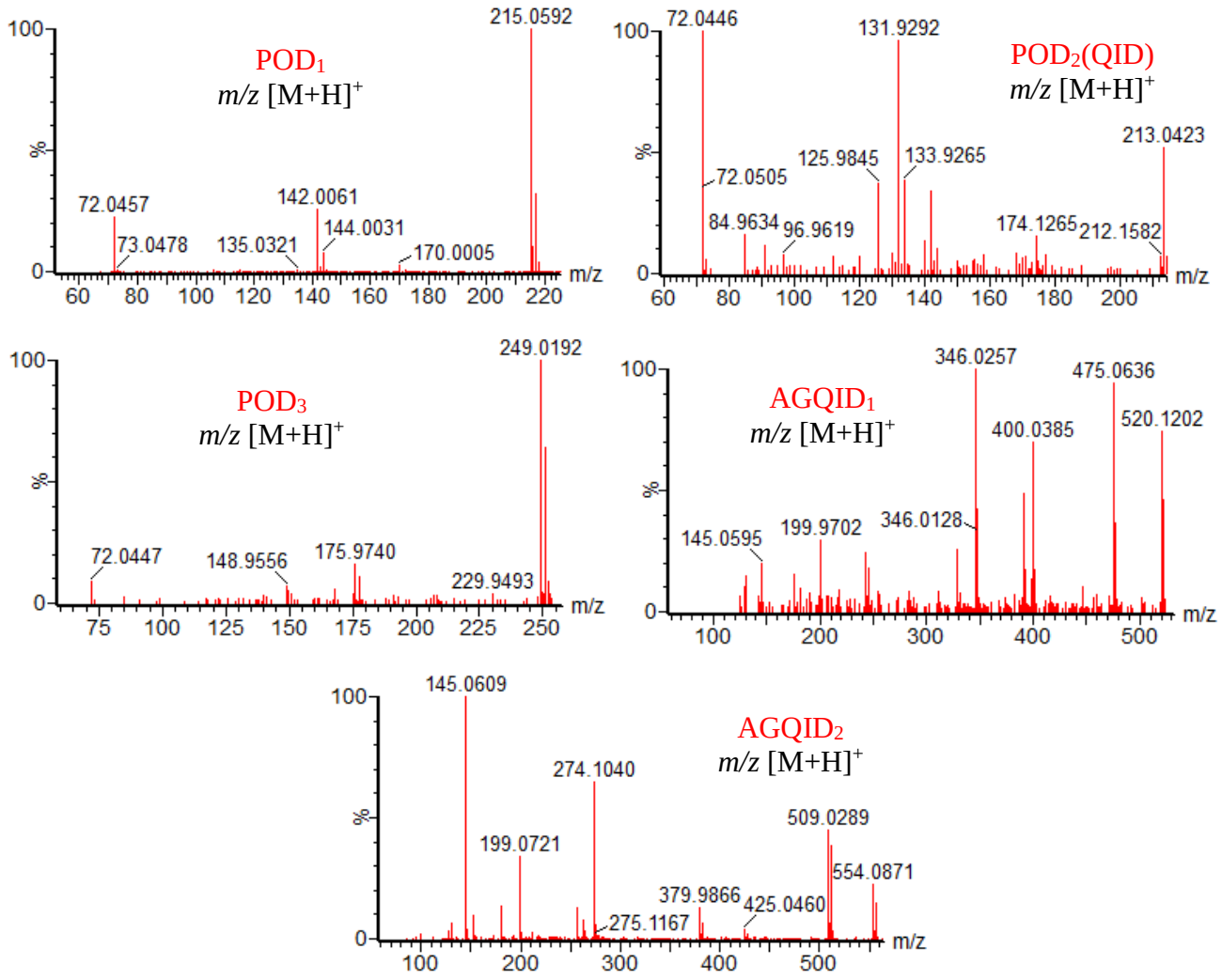


Figure A-3. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 215,06; 213,04; 249,02; 520,12 et 554.09 correspondant aux produits d'oxydation POD_1, POD_2, POD_3 and $AGQID_1$ and $AGQID_2$

.

4- ISO

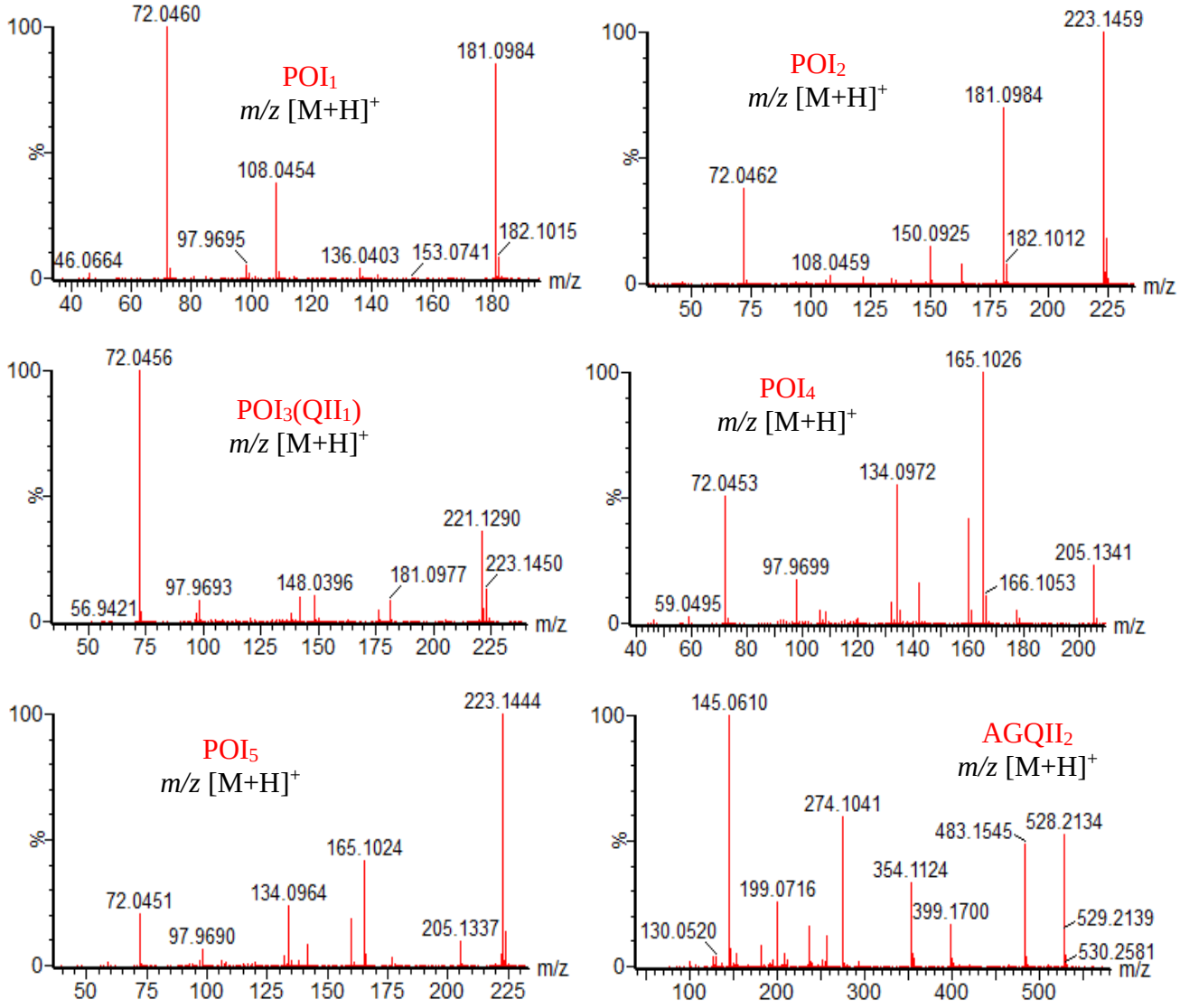


Figure A-4. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 181,09; 223,14; 221,12; 205,13 et 528,21 correspondant aux produits d'oxydation POI_1, POI_2, POI_3, POI_4, POI_5 et $AGQII_2$

5- CHLORTO

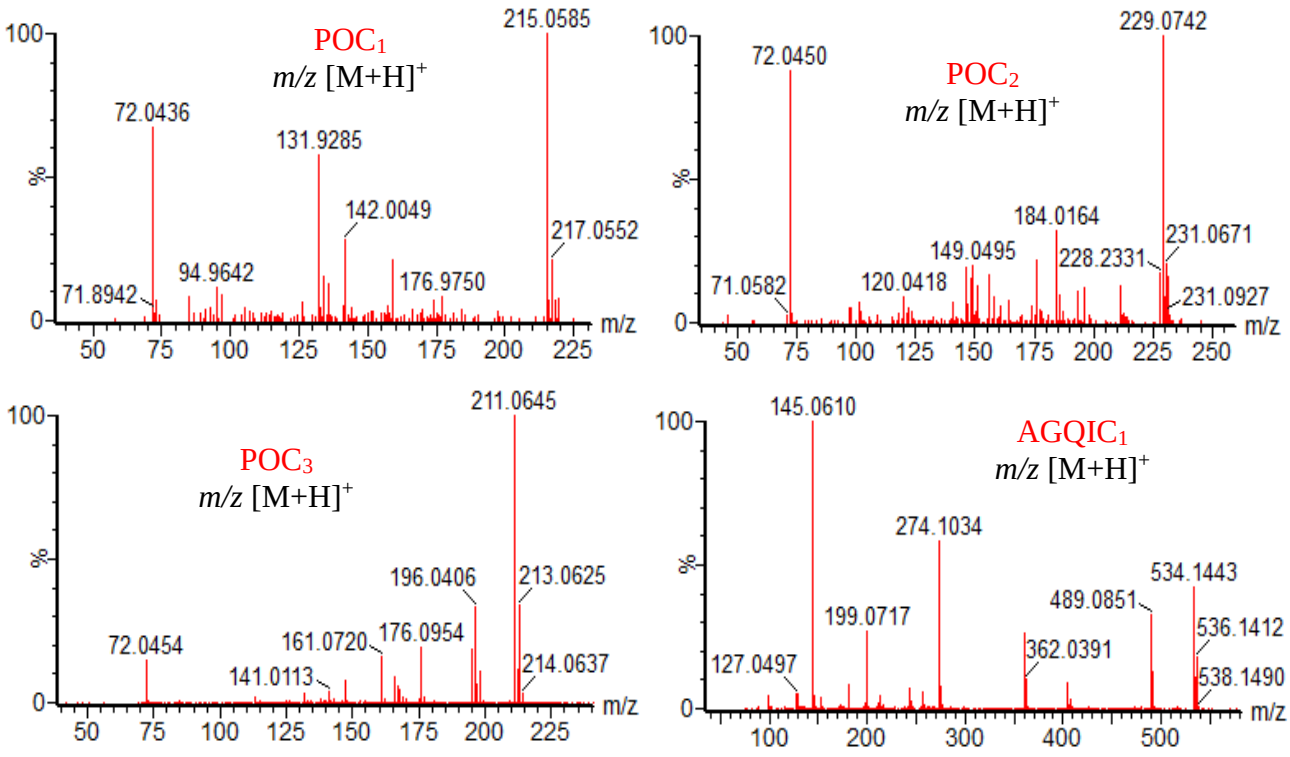


Figure A-5. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 215,06; 229,07; 211,06 et 534,14 correspondant aux produits d'oxydation POC_1, POC_2, POC_3 et $AGQIC_1$

6- METOX

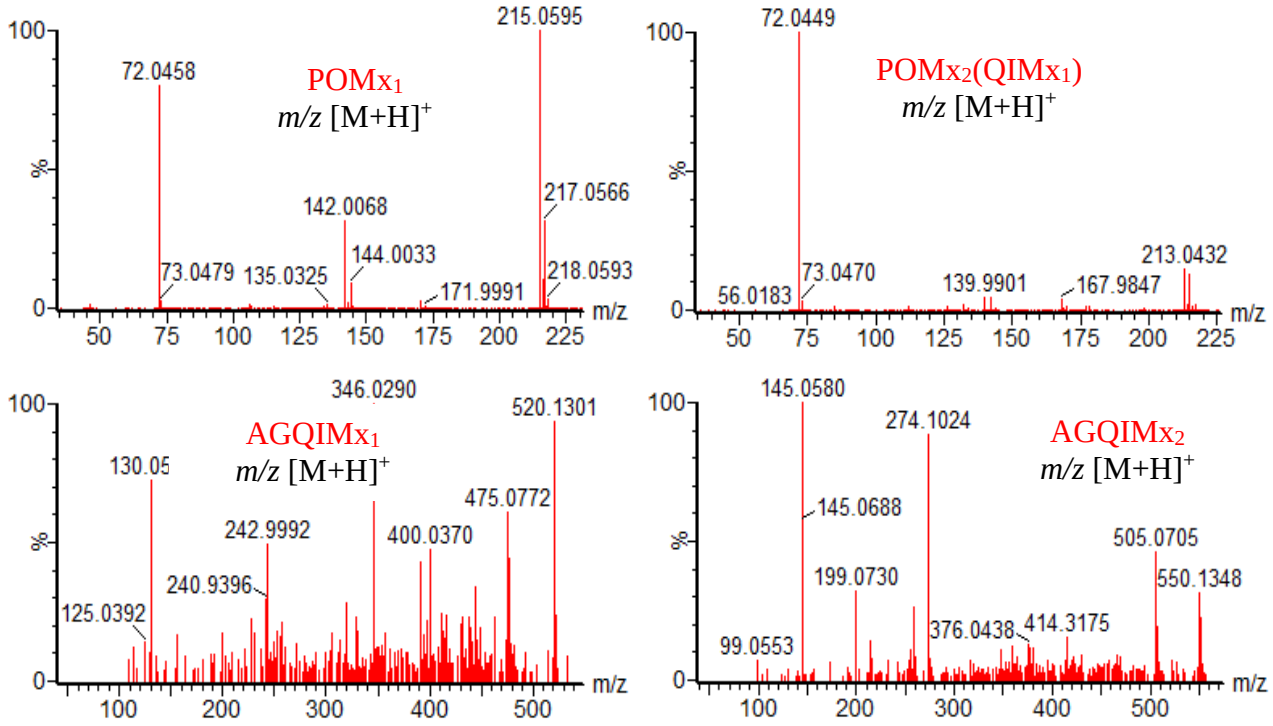
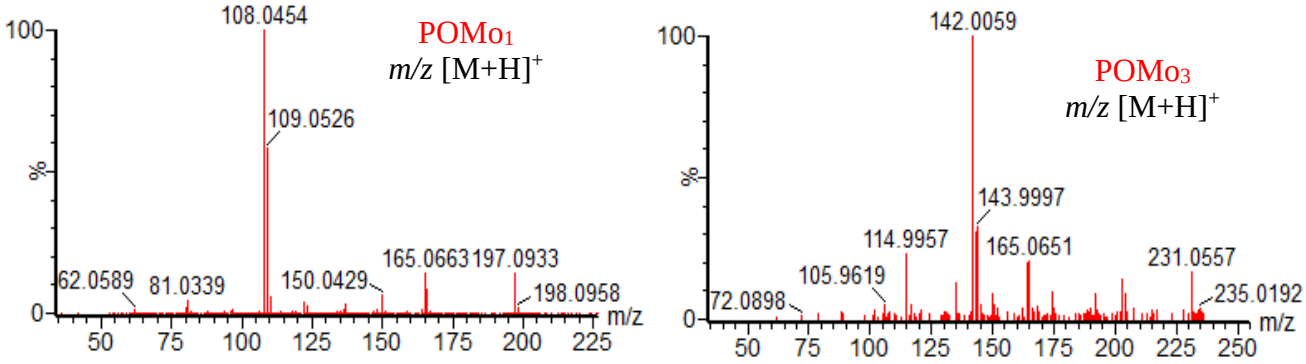


Figure A-6. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 215,05; 213,04; 520,12 et 550,13 correspondant aux produits d'oxydation $POMx_1$, $POMx_2$, $AGQIMx_1$ et $AGQIMx_2$

7- MONO



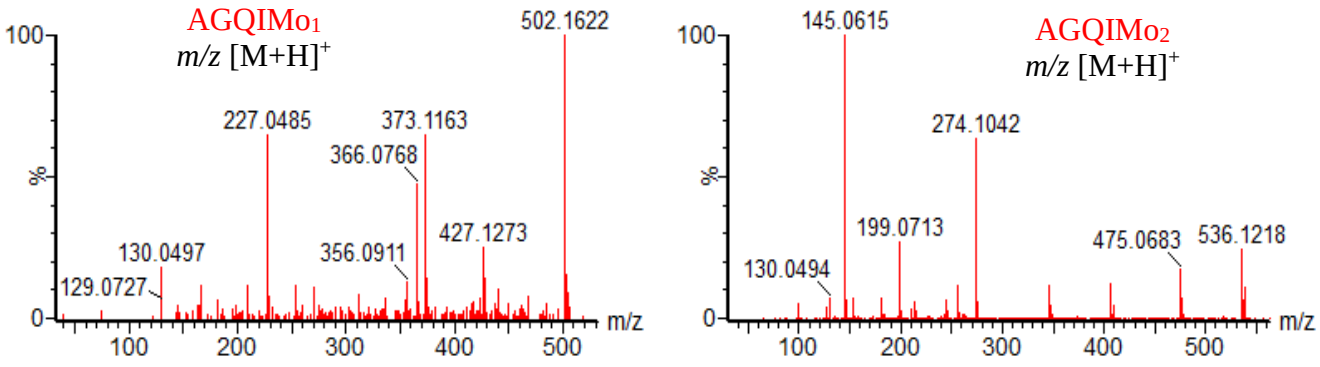


Figure A-7. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 197,09; 502,16; 231,05 et 536,12 correspondant aux produits d'oxydation $POMo_1$, $POMo_3$, $AGQIMo_1$ and $AGQIMo_2$

8- LINU

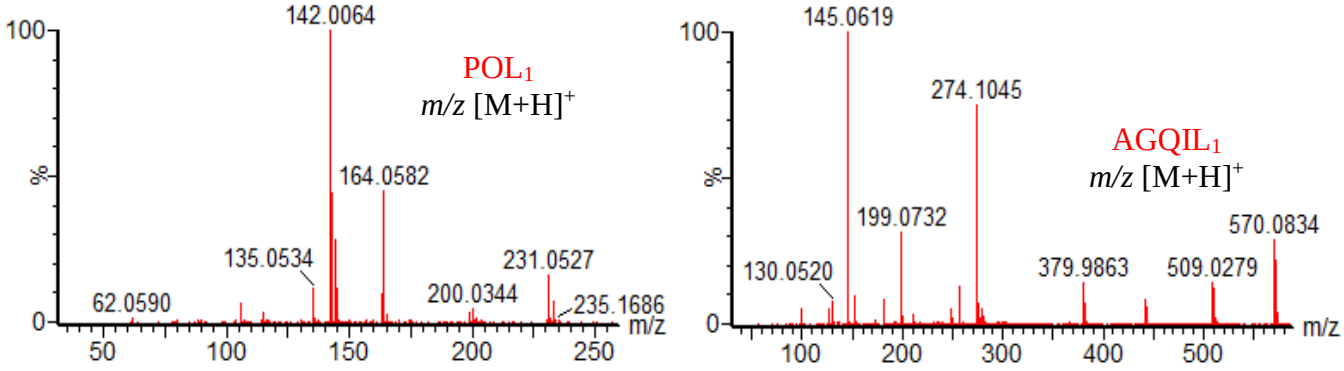


Figure A-8. Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation des ions $[M+H]^+$ observés aux *m/z* 231,05 et 570,08 correspondant aux produits d'oxydation POL_1 and $AGQIL_1$

Production scientifique et congrès

Articles scientifiques

- **Ranil C.T. Temgoua**, Ugo Bussy, Dimitri Alvarez-Dorta, Nicolas Galland, Julie Hémez, Ignas K. Tonlé, and Mohammed Boujtita **(2020)**. Simulation of the environmental degradation of diuron (herbicide) using electrochemistry coupled to mass spectrometry. *Electrochimica Acta*, 352, 136485**.**

- **Ranil C.T. Temgoua**, Ugo Bussy, Dimitri Alvarez-Dorta, Nicolas Galland, Julie Hémez, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, and Mohammed Boujtita **(2020)**. Using electrochemistry coupled to mass spectrometry for the simulation of the environmental degradation of the recalcitrant fungicide carbendazim. *Talanta*, 221, 121448.

- **Ranil C.T. Temgoua**, Ugo Bussy, Dimitri Alvarez-Dorta, Nicolas Galland, Julie Hémez, Evangeline Njanja, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, and Mohammed Boujtita **(2020)**. Electrochemistry-coupled to mass spectrometry and theoretical DFT calculations for the simulation of the environmental degradation of selected phenylurea herbicides. (*Ready to submit*).

Communications orales

- **Ranil Clément Tonleu Temgoua**, Renaud Boisseau, Dimitri Alvarez-Dorta, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, et Mohammed Boujtita. *Electrochemistry and liquid chromatography-mass spectrometry: A powerful technology to simulate various processes in live sciences.* ***6^{éme} édition des Journées de Science de la Vie (JSV)****, 8-10 août* ***2018****, Université de Dschang, Dschang, Cameroun.*

- **Ranil Clément Tonleu Temgoua**, Dimitri Alvarez-Dorta, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, et Mohammed Boujtita. *Electrochemistry-electrospray mass spectrometry coupling for the prediction of environmental and in vivo degradation of pesticides carbendazim and diuron.* ***Journée de l'Ecole Doctorale 3M (JED-3M)****. 19 Février* ***2019****, Université Bretagne Occidentale, Brest, France.*

- **Ranil Clément Tonleu Temgoua**, Renaud Boisseau, Dimitri Alvarez-Dorta, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, et Mohammed Boujtita. *Électrochimie couplée à la spectrométrie de masse et à la chromatographie liquide pour la prédiction des processus de transformation métabolique des pesticides.* ***10ème édition des Journées de Chimie Analytique (JCA)****, 04-06 Septembre* ***2019****, Université de Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroun.*

Communications par affiche

- **Ranil Clément Tonleu Temgoua**, Renaud Boisseau, Dimitri Alvarez-Dorta, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, et Mohammed Boujtita. ***Electrochemistry coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for studying xenobiotics metabolism: Tools and technologies****. **Journée de l'Ecole Doctorale 3M****. 06 Juin* ***2018****, Le Mans Université, Le Mans, France.*

- **Ranil Clément Tonleu Temgoua**, Renaud Boisseau, Dimitri Alvarez-Dorta, Christine Thobie-Gautier, Ignas K. Tonlé, et Mohammed Boujtita. *Electrochemistry coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for fast simulation (detection) of biotransformation reactions of the fungicide carbendazim****. 8th International Conference on Electrochemistry in Nanoscience****. 29-31 Mai* ***2018****, Université de Nancy, Nancy, France.*

Liste des illustrations (figures, tableaux et schémas)

Liste des figures

Figure I. 1: Description des différentes étapes du processus électrochimique au niveau d'une électrode. 8

Figure I. 2: Schéma des mécanismes limites pour un transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et un CPET (Mayer, 2004). 10

Figure I. 3: Allure typique d'un voltampérogramme cyclique annoté avec ses valeurs caractéristiques. 12

Figure I. 4: Allure typique des voltampérogrammes cycliques à différents systèmes (rapide, quasi-rapide ou lent) et critères permettant de les différencier. 13

Figure I. 5: Description schématique des éléments constituant un SM et différentes étapes réalisées lors d'une analyse par SM. 18

Figure I. 6: Vue schématisée d'une source ESI et du principe d'ionisation en mode positif. 19

Figure I. 7: Schématisation d'un analyseur quadripolaire linéaire. 22

Figure I. 8: Spectromètre à temps de vol à parcours direct et principe du réflecteur d'ions. 23

Figure I. 9: Principe d'un appareil SMSM à 3 quadripôles en série. 25

Figure I. 10: (a) Diagramme schématique de la réaction à la surface de l'électrode et (b) intensité du réactif et du produit vs le potentiel appliqué (voltampérogramme massique). 30

Figure I. 11: (a) Diagramme schématique de la réaction EC/SM en ligne et (b) du métabolisme oxydatif basé sur le CYP450. 30

Figure II. 1: Exemple de transformations des pesticides dans l'environnement (Fenner et al., 2013). 39

Figure III. 1: Aperçu schématique des processus de transformation des pesticides. Du côté gauche, les processus de transformations naturelles dans les organismes et l'environnement, du côté droit, les méthodes de simulation les plus courantes. 48

Figure III. 2: Schématisation des différentes phases du métabolisme in vivo d'un xénobiotique. 51

Figure IV. 1: Configurations de cellules électrochimiques: (A) Tubulaire (tubular); (B) Couche mince (thin-layer); (C) Jet (wall-jet); (D) Flux (flow-through); and (E) Double flux (dual working flow-through) (Antec, 2016) _____ 63

Figure IV. 2: Schéma de principe du couplage EC-CL-SM. En rouge, l'association pour l'injection des espèces électro générées se fait par le passeur d'échantillon de la chromatographie liquide. En vert, la sortie de la cellule électrochimique est connectée à la boucle d'injection du chromatographe. _____ 64

Figure IV. 3: Représentation schématique du couplage EC-SM. _____ 65

Figure IV. 4: Montage réalisé pour les tracés voltampérométriques utilisant voltampérométrie cyclique. _____ 68

Figure IV. 5: Montage réalisé pour les couplages direct et indirect : EC-SM et EC-CL-SM_ 70

Figure V. 1: Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 0,1 M. Le balayage de potentiel se fait de - 0,4 V à 1,2 V vs ECS à la vitesse de 50 $mV.s^{-1}$. _____ 76

Figure V. 2: Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM à différents pH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure V.1. _____ 77

Figure V. 3: Spectre de masse electrospray du DIU correspondant à l'ion $[M+H]^+$ _____ 78

Figure V. 4: Variation de la charge Q en fonction du temps t après 6 h d'électrolyse en milieu neutre, en mode stationnaire. Q_{calc}: Charge calculée; Q_{exp}: Charge expérimentale; r_F: Rendement de Faraday (Q_{exp}/Q_{calc}). _____ 79

Figure V. 5: Chromatogrammes UPLC des solutions de DIU (non oxydé et oxydés électrochimiquement) en milieu neutre. _____ 81

Figure V. 6: Spectres de masse haute résolution de quelques molécule oxydées, enregistrés en mode d'ionisation positive. _____ 83

Figure V. 7: En (a) voltampérogrammes massiques 2D du DIU 0,1 mM et de ses produits d'oxydation (POD_n) dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 20 mM. Le balayage de potentiel se fait de 0,0 V à 2 V vs Pd/H_2 à la vitesse de 2 $mV.s^{-1}$. L'électrode de travail est du carbone diamant dopé au bore (BDD). En (b,c) spectres de masse haute résolution enregistrés à différents temps (10 min et 12 min) ; Les pics aux m/z 213, 215, 249, 445 et 465 sont présents uniquement en (c). _____ 85

Figure V. 8: Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 215,06 correspondant au produit d'oxydation POD_1 (a) ; de l'ion observé au m/z

213,05 correspondant au produit d'oxydation POD_2 (b) et de l'ion observé au m/z 520,12 correspondant au produit d'oxydation QID_1 (c). _____ 87

Figure V. 9: Voltampérogrammes cycliques du DIU à 1 mM (a) et 5 mM (b), en absence et en présence d'un excès de GSH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure V.1. _____ 88

Figure V. 10: (a) fonction f^+ de Fukui calculée pour le cation DIU déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$) et (b) Densité de spin calculée du radical DIU déprotoné ($-e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes orange (bleu ciel) sont plus sujets aux attaques radicalaires (respectivement nucléophiles). _____ 89

Figure V. 11: Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 249,02 correspondant au produit d'oxydation POD_3. _____ 91

Figure V. 12: Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 554,09 $[M+H]^+$ correspondant au produit d'oxydation QID_2. _____ 92

Figure V. 13: Profils chromatographiques du composé au m/z 161,98 (DCA) à différents pH. _____ 95

Figure V. 14: Comparaison entre la dégradation électrochimique et environnementale du DIU. _____ 96

Figure V. 15: Voltammogrammes cycliques de 1 mM de différents herbicides phénylurées (FENU, MONU, DIU, ISO, CHLORTO, METOX, MONO et LINU); dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s. _____ 101

Figure V. 16: Fonctions f^+ de Fukui calculées pour différents herbicides phénylurées déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes violette sont plus sujets aux attaques nucléophiles. _____ 106

Figure V. 17: Voltammogrammes massiques 2D de quatre herbicides phénylurées (FENU, DIU, ISO et LINU) et leurs produits d'oxydation (POHn) dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium à 20 mM. Le balayage de potentiel se fait de 0,0 V à 2 V vs Pd/H_2 à la vitesse de balayage de 2 mV/s). _____ 110

Figure V. 18: Voltammogrammes cycliques de 1 mM de CBZ dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s. _____ 116

Figure V. 19: Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_1 dans un mélange eau/acétonitrile (50/50) contenant de l'acétate d'ammonium 20 mM. Le

balayage de potentiel se fait de 0,0 V à 2 V vs Pd/H_2 à la vitesse de 2 $mV.s^{-1}$. L'électrode de travail est du carbone diamant dopé au bore (BDD). _____ 120

Figure V. 20: (a) Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 134,07 correspondant au produit PDC_1 et (b) de l'ion observé au m/z 150,07 correspondant au produit d'oxydation PDC_2._____ 120

Figure V. 21: Voltammogrammes cycliques de 1 mM de PDC_2 (2-AB) dans H_2O/MeCN 50:50 avec 0,1 M d'acétate d'ammonium pH 7,4, vitesse de balayage 50 mV/s. _____ 121

Figure V. 22: (a) Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_6. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Spectres SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 381,13 correspondant au produit PDC_6._____ 122

Figure V. 23: (a) Densité de spin calculée du radical CBZ déprotoné ($-e^-$, $-H^+$) et (b) fonction f^+ de Fukui calculée pour le cation CBZ déprotoné ($-2e^-$, $-H^+$). Les atomes avec les plus grands lobes vert (violet) sont plus sujets aux attaques radicalaires (respectivement nucléophiles), le site le plus important étant différencié par son indice calculé._____ 123

Figure V. 24: Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 208,07 correspondant au produit d'oxydation PDC_4._____ 124

Figure V. 25: (a) Voltampérogrammes massiques 2D de la CBZ (0,1 mM) et de PDC_4. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Voltampérogrammes cycliques de la CBZ à 0,1 mM, en absence et en présence d'un excès de GSH. Conditions opératoires identiques à celles de la figure 1. La flèche montre le pic anodique de l'adduit au GSH._____ 125

Figure V. 26: Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 513,1414 $[M+H]^+$ correspondant à l'adduit au GSH de la quinone imine (QI). 126

Figure V. 27: (a) Voltampérogrammes massiques 2D correspondants aux ions aux m/z 513,14 et 497,14 $[M+H]^+$. Conditions opératoires à celles de la figure V.18. (b) Spectres SMHR enregistrés à différents potentiels d'oxydations (0,7 V et 1,1 V). ____ 127

Figure V. 28: Spectre de fragmentation SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 497,1475 $[M+H]^+$ correspondant à l'adduit au GSH du cation nitrenium._____ 128

Figure V. 29: Spectre SM^2HR et attribution après fragmentation de l'ion observé au m/z 118,06 correspondant au produit d'oxydation PDC_5._____ 129

Figure V. 30: Comparaison entre la dégradation électrochimique, chimique et environnementale de la CBZ. 130

Liste des tableaux

Tableau I. 1: Comparaison des performances relatives des analyseurs. 21

Tableau II. 1: Classification et caractéristiques de quelques groupes de pesticides (Aubertot et al., 2005 ; Carter, 2000). 35
Tableau II. 2: Structure des pesticides de la famille phénylurées (Salvestrini et al., 2002). 44
Tableau II. 3: Propriétés physico-chimiques du diuron (Giocomazzi et Cochet, 2004). 45
Tableau II. 4: Propriétés physico-chimiques de la carbendazime (Bonnard et al., 2009). 46

Tableau III. 1: Méthodes de prédiction des produits de transformation de quelques pesticides. 59

Tableau IV. 1: Composition du gradient en voies A et B. 71

Tableau V. 1: Composition élémentaire du DIU et de ses produits d'oxydation. 84
Tableau V. 2: Produits de dégradation détectés, avec leurs masses exactes, temps de rétention, erreurs, formules moléculaires et transformations chimiques. 103
Tableau V. 3: Produits de dégradation de la CBZ détectés, avec leurs masses exactes, temps de rétention, erreurs, formules moléculaires et transformations chimiques. 118

Liste des schémas

Schéma II. 1: Structure de la carbendazime (Bonnard et al., 2009). 46

Schéma V. 1: Mécanisme électrochimique de formation de POD_1 et POD_2 (QID_1). 90
Schéma V. 2: Mécanisme électrochimique de formation de $POD_{3a,b}$ et $QID_{2a,b}$. 92
Schéma V. 3: Mécanisme de dégradation électrochimique du DIU. 97
Schéma V. 4: Structures des herbicides phénylurées étudiés (le squelette en bleu est commun à toutes le structures). 99

Schéma V. 5: Structures des différents herbicides phénylurées ainsi que leurs principaux produits d'oxydation. _____ 108

Schéma V. 6: Mécanisme général de dégradation électrochimique des herbicides phénylurées. _____ 111

Schéma V. 7: Mécanisme de génération électrochimique de (a) POI_4 et POI_5 ; (b) POC_3 et POC_4 et (c) POF_1 et POF_3. _____ 112

Schéma V. 8: a) Mécanisme de désalkylation hydrolytique d'ISO et de CHLORTO: génération de POI_1 et POC_1. b) Mécanisme de déméthoxylation hydrolytique de METOX: génération de $POMx_1$. _____ 113

Schéma V. 9: Mécanisme général de dégradation environnementale des herbicides phénylurées. _____ 114

Schéma V. 10: Mécanisme chimique de la formation de PDC_1. _____ 119

Schéma V. 11: Mécanisme chimique de la formation de PDC_2 et son oxydation électrochimique pour former PDC_3. _____ 121

Schéma V. 12: Mécanisme électrochimique de formation de PDC_4 et de la quinone imine (QI). _____ 124

Schéma V. 13: Mécanisme électrochimique de la formation du cation nitrenium et de l'adduit au GSH. _____ 128

Schéma V. 14: Mécanisme de dégradation chimique et électrochimique de la CBZ. _____ 130

Références bibliographiques

A

Abdou, W.; Mahran, M.; Sidky, RM. M. and Wamhoff, H. (**1985**). Photochemistry of pesticides, 3: Photolysis of methyl 2-benzimidazolecarbamate (carbendazim) in the presence of singlet oxygen. *Chemosphere*, 14, 1343–1353.

Antec (**2019**). Design of electrochemical cells, accessible from: *https://www.myantec.com/. accessed June 2019*.

Arpino, P. (**2009**). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. III. *Techniques de l'ingénieur. Référence : P1492 V*$_1$, 1-29.

Ashrafi, A. M.; Đorđević, J.; Guzsvány, V.; Švancara, I.; Trtić-Petrović, T.; Purenović, M. and Vytřas, K. (**2012**). Trace Determination of Carbendazim Fungicide Using Adsorptive Stripping Voltammetry with a Carbon Paste Electrode Containing Tricresyl Phosphate. *International Journal of Electrochemical Science*, 7, 9717–9731.

Aubertot, J. N.; Barbier, J. M.; Carpentier, A.; Grill, J. J.; Guichard, L.; Lucas, P.; Savary, S.; Savini, I. et Voltz, M. (**2005**). Pesticides, agriculture et environnement : Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. *Expertise scientifique collective, synthèse de rapport, INRA et Cemagref, (France)*, 1-64.

Awad, H.; Khamis, M.M. and El-Aneed, A. (**2014**). Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50, 158–175.

B

Badawi, N.; Rønhede, S.; Olsson, S.; Kragelund, B. B.; Johnsen, A. H.; Jacobsen, O.S. and Aamand, J. (**2009**). Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus Mortierella sp.. *Environmental Pollution*, 157, 2806–2812.

Bai, N.; Wang, S.; Abuduaini, R.; Zhang, M.; Zhu, X. and Zhao,Y. (**2017**). Rhamnolipid-aided biodegradation of carbendazim by Rhodococcus sp. D-1: characteristics, products, and phytotoxicity. *Science of Total Environment*, 590-591, 343–351.

Bandžuchova, L.; Švorc, L.; Sochr, J.; Svítkova, J. and Chýlkova, J. (**2013**) Voltammetric method for sensitive determination of herbicide picloram in environmental and biological samples using boron-doped diamond film electrode. *Electrochimica Acta*, 111, 242–249.

Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (**2001a**). Introduction and overview of electrode processes, in:

Electrochemical methods: Fundamentals and applications (2nd Ed.), *John Wiley et Sons, Inc., ISBN 0-471-04372-9, New York, USA*, 1-44, 833p.

Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (**2001b**). Potential sweep methods, in: Electrochemical methods: Fundamentals and applications (2nd Ed.), *John Wiley et Sons, Inc., ISBN 0-471-04372-9, New York, USA*, 226-261, 833p.

Bard, A. J. and Faulkner, L. R. (**2001c**). controlled-current techniques, in: Electrochemical methods: Fundamentals and applications (2nd Ed.), *John Wiley et Sons, Inc., ISBN 0-471-04372-9, New York, USA*, 226-261, 833p.

Barriuso E.; Calvet R.; Schiavon M. et Soulas G. (**1996**). Les pesticides et les polluants organiques des sols : Transformations et dissipation. *Etude et gestion des sols*, 34, 279-296.

Bauer, A.; Luetjohann, J.; Hanschen, F.S.; Schreiner, M.; Kuballa, J.; Jantzen, E. and Rohn, S. (**2018**). Identification and characterization of pesticide metabolites in brassica species by liquid chromatography travelling wave ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TWIMS-QTOF-MS). *Food Chemistry*, 244, 292–303.

Baumann, A.; Pfeifer, T.; Melles, D. and Karst, U. (**2013**). Investigation of the biotransformation of melarsoprol by electrochemistry coupled to complementary LC/ESI-MS and LC/ICP-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5249-5258.

Berberidou, C.; Kitsiou, V.; Kazala, E.; Lambropoulou, D.A.; Kouras, A.; Kosma, C.I.; Albanis, T.A. and Poulios, I. (**2017**). Study of the decomposition and detoxification of the herbicide bentazon by heterogeneous photocatalysis: Kinetics, intermediates and transformation pathways. *Applied Catalysis B*, 200, 150–163,

Blankert, B.; Hayen, H.; Van Leeuw, S. M.; Karst, U.; Bodoki, E.; Lotrean, S.; Sandulescu, R.; Mora Diez, N.; Dominguez, O.; Arcos, J. and Kauffmann, J.-M. (**2005**). Electrochemical, chemical and enzymatic oxidations of phenothiazines. *Electroanalytical Chemistry*, 17, 1501-1510.

Bletsou, A.A.; Jeon, J.; Hollender, J.; Archontaki, E. and Thomaidis, N.S. (**2015**). Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 66, 32–44.

Boese, A.D. and Martin, J.M.L. (**2004**). Development of density functionals for thermochemical kinetics. *The Journal of Chemical Physics*, 121, 3405–3416.

Bolton, J. L.; Trush, M. A.; Penning, T. M.; Dryhurst, G. and Monks, T. J. (**2000**). Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 13, 135-160.

Bonnard, N.; Jargot, D.; Falcy, M.; Fastier, A.; Oudar, S. et Rambour, M. (**2009**). Carbendazime. *Institut National de Recherche et de Sécurité, Fiche toxicologue*, N° 214, 1-8.

Boudina, A.; Emmelin, C.; Baaliouamer, A.; Grenier-Loustalot, M. F. and Chovelon, J. M. (**2003**). Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution, *Chemosphere*, 50, 649–655.

Brandon, E.F.A.; Raap, C.D.; Meijerman, I.; Beijnen, J.H. and Schellens, J.H.M. (**2003**). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189, 233–246.

Brillas, E.; Sirés, I. and Oturan, M.A. (**2009**). Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on Fenton's reaction chemistry. *Chemical Reviews*, 109, 6570–6631.

Bruins, A.P. (**2015**). An overview of electrochemistry combined with mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 70, 14–19.

Bussy, U. and Boujtita, M. (**2014**). Advances in the electrochemical simulation of oxidation reactions mediated by cytochrome P450. *Chemical Research in Toxicology*, 27,1652–1668.

Bussy, U.; Boisseau, R.; Thobie-Gautier, C. and Boujtita, M. (**2015**). Electrochemistry-mass spectrometry to study reactive drug metabolites and CYP450 simulations. *Trends in Analytical Chemistry*, 70, 67–73.

Bussy, U.; Chung-Davidson, Y.W.; Li, K. and Li, W. (**2014**). Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 7253–7260.

Bussy, U.; Delaforge, M.; El-Bekkali, C.; Ferchaud-Roucher, V.; Krempf, M.; Tea, I.; Galland, N.; Jacquemin, D. and Boujtita, M. (**2013**). Acebutolol and alprenolol metabolism predictions: comparative study of electrochemical and cytochrome P450-catalyzed reactions using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 6077–6085.

Bussy, U.; Giraudeau, P.; Tea, I. and Boujtita, M. (**2013**). Understanding the degradation of electrochemically-generated reactive drug metabolites by quantitative NMR. *Talanta*, 116, 554–558.

Büter, L.; Vogel, M. and Karst, U. (**2015**). Adduct formation of electrochemically generated reactive intermediates with biomolecules. *Trends in Analytical Chemistry*, 70, 74–91.

C

Carsel, R.F. and Smith, C. N. (**1987**). Impact of pesticides on ground water contamination. In G. J. Marco et al (ed), Silent spring revisited. *American Chemical Society*, Washington, DC, 71-83.

Carter, A. (**2000**). How pesticides get into water and proposed reduction measures. *Pesticides Outlook.* 11, 149-157.

Chauhan, A.; Goyal, M. K. and Chauhan, P. (**2014**). GC-MS technique and its analytical applications in science and technology. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 5, 1-5.

Chaussard J. (**1991**). Electrosynthèse organique. *Techniques de l'ingénieur. Référence : J5970 V_1*, 1-10.

Chernyak, S.M.; Rice, C.P. and McConnell, L.L. (**1996)**. Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 410-419.

Chevreuil, M. ; Garmouma, M. ; Teil, M. J. and Chesterikoff, A. (**1996**). Occurence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of the Paris area. *Science of the Total Environment*, 182, 25-37.

Choudhury, P.P. (**2017**). Leaf cuticle-assisted phototransformation of isoproturon. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 188-194.

Churchwell, M.I.; Twaddle, N.C.; Meeker, L.R. and Doerge, D.R. (**2005**). Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 825, 134–143.

Claude, M. et Jardy A. (**1999**). Méthodes chromatographiques – introduction. *Techniques de l'ingénieur. Référence : P1445 V_2*, 1-6.

Cluzeau, S. (**1997**). Index phytosanitaire. *Association de Coordination Technique Agricole, 33ème éditions, Paris*, 575p.

Cohen, Z. Z.; Eiden, C. and Lober, M. N. (**1986**). Monitoring ground water for pesticides, in: Evaluation of pesticide in groundwater. *American Chemical Society, ACS Symposium Series, Washington DC*, 170-196, 315p.

Colin, F. (**2000**). Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires : cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France). *Thèse de doctorat, Sciences de l'Eau, ENGREF, Montpellier*, 170p.

Couteaux, A. (**2004**). Index phytosanitaire. Association de Coordination Technique Agricole, 40ème édition, Paris, 804p.

D

Da Costa, E. P.; Bottrel, S. E. C.; Starling, M. C. V. M.; Leão, M. M. D. and Amorim, C. C. (**2019**). Degradation of carbendazim in water via photo-Fenton in raceway pond reactor: Assessment of acute toxicity and transformation products. *Environmental Science of Pollution Research*, 26, 4324–4336.

Dayon, L.; Roussel, C. and Girault, H.H. (**2004**). On-line electrochemical tagging of free cysteines in peptides during nanospray ionisation mass spectrometry: An overview, *Chimia*, 58, 204-207.

De-la-Mora, J.F.; Van-Berkel, G.J.; Enke, C.G.; Cole, R.B.; Martinez-Sanchez, M. and Fenn, J.B. (**2000**). Special feature: Discussion electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 35, 939–952.

Diehl, G. and Karst, U. (**2002**). On-line electrochemistry-MS and related techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373, 390-398.

Di Girolamo, F.; Lante, I.; Muraca, M. and Putignani, L. (**2013**). The role of mass spectrometry in the "Omics" era. *Current Organic Chemistry*, 17, 2891-2905.

Dong, B. and Hu, J. (**2016**). Photodegradation of the novel fungicide fluopyram in aqueous solution: Kinetics, transformation products, and toxicity evolvement. *Environmental Science and Pollution Research (International)*, 23, 19096–19106.

Du, B.; Lofton, J.M.; Peter, K.T.; Gipe, A.D.; James, C.A.; McIntyre, J.K.; Scholz, N.L.; Baker, J.E. and Kolodziej, E.P. (**2017**). Development of suspect and non-target screening methods for detection of organic contaminants in highway runoff and fish tissue with high-resolution time of-flight mass spectrometry. *Environmental Science: Process et Impacts*, 19, 1185–1196.

E

Ecobichon, D.J. (**2001**). Pesticide use in developing countries, *Toxicology*, 160 27–33.

Ellegaard-Jensen, L.; Aamand, J.; Kragelund, B. B.; Johnsen, A. H. and Rosendahl, S. (**2013**). Strains of the soil fungus Mortierella show different degradation potentials for the phenylurea herbicide diuron. *Biodegradation*, 24, 765–774.

Ellegaard-Jensen, L.; Knudsen, B.E.; Johansen, A.; Albers, C. N.; Aamand, J. and Rosendahl, S. (**2014**). Fungal-bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems. *Science of Total Environment*, 466, 699–705.

El-Madani, M.; Guillard, C.; Perol, N.; Chovelon, J. M.; El-Azzouzi, M.; Zrineh, A. and Herrmann, J. M. (**2006**). Photocatalytic degradation of diuron in aqueous solution in presence of two industrial titania catalysts, either as suspended powders or deposited on flexible industrial photo resistant papers. *Applied Catalysis B: Environmental*, 65, 70 – 76.

Enoch, S. J. and Cronin, M.T.D. (**2010**). A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding. *Critical Reviews in Toxicology*, 40, 728–748.

Enoch, S. J.; Ellison, C. M.; Schultz, T. W. and Cronin, M.T.D. (**2011**). A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 41 783–802.

Even, I.; Berta, J-L. et Volatier. J-L. (**2002**). Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. *Document AFSSA 2002*.

Faber, H.; Jahn, S.; Künnemeyer, J.; Simon, H.; Melles, D.; Vogel, M. and Karst, U. (**2011**). Electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry as a tool in metabolism studies. *Angewandte Chemie Internationnal Edition English*, 50, A52.

Faber, H.; Melles, D.; Brauckmann, C.; Wehe, C. A.; Wentker, K. and Karst, U. (**2012**). Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography/) mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 345–354.

Faber, H.; Vogel, M. and Karst, U. (**2014**). Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies - a review. *Analytica Chimica Acta*, 834, 9–21.

Fatta-Kassinos, D.; Vasquez, M.I. and Kummerer, K. (**2011**). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes-degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, *85*, 693–709.

Fenn, J. B. (**2001**). Method and apparatus for electrospray ionization. *United States Patent*, 6, 297, 499 B1.

Fenner, K.; Caronica S.; Wackett L.P. and Elsner M. (**2013**) Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341, 752-758.

Ferri, P.; Ramil, M.; Rodriguez, I.; Bergamasco, R.; Vieira, A.M. and Cela, R. (**2017**).

Assessment of quinoxyfen phototransformation pathways by liquid chromatography coupled to accurate mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2981–2991.

Fine, J.D. and Mullin, C.A. (**2017**). Metabolism of N-methyl-2-pyrrolidone in honey bee adults and larvae: Exploring age related differences in toxic effects. *Environmental Science and Technology*, 51, 11412–11422.

Fournier, J.C. (**1989**) Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol. *Thèse de doctorat, Université de Perpignan, Perpignan,* 502p.

Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A. and Nakatsuji, H. (**2016**). Gaussian 16, *Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2016*.

Fujishima, A.; Zhang, X. and Tryk, D.A. (**2008**). TiO_2 photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63, 515–582.

G

Galiano-Roth, A. S.; Kim, Y. J.; Gilchrist, J. H.; Harrison, A. T.; Fuller, D. J. and Collum, D. B. (**1991**). Lithium diisopropylamine mixed aggregates: Structures and consequences on the stereochemistry of ketone enolate formation. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 5053-5055.

Gamache, P.; McCarthy, R.; Waraska, J. and Acworth, I. (**2003**). Pharmaceutical oxidative stability profiling with high- throughput voltammetry. *American Laboratory*, 35, 21-25.

Gamache, P.; Meyer, D.; Granger, M. and Acworth, I. (**2004**). Metabolomic applications of electrochemistry/mass spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 15, 1717- 1726.

Gamache, P.; Smith, R.; McCarthy, R.; Waraska, J. and Acworth, I. (**2003**). ADME/TOx profiling using coulometric electrochemistry and electrospray ionization mass spectrometry. *Spectroscopy*, 18, 14-21.

Geerlings, P.; De Proft, F. and Langenaeker, W. (**2003**). Conceptual density functional theory. *Chemical Reviews*, 103, 1793–1874.

Getek, T. A.; Korfmacher, W. A.; McRae, T. A. and Hinson, J. A. (**1989**). Utility of solution electrochemistry mass spectrometry for investigation the formation and detection of biologically important conjugates of acetaminophen. *Journal of Chromatography A*,

474, 245-256.

Giacomazzi, S. and Cochet, N. (**2004**). Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere*, 56, 1021–1032.

Gilbert-López, B.; Valdés, A.; Acunha, T.; García-Cañas, V.; Simó, C. and Cifuentes, A. (**2017**). Foodomics: LC and LCMS-based omics strategies in food science and nutrition. *Journal of Liquid Chromatography*, 267-299.

Girault, H.; Liu, B.; Qiao, L.; Bi, H.; Prudent, M.; Lion, N. and Abonnenc, M. (**2010**) Electrochemical reactions and ionization processes. *European Journal of Mass Spectrometry (Chichester)*, 16, 341-349.

Gligorovski, S.; Strekowski, R.; Barbati, S. and Vione, D. (**2015**). Environmental implications of hydroxyl radicals *OH. *Chemical Reviews*, 115, 13051–13092.

Glotfelty, D. E.; Taylor, A. W.; Turner, B. C. and Zoller, W. H. (**1984**). Volatilization of surface-applied pesticides from fallow soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 638-643.

Gonzalez, M. J. ; Hernandez, P. ; Ballestros, Y. and Hernandez, L. (**2000**). Determination of carbendazim in soil samples by anodic stripping voltammetry using a carbon ultramicroelectrode. *Fresenius Journal of Analytic Chemistry*, 367, 474-478.

Guengerich, F.P. (**2001**). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 611–650.

Gumustas, M.; Kurbanoglu, S.; Uslu, B. and Ozkan, S.A. (**2013**). UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, 76, 1365–1427.

H

Hang, M.; Huynh, V. and Meyer, T. J. (**2007**). Proton-coupled electron transfer. *Chemical Reviews*, 107, 5004-5064.

Hao, C.; Zhao, X. and Yang, P. (**2007**). GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 569–580.

Hernandez, P. ; Ballestros, Y. ; Galan, F. and Hernandez, L. (**1996**). Determination of Carbendazim with a Graphite Electrode Modified with silicone OV-7. *Electroanalysis*, 8, 941-946.

Himel, C.M.; Loats, H. and Bailey, G.W. (**1990**). Pesticide sources to the soil and principles of sprays physics. *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modeling*

SSSA Book series, 2, 7-50.

Hoffman, E. and Stroobant V. (**2007a**). Ions sources, in: Mass spectrometry: Principles and applications (3rd Ed.), *John Wiley et Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-03310-4, Chichester, England*, 15-84, 489p.

Hoffman, E. and Stroobant V. (**2007b**). Mass analysers, in: Mass spectrometry: Principles and applications (3rd Ed.), *John Wiley et Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-03310-4, Chichester, England*, 85-174, 489p.

Hoffman, E. and Stroobant V. (**2007c**). Tandem mass spectrometry, in: Mass spectrometry: Principles and applications (3rd Ed.), *John Wiley et Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-03310-4, Chichester, England*, 189-216, 489p.

Hoffman, E. and Stroobant V. (**2007d**). Mass spectrometry/Chromatography coupling, in: Mass spectrometry: Principles and applications (3rd Ed.), *John Wiley et Sons, Ltd., ISBN 978-0-470-03310-4, Chichester, England*, 217-242, 489p.

Hoffmann, T.; Hofmann, D.; Klumpp, E. and Küppers, S. (**2011**). Electrochemistry-mass spectrometry for mechanistic studies and simulation of oxidation processes in the environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1859-1868.

Hoguendoom ; Elbert ; Van Zoonen and Piet. (**2000**). Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. *Journal of Chromatography*, 892, 435-453.

Hubner, U.; von Gunten, U. and Jekel, M. (**2015**). Evaluation of the persistence of transformation products from ozonation of trace organic compounds-A critical review. *Water Research*, *68*, 150–170.

Hussain, S.; Arshad, M.; Springael, D.; SøRensen, S. R.; Bending, G. D.; Devers-Lamrani, M.; Maqbool, Z. and Martin-Laurent, F. (**2015**). Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 1947–1998.

J

Jahn, S. and Karst, U. (**2012**). Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry--current state and future perspectives. *Journal of Chromatography A*, 1259, 16–49,

Jia, L.; Wong, H.; Wang, Y.; Garza, M. and Weitman, S. D. (**2003**). Carbendazim: Disposition, cellular permeability, metabolite identification, and pharmacokinetic comparison with its nanoparticle. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 161–172.

Jiangyuan, L. and Yongming, C. (**2009**). Determination of carbendazim with multiwalled carbon nanotubes-polymeric methyl red film modified electrode. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 101-104.

Jing-Liang, X.; Xiang-Yang, G.; Biao, S.; Zhi-Chun, W.; Kun, W. and Shun-Peng, L. (**2006**). Isolation and characterization of a carbendazim-degrading rhodococcus sp. djl-6. *Current Microbiology*, 53, 72–76.

Johansson, T.; Jurva, U.; Grönberg, G.; Weidolf, L. and Masimirembwa, C. (**2008**). Novel metabolites of amodiaquine formed by CYP1A1 and CYP1B1: Structure elucidation using electrochemistry, mass spectrometry, and NMR. *Drug Metabolism and Disposition*, 37, 571–579.

Johansson, T.; Weidolf, L. and Jurva, U. (**2007**). Mimicry of phase I drug metabolism–novel methods for metabolite characterization and synthesis. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21, 2323–2331.

Jokanović, M. **(2001**). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166, 139-160.

Jokanović, M. **(2009**). Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters*, 190 (2), 107-115.

Jurva, J. (**2004**). Electrochemistry on-line with mass spectrometry: instrumental methods for in vitro generation and detection of drug metabolites. *PhD dissertation, University of Groningen, Groningen, Netherland*, 163p.

Jurva, U. and Weidolf, L. (**2015**). Electrochemical generation of drug metabolites with applications in drug discovery and development. *Trend in Analytical Chemistry, 70*, 92–99.

Jurva, U.; Wikström, H. V. and Bruins, A. P. (**2000**). In vitro mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 14, 529-533.

Jurva, U.; Wikström, H. V. and Bruins, A. P. (**2002**). Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 16, 1934-1940.

Jurva, U.; Wikström, H.V.; Weidolf, L. and Bruins, A.P. (**2003**). Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 17, 800–810.

K

Kamel, A.; Byrne, C.; Vigo, C.; Ferrario, J.; Stafford, C.; Verdin, G.; Siegelman, F.; Knizner, S. and Hetrick J. (**2009**). Oxidation of selected organophosphate pesticides during chlorination of simulated drinking water. *Water Research*, 43, 522-34.

Khongthon, W.; Jovanovic, G.; Yokochi, A.; Sangvanich, P. and Pavarajarn, V. (**2016**). Degradation of diuron via an electrochemical advanced oxidation process in a microscale-based reactor. *Chemical Engineering Journal*, 292, 298–307.

Kimura, H.; Sakai, Y. and Fujii, T. (**2018**). Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 33, 43–48.

Klopčič, I. and Dolenc, M. S. (**2019**). Chemicals and drugs forming reactive quinone and quinone imine metabolites. *Chemical Research in Toxicology*, 32, 1–34.

Kosjek, T. and Heath, E. (**2011**). Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1065–1087.

L

Langreth, D. C. and Perdew, J. P. (**1982**). Exchange-Correlation energy of a metallic surface: wave-vector analysis II. *Physical Review B: Condensed Matter*, 26, 2810.

Laudien, R. and Mitzner, R. (**2001**). Phenylureas. Part 1. Mechanism of the basic hydrolysis of phenylureas. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2, 2226–2229.

Laudien, R. and Mitzner, R. (**2001**). Phenylureas. Part 2. Mechanism of the acid hydrolysis of phenylureas. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2, 2230–2232.

Lecours, M.-A.; Eysseric, E.; Yargeau, V.; Lessard, J.; Brisard, G. and Segura, P. (**2018**). Electrochemistry-high resolution mass spectrometry to study oxidation products of trimethoprim. *Environments*, 5, 2-18.

Lei, J.; Wei, S.; Ren, L.; Hu, S. and Chen, P. (**2017**). Hydrolysis mechanism of carbendazim hydrolase from the strain Microbacterium sp. djl-6F. *Journal of Environmental Sciences*, 54, 171–177.

Leonard, R.A. (**1990**). Movement of pesticides into surface waters. *Soil Science Society of America Book Series*, N°2, 303-349.

Levine, S.L. and Oris, J.T. (**1999**). Enhancement of acute parathion toxicity to fathead minnows following pre-exposure to propiconazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65, 102-109.

Levsen, K.; Schiebel, H.-M.; Behnke, B.; Dötzer, R.; Dreher, W.; Elend, M. and Thiele, H. (**2005**). Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an

overview. *Journal of Chromatography A*, 1067, 55–72.

Liao, X.; Zhang, C.; Liu, Y.; Luo, Y.; Wu, S.; Yuan, S. and Zhu, Z. (**2016**). Abiotic degradation of methyl parathion by manganese dioxide: Kinetics and transformation pathway. *Chemosphere*, 150, 90–96.

Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L. and Wenzel, A. (**2003**). Endocrine disruptors in the environment, IUPAC technical report. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 631-681.

Lohmann, W. and Karst, U. (**2006**). Simulation of the detoxification of paracetamol using on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1701–1708.

Lohmann, W. and Karst, U. (**2007**). Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79, 6831–6839.

Lohmann, W. and Karst, U. (**2008**). Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 79–96.

Lohmann, W.; Dotzer, R.; Gutter, G.; Van Leeuwen, S.M. and Karst, U. (**2009**). On-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry for the simulation of pesticide metabolism. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20, 138–145.

Lohmann, W. and Karst, U. (**2009**). Electrochemistry meets enzymes: Instrumental on-line simulation of oxidative and conjugative metabolism reactions of toremifene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1341–1348.

Lopez-Ruiz, R.; Ruiz-Muelle, A.B.; Romero-Gonzalez, R.; Fernandez, I.; Vidal, J.L.M. and Frenich, A.G. (**2017**). The metabolic pathway of flonicamid in oranges using an orthogonal approach based on high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytical Methods*, 9, 1718–1726.

Lu, J.S.; Hua, X. and Long, Y.T. (**2017**). Recent advances in real-time and in situ analysis of an electrode-electrolyte interface by mass spectrometry. *Analyst*, 142, 691-699.

Lynch, T.J.P. and Anita, L. (**2007**). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American of Family Physicians*, 76, 391–397.

M

Ma, S. and Subramanian, R. (**2006**). Detecting and characterizing reactive metabolites by

liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 1121–1139.

Mackintosh, S.A.; Dodder, N.G.; Shaul, N.J.; Aluwihare, L.I.; Maruya, K.A.; Chivers, S.J.; Danil, K.; Weller, D.W. and Hoh, E. (**2016**). Newly identified DDT-related compounds accumulating in southern California bottlenose dolphins. *Environmental Science of Technology*, 50, 12129–12137.

Macounova, K.; Klima, J.; Bernard, C. and Degrand, C. (**1998**). Ultrasound-assisted anodic oxidation of diuron. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 457, 141–147.

Madsen, K.G.; Olsen, J.; Skonberg, C.; Hansen, S.H. and Jurva, U. (**2007**). development and evaluation of an electrochemical method for studying reactive phase-I metabolites: Correlation to in vitro drug metabolism. *Chemical Research in Toxicology*, 20, 821–831.

Maggio, R.M.; Calvo, N.L.; Vignaduzzo, S.E. and Kaufman, T.S. (**2014**). Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 102–122.

Malato, S.; Caceres, J.; Fernandes-Alba, A. R.; Piedra L.; Hernando, M. D.; Aguera A. and Vial J. (**2003**). Photocatalytic treatment of diuron by solar photocatalysis: Evaluation of main intermediates and toxicity. *Environmental Science of Technology*, 37, 2516 – 2524.

Mandic, Z. (**2017**). Electrochemical methods in drug discovery and development. *Bulgarian Chemical Communication*, 49, 65–73.

Marenich, A.V.; Cramer, C.J. and Truhlar, D.G. (**2009**). Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Chemical Physics B*, 113, 6378–6396.

Marinovich, M.; Ghilardi, F. and Galli, C.L. (**1996**). Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology*, 108, 201-206.

Marshall, A.G. and Hendrickson, C.L. (**2008**). High-resolution mass spectrometers. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 579–599.

Martin, E.T.; McGuire, C.M.; Mubarak, M.S. and Peters, D.G. (**2016**). Electro reductive remediation of halogenated environmental pollutants. *Chemical Reviews*, 116, 15198–15234.

Mayer J. M. (**2011**). Understanding hydrogen atom transfer: from bond strengths to Marcus theory. *Accounts of Chemical Research*, 44, 36-46.

Mayer, J. M. (**2004**). Proton-coupled electron transfer: a reaction chemist's view. *Annual Review of Physical Chemistry*, 55, 363-390.

Mayer, J. M. and Rhile, I. J. (**2004**). Thermodynamics and kinetics of proton-coupled electron transfer: stepwise vs. concerted pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1655, 51-58.

Mazelier, P.; Leroy, E.; De Laat, J. and Legube, B. (**2003**). Degradation of carbendazim by UV/H_2O_2 investigated by kinetic modeling. *Environment Chemistry Letter*, 1, 68-72.

Mazellier, P.; Leroy, E. and Legude, B. (**2002**). Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 153, 221-227.

Mekonnen, T.F.; Panne, U. and Koch, M. (**2017**). Electrochemistry coupled online to liquid chromatography-mass spectrometry for fast simulation of biotransformation reactions of the insecticide chlorpyrifos. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 3359–3368.

Mekonnen, T.F.; Panne, U. and Koch, M. (**2018a**). Prediction of biotransformation products of the fungicide fluopyram by electrochemistry coupled online to liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with in vitro microsomal assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 2607–2617.

Mekonnen, T.F.; Panne, U.; Koch, M. and Lee, Y.J. (**2018b**). Glucosylation and glutathione conjugation of chlorpyrifos and fluopyram metabolites using electrochemistry/mass spectrometry. *Molecules*, 24, 898.

Mekonnen, T.F.; Byrne, L.; Panne, U. and Koch, M. (**2018c**). Investigation of chlorpyrifos and its transformation products in fruits and spices by combining electrochemistry and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 11, 2657–2665.

Menet, M. C. (**2011**). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires*, N° 437, 41-53.

Menz, J.; Toolaram, A.P.; Rastogi, T.; Leder, C.; Olsson, O.; Kummerer, K. and Schneider, M. (**2017**). Transformation products in the water cycle and the unsolved problem of their proactive assessment: A combined in vitro/in silico approach. *Environment International*, 98, 171–180.

Metz, J. G.; Pakrasi, H. B.; Seibert, M. and Arntzer, C. J. (**1986**). Evidence for a dual function of the herbicide-binding D1 protein in photosystem II. *FEBS Letters*, 205 269–274.

Miomandre, F. ; Sadki, S. ; Audebert, P. et Méallet-Renault, R. (**2014a**). Aspects

thermodynamiques de la réaction électrochimique, dans : Electrochimie des concepts aux applications. (3ème Ed.), *Dunod, ISBN 978-2-10-071234-2, Paris, France,* 261-280, 409p.

Miomandre, F. ; Sadki, S. ; Audebert, P. et Méallet-Renault, R. (**2014b**). Electrosynthèse organique, dans : Electrochimie des concepts aux applications. (3ème Ed.), *Dunod, ISBN 978-2-10-071234-2, Paris, France,* 261-280, 409p.

Miomandre, F. ; Sadki, S. ; Audebert, P. et Méallet-Renault, R. (**2014c**). Réactions chimiques couplées au transfert électronique, dans : Electrochimie des concepts aux applications. (*3ème Ed.), Dunod, ISBN 978-2-10-071234-2, Paris, France*, 261-280, 409p.

Miomandre, F. ; Sadki, S. ; Audebert, P. et Méallet-Renault, R. (**2014d**). Techniques électrochimiques d'analyses, dans : Electrochimie des concepts aux applications. *(3ème Ed.), Dunod, ISBN 978-2-10-071234-2, Paris, France*, 261-280, 409p.

Mohle, S.; Zirbes, M.; Rodrigo, E.; Gieshoff, T.; Wiebe, A. and Waldvogel, S.R. (**2018**). Modern electrochemical aspects for the synthesis of value-added organic products. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 57, 6018–6041.

Mugadza, T. and Nyokong, T. (**2010**). Facile electrocatalytic oxidation of diuron on polymerized nickel hydroxotetraamino-phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. *Talanta*, 81, 1373–1379.

Murakata, M.; Nakajima, M. and Koga, K. (**1990**). Enantioselective alkylation at the α-position of cyclic ketones using a chiral lithium amide as a base in the presence of lithium bromide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1657-1658.

N

Nakai, M.; Hess, R.A.; Moore, B.S.; Guttrof, R.F.; Strader, L.F. and Linder, R.E. (**1992**). Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazime in male reproductive system in the rat. *Journal of Andrology,* 13, 6-10.

Negreira, N.; Regueiro, J.; Valdersnes, S.; Berntssen, M.H.G. and Ornsrud, R. (**2017**). Comprehensive characterization of ethoxyquin transformation products in fish feed by traveling-wave ion mobility spectrometry coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.*, 965, 72–82.

Nicol, E.; Chayata, H.; Genty, C.; Bouchonnet, S. and Bourcier, S. (**2016**). Photodegradation of cyprodinil under UV visible irradiation-chemical and toxicological approaches. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 30, 2201-2211.

Nikolaev, E.N.; Kostyukevich, Y.I. and Vladimirov, G.N. (**2016**). Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. *Mass Spectrometry Reviews*, 35, 219–258.

Nouri-Nigjeh, E.; Bischoff, R.; Bruins, A. P. and Permentier, H. P. (**2011**). Electrochemical oxidation by square-wave potential pulses in the imitation of phenacetin to acetaminophen biotransformation. *Analyst*, 136, 5064–5067.

Nouri-Nigjeh, E.; Bischoff, R.; Bruins, A.P. and Permentier, H.P. (**2001**). Electrochemistry in the mimicry of oxidative drug metabolism by cytochrome P450s. *Current Drug Metababolism*, 12, 359–371.

Nowak, P.; Woźniakiewicz, M. and Koscielniak, P. (**2014**). Simulation of drug metabolism. *Trends in Analytical Chemistry*, 59, 42-49.

Oturan, M. A.; Oturan, N.; Edelahi, M. C.; Podvorica, F. I. and El Kacemi, K. (**2011**). Oxidative degradation of herbicide diuron in aqueous medium by Fenton's reaction based advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*, 171, 127–135.

Oturan, N.; Trajkovska, S.; Oturan, M. A.; Couderchet, M. and Aaron, J.-J. (**2008**). Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process "electro-Fenton," *Chemosphere*, 73, 1550–1556.

Panadés, R.; Ibarz, A. and Esplugas, S. (**2000**). Photodecomposition of carbendazim in aqueous solutions. *Water Research*, 34, 2951–2954.

Pascal-Lorber, S., Alsayeda, H., Jouanin, I., Debrauwer, L., Canlet, C. and Laurent, F.O. (**2010**). Metabolic fate of [^{14}C]Diuron and [^{14}C]linuron in wheat (Triticum aestivum) and radish (Raphanus sativus). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10935–10944.

Petrovic, M. and Barceló, D. (**2007**). LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 486–493.

Pfefer, G. and Boistelle, R. (**1996**). Experimental and theoretical morphologies of diuron, N'-(3, 4-dichlorophenyl)-N, N-dimethylurea. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 52, 662–667.

Pico, Y. and Barcelo, D. (**2015**). Transformation products of emerging contaminants in the environment and high-resolution mass spectrometry: A new horizon. *Analytical and*

Bioanalytical Chemistry, 407, 6257–6273.

Portoles, T.; Mol, J.G.; Sancho, J.V. and Hernandez, F. (**2014**). Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening and identification of organic pollutants in waters. *Journal of Chromatography A*, 1339, 145–153.

Portychová, L. and Schug, K.A. (**2017**). Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: A review. *Analytica Chimica Acta*, 993, 1–21.

Prost, F. and Thormann, W. (**2003**). Capillary electrophoresis to assess drug metabolism induced in vitro using single CYP450 enzymes (Supersomes): Application to the chiral metabolism of mephenytoin and methadone. *Electrophoresis*, 24, 2577–2587.

R

Ramirez-Zamora, R. M. and Seux, R. (**1999**). Oxydation du diuron et identification de quelques sous-produits de la réaction. *Revue des Sciences de l'Eau,* 12, 545 – 560.

Reed, A.E.; Curtiss, L.A. and Weinhold, F. (**1988**). Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chemical Reviews*, 88, 899–926.

Rekha; Naik, S.N. and Prasad, R. (**2006**). Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety*, 13, 12-19.

Ribeiro,W. F.; Selva,T. M. G.; Lopes, I. C.; Coelho, E.S. C.; Lemos, S. G.; Caxico de Abreu, Bernardo do Nascimento, F. V. and ario esar Ugulino de Ara ujo, M.C. (**2011**). Electroanalytical determination of carbendazim by square wave adsorptive stripping voltammetry with a multiwalled carbon nanotubes modified electrode, *Analyticals Methods*, 3, 1202-1206.

Rondeau, D. (**2017a**). Spectrométrie de masse organique – Principe, méthodes d'introduction et d'ionisation. *Techniques de l'ingénieur. Référence : P2645 V_2*, 1-26.

Rondeau, D. (**2017b**). Spectrométrie de masse organique – Analyseurs et méthodes en tandem ou MS. *Techniques de l'ingénieur. Référence : P2647 V_1*, 1-32.

Rouessac, F. ; Rouessac, A. ; Cruché, D. ; Duverger-Arfuso, C. et Martel, A. (**2016a**). Spectrométrie de masse, dans : Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales. (8ème Ed.), *Dunod, ISBN 978-2-10-074688-0, Paris, France*, 385-430, 552p.

Rouessac, F. ; Rouessac, A. ; Cruché, D. ; Duverger-Arfuso, C. et Martel, A. (**2016b**). Chromatographie liquide haute performance, dans : Analyse chimique : Méthodes et

techniques instrumentales. (8ème Ed.), *Dunod, ISBN 978-2-10-074688-0, Paris, France*, 69-104, 552p.

Roussel, C.; Dayon, L.; Lion, N.; Rohner, T.C.; Josserand, J.; Rossier, J.S.; Jensen, H. and Girault, H.H. (**2004**). Generation of mass tags by the inherent electrochemistry of electrospray for protein mass spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 15, 1767-1779.

Rousis, N.I.; Bade, R.; Bijlsma, L.; Zuccato, E.; Sancho, J.V.; Hernandez, F. and Castiglioni, S. (**2017**). Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. *Environmental Research*, 156, 31–38.

Ruokolainen, M.; Gul, T.; Permentier, H.; Sikanen, T.; Kostiainen, R. and Kotiaho, T. (**2016**). Comparison of TiO_2 photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 36–44.

§

Sahni, V. and Slamet, M. (**1999**). Electron correlations in Khon-Sham exchange-only theory. *International Journal of Quantum Chemistry*, 71, 475-480.

Salvestrini, S.; Di-Cerbo, P. and Capasso, S. (**2002**), Kinetics of chemical degradation of diuron. *Chemosphere*, 48, 69 – 73.

Sánchez-Peña, L.C. ; Reyes, B.E. ; Lopez-Carillo, L. ; Recio, R. ; Moran-Martinez, J. ; Cebrian, M. E. and Quintanilla-Vega, B. (**2004**). Organophosphorous pesticide exposure alters spermchromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 108-113.

Santos, M.S.F.; Alves, A. and Madeira, L.M. (**2016**). Chemical and photochemical degradation of polybrominated diphenyl ethers in liquid systems-A review. *Water Research*, 88, 39–59.

Schiavon, M.; Perrin-Ganier, C. et Portal, J. M. (**1995**). La pollution de l'eau par les produits phytosanitaires : Etat et origine. *Agronomie*, 15, 157-170.

Schofield, P. C.; Robertson, I. G. C. and Paxton, J. W. (**2000**). Inter-species variation in the metabolism and inhibition of N-[(2'-dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA) by aldehyde oxidase. *Biochemistry Pharmacology*, 59, 161-165.

Schwarzenbach, R. P.; Gschwend P. M. and Dieter, M. I. (**1993**). Environmental organic chemistry. *New York, NY, John Wiley et Sons, Inc, ISBN:978-1-118-76723-8*, 1024p.

Schymanski, E.L.; Singer, H.P.; Slobodnik, J.; Ipolyi, I.M.; Oswald, P.; Krauss, M.; Schulze,

T.; Haglund, P.; Letzel, T. and Grosse, S. (**2015**). Non-target screening with high resolution mass spectrometry: Critical review using a collaborative trial on water analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 6237–6255.

Shaw, J.B.; Lin, T.-Y.; Leach, F.E.; Tolmachev, A.V.; Tolić, N.; Robinson, E.W.; Koppenaal, D.W. and Paša-Tolić, L.J.J. (**2016**). 21 Tesla Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometers greatly expands mass spectrometry toolbox. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 1929–1936.

Singh, S.; Singh, N.; Kumar, V.; Datta, S.; Abdul, B.; Wani, D.; Singh, K. and Singh, Joginder Singh. (**2016**). Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental Chemistry Letters*, 14, 317–329.

Slamet, M. and Sahni, V. (**1992**). The gradient expansion approximation for exchange: A physical perspective. *International Journal of Quantum Chemistry*, 44, 333-345.

Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter, E.D. and Dawson, J.H. (**1996**). Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2841– 2887.

Soo-Myung, K. and Alfons, V. (**1998**). Degradation of organic pollutants by the photo-Fenton-process. *Chemical Engineering and Technology*, 21, 187–191.

Sørensen, S. R., Bending, G. D., Jacobsen, C. S., Walker, A., and Aamand, J. (**2003**). Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, 1-11.

Sørensen, S. R., Juhler, R. K., and Aamand, J. (**2013**). Degradation and mineralisation of diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic µg L^{-1} diuron concentration. *Pest Management Science*, 69, 1239-1244.

Soulas, G. (**1999**). Techniques d´écotoxicité des substances xénobiotiques vis-à-vis de la microflore des sols. *Ingénieries-EAT*, 19, 57-66.

Speight, J.G. (**2017**). Chemical transformations in the environment. in: environmental organic chemistry for engineers. *Butterworth-Heinemann: Oxford, U.K.*, 305-353.

Stephen, G.; Tapan, S. and Samuel, H. (2005). Structure determination and characterization of carbendazim Hydrochloride Dihydrate. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 1-19.

Swartz, E.M. (**2005**). UPLC™: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1253-1263.

T

Taylor, A.W. and Spencer, W.F. (**1990**). Volatilization and vapor transport processes. *Soil*

Science Society of America Book Series, N°2, 213-269.

Teadoum, D. N.; Noumbo, S.K.; Kamdem, A. T.; Temgoua, R. C. T.; Mvondo, A.D. and Tonle, I.K. (**2016**). Square Wave Voltammetric Determination of Residues of Carbendazim Using a Fullerene/Multiwalled Carbon Nanotubes/Nafion/Coated Glassy Carbon Electrode. *International Journal of Electrochemistry*, 1-9.

Temgoua, R. C.T.; Bussy, U.; Alvarez-Dorta, D.; Galland, N.; Hémez, J.; Tonlé, I. K. and Boujtita, M. (**2020**). Simulation of the environmental degradation of diuron (herbicide) using electrochemistry coupled to high resolution mass spectrometry. *Electrochimica Acta*, 352, 136485.

Tixier, C.; Sancelme, M.; Sancelme, M.; Bonnemoy, F.; Cuer, A. and Veschambre, H. (**2001**). Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1381–1389.

Torstenson, L.; Cederlund, H; Borjesson, E. and Stenstron, J (**2003**). Environmental problems with the use of diuron on swedish railways. *Pesticide Outlook*, 3, 108-111.

U

Union Européenne (**2008**). Directive n°2008/105/EC, on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.

V

Van Berkel, G. J. (**2004**). Focus issue on electrochemistry combined with mass spectrometry. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 15, 1691-1692.

Van Berkel, G.J.; McLuckey, S.A. and Glish, G.L. (**1992**). Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra. *Analytical Chemistry*, 64, 1586-1593.

Van Leeuwen, S. M.; Blankert, B.; Kauffmann, J. M. and Karst, U. (**2005**). Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 742–750.

Veerappan, M.; Rajkumar, D.; Shen-Ming, C.; Tzu-Ying, W. and Kohilarani, K. (**2015**). High-performance electrochemical amperometric sensors for the sensitive determination of phenyl urea herbicides diuron and fenuron. *Ionics*, 21, 2675–2683.

Ventura, A.; Jacquet, G.; Bermond, A. and Camel, V. (**2002**). Electrochemical generation of the Fenton's reagent: Application to atrazine degradation. *Water Research*, 36, 3517–

3522.

Von Gunten, U. (**2018**). Oxidation processes in water treatment: Are we on track? *Environmental Science and Technology*, 52, 5062–5075.

W

Wang, J. (**2006a**). Fundamental concepts, in: Analytical electrochemistry (3rd Ed.), *Wiley-VCH, ISBN 100-471-67879-1, New Jersey, USA*, 1-28, 250p.

Wang, J. (**2006b**). Controlled-potential techniques, in: Analytical electrochemistry (3rd Ed.), *Wiley-VCH, ISBN 100-471-67879-1, New Jersey, USA*, 67-114, 250p.

Wang, X.; Wang, D.; Wang, Y.; Zhang, P.; Zhou, Z. and Zhu, W. (**2016**). A combined non-targeted and targeted metabolomics approach to study the stereoselective metabolism of benalaxyl enantiomers in mouse hepatic microsomes. *Environmental Pollution*, 212, 358–365.

Wang, Z.; Wang, Y.; Gong, F.; Zhang, J.; Hong, Q. and Li, S. (**2010**). Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium Rhodococcus jialingiae djl-6-2. *Chemosphere*, 81, 639–644.

Wang, Z.Y.; Zhang, Y.Y.; Liu, B.W.; Wu, K.; Thevuthasan, S.; Baer, D.R.; Zhu, Z.H.; Yu, X.Y. and Wang, F.Y. (**2017**). In situ mass spectrometric monitoring of the dynamic electrochemical process at the electrode-electrolyte interface: A SIMS approach. *Analytical Chemistry*, 89, 960-965.

Wilber, G.G. and Wang, G. (**1997**). Biotransformation of herbicides in the presence of various electron acceptors. *Journal of the Airandt Waste Management Association*, 47, 690-696.

Wigger, T.; Seidel, A. and Karst, U. (**2017**). Electrochemistry coupled to (LC-)MS for the simulation of oxidative biotransformation reactions of PAHs. *Chemosphere*, 176, 202-211.

Wong, A.; Roberto de Vasconcelos, M. L. and Del Pilar Taboada, M. S. (**2013**). Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel(II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H,31H-phthalocyanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 690, 83–88.

X

Xie, Y.L.; Zhao, Z.D.; Zhang, X.L.; Tang, L.L.; Zhang, Y. and Zhang, C.H. (**2017**). Simultaneous analysis of herbicide metribuzin and its transformation products in tomato using QuEChERS-based gas chromatography coupled to a triple quadrupole

mass analyzer. *Microchemical Journal*, 133, 468–473.

Y

Yang, Y.; Wang, H.; Huang, L.; Zhang, S.; He, Y.; Gao, Q. and Ye, Q. (**2017**). Effects of superabsorbent polymers on the fate of fungicidal carbendazim in soils. *Journal of Hazardous Material*, 328, 70–79.

Yaser, A.; Youssef and Tatal, S. A. (**2011**). Photolysis of some benzimidazole based pesticides, in: *pesticides in modern world-trends in pesticides analysis (Ed.), Intech., ISBN 978-953-307-437-5, Rijeka, Croatia*, 43-54.

Z

Zabaleta, I.; Bizkarguenaga, E.; Nunoo, D.B.O.; Schultes, L.; Leonel, J.; Prieto, A.; Zuloaga, O. and Benskin, J.P. (**2018**). Biodegradation and uptake of the pesticide sulfluramid in a soil-carrot mesocosm. *Environmental Science and Technology*, 52, 2603–2611.

Zacharia and Tano, J. (**2011**). Identity, physical and chemical properties of pesticides, in: *pesticides in modern world-trends in pesticides analysis (Ed.), Intech, ISBN 978-953-307-437-5, Rijeka, Croatia*, 3-20.

Zarei, K. and Khodadadi, A. (**2017**). Very sensitive electrochemical determination of diuron on glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide–gold nanoparticle–Nafion composite film. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 171–177.

Zedda, M.; Zwiener, C. (**2012**). Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2493–2502.

Zhang, D.; Luo, G.; Ding, X. and Lu, C. (**2012**). Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmacologica Sinica B*, 2, 549–561.

Zhang, Z.; Gao, Z.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Dong, J. and Yue, T. (**2017**). Transformation products elucidation of forchlorfenuron in postharvest kiwifruit by time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE*, 12, 1-15.

Zhang, Z. and Tang, W. (**2018**). Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmacologica Sinica B*, 8, 721–732.

Zoski, C. G. (**2007**). Electrochemical methods, in: Handbook of electrochemistry (1st Ed.), *Elsevier, ISBN 10 0-444-51958-0, Amsterdam, Holland*, 836-848, 934p.

UNIVERSITE MATIERE BRETAGNE MOLECULES LOIRE ET MATERIAUX

UNIVERSITÉ DE NANTES

UNIVERSITÉ DE DSCHANG
UNIVERSITY OF DSCHANG

Titre : **Simulation des dégradations environnementales de quelques pesticides électroactifs par couplage électrochimie - spectrométrie de masse haute résolution - calculs théoriques *DFT***

Mots clés : Pesticides, EC-SM, EC-CL-SM, *DFT*, simulation électrochimique, dégradation environnementale, voltampérométrie massique.

Résumé : La simulation/prédiction des dégradations environnementales de xénobiotiques est un axe de recherche important qui permet de mieux comprendre les risques potentiels que représentent les contaminants organiques dans les systèmes environnementaux. L'objectif principal de ce travail de thèse est la mise en œuvre des couplages hybrides associant un dispositif électrochimique (EC) avec les outils analytiques que sont la chromatographie liquide (CL) et la spectrométrie de masse (SM) [(couplages EC-CL-SM et EC-SM)] pour la simulation des dégradations dans l'environnement de quelques pesticides électroactifs. Le mécanisme de dégradation oxydative de ces pesticides a été étudié à l'aide d'une cellule électrochimique en flux directement couplée à un spectromètre de masse pour une identification rapide de leurs produits de dégradation. Dans un premier temps, l'élucidation du comportement électrochimique du diuron (herbicide phénylurées) a été possible au travers de l'identification de ses produits d'oxydation par l'utilisation des couplages EC-LC-SM et EC-SM. Dans un second temps, le mimétisme par électrochimie de la dégradation environnementale de sept autres herbicides (fénuron, monuron, isoproturon, chlortoluron, métoxuron, monolinuron, linuron) de la même famille que le diuron a été mise en œuvre. La troisième partie a portée sur l'étude du comportement/dégradation électrochimique d'un fongicide de la famille des carbamates (carbendazime). En plus des produits de transformation connus pour ces pesticides étudiés, deux nouveaux produits de dégradation très instables ont été identifiés dans ce travail pour la première fois, principalement les quinones imine et les ions nitrenium. Tous les résultats obtenus au cours de cette étude ont été étayés par des calculs de mécanique quantique (DFT).

Title: **Simulation of the environmental degradation of selected electroactive pesticides through coupling of electrochemistry - high resolution mass spectrometry - DFT theoretical calculations**

Keywords: Pesticides, EC-MS, EC-LC-MS, DFT, electrochemical simulation, environmental degradation, mass voltammetry.

Abstract: The simulation/prediction of the environmental degradations of xenobiotics is an important field of research which allows to better understand the potential risks that represent organic contaminants in environmental systems. The main objective of this work is the implementation of hybrid couplings, associating an electrochemical device (EC) with analytical tools that are liquid chromatography (LC) and mass spectrometry MS [(EC-LC-MS and EC-MS couplings)] for simulation of the environmental degradation of selected electroactive pesticides. The oxidative degradation of this fungicide was studied using an electrochemical flow-through cell directly coupled to a mass spectrometer for rapid identification of their degradation products. Firstly, the elucidation of the electrochemical behavior of diuron (phenylurea herbicide) was possible through the identification of its oxidation products using EC-LC-MS and EC-MS couplings. Secondly, the mimicry by electrochemistry of the environmental degradation of seven other herbicides (fenuron, monuron, isoproturon, chlortoluron, metoxuron, monolinuron, linuron) was implemented. The third part focused on the study of the electrochemical behavior/degradation of a fungicide of the carbamate family (carbendazim). In addition to the known transformation products for these studied pesticides, two new very unstable degradation products have been identified in this work for the first time, mainly quinones imine and nitrenium ions. All the results obtained during this study were supported by quantum mechanics calculations (DFT).