



Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires

Danièle Pro

► To cite this version:

Danièle Pro. Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires. Chimie organique. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, 2011. Français. NNT : ENSCR-003 . tel-00682105

HAL Id: tel-00682105

<https://theses.hal.science/tel-00682105>

Submitted on 23 Mar 2012

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

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



THESE / ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE RENNES

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'ENSCR

*Mention : Sciences Chimiques
Sciences De La Matière*

présentée par

Danièle Pro

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche (n°6226)
Sciences Chimiques de Rennes

Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires

Thèse soutenue le 4 novembre 2011,
devant le jury composé de :

Jean-Louis FELLOUS
Directeur exécutif – COSPAR / *Président*

Eric DESLANDES
Professeur des Universités – Université de Brest / *Rapporteur*

Sébastien FORT
Chargé de recherche / HDR – CERMAV CNRS UPR 5301 / *Rapporteur*

Alain OURRY
Professeur des Universités – INRA Caen / *Examineur*

Jean-Claude YVIN
Directeur R&D – Timac Agro International Dinard / *Examineur*

Caroline NUGIER-CHAUVIN
Maître de Conférences / HDR – ENSCR CNRS UMR 6226

Vincent FERRIERES
Professeur des Universités – ENSCR CNRS UMR 6226

Remerciement

Cette thèse a été effectuée au sein de l'UMR 6226 dans l'équipe "Chimie Organique et Supramoléculaire" située à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. Je remercie tout d'abord le groupe Roullier pour avoir initié le projet AZOSTIMER, dans lequel se sont inscrits ces travaux de thèse et le pôle de compétitivité Mer-Bretagne pour l'avoir financé.

Je remercie vivement M. Éric DESLANDES et M. Sébastien FORT pour avoir accepté de donner leur temps et leur énergie pour juger mes travaux de thèse et d'en être les rapporteurs. Je tiens tout particulièrement à remercier M. Jean-Louis FELLOUS pour avoir accepté, sans la moindre hésitation, de faire partie de mon jury de thèse. Je tiens également à lui témoigner toute ma gratitude pour avoir soutenu très tôt mon intérêt pour la recherche. J'adresse aussi mes sincères remerciements à M. Jean-Claude YVIN, porteur du projet AZOSTIMER et à M. Alain OURRY, également acteur du projet, pour avoir accepté de faire partie de cette commission d'examen, ainsi que pour tout ce qu'ils ont apporté à ces travaux, pour leurs idées, leurs suggestions et leurs éclaircissements.

Je suis particulièrement reconnaissante envers mes directeurs de thèse, M. Vincent FERRIERES et Mme. Caroline NUGIER-CHAUVIN, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et m'avoir accordé toute leur confiance. Durant ces trois années de travail, ils ont su modérer mon caractère spontané, ils ont été particulièrement à l'écoute dans les moments difficiles et m'ont appris énormément, tant au niveau scientifique qu'en matière de communication.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les acteurs du projet AZOSTIMER, qui ont apporté leur contribution à ces recherches : l'équipe CIP de l'ENSCR, l'équipe de l'INRA de Caen, les équipes de Timac Agro International de Pampelune et Dinard, l'équipe de FORCE-A et celle d'Anaximandre. Ce fut un réel plaisir de travailler avec eux, dans une ambiance toujours très amicale.

Merci plus particulièrement à M. Dominique WOLBERT pour sa réelle implication et ses nombreux éclaircissements sur l'interprétation des résultats de tests biologiques, à M. José-Maria GARCIA-MINA pour m'avoir accueillie dans son laboratoire en Espagne et m'avoir transmis de nombreuses connaissances sur l'évaluation des inhibiteurs d'uréases et de la nitrification et à M. Mustapha ARKOUN et M. Xavier SARDA pour les très nombreux tests réalisés sur les sols. Enfin, à M. Samuel HUGUET, avec qui j'ai pu réaliser un réel travail en binôme, un merci tout particulier pour les nombreuses expériences réalisées ensemble, les longs échanges d'idées et de connaissances, le soutien, la compréhension et l'amitié.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers M. Jean MORVAN pour son investissement pendant ces trois années. Il m'a tout enseigné sur la culture des bactéries nitrifiantes et a été d'une grande aide dans l'interprétation des résultats de tests biologiques. Merci aussi à Fatiha et Daouia pour m'avoir épaulé avec une extrême gentillesse lors des tests de DBO, à Lidia pour m'avoir aidé à mettre en place le réacteur de bactéries nitrifiantes et à toute l'équipe CIP pour leur accueil et leur sympathie. Pendant un moment, cette équipe aura vraiment été comme la mienne.

Je tiens à remercier M. Jean-Claude GUILLEMIN pour ses nombreux conseils sur la chimie du phosphore et sur l'utilisation de l'ammoniac gaz, M. Jean-Paul GUEGAN pour son aide sur les expérimentations par RMN et pour sa disponibilité, et Mme. Sylvie JAOUEN pour m'avoir si souvent épaulé dans les démarches administratives. Un grand merci aussi à M. Richard DANIELLOU et à M. Laurent LEGENTIL pour avoir porté regard extérieur sur mes travaux, mais aussi pour les bons moments de rigolade.

Je remercie sincèrement tous mes collègues et amis, Rémy, Balla, Alizé, Ilona, Yari, Ana, Mélanie, Claudie, Élodie, Hakima et Dimitri, pour la bonne ambiance au laboratoire et pour tout ce que nous avons partagé pendant ces trois années. Sans oublier tous mes amis, Francis, Séverine, Maëva, Jérôme, Sabine, Mich, Kwikwi, Cécile, Sévan, Guich, Amélie, et Marie-Laure, qui n'ont pas été les témoins directs de mon anxiété, mes surprises ou mes déceptions au travail, mais qui ont toujours été là quand j'en avais besoin.

Je ne peux oublier de remercier Florica, ma professeur de violon et le Melting'notes Orchestra, orchestre d'harmonie qui m'a accueilli dans ses rangs. En six années sans musique, j'avais oublié la sensation de détente et le plaisir que cela procure. Or, rien de tel que la musique pour se vider l'esprit après une difficile journée de travail et repartir de plus belle.

Enfin, je ne peux qu'exprimer ma plus profonde gratitude envers ma famille, mes parents et mes beaux-parents pour leur présence, leur soutien et leur réconfort. Maman, malgré les 900 km qui nous séparent tu as toujours été là et tu as pu suivre tous les rebondissement, les bons comme les mauvais. Cela n'a pas du être facile tous les jours pour toi et c'est aussi grâce à toi que j'ai pu aller jusqu'au bout de mon projet.

Pour finir, il y a une personne qui m'a soutenue au quotidien, qui a subi mes sautes d'humeurs et les a supportées avec une patience infinie... ou presque, qui a calmé mes anxiétés, modéré mes excès de joie, m'a aidé à prendre du recul et m'a même donné quelques idées. Maëlig, ce n'est pas sans émotion que je te fais part de toute ma gratitude pour tout ce que tu as fais et supporté pour moi.

Liste des abréviations

Ac : Acétyle
AH : Acide humique
AHA : Acide acétohydroxamique
AMO : Ammonium monooxygénase
Anammox : Oxydation anaérobie de l'ammonium
Araf : Arabinofuranose
BME : β -mercaptoéthanol
BOD : Demande biologique en oxygène
BPU : Urease *Bacillus pasteurii*
Bz : Benzyle
BZI : Benzimidazole
BZT : Benzothiazole
Cel : Cellobiose
CD α : Cyclodextrine alpha
CD β : Cyclodextrine bêta
CD γ : Cyclodextrine gamma
COD : Demande chimique en oxygène
COSY : Correlation spectroscopy
DAP : Diaminophosphate
DATP : Acide diaminothiophosphorique
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNRA : Réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium
DPhP : Diamide phénylphosphonique
EC₅₀ : Concentration tuant 50 % des bactéries
Gen : Gentiobiose
Glc : Glucose
HAO : Hydroxylamine oxydoréductase
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
HRMS : Spectroscopie de masse à haute résolution
HSQC : Heteronuclear single quantum coherence
IC₅₀ : Concentration inhibant 50 % des enzymes
JBU : Urease Jack Bean
KAU : Urease *Klebsiella aerogenes*
Lac : Lactose
LC/MS : Chromatographie liquide / Spectroscopie de masse
MBI : 2-mercapto-benzimidazole
MBT : 2-mercapto-benzothiazole
MMO : Méthane monooxygénase
mp : Point de fusion
MTBI : 2-méthylthiobenzimidazole
MTBT : 2-méthylthiobenzothiazole
NBPT : *N*-butyl-thiophosphotriamide
NBPTO : *N*-butyl-phosphotriamide
NBzPT : *N*-benzoyl-phosphotriamide
NMR : Nuclear magnetic resonance
NPhPT : *N*-phényl-phosphotriamide

NVrPT : *N*-valéroyl-phosphotriamide

OHBI : 2-hydroxybenzimidazole

OHBT : 2-hydroxybenzothiazole

PEG : Poly-éthylène-glycol

Ph : Phényle

PPD : Phénylphosphorodiamidate

Rf : Rapport frontal

T-ROESY : Transverse rotating-frame overhauser enhancement spectroscopy

THF : Tétrahydrofurane

TLC : Chromatographie sur couche mince

TOCSY : Total correlation spectroscopy

Vr : Valéroyl

Table des matières

Remerciement	1
Liste des abréviations	3
Introduction générale	
Le cycle de l'azote et l'agriculture intensive	7
Amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote dans l'agriculture	9
Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification disponibles dans le commerce	10
Orientation des recherches	12
Objectifs de la thèse	15
Références bibliographiques	17
I. Nouveaux inhibiteurs glycosylés de la nitrification	
1. L'inhibition de la nitrification	19
1.1. Le cycle de l'azote microbien des sols	19
1.2. Les ammonium monooxygénases (AMO)	21
1.3. Les inhibiteurs de la nitrification	24
2. Design et synthèse de nouveaux inhibiteurs de la nitrification	29
2.1. Le 2-mercapto-benzothiazole : Intérêts de la glycosylation	29
2.2. Synthèse de nouvelles molécules glycosylées	29
3. Évaluation des propriétés physico-chimiques et de l'écotoxicité	35
3.1. Hydrosolubilité	35
3.2. Ecotoxicité	36
3.2.1. "Microtox Acute"	36
3.2.2. Mesures de DBO ₅	36
3.3. Stabilité vis-à-vis du pH	37
4. Évaluation de l'inhibition de la nitrification sur un modèle <i>in vitro</i>	39
4.1. Culture de bactéries nitrifiantes	39
4.2. Tests d'inhibition de la nitrification en l'absence de bactéries hétérotrophes	39
4.3. Tests d'inhibition de la nitrification en présence de bactéries hétérotrophes	41
5. Expérimentations sur sols	47
5.1. Inhibition de la nitrification <i>in vivo</i>	47
5.2. Analyse des dégradations	48
5.3. Analyse de la mobilité	52
6. Conclusion	55
Experimental part	57
Références bibliographiques	79
II. Inhibition des uréases	
7. Les uréases et le NBPT	83
7.1. Mécanisme des uréases	83
7.2. Mode d'action de quelques inhibiteurs connus	86
7.3. Le NBPT, inhibiteur d'intérêt	88
7.3.1. Mécanisme d'inhibition des uréases par le NBPT	88
7.3.2. Avantages et inconvénients du NBPT	89
7.3.3. Suivi de la dégradation du NBPT en milieu tamponné acide	90

8. Stabilisation du NBPT par des formulations	93
8.1. Adsorption sur la wollastonite	93
8.2. Encapsulation dans des acides humiques	95
8.3. Stabilisation par des polysaccharides	99
8.3.1. Polysaccharides algaux	99
8.3.2. Amidon	103
8.4. Stabilisation par des cyclodextrines	105
8.4.1. Optimisation de la formulation	106
8.4.2. Caractérisation de la formulation retenue	107
8.4.3. Mesure de l'activité de la formulation	111
8.5. Conclusion	113
9. Modulations chimiques du NBPT	115
9.1. Nouvelles molécules cibles	115
9.1.1. Étude des modulations existantes	115
9.1.2. Effets électroniques stabilisants	116
9.1.3. Nouvelles modulations du NBPT	116
9.2. Synthèses des molécules cibles	117
9.2.1. <i>N</i> -aryl-phosphotriamides et <i>N</i> -alkyl-phosphotriamides	117
9.2.2. <i>N</i> -acyl-phosphotriamides	118
9.2.3. <i>N</i> -Acétyl- <i>N</i> -aryl-phosphotriamides et <i>N</i> -Acétyl- <i>N</i> -alkyl-phosphotriamides	120
9.2.4. Diamides phosphoniques	121
9.2.5. Bilan	122
9.3. Évaluation de la stabilité en milieu tamponné acide	122
9.4. Étude de l'inhibition des uréases	124
9.4.1. Activité <i>in vitro</i>	124
9.4.2. Activité dans les sols	125
9.5. Conclusion	127
Experimental part	129
Références bibliographiques	141

Conclusion générale

Introduction générale

L'humanité traverse aujourd'hui une crise sans précédent : crise climatique, énergétique, alimentaire, crise de l'eau, crise économique... La démographie humaine ne cessant de croître, les ressources naturelles s'épuisent. Les solutions apportées du XIX^e au XX^e siècle, bien qu'ayant répondu efficacement à ces évolutions, ont aussi entraîné leur lot de dérèglements environnementaux. Une nouvelle problématique est lancée. Il faut répondre aux besoins de l'Homme, tout en ménageant la planète.

Le secteur agricole est particulièrement affecté. Les agriculteurs, déjà touchés de plein fouet par la crise financière, sont les premiers à subir les conséquences du réchauffement climatique : dans certaines parties du globe, la désertification gagne du terrain sur les terres agricoles, les sols s'appauvrissent, les rendements diminuent. Malgré cela, l'utilisation d'engrais et de pesticides, bien que nécessaire pour répondre à la demande toujours croissante en nourriture, est pointée du doigt. Le développement de produits phytosanitaires de nouvelle génération est aujourd'hui crucial, des produits plus efficaces, peu coûteux et dont l'impact environnemental reste limité.

C'est dans ce contexte qu'est né le projet AZOSTIMER, initié par le groupe Roullier, et financé par le pôle de compétitivité Mer-Bretagne. Son objectif est d'optimiser l'efficacité des engrais azotés pour limiter leur l'impact sur l'environnement. Ces recherches ont associé plusieurs laboratoires académiques (INRA de Caen, équipes CIP et COS de l'ENSC Rennes) avec des organismes privés (Timac Agro International à Dinard et à Pampelune en Espagne, Force-A, Anaximandre) dans un désir commun, celui d'apporter une réponse innovante aux problèmes posés par la fertilisation azotée.

Le cycle de l'azote et l'agriculture intensive

Le cycle de l'azote

Le cycle de l'azote est un équilibre complexe mettant en jeu de multiples transformations entre les nombreuses formes de l'azote, organique ou minéral. Des processus très variés, dus aux métabolismes animal, végétal et microbien, orchestrent ces multiples transformations.

Lors du cycle de l'azote naturel (figure 1), les ammoniums du sol (NH_4^+) peuvent provenir de différentes sources : (i) l'azote gaz de l'atmosphère (N_2) est fixé par des bactéries ou par les plantes légumineuses qui le rejettent par l'intermédiaire du rhizobium ; (ii) l'azote organique contenu dans les résidus végétaux ou animaux, ou encore dans les excréments, est dégradé par les champignons et les micro-organismes décomposeurs ; (iii) l'azote consommé par les animaux est partiellement rejeté dans l'urine sous forme d'urée, puis dégradée par les uréases microbiennes. Une partie des ammoniums ainsi apportés aux sols peut rester immobilisée dans les argiles. Une faible proportion peut également être assimilée par les plantes ou perdue dans l'atmosphère par volatilisation. Mais la majorité des ammoniums entrent dans le processus de nitrification où ils sont tout d'abord oxydés en nitrites (NO_2^-) par les bactéries *Nitrosomonas*, puis en nitrates (NO_3^-) par les *Nitrobacter*. Les nitrates sont l'élément essentiel de la nutrition des plantes. Ces dernières en consomment une grande partie pour leur croissance. Les nitrates qui ne sont pas assimilés alimentent le processus bactérien de dénitrification. L'azote retourne alors dans l'atmosphère sous forme d'azote gaz (N_2), bouclant ainsi le cycle, mais aussi sous forme d'oxydes gazeux (N_2O , NO_2). Enfin, une fraction des nitrates sont entraînés dans le sol par les eaux pluviales pour rejoindre les nappes phréatiques, lacs et rivières, jusqu'à l'océan.

Les conséquences de l'agriculture intensive sur l'environnement

L'équilibre du cycle de l'azote est fragile et l'activité humaine intensive cause aujourd'hui de graves dérèglements. C'est notamment le cas de l'agriculture. L'utilisation intensive d'engrais azotés, permettant d'augmenter les rendements de production agricole, est devenue aujourd'hui indispensable. L'urée, grâce à son faible coût, est le fertilisant azoté le plus important dans l'agriculture mondiale. Elle est généralement associée au nitrate d'ammonium. L'important apport d'azote dans les sols déséquilibre la balance de l'écosystème et des substances azotées s'accumulent, entraînant leur lot de dérèglements environnementaux. Les nitrates, issus des bio-transformations de l'urée et des ammoniums atteignent des concentrations bien supérieures à celles que les cultures sont capables d'absorber. Une grande partie de cet ion est par conséquent perdue, en dehors de la zone d'utilisation par lessivage d'une part, dans l'atmosphère par dénitrification d'autre part. Souvent, moins de 30 % de l'azote appliqué dans les fertilisants sont assimilés par les plantes [18].

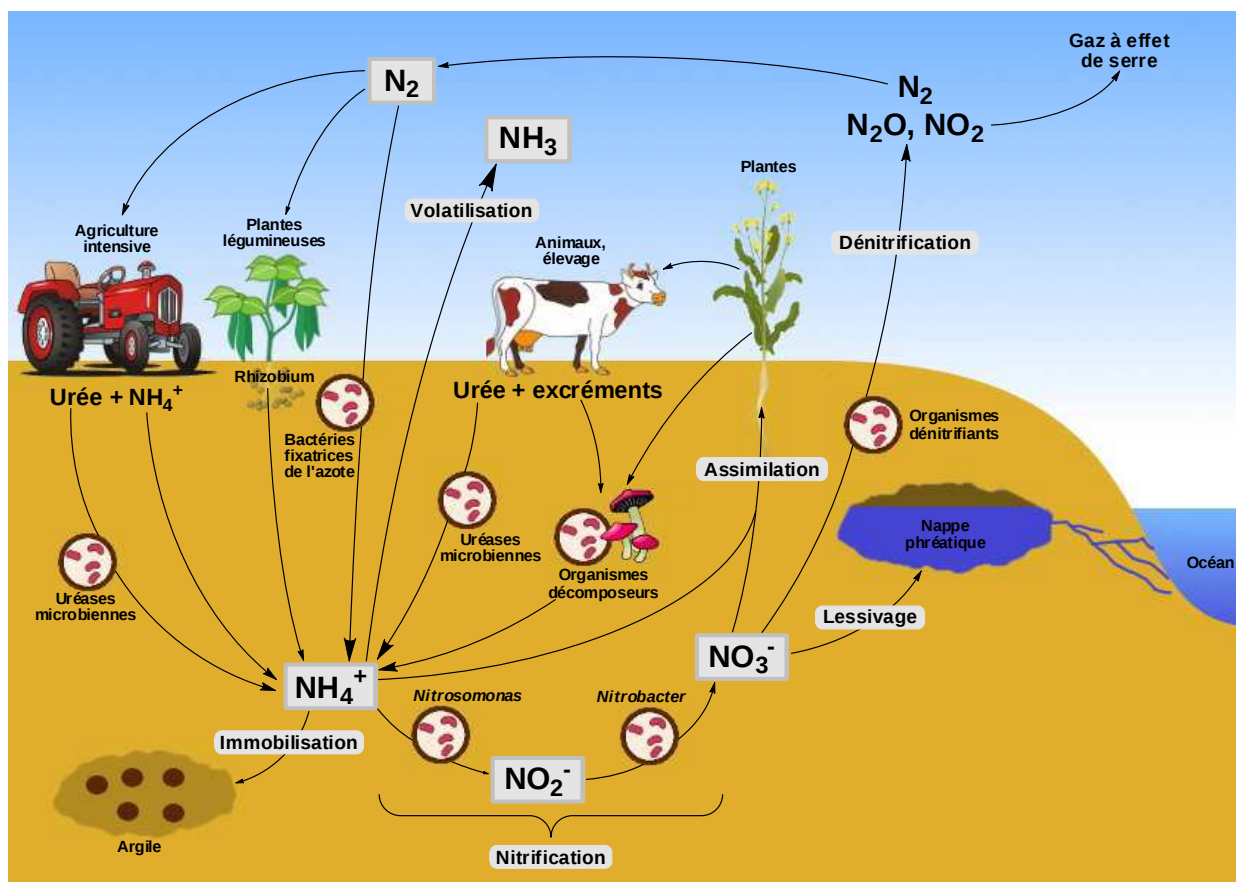


FIGURE 1. Cycle de l'azote [13, 9]

L'agriculture intensive n'est pas la seule mise en cause. L'élevage est aussi à l'origine de nombreux rejets d'azote, provenant de l'urine des animaux, mais également de l'épandage de fumier, polluant notamment les zones de pâturages [3, 10].

Les pertes d'azote sont un enjeu majeur pour l'environnement. En effet, les oxydes gazeux rejetés dans l'atmosphère ont un effet catalytique sur la destruction de la couche d'ozone et font partie des gaz à effet de serre. Le processus de dénitrification est la source principale d'hémioxyde d'azote (N_2O), cause essentielle de la destruction de la couche d'ozone entre 15 et 35 km d'altitude. En conséquence de l'utilisation intensive d'engrais ces trente dernières années, la concentration de cette molécule dans la troposphère a augmenté à raison de 2 à 3 % par décennie [5].

Les nitrates, quant à eux, sont considérés comme le second plus important polluant des eaux souterraines. Les concentrations élevées en nitrates dans les eaux naturelles sont dues à la forte hydrosolubilité de cet ion et dépendent notamment du taux de précipitations. De grandes concentrations en nitrates dans les eaux naturelles peuvent présenter un danger pour la santé des humains et des animaux, et favorisent la prolifération des algues, causant l'empoisonnement de la faune aquatique. La "dead zone" dans le golfe de Mexico en est un parfait exemple : l'excès de nitrates a provoqué une forte croissance des algues. La mort de ces algues s'est accompagné d'un épuisement en oxygène à cause de l'activité bactérienne associée à leur décomposition. Ceci a causé la fuite des poissons et la mort des animaux ne pouvant pas s'échapper. Plus localement, la prolifération des algues vertes en Bretagne a provoqué de nombreuses morts animales, dues à l'émission de gaz toxiques lors de leur dégradation.

Chez l'Homme, la consommation de fortes concentrations de nitrates cause d'importants problèmes de santé, particulièrement chez les nourrissons avec des cas de méthémoglobinémie appelés le "syndrome du bébé bleu". Une consommation chronique de nitrates peut également déclencher chez l'homme des cancers gastriques, des cancers de la vessie, ou encore des lymphomes non-hodgkinien. La concentration maximale en nitrates acceptée dans l'eau

potable est de 45 mg/L. Dans certaines eaux peu profondes en Inde, des concentrations atteignant les 100 mg/L ont été mesurées, résultat d'une utilisation excessive d'engrais. En effet, l'Inde consomme 62 % des fertilisants produits [17].

Et ce n'est pas tout. Une hydrolyse trop importante de l'urée augmente la concentration en ammoniac et donc le pH du sol, ce qui peut se révéler toxique pour les semis et la germination [1]. De fortes concentrations en ammoniums augmentent également les fuites de NH_3 dans l'atmosphère par volatilisation, allant parfois jusqu'à plus de 50 % de pertes. Celles-ci sont particulièrement importantes dans les cas où l'urée a été appliquée en surface, sur des sols de faible capacité d'adsorption ou de pH élevé. Des températures élevées et l'absence de précipitations favorise également la volatilisation de l'ammoniac [7, 15, 20].

Un accroissement des nitrites est également à éviter à cause de la forte toxicité de cette entité envers les plantes, mais aussi les animaux et l'Homme. Heureusement, leur concentration reste généralement très faible. Cependant, des cas d'accumulation de nitrites ont parfois été observés, par exemple en 1994 dans la rivière Hai-Luan en Chine, où leur concentration a grimpé bien au-delà des 200 $\mu\text{g/L}$ acceptables. L'accumulation de nitrites dans les cultures est le résultat de deux facteurs : une forte concentration en ammoniums et un pH élevé du sol [16].

Tous les dérèglements écologiques provoqués par l'utilisation excessive de fertilisants azotés présentent un danger pour l'environnement, mais aussi pour la santé animale et humaine. Il est donc nécessaire de limiter les rejets d'azotes dus à l'agriculture intensive.

Amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote dans l'agriculture

Certaines astuces existent pour améliorer l'absorption de l'azote par les plantes. Par exemple, une structure aérée du sol, un taux idéal en humus, un approvisionnement adéquat en eau, sont autant de facteurs capables d'améliorer la croissance des racines. Cependant, ces facteurs sont délicats à contrôler et ces solutions ne sont pas suffisantes. Les producteurs de fertilisants ont donc été emmenés à développer de nouveaux types d'engrais, capables de ralentir le relargage des substances nutritives. Deux types de fertilisants ont alors été mis au point : (i) les fertilisants à relargage lent ou contrôlé et (ii) les fertilisants stabilisés [19].

Les fertilisants à relargage lent ou contrôlé

Définition : "Un engrais contenant un élément nutritif pour les plantes, dans une forme qui, après application, retarde sa disponibilité pour l'absorption et l'utilisation par les végétaux, ou qui prolonge sa disponibilité significativement plus longtemps qu'une référence d' "engrais à éléments nutritifs rapidement disponibles" telle que le nitrate d'ammonium ou l'urée, le phosphate de potassium ou le chlorure de potassium. Ce délai par rapport à la disponibilité initiale ou cette période prolongée de disponibilité continue peut se produire par divers mécanismes, parmi lesquels une solubilité contrôlée du composé dans l'eau (au moyen de revêtements semi-perméables ou d'occlusion, ou encore grâce à l'insolubilité dans l'eau inhérente à des polymères, des matières organiques azotées naturelles, des matières protéiques ou d'autres formes chimiques), une hydrolyse lente de composés hydrosolubles, ou bien par d'autres moyens inconnus." Traduit de "Official Publication 57", AAPFCO (Association of American Plant Food Control Officials).

Différents types de fertilisants à relargage contrôlé ont été développés :

- les composés organiques azotés à faible solubilité qui se dégradent petit à petit dans les sols suivant des processus biologiques ou chimiques.
- les engrais dont le relargage est contrôlé par une barrière physique, le plus souvent hydrophobe. Ils sont présentés sous forme de granules, de tablettes ou de gels.
- les composés inorganiques de faible hydrosolubilité, tels que le MgNH_4PO_4 .

Ces engrais présentent l'avantage de relarguer les nutriments au fur et à mesure des besoins des cultures. Cependant de nombreuses limites existent. Le relargage des substances nutritives est fortement dépendant de facteurs non contrôlables, et il n'est pas rare d'obtenir un relargage trop rapide ou trop long. De plus, les engrais au relargage contrôlé par des barrières physiques laissent des résidus de matières synthétiques dans les sols, peu dégradables, qui s'accumulent au fur et à mesure des applications [19].

Les fertilisants stabilisés

Définition : "Un engrais auquel un stabilisateur d'azote a été ajouté (un stabilisateur d'azote est une substance ajoutée à un engrais, qui prolonge le temps pendant lequel le composé azoté de l'engrais reste sous forme ammoniacale ou uréique dans le sol)." Traduit de "Official Publication 57", AAPFCO (Association of American Plant Food Control Officials).

Dans ce cas, la stabilisation de l'azote se fait par le biais des inhibiteurs d'uréases et de la nitrification.

Définition d'un inhibiteur de la nitrification : "Une substance qui inhibe l'oxydation biologique de l'azote ammoniacal en azote nitrique."

Définition d'un inhibiteur d'uréases : "Une substance qui inhibe l'action hydrolytique des uréases sur l'urée."

Traduit de "Official Publication 57", AAPFCO (Association of American Plant Food Control Officials).

L'utilisation d'inhibiteurs de la nitrification, lorsqu'ils sont appliqués avec les engrais dans les sols, retarde le processus de bio-transformation des ammoniums en nitrates en limitant l'activité des bactéries nitrifiantes. Par conséquent, l'émission de nitrates est ralentie, et les pertes par lessivage ou par dénitrification sont limitées. Mais ce n'est pas là le seul avantage des inhibiteurs de la nitrification. Les ions ammoniums sont amenés à rester stockés dans les argiles et demeurent ainsi disponibles, favorisant la nutrition ammoniacale des plantes. La possibilité d'une utilisation directe des ammoniums a un effet positif sur la synthèse des polyamines, des cytokinines et des gibberellines des végétaux [12], ainsi que sur l'absorption du phosphore et de certains micro-nutriments [14]. De plus, les ammoniums stockés dans les sols qui n'ont pas été consommés par les plantes restent disponibles pour la culture suivante, diminuant alors l'apport nécessaire en nutriments azotés.

L'application d'inhibiteurs d'uréases réduit considérablement la volatilisation de l'ammoniac, ainsi que les dommages causés sur les semis. Les plantes sont aussi capables d'assimiler l'azote sous forme d'urée, et les inhibiteurs d'uréases favorisent ce type de nutrition, également bénéfique pour la croissance des végétaux [19]. Enfin, ces inhibiteurs ne sont pas uniquement utiles en agriculture, mais également en élevage ou dans les laiteries, où leur application sur les sols peut réduire significativement les émissions d'azote dues aux urines et au fumier [8, 23].

Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification disponibles dans le commerce

Alors que des centaines de molécules ont été testées, très peu ont été commercialisées. En effet, les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification doivent répondre à des critères d'efficacité et de respect de l'environnement, mais aussi de manutention et de coût. Les nombreuses conditions nécessaires à la commercialisation d'un nouvel inhibiteur rendent leur développement très long et onéreux [19].

- Ils ne doivent pas avoir d'effets secondaires défavorables pour la fertilité des sols.
- Ils ne doivent pas se dégrader en substances toxiques dans les sols.
- Ils ne doivent pas être toxiques pour les plantes, les animaux et l'Homme.
- Ils doivent être acceptables pour l'environnement.
- Ils doivent s'adapter à la complexité du système de production et doivent être viables économiquement.
- Ils doivent être stables durant la production, le stockage, le transport et l'utilisation.
- Leurs prix doivent être abordables pour les agriculteurs.
- Dans le cas des inhibiteurs d'uréases, ils doivent être compatibles avec les fertilisants contenant de l'urée.

Enfin, si une molécule répond à ces critères, le processus d'enregistrement, exigé avant l'autorisation de son utilisation dans l'agriculture, peut nécessiter plusieurs années. Les inhibiteurs ayant connu une commercialisation sont répertoriés dans les tableaux 1 et 2.

Outre l'éventail de molécules, de nombreuses formes sont proposées aux agriculteurs pour l'application des inhibiteurs dans les champs. Ils peuvent être proposés seuls, ou directement incorporés à l'engrais. Ils peuvent également être formulés sous forme liquide ou solide. Ce large choix permet une grande adaptabilité des traitements aux caractéristiques des sols et aux infrastructures de l'utilisateur. Les formes de commercialisation du DCD sont un excellent exemple d'adaptabilité, puisqu'il est possible, entre autres, de se procurer cette molécule seule (Guardian[®], Conklin Compagny), associée à d'autres inhibiteurs de la nitrification (Guardian[®]-DL, Conklin Compagny), mélangée à de l'urée (Alzon[®] 46, SKW Piesteritz), ou encore, incorporée dans des fertilisants composés d'ammoniums et de nombreux autres nutriments (Nitrophos[®] stabil, Nitrophoska[®] stabil, Basammon[®] stabil, BASF). De même, Agrotain International propose le NBPT sous forme d'Agrotain[®], formulation liquide

TABLEAU 1. Molécules étant ou ayant été commercialisées comme inhibiteur de la nitrification [19, 11]

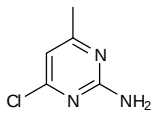
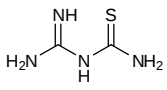
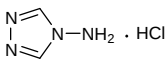
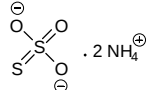
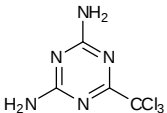
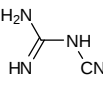
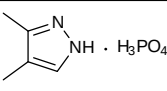
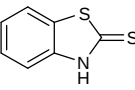
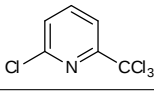
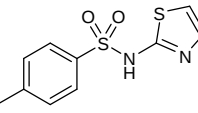
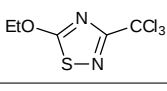
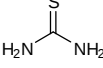
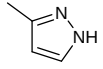
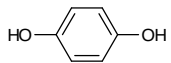
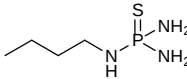
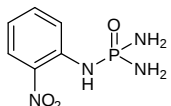
Nom usuel	Formule	Nomenclature	Nom de commercialisation	Producteur
AM		2-amino-4-chloro-6-méthyl-pyrimidine	-	Mitsui Toatsu Co
ASU		guanyl-thiourée	-	Nitto Chemical Ind.
ATC		4-amino-1,2,4-triazole-HCl	-	Ishihada Industries
ATS		thiosulfate d'ammonium	-	Nutra-Flo, Tessengerlo Kerley
CL-1580		2,4-diamino-6-trichloro-méthyltriazine	-	American Cyanamid
DCD		dicyandiamide	Nitrophos® stabil , Nitrophoska® stabil , Basammon® stabil	BASF
			Guardian®	Conklin Compagny
			Didin®, Alzon® 46	SKW Piesteritz
DMPP		Phosphate de 3,4-diméthylpyrazole	Entec®, Entec® liquid	BASF
MBT		2-mercapto-benzo-thiazole	-	Onodo Chemical Industries
Nitrapyrine		2-chloro-6-(trichloro-méthyl)-pyridine	N-Serve®	Dow Chemical Co.
ST		2-sulfanilamidothiazole	-	Mitsui Toatsu
Terrazole		5-éthoxy-3-trichloro-méthyl-1,2,4-thiadiazole	Dwell®	Olin Mathieson
TU		thiourée	-	Nitto Ryuso
3-MP		3-méthylpyrazole	Piadin®	SKW Piesteritz

TABLEAU 2. Molécules étant ou ayant été commercialisées comme inhibiteur d'uréases [19]

Nom	Formule	Nomenclature	Nom de commercialisation	Producteur
HQ		Hydroquinone	-	Hanfeng Evergreen
NBPT		<i>N</i> -butyl-thiophosphorotriamide	Agrotain®	Agrotain International
2-NPT		<i>N</i> -(2-nitrophenyl)-phosphoric-triamide	-	SKW Piesteritz

du NBPT, mais également dans une formulation solide contenant aussi du DCD, appelée "Agrotain Plus", ou encore dans des granulés solides, "SuperU", composés d'urée, de NBPT et de DCD. BASF commercialise des engrais contenant des ammoniums stabilisés par du DMPP, associés à divers autres nutriments, sous forme solide ou liquide, respectivement sous le nom de Entec® et Entec® liquid.

Les inhibiteurs disponibles dans le commerce stabilisent l'azote pendant plusieurs jours à plusieurs semaines, mais le temps d'efficacité varie suivant les caractéristiques du sol (pH, composition...) ou encore la température et le taux de précipitations (tableau 3) [18]. Le pH du sol, variant généralement de 5,5 à 9, a d'autant plus d'influence qu'il agit à la fois sur l'activité bactérienne (nitrifiantes ou hétérotrophes) et sur la vitesse de dégradation chimique des inhibiteurs.

L'application de fertilisants stabilisés peut s'accompagner d'une augmentation des rendements de production [2, 21]. Mais, ce n'est pas forcément le cas. L'amélioration la plus souvent observée est une diminution des pertes d'azotes. L'utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de la nitrification diminue significativement les fuites de nitrates par lessivage et l'émission d'oxydes gazeux dans l'atmosphère [4, 19]. Seulement, il est nécessaire de parfaitement équilibrer l'effet des deux types d'inhibiteurs pour ne pas augmenter la volatilisation de l'ammoniac (figure 2) [6, 22].

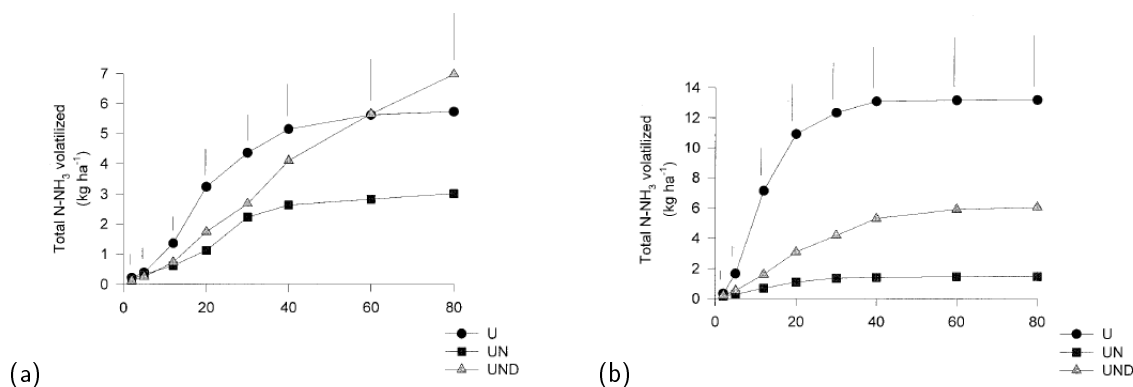


FIGURE 2. Pertes par volatilisation de l'ammoniac en fonction des traitements appliqués (a) dans un sol argileux et (b) dans un sol sableux, mesurées par Gioacchini et al. [6]. U : Urée ; UN : Urée + NBPT ; UND : Urée + NBPT + DCD.

Orientation des recherches

Les bienfaits des inhibiteurs d'uréases et de la nitrification sont démontrés depuis plusieurs années. Cependant, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour comprendre leurs mécanismes et les conséquences de leur utilisation à long terme, ainsi que pour augmenter leur efficacité [19].

TABLEAU 3. Facteurs influençant l'efficacité des inhibiteurs dans les sols (adapté de Subbarao et al. [18])

Facteur		Remarque
Propriétés de l'inhibiteur	Hydrosolubilité	Détermine le mode d'application et influence les capacités de lessivage de l'inhibiteur.
	Volatilité	Influence la mobilité dans les sols et l'efficacité à haute température.
	Affinité pour les colloïdes du sol (matière organique, argile)	Limite la mobilité dans les sols et le phénomène de lessivage.
	Stabilité	Détermine la persistance de l'inhibiteur dans les sols.
Propriétés physico-chimiques du sol	pH	Influence la solubilité et la stabilité de l'inhibiteur, ainsi que l'activité bactérienne.
	Taux de matière organique	Adsorbe les inhibiteurs. Influence leur mobilité et leur stabilité.
	Porosité	Influence le taux d'oxygène des sols, qui détermine l'activité bactérienne. Influence l'efficacité des inhibiteurs volatiles.
Propriétés biologiques du sol	Population de bactéries	Les sols qui ont une forte densité en micro-organismes nécessitent une plus grande concentration en inhibiteurs. Une forte diversité génétique influence l'efficacité des inhibiteurs.
	Taux de carbone du sol	Influence l'activité des micro-organismes hétérotrophes, capables de métaboliser les inhibiteurs. Influence le taux d'immobilisation microbienne des ammoniums.
Facteurs abiotiques	Température	Influence l'activité des micro-organismes du sol (faible en hiver, plus élevée en printemps ou été dans les régions tempérées). Influence la stabilité des inhibiteurs.
	Qualité de l'eau	Influence l'activité bactérienne, la mobilité des inhibiteurs dans les sols et l'aération des sols.
Autres facteurs	Type de fertilisant	Influence le pH du sol (l'utilisation de sulfate d'ammonium acidifie les sols, l'urée augmente le pH).
	Mode d'application	L'épandage des inhibiteurs, lorsqu'il est effectué après celui de l'engrais est généralement plus efficace que lorsque les deux sont appliqués ensembles, mais nécessite une plus grande quantité d'inhibiteurs.

L'utilisation massive des engrais stabilisés pourrait avoir de nombreuses conséquences à long terme, qui sont jusqu'alors très peu connues. L'usage répété d'une substance pourrait diminuer son efficacité au cours du temps. L'application récurrente d'inhibiteurs d'uréases et de la nitrification pourrait générer des modifications de la population bactérienne à long terme, favorisant la croissance de certains types de micro-organismes par rapport à d'autres, ou encore déclencher un phénomène de résistance. Des modifications des sols pourraient également avoir lieu, avec un risque de perte de fertilité. Les conséquences à long terme sur la santé des animaux et de l'Homme sont également inconnues et nécessitent des études. Le risque existe, de retrouver dans l'eau potable, des inhibiteurs appliqués en grande quantité, ou encore de les voir s'accumuler au fur et à mesure de la chaîne alimentaire à cause d'une assimilation par les plantes ou les animaux.

Le besoin d'augmenter l'efficacité des inhibiteurs d'uréases et de la nitrification est également toujours présent. Cette recherche peut se faire au moyen de différentes stratégies. Une étude des mécanismes des nutriments de type uréique et ammoniacale pourrait expliquer les conséquences observées sur la croissance des plantes lors de l'utilisation d'engrais stabilisés. Ce type d'étude pourrait apporter des solutions pour améliorer la qualité des productions. La compréhension des mécanismes des sols, ainsi que l'identification des facteurs propices à une bonne efficacité des inhibiteurs, ou entraînant leur dégradation, serait également utile dans le but d'augmenter les rendements.

Enfin, le développement de nouveaux inhibiteurs répondant aux critères d'activité, de viabilité économique et de respect des exigences environnementales, est désirable, et pourtant trop souvent délaissé à cause de l'important investissement en temps et en argent nécessaire à ces recherches.

Objectifs de la thèse

Le projet AZOSTIMER s'articule autour de deux axes de recherches. Le premier, visant à évaluer les effets stimulants des algues et des acides humiques sur le métabolisme des plantes et leur capacité d'absorption des apports, a été développé par les équipes de l'INRA à Caen, de Timac Agro International à Pampelune et de Force-A. Le second, dans lequel s'inscrit cette thèse, a rassemblé les équipes COS et CIP de l'ENSCR, ainsi que l'INRA de Caen, dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification, plus efficaces et moins polluants. Le 2-mercapto-benzothiazole (**MBT**), inhibiteur de la nitrification, et le *N*-butyl-thiophosphotriamide (**NBPT**), inhibiteur d'uréases, ont été sélectionnés comme point de départ.



En premier lieu, nous avons souhaité améliorer l'hydrosolubilité, et ainsi la biodisponibilité du **MBT**, tout en prolongeant son action biologique par mise à profit du concept de pro-drogue. Une glycosylation a été choisie pour le caractère potentiellement clivable du lien covalent formé, ainsi que pour la forte hydrosolubilité et l'absence de toxicité des sucres. La même étude a été réalisée sur le 2-mercapto-benzimidazole (**MBI**), homologue azoté du **MBT** (figure 3). La synthèse de nouveaux inhibiteurs glycosylés sera présentée dans cette partie. Ces composés seront ensuite comparés aux principes actifs en termes d'hydrosolubilité, de stabilité et d'écotoxicité. Par la suite, les résultats obtenus lors de tests d'inhibition de la nitrification *in vitro* et dans les sols seront exposés, suivis des expérimentations visant à déterminer la dégradabilité et la mobilité de ces molécules dans les sols.

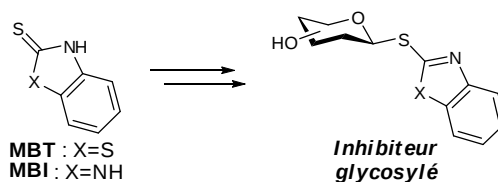


FIGURE 3. Molécules cibles

Dans un second temps, nous avons cherché à prolonger l'efficacité du **NBPT** dans les sols acides en limitant sa dégradation due au pH.

La première stratégie consiste à formuler le **NBPT**, afin de construire autour de l'inhibiteur un environnement protecteur (figure 4.a). Différents types de formulations seront présentées. Les résultats relatifs à la stabilité du **NBPT** dans ces formulations en solution aqueuse tamponnée seront présentés et permettront de sélectionner les formulations efficaces. Ces dernières seront ensuite évaluées sur les sols.

Par ailleurs, nous avons imaginé une stabilisation d'ordre chimique du **NBPT** au moyen de modulations ciblées. Nous avons ainsi souhaité insérer un groupement électroattracteur en α de l'azote secondaire, ou encore remplacer la liaison P-N aisément clivable par une liaison P-C, probablement plus stable (figure 4.b). Les stratégies de synthèses adoptées seront décrites, suivies de l'étude des propriétés des phosphoramides synthétisés *in vitro* (dégradation à pH acide et activité sur les uréases). Nous en dégagerons des conclusions sur les relations structure-stabilité chimique et structure-activité. Enfin, ces molécules seront évaluées pour une utilisation en sols.

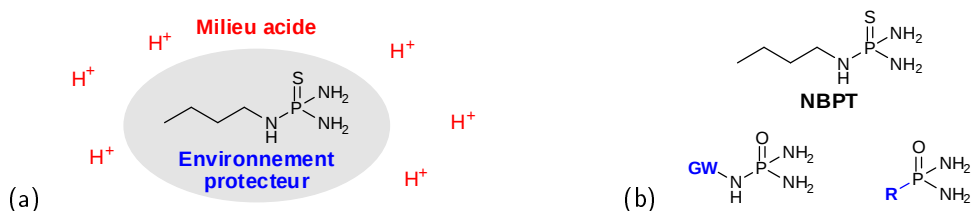


FIGURE 4. Stratégies pour protéger le **NBPT** des dégradations en milieu acide : développement (a) de formulations et (b) de modulations chimiques.

Bibliographie

Références bibliographiques

- [1] Bremner, J. M. (1995) Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Fertil. Res.* 42, 321–329.
- [2] Chaiwanakupt, P., Freney, J. R., Keerthisinghe, D. G., Phongpan, S., and Blakeley, R. L. (1996) Use of urease, algal inhibitors, and nitrification inhibitors to reduce nitrogen loss and increase the grain yield of flooded rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils* 22, 89–95.
- [3] Di, H. J., and Cameron, K. C. (2005) Reducing environmental impacts of agriculture by using a fine particle suspension nitrification inhibitor to decrease nitrate leaching from grazed pastures. *Agric. Ecosyst. Env.* 109, 202–212.
- [4] Ding, W. X., Yu, H. Y., and Cai, Z. C. (2011) Impact of urease and nitrification inhibitors on nitrous oxide emissions from fluvo-aquic soil in the North China Plain. *Biol. Fertil. Soils* 47, 91–99.
- [5] Fellous, J. L., and Gautier, C. *Comprendre le changement climatique* ; Odile Jacob, 2007.
- [6] Gioacchini, P., Nistri, A., Marzadori, C., Giovannini, C., Vittori Antisari, L., and Gessa, C. (2002) Influence of urease and nitrification inhibitors on N losses from soils fertilized with urea. *Biol. Fertil. Soils* 36, 129–135.
- [7] Grant, C. A., Brown, K. R., Bailey, L. D., and Jia, S. (1996) Volatile losses of NH_3 from surface-applied urea and urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitors NBPT or ammonium thiosulphate. *Can. J. Soil Sci.* 76, 417–419.
- [8] Leinker, M., Reinhardt-Hanisch, A., Hartung, E., and von Borell, E. (2005) Reducing ammonia emissions by using urease inhibitors. *Landtechnik* 6, 342–343.
- [9] McNeill, A., and Unkovich, M. (2007) The nitrogen cycle in terrestrial ecosystem. *Soil Biol.* 10, 37–64.
- [10] Monteny, G.-J., Bannink, A., and Chadwick, D. (2006) Greenhouse gas abatement strategies for animal husbandry. *Agriculture, ecosystems and environment* 112, 163–170.
- [11] Nelson, D. W., and Huber, D. (fev. 1992) Nitrification inhibitors for corn production. *National Corn Handbook* 55.
- [12] Pasda, G., Hähndel, R., and Zerulla, W. (2001) Effect of fertilizers with the new nitrification inhibitor DMPP (3,4-dimethylpyrazole phosphate) on yield and quality of agricultural and horticultural crops. *Biol. Fertil. Soils* 34, 85–97.
- [13] Paul, E. A., and Clark, F. E. *Soil microbiology and biochemistry - Second edition* ; Academic Press, 1996 ; Chapter 8, pp 181–198.
- [14] Rahmatullah, Gill, M. A., Wissemeier, A. H., and Steffens, D. (2006) Phosphate availability from phosphate rock as related to nitrogen form and the nitrification inhibitor DMPP. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169, 675–678.
- [15] Rawluk, C. D. L., Grant, C. A., and Racz, G. J. (2001) Ammonia volatilization from soils fertilized with urea and varying rates of urease inhibitor NBPT. *Can. J. Soil Sci.* 81, 239–246.
- [16] Shen, Q. R., Ran, W., and Cao, Z. H. (2003) Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere* 50, 747–753.
- [17] Singh, N. S., and Tripathi, R. D. *Environmental bioremediation technologies* ; Springer, 2007 ; Chapter 16, pp 353–389.
- [18] Subbarao, G. V., Ito, O., Sahrawa, K. L., Berry, W. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Watanabe, T., Sue-naga, K., Rondon, M., and Rao, I. M. (2006) Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems - Challenges and opportunities. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 303–335.
- [19] Trenkel, M. E. *Slow- and controled-release and stabilized fertilizers. An option for enhancing nutrient use efficiency in agriculture* ; International fertilizer industry association, 2010.
- [20] Watson, C. J., Miller, H., Poland, P., Kilpatrick, D. J., Allen, M. D. B., Garrett, M. K., and Christianson, C. B. (1994) Soil properties and the ability of the urease inhibitor *N*-(*N*-butyl) thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1165–1171.
- [21] Xu, X., Zhou, L., Van Cleemput, O., and Wang, Z. (2000) Fate of urea- ^{15}N in a soil-wheat system as influenced by urease inhibitor hydroquinone and nitrification inhibitor dicyandiamide. *Plant Soil* 220, 261–270.

- [22] Zaman, M., and Blennerhassett, J. D. (2010) Effects of the different rates of urease and nitrification inhibitors on gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, nitrate leaching and pasture production from urine patches in an intensive grazed pasture system. *Agric. Ecosyst. Environ.* 136, 236–246.
- [23] Zaman, M., Nguyen, M. L., Blennerhassett, J. D., and Quin, B. F. (2008) Reducing NH_3 , N_2O and NO_3^- -N losses from a pasture soil with urease or nitrification inhibitors and elemental S-amended nitrogenous fertilizers. *Biol. Fertil. Soils* 44, 693–705.

Première partie

Nouveaux inhibiteurs glycosylés de la nitrification

1. L'inhibition de la nitrification

1.1. Le cycle de l'azote microbien des sols

La nitrification n'est qu'une étape parmi les nombreux processus de transformation de l'azote minéral dans les sols. Ces transformations sont essentiellement dues à l'activité respiratoire d'une multitude de micro-organismes, qui trouvent dans l'azote inorganique une source d'énergie. Par conséquent, il peut être judicieux de situer le processus de nitrification dans un contexte plus général. Les capacités métaboliques de la biodiversité microbienne des sols sont tellement vastes et variées que la connaissance que nous en avons est encore largement incomplète, comme en témoignent les nombreuses découvertes qui ont marqué les dix dernières années [38]. À l'heure actuelle, il n'est possible de présenter qu'une version simplifiée et incomplète du cycle de l'azote microbien des sols.

Encore récemment, le cycle de l'azote connu se résumait à trois étapes : la fixation de l'azote gaz alimentant les sols en ammoniums, la nitrification qui transforme les ammoniums en nitrates, et enfin la dénitrification, processus de transformation des nitrates en formes gazeuses de l'azote. Il s'avère aujourd'hui que ce schéma est largement incomplet, et que les processus récemment découverts, nommés "Anammox" [72] et "DNRA" [11], explicités dans la suite de ce chapitre, occupent une place toute aussi importante parmi les biotransformations de l'azote (figure 1.1).

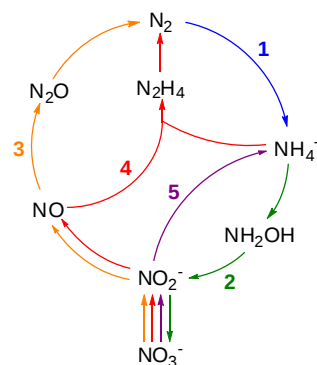
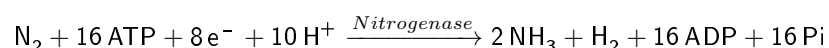


FIGURE 1.1. Transformations principales du cycle de l'azote microbien : (1) fixation de l'azote gaz, (2) nitrification, (3) dénitrification, (4) Anammox, (5) DNRA [38].

Fixation de l'azote

L'étape de fixation de l'azote gaz est cruciale pour l'équilibre de l'écosystème puisqu'elle alimente les sols en ammoniums et permet d'y maintenir un niveau d'azote suffisant pour compenser les pertes gazeuses dues à la dénitrification et à l'Anammox. Ce phénomène est réalisé en grande partie par les plantes, mais également par la flore microbienne.

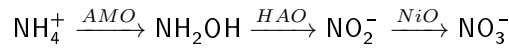
Les micro-organismes capables de fixer l'azote gaz possèdent un complexe enzymatique de type nitrogénase, qui permet l'hydrolyse d'ATP à partir de la réduction du diazote atmosphérique et de protons, suivant l'équation générale suivante :



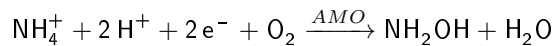
Le complexe enzymatique est composé de deux protéines. La première lie la molécule d'ATP, la seconde abrite le site actif de réduction du diazote. Les électrons nécessaires à la réduction de l'azote sont transférés d'une protéine à l'autre, et donc, le complexe s'inactive lorsque l'ensemble se dissocie [19, 58].

Nitrification

La nitrification, conversion des ammoniums en nitrates, est majoritairement l'activité aérobique d'organismes autotrophes qui y trouvent une source d'électrons. Ce processus implique généralement deux types de bactéries. Les premières (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*...), convertissent les ammoniums en nitrites et les secondes (*Nitrobacter*, *Nitrospira*...), transforment les nitrites en nitrates. L'implication de certains organismes hétérotrophes a été reconnue plus tardivement [14, 59].



La première étape, conversion de l'ammonium en hydroxylamine, est assurée par l'ammonium mono-oxygénase (AMO) suivant l'équation suivante :



Cette réaction nécessite l'apport de deux électrons, lesquels sont fournis, via un ensemble de cytochromes *c* et le pool quinolique, par l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrites (figure 1.2). Cette dernière est catalysée par l'hydroxylamine oxydoréductase (HAO) selon l'équation suivante :

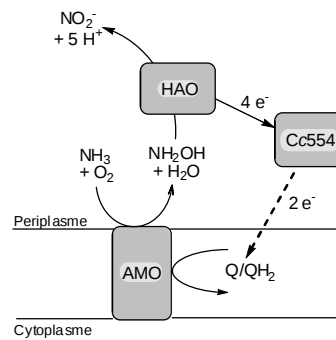
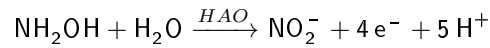
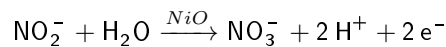


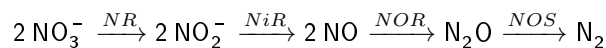
FIGURE 1.2. Mécanisme simplifié proposé pour la conversion des ammoniums en nitrites chez *Nitrosomonas europaea* [84, 39]. Les chaînes de transports d'électrons établies sont représentées par des flèches pleines. La flèche pointillée résume un ensemble de transports d'électrons hypothétiques. AMO, ammoniac monooxygénase ; HAO, hydroxylamine oxydoréductase ; Q, Ubiquinone-8 ; Cc554, cytochrome *c*554.

Enfin, les nitrites sont oxydés en nitrates par les nitrites oxydases (NiO) [19] comme suit :

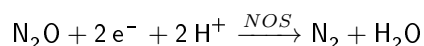
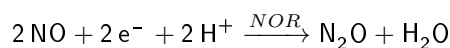
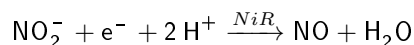
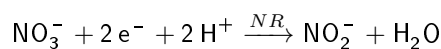


Dénitrification

La réduction des nitrites en oxydes gazeux (NO , N_2O et N_2) est appelée dénitrification. Les micro-organismes dénitrifiants utilisent cette cascade de réactions comme mécanisme de respiration dans des conditions d'anoxie [60, 77].



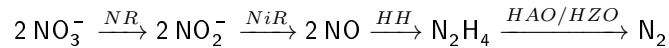
Les équations des réactions impliquées sont les suivantes :



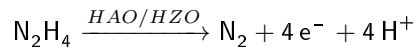
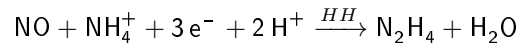
Quatre complexes enzymatiques sont impliqués dans ce processus : la nitrate réductase (NR), la nitrite réductase (NiR), l'oxyde nitrique réductase (NOR), et l'oxyde nitreux réductase (NOS). Toutes sont inhibées par l'oxygène, les organismes dénitrifiants préférant en général utiliser ce dernier lorsqu'il est disponible.

Anammox (Anaerobic ammonium oxydation)

L'Anammox est une chaîne de respiration particulière utilisée par les bactéries de type *Planctomycetales*, qui intervient sous des conditions anaérobiques [48].

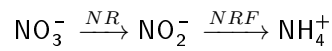


Les deux premières étapes de l'Anammox sont identiques au processus de dénitrification. Cependant, les bactéries capables d'Anammox possèdent deux enzymes particulières : l'hydrazine hydrolase (HH) qui produit de l'hydrazine à partir d'ammonium et d'oxyde nitrique, et un type particulier d'HAO capable d'oxyder l'hydrazine en diazote gaz (HZO). Les transformations mises en jeu sont les suivantes :

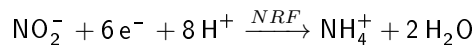


DNRA (Dissimilatory nitrate reduction to ammonium)

La DNRA apparaît lorsque les nitrates sont limitants par rapport au carbone organique. Les bactéries capables d'utiliser ce processus sont nombreuses et variées, comme par exemple les *Escherichia coli* ou les *Vibrio fischeri* [48].



La première étape de la DNRA, catalysée par des nitrates réductases, est identique celle de la dénitrification et de l'anammox. La seconde étape, réduction des nitrites en ammoniums s'effectue via un type particulier de nitrite réductases (NRF) :



Parmi les principales transformations de l'azote minéral présentées ici, seule l'étape de nitrification permet le passage des ammoniums aux nitrates, d'où l'efficacité prouvée des inhibiteurs de la nitrification.

1.2. Les ammonium monooxygénases (AMO)

Comme il sera montré par la suite, les inhibiteurs de la nitrification agissent sur la première étape de la nitrification, c'est-à-dire la transformation de l'ammonium en hydroxylamine, catalysée par les AMO. Malheureusement, cette étape est aussi la plus difficile à étudier à cause du caractère membranaire de cette enzyme, qui la rend particulièrement difficile à purifier. La séquence génétique codant pour cette enzyme a pourtant été déterminée [5, 47, 52, 68], ouvrant la voie à de très nombreuses études phylogénétiques sur les bactéries nitrifiantes [1, 8, 32, 57, 71]. Des AMO ont pu être purifiées [56], cependant leur étude est largement compliquée par l'instabilité des enzymes une fois isolées [18]. Une AMO soluble a également été identifiée chez *N. europaea*, mais sa structure est tout aussi peu élucidée [25]. Toutes ces difficultés font que le mécanisme des AMO est à l'heure actuelle encore très peu connu.

L'AMO membranaire est une métalloprotéine composée de 3 sous-unités (*AmoA*, *AmoB* et *AmoC*). C'est la sous-unité *AmoA* qui est supposée contenir le site catalytique d'oxydation des NH_3 [2]. Deux éléments suggèrent la présence de cuivre dans le site actif des AMO. En effet, les agents chélatants du cuivre induisent une inactivation des AMO et l'addition de cuivre dans les extraits d'AMO réactive l'enzyme [18]. La présence d'un centre ferrique a également été suggérée par Zahn et al. [86].

L'AMO soluble consiste en 3 ensembles de 3 sous-unités (*AmoA*, *AmoB* et un cytochrome c_1) [25]. Elle aussi contient des atomes de cuivre, un fer lié au cytochrome et potentiellement du zinc [24].

Les AMO et les méthane monooxygénases (MMO) possèdent non seulement une structure primaire, mais aussi une structure secondaire semblable [30]. Une étude phylogénétique révèle que les AMO et les MMO possèdent une très forte analogie de séquence. Les MMO étant bien mieux connues que les AMO [49, 50], cette analogie peut aider à la compréhension du mécanisme de ces dernières.

De très nombreuses analogies existent entre les organismes méthanomorphes qui oxydent le méthane en méthanol via les MMO et les organismes nitrifiants qui contiennent des AMO. En effet, seule l'oxydation du méthane permet une croissance de la population de méthanomorphes et pourtant ces derniers participent également à l'oxydation des ammoniums. De la même façon, les organismes nitrifiants ne sont capables de se développer qu'en présence d'ammoniac, bien qu'ils oxydent aussi le méthane (figure 1.3) [53]. En fait, les bactéries méthanomorphes et les bactéries nitrifiantes sont capables d'oxyder aussi bien le NH_3 que le CH_4 et le CO , ainsi qu'une grande variété de substrats organiques ne jouant aucun rôle dans leur croissance [4].

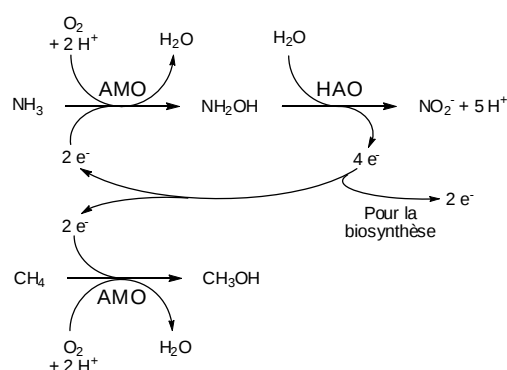


FIGURE 1.3. Influence de l'oxydation du méthane sur la croissance des bactéries nitrifiantes. L'oxydation de l'ammoniac en hydroxylamine par l'AMO coûte deux électrons, qui sont par la suite récupérés lors de l'oxydation par l'HAO de l'hydroxylamine en nitrite. Cette chaîne métabolique produit deux électrons supplémentaires qui peuvent être utilisés pour la biosynthèse. L'oxydation du méthane par l'AMO coûte aussi deux électrons, mais ne participe pas à la biosynthèse.

La plupart des connaissances actuelles sur le site actif et le mécanisme de réaction des AMO proviennent d'études réalisées sur des cellules entières. L'aspect le plus frappant des AMO est son large spectre de substrats potentiels (tableau 1.1). Tous les substrats, ainsi que les inhibiteurs compétitifs de cette enzyme, sont des molécules apolaires. De même, l'ammoniac est substrat de l'AMO plutôt que les ions ammoniums [76]. Ceci suggère que le site actif est hydrophobe. De plus, la grande diversité des substrats indique que le mécanisme réactionnel est initié par une activation de l'oxygène, et non pas du substrat.

Lors d'étude sur la dégradation de composés aliphatiques halogénés, Vannelli et al. [82] ont montré que le *trans*-dibromoéthylène, incubé avec des *N. europaea* restait intact, alors que son homologue *cis*- était totalement oxydé après 24 heures. Ils ont alors proposé une structure du site actif, contenant une poche hydrophobe opposée au site d'activation de l'oxygène (figure 1.4).



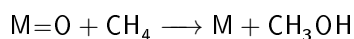
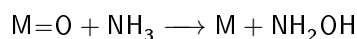
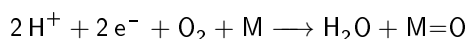
FIGURE 1.4. Site actif de l'AMO de *N. europaea* proposé par Vannelli et al. [82]. (a) La double liaison du *cis*-dibromoéthylène est bien placée pour réagir avec l'oxygène activé, tandis que (b) dans le cas du *trans*-dibromoéthylène, la réaction est bloquée par la mauvaise position du Br situé entre la double liaison et le site d'activation de l'oxygène. H, région hydrophobe ; A, site d'activation de l'oxygène.

Un mécanisme peut être supposé par analogie avec d'autres monooxygénases (Méthane monooxygénase, cytochrome P-450). L'oxygène serait tout d'abord activé par réaction avec le centre métallique de l'enzyme, nécessitant l'apport de deux électrons. Cette étape relarguerait une molécule d'eau en formant une espèce oxygénée pouvant

TABLEAU 1.1. Substrats connus des AMO de *N. europaea* [31, 53]

Famille	Exemples	Réf.
Ammoniac	-	-
Méthane	-	[40]
Alcanes et alcènes	<i>n</i> -Alcanes jusqu'à C ₈ , 1-Alcènes jusqu'à C ₅ , <i>cis</i> - et <i>trans</i> -2-Butène.	[34]
Alcanes halogénés	Fluorométhane, chloroéthane, 1,1,2-trichloroéthane, chlorométhane, bromoéthane, 1,1,2,2-tétrachloroéthane, bromoéthane, iodoéthane, chloropropane, dichlorométhane, 1,1-dichloroéthane, 1,2-dichloropropane, dibromométhane, 1,2-dichloroéthane, 1,2,3-trichloropropane, trichlorométhane, 1,2-dibromoéthane, 1,2-dibromo-3-chloropropane, fluoroéthane, 1,1,1-trichloroéthane, chlorobutane.	[35] [65] [63] [64] [82]
Alcènes halogénés	Chloroéthylène, trichloroéthylène, 2,3-dichloropropène, <i>gem</i> -dichloroéthylène, tribromoéthylène, <i>cis</i> -1,3-dibromopropène, <i>cis</i> -dichloroéthylène, 3-iodopropène, <i>trans</i> -1,3-dibromopropène, <i>trans</i> -dichloroéthylène, <i>cis</i> -1,3-dichloropropène, 1,1,3-trichloropropène, <i>cis</i> -dibromoéthylène, <i>trans</i> -1,3-dichloropropène.	[82]
Composés aromatiques	Benzène, bromobenzène, <i>ortho</i> -crésol, toluène, iodobenzène, 2,5-diméthylphénol, <i>para</i> -Xylène, 1,2-dichlorobenzène, acétophénone, éthylbenzène, phénol, aniline, styrène, anisole, nitrobenzène, naphthalène, alcool <i>para</i> -méthylbenzylique, benzonitrile, fluorobenzène, alcool phénéthylrique, chlorobenzène, alcool <i>sec</i> -phénéthylrique, nitrapyrin.	[43] [79] [81] [80]
Composés sulfurés	Méthylsulfide, éthylsulfide, allylméthylsulfide, allylsulfide, tétrahydrothiophène, thiophène.	[41]
Autres	Méthanol, monoxyde de carbone, éther diéthylique, éthylène, Formaldéhyde...	[83] [78] [35] [37]

être symbolisée $M=O$. Cette espèce activée réagirait ensuite avec une liaison N-H (ammoniac), C-H (méthane) ou π (trichloroéthylène) du substrat pour former le produit [31].



La photo-sensibilité des AMO, inhibées par la lumière u.v., suppose la formation d'une forme intermédiaire oxydée de l'enzyme lors du cycle catalytique. Ce phénomène a inspiré à Shears et Wood une proposition de cycle catalytique simplifié (figure 1.5), par analogie avec les cycles catalytiques des tyrosinases et des hémocyanines, enzymes possédant également deux atomes de cuivre [69].

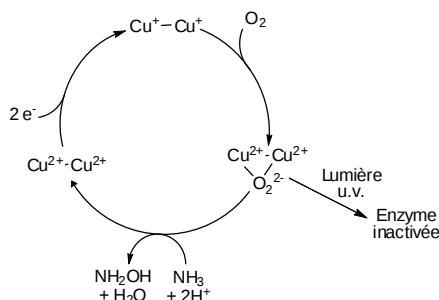


FIGURE 1.5. Proposition de cycle catalytique simplifié de l'oxydation de l'ammoniac par la AMO [69]

1.3. Les inhibiteurs de la nitrification

Inhibition par les substrats des AMO

Les nombreux substrats des AMO sont tous des inhibiteurs compétitifs potentiels [53]. Par conséquent, une très grande variété de molécules peuvent inhiber la nitrification. Ainsi, il a été démontré que même le méthane [54] et plusieurs autres molécules simples [35, 37] sont capables d'inhiber compétitivement la nitrification.

Si les hydrocarbures peuvent également être inhibiteurs de la nitrification, Keener et Arp [44] ont montré que le caractère compétitif de l'inhibition par cette famille de molécules diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire, pour adopter ensuite un caractère non compétitif. Par exemple, CH_4 et C_2H_4 sont des inhibiteurs compétitifs de l'oxydation de l'ammoniac par les AMO, tandis que C_2H_6 , C_3H_8 et $n\text{-C}_4\text{H}_{10}$, ainsi que les alcanes mono-halogénés, sont des inhibiteurs non compétitifs. Cette équipe a donc émis l'hypothèse d'une AMO contenant deux sites actifs, le premier oxydant les NH_3 , le deuxième liant les inhibiteurs non compétitifs. Les substrats non compétitifs sont néanmoins capables d'inhiber les AMO par consommation des réducteurs disponibles.

Rasche et al. [64] ont étudié une série de molécules de type alcanes, halogénés ou non, alcènes et alcynes, comme substrat et inhibiteurs de l'oxydation de l'ammoniac par les *N. europaea*. Ils ont ainsi remarqué deux types de comportements parmi les substrats des AMO : (i) les composés qui sont oxydés par les bactéries, et qui ne présentent pas de toxicité pour ces micro-organismes et (ii) les composés qui sont oxydés et induisent une inactivation de l'oxydation de NH_3 . Ces derniers composés sont des inhibiteurs dont l'activité est basée sur le mécanisme des AMO. Ce sont leurs produits d'oxydation par les AMO qui inhibent l'enzyme, le plus souvent de façon irréversible au moyen d'une liaison covalente. De nombreuses molécules illustrent ce phénomène.

Inhibition par les produits d'oxydation des substrats

La première preuve de l'existence d'inhibiteurs "basés sur le mécanisme" a été apportée par Hyman et Wood [36] lors de l'étude de l'inhibition des *N. europaea* par l'acétylène. L'incubation des micro-organismes avec de l'acétylène enrichi en ^{14}C a provoqué le marquage d'une sous-unité de l'AMO. L'acétylène a alors été nommé "substrat suicide". Bien plus tard, il a été montré que le produit d'oxydation de l'acétylène se lie de façon covalente à l'histidine 191 de la sous-unité AmoA chez *N. europaea* [26]. Ainsi, cette histidine pourrait être située dans le site actif d'activation de l'acétylène par l'AMO, ou dans un environnement proche. Lors de la liaison du dérivé d'oxydation de l'acétylène, la masse moléculaire de l'His191 varie de 42,05 Da, ce qui correspond à la masse moléculaire d'un cétène (CH_2CO). Le mécanisme d'inactivation des AMO par l'acétylène serait donc analogue à celui suggéré par Chan et al. [9] pour l'inactivation d'une MMO par ce même substrat (figure 1.6).

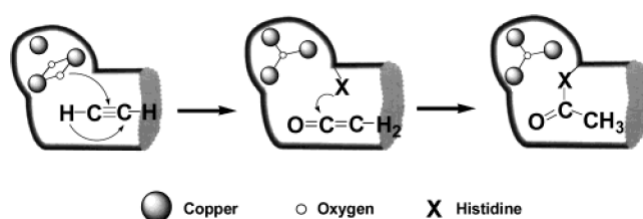


FIGURE 1.6. Schéma de la poche hydrophobe du site actif et mécanisme d'inhibition supposé d'une MMO particulière par l'acétylène. L'acétylène réagit avec l'un des cuivre activés du centre métallique pour former un cétène, qui réagit ensuite avec un résidu nucléophile du site actif [9].

Un potentiel d'inhibition de la nitrification a également été montré pour des alcynes de 2 à 10 carbones. Le mécanisme d'inhibition par ces molécules serait similaire à celui de l'acétylène [34, 45]. Les alcènes quant à eux sont oxydés en époxydes qui peuvent également être considérés comme des agents alkylants potentiels [34].

Parmi les "inhibiteurs suicide", nous trouvons également des composés halogénés, tels que les alcènes chlorés ou les molécules contenant un carbone dichloré. Rasche et al. [64] ont étudié l'inhibition du métabolisme de *N. europaea* par le trichloroéthylène (TCE). Lors de l'incubation des bactéries nitrifiantes avec du TCE marqué au ^{14}C , des protéines cellulaires très variées ont été étiquetées. Ainsi, le TCE, pourtant substrat de l'AMO, n'a pas inactivé cette seule enzyme, mais aussi un grand nombre de composants cellulaires de *N. europaea*. Le temps de récupération de l'activité de cette dernière se trouve alors prolongé par rapport à l'inhibition par l'acétylène. A

partir de ce constat, un mécanisme d'inhibition a pu être proposé pour le TCE et d'autres composés chlorés [64]. Il est avéré que les alcènes terminaux sont oxydés en époxydes par les AMO [34]. Les alcènes chlorés de la famille du TCE sont donc oxydés en époxydes chlorés, qui seraient par la suite dérivés en chlorures d'acyle. De même, l'hydroxylation par les AMO des molécules contenant un carbone dichloré en bout de chaîne aboutit, par élimination d'un chlore, à la formation de chlorure d'acyle (figure 1.7). Les chlorures d'acyle sont des agents alkylants capables de réagir avec les acides aminés nucléophiles des protéines avoisinantes, provoquant leur inactivation.

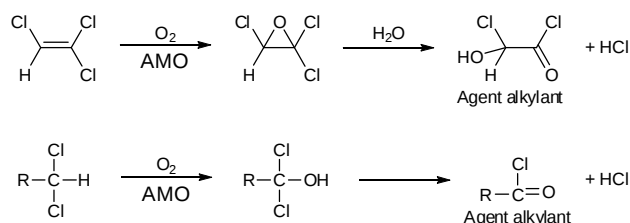


FIGURE 1.7. Activation du TCE et de dérivés dichlorés par les AMO, selon Rasche et al. [64].

Le périmètre d'inactivation des protéines de la bactérie par les "inhibiteurs suicide" dépend de la stabilité de l'intermédiaire alkylant formé par oxydation. Par exemple, le temps de demi-vie de l'époxyde issu du TCE a été estimé à 20 secondes, ce qui lui laisse le temps de diffuser à travers la cellule pour alkyler n'importe quel polypeptide. En revanche, le produit d'oxydation de l'acétylène est très instable et réagit dans le site actif de l'AMO [53].

La Nitrapyrine, inhibiteur très utilisé dans l'agriculture, est un composé halogéné, comportant un atome de carbone trichloré. Son fonctionnement est similaire à celui des composés dichlorés présentés précédemment, à la différence près que sa transformation chez *N. europaea* débute par une déchloration réductrice. Cette première transformation semble catalysée par les AMO, mais son mécanisme est encore flou [80]. L'intermédiaire hydroxylé alors obtenu se réarrange en chlorure d'acyle qui se lie ensuite majoritairement aux protéines membranaires (figure 1.8) [81].

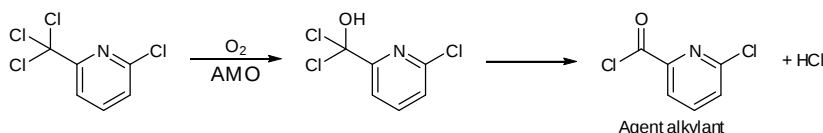


FIGURE 1.8. Activation de la Nitrapyrine par les AMO, selon Vannelli and Hooper [81]

Alors que le cyclopropane n'est pas inhibiteur de la nitrification, certains de ses dérivés le sont (le bromure de cyclopropyle et le *cis*-1,2-diméthylcyclopropane). Un mécanisme radicalaire est soupçonné, par analogie avec les mécanismes observés pour d'autres monooxygénases [3, 23, 28, 67]. Ainsi, l'inactivation de l'AMO par le 1,2-diméthylcyclopropane pourrait résulter de la formation, par oxydation à un électron, d'un intermédiaire radicalaire. Ce dernier pourrait se lier de façon covalente à l'AMO par ouverture de cycle. Il en est de même pour le bromure de cyclopropyle qui subirait une oxydation à un électron dans le site actif de l'AMO, formant un intermédiaire radicalaire alkylant (figure 1.9) [45].

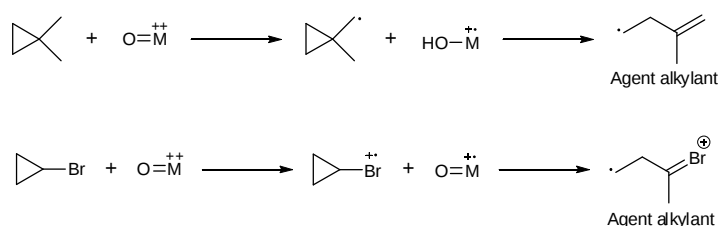


FIGURE 1.9. Activation des dérivés du cyclopropane par les AMO, selon Keener et al. [45]

Le benzène et un grand nombre de ses dérivés sont inhibiteurs du métabolisme des *N. europaea*. Nombre d'entre eux sont également substrats des AMO qui leur infligent de nombreux types de transformations (figure 1.10) [43]. Ces deux phénomènes semblent avoir la même origine : une transformation radicalaire par les AMO [79]. Keener et al. [45] proposent un mécanisme pour le cas des dérivés de l'aniline : une oxydation à un électron se produirait sur l'atome d'azote, puis le radical formé se délocaliserait sur le cycle aromatique, permettant la formation d'une liaison avec l'enzyme en *para*.

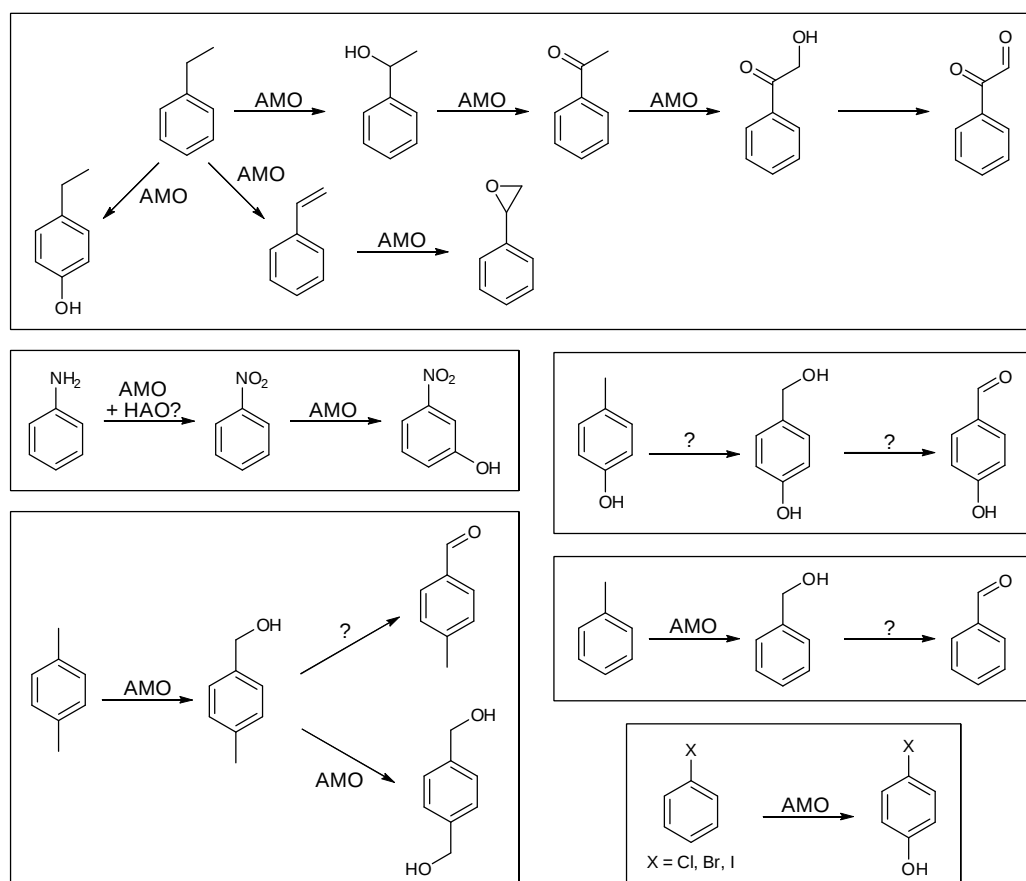


FIGURE 1.10. Transformations des composés aromatiques par *N. europaea* [43].

L'allylsulfure est un inhibiteur particulier, car le seul de sa famille capable d'inhiber les AMO [42]. Cette molécule présente deux sites d'activation possibles par les AMO : l'un des alcènes terminaux ou l'atome de soufre central (figure 1.11). L'oxydation de l'alcène terminal devrait aboutir à la formation d'un époxyde, potentiellement capable de réagir sur la protéine. Cependant, l'allylméthylsulfure n'est pas inhibiteur des AMO, ce qui écarte cette hypothèse. En fait, l'oxydation de l'allylméthylsulfure par les AMO produit de l'allylméthylsulfoxyde, ce qui montre que le soufre est le site d'oxydation préférentiel pour ce type de molécule [41]. Ainsi, l'AMO catalyse l'oxydation de l'allylsulfure en allylsulfoxyde, intermédiaire que l'on suppose responsable de la destruction de cet enzyme.

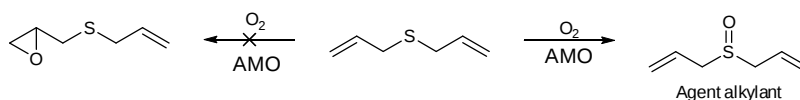


FIGURE 1.11. Deux modes d'oxydation possibles de l'allylsulfure par les AMO. L'atome de soufre est le site d'oxydation préférentiel, conduisant à une dénaturation de l'enzyme par l'intermédiaire de l'allylsulfoxyde.

Inhibition par les agents chélatants du cuivre

Les composés soufrés contenant une liaison double C=S inhibent efficacement l'oxydation de l'ammoniac par *N. europaea*, sans être substrats des AMO [33, 53]. Parmi ces composés se trouvent des thiourées, des thiosulfates, des thiocarbamates, des xanthates mais également des acides aminés (méthionine, cystine, cystéine), des composés volatiles (disulfure de carbone, disulfure de diméthyle, méthyle mercaptant...) [6], ou même les composés de la famille des thiophosphoramides, dont le potentiel d'inhibition, à la fois des uréases et de la nitrification, est particulièrement intéressants pour l'agriculture [61].

Les dérivés de la thiourée sont connus pour complexer les métaux, et plus particulièrement le cuivre. Selon Wood et al. [85], cette affinité serait due à la possibilité de tautomérisation de ces molécules, qui formerait des thiols réactifs. Ce phénomène serait à l'origine de leur pouvoir inhibant sur les AMO. Pourtant, les inhibiteurs de la famille des thiourées sont des ligands très peu spécifiques qui peuvent former des complexes avec différents métaux.

Hyman et al. [33] ont étudié plus précisément le mode d'action particulier de CS₂. Cette molécule tend à réagir avec les fonctions nucléophiles de certains acides aminés, comme les groupements amine, mercapto ou hydroxyle, pour former respectivement des dithiocarbamates, trithiocarbamates ou xanthogénates. Ces composés sont des agents chélatants des ions métalliques, très affins pour le cuivre et le zinc. Dans le cas de l'inhibition des AMO, la réaction réversible du CS₂ avec un acide aminé positionné à proximité du site actif, résulte en la formation d'un complexe sur le métallocentre de l'enzyme. Par ailleurs, il semblerait que la formation de CS₂ à partir des acides aminés soufrés soit à l'origine de la capacité de ces derniers à inhiber la nitrification [6].

Ce sont les groupements fonctionnels des inhibiteurs qui dictent le mécanisme d'inhibition. Ainsi, les dérivés de thiourées, qui ne possèdent qu'une seule liaison C=S, ne peuvent se lier qu'à un seul ion métallique. Les composés issus de la réaction entre le CS₂ et un acide aminé voisin sont quant à eux capables de lier deux atomes de cuivre, d'où un pouvoir inhibant supérieur (figure 1.12) [33].

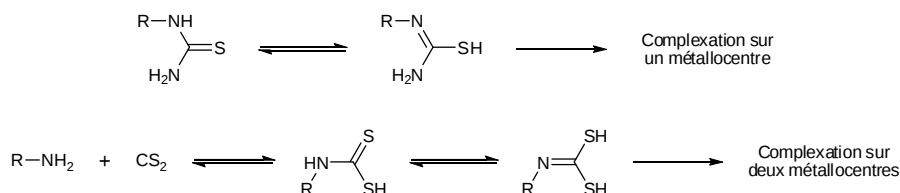


FIGURE 1.12. Modes d'actions des dérivés de la thiourée et du CS₂. Les premiers ne possédant qu'un atome de soufre ne peuvent complexer qu'un seul cuivre. Le second permet la chélation de deux métallocentres.

Inhibition par rupture du transfert d'électron

Le diphenyliodonium (DPI) inhibe les AMO par un mécanisme tout à fait particulier. En premier lieu, un mécanisme radicalaire était soupçonné. Cependant Shiemke et al. [70] ont montré que le mode d'action de cet inhibiteur passait par un tout autre processus. En effet, l'inactivation de l'AMO par le DPI résulte d'une rupture dans la chaîne de transfert d'électrons provenant du pool quinolique vers la monooxygénase. Plus précisément, cette rupture aurait lieu au sein de l'enzyme, entre le site de liaison des hydroquinones et le site d'oxydation de l'ammoniac. Le site de liaison du DPI sur l'AMO, ainsi que son mode d'action précis restent inconnus.

Inhibiteurs au mécanisme inconnu

Le mécanisme de certaines familles d'inhibiteurs avérés reste encore inconnu. C'est le cas notamment des composés hétérocycliques. Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de leur efficacité : l'inactivation des AMO pourrait résulter d'une inhibition compétitive, d'un défaut d'approvisionnement en réducteur, ou encore, d'une interaction entre l'inhibiteur et l'AMO [43]. À l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de déterminer le mécanisme d'inhibition par les composés hétérocycliques, mais des études de comparaison structure-activité dans les sols sont néanmoins disponibles [53].

De nombreux hétérocycles azotés possèdent une activité inhibitrice notable de la nitrification, plus particulièrement les cycles aromatiques contenant deux atomes d'azote adjacents (pyrazole, pyridazine, benzotriazole...).

Les hétérocycles mono-azotés, substitués par un groupement électroattracteur, tel que le Cl, en α de l'azote sont également de très bons inhibiteurs. Cette substitution peut avoir deux effets majeurs : la possibilité d'une substitution nucléophile de l'atome de chlore et la diminution du pKa de l'atome d'azote. Cependant, l'importance de ces effets pour l'inhibition des AMO n'est pas encore déterminée [55].

Inhibition de la nitrification "biologique"

La production d'inhibiteurs de la nitrification par les plantes est connue depuis plusieurs dizaines d'années. La présence, dans certains sols, de hautes concentrations en NH_4^+ par rapport au NO_3^- laissait soupçonner ce phénomène. Mais l'outil permettant de l'étudier plus précisément a été développé très récemment par Subbarao et al. [73] : une souche recombinante de *Nitrosomonas europaea* capable de produire une bioluminescence pendant la nitrification. Dès lors, de nombreuses espèces végétales ont pu être testées, à commencer par *Brachiaria humidicola*, une variété de plante fourragère tropicale, qui s'est effectivement révélée productrice de substances chimiques inhibant la nitrification. Il a également été montré que la sécrétion d'inhibiteurs par *B. humidicola* est dépendante du taux d'ammoniums présents dans les sols [75], et que les AMO et les HAO sont toutes deux inactivées [74].

Le caractère inhibiteur des racines d'un grand nombre de céréales et de légumes, notamment tropicaux, a été évalué. La plupart des cultures domestiquées ne possèdent pas cette propriété. Cependant, une activité inhibitrice a été détectée chez quelques-unes : le sorgho (*Sorghum bicolor*), le mil (*Pennisetum glaucum*) et l'arachide (*Arachis hypogaea*). Il est apparu que l'inhibition de la nitrification par les plantes est un phénomène très répandu parmi les espèces fourragères tropicales [74].

Des cas d'inhibitions biologiques ont également été découverts chez des plantes invasives qui semblent pouvoir s'adapter facilement à différents écosystèmes en le modifiant localement. Par exemple *Fallopia japonica* est capable d'influer sur les paramètres abiotiques et biotiques des sols (concentration en minéraux, activité microbienne...) pour se construire un environnement optimal [13]. *Fallopia* est notamment capable d'inhiber à la fois les organismes nitrifiants et dénitrifiants afin de retenir l'azote dans son environnement.

Le méthyl-*p*-coumarate et le férulate de méthyle ont été isolés des racines de *B. humidicola* et identifiés comme inhibiteurs des AMO par Gopalakrishnan et al. [27]. Ces derniers ont alors soulevé une nouvelle remarque : chaque année, lors de la récolte, environ 30 % des racines restent dans les sols. Ainsi, des inhibiteurs sont encore sécrétés durant la phase de décomposition de ces racines, permettant potentiellement une accumulation d'inhibiteurs à chaque nouvelle culture.

L'inhibition de la nitrification biologique pourrait être une solution d'avenir pour la régulation de l'azote dans les cultures. Il serait intéressant de rechercher cette capacité chez les cousins sauvages des espèces cultivées en milieu tempéré (blé, orge, riz ou maïs), afin de l'introduire dans les cultures domestiques. Les espèces qui se développent naturellement dans des sols pauvres en azote sont particulièrement prometteuses [22]. Par ailleurs, la capacité d'inhibition de la nitrification pourrait être génétiquement introduite dans les cultures domestiques [74]. Ceci nécessite de nombreuses recherches pour la compréhension de ce phénomène, notamment dans l'identification des mécanismes moléculaires et génétiques qui contrôlent la sécrétion d'inhibiteurs par les plantes [22].

2. Design et synthèse de nouveaux inhibiteurs de la nitrification

2.1. Le 2-mercapto-benzothiazole : Intérêts de la glycosylation

Le 2-mercapto-benzothiazole, molécule d'utilisation courante au laboratoire, n'étant plus protégée pour son utilisation en temps qu'inhibiteur de la nitrification, est devenu notre centre d'attention. Son principal inconvénient est son absence de solubilité dans l'eau. Lors de l'épandage, cet inhibiteur insoluble ne peut pas être entraîné en profondeur par l'eau et ne peut donc exercer son pouvoir inhibant que sur un nombre limité de bactéries, celles situées dans la couche superficielle du champ. D'où l'idée d'accroître la biodisponibilité de cette molécule en lui conférant un caractère hydrosoluble par liaison avec un sucre, molécule naturelle hydrosoluble.

Notre objectif dans la conception de nouveaux inhibiteurs de nitrification vise également à prolonger l'action biologique en jouant notamment sur la capacité d'un produit ou d'une formulation à relarguer progressivement la substance active, suivant le concept de pro-drogue. Ainsi, la glycosylation, de part le caractère potentiellement hydrolysable du lien covalent formé, permet de moduler le relargage de la partie active dans le milieu.

Durant la première partie de ce travail, nous avons souhaité mettre à profit le concept de pro-drogue à cet inhibiteur avéré de la nitrification qu'est le 2-mercapto-benzothiazole (**MBT**). Par ailleurs, le 2-mercapto-benzimidazole (**MBI**) possède de grandes similitudes structurales avec le **MBT**. Les deux molécules ne diffèrent que par un seul groupement fonctionnel. Le potentiel d'inhibition du **MBI** n'étant pas connu, nous avons jugé intéressant de l'évaluer dans l'espoir de découvrir une activité particulière.

Cette approche a nécessité la construction d'une liaison covalente clivable entre la partie active et un sucre hydrosoluble par synthèse glycosidique (figure 2.1). Les propriétés physico-chimiques (solubilité, stabilité) et biologiques des nouveaux inhibiteurs glycosylés ont ensuite été évaluées par comparaison directe avec la substance active non glycosylée (**MBT** et **MBI**).

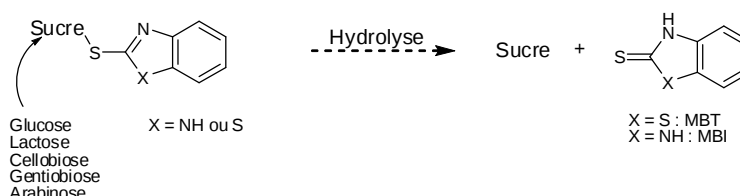


FIGURE 2.1. Nouveaux inhibiteurs glycosylés de la nitrification

2.2. Synthèse de nouvelles molécules glycosylées

La difficulté de la chimie des sucres réside dans le contrôle des équilibres entre les différentes formes et configurations de la molécule (pyranose, furanose, α , β ...). Une réaction de glycosylation directe donnerait lieu à un ensemble de co-produits indésirables, augmentant la difficulté des purifications et diminuant le rendement de la réaction. D'où la nécessité de procéder par des étapes de protection/déprotection [29, 87]. Deux schémas de synthèses sont à distinguer selon que le sucre est de série pyranose ou furanose.

En ce qui concerne les mono- et disaccharides de forme pyranose, la synthèse débute par la protection de la totalité des hydroxyles par des groupements de type acétyle (figure 2.2). Dans des conditions thermodynamiques, la molécule est figée dans sa forme la plus stable, dans ce cas, celle d'un cycle à 6. Les sucres acétylés de départ

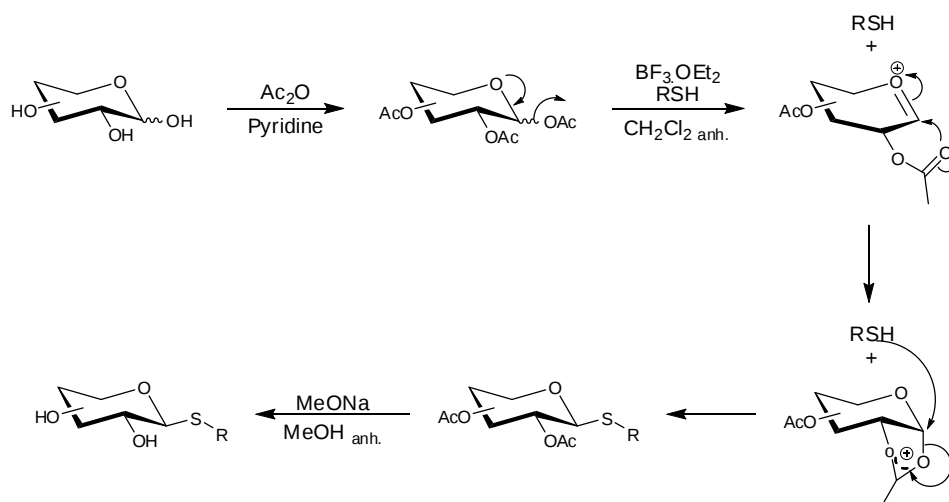


FIGURE 2.2. Schéma de synthèse des inhibiteurs en série pyranose.

sont disponibles dans le commerce, mais peuvent aussi être facilement synthétisés à partir des sucres libres en présence d'anhydride acétique dans la pyridine, par exemple.

L'acétate anomérique est un bon groupement partant vis-à-vis des thiols en présence d'un catalyseur acide. Lors de l'étape de glycosylation, cette fonction est tout d'abord activée par un promoteur de type acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$). C'est alors que l'acétyle voisin entre en jeu en temps que groupement participant et conduit à la formation d'un ion acyloxonium [29]. Cette espèce induit une attaque privilégiée de l'accepteur sur la face opposée au groupement participant, conduisant au glycoside de configuration 1,2-*trans*, ce qui correspond, dans le cas du glucose, à l'anomère β . La réaction de thioglycosylation, effectuée dans ces conditions, possède une excellente régio-sélectivité et stéréo-sélectivité. Les produits sont isolés avec de bons rendements, d'autant plus lorsque l'aglycone est introduite en faible excès [12, 20]. Dans le cas du **MBT** et du **MBI**, la glycosylation nécessite également un excès d'acide de Lewis par rapport au composé soufré, afin d'accroître la nucléophilie de la fonction thiol de l'accepteur par déplacement de l'équilibre thione/thiol vers la forme thiol (figure 2.3) [21]. Il ne reste plus alors qu'à déprotéger la molécule dans les conditions de Zemplén, pour obtenir le sucre libre désiré.

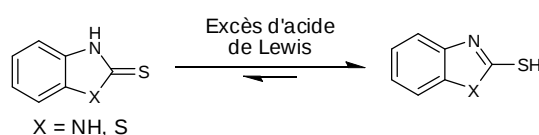


FIGURE 2.3. Équilibre tautomère thione/thiol

Nous nous sommes également intéressés à un pentose, le L-arabinose (Ara), car les conjugués correspondants se présentent plus souvent sous la forme furanose. Les dérivés furanosidiques sont connus pour être moins stables que leurs homologues pyranosidiques. Cependant, il faut également prendre en compte l'hydrolyse de type enzymatique : les furanosidases sont moins répandues que les glucosidases. Ce paramètre pourrait donc être essentiel pour contrôler l'hydrolyse souhaitée et donc le relargage recherché du principe actif.

La synthèse des dérivés arabinofuranosidiques a été réalisée au laboratoire par le passé (figure 2.4) [51]. Elle débute par la formation du 2,3,5-*per*benzoyl- α -L-arabinofuranoside de méthyle en deux étapes à partir du L-arabinose : l'arabinofuranoside de méthyle est tout d'abord formé par glycosylation de Fisher en présence d'un acide et de méthanol, puis le composé résultant est protégé à l'aide de benzoyles. La position anomérique est ensuite acétolysée en présence d'anhydride acétique et d'une quantité catalytique d'acide sulfurique.

Comme dans le cas de la série pyranosidique, l'acétate anomérique est un bon groupe partant, et le composé ainsi obtenu peut subir l'attaque du thiol en position anomérique en présence d'un acide de Lewis. Le groupement benzoyle agissant également comme groupement participant oriente la réaction vers la formation du composé 1,2-*trans*. Enfin, une débenzoylation finale dans les conditions de Zemplén conduit au sucre libre. Toutefois, il faut

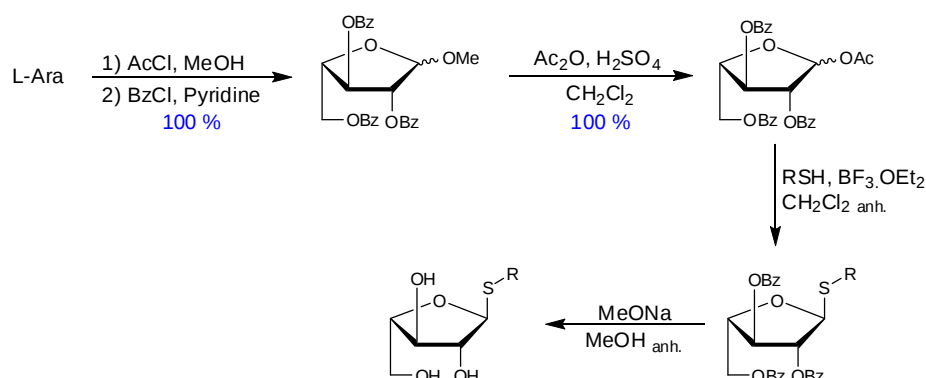


FIGURE 2.4. Schéma de synthèse des inhibiteurs de type arabinofuranoside

noter que cette étape est particulièrement délicate dans le cas du dérivé du **MBT** car ce composé furanique semble peu stable dans les conditions de Zemplén (rdt : 6,4 %).

Afin d'étudier l'influence de la partie sucre, des mono- et disaccharides ont été sélectionnés pour leur disponibilité, leur prix et leur solubilité dans l'eau : le glucose (**Glc**), le lactose (**Lac**), le cellobiose (**Cel**) le gentiobiose (**Gen**) et l'arabinose (**Ara**). Il est à noter parmi eux la présence du gentiobiose, connu pour ses propriétés élictrices, bénéfiques pour la santé des plantes [10]. Les synthèses ont été effectuées suivant les schémas explicités précédemment et les résultats sont présentés figure 2.5 et 2.6

<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nom</th><th>R¹</th><th>R²</th><th>Rdt</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glc protégé</td><td>OAc^c</td><td>Ac</td><td>-</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZT^d</td><td>Ac</td><td>85 %</td></tr> <tr> <td>Glc-S-BZT</td><td>-S-BZT^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZI^d</td><td>Ac</td><td>89 %</td></tr> <tr> <td>Glc-S-BZI</td><td>-S-BZI^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> </tbody> </table>		Nom	R ¹	R ²	Rdt	Glc protégé	OAc ^c	Ac	-	-	-S-BZT ^d	Ac	85 %	Glc-S-BZT	-S-BZT ^d	H	100 %	-	-S-BZI ^d	Ac	89 %	Glc-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nom</th><th>R¹</th><th>R²</th><th>Rdt</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lac protégé</td><td>OAc^c</td><td>Ac</td><td>-</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZT^d</td><td>Ac</td><td>49 %</td></tr> <tr> <td>Lac-S-BZT</td><td>-S-BZT^d</td><td>H</td><td>80 %</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZI^d</td><td>Ac</td><td>61 %</td></tr> <tr> <td>Lac-S-BZI</td><td>-S-BZI^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> </tbody> </table>		Nom	R ¹	R ²	Rdt	Lac protégé	OAc ^c	Ac	-	-	-S-BZT ^d	Ac	49 %	Lac-S-BZT	-S-BZT ^d	H	80 %	-	-S-BZI ^d	Ac	61 %	Lac-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %
Nom	R ¹	R ²	Rdt																																																
Glc protégé	OAc ^c	Ac	-																																																
-	-S-BZT ^d	Ac	85 %																																																
Glc-S-BZT	-S-BZT ^d	H	100 %																																																
-	-S-BZI ^d	Ac	89 %																																																
Glc-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %																																																
Nom	R ¹	R ²	Rdt																																																
Lac protégé	OAc ^c	Ac	-																																																
-	-S-BZT ^d	Ac	49 %																																																
Lac-S-BZT	-S-BZT ^d	H	80 %																																																
-	-S-BZI ^d	Ac	61 %																																																
Lac-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %																																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nom</th><th>R¹</th><th>R²</th><th>Rdt</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cel protégé</td><td>OAc^c</td><td>Ac</td><td>-</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZT^d</td><td>Ac</td><td>68 %</td></tr> <tr> <td>Cel-S-BZT</td><td>-S-BZT^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZI^d</td><td>Ac</td><td>76 %</td></tr> <tr> <td>Cel-S-BZI</td><td>-S-BZI^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> </tbody> </table>		Nom	R ¹	R ²	Rdt	Cel protégé	OAc ^c	Ac	-	-	-S-BZT ^d	Ac	68 %	Cel-S-BZT	-S-BZT ^d	H	100 %	-	-S-BZI ^d	Ac	76 %	Cel-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nom</th><th>R¹</th><th>R²</th><th>Rdt</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Gen protégé</td><td>OAc^c</td><td>Ac</td><td>-</td></tr> <tr> <td>Gen-S-BZT</td><td>-S-BZT^d</td><td>H</td><td>28 %</td></tr> <tr> <td>-</td><td>-S-BZI^d</td><td>Ac</td><td>68 %</td></tr> <tr> <td>Gen-S-BZI</td><td>-S-BZI^d</td><td>H</td><td>100 %</td></tr> </tbody> </table>		Nom	R ¹	R ²	Rdt	Gen protégé	OAc ^c	Ac	-	Gen-S-BZT	-S-BZT ^d	H	28 %	-	-S-BZI ^d	Ac	68 %	Gen-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %				
Nom	R ¹	R ²	Rdt																																																
Cel protégé	OAc ^c	Ac	-																																																
-	-S-BZT ^d	Ac	68 %																																																
Cel-S-BZT	-S-BZT ^d	H	100 %																																																
-	-S-BZI ^d	Ac	76 %																																																
Cel-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %																																																
Nom	R ¹	R ²	Rdt																																																
Gen protégé	OAc ^c	Ac	-																																																
Gen-S-BZT	-S-BZT ^d	H	28 %																																																
-	-S-BZI ^d	Ac	68 %																																																
Gen-S-BZI	-S-BZI ^d	H	100 %																																																

FIGURE 2.5. Récapitulatif des synthèses en série pyranose. a : **MBT** (3 eq), BF₃·Et₂O (9 eq), CH₂Cl₂ anh., 24h, TA ; a' : **MBI** (3 eq), BF₃·Et₂O (9 eq), CH₂Cl₂ anh., 24h, TA ; b : MeONa (0.1 eq), MeOH anh. TA ; ^c : mélange d'anomères α et β ; ^d : anomère β.

	Nom	R ¹	R ²	Rdt
a, b	Araf protégé	OBz ^c	Ac	-
	Araf-S-BZT	-S-BZT ^d	H	6,4 %
	Araf-S-BZI	-S-BZI ^d	H	65 % ¹

a', b

FIGURE 2.6. Récapitulatif des synthèses en série furanose. a : **MBT** (3 eq), BF₃ · Et₂O (9 eq), CH₂Cl₂ anh., 24h, TA ; a' : **MBI** (3 eq), BF₃ · Et₂O (9 eq), CH₂Cl₂ anh., 24h, TA ; b : MeONa (0.1 eq), MeOH anh. TA ;

^c : mélange d'anomères α et β ; ^d : anomère α ;

¹ : synthèse effectuée par Mélanie ALMENDROS et Rémy DUREAU de l'équipe de Vincent FERRIERES, ENSCR, Rennes.

Chaque produit et intermédiaire réactionnel a été recristallisé ou purifié sur colonne de gel de silice. Tous ont été caractérisés par RMN ¹H et ¹³C. Des analyses RMN 2D (COSY, HSQC) ont également été réalisées afin d'élucider les structures. Des analyses TOCSY1d ont été effectuées dans les cas des disaccharides afin de différencier les signaux de chaque unité sucre de la molécule (figure 2.7). Les spectres RMN ¹H montrent clairement que les configurations relatives sont de type 1,2-*trans* : la constante de couplage *J*₁₋₂ pour l'entité sur laquelle vient d'être greffé le résidu **MBI** ou **MBT** est de l'ordre de 9-10 Hz en série pyranique, que les glycosides soient acétylés ou libres et de l'ordre de 4 Hz en série furanique.

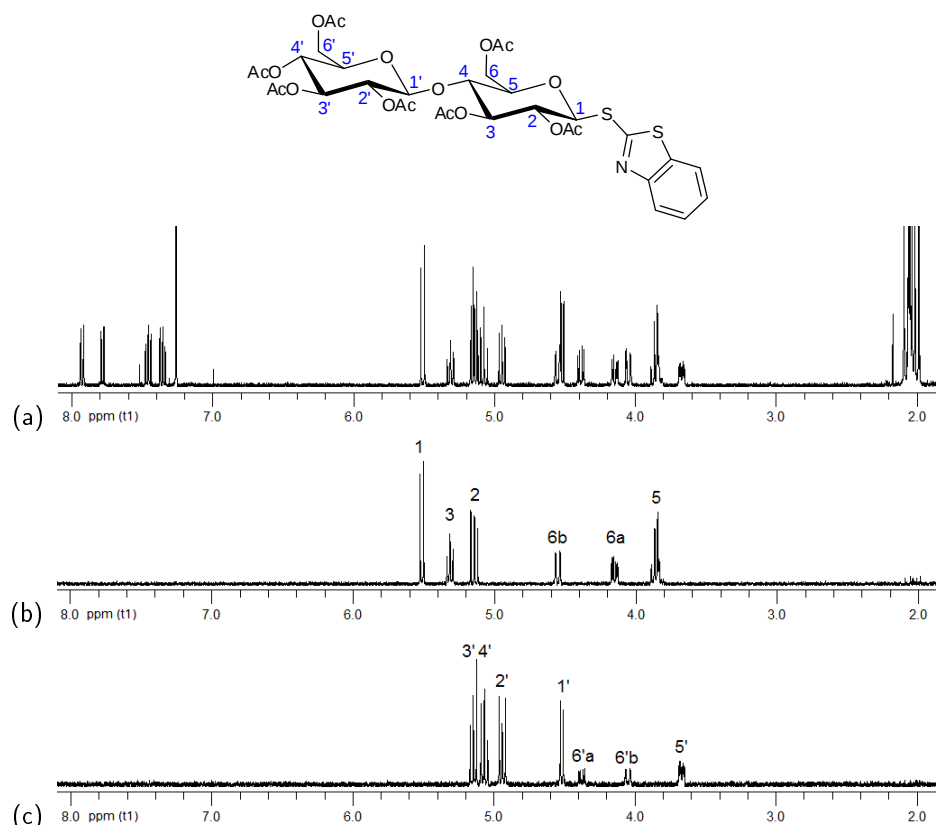


FIGURE 2.7. Exemple d'élucidation de la structure d'un disaccharide à l'aide de la RMN TOCSY1d. (a) RMN ¹H du Cel-S-BZT per-acétylé dans le CDCl₃ et RMN TOCSY1d ciblée sur des protons isolés de chaque unité sucre : (b) le proton anomérique pour l'unité thiosaccharidique, (c) le proton 2' pour l'unité saccharidique.

Dans le cas des sucres protégés dont l'aglycone est un **MBI**, des spectres différents sont obtenus, selon que des traces d'eau sont présentes où non dans le solvant. En RMN du proton, cet hétérocycle, en présence de traces

d'eau, présente trois massifs situés entre 8 et 7 ppm, deux d'entre eux intégrant pour un proton et le moins déblindé intégrant pour deux protons, auxquels s'ajoute un massif intégrant pour un proton situé au delà de 10 ppm, correspondant au proton de l'amine (figure 2.8.a). En l'absence d'eau, en revanche, le signal se simplifie à un massif et un multiplet situés entre 8 et 7 ppm intégrant chacun pour deux protons. Le proton de l'amine n'est plus visible dans ce cas (figure 2.8.b). Des différences sont aussi rencontrées sur le spectre RMN du carbone. Ainsi, les cinq pics des carbones aromatiques visibles en présence de traces d'eau se simplifient en deux pics sur le spectre du même produit parfaitement séché (figure 2.8.c et 2.8.d).

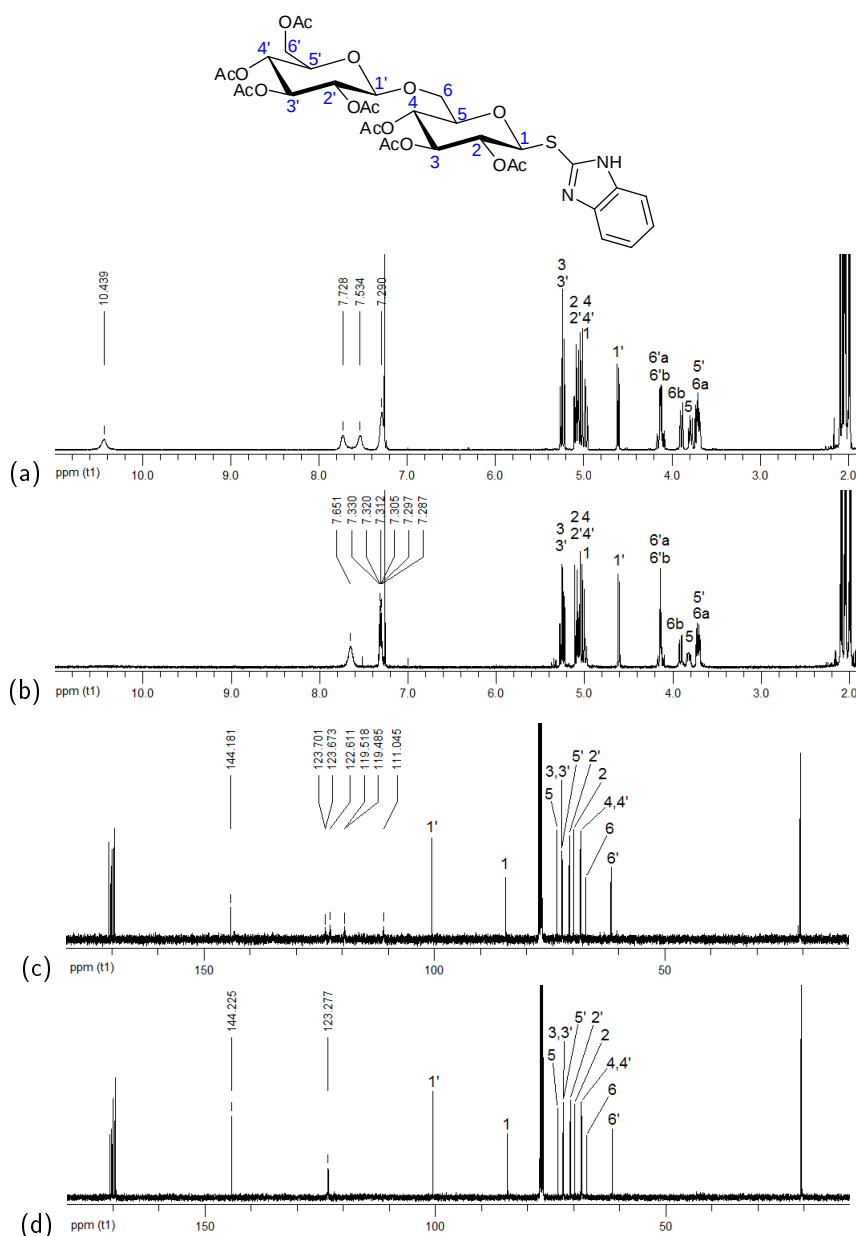


FIGURE 2.8. Spectre RMN ^1H du **Gen-S-BZI** per-acétylé dans le CDCl_3 (a) avec des traces d'eau et (b) en l'absence eau. Spectre RMN ^{13}C du **Gen-S-BZI** per-acétylé dans le CDCl_3 (c) avec des traces d'eau et (d) en l'absence eau.

Enfin, ces données structurales ont été complétées par les spectres de masse pour les sucres déprotégés, et par des analyses élémentaires dans le cas des intermédiaires protégés. Les résultats de ces analyses sont développés dans la partie expérimentale.

3. Évaluation des propriétés physico-chimiques et de l'écotoxicité

3.1. Hydrosolubilité

Pour commencer, les limites de solubilité dans l'eau ont été mesurées à 25°C. Pour cela, la molécule à étudier a été introduite jusqu'à saturation dans 500 µL d'eau, puis le mélange a été laissé 24 h à 25°C. Le précipité a ensuite été retiré par microfiltration (0,2 µm) puis un échantillon, de volume connu, de la solution aqueuse saturée en molécule, a été lyophilisé. Une pesée du solide sec ainsi obtenu a permis de déterminer la quantité de molécule présente dans ce volume de solution saturée et par conséquent, sa limite de solubilité dans l'eau. Pour chaque molécule, cette expérience a été réalisée en triplicat.

Dans le cas de certaines molécules très hydrosolubles, aucune saturation n'a été atteinte après addition de 100 mg de molécule dans 500 µL d'eau. Le protocole appliqué ici étant difficile à mettre en oeuvre à partir de telles masses de molécules, la limite d'hydrosolubilité de ces substances a été considérée comme supérieure à 200 g/L. Des difficultés ont également été rencontrées dans le cas des dérivés d'arabinofuranose. En effet, l'expérimentation présente étant très gourmande en produits, l'analyse n'a pas pu être réalisée sur ces derniers, dont les stock disponibles étaient limités. Les résultats des mesures d'hydrosolubilité sont rassemblés dans le tableau 3.1.

TABEAU 3.1. Limites de solubilités dans l'eau des différentes molécules à 25°C.

Entrée	Molécule	Limite de solubilité dans l'eau (g/L)
1	MBI	0,25
2	Glc-S-BZI	> 200
3	Lac-S-BZI	59
4	Cel-S-BZI	> 200
5	Gen-S-BZI	> 200
6	MBT	< 0,03
7	Glc-S-BZT	121
8	Lac-S-BZT	5
9	Cel-S-BZT	19
10	Gen-S-BZT	21

Dans les conditions présentes, le **MBI** et le **MBT** sont très faiblement solubles dans l'eau et il a été nécessaire de réaliser le test d'hydrosolubilité dans 5 mL d'eau au lieu de 500 µL pour pouvoir effectuer une pesée représentative. Comme attendu, les molécules glycosylées sont hydrosolubles, comme le montrent les limites de solubilité dans l'eau comprises entre 5 et 121 g/L dans le cas des dérivés du **MBT** et supérieures à 200 g/L pour la plupart des dérivés du **MBI** à 25°C.

Le **MBI** (entrée 1) est environ 10 fois plus soluble que le **MBT** (entrée 6) dans l'eau. De même, les dérivés glycosylés du **MBI** possèdent une limite d'hydrosolubilité bien plus élevée que leurs homologues dérivés du **MBT**. Mais le fait le plus marquant est la forte augmentation de l'hydrosolubilité apportée par les sucres. Les molécules glycosylées sont toutes au minimum 100 fois plus solubles dans l'eau que leur aglycone seule (**MBT** et **MBI**). Les dérivés du glucose semblent présenter les meilleurs progrès : le **Glc-S-BZT** est presque 5000 fois plus hydrosoluble que le **MBT** (entrées 6 et 7). En revanche, les dérivés du lactose (entrées 3 et 8) sont les moins intéressants. Par ailleurs, les limites de solubilité obtenues dans le cas des dérivés du cellobiose (entrées 4 et 9) et du gentiobiose (entrées 5 et 10) sont tout à fait satisfaisantes, avec une amélioration d'un facteur supérieur à 500 par rapport à l'aglycone seule.

3.2. Ecotoxicité

3.2.1. "Microtox Acute"

Le test de "Microtox Acute" consiste à quantifier la décroissance d'une population de *Vibrio fischeri* photo-luminescentes après contact avec des solutions de concentrations variables en molécule à tester. Cette décroissance est proportionnelle à la toxicité de la molécule. Le dosage de la vie cellulaire se fait par mesure de la photo-luminescence émise. Le résultat, est exprimé comme l' EC_{50} , soit la concentration en molécule capable de tuer 50 % de la population bactérienne. Bien que conforme à la norme ISO 11348-3, le modèle utilisé ici est très particulier. En effet, les *Vibrio fischeri* utilisées lors de ce test sont une souche purifiée faiblement représentative de la population bactérienne des sols. Pourtant nous pouvons considérer qu'une molécule peu toxique pour cette souche, très fragile, a de grandes chances de ne pas l'être non plus pour la majorité des bactéries du sol.

Des mesures de "Microtox Acute" ont été réalisées sur l'ensemble des molécules, glycosylées ou non (figure 3.1). Les problèmes de solubilité rencontrés avec les thiones non glycosylées ont été résolus par l'introduction de poly éthylène glycols (PEG 1500) dans les mélanges. Une solution à 5 mM de PEG n'ayant montré aucune toxicité sur le test de "Microtox Acute", les toxicités observées dans les formulations PEG+MBI et PEG+MBT sont donc uniquement dues au MBI et au MBT.

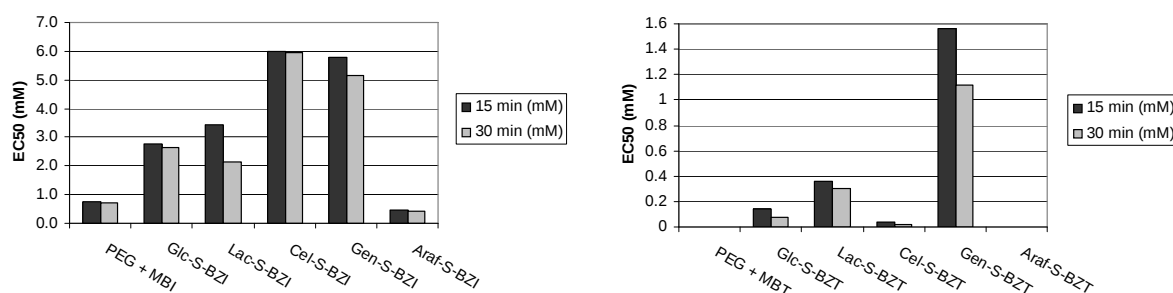


FIGURE 3.1. Récapitulatif des mesures de "Microtox Acute"

Tout d'abord, le MBI est presque 1000 fois moins toxique que le MBT (l' EC_{50} est de 740 μ M pour le MBI et de 1 μ M pour le MBT après 15 minutes). De la même façon, les molécules glycosylées dont la partie active est le MBI sont moins toxiques que leurs analogues dérivés du MBT. La glycosylation des parties actives s'accompagne d'une diminution de l'écotoxicité, excepté dans le cas de l'Araf-S-BZI. Seuls les deux dérivés d'arabinofuranose ne présentent pas de réelle amélioration. Les meilleurs résultats sont obtenus pour les dérivés du gentiobiose. (Amélioration d'un facteur 7 du Gen-S-BZI par rapport au MBI ; amélioration d'un facteur supérieur à 1500 dans le cas du Gen-S-BZT par rapport au MBT). Ces deux molécules ont donc été sélectionnées pour approfondir l'étude.

3.2.2. Mesures de DBO_5

La demande biologique en oxygène (DBO) quantifie la consommation en oxygène par des bactéries en aérobie. Le test repose sur une mesure de la pression dans un système clos, contenant des bactéries en présence d'une solution à tester. Les micro-organismes de l'échantillon consomment l'oxygène en formant du CO_2 . Celui-ci est absorbé par des pastilles de soude. Il s'ensuit une dépression, dont la mesure peut être lue directement en mg/L d'oxygène. La mesure de DBO est ainsi liée à la croissance cellulaire dans l'échantillon. La DBO_5 est la DBO mesurée après 5 jours d'incubation.

Des mesures de DBO ont été effectuées à l'aide d'un ensemble de bactéries très variées, provenant de boues activées de la station d'épuration de Cesson-Sévigné (Ille-et-Vilaine, France). Parmi les inhibiteurs glycosylés, seuls les dérivés du gentiobiose ont été étudiés, à des concentrations de 100 μ M. Afin d'effectuer des comparatifs, une solution de MBI a également été étudiée. Malheureusement, il a été impossible d'effectuer cette étude sur le MBT, en raison de son absence de solubilité dans l'eau. La DCO des solutions, quantité d'oxygène nécessaire pour

dégrader par voie chimique la totalité des molécules organiques, jusqu'à obtention d'entités minérales (CO_2 , H_2O , $\text{NO}_2\ldots$), a également été mesurée. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans le tableau 3.2.

TABLEAU 3.2. Bilan des mesures de DCO et DBO_5

Entrée	Solution	DCO (mg/L O_2)	DBO_5^* (mg/L O_2)
1	MBI 100 μM	29	-14
2	Gen-S-BZI 100 μM	62	6
3	Gen-S-BZT 100 μM	68	-4

* mesures exprimées comme la différence entre la valeur mesurée pour l'échantillon et la valeur mesurée pour un blanc réalisé sans ajout de molécule organique.

Dans le cas des solutions de **MBI** (entrée 1) et de **Gen-S-BZT** (entrée 3) à des concentrations de 100 μM , les valeurs de DBO_5 obtenues sont négatives. En présence de ces deux molécules, la croissance bactérienne a été ralentie par rapport au blanc (sans ajout de molécule organique). En revanche, dans le cas du **Gen-S-BZI** (entrée 2), une faible augmentation de la croissance bactérienne par rapport au blanc a été observée, comme en témoigne la valeur positive de DBO_5 , gage de l'absence de toxicité de cette molécule à une concentration de 100 μM . L'indice de biodégradabilité DCO/DBO_5 , supérieur à 10 dans le cas présent, indique que la molécule n'est pas, ou peu, biodégradable à court terme.

Cette étude confirme certains des résultats obtenus lors des mesures de "Microtox Acute", à savoir, d'une part, que le **Gen-S-BZI** est moins toxique que le **Gen-S-BZT** (entrées 2 et 3), d'autre part, que la glycosylation du **MBI** à l'aide du gentiobiose diminue sa toxicité (entrées 1 et 2).

3.3. Stabilité vis-à-vis du pH

Les dérivés du gentiobiose ont obtenu des résultats positifs lors des tests d'écotoxicité. Leur étude a donc été prolongée vers des tests de stabilité. En effet, nous avons souhaité vérifier si ces molécules sont suffisamment stables pour qu'une utilisation dans les sols soit envisageable. Pour ce faire, les dégradations du **Gen-S-BZT** et du **Gen-S-BZI** dans des solutions aqueuses à différents pH ont été suivies dans le temps par LC/MS avec l'aide de Samuel HUGUET, post-doctorant sous la direction de Dominique WOLBERT dans l'équipe CIP de l'ENSCR. Ces molécules contiennent deux liaisons potentiellement clivables. Une rupture de la liaison glycosidique β -(1,6) formerait du glucose d'une part et un glucoside d'autre part (**Glc-S-BZT** ou **Glc-S-BZI**). Si, à l'inverse, la liaison thioglycosidique est préférentiellement clivée, du gentiobiose se formerait, accompagné des molécules non glycosylées (**MBT** et **MBI**) (figure 3.2).

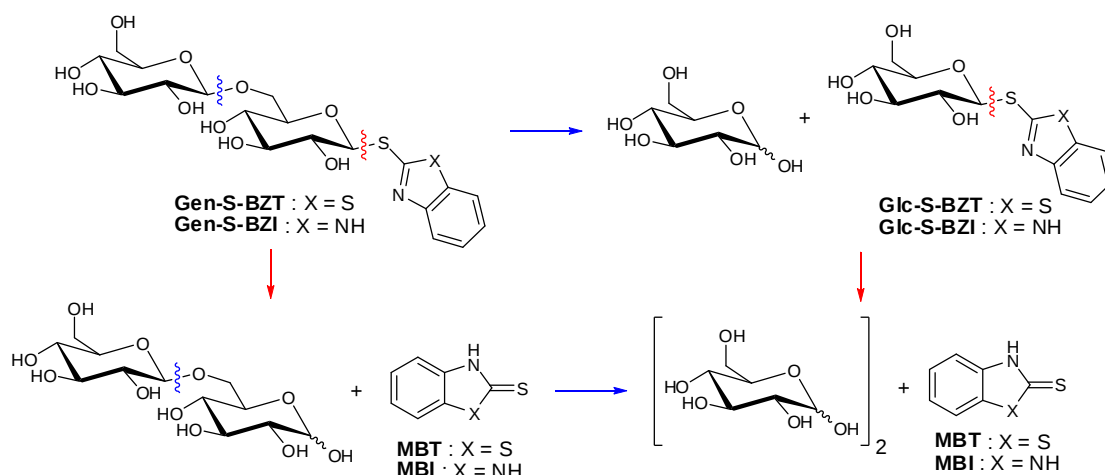


FIGURE 3.2. Dégradations possibles du **Gen-S-BZI** et du **Gen-S-BZT**. En rouge, rupture de la liaison thioglycosidique, et bleu, rupture de la liaison glycosidique β -(1,6).

Ainsi, quatre dosages ont été effectués pour la réalisation de ce suivi : la molécule de départ (**Gen-S-BZT** ou **Gen-S-BZI**), le glucoside (**Glc-S-BZT** ou **Glc-S-BZI**), le gentiobiose (**Gen**) et le glucose (**Glc**). Les résultats sont présentés dans la figure 3.3 sous la forme d'un bilan glucose (deux unités glucose sont présentes dans le gentiobiose et ses dérivés, une seule unité dans le glucose et ses dérivés).

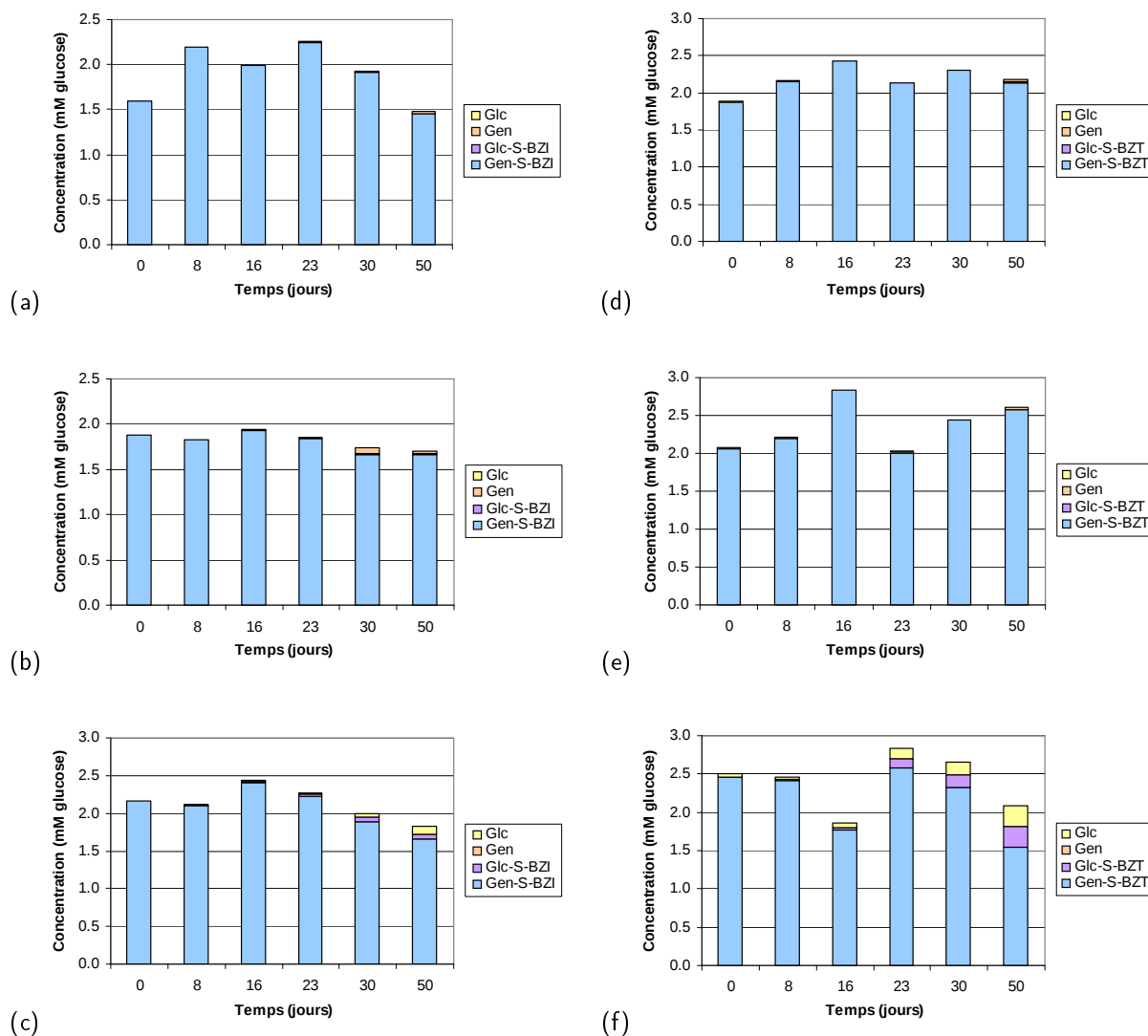


FIGURE 3.3. Suivi des dégradations du **Gen-S-BZI** à (a) pH 7, (b) pH 8 et (c) pH 5,5 et du **Gen-S-BZT** à (d) pH 7, (e) pH 8 et (f) pH 5,5.

Le **Gen-S-BZI** et le **Gen-S-BZT** sont tous deux stables à plus de 95 % après 50 jours à pH 7 et à pH 8. Quelques dégradations sont visibles à pH 5,5 au niveau de la liaison glycosidique β -(1,6). Elles restent cependant très limitées par rapport à la grande échelle de temps de l'expérimentation qui se prolonge jusqu'à 50 jours (74 % de conservation du **Gen-S-BZT** et 91 % de conservation du **Gen-S-BZI** après 50 jours à pH 5,5).

4. Évaluation de l'inhibition de la nitrification sur un modèle *in vitro*

4.1. Culture de bactéries nitrifiantes

Pour pouvoir engager des tests d'inhibition de la nitrification *in vitro*, il a tout d'abord été nécessaire de cultiver des bactéries nitrifiantes en réacteur. Celles-ci sont issues de boues activées, prélevées dans une station d'épuration. Comme énoncé lors des mesures de DBO_5 , les boues activées ont l'avantage de contenir un éventail très varié de souches bactériennes. La majorité d'entre elles sont des souches de type hétérotrophe qui consomment de l'azote organique. La sélection des bactéries nitrifiantes se fait alors par acclimatation à une nouvelle alimentation pendant plusieurs semaines. Une alimentation de type inorganique (NH_4HCO_3 , Na_2HCO_3 et Na_2HPO_4) a pour effet de décroître la population de micro-organismes hétérotrophes et proliférer les souches autotrophes. La rigueur de cette sélection dépend alors de la durée de la période d'acclimatation. Il est également important de protéger le réacteur de la lumière afin d'éviter la présence d'organismes hétérotrophes capables de photosynthèse.

Les bactéries contenues dans le réacteur vivent en aérobie grâce à une aération permanente (figure 4.1). Elles sont alimentées en continu à partir du réservoir d'alimentation. Afin de garder un volume constant sans perdre de cellules, le réacteur est relié à un décanteur. Tandis que les micro-organismes tombent dans le fond pour être renvoyés vers le réacteur, le surplus de solution est évacué par le haut du décanteur. Enfin, les bactéries sont prélevées là où elles se trouvent en plus grande concentration, c'est-à-dire en sortie du décanteur.

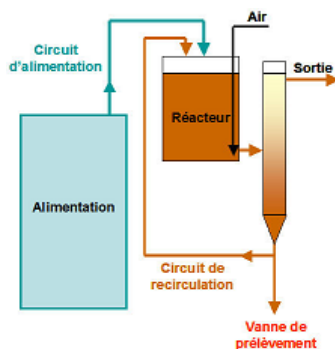


FIGURE 4.1. Schéma de montage du réacteur de culture des bactéries nitrifiantes

4.2. Tests d'inhibition de la nitrification en l'absence de bactéries hétérotrophes

Après 6 mois de culture dans le réacteur, des bactéries nitrifiantes provenant de la station d'épuration de Betton (Ille-et-Vilaine, France) et rigoureusement sélectionnées ont été utilisées pour effectuer des tests d'inhibition de la nitrification *in vitro*. En milieu tamponné par du maërl (un substrat constitué de débris d'algues marines riches en calcaire), compris entre pH 6 et 9, le suivi sur 2 semaines de la consommation d'ammoniums (figure 4.2) et de la production de nitrites (figure 4.3) par ces bactéries a été réalisé en présence de différents inhibiteurs, glycosylés ou non, à une concentration de 100 μM . Pour cela, le **MBT** et le **MBI**, insolubles dans l'eau, ont dû être formulés à l'aide de PEGs 1500. Un témoin contenant des PEGs seuls a donc été réalisé, en plus du témoin sans inhibiteur, pour s'assurer que ceux-ci n'influencent pas la consommation ni la survie des bactéries. Pour s'affranchir des effets

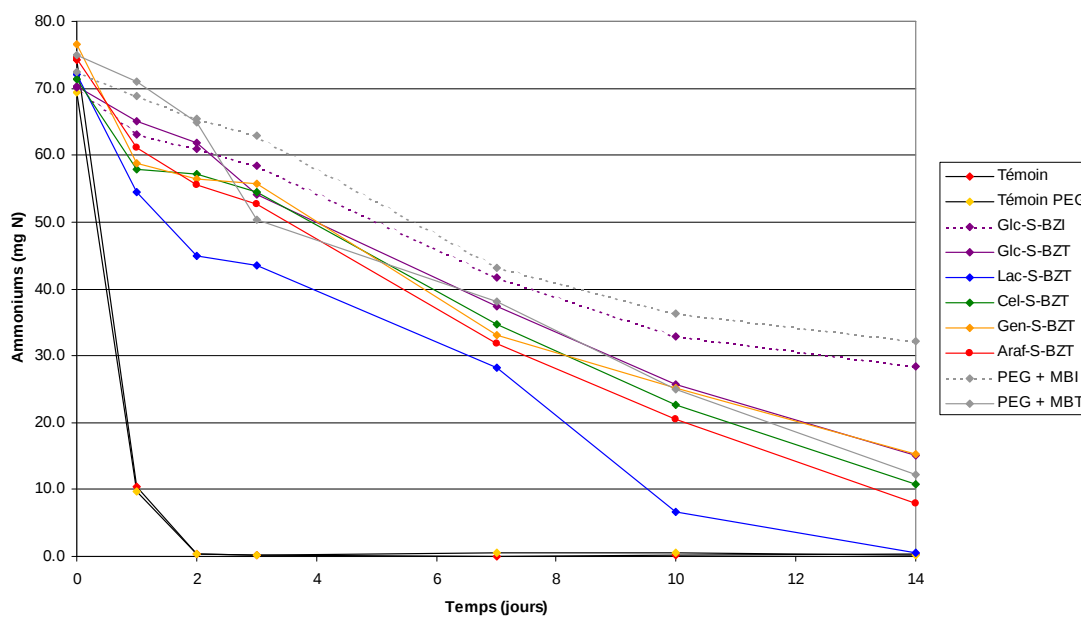


FIGURE 4.2. Suivi de la quantité d'ammoniums en l'absence de souches hétérotrophes

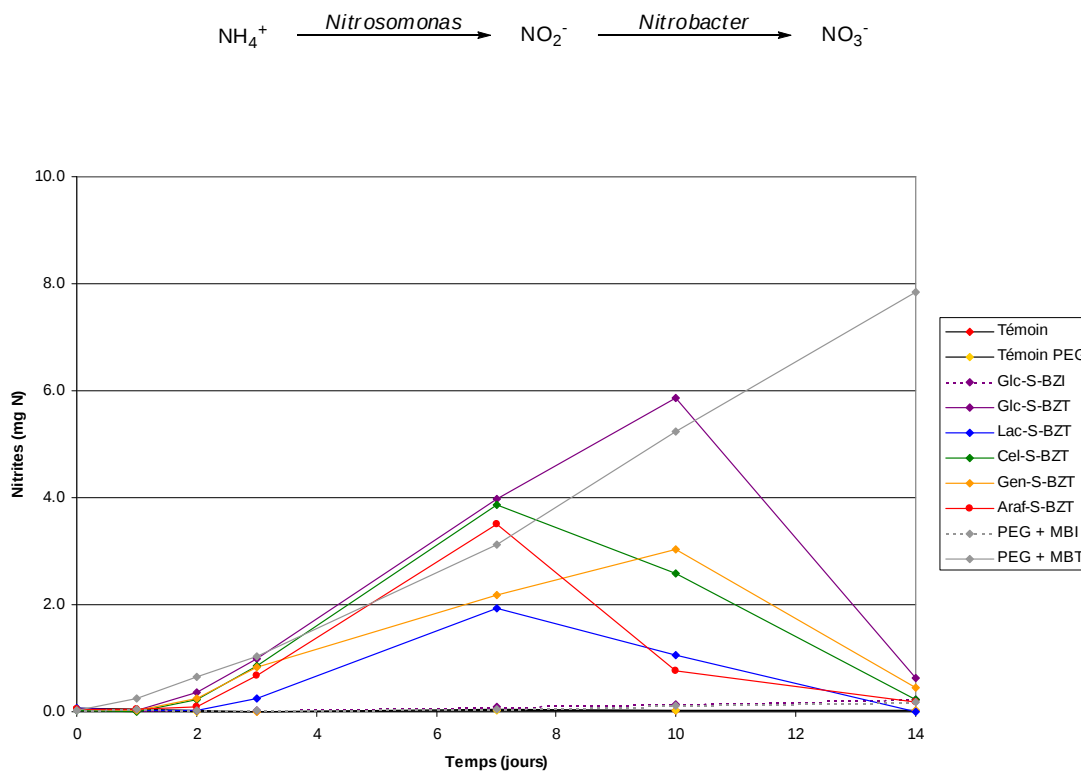


FIGURE 4.3. Suivi de la quantité de nitrites en l'absence de souches hétérotrophes

environnementaux, tels que les variations de la température ambiante, les inhibiteurs ont tous été testés en parallèle sur une même population de micro-organismes. Le suivi des concentrations en ammoniums et en nitrites a été réalisé à l'aide de dosages par colorimétrie. Le pH a été contrôlé tout au long de l'expérimentation pour s'assurer d'être dans la gamme optimale pour les bactéries.

Tandis que la totalité de l'ammonium est consommée en moins de 2 jours dans les expériences témoins, elle l'est en plus de 14 jours en présence d'inhibiteur (figure 4.2). Toutes les molécules testées ici, qu'elles soient glycosylées ou non, ralentissent largement la disparition des ammoniums, et montrent ainsi une activité inhibitrice sur les bactéries *Nitrosomonas*, responsables de la première étape du processus de nitrification. En présence d'inhibiteurs, les nitrites, produits plus rapidement qu'ils sont consommés, s'accumulent (figure 4.3). Cette accumulation atteint un sommet, avant de décroître lorsque la concentration en ammonium devient trop faible (inférieure à 30 mg d'azote). Hors, aucune accumulation n'est visible dans le cas des témoins, gage de la rapide consommation des nitrites en l'absence d'inhibiteurs. Ceci montre que nos molécules inhibent également les bactéries responsables de la seconde étape de la nitrification, les *Nitrobacter*. De ce fait, toutes les molécules évaluées lors de ce test ont montré une activité significative vis-a-vis de la nitrification et cette inhibition vise aussi bien les *Nitrosomonas* que les *Nitrobacter*.

Lorsque l'on compare l'effet du **MBT** et du **MBI** sur la consommation des ammoniums (figure 4.2), une différence significative d'activité est observée au-delà de 2 jours d'incubation. La diminution des ammoniums est plus lente en présence de **MBI**, avec environ 40 % de conservation après 14 jours, contre moins de 20 % dans le cas du **MBT**. Un constat similaire est observé lorsque le **Glc-S-BZT** est comparé au **Glc-S-BZI**. Ainsi, en matière d'inhibition des *Nitrosomonas*, le **MBI** et ses dérivés sont plus efficaces que les molécules issues du **MBT**. Par ailleurs, les accumulations de nitrites en présence des dérivés du **MBT** sont bien plus importantes qu'en présence de **MBI** ou de **Glc-S-BZI** (figure 4.3) : après 10 jours d'incubation, les concentrations en nitrites sont 50 fois supérieures en présence de **MBT** qu'avec du **MBI** et 40 fois supérieures dans le cas du **Glc-S-BZT** par rapport au **Glc-S-BZI**. Il semble donc que les *Nitrobacter* soient moins sensibles au **MBI** et à ses dérivés qu'au **MBT**, glycosylé ou non.

Pour résumer, l'inhibition des *Nitrosomonas* est meilleure en présence du **MBI** et de ses dérivés, tandis que les *Nitrobacter* sont plus sensibles aux inhibiteurs de la famille du **MBT**. Ainsi, le **MBI** et ses dérivés glycosylés, qui accumulent peu de nitrites, semblent les plus adaptés pour une utilisation en agronomie. Mais ce constat est modéré par les faibles quantités de nitrites accumulées par rapport à la concentration introduite en ammoniums.

Nous pouvons ensuite comparer l'effet des différentes parties saccharidiques des inhibiteurs sur la consommation des ammoniums (figure 4.2). Aucune différence significative d'activité n'est observée entre le **MBI** et le **Glc-S-BZI**, ainsi qu'entre le **MBT** et le **Glc-S-BZT**. Nous constatons également que l'ajout, sur le **MBT**, d'une unité sucre de type cellobiose (**Cel-S-BZT**), gentiobiose (**Gen-S-BZT**) ou arabinofuranose (**Araf-S-BZT**) n'a pas significativement modifié l'effet sur la consommation des ammoniums, et donc l'activité sur les *Nitrosomonas*. Seul le **Lac-S-BZT** semble moins efficace que les autres. Ce résultat pourrait être dû à une différence d'hydrophilie, ce dernier étant le moins hydrosoluble. Quelques différences apparaissent pourtant sur l'accumulation des nitrites (figure 4.3). L'accumulation la plus importante est observée dans le cas du **MBT**. L'ajout d'une unité sucre sur la partie active semble diminuer l'inhibition des *Nitrobacter*, puisque l'accumulation de nitrites observée dans le cas des inhibiteurs glycosylés est moins importante.

D'après ces résultats, il semblerait donc que, dans la majorité des cas, la glycosylation ne modifie pas significativement l'activité des inhibiteurs sur les *Nitrosomonas* (excepté dans le cas du lactoside), mais diminue l'inhibition des *Nitrobacter*. Les nitrites, toxiques, atteignent alors des concentrations plus faibles en présence des inhibiteurs glycosylés.

4.3. Tests d'inhibition de la nitrification en présence de bactéries hétérotrophes

Afin de compléter la première expérience, une seconde expérimentation a été réalisée à partir de bactéries nitrifiantes provenant de la station d'épuration de Cesson-Sévigné (Ille-et-Vilaine), qui n'ont été sélectionnées que pendant 1 mois dans le réacteur. Ainsi, nous avons supposé que des souches hétérotrophes restaient présentes bien que très minoritaires. Les mélanges ont été réalisés suivant le même protocole opératoire que lors de l'expérience précédente. Seuls les types de dosages ont été modifiés. Comme précédemment, le pH a été suivi, ainsi que la concentration en ammoniums par colorimétrie (figure 4.4). Les suivis des concentrations en nitrites (figure 4.5) et

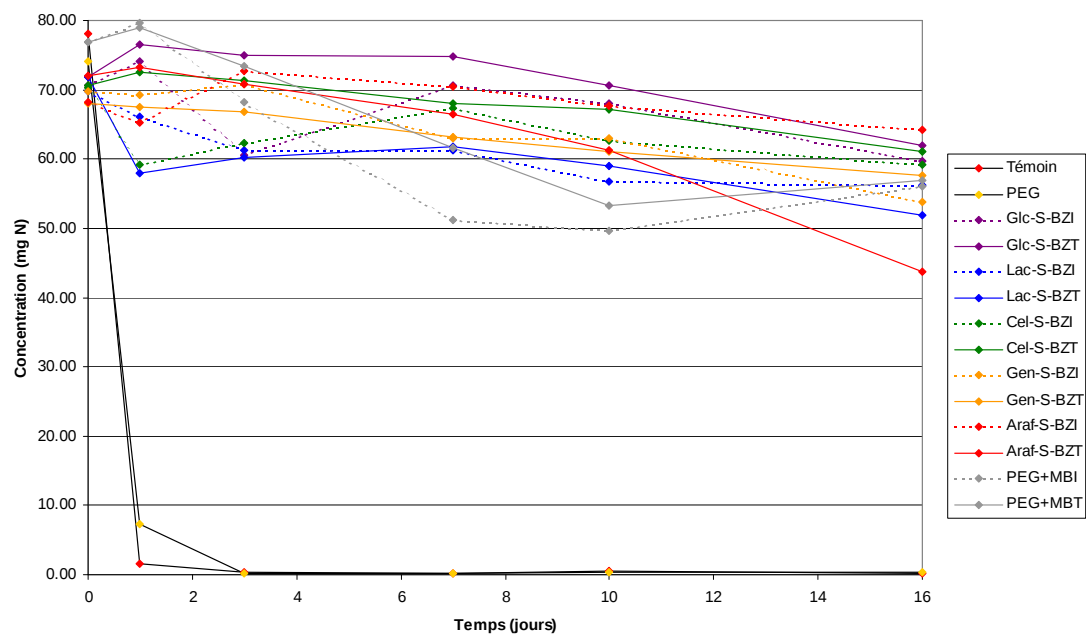


FIGURE 4.4. Suivi de la quantité d'ammoniums en présence de souches hétérotrophes

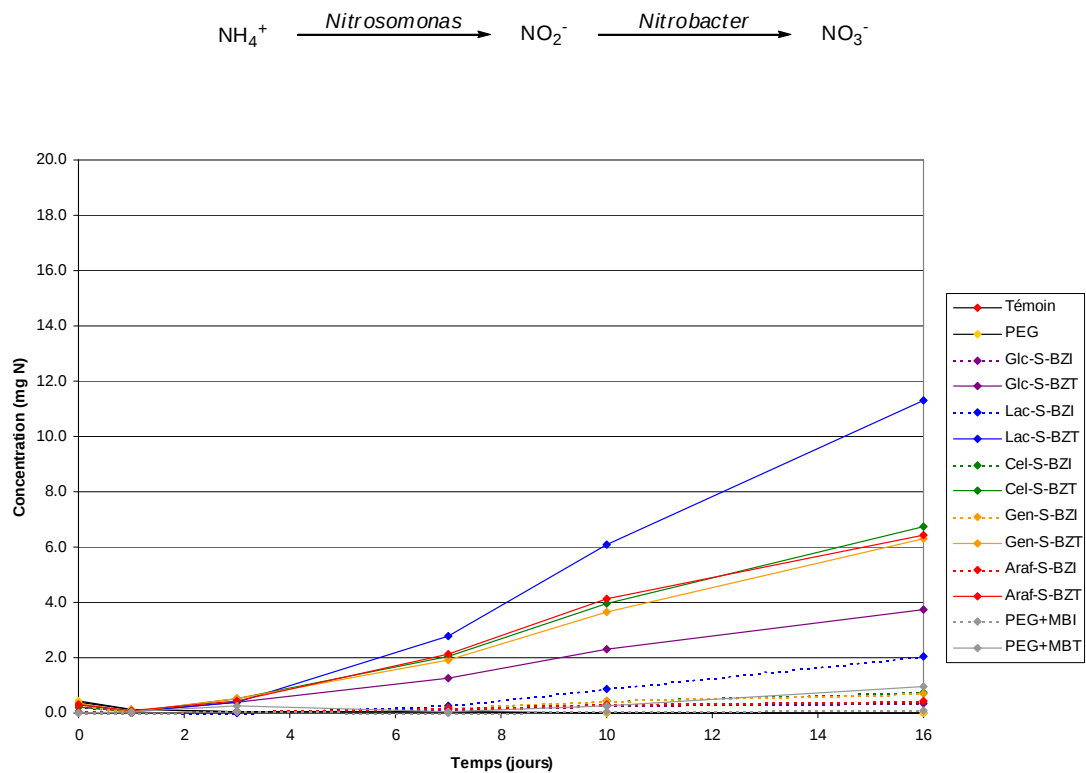


FIGURE 4.5. Suivi de la quantité de nitrites en présence de souches hétérotrophes

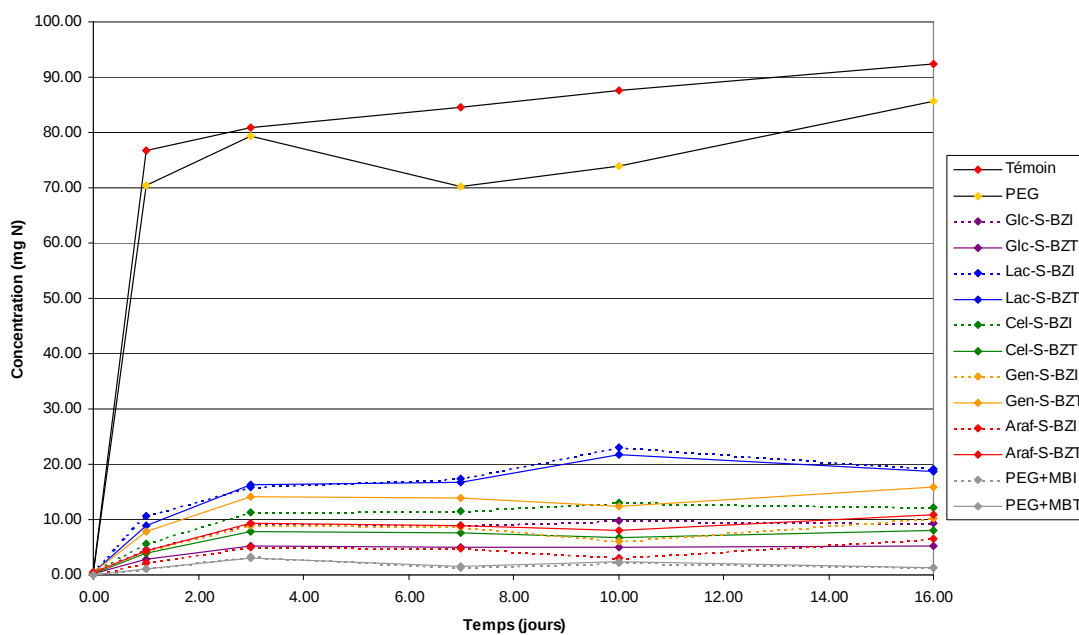


FIGURE 4.6. Suivi de la quantité de nitrates en présence de souches hétérotrophes

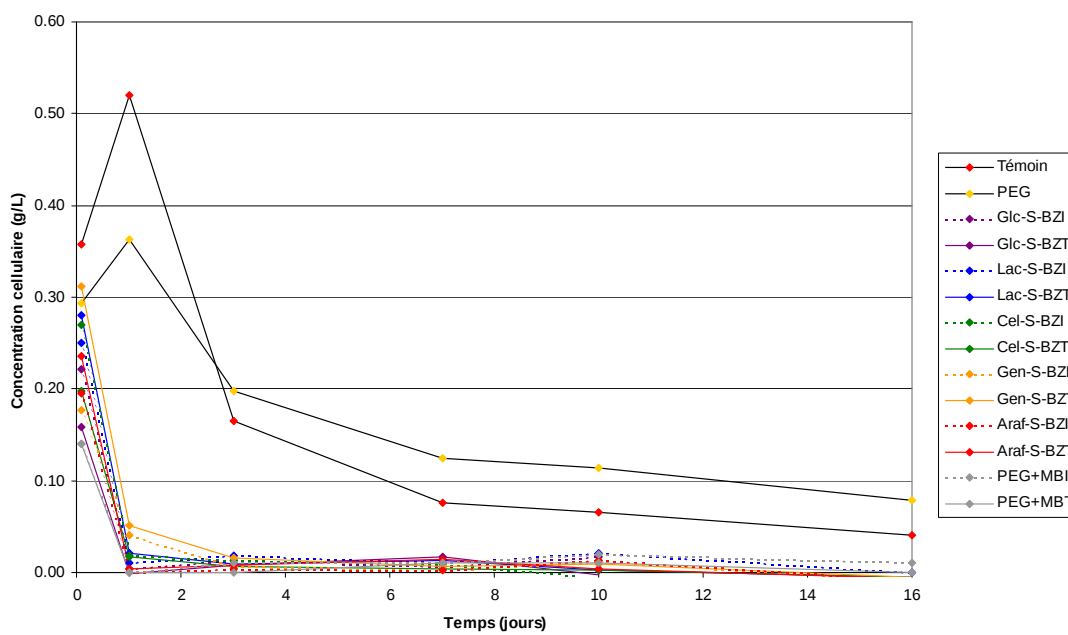


FIGURE 4.7. Suivi de la vie cellulaire en présence de souches hétérotrophes

en nitrates (figure 4.6) ont été réalisés par chromatographie ionique. Un suivi de la vie cellulaire par colorimétrie (figure 4.7) a également été mis en place, basé sur le dosage de la respiration cellulaire par la résazurine.

Lors de ce test, la consommation d'ammonium en présence d'inhibiteurs est beaucoup plus faible que lors de la première expérimentation, bien que les témoins suivent le même profil que précédemment (figure 4.4). L'accumulation de nitrite n'atteint pas un maximum, mais continue de croître même après 16 jours d'expérimentation (figure 4.5). Les nitrates, quant à eux, atteignent un pallier dès le troisième jour (figure 4.6). Ces résultats peuvent s'expliquer par le suivi de la vie cellulaire (figure 4.7). Dans le cas des témoins, une forte croissance est observée pendant la phase de consommation des ammoniums, suivie d'une diminution progressive de la population bactérienne lorsque le substrat (NH_4^+) vient à manquer. En présence d'inhibiteurs, les bactéries sont décimées en moins de 3 jours.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences observées entre les deux tests d'inhibition de la nitrification. Tout d'abord, les bactéries ne provenant pas de la même source, peuvent avoir des sensibilités différentes face aux produits toxiques. Il se peut donc que les bactéries de la station d'épuration de Betton soient plus résistantes que celles de la station de Cesson-Sévigné. **Plus important, il subsistait, lors de la seconde expérimentation, quelques souches de bactéries hétérotrophes, pouvant très rapidement dégrader les inhibiteurs glycosylés, source de carbone. Les parties actives ainsi libérées, plus toxiques que les composés saccharidiques, ont pu alors plus fortement affecter la population microbienne.**

Pour vérifier ces hypothèses, il est nécessaire, tout d'abord de savoir si la quantité de bactéries introduites aurait pu changer les profils des différents suivis, mais également de déterminer le devenir des inhibiteurs glycosylés, et notamment de leur partie sucre, en présence de ce consortium bactérien. Une dernière expérience a été réalisée dans ce but à partir de quantités variables de ces bactéries (de 5 mg à 50 mg), mises en présence de **Gen-S-BZI** ou de **Gen-S-BZT** (100 μM), suivant le même protocole que précédemment. Le suivi de la vie cellulaire ainsi que la consommation d'ammoniums ont été effectués sur 3 jours. Les inhibiteurs et leurs produits de dégradations restant après 3 jours de contact avec les bactéries ont par la suite été dosés par LC/MS avec l'aide de Samuel HUGUET de l'équipe CIP de l'ENSCR.

Quelle que soit la quantité initiale en bactéries, la mort cellulaire en présence d'inhibiteurs est très rapide (moins de 1 jour pour 20 mg de bactéries, moins de 2 jours pour 50 mg de bactéries). Dans tous les cas, la courbe de vie cellulaire tend vers zéro (figure 4.8). De plus, aucune consommation d'ammoniums n'a pu être observée, quel que soit le cas. Ainsi, la quantité de bactéries initialement introduites dans les tests n'a que peu d'influence sur les profils des différents dosages. Les différences observées entre les résultats du premier et du second test d'inhibition de la nitrification semblent effectivement dues au changement de consortium bactérien.

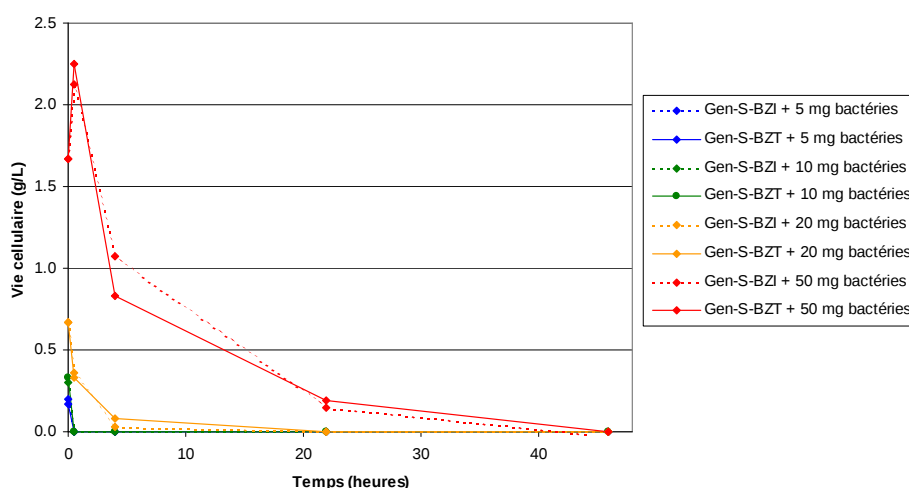


FIGURE 4.8. Suivi de la vie cellulaire en présence de quantités initiales variables en bactéries

De plus, les analyses de traces montrent clairement que la partie glycosidique des inhibiteurs a été très rapidement minéralisée. Quelle que soit la quantité de bactéries initialement introduite, il ne reste plus d'inhibiteur de

départ après 2 jours d'incubation. Nous avons observé la présence de **Glc-S-BZI** ou de **Glc-S-BZT**, produits de la rupture glycosidique des inhibiteurs, dans des concentrations très faibles (inférieures à $1,3 \mu\text{M}$ contre $100 \mu\text{M}$ de **Gen-S-BZI** et **Gen-S-BZT** initialement introduits) (figure 4.9). De plus, la concentration de ces produits de dégradation diminue à mesure que la quantité de bactéries augmente, ce qui signifie que la vitesse de dégradation des inhibiteurs glycosylés croît avec la quantité de bactéries. Ce lien entre la dégradation des inhibiteurs et la quantité de bactéries confirme la consommation des sucres par les micro-organismes hétérotrophes, libérant la partie active dans le milieu. Une fois encore nous pouvons remarquer que la liaison coupée prioritairement est la liaison glycosidique. Il semble donc que, comme énoncé dans l'hypothèse de départ, les inhibiteurs glycosylés soient des pro-drogues, capables de libérer le **MBI** ou le **MBT** dans le milieu par l'action des bactéries hétérotrophes.

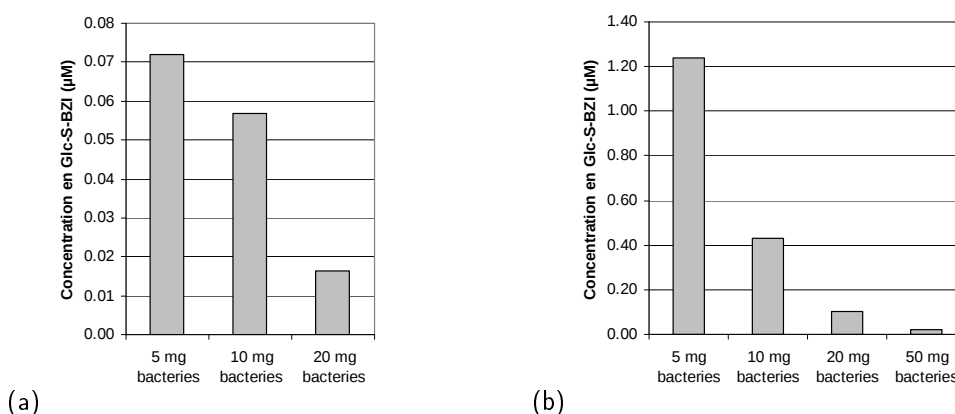


FIGURE 4.9. Après deux jours de contact des inhibiteurs glycosylés (**Gen-S-BZI** et **Gen-S-BZT**) avec une quantité variable de bactéries, (a) dosages du **Glc-S-BZI**, produit de dégradation du **Gen-S-BZI** et (b) dosages du **Glc-S-BZT**, produit de dégradation du **Gen-S-BZT**. Les dosages des inhibiteurs initialement introduits ont montré leur dégradation totale.

5. Expérimentations sur sols

5.1. Inhibition de la nitrification *in vivo*

La série d'expérimentations *in vitro* étant concluante, les inhibiteurs glycosylés ont par la suite été envoyés à l'INRA de Caen afin d'évaluer leur efficacité dans les sols. Ces travaux ont été réalisés par Mustapha ARKOUN, doctorant sous la direction d'Alain OURRY. De plus amples précisions seront donc présentées dans son mémoire de thèse.

Pour pouvoir tester les nouveaux inhibiteurs de la nitrification *in vivo*, deux types de sols ruraux, venant de Basse-Normandie, ont été choisis pour leurs pH. Le sol alcalin (pH 8,2) a été prélevé à Courseulles-sur-mer (Calvados, France) et le sol acide (pH 5,5) à Mortrée (Orne, France). Ces sols ont été préparés par séchage et tamisage (2 mm) et leurs caractéristiques ont été mesurées. Elles sont résumées dans le tableau 4.1.

TABLEAU 5.1. Caractéristiques des sols utilisés pour les expérimentations *in vivo*.

Caractéristique	Sol alcalin	Sol acide
pH	8,2	5,5
Texture	limon	sable, argile, limon
Matière organique (g/kg)	21	32
Taux de saturation	230	66
Argile (g/kg)	6,06	1,48

Afin d'évaluer l'inhibition de la nitrification, une solution de sulfate d'ammonium a été apportée aux sols, ainsi qu'une solution d'inhibiteurs. Le **MBT** a été introduit à hauteur de 4,5 % massique par rapport à l'azote ammoniacal apporté, conformément à la réglementation EC No. 1107/2008. Pour pouvoir effectuer des comparatifs, les autres inhibiteurs (molécules glycosylées ou dérivées du **MBI**) sont introduits dans la même concentration molaire que le **MBT**. Chaque expérience a été répétée 4 fois.

Tout d'abord, en l'absence d'inhibiteur (figure 5.1), la concentration d'ammoniums reste sensiblement stable pendant environ 5 jours, avant de commencer à décroître, quel que soit le pH du sol. Dans des conditions alcalines (figure 5.1.a), les ammoniums sont consommés rapidement, jusqu'à atteindre une concentration nulle après seulement une vingtaine de jours. En revanche, dans le sol acide (figure 5.1.b), cette consommation est bien plus lente, et après 30 jours d'incubations, la moitié des ammoniums apportés initialement sont encore présents. La nécessité d'inhiber le phénomène de nitrification est donc bien plus importante dans le cas des sols alcalins.

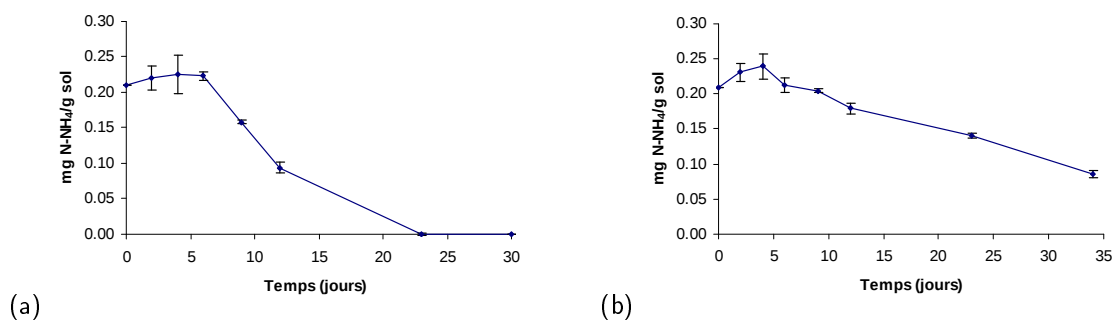


FIGURE 5.1. Suivi de la consommation d'ammoniums sans inhibiteurs (a) en sol alcalin et (b) en sol acide.

Les graphiques relatifs à la consommation des ammoniums en présence des inhibiteurs non glycosylés (**MBT** et **MBI**) montrent l'efficacité de ces derniers (figure 5.2). Par exemple, l'utilisation de ces principes actifs a permis de maintenir la présence d'ammoniums dans les échantillons de sols alcalins au delà de 30 jours (figure 5.2.a). Mais ces graphiques ont surtout mis en évidence un phénomène inattendu. Dans les sols alcalins, le **MBI** est plus efficace que le **MBT**, avec 41 % de l'azote ammoniacal apporté initialement restant après 30 jours d'incubation en présence de **MBI**, contre seulement 14 % en présence de **MBT** (figure 5.2.a). En revanche, le **MBT** est le plus efficace en milieu acide et dans ce cas, il n'y a aucune consommation d'ammoniums significative visible après 30 jours. (figure 5.2.b). Ce phénomène se confirme également avec les inhibiteurs dérivés du glucose : le **Glc-S-BZI** est plus efficace que le **Glc-S-BZT** en milieu alcalin (figure 5.2.c), et l'inverse se produit en sols acides (figure 5.2.d). **Il existe donc une complémentarité d'utilisation des deux principes actifs.**

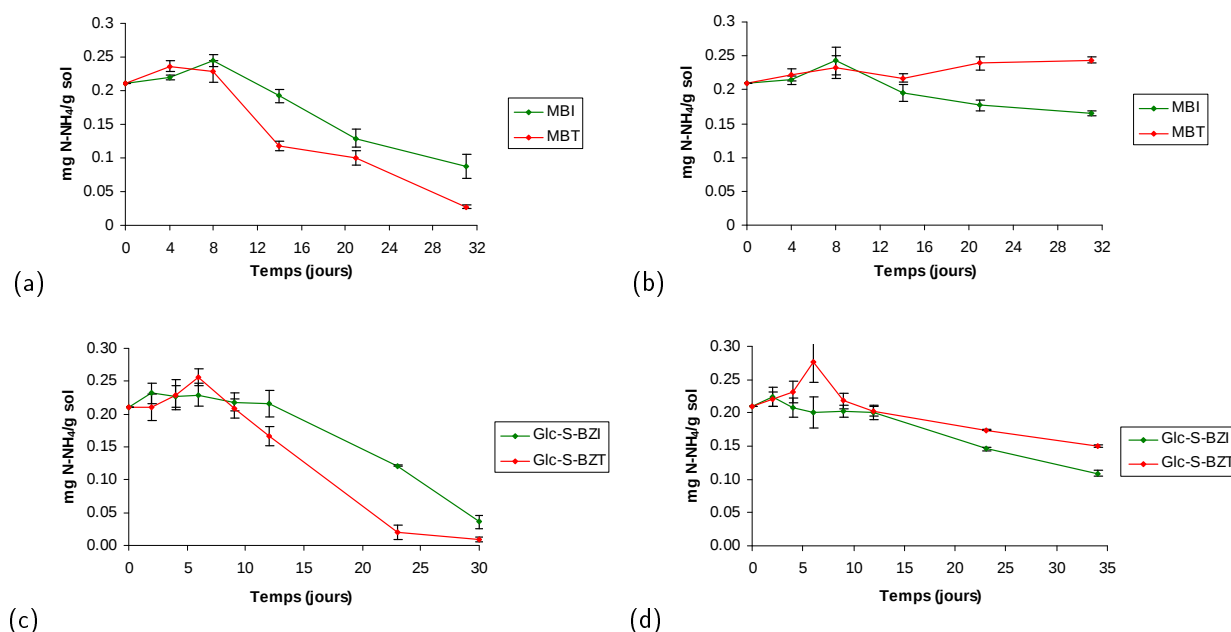


FIGURE 5.2. Suivi de la consommation d'ammoniums en présence de **MBI** et de **MBT** (a) en sol alcalin et (b) en sol acide. Suivi de la consommation d'ammoniums en présence de **Glc-S-BZI**, de **Glc-S-BZT** (c) en sol alcalin et (d) en sol acide.

Nous avons montré que le **MBT** et le **MBI** avaient des effets différents suivant le pH du sol, ce dernier facteur ayant une forte influence sur l'activité biologique des sols. Par la suite, les dérivés glycosylés du **MBI** n'ont été évalués que sur les sols alcalins et les dérivés du **MBT** sur les sols acides (figure 5.3). **Dans les conditions présentes, il n'existe pas de différence significative entre l'effet des principes actifs seuls et celui de leurs dérivés glycosylés, quel que soit le choix du sucre ajouté.** Ceci coïncide avec l'hypothèse énoncée lors des expérimentations *in vitro*, à savoir que la partie sucre des molécules est rapidement consommée par les organismes hétérotrophes, libérant le principe actif dans les sols.

5.2. Analyse des dégradations

Les dérivés connus du **MBT** ont été répertoriés par De Wever et al. [15], et sont résumés dans le tableau 5.2. Par le passé, de nombreuses études ont été réalisées pour identifier les sous produits du **MBT**, en aérobie ou en anaérobie, le plus souvent au moyen de boues activées. L'équipe de De Wever [16] propose le benzothiazole-2-sulfonate (**BTSO₃**), le benzothiazole (**BZT**) et le 2-hydroxybenzothiazole (**OHBT**) comme sous-produit du **MBT**. Reemtsma et al. [66] proposent les mêmes transformations, mais également le 2,2'-dithio-bisbenzothiazole (**DM**). Enfin, d'après Brownlee et al. [7] le **MBT** serait capable de se dégrader en 2-méthylthio-benzothiazole (**MTBT**) d'une part, en **BZT** puis en **HOBT** d'autre part.

Pour estimer la longévité des inhibiteurs de nitrification dans les sols, Samuel HUGUET, de l'équipe CIP de l'ENSCR a effectué des dosages par LC/MS des produits de dégradation des inhibiteurs glycosylés et non glycosylés

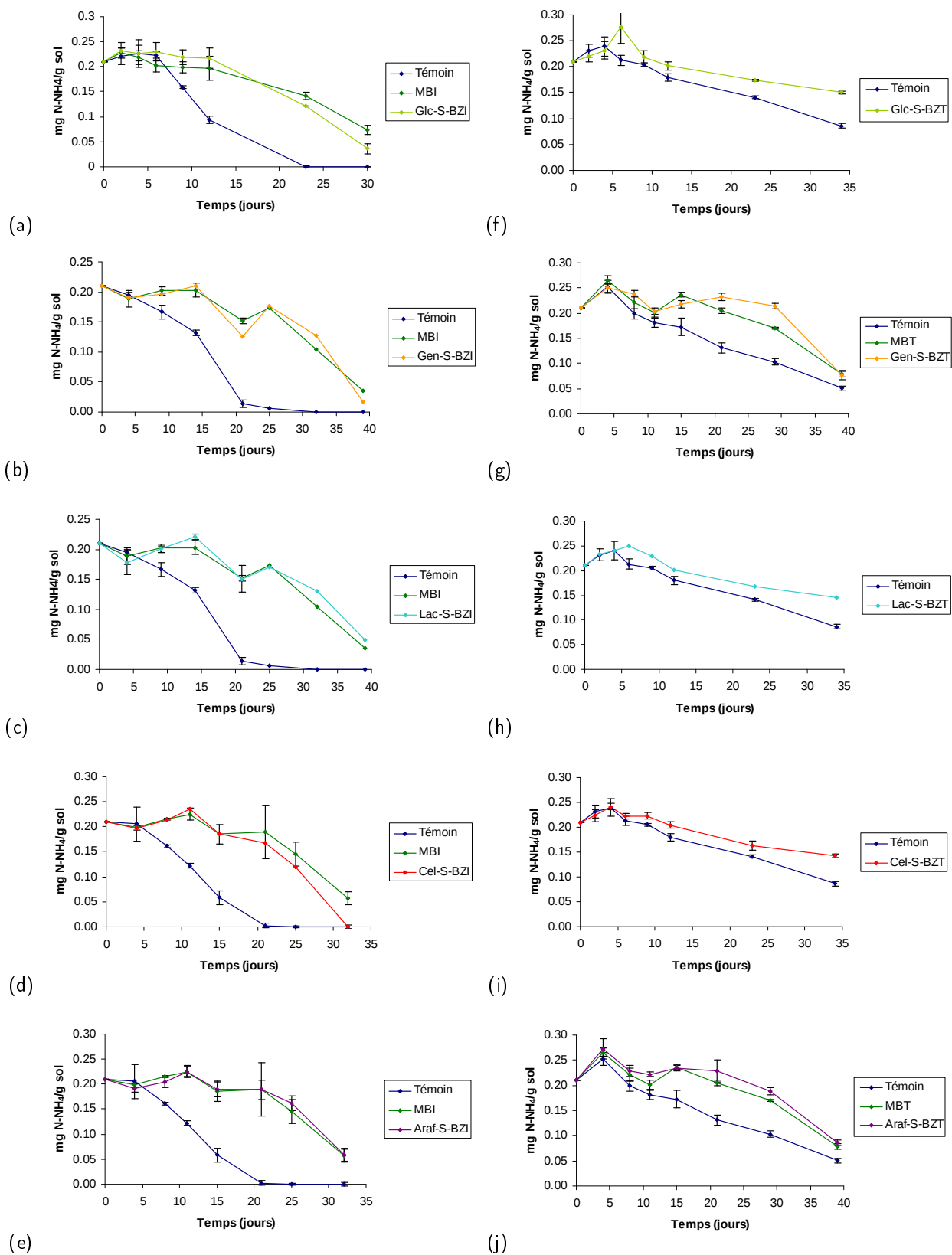


FIGURE 5.3. Suivi de la consommation d'ammoniums en présence des différents inhibiteurs glycosylés (a-e) en sol alcalin et (f-j) en sol acide.

TABLEAU 5.2. Dérivés du **MBT**, rencontrés dans la littérature [15].

c1ccc2c(c1)n(c2)R

Substituant R	Nom	Code
H	benzothiazole	BZT
OH	2-hydroxybenzothiazole	OHBT
SCH ₃	2-méthylthiobenzothiazole	MTBT
SCH ₂ SCN	2-thiocyanométhylthiobenzothiazole	TCMBT
SO ₃ H	benzothiazole-2-sulfonate	BTSO₃
NH ₂	2-aminobenzothiazole	ABT
-S-MBT	2,2'-dithiobisbenzothiazole	DM

incubés dans des sols pendant 72 heures (figure 5.4). La minéralisation des molécules, les nombreux produits non identifiés issus de la dégradation du **MBT** et du **MBI**, ou encore la forte adsorption des molécules dans le sol, sont autant de facteurs qui peuvent expliquer la diminution du bilan au fur et à mesure du temps. Les principaux produits de dégradation des inhibiteurs ont été néanmoins identifiés.

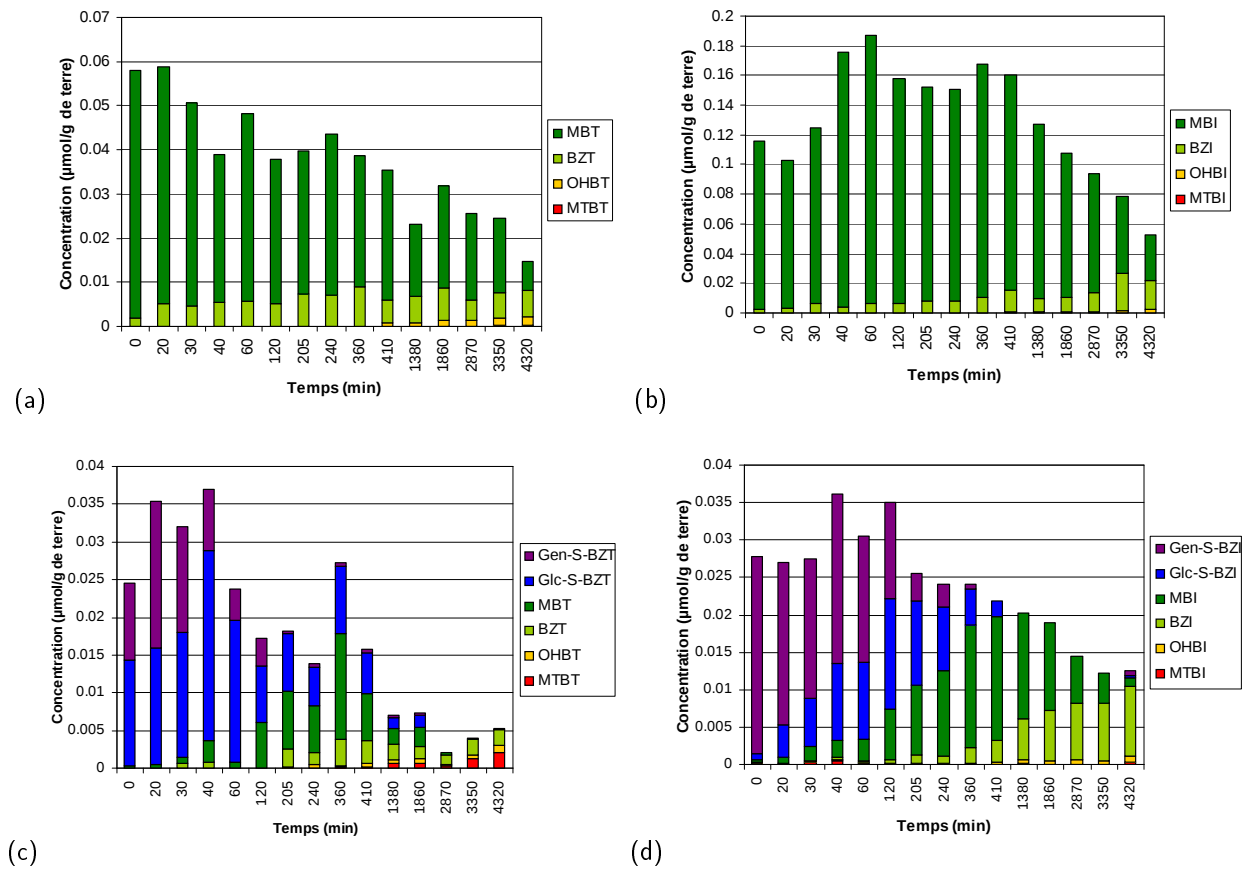


FIGURE 5.4. Diagramme de dégradation (a) du **MBT**, (b) du **MBI** (c) du **Gen-S-BZT** et (d) du **Gen-S-BZI**, en fonction du temps d'incubation dans un sol.

Tout d'abord, cette étude a démontré que le processus de dégradation du **MBT** correspond au mécanisme proposé par Brownlee et al. [7] : le **MBT** est dégradé en **BZT**, qui s'oxyde ensuite en **OHBT**. Plus tardivement, des phénomènes de biométhylation apparaissent avec la formation de **MTBT** (figure 5.4.a). Le **MBI** suit un processus

de dégradation semblable au **MBT**, avec la formation de benzimidazole (**BZI**), puis de 2-hydroxybenzimidazole (**OHBI**) et enfin l'apparition de traces de 2-méthylthiobenzimidazole (**MTBI**) (figure 5.4.b).

Dans le cas du **Gen-S-BZT** (figure 5.4.c) et du **Gen-S-BZI** (figure 5.4.d), une rupture de la liaison glycosidique a été observée dès le temps initial avec l'apparition respectivement de **Glc-S-BZT** et de **Glc-S-BZI**. Une dégradation s'est produite durant la phase d'extraction de la terre, nécessaire à l'analyse. Comme lors des tests précédents *in vitro*, l'inhibiteur de départ (**Gen-S-BZT** ou **Gen-S-BZI**) subit une décroissance rapide. Il n'en subsiste que des traces après seulement 360 minutes (6 heures) d'incubation. La quantité de **Glc-S-BZT** et de **Glc-S-BZI** augmente pendant les 40 premières minutes d'incubation, puis diminue progressivement pour laisser la place aux parties actives libres (**MBT** et **MBI**). Le **MBT** et le **MBI** libérés dans les sols subissent ensuite les dégradations observées précédemment, à savoir la perte de la fonction thiol (**BZT** et **BZI**) suivie d'une oxydation (**OHBT** et **OHBI**), puis le phénomène de biométhylation (**MTBT** et **MTBI**). Il est tout de même surprenant de remarquer que la durée de vie du **MBT** et du **MBI** est plus faible lorsque ceux-ci sont relâchés par les inhibiteurs glycosylés que lorsqu'ils sont introduits seuls dans les sols, puisqu'il n'en reste que des traces après 4320 minutes (72 heures), au dépend de leurs produits de dégradation.

Cette expérience montre une fois de plus le caractère éphémère des inhibiteurs glycosylés et la rapide consommation de la partie glycosidique des molécules dans le sol. Les dégradations successives observées lors de l'incubation du **Gen-S-BZT** et du **Gen-S-BZI** dans les sols sont résumées par la figure 5.5.

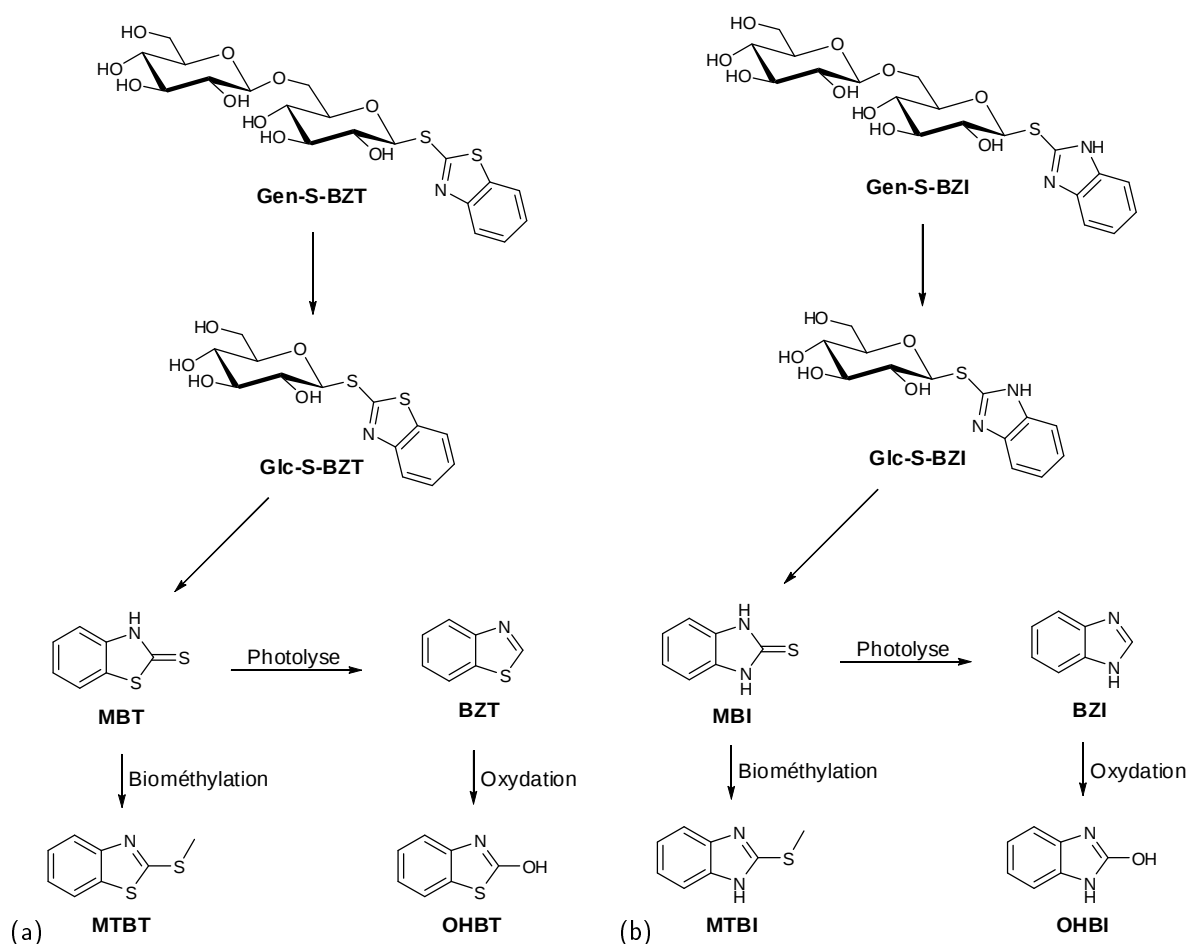


FIGURE 5.5. Dégradations successives (a) du **Gen-S-BZT** et (b) du **Gen-S-BZI**, observées dans les sols.

Pour connaître l'origine des dégradations observées, des expériences similaires ont été réalisées sur des sols stérilisés à l'autoclave (figure 5.6). L'inhibiteur de départ, qui s'était dégradé à plus de 97 % en seulement 6 heures lors de l'expérience précédente, subsiste pendant plus de 48 heures dans des sols stérilisés, avec une conservation

de 48 % dans le cas du **Gen-S-BZI** et de 98 % pour le **Gen-S-BZT**. Les dégradations du **Gen-S-BZT** et du **Gen-S-BZI** observées dans les sols non stérilisés sont donc très majoritairement l'effet d'une activité bactérienne.

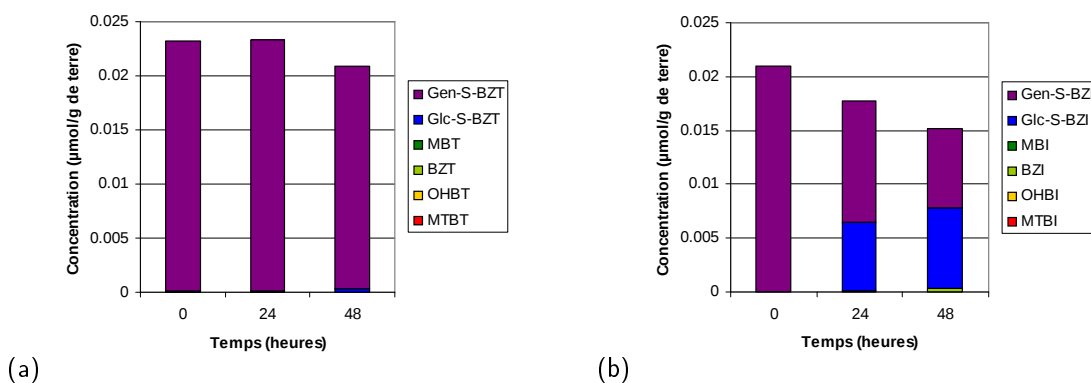


FIGURE 5.6. Diagramme de dégradation (a) du **Gen-S-BZT** et (b) du **Gen-S-BZI**, en fonction du temps d'incubation dans un sol stérilisé.

5.3. Analyse de la mobilité

Des expérimentations ont été effectuées sur colonnes de sols par Mustapha ARKOUN à l'INRA de Caen et Samuel HUGUET de l'équipe CIP de l'ENSCR afin d'évaluer la mobilité des inhibiteurs. Des colonnes de sols de 60 cm de hauteur et 8 cm de diamètre ont été mises en places à partir de 3 kg de sols reconstitué. Des inhibiteurs (**MBI**, **MBT**, **Gen-S-BZI** et **Gen-S-BZT**) ont été apportés par le haut dans 50 mL d'eau, à la concentration de l'utilisation en champ (12,2 mM). Des lixiviations ont été réalisées dans les jours suivants : 500 mL d'eau après 2 jours, puis 150 mL d'eau après 8, 15 et 24 jours. Les inhibiteurs de départ et leurs produits de dégradation ont été dosés par LC/MS sur 3 horizons de 20 cm de hauteur chacune, ainsi que sur les eaux de percolations, après différents temps d'incubation (figure 5.7). Ces mesures ont permis d'étudier les horizons de sols affectées par les différents inhibiteurs (figure 5.8).

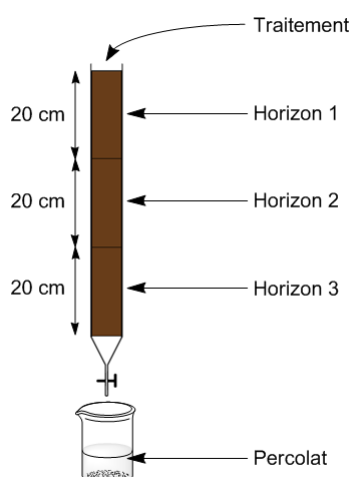


FIGURE 5.7. Schéma des colonnes de sol

Quelles que soient les molécules incubées, les inhibiteurs et leurs produits de dégradation sont essentiellement retrouvés dans la première couche de 20 cm d'épaisseur. Les produits de dégradation du **MBI** sont également retrouvés dans les horizons 2 et 3 (figure 5.8.b), tandis que ceux du **MBT**, non hydrosoluble, ne sont pas entraînés

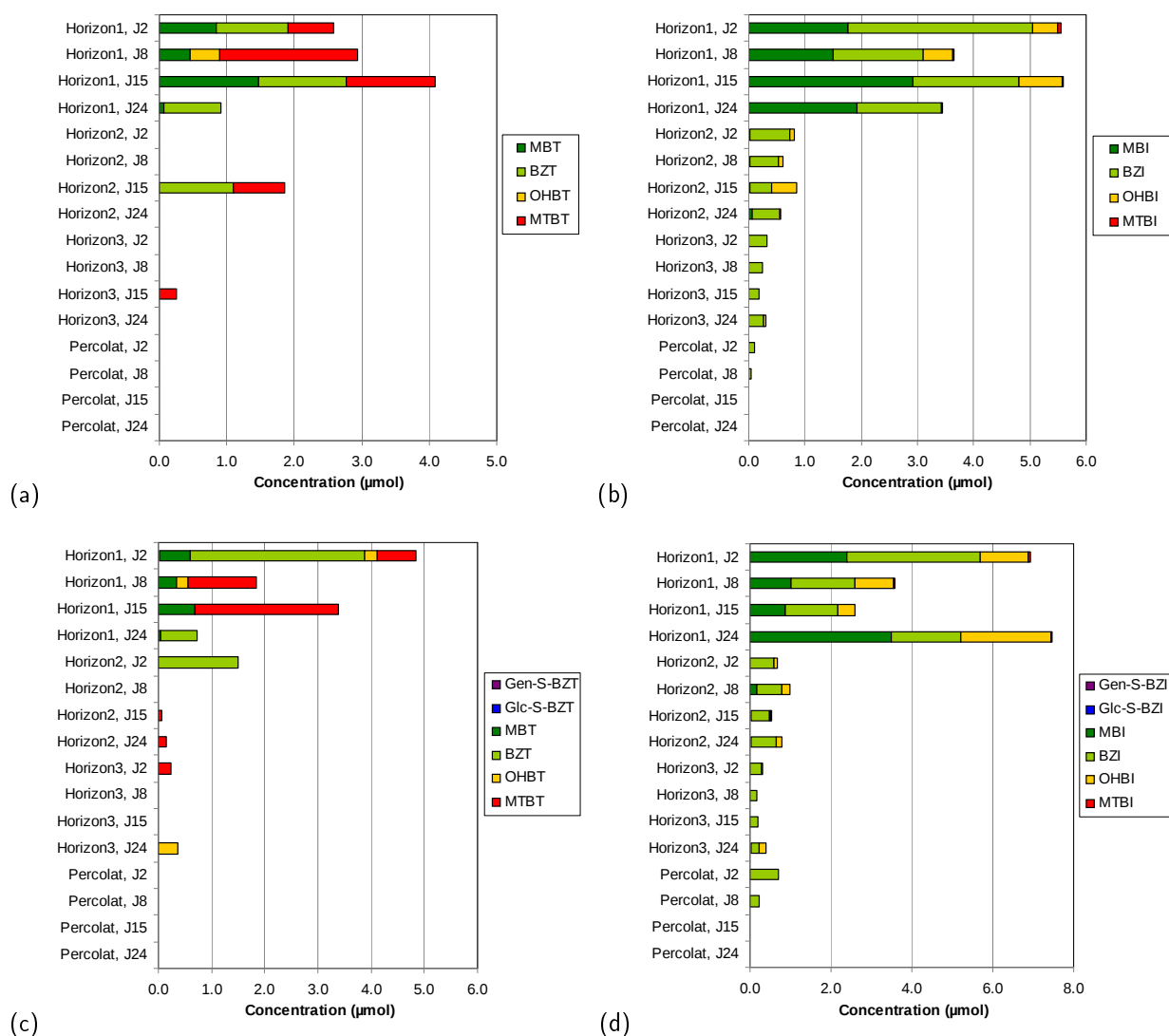


FIGURE 5.8. Diagramme de dégradation (a) du **MBT**, (b) du **MBI** (c) du **Gen-S-BZT** et (d) du **Gen-S-BZI**, en fonction du temps d'incubation dans un sol pour différents horizons.

au delà de l'horizon 1 (figure 5.8.a). Dans le cas des inhibiteurs glycosylés, nous observons une faible augmentation de la profondeur atteinte. En effet, quelques produits de dégradation du **Gen-S-BZT** ont été retrouvés dans l'horizon 2 (figure 5.8.d), et ceux du **Gen-S-BZI** ont été entraînés jusqu'au percolat (figure 5.8.c). Cependant, cette amélioration, très faible, n'est pas forcément représentative.

Ces tests ont apporté une réponse préliminaire sur la mobilité des molécules dans le sol. Le **MBI**, plus soluble que le **MBT**, est par conséquent plus mobile. De même, les molécules glycosylées semblent entraînées un peu plus profondément que leur partie active seule. Cependant, une analyse plus fine est nécessaire pour évaluer l'augmentation de la bio-disponibilité des inhibiteurs.

6. Conclusion

Dans le but de concevoir des inhibiteurs de nitrification solubles dans l'eau, à partir du 2-mercapto-benzothiazole et de son analogue structural, le 2-mercapto-benzimidazole, une famille de molécules glycosylées a été synthétisée. Des études d'hydrosolubilité et d'écotoxicité ont été menées. La mise au point d'un protocole de test adapté a également permis d'évaluer l'activité inhibitrice de ces molécules sur des bactéries nitrifiantes, cultivées à partir de boues activées. Des expérimentations sur sols ont par la suite été réalisées.

Comme nous l'avions escompté, la glycosylation a nettement accru l'hydrosolubilité des inhibiteurs, permettant leur dissolution directe dans l'eau, sans besoin d'additif. Leur utilisation en est largement simplifiée. De plus, l'ajout de motif saccharidique sur les inhibiteurs a apporté un effet bénéfique en terme d'écotoxicité, excepté dans le cas des dérivés de l'arabinofuranoside. Au terme de cette étude, les dérivés du gentiobiose ont été sélectionnés pour leurs excellentes performances en terme de solubilité et d'écotoxicité, afin d'évaluer leur dégradabilité.

Lors des expérimentations *in vitro* comme *in vivo*, la glycosylation n'a pas modifié l'activité inhibitrice des composés de départ. Le 2-mercapto-benzimidazole, dont l'activité inhibitrice n'était alors que supposée, a confirmé son potentiel, en particulier par une inhibition préférentielle des bactéries *Nitrosomonas*, limitant ainsi l'accumulation de nitrites par rapport au 2-mercapto-benzothiazole. Par ailleurs, une complémentarité a été observée entre les deux parties actives quant au type de sol à traiter : les dérivés du **MBI** sont plus efficaces dans les sols alcalins tandis que les dérivés du **MBT** sont mieux adaptés pour les sols acides.

Des différences notables ont été observées lors des tests d'inhibition *in vitro* en l'absence ou en présence de micro-organismes hétérotrophes. En présence de ces derniers, la vie cellulaire a été très rapidement décimée, et les bactéries nitrifiantes ont alors cessé toute activité métabolique. Pourtant très stables en solution aqueuse tamponnée de pH 5,5 à pH 8, les inhibiteurs dérivés du gentiobiose sont dégradés en quelques jours en présence de bactéries hétérotrophes. Ces dernières, par consommation de la partie sucre des inhibiteurs, ont alors libéré dans le milieu la partie active. Ce résultat a été confirmé par les analyses de traces de produits de dégradations des d'inhibiteurs incubés dans les sols. Comme imaginé lors de l'hypothèse de départ, la liaison thioglycosidique est clivée par les micro-organismes. Le phénomène de pro-drogue a été vérifié. Cependant, cette rupture est particulièrement rapide. Ainsi, l'apport de la partie sucre sur la biodisponibilité de l'inhibiteur reste à démontrer.

Nous avons souhaité que l'hydrosolubilité des inhibiteurs glycosylés soit maintenue suffisamment longtemps dans les sols pour entraîner le principe actif vers les couches inférieures. Les expérimentations sur colonnes de sols ont montré que le produit n'était pas entraîné au-delà de 20 cm de profondeur. Des tests plus précis permettraient de savoir s'ils sont entraînés plus profondément que les inhibiteurs non glycosylés.

Experimental part

Experimental part

Chromatography Thin layer chromatography (TLC) analysis were conducted on E. Merck 60 F₂₅₄ Silica Gel nonactivated plates and compounds were visualized by UV (254 nm) and by exposure to a 5% solution of orcinol in 5% solution of H₂SO₄ in EtOH followed by heating. For column chromatography, Geduran Si 60 (40-63 µm) Silica Gel was used.

Melting point Melting points were determined on a Reichert microscope.

Optical rotation Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter.

Nuclear Magnetic Resonance ¹H, ¹³C, COSY, HSQC and TOCSY1d NMR spectra were recorded with a Brüker ARX 400 spectrometer at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given in δ units (ppm). Coupling constants *J* were calculated in Herzt (Hz). Abbreviations were used to precise signal multiplicity : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet)...

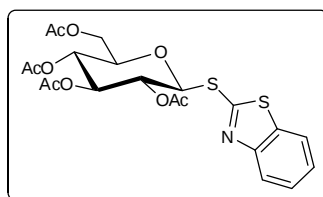
Mass spectroscopy The HRMS were measured at the “Centre Regional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO, Université de Rennes 1)” with a MS/MS ZabSpec TOF Micromass using *m*-nitrobenzylic alcohol as a matrix and accelerated caesium ions for ionization.

Elementary analyses Microanalysis were performed by the “Centre Regional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO, Université de Rennes 1)”.

General procedure A for glycosylation reaction To a solution of per-*O*-acetylated donor (1 equiv) in anhydrous dichloromethane were successively added the acceptor (**MBT** or **MBI**, 3 equiv) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (9 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, the remaining acceptor was filtered off. The resulting filtrate was washed successively with a saturated solution of aqueous NaHCO_3 and water. The aqueous layers thus obtained were extracted with dichloromethane, and the combined organic layers finally dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography on silica gel afforded the desired glycosyl thioimide.

General procedure B for deacetylation To a solution of per-*O*-acetylated derivative in anhydrous methanol was added a 0.1 M solution of sodium methylate in methanol. The mixture was stirred at room temperature until no starting material was detected by TLC. Neutralisation was then performed by adding Amberlite IR-120 (H^+ -form). The resin was finally filtered off and the solvent removed under reduced pressure to afford the desired product.

Per-*O*-acetylated Glc-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside



This compound was synthesized according to the general procedure A, starting from D-glucopyranose pentaacetate (5.00 g, 12.8 mmol), 2-mercaptobenzothiazole (6.42 g, 38.4 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (14.6 mL, 115.2 mmol). Column chromatography (9:1 Toluene/AcOEt) gave the desired product (5.42 g, 10.9 mmol) as a white solid in 85% yield.

TLC : R_f 0.4 (4:1 Toluene/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: +6.4 (c 1.25, CH_2Cl_2)

mp : 127 – 128 °C; litt. : 121-124 °C [62]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.93 (ddd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.2$ Hz, $J = 0.6$ Hz, H_{arom}), 7.79 (ddd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.2$ Hz, $J = 0.6$ Hz, H_{arom}), 7.46 (ddd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_{arom}), 7.36 (ddd, $J = 8.0$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_{arom}), 5.58 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.3$ Hz, **H-1**), 5.35 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, **H-3**), 5.23 (dd, 1H, **H-2**), 5.18 (dd, 1H, $J_{4,5} = 10.0$ Hz, **H-4**), 4.31 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, $J_{5,6a} = 4.9$ Hz, **H-6a**), 4.18 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 2.3$ Hz, **H-6b**), 3.93 (ddd, 1H, **H-5**), 2.05, 2.05, 2.04, 2.02 (4xs, 12H, CH_3CO).

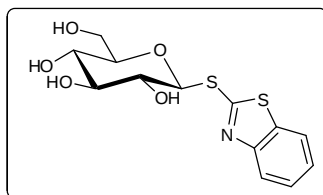
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 170.6, 170.0, 169.4, 169.3 (**CO**), 161.8, 152.7, 135.8, 126.4, 125.0, 122.3, 121.1 (**C_{arom}**), 84.0 (**C-1**), 76.2 (**C-5**), 73.7 (**C-3**), 69.6 (**C-2**), 68.0 (**C-4**), 61.8 (**C-6**), 20.7, 20.6, 20.5 (CH_3).

Elementary analyses : ($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_9\text{S}_2$)

Calculated : **C** 50.70 **H** 4.66 **N** 2.82 **S** 12.89

Found : **C** 50.53 **H** 4.67 **N** 2.80 **S** 12.91

This molecule has been previously synthesized [46, 62].

Glc-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 1-thio- β -D-glucopyranoside

Zemplen transesterification was performed from peracetylated **Glc-S-BZT** (5.11 g, 10.3 mmol) using 0.1 M NaOMe/MeOH (10.3 mL), according to the general procedure B. Work-up provided the desired product (3.38 g, 10.3 mmol, 100%) as a white powder.

TLC : R_f 0.7 (4:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -72.5 (c 3.60, MeOH)

mp : 80 – 81 °C

^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ_{H}) : 7.88 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{arom}), 7.83 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_{arom}), 7.51 (t, 1H, $J = 7.7$ Hz, H_{arom}), 7.42 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz, H_{arom}), 5.17 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.1$ Hz, **H-1**), 3.96 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, **H-6b**), 3.79 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5.3$ Hz, **H-6a**), 3.66-3.50 (m, 4H, **H-2**, **H-3**, **H-4**, **H-5**).

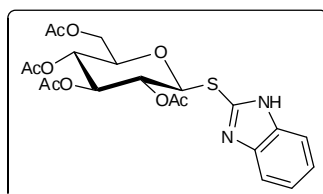
^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , δ_{C}) : 164.7, 151.2, 134.9, 129.5, 125.1, 121.2, 120.9 (C_{arom}), 86.1 (**C-1**), 80.1 (**C-5**), 77.0 (**C-3**), 71.7 (**C-2**), 68.9 (**C-4**), 60.5 (**C-6**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NaNO}_5\text{S}_2$	m/z calculated :	352.02894
	m/z found :	352.0289

This molecule has been previously synthesized [46].

Per-*O*-acetylated Glc-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside



This compound was prepared according to the general procedure A, starting from D-glucopyranose pentaacetate (5.00 g, 12.8 mmol), 2-mercaptobenzimidazole (5.81 g, 38.4 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (14.6 mL, 115.2 mmol). Column chromatography (7:3 Toluene/AcOEt) afforded the desired product (5.47 g, 11.4 mmol) as a white solid in 89% yield.

TLC : R_f 0.5 (4:1 light petroleum/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -22.1 (c 0.86, CH_2Cl_2)

mp : 138 – 139 °C ; litt : 142 °C [17]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.60 (s, 2H, **H_{arom}**), 7.29-7.24 (m, 2H, **H_{arom}**), 5.27 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, $J_{2,3} = 7.3$ Hz, $J_{1,3} = 2.0$ Hz, **H-3**), 5.12-5.06 (m, 3H, **H-1**, **H-2**, **H-4**), 4.38 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.5$ Hz, $J_{5,6b} = 2.3$ Hz, **H-6b**), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.7$ Hz, **H-6a**), 3.79 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 10.2$ Hz, **H-5**), 2.11, 2.08, 2.05, 2.00 (4xs, 12H, **COCH₃**).

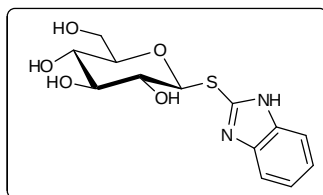
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 171.2, 170.0, 169.5, 169.3 (**CO**), 143.5, 123.1 (**C_{arom}**), 83.4 (**C-1**), 76.4 (**C-5**), 73.4 (**C-3**), 70.0 (**C-2**), 67.9 (**C-4**), 61.6 (**C-6**), 20.9, 20.6, 20.5, 20.5 (**CH₃**).

Elementary analyses : ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$)

Calculated : **C** 52.49 **H** 5.03 **N** 5.83 **S** 6.67

Found : **C** 52.46 **H** 5.04 **N** 5.84 **S** 6.54

This molecule has been previously synthesized [17].

Glc-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 1-thio- β -D-glucopyranoside

Deacylation of peracetylated **Glc-S-BZI** (5.38 g, 11.2 mmol) using 0.1 M NaOMe/MeOH (11.2 mL), according to the general procedure B, gave the target compound (3.44 g, 11.0 mmol, 100%) as a white solid.

TLC : R_f 0.5 (4:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -53.6 (c 5.75, MeOH)

mp : 114 – 116 °C

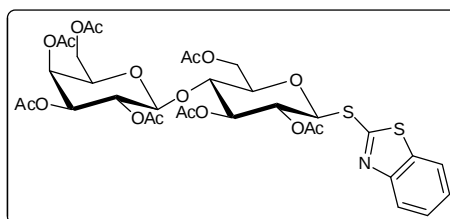
^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ_{H}) : 7.45-7.40 (m, 2H, H_{arom}), 7.21-7.16 (m, 2H, H_{arom}), 4.96 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, **H-1**), 3.86 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, **H-6b**), 3.69 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, $J_{5,6a} = 5.6$ Hz, **H-6a**), 3.52 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, **H-3**), 3.47 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, **H-5**), 3.40 (dd, 1H, **H-4**), 3.35 (dd, 1H, **H-2**).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , δ_{C}) : 145.6, 138.1, 123.0, 110.3 (C_{arom}), 85.5 (**C-1**), 80.1 (**C-5**), 76.9 (**C-3**), 71.9 (**C-2**), 69.0 (**C-4**), 60.5 (**C-6**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NaN}_2\text{O}_5\text{S}$	m/z calculated :	335.06776
	m/z found :	335.0673

Per-*O*-acetylated Lac-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-lactoside



This lactosyl intermediate was synthesized according to the general procedure A, starting from lactoside octoacetate (1.00 g, 1.47 mmol), 2-mercaptobenzothiazole (0.74 g, 4.42 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (1.7 mL, 13.2 mmol). Chromatographic purification (4:1 Toluene/AcOEt) yielded the desired compound (0.57 g, 0.73 mmol, 49%) as a white solid.

TLC : R_f 0.7 (2:3 Toluene/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -9.0 (c 3.1, CH_2Cl_2)

mp : 167 – 169 °C

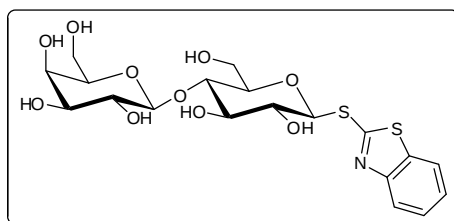
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.93 (ddd, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.78 (ddd, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.45 (ddd, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.35 (ddd, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.52 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.3 \text{ Hz}$, H-1), 5.36 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 3.5 \text{ Hz}$, $J_{4',5'} = 1.0 \text{ Hz}$, H-4'), 5.33 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.6 \text{ Hz}$, H-3), 5.14 (dd, 1H, H-2), 5.12 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10.4 \text{ Hz}$, $J_{1',2'} = 7.9 \text{ Hz}$, H-2'), 4.96 (dd, 1H, H-3'), 4.52 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.0 \text{ Hz}$, $J_{5,6b} = 1.7 \text{ Hz}$, H-6b), 4.49 (d, 1H, H-1'), 4.15 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.9 \text{ Hz}$, H-6a), 4.15-4.06 (m, 2H, H-6'a , H-6'b), 3.91-3.86 (m, 1H, H-5'), 3.89 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.9 \text{ Hz}$, H-4), 3.84 (ddd, 1H, H-5), 2.16, 2.06, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03, 1.97 (7xs, 3H, CH_3CO).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 169.6, 169.5, 169.0 (CO), 161.8, 152.7, 135.7, 126.3, 125.0, 122.3, 120.9 (C_{arom}), 101.0 (C-1'), 83.8 (C-1), 77.0 (C-5), 75.9 (C-4), 73.5 (C-3), 70.9 (C-3'), 70.7 (C-5'), 69.9 (C-2), 69.0 (C-2'), 66.6 (C-4'), 62.0 (C-6), 60.8 (C-6'), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (CH_3).

Elementary analyses : ($\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{NO}_{17}\text{S}_2$)

Calculated : C 50.44 H 5.00 N 1.78 S 8.16

Found : C 50.62 H 5.11 N 1.88 S 8.34

Lac-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 1-thio- β -D-lactoside

Peracetylated **Lac-S-BZT** (3.55 g, 4.2 mmol) was deacetylated using 0.1 M NaOMe/MeOH (4.2 mL), according to the general procedure B. The resulting material was purified by recrystallization from water to afford **Lac-S-BZT** as a white solid in a 80% yield (1.66 g, 3.4 mmol).

TLC : R_f 0.5 (7:3 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -23.3 (c 3.0, DMSO)

mp : 186 – 187 °C

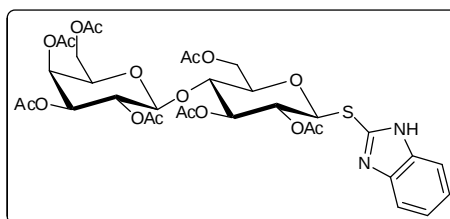
^1H NMR (400 MHz, DMSO, δ_{H}) : 8.04 (ddd, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.5 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.88 (ddd, 1H, $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$, $J = 0.5 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.48 (ddd, 1H, $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.39 (ddd, 1H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 1.0 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.81 (d, 1H, $J = 6.3 \text{ Hz}$, OH-2), 5.19 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9 \text{ Hz}$, H-1), 5.11 (d, 1H, $J = 4.4 \text{ Hz}$, OH-2'), 4.88 (d, 1H, $J = 1.2 \text{ Hz}$, OH-4'), 4.80 (d, 1H, $J = 5.2 \text{ Hz}$, OH-3), 4.66 (d, 1H, $J = 5.14 \text{ Hz}$, OH-6), 4.65 (dd, 1H, $J = 5.4 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$, OH-6'), 4.53 (d, 1H, $J = 4.6 \text{ Hz}$, OH-3'), 4.27 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.3 \text{ Hz}$, H-1'), 3.80 (ddd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.0 \text{ Hz}$, $J = 5.5 \text{ Hz}$, $J = 2.1 \text{ Hz}$, H-6b), 3.71 (ddd, 1H, $J = 6.6 \text{ Hz}$, $J = 4.2 \text{ Hz}$, H-6a), 3.63 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 4.3 \text{ Hz}$, $J_{3',4'} = 3.0 \text{ Hz}$, H-3'), 3.58-3.44 (m, 6H, H-4 , H-5 , H-4' , H-5' , H-6'a , H-6'b), 3.39-3.29 (m, 3H, H-2 , H-3 , H-2').

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, δ_{C}) : 164.5, 152.2, 135.0, 126.3, 124.5, 121.6, 121.3 (C_{arom}), 103.6 (C-1'), 85.9 (C-1), 79.6 (C-5), 79.2 (C-4'), 76.0 (C-3'), 75.5 (C-5'), 73.1 (C-4), 72.2 (C-2'), 70.5 (C-2), 68.1 (C-3), 60.3 (C-6), 60.0 (C-6').

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{10}\text{S}_2$	m/z calculated :	514.08176
	m/z found :	514.0823

Per-*O*-acetylated Lac-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-lactoside



This lactosyl intermediate was produced according to the general procedure A, starting from peracetylated lactose (2.39 g, 3.5 mmol), 2-mercaptobenzimidazole (1.59 g, 10.6 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (4.0 mL, 31.7 mmol). Chromatographic purification (7:3 $\rightarrow$ 1:1 Toluene/AcOEt) afforded the desired compound (1.64 g, 2.1 mmol) in 61% yield as a white solid.

TLC : R_f 0.5 (2:3 Toluene/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -25.1 (c 5.30, CH_2Cl_2)

mp : 106 – 108 $^\circ\text{C}$

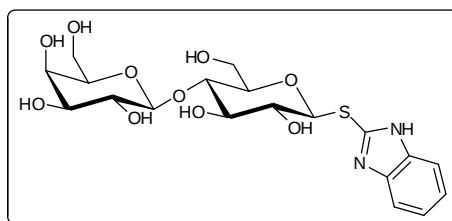
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.59 (s, 2H, H_{arom}), 7.27-7.22 (m, 2H, H_{arom}), 5.34 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 3.4$ Hz, $J_{4',5'} = 1.1$ Hz, **H-4'**), 5.24 (ddd, 1H, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, $J_{2,3} = 6.2$ Hz, $J_{1,3} = 2.8$ Hz, **H-3**), 5.11 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10.5$ Hz, $J_{1',2'} = 7.9$ Hz, **H-2'**), 5.03-4.96 (m, 2H, **H-1**, **H-2**), 4.98 (dd, 1H, **H-3'**), 4.77 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, $J_{5,6b} = 2.3$ Hz, **H-6b**), 4.54 (d, 1H, **H-1'**), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, **H-6a**), 4.14-4.03 (m, 2H, **H-6'a**, **H-6'b**), 3.88 (ddd, 1H, $J_{5',6'a} = 7.4$ Hz, $J_{5',6'b} = 6.4$ Hz, **H-5'**), 3.80 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, **H-4**), 3.65 (ddd, 1H, **H-5**), 2.15, 2.14, 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 1.96 (7xs, 21H, **CH₃CO**).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 171.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.8, 169.5, 168.9 (**CO**), 143.3, 123.0 (**C_{arom}**), 100.9 (**C-1'**), 83.0 (**C-1**), 77.2 (**C-5**), 75.5 (**C-4**), 73.3 (**C-3**), 70.8 (**C-5'**), 70.7 (**C-3'**), 70.4 (**C-2**), 69.1 (**C-2'**), 66.5 (**C-4'**), 61.1 (**C-6**), 60.7 (**C-6'**), 21.0, 20.7, 20.6, 20.5 (**CH₃**).

Elementary analyses : ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{S}$)

Calculated : C 51.56 H 5.24 N 3.64 S 4.17

Found : C 51.42 H 5.49 N 3.53 S 4.00

Lac-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 1-thio- β -D-lactoside

Deacylation of the peracetylated **Lac-S-BZI** (1.64 g, 2.1 mmol) was performed with 0.1 M NaOMe/MeOH (2.1 mL), according to the general procedure B and afforded the lactosyl derivative **Lac-S-BZI** (1.49 g, 3.1 mmol, 100%) as a white solid. The latter was further recrystallized from MeOH/toluene afforded the desired derivative isolated as a white solid (0.45 g, 0.95 mmol, 44%).

TLC : R_f 0.4 (7:3 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$[\alpha]_D^{20}$: -48.5 (c 1.65, MeOH)

mp : 163 – 164 °C

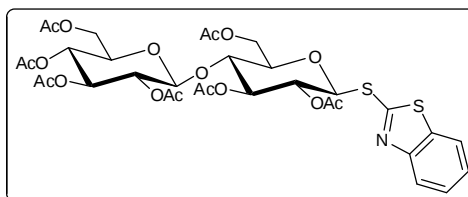
^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ_{H}) : 7.61 (dd, 2H, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.34 (dd, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.11 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-1**), 4.44 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.8 \text{ Hz}$, **H-1'**), 3.97 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4 \text{ Hz}$, $J_{5,6b} = 1.4 \text{ Hz}$, **H-6b**), 3.92 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 3.4 \text{ Hz}$, $J_{4',5'} = 0.7 \text{ Hz}$, **H-4'**), 3.83 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 3.9 \text{ Hz}$, **H-6a**), 3.80-3.74 (m, 2H, **H-6'a**, **H-6'b**), 3.73-3.68 (m, 4H, **H-3**, **H-4**, **H-5**, **H-5'**), 3.66 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10.0 \text{ Hz}$, **H-3'**), 3.55 (dd, 1H, **H-2'**), 3.46 (ddd, 1H, $J_{2,3} = 6.5 \text{ Hz}$, $J_{2,4} = 2.3 \text{ Hz}$, **H-2**).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , δ_{C}) : 145.7, 123.3 (C_{arom}), 102.8 (**C-1'**), 85.4 (**C-1**), 79.0, 77.5, 75.6, 75.3 (**C-3**, **C-4**, **C-5**, **C-5'**), 72.5 (**C-3'**), 71.7 (**C-2**), 70.9 (**C-2'**), 68.5 (**C-4'**), 61.0 (**C-6'**), 59.9 (**C-6**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NaN}_2\text{O}_{10}\text{S}$	m/z calculated :	497.12059
	m/z found :	497.1200

Per-*O*-acetylated Cel-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-cellobioside



This disaccharide was prepared as described in general procedure A, starting from cellobiose octoacetate (3.00 g, 4.42 mmol), 2-mercaptobenzothiazole (2.22 g, 13.2 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (5.0 mL, 39.8 mmol). Column chromatography (3:2 Cyclohexane/AcOEt) gave the desired product (2.37 g, 3.0 mmol) as a white solid in 68% yield.

TLC : R_f 0.6 (2:3 Cyclohexane/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -19.2 (c 2.60, CH_2Cl_2)

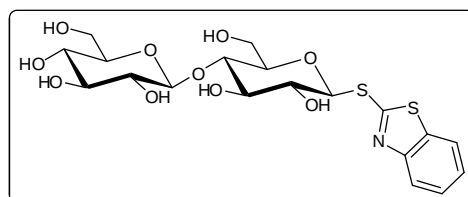
mp : 205 - 206 °C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.93 (ddd, 1H, $J = 8.3 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.78 (ddd, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.46 (ddd, 1H, $J = 8.3 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.35 (ddd, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 7.2 \text{ Hz}$, $J = 1.1 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.51 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.3 \text{ Hz}$, H-1), 5.31 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1 \text{ Hz}$, H-3), 5.15 (t, 1H, $J_{3',4'} = 9.4 \text{ Hz}$, $J_{2',3'} = 9.2 \text{ Hz}$, H-3'), 5.14 (dd, 1H, H-2), 5.07 (t, 1H, $J_{4',5'} = 9.7 \text{ Hz}$, H-4'), 4.94 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 7.9 \text{ Hz}$, H-2'), 4.55 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.1 \text{ Hz}$, $J_{5,6b} = 1.7 \text{ Hz}$, H-6b), 4.52 (d, 1H, H-1'), 4.38 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.5 \text{ Hz}$, $J_{5',6'a} = 4.4 \text{ Hz}$, H-6'a), 4.15 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.9 \text{ Hz}$, H-6a), 4.05 (dd, $J_{5',6'b} = 2.3 \text{ Hz}$, H-6'b), 3.89-3.82 (m, 2H, H-4 , H-5), 3.67 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.7 \text{ Hz}$, H-5'), 2.09, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03, 2.01, 1.99 (7xs, 21H, COCH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 170.5, 170.2, 169.6, 169.3, 169.1 (CO), 161.9, 152.7, 135.8, 126.4, 125.0, 122.4, 120.9 (C_{arom}), 100.8 (C-1'), 83.9 (C-1), 77.2, 76.2 (C-4 , C-5), 73.3 (C-3), 72.9 (C-3'), 72.0 (C-5'), 71.6 (C-2'), 69.9 (C-2), 67.8 (C-4'), 61.9 (C-6), 61.6 (C-6'), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (CH_3).

Elementary analyses : ($\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{NO}_{17}\text{S}_2$)

Calculated :	C 50.44	H 5.00	N 1.78	S 8.16
Found :	C 50.31	H 5.05	N 1.73	S 8.13

Cel-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 1-thio- β -D-cellobioside

Deprotection of peracetylated **Cel-S-BZT** (2.36 g, 3.0 mmol) using 0.1 M NaOMe/MeOH (3.0 mL), according to general procedure B, gave **Cel-S-BZT** (1.46 g, 3.0 mmol, 100%) as a white solid. The latter was further recrystallized from MeOH/CH₂Cl₂ to afford the desired product (0.85 g, 1.7 mmol) in 58% yield.

TLC : R_f 0.5 (7:3 CH₂Cl₂/MeOH)

$[\alpha]_D^{20}$: -121.6 (c 1.25, MeOH)

mp : 141 – 143 °C

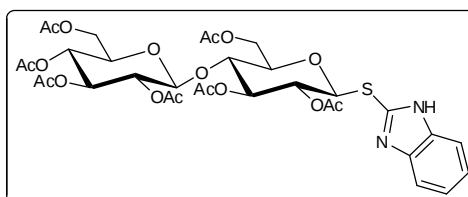
¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ_H) : 7.88 (ddd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, $J = 0.6$ Hz, **H_{arom}**), 7.84 (ddd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, $J = 0.6$ Hz, **H_{arom}**), 7.51 (ddd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, **H_{arom}**), 7.42 (ddd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 1.1$ Hz, **H_{arom}**), 5.19 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, **H-1**), 4.53 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.9$ Hz, **H-1'**), 4.02 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 11.7$ Hz, **H-6b**), 3.92 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.4$ Hz, $J_{5',6'b} = 2.2$ Hz, **H-6'b**), 3.88 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.9$ Hz, **H-6a**), 3.78-3.69 (m, 3H, **H-3**, **H-4**, **H-5**), 3.73 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 5.6$ Hz, **H-6'a**), 3.62 (dd, 1H, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, **H-2**), 3.52 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.1$ Hz, **H-3'**), 3.49 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, **H-5'**), 3.42 (dd, 1H, **H-4'**), 3.34 (dd, 1H, **H-2'**).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O, δ_C) : 164.7, 151.4, 135.2, 126.8, 125.4, 121.5, 121.1 (**C_{arom}**), 102.5 (**C-1'**), 86.0 (**C-1**), 79.0 (**C-5**), 77.8 (**C-3**), 76.0 (**C-5'**), 75.5 (**C-3'**), 75.4 (**C-4**), 73.1 (**C-2'**), 71.5 (**C-2'**), 69.4 (**C-4'**), 60.5 (**C-6'**), 59.8 (**C-6**).

ESI-HRMS : $[M+Na]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{10}\text{S}_2$	m/z calculated :	514.08176
	m/z found :	514.0814

Per-*O*-acetylated Cel-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-cellobioside



This disaccharide was synthesized according to general procedure A, starting from cellobiose octoacetate (3.00 g, 4.42 mmol), 2-mercaptobenzimidazole (1.99 g, 13.2 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (5.0 mL, 39.8 mmol). Column chromatography (3:2 Cyclohexane/AcOEt) gave the desired compound (2.58 g, 3.4 mmol, 76% yield) as a white solid.

TLC : R_f 0.4 (2:3 Cyclohexane/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -30.5 (c 4.85, CH_2Cl_2)

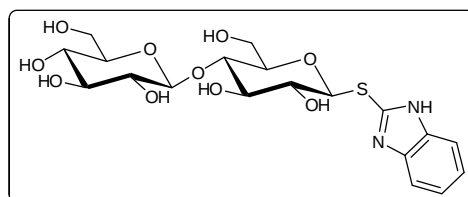
mp : 144 – 146 °C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.64 (s, 2H, H_{arom}), 7.32-7.26 (m, 2H, H_{arom}), 5.22 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9$ Hz, **H-3**), 5.16 (t, 1H, $J_{2',3'} = 9.4$ Hz, $J_{3',4'} = 9.6$ Hz, **H-3'**), 5.07 (t, 1H, $J_{4',5'} = 9.6$ Hz, **H-4'**), 5.00 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, **H-2**), 4.95 (d, 1H, **H-1**), 4.93 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, **H-2'**), 4.81 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.3$ Hz, $J_{5,6b} = 2.2$ Hz, **H-6b**), 4.57 (d, 1H, **H-1'**), 4.37 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.5$ Hz, $J_{5',6'a} = 4.3$ Hz, **H-6'a**), 4.13 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, **H-6a**), 4.03 (dd, 1H, $J_{5',6'b} = 2.2$ Hz, **H-6'b**), 3.78 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, **H-4**), 3.70-3.62 (m, 2H, **H-5**, **H-5'**), 2.16, 2.08, 2.06, 2.02, 2.01, 2.00, 1.98 (7xs, 21H, **COCH₃**).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 171.4, 170.5, 170.3, 169.8, 169.5, 169.2, 168.8 (**CO**), 143.2, 123.4 (**C_{arom}**), 100.6 (**C-1**), 82.9 (**C-1'**), 77.2 (**C-5**), 75.6, (**C-4**), 72.9 (**C-3**), 72.8 (**C-3'**), 72.1 (**C-5'**), 71.6 (**C-2'**), 70.3 (**C-2**), 67.6 (**C-4'**), 61.4 (**C-6'**), 60.9 (**C-6**), 21.1, 20.6, 20.5, 20.4 (**CH₃**).

Elementary analyses : ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{S}$)

Calculated :	C 51.56	H 5.24	N 3.64	S 4.17
Found :	C 51.26	H 5.27	N 3.30	S 3.80

Cel-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 1-thio- β -D-cellobioside

Deprotection of peracetylated **Cel-S-BZI** (2.46 g, 3.2 mmol) was performed with 0.1 M NaOMe/MeOH (3.2 mL), according to the general procedure B and afforded the cellobiosyl derivative **Cel-S-BZI** (1.49 g, 3.1 mmol, 100%) as a white solid. The latter was further recrystallized from MeOH/AcOEt to give the desired product (0.66, 1.4 mmol).

TLC : R_f 0.56 (3:4 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -53.2 (c 2.50, MeOH)

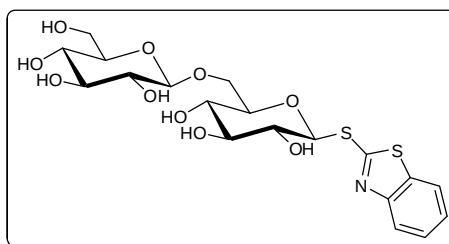
mp : 159 – 160 °C

^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ_{H}) : 7.63 (dd, 2H, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.38 (dd, 2H, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.12 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-1**), 4.50 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.9 \text{ Hz}$, **H-1'**), 3.97 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 12.0 \text{ Hz}$, **H-6b**), 3.90 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.3 \text{ Hz}$, $J_{5',6'b} = 2.1 \text{ Hz}$, **H-6'b**), 3.84 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.8 \text{ Hz}$, **H-6a**), 3.72 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 5.7 \text{ Hz}$, **H-6'a**), 3.71-3.68 (m, 3H, **H-3**, **H-4**, **H-5**), 3.50 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.1 \text{ Hz}$, **H-3'**), 3.50-3.44 (m, 2H, **H-5'**, **H-2**), 3.41 (dd, 1H, $J_{4',5'} = 9.6 \text{ Hz}$, $J_{3',4'} = 9.1 \text{ Hz}$, **H-4'**), 3.31 (dd, 1H, **H-2'**).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , δ_{C}) : 145.5, 138.1, 123.1, 114.3 (C_{arom}), 102.4 (**C-1'**), 85.4 (**C-1**), 79.0 (**C-5**), 77.9 (**C-3**), 75.9 (**C-5'**), 75.5, 75.4 (**C-3'**, **C-4**), 73.0 (**C-2'**), 71.7 (**C-2**), 69.4 (**C-4'**), 60.5 (**C-6'**), 59.9 (**C-6**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NaN}_2\text{O}_{10}\text{S}$	m/z calculated :	497.12059
	m/z found :	497.1205

Gen-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 1-thio- β -D-gentiobioside

This intermediate was prepared according to the general procedure A, starting from peracetylated gentiobiose (2.00 g, 2.9 mmol), 2-mercaptobenzothiazole (1.48 g, 8.8 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.4 mL, 26.5 mmol). The resulting crude was further engaged in the deprotection step after simple work-up but without chromatographic purification. The crude was subjected to the general procedure B, using 0.1 M NaOMe/MeOH (2.9 mL). The resulting material was purified by column chromatography on silica gel (7:3 CH_2Cl_2 /MeOH) to give **Gen-S-BZT** as a white solid in a 28% yield (0.41 g, 0.83 mmol).

TLC : R_f 0.3 (7:3 CH_2Cl_2 /MeOH)

$[\alpha]_D^{20}$: -81.4 (c 2.85, MeOH)

mp : 128 – 131 °C

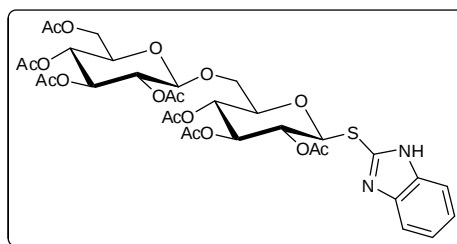
^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ_{H}) : 7.89 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{arom}), 7.84 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_{arom}), 7.51 (ddd, 1H, $J = 8.2$, $J = 7.5$, $J = 0.9$ Hz, H_{arom}), 7.42 (ddd, 1H, $J = 8.0$, $J = 7.4$, $J = 0.9$ Hz, H_{arom}), 5.23 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.3$ Hz, **H-1**), 4.42 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.6$ Hz, **H-1'**), 4.19 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11.9$ Hz, $J_{5,6b} = 1.7$ Hz, **H-6b**), 3.89 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.4$ Hz, **H-6a**), 3.82 (d, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.2$ Hz, **H-6'b**), 3.82-3.75 (m, 1H, **H-5**), 3.62 (dd, 1H, $J_{5',6'a'} = 3.3$ Hz, **H-6'a**), 3.61-3.52 (m, 3H, **H-2**, **H-3**, **H-4**), 3.31-3.25 (m, 3H, **H-3'**, **H-4'**, **H-5'**), 3.25-3.18 (m, 1H, **H-2'**).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , δ_{C}) : 164.5, 151.5, 135.2, 126.8, 125.4, 121.5, 121.2, (C_{arom}), 102.3 (**C-1'**), 86.1 (**C-1**), 79.4 (**C-5**), 76.9 (**C-3**), 75.8 (**C-5'**), 75.5 (**C-3'**), 73.0 (**C-2'**), 71.6 (**C-2**), 69.4 (**C-4'**), 68.8 (**C-4**), 68.0 (**C-6**), 60.6 (**C-6'**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{10}\text{S}_2$	m/z calculated :	514.08176
	m/z found :	514.0811

Per-*O*-acetylated Gen-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-gentiobioside



This dissaccharide was prepared according to the general procedure A, starting from gentiobiose octoacetate (2.00 g, 2.9 mmol), 2-mercaptobenzimidazole (1.33 g, 8.8 mmol) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (3.4 mL, 26.5 mmol). Column chromatography (3:2 Cyclohexane/AcOEt) yielded the desired compound (1.54 g, 2.0 mmol, 68%) as a white solid.

TLC : R_f 0.4 (2:3 Toluene/AcOEt)

$[\alpha]_D^{20}$: -5.5 (c 4.00, CH_2Cl_2)

mp : 96 - 97 °C

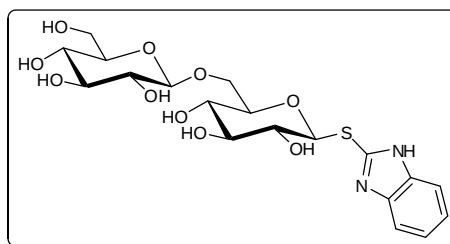
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.65 (s, 2H, H_{arom}), 7.34-7.28 (m, 2H, H_{arom}), 5.26 (t, 1H, $J_{2',3'} = J_{3',4'} = 9.6$ Hz, **H-3'**), 5.25 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, **H-3**), 5.09 (dd, 1H, $J_{1,2} = 10.1$ Hz, $J_{2,3} = 9.3$ Hz, **H-2**), 5.08 (dd, 1H, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, **H-2'**), 5.04 (t, 1H, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, **H-4'**), 5.02 (t, 1H, $J_{4,5} = 9.8$ Hz, **H-4**), 4.98 (d, 1H, **H-1**), 4.61 (d, 1H, **H-1'**), 4.16 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.4$ Hz, $J_{5',6'b} = 2.7$ Hz, **H-6'b**), 4.11 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 4.6$ Hz, **H-6'a**), 3.89 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz, $J_{5,6b} = 2.0$ Hz, **H-6b**), 3.79 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 6.5$ Hz, **H-5**), 3.71 (dd, 1H, **H-6a**), 3.70 (ddd, 1H, **H-5'**), 2.10, 2.07, 2.05, 2.04, 2.03, 2.00, 1.98 (7xs, 21H, **CH₃CO**).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 170.6, 170.3, 170.1, 170.0, 169.6, 169.4, 169.4 (**CO**), 144.2, 123.3 (**C_{arom}**), 100.5 (**C-1'**), 84.5 (**C-1**), 76.8 (**C-5**), 73.5, 72.3 (**C-3**, **C-3'**), 72.2 (**C-5'**), 70.7 (**C-2'**), 69.8 (**C-2**), 68.4, 68.2 (**C-4**, **C-4'**), 67.2 (**C-6**), 61.7 (**C-6'**), 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5 (**CH₃**).

Elementary analyses : ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{S}$)

Calculated : C 51.56 H 5.24 N 3.64 S 4.17

Found : C 51.40 H 5.29 N 3.91 S 3.98

Gen-S-BZI : 2'-Benzimidazolyl 1-thio- β -D-gentiobioside

Deprotection of peracetylated **Gen-S-BZI** (1.47 g, 1.9 mmol) was performed with 0.1 M NaOMe/MeOH (1.9 mL), according to general procedure B and afforded the desired derivative **Gen-S-BZI** which was chromatographically purified (7:3 CH₂Cl₂/MeOH) and isolated as a white solid (0.90 g, 1.9 mmol, 100%).

TLC : R_f 0.3 (7:3 CH₂Cl₂/MeOH)

[α]_D²⁰ : -45.8 (c 3.95, MeOH)

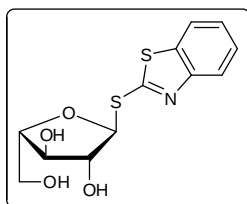
mp : 134 – 136 °C

¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ_{H}) : 7.60 (dd, 2H, $J = 6.0 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, **H_{arom}**), 7.33 (dd, 2H, $J = 6.0 \text{ Hz}$, $J = 3.2 \text{ Hz}$, **H_{arom}**), 5.16 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.9 \text{ Hz}$, **H-1**), 4.41 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7.2 \text{ Hz}$, **H-1'**), 4.15 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11.9 \text{ Hz}$, $J_{5,6b} = 1.5 \text{ Hz}$, **H-6b**), 3.90 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5.8 \text{ Hz}$, **H-6a**), 3.83 (d, 1H, $J_{6'a,6'b} = 12.1 \text{ Hz}$, **H-6'b**), 3.74 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 9.1 \text{ Hz}$, **H-5**), 3.58 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1 \text{ Hz}$, **H-3**), 3.57 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 2.9 \text{ Hz}$, **H-6'a**), 3.50 (t, 1H, **H-4**), 3.44 (dd, 1H, **H-2**), 3.31-3.21 (m, 4H, **H-2'**, **H-3'**, **H-4'**, **H-5'**).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O, δ_{C}) : 145.8, 123.2 (**C_{arom}**), 102.4 (**C-1'**), 85.5 (**C-1**), 79.2 (**C-5**), 76.9 (**C-3**), 75.8, 75.5 (**C-3'**, **C-5'**), 73.0 (**C-2'**), 71.9 (**C-2**), 69.5 (**C-4'**), 69.0 (**C-4**), 68.5 (**C-6**), 60.6 (**C-6'**).

ESI-HRMS : [M+Na]⁺

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{10}\text{S}_2$	m/z calculated :	497.12059
	m/z found :	497.1199

Araf-S-BZT : 2'-Benzothiazolyl 1-thio- α -L-arabinofuranoside

The compound was synthesised according to procedure available in bibliography [51]. After recrystallisation into AcOEt, the desired product was obtained as a white solid in a 6.4% yield (0.14 g, 0.47 mmol).

TLC : R_f 0.58 (9:1 CH_2Cl_2 – MeOH)

mp : 133 – 134 °C

^1H NMR (400 MHz, MeOD, δ_{H}) : 7.82 (ddd, 1H, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.79 (ddd, 1H, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, $J = 0.6 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.40 (ddd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 7.30 (ddd, $J = 8.0 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, H_{arom}), 5.98 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.2 \text{ Hz}$, H-1), 4.15 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.8 \text{ Hz}$, H-2), 4.08-4.03 (m, 1H, H-4), 3.97 (dd, 1H, $J_{3,4} = 5.8 \text{ Hz}$, H-3), 3.73 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.1 \text{ Hz}$, $J_{4,5a} = 3.3 \text{ Hz}$, H-5a), 3.64 (dd, 1H, $J_{4,5b} = 4.9 \text{ Hz}$, H-5b).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD, δ_{C}) : 167.6, 154.1, 136.8, 127.6, 126.0, 122.5, 122.4 (C_{arom}), 93.2 (C-1), 86.8 (C-4), 83.8 (C-2), 78.0 (C-3), 62.5 (C-5).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NaNO}_{10}\text{S}_2$	m/z calculated :	322.01837
	m/z found :	322.0186

Physicochemical properties determination :

Solubility measurement : A solution of water saturated with the studied compound (500 μ L) was thermostated at 25°C for 24 hours. Then, the sample was filtrated through a 0.2 μ m filter. The hydrosolubility, measured in triplicate, was obtained from a known volume of filtrate which was lyophilised and weighed. When no precipitation occurred starting from 100 mg for 500 μ L of water, the hydrosolubility was considered as higher than 200 g/L.

Stability measurement : Synthetic compounds (1 mM) were solubilized into aqueous solutions of different pHs (Ultrapure water, Tris buffer 5 mM pH 8, Acetate buffer 5 mM pH 5.5). 1 mL samples were regularly taken and lyophilized. Concentrations of molecules and degradation products were determined by LC/MS.

Ecotoxicity determination :

Microtox Acute : Microtox[®], developed by Azur Environmental (Carlsbad, CA, USA) was used for the screening of toxicity of the studied compounds. Measurements were performed with the Microtox[®] Toxicity Analyser Model 500 (R-Biopharm, Ref SD50A002), using *Vibrio fischeri* bacteria (R-Biopharm, Ref SD686018A). Data were calculated by the software "Microtox Omni" (R-Biopharm, Ref SD50H098). The procedure applied was the "Microtox[®] acute toxicity basic test procedure" provided by the supplier.

COD measurement : A solution of nitrification inhibitor (100 μM) was prepared into ultrapure water. The COD of this solution was determined thanks to the NANOCOLOR[®] COD 160 kit from Macherey-Nagel (Ref 985026).

BOD₅ measurement : A solution of nitrification inhibitor (100 μM) was prepared into ultrapure water. The BOD₅ was measured thanks to the OxiTop[®] apparatus provided by WTW ("Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH", Weilheim, Germany). The measurement of BOD with OxiTop[®] was carried out according to the operating instructions provided by the supplier, except for the bacteria source. Bacteria were taken from the activated sludges of the wastewater treatment of Cesson-Sévigné (Ille-et-Vilaine, France). After three washings, consisting in ultrapure water addition, stirring, decantation and supernatant removal, the bacteria were introduced into samples for a total concentration of 0.5 g/L.

Inhibition of nitrification *in vitro* assay :

Cell culture : The required installation was developed from biological floc (20 L) taken from the aeration tank of the wastewater purification in Cesson-Sévigné (Ille-et-Vilaine, France), which was first sifted through a 0.5 mm sieve. Filtrate was decanted and supernatant was withdrawn. The concentrated solution thus obtained was put in an aerobic reactor, using a continuous aeration. Bacteria were fed continuously, and consumed each week a solution of 50 L of water containing 32 g of NH_4HCO_3 , 30 g NaHCO_3 , 4 g Na_2HPO_4 and a spatula tip of ferrous ions (II). After one or six months, the consortium of bacteria can be used for inhibition tests.

Preparation of bacteria solution : 500 mL of bacteria solution was taken from the reactor. After a first decantation, and removal of the supernatant, ultrapure water (200 mL) was added to the resulting mixture of bacteria. The suspension was then stirred until homogenization, decanted and the supernatant removed. This procedure was further repeated three times more. The resulting sample was subsequently used for (i) determination of the concentration of dry material, and (ii) for the inhibition tests.

Concentration of dry material measurement : The first data was obtained from 1 mL of the solution which was dried at 100 °C for 1 hour, and measurement was performed in triplicate.

Inhibition tests : For each inhibitor, a 30 mL of the solution containing ammonium chloride (100 mg/L in NH_4^+), inhibitor (100 μM), and finally 1 mL of bacteria solution was prepared in a test tube containing 1 g of maerl. The blank solution consisted in the same mixture but without synthetic compounds. All mixtures were prepared in parallel. Test tubes were stirred at 400 rpm and room temperature. Measurements of pH, ammonium, nitrite, nitrate concentrations and cell viability were achieved.

Cell viability : To perform cell viability measurement, 500 μL of sample, taken under stirring, and 10 μL of resazurine (0.1 % resazurine in water) were mixed together. After 1.5 hour stirring, mixtures were decanted and supernatants diluted twice. Absorbances were measured in microplate reader at 574 and 602 nm. The subtraction between data obtained at the two wavelengths is proportional to the cell viability (g/L). The calibration curve was measured on the solution of washed bacteria used to perform the inhibition tests.

Determination of ammoniums, nitrite and nitrate concentrations : The desired concentrations were further determined starting from 1 mL of samples, taken under stirring, which were filtrated through filter paper. The resulting filtrate was diluted with ultrapure water (5 to 100). The concentration in ammonium cations was obtained photometrically, using the ammonium Test from Merck (Ref 1.14752.0001). The concentration in nitrites was determined either photometrically at 537 nm using a diazotation reactive (sulfanilamide and N-(1-naphtyl)ethylene diamine solution in water), or by ion chromatography. Nitrates concentration was determined by ion chromatography.

Analysis by LC/MS/MS : The samples (5 μ L) were injected into the chromatography apparatus (Waters, UPLC/MS/MS, Milford, USA), equipped with an amide column (UPLC Acquity BEH, 2.1x 100 mm, particle size 1.7 μ m) and eluted at a flow rate of 400 μ L/min with a mobile phase prepared from (A) 100 % acetonitrile and (B) 90 % ultrapure water/10 % acetonitrile containing 0.1 % NH_4OH (pH 9). The mixing was as follows : 70 % A, 30 % B. The column was operated at a constant temperature of 45 $^{\circ}\text{C}$. Mass spectrometry analysis was carried out on a Quattro Premier (Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray source (ESI Z-sprayTM) and a triple quadrupole. The nebulizer and desolvation gas was nitrogen generated from the nitrogen generator NM30LA (Peak scientific, Inchinnan, UK) and the collision gas was high grade argon (Air Liquide, Paris, France). The ESI source parameters were as follows : capillary voltage, 3 kV ; source temperature, 120 $^{\circ}\text{C}$; cone gas flow, 50 L/h, desolvation gas temperature, 350 $^{\circ}\text{C}$; desolvation gas flow, 750 L/h ; extraction voltage, 1V ; RF lens voltage, 0.3 V. Following table summarizes the method parameters for the molecules detection. The UPLC/MS/MS was controlled by the software Mass LynxTM and data processing was performed by the program Target Lynx.

Analyte	Ionization	Mass transition	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
Glucose	ESI-	179/89	20	5
Gentiobiose	ESI-	342/179	20	10
Glc-S-BZT	ESI+	330/168	17	13
Gen-S-BZT	ESI+	492/168	20	15
Glc-S-BZI	ESI+	313/151	30	20
Gen-S-BZI	ESI+	475/151	20	12

Analysis by ion chromatography : The samples (250 μ L) were injected by a into a DX 120 system (Dionex) equipped with an Ion Pac AS 18 column (4 x 250 mm, Ref 062885), a precolumn AG 18 (Ref 062887) and a suppressor ASRS 300 (50 mA, 4 mm, P/N 064554) and eluted at a flow rate of 1 mL/min with a gradient solution of KOH generated in situ by a EGC-KOH cartridge. The gradient was as follows : 10 mM KOH from 0 to 10 min, an increase from 10 mM to 45 mM KOH from 10 to 25 min, then 45 mM KOH until 35 min. The detection by conductivity happened after electrolytic suppression. The system was controlled by the software Chromeleon.

Bibliographie

Références bibliographiques

- [1] Aakra, A., Utåker, J. B., and Nes, I. F. (2001) Comparative phylogeny of the ammonia monooxygenase subunit A and 16S rRNA genes of ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 237–242.
- [2] Arp, D. J., Sayavedra-Soto, L. A., and Hommes, N. G. (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 178, 250–255.
- [3] Atkinson, J. K., and Ingold, K. U. (1993) Cytochrome P450 hydroxylation of hydrocarbons : Variation in the rate of oxygen rebound using cyclopropyl radical clocks including two new ultrafast probes. *Biochem.* 32, 9209–9214.
- [4] Bédard, C., and Knowles, R. (1989) Physiology, Biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53, 68–84.
- [5] Bergmann, D. J., and Hooper, A. B. (1994) Sequence of the gene, *amoB*, for the 43-kDa polypeptide of ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 759–762.
- [6] Bremner, J. M., and Bundy, L. G. (1974) Inhibition of nitrification in soils by volatile sulfur compounds. *Soil Biol. Biochem.* 6, 161–165.
- [7] Brownlee, B. G., Carey, J. H., Mac Innis, G. A., and Pellizzari, I. T. (1992) Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1153–1168.
- [8] Calvo, L., and Garcia-Gil, L. J. (2004) Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 57, 69–78.
- [9] Chan, S. I., Chen, K. H.-C., Yu, S. S.-F., Chen, C.-L., and Kuo, S. S.-J. (2004) Toward delineating the structure and function of the particulate methane monooxygenase from methanotrophic bacteria. *Biochem.* 43, 4421–4430.
- [10] Cheong, J.-J., Birberg, W., Fügedi, P., Pilotti, A., Garegg, P. J., Hong, N., Ogawa, T., and Hahn, M. G. (1991) Structure-activity relationships of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. *The Plant Cell* 3, 127–136.
- [11] Cole, J. A., and Brown, C. M. (1980) Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria - Short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 7, 65–72.
- [12] Das, S. K., and Roy, N. (1996) An improved method for the preparation of some ethyl 1-thioglycosides. *Carbohydr. Res.* 296, 275–277.
- [13] Dassonville, N., Guillaumaud, N., Piola, F., Meerts, P., and Poly, F. (2011) Niche construction by the invasive Asian knotweeds (species complex *Fallopia*) : impact on activity, abundance and community structure of denitrifiers and nitrifiers. *Biol. Invasions* 13, 1115–1133.
- [14] De Boer, W., and Kowalchuk, G. A. (2001) Nitrification in acid soils : micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33, 853–866.
- [15] De Wever, H., Besse, P., and Verachtert, H. (2001) Microbial transformations of 2-substituted benzothiazoles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 620–625.
- [16] De Wever, H., Vereecken, K., Stolz, A., and Verachtert, H. (1998) Initial transformation in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3270–3274.
- [17] El Ashry El Sayed, H., Aly Aly, A., Aouad, M. R., and Amer, M. R. (2010) Revisit to the reaction of *O*-phenylene diamine with thiosemicarbazide to give benzimidazole-2-thione rather than benzotriazine-2-thione and its glycosylation. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 29, 698–706.
- [18] Ensign, S. A., Hyman, M. R., and Arp, D. (1993) In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *J. Bacteriol.* 175, 1971–1980.
- [19] Ferguson, S. J. (1998) Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 182–193.
- [20] Ferrier, R. J., and Furneaux, R. H. (1976) Synthesis of 1,2-*trans*-related 1-thioglycoside esters. *Carbohydr. Res.* 52, 63–68.
- [21] Ferrieres, V., Blanchard, S., Fischer, D., and Plusquellec, D. (2002) A novel synthesis of D-galactofuranosyl, D-glucofuranosyl and D-mannofuranosyl 1-phosphates based on remote activation of new and free hexofu-

- ranosyl donors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3515–3518.
- [22] Fillery, I. R. P. (2007) Plant-based manipulation of nitrification in soil : a new approach to managing N loss? *Plant Soil* **294**, 1–4.
- [23] Fitzpatrick, P. F., and Villafranca, J. J. (1985) Mechanism-based inhibitors of dopamine β -hydroxylase containing acetylenic or cyclopropyl groups. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 5022–5023.
- [24] Gilch, S., Meyer, O., and Schmidt, I. (2010) Electron paramagnetic studies of the copper and iron containing soluble ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *Biometals* **23**, 613–622.
- [25] Gilch, S., Meyer, O., and Schmidt, I. (2009) A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Biol. Chem.* **390**, 863–873.
- [26] Gilch, S., Vogel, M., Lorenz, M. W., Meyer, O., and Schmidt, I. (2009) Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* **155**, 279–284.
- [27] Gopalakrishnan, S., Subbarao, G. V., Nakahara, K., Yoshihashi, T., Ito, O., Maeda, I., Ono, H., and Yoshida, M. (2007) Nitrification inhibitors from the root tissues of *brachiaria humidicola*, a tropical grass. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 1385–1388.
- [28] Guengerich, F. P., Willard, R. J., Shea, J. P., Richards, L. E., and Macdonald, T. L. (1984) Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P-450 by heteroatom-substituted cyclopropanes and formation of ring-opened products. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6446–6447.
- [29] Guo, J., and Ye, X.-S. (2010) Protecting groups in carbohydrate chemistry : influence on stereoselectivity of glycosylations. *Molecules* **15**, 7235–7265.
- [30] Holmes, A. J., Costello, A., Lidstrom, M. E., and Murrell, J. C. (1995) Evidence that participate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**, 203–208.
- [31] Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J., and Arciero, D. M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 59–67.
- [32] Horz, H.-P., Rotthauwe, J.-H., Lukow, T., and Liesack, W. (2000) Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microbiol. Meth.* **39**, 197–204.
- [33] Hyman, M. R., Kim, C. Y., and Arp, D. J. (1990) Inhibition of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by carbon disulfide. *J. Bacteriol.* **172**, 4775–4782.
- [34] Hyman, M. R., Murton, I. B., and Arp, D. J. (1988) Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes, and alkynes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3187–3190.
- [35] Hyman, M. R., Page, C. L., and Arp, D. J. (1994) Oxidation of methyl fluoride and dimethyl ether by ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3033–3035.
- [36] Hyman, M. R., and Wood, P. M. (1985) Suicidal inactivation and labelling of ammonia mono-oxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**, 719–725.
- [37] Hyman, M. R., and Wood, P. M. (1984) Ethylene oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* **137**, 155–158.
- [38] Jetten, M. S. M. (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ. Microbiol.* **10**, 2903–2909.
- [39] Jetten, M. S. M. (2001) New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems. *Plant and Soil* **230**, 9–19.
- [40] Jones, R. D., and Morita, R. Y. (1983) Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 401–410.
- [41] Juliette, L. Y., Hyman, M. R., and Arp, D. J. (1993) Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds : thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3718–3727.
- [42] Juliette, L. Y., Hyman, M. R., and Arp, D. J. (1993) Mechanism-based inactivation of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by Allylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3728–3735.
- [43] Keener, W. K., and Arp, D. J. (1994) Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1914–1920.
- [44] Keener, W. K., and Arp, D. J. (1993) Kinetic studies of ammonia monooxygenase inhibition in *Nitrosomonas europaea* by hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in an optimized whole-cell assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2501–2510.
- [45] Keener, W. K., Russell, S. A., and Arp, D. J. (1998) Kinetic characterization of the inactivation of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by alkyne, aniline and cyclopropane derivatives. *Biochim. Biophys.*

- 1388, 373–385.
- [46] Khodair, A. I., Al-Masoudi, N. A., and Gesson, J. P. (2003) A new approach to the synthesis of benzothiazole, benzoxazole, and pyridine nucleosides as potential antitumor agents. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 22, 2061–2076.
 - [47] Klotz, M. G., Alzerreca, J., and Norton, J. M. (1997) A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria : a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 303–311.
 - [48] Kraft, B., Strous, M., and Tegetmeyer, H. E. (2011) Microbial nitrate respiration - Genes, enzymes and environmental distribution. *J. Biotechnol.* 155, 104–117.
 - [49] Lieberman, R. L., and Rosenzweig, A. C. (2005) Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434, 177–182.
 - [50] Lipscomb, J. D. (1994) Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 371–399.
 - [51] Lopez, G., Daniellou, R., O'Donohue, M., Ferrières, V., and Nugier-Chauvin, C. (2007) Thioimidoyl furanosides as first inhibitors of the α -L-arabinofuranosidase AbfD3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 434–438.
 - [52] Mc Tavish, H., Fuchs, J. A., and Hooper, A. B. (1993) Sequence of the gene coding for ammonium monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 175, 2436–2444.
 - [53] McCarty, G. W. (1999) Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fert. Soil* 29, 1–9.
 - [54] McCarty, G. W., and Bremner, J. M. (1991) Inhibition of nitrification in soil by gaseous hydrocarbons. *Biol. Fert. Soils* 11, 231–233.
 - [55] McCarty, G. W., and Bremner, J. M.
 - [56] Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S., and Richardson, D. J. (1996) The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* 387, 71–74.
 - [57] Norton, J. M., Javier Alzerreca, J., Suwa, Y., and Klotz, M. G. (2002) Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177, 139–149.
 - [58] Paul, E. A., and Clark, F. E. *Soil microbiology and biochemistry - Second edition*; Academic Press, 1996; Chapter 10, pp 215–244.
 - [59] Paul, E. A., and Clark, F. E. *Soil microbiology and biochemistry - Second edition*; Academic Press, 1996; Chapter 8, pp 181–198.
 - [60] Paul, E. A., and Clark, F. E. *Soil microbiology and biochemistry - Second edition*; Academic Press, 1996; Chapter 9, pp 199–214.
 - [61] Radel, R. J., Randle, A. A., Gautney, J., R, B. B., and Williams, H. M. (1992) Thiophosphoryl triamide : a dual purpose urease/nitrification inhibitor. *Fertilizer Res.* 31, 275–280.
 - [62] Ramakrishnan, A., Pornsuriyasak, P., and Demchenko, A. V. (2005) Synthesis, glycosidation, and hydrolytic stability of novel glycosyl thioimidates. *J. Carbohydrate Chem.* 24, 649–663.
 - [63] Rasche, M., Hicks, R., Harding, R., Hyman, M., and Arp, D. (1990) Oxidation of monohalogenated ethanes and *n*-chlorinated alkanes by whole cells of *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* 172, 5368–5373.
 - [64] Rasche, M. E., Hyman, M. R., and Arp, D. J. (1991) Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea* : cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2986–2994.
 - [65] Rasche, M. E., Hyman, M. R., and Arp, D. J. (1990) Biodegradation of halogenated hydrocarbon fumigants by nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2568–2571.
 - [66] Reemtsma, T., Fiehn, O., Kalnowski, G., and Jekel, M. (1995) Microbial transformations and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 29, 478–485.
 - [67] Ruzicka, F., Huang, D.-S., Donnelly, M. I., and Frey, P. A. (1990) Methane monooxygenase catalyzed oxygenation of 1,1-dimethylcyclopropane. Evidence for radical and carbocationic intermediates. *Biochem.* 29, 1696–1700.
 - [68] Sayavedra-Soto, L. A., Hommes, N. G., Alzerreca, J. J., Arp, D. J., Norton, J. M., and Klotz, M. G. (1998) Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 81–88.
 - [69] Shears, J. H., and Wood, P. M. (1985) Spectroscopic evidence for a photosensitive oxygenated state of ammonia mono-oxygenase. *Biochem. J.* 226, 499–507.
 - [70] Shiemke, A. K., Arp, D. J., and Sayavedra-Soto, L. A. (2004) Inhibition of membrane-bound methane

- monooxygenase and ammonia monooxygenase by diphenyliodonium : Implications for electron transfer. *J. Bacteriol.* **186**, 928–937.
- [71] Singh, S. K., Verma, P., Ramaiah, N., Chandrashekar, A. A., and Shouche, Y. S. (2010) Phylogenetic diversity of archaeal 16S rRNA and ammonia monooxygenase genes from tropical estuarine sediments on the central west coast of India. *Res. in Microbiol.* **161**, 177–186.
- [72] Strous, M., and Jetten, M. S. M. (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Ann. Rev. Microbiol.* **58**, 99–117.
- [73] Subbarao, G. V., Ishikawa, T., Ito, O., Nakahara, K., Wang, H. Y., and Berry, W. L. (2006) A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots : a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant Soil* **288**, 101–112.
- [74] Subbarao, G. V., Rondon, M., Ito, O., Ishikawa, T., Rao, I. M., Nakahara, K., Lascano, C., and Berry, W. L. (2007) Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? *Plant Soil* **294**, 5–18.
- [75] Subbarao, G. V., Wang, H. Y., Ito, O., Nakahara, K., and Berry, W. L. (2007) NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant Soil* **290**, 245–257.
- [76] Suzuki, I., Dular, U., and Kwok, S. C. (1974) Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**, 556–558.
- [77] Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2006) Metalloenzymes of the denitrification pathway. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 2087–2100.
- [78] Tsang, D. C., and Suzuki, I. (1982) Cytochrome c_{554} as a possible electron donor in the hydroxylation of ammonia and carbon monoxide in *Nitrosomonas europaea*. *Can. J. Biochem.* **60**, 1018–1024.
- [79] Vannelli, T., and Hooper, A. B. (1995) NIH shift in the oxidation of aromatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Evidence against an arene oxide intermediate. *Biochem.* **34**, 11743–11749.
- [80] Vannelli, T., and Hooper, A. B. (1993) Reductive dehalogenation of the trichloromethyl group of Nitrapyrin by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3597–3601.
- [81] Vannelli, T., and Hooper, A. B. (1992) Oxidation of Nitrapyrin to 6-Chloropicolinic acid by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2321–2325.
- [82] Vannelli, T., Logan, M., Arciero, D. M., and Hooper, A. B. (1990) Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1169–1171.
- [83] Voysey, P. A., and Wood, P. M. (1987) Methanol and formaldehyde oxidation by autotrophic nitrifying bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **33**, 283–290.
- [84] Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D., and Hooper, A. B. (2000) Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 346–355.
- [85] Wood, L. B., Hurley, B. J. E., and Matthews, P. J. (1981) Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification. *Water Res.* **15**, 543–551.
- [86] Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B., and DiSpirito, A. A. (1996) Evidence for an iron center in the ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea*. *FEBS Lett.* **397**, 35–38.
- [87] Zhu, X., and Schmidt, R. R. (2009) New principles for glycoside-bond formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 1900–1934.

Deuxième partie

Inhibition des uréases

7. Les uréases et le NBPT

7.1. Mécanisme des uréases

Structure du site actif

En 1926, une uréase de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) est cristallisée pour la première fois par James B. Sumner [90]. Il obtient alors le prix Nobel en 1946 pour avoir montré qu'une enzyme pouvait être cristallisée. Il a ensuite fallu attendre presque 50 ans avant que la présence de deux atomes de nickel soit découverte dans le site actif de ces uréases [30]. Par la suite, notamment dans les années 90, de nombreuses études de cristallographie par rayons X ont été menées sur différents type d'uréases afin de déterminer de façon plus précise la structure de la protéine et de son site actif [14, 70]. La séquence complète de l'uréase Jack Bean a été élucidée en 1988 [93]. Mais ce n'est qu'en 2010 que sa structure cristalline a pu être identifiée précisément [10].

La structure quaternaire de la majorité des uréases bactériennes, comme celle de *Bacillus pastorii* (BPU) ou celle de *Klebsiella aerogenes* (KAU), est composée d'un trimère de trimères $(\alpha\beta\gamma)_3$, chaque sous-unité α contenant un site actif (figure 7.1.a) [48, 19]. Les uréases présentes chez *Helicobacter Pylori* sont une exception puisqu'elles sont composées de 4 trimères de dimères $((\alpha\beta)_3)_4$ offrant un total de 12 sites actifs [45]. Quand aux uréases des plantes, dont les uréases Jack Bean (JBU), elles sont composées de 2 homotrimères $(\alpha_3)_2$ et contiennent 6 sites actifs (figure 7.1.b) [10].

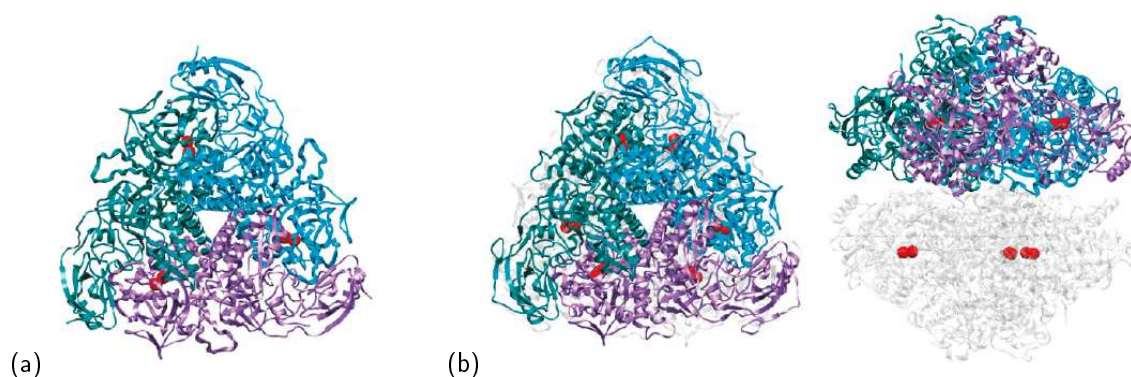


FIGURE 7.1. Structures quaternaires de (a) BPU et de (b) JBU [108]

La structure du site actif est la même, quelle que soit l'uréase considérée (figure 7.2), les uréases connues étant toutes des variantes de la même enzyme [66]. Le centre du site actif des uréases est occupé par deux ions Ni^{2+} distants de 3,5 à 3,7 Å. Les deux métallocentres sont reliés par la fonction carboxylate d'une lysine présente sous forme carbamate. Chacun d'eux est également lié à deux histidines. Enfin, l'un de ces atomes de nickel forme également une liaison avec un aspartate [71, 19].

Le site actif est occupé par un cluster tétraédrique formés de 4 entités (WB, W1, W2 et W3) qui sont soit des molécules d'eau, soit des ions hydroxyle. L'une d'elle (WB) relie les deux atomes de nickel de façon symétrique, tandis que deux autres (W1 et W2) sont coordonnées respectivement à chaque métallocentre. La quatrième entité (W3) complète le cluster à l'aide de liaisons hydrogènes, et est orientée vers l'ouverture du site actif. Il en résulte une géométrie bipyramide trigonale distordue pour l'un des nickels (Ni2), tandis que l'autre est pseudo-tétraédrique (Ni1). De part leur environnement différent, les deux nickels jouent un rôle distinct dans le mécanisme de dégradation de l'urée.

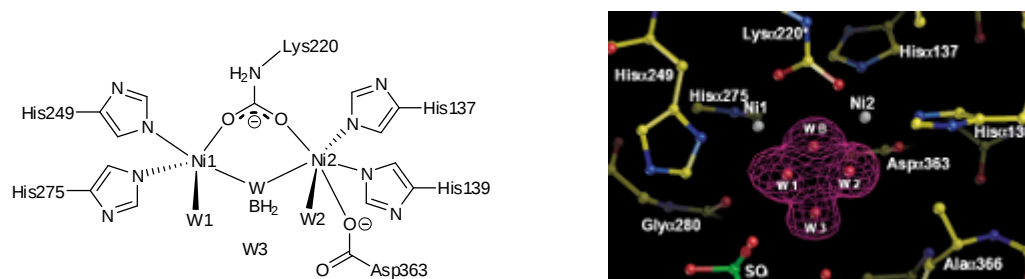


FIGURE 7.2. Géométrie du site actif de l'uréase de la sous-unité α de BPU [19]. WB, W1, W2 et W3 représentent le cluster tétraédrique.

Le site actif est protégé par un volet qui referme la cavité lorsque un substrat ou un inhibiteur se trouve à l'intérieur. Ces acides aminés (notamment une alanine, une histidine et une cystéine) participent également au mode de liaison des substrats à travers la formation de liaisons hydrogène, et accélèrent la réaction par stabilisation de l'état de transition. La cavité ne s'ouvre de nouveau que lorsque la réaction est terminée, afin de libérer les produits de réactions et introduire un nouveau cluster d'eau [58].

Mécanisme de dégradation de l'urée

À l'heure actuelle, le mécanisme exact de dégradation de l'urée n'est pas connu avec certitude. Il n'existe aujourd'hui que des hypothèses, qui sont encore à l'étude à partir de comparaisons avec des modèles simplifiés [49], ou de modélisations informatiques [26]. La première hypothèse historique est celle de l'hydrolyse, mais il est également possible d'envisager une réaction d'élimination.

Un mécanisme d'hydrolyse impliquerait l'attaque de l'une des molécules d'eau du cluster sur le carbone de l'urée. Il en résulterait un intermédiaire tétraédrique qui libérerait alors une molécule d'ammoniac en formant une molécule d'acide carbamique. Cette dernière, en milieu aqueux, se décomposerait alors en ammoniac et dioxyde de carbone. Deux mécanismes différents ont été proposés, par Karplus et al. [50] (figure 7.3), et par Benini et al. [15] (figure 7.4). La différence entre les deux réside dans la nature de la molécule d'eau à l'origine de l'attaque nucléophile.

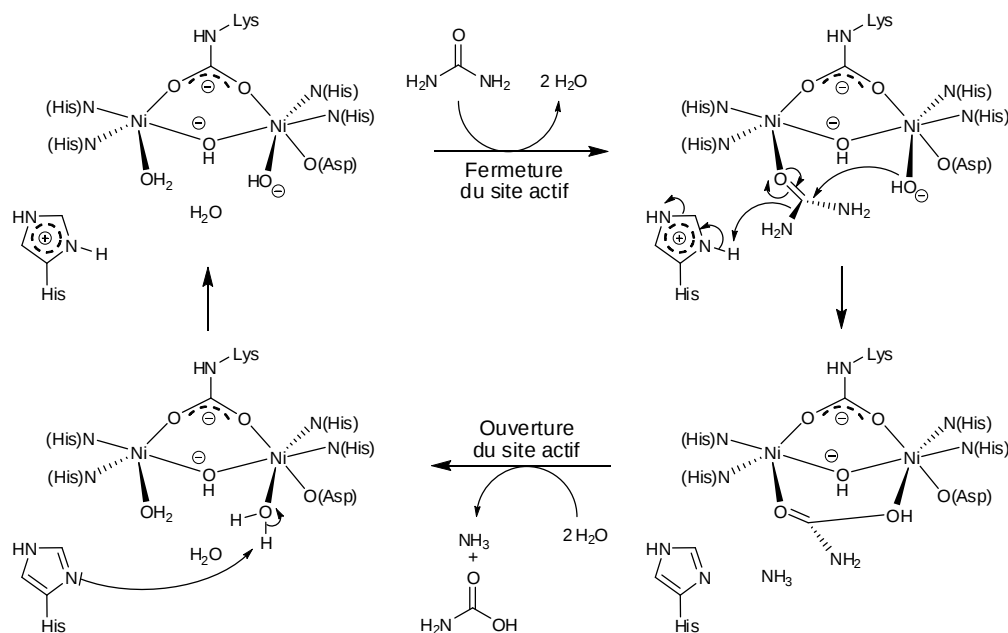


FIGURE 7.3. Mécanisme d'hydrolyse de l'urée selon Karplus et al. [50]

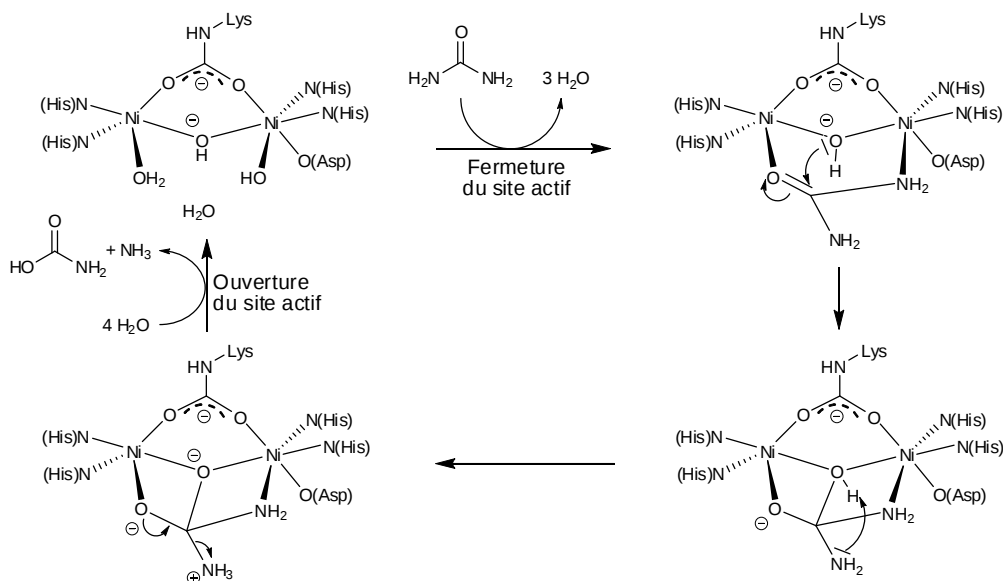


FIGURE 7.4. Mécanisme d'hydrolyse de l'urée selon Benini et al. [15]

La dégradation de l'urée se produisant par voie non enzymatique en solution aqueuse, entre pH 2 et pH 12, se fait par une réaction d'élimination, et forme de l'ammoniaque et de l'acide cyanique [24]. La dégradation de l'urée par les uréases se faisant 10^{14} fois plus rapidement que la dégradation spontanée pH-indépendante, il est possible d'imaginer un mécanisme enzymatique qui procède par voie d'élimination, comme l'ont proposé Barrios et Lippard [11] (figure 7.5). Dans ce cas, l'urée prendrait la place de trois molécules d'eau en se complexant au nickel tétra-substitué. L'un des acides aminés voisin, agissant en temps que base, déprotonerait l'une des fonctions amine du substrat, permettant, via un réarrangement, la libération d'une molécule d'ammoniaque et la formation d'acide cyanique. Cette molécule en milieu aqueux se décompose en ammoniaque et dioxyde de carbone.

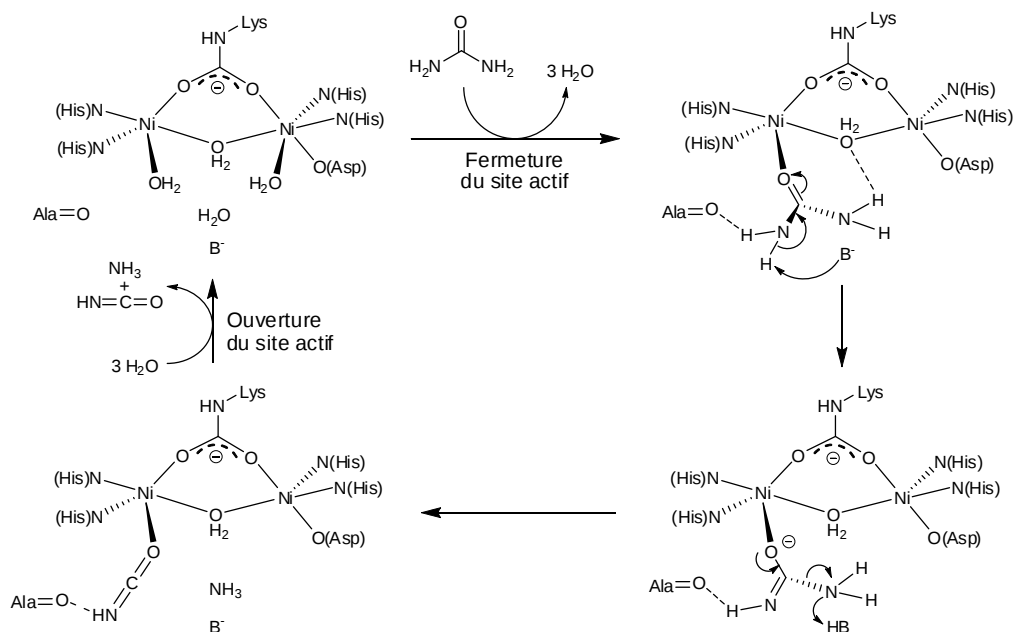


FIGURE 7.5. : Mécanisme d'élimination de l'urée selon Barrios et Lippard [11]

Plusieurs études ont cherché à déterminer lequel des trois mécanismes paraissait le plus probable. D'après Musiani et al. [68], l'entité la plus susceptible de débiter un mécanisme d'hydrolyse serait l'hydroxyde pontant les deux atomes de nickel. En ce qui concerne la comparaison hydrolyse/élimination, aucune étude n'a parmi de conclure de façon satisfaisante. Il semblerait que les deux mécanismes soient favorisés de façon égale, et seraient par conséquent en compétition dans le site actif, phénomène qui a déjà été rencontré lors de diverses réactions enzymatiques [35, 34, 33].

7.2. Mode d'action de quelques inhibiteurs connus

Les uréases sont inhibées par un grand nombre de composés organiques, qui sont largement utilisés en médecine et en agriculture. Les études des mécanismes d'inhibition des uréases ont été réalisées, autant pour pouvoir contrôler l'activité de l'enzyme que pour comprendre le mécanisme de dégradation de l'urée [56].

Les acides hydroxamiques

Les propriétés inhibitrices des acides hydroxamiques ont été découvertes pour la première fois en 1962, sur l'uréase Jack Bean [53]. Les acides hydroxamiques sont de bon agents chélatants et se lient au site actif des uréases de façon compétitive.

Parmi eux, l'acide acétohydroxamique (AHA) possède une constante d'inhibition d'approximativement 2,6 μM [96]. Les structures cristallographiques menées sur KAU [70] et BPU [18] inhibées par le AHA ont permis d'élucider le mécanisme d'inhibition de ce composé. Le mode d'inhibition du AHA est dépendant du pH. La forme neutre de la molécule se lie de façon monodentate sur l'un des nickels, via l'oxygène du carbonyle (figure 7.6.a) [83, 61]. En revanche, sa forme anionique, l'hydroxamate, se lie au site actif de façon bidentate. Tandis que l'oxygène de l'hydroxamate ponte les deux nickels, celui du carbonyle chélate l'un des deux métallocentres (figure 7.6.b). La présence de cet inhibiteur dans la cavité du site actif interdit également au volet de se refermer. Le passage d'un mode de liaison à l'autre se fait via la perte d'une molécule d'eau.

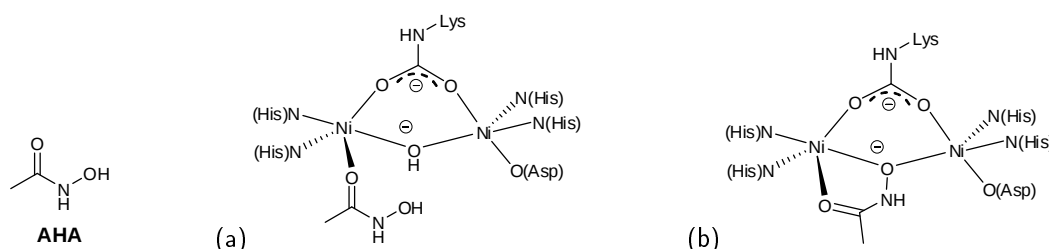


FIGURE 7.6. Uréase inhibée par (a) le AHA de façon monodentate ou (b) par l'hydroxamate de façon bidentate

Les thiols

Les thiols ne sont pas des inhibiteurs très efficaces, comme en témoignent leurs constantes d'inhibitions supérieures à 5 μM [96]. Pourtant, leur étude a apporté de nombreuses informations sur le mécanisme des uréases.

Les composés de la famille des thiols inhibent compétitivement les uréases à partir de leur forme anionique R-S^- . La structure cristalline de BPU inhibée par le β -mercaptoéthanol (BME) a montré que l'atome de soufre se lie aux deux nickels du site actif. La fonction alcool, quant à elle, se chélate à l'un des métallocentres (figure 7.7). Une seconde molécule d'inhibiteur forme un pont dissulfure avec une cystéine, refermant ainsi l'entrée vers la cavité du site actif [16].

Les amides et esters d'acides phosphoriques

Les inhibiteurs de type phosphoramides sont les inhibiteurs compétitifs parmi les plus efficaces. Par exemple, la constante d'inhibition du phényl phosphorodiamidate (PPD) a été évaluée à 95 nM [96]. La plupart des composés de cette famille inhibent les uréases par l'intermédiaire de leur produit d'hydrolyse, le diaminophosphate (DAP) [9]. La structure cristalline de BPU inhibée par le PPD a révélé la présence du DAP dans le site actif de l'enzyme [19]. Cette molécule tétraédrique remplace presque parfaitement le cluster d'eau. L'un des oxygènes lie les deux

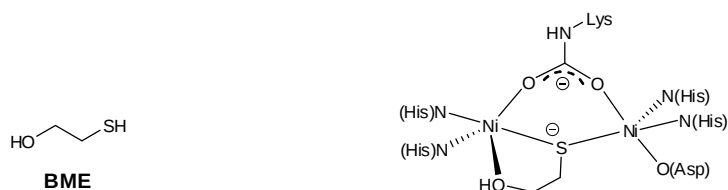


FIGURE 7.7. Uréase inhibée par le BME

atomes de nickel. Le second oxygène et l'une des amines chélatent chacun des métallocentres (figure 7.8.a). La dernière amine est dirigée vers l'ouverture de la cavité. De ce fait, le DAP est un mime de l'état de transition tétraédrique supposé lors de l'hydrolyse de l'urée.

Le phosphate est également un inhibiteur d'uréases, bien que son activité soit dépendante du pH. En effet, son activité décroît à mesure que le pH augmente, jusqu'à être nulle au delà de pH 7 [96]. D'après la structure cristalline d'une BPU inhibée par le phosphate, le mécanisme d'inhibition de ce dernier est similaire à celui du DAP (figure 7.8.b) [15].

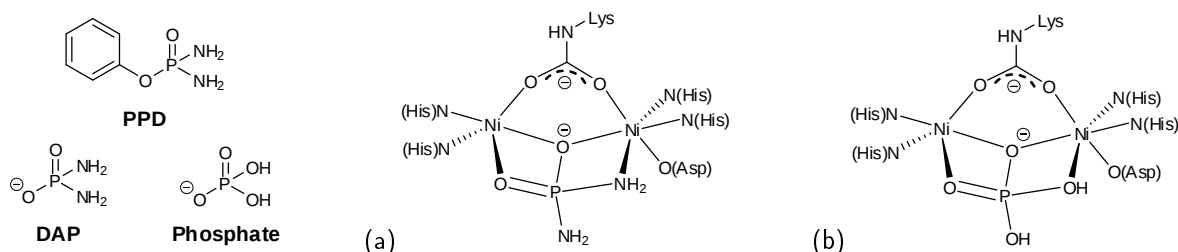


FIGURE 7.8. Uréase inhibée par (a) le DAP et (b) le phosphate

Étant donné l'efficacité remarquable de cette famille d'inhibiteurs, de nombreuses modulations ont été développées parmi les amides et les esters d'acides phosphoriques et thiophosphoriques [31, 38].

Les acides boriques et boroniques

L'activité des acides boriques et les acides boroniques varient avec le pH. Dans le cas de l'acide borique, le maximum d'inhibition se situe pour un pH compris entre 6 et 9, indiquant que la forme active de la molécule est $B(OH)_3$ [57]. La structure cristalline de BPU inhibée par l'acide borique montre que ce dernier remplace 3 des molécules d'eau présentes dans le site actif de l'uréase native. Deux oxygènes se lient aux nickels tandis que le troisième pointe vers l'extérieur de la cavité (figure 7.9) [17].

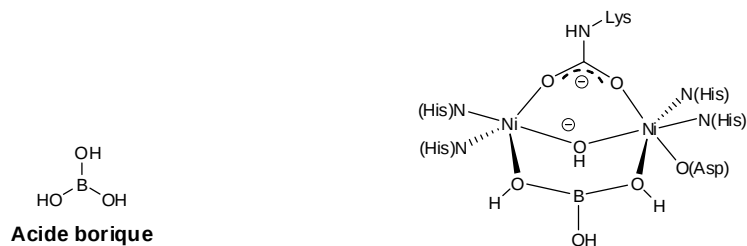


FIGURE 7.9. Uréase inhibée par l'acide borique

Autres

Des nouveaux inhibiteurs d'uréases sont encore développés aujourd'hui, notamment pour répondre à la problématique médicale que posent les infections de l'estomac par *Helicobacter pylori*. La croissance de ces bactéries dépend de leur capacité à neutraliser l'acidité de l'estomac au moyen d'une émission d'ammoniac. Ce type d'infection

est donc traité par l'inhibition des uréases de ces micro-organismes pathogènes, ce qui limite leur production d'ammoniac. De nombreuses familles de composés organiques ont montré un potentiel dans ce domaine, parmi lesquelles se trouvent par exemple des cétones (α,β -insaturées [95], α -hydroxycétone [94], quinones [106]), des oxadiazoles, thiadiazoles et triazoles [7], des polyphénols [101], des *bis*-coumarines [51, 107], des germa- γ -lactones [6], des dérivés de sélénourées [81], et des acides aminométhane-phosphoniques et aminométhane-*P*-méthylphosphiniques [98, 20] (figure 7.10). Des études ont également montré que les complexes métalliques de type base de Schiff pouvaient inhiber efficacement les uréases [104, 25, 103].

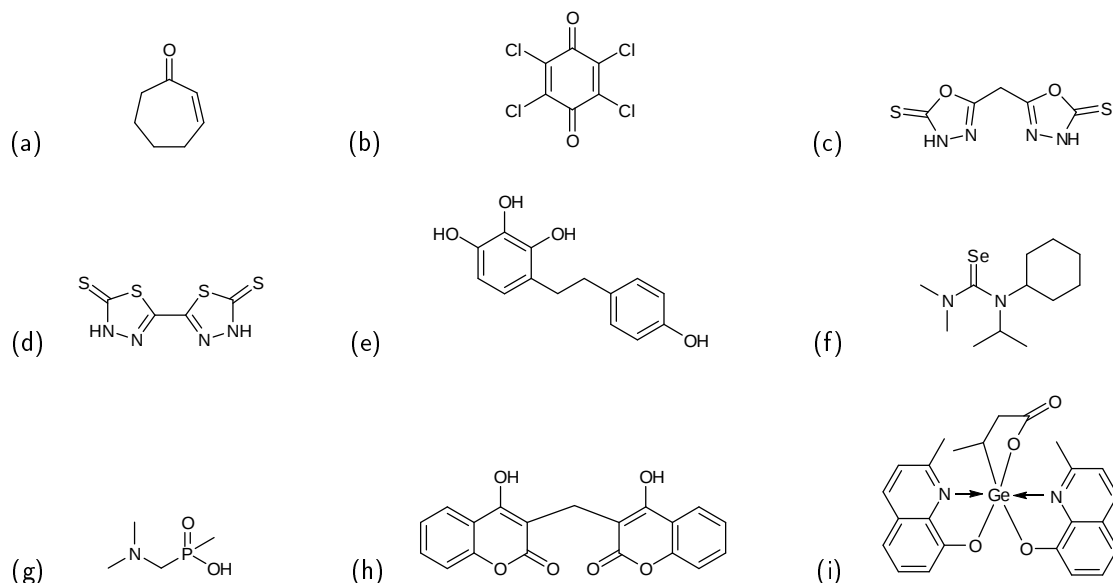
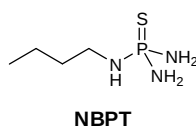


FIGURE 7.10. Composés organiques ayant montré une activité inhibitrice sur les uréases : (a) cétone α,β -insaturée, (b) quinone, (c) oxadiazole, (d) thiadiazole, (e) polyphénol, (f) sélénourée, (g) acide aminométhane-*P*-méthylphosphinique, (h) *bis*-coumarine et (i) germa-lactone,

7.3. Le NBPT, inhibiteur d'intérêt



7.3.1. Mécanisme d'inhibition des uréases par le NBPT

Les thiophosphorotriamides ne sont que de pauvres inhibiteurs d'uréase. Leur effet dépend essentiellement de leur taux de conversion en phosphorotriamides dans les sols (figure 7.11). Dans le cas du **NBPT**, l'espèce inhibitrice est le **NBPTO**, résultat de la substitution de l'atome de soufre par un atome d'oxygène. Cette transformation se produit très rapidement dans les sols [64].

Plusieurs mécanismes d'inhibition ont été proposés. L'un d'eux propose la coordination de chaque amine sur un nickel tandis que l'oxygène ponte les deux métallocentres (figure 7.12.a) [31]. Un autre implique plutôt la formation d'une liaison hydrogène entre l'oxygène de l'inhibiteur et la lysine carbamate du site actif (figure 7.12.b) [61]. Dans ces deux cas, la stabilité du complexe s'explique par sa nature tridentate. Quant à ses propriétés inhibitrices, elles seraient dues à la chaîne butyle pointant vers l'extérieur de la cavité, et interdisant ainsi l'entrée du substrat à proximité des deux nickels.

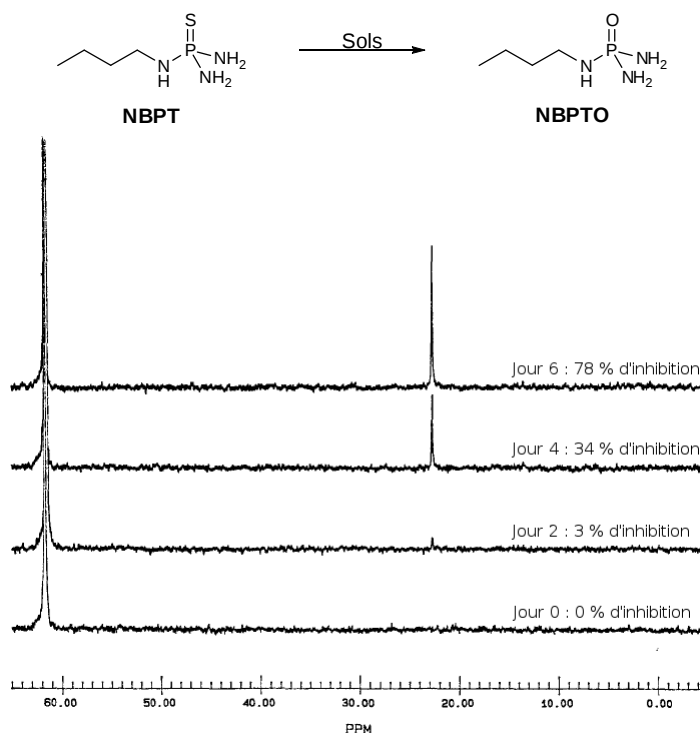


FIGURE 7.11. RMN ^{31}P du NBPT après incubation dans des sols pendant 0, 2, 4 et 6 jours. A 62 ppm se trouve le pic correspondant au NBPT. La formation du NBPTO est visible par la croissance du pic correspondant à 23 ppm. L'intensité du pic correspondant au NBPTO est mise en relation avec le pourcentage d'inhibition des uréases [65, 64].

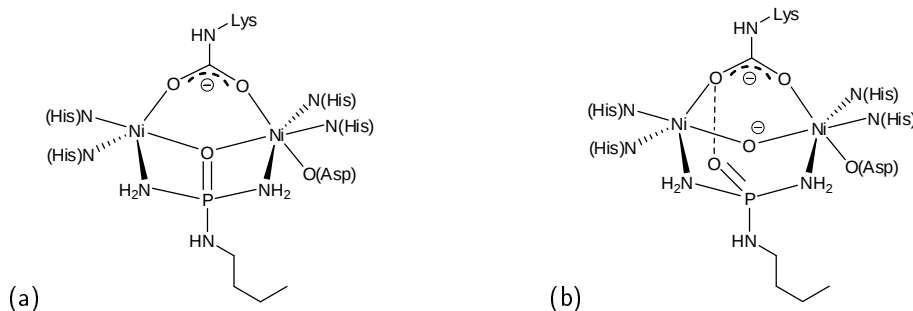


FIGURE 7.12. Hypothèses sur le mode de liaison du NBPTO au site actif de l'uréease (a) selon Domínguez et al. [31] et (b) selon Manunza et al. [61].

7.3.2. Avantages et inconvénients du NBPT

Étant donné son excellente efficacité (NBPT : $\text{IC}_{50} = 100 \text{ nM}$; NBPTO : $\text{IC}_{50} = 1 \text{ nM}$), le NBPT a été breveté en 1985 pour son application en agriculture [55] et est aujourd'hui utilisé industriellement dans de nombreux engrais. Sa faible solubilité dans l'eau est un inconvénient mineur qui a été maîtrisé grâce à l'utilisation de diverses formulations, certaines liquides, comme l'Agrotain [99], d'autres sous forme de granulés [100]. Cependant, son principal point faible, qu'est sa piètre stabilité en milieu acide, reste encore insurmonté.

En effet, cet inhibiteur connu pour être efficace en milieu neutre et basique perd rapidement son activité en milieu acide. Des expériences de suivi de l'urée en présence et en l'absence d'Agrotain, réalisées à l'INRA de Caen par Xavier SARDA, dans l'équipe d'Alain OURRY, illustrent bien ce phénomène (figure 7.13).

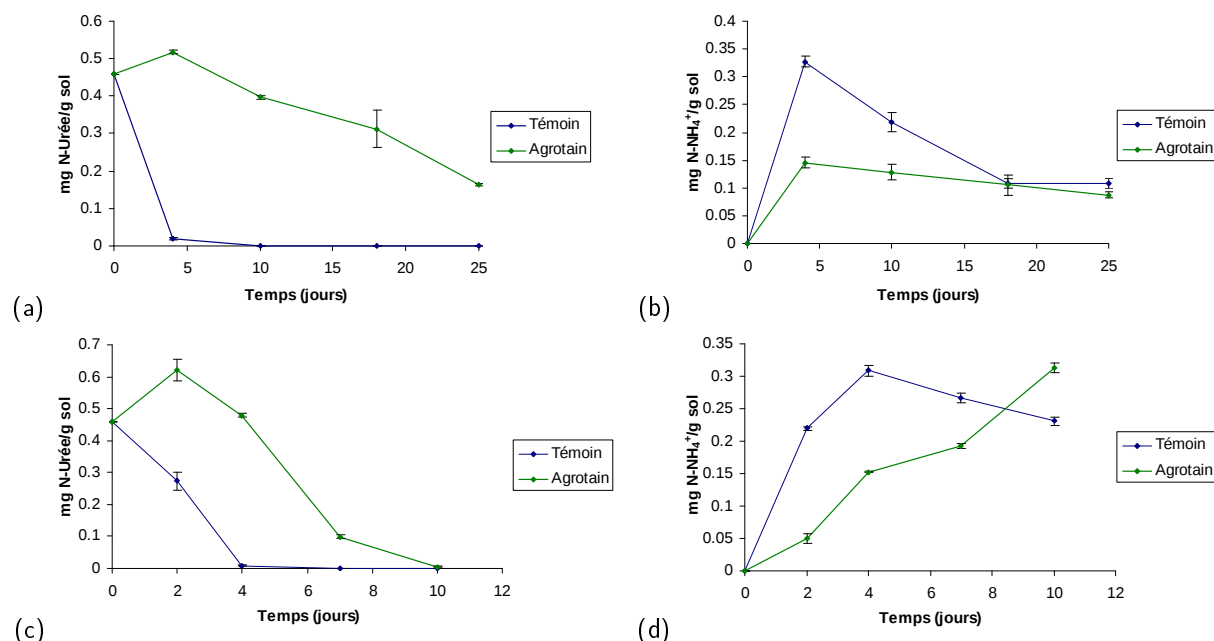


FIGURE 7.13. Suivi en sol alcalin de la concentration (a) en urée et (b) en ammoniums en présence de **NBPT** (Agrotain) et sans inhibiteur (Témoin). Suivi en sol acide de la concentration (c) en urée et (d) en ammoniums en présence et en l'absence de **NBPT**.

En l'absence d'inhibiteurs d'uréases (Témoin), l'urée introduite dans l'échantillon de sol est totalement consommée en 4 jours, quel que soit le pH du sol. En conséquence, la concentration en ammonium atteint un sommet au quatrième jour, puis connaît une décroissance au fur et à mesure que les ammoniums sont à leur tour consommés par la nitrification.

Lorsque de l'Agrotain est appliqué en sol alcalin (figure 7.13.a), la consommation de l'urée est fortement ralentie, et un tiers de l'urée initialement introduite subsiste encore après 25 jours d'incubation. Dans le sol acide en revanche, cette consommation est certes ralentie, mais dans une bien moindre mesure, puisqu'elle est totale après seulement 10 jours d'incubation (figure 7.13.c). De ce fait, l'accumulation d'ammoniums, qui ne dépasse pas les 0,15 mg N-NH₄⁺/g sol dans le sol basique (figure 7.13.b), atteint plus du double de cette valeur dans le sol acide (figure 7.13.d).

C'est là le déficit qu'il a été choisi de relever lors de ces recherches. Deux voies ont donc été envisagées pour diminuer la sensibilité du **NBPT** aux environnements acides. La première consiste à formuler la molécule afin de la protéger au coeur d'une structure supramoléculaire. La seconde consiste en des modulations chimiques développées au voisinage de la fonction clivable du **NBPT**.

7.3.3. Suivi de la dégradation du NBPT en milieu tamponné acide

Pour réaliser cette étude, il est nécessaire de pouvoir évaluer la cinétique de dégradation du **NBPT** dans l'Agrotain et dans les formulations, ainsi que celles des molécules nouvellement développées. Plusieurs méthodes sont envisageables pour suivre la dégradation d'un composé, parmi lesquelles le dosage par HPLC [32] ou encore par spectroscopie UV-visible [4]. L'une des méthodes les plus faciles à mettre en place reste malgré tout le suivi par RMN car les molécules de la famille des phosphoramides se prêtent particulièrement bien à un suivi par RMN du phosphore.

Après mise en contact du **NBPT** avec un milieu tamponné acide (tampon acétate, pH 5,5), le pic RMN correspondant au phosphore du **NBPT**, situé à environ 60 ppm, diminue d'intensité lors de la dégradation de cette molécule (figure 7.14). Dans un même temps, un autre pic grandit à 53 ppm, correspondant à l'apparition d'un produit de dégradation. La présence dans le tube RMN d'un capillaire étalon isolé, contenant une solution de H₃PO₄ de concentration fixe, permet de quantifier la disparition du **NBPT**.

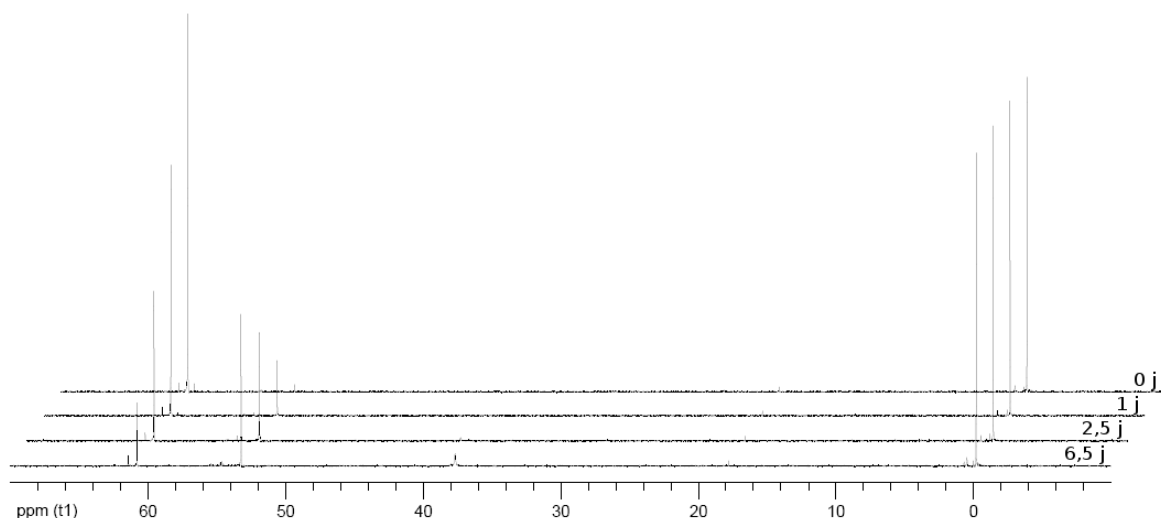


FIGURE 7.14. Suivi de la dégradation du **NBPT** par RMN du phosphore en solution aqueuse de pH 5,5. Vers 60 ppm se trouve le pic de phosphore du **NBPT**. Vers 53 ppm apparaît un produit de dégradation. Le pic à 0 ppm correspond à l'étalon de concentration fixe (H_3PO_4).

Avec l'aide de l'équipe CIP de l'ENSCR, le produit de dégradation du **NBPT** en solution aqueuse acide a été caractérisé par spectrométrie de masse comme étant issu de la coupure entre le phosphore et l'azote supportant le groupement butyle (figure 7.15). Il en résulte l'apparition d'acide diaminothiophosphorique (**DATP**) et de *n*-butylamine dans le milieu.

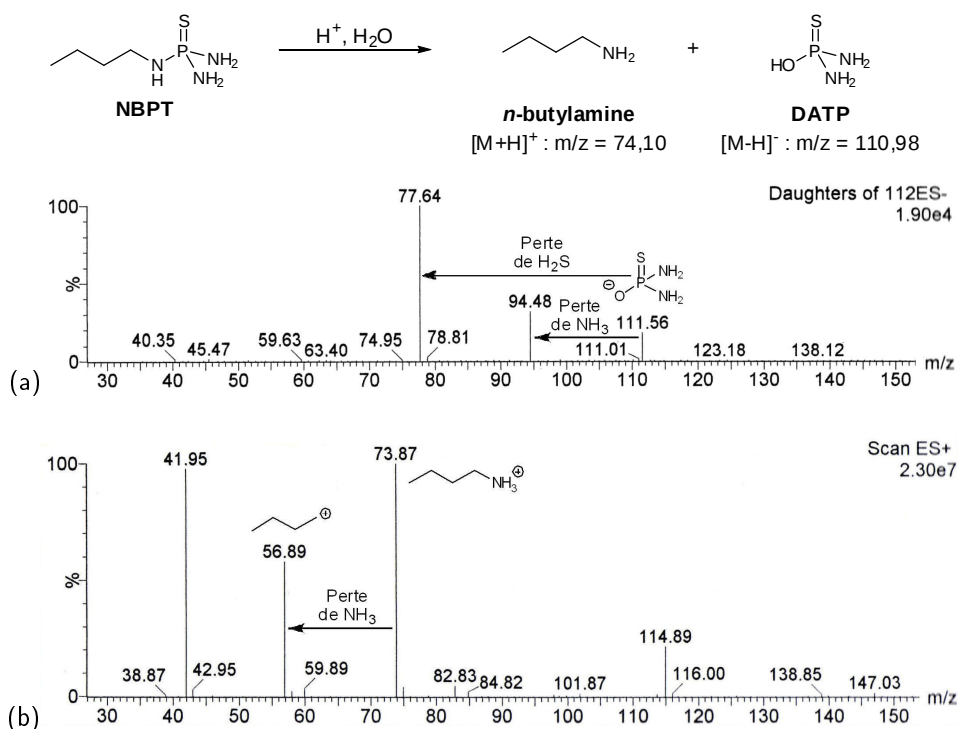


FIGURE 7.15. Caractérisation par LC/MS du produit de dégradation du **NBPT** dont le pic de phosphore est situé à 53 ppm. (a) En ionisation négative, à 30 V, la partie phosphoramidate apparaît faiblement. (b) L'analyse en ionisation positive, à 30 V, laisse apparaître une chaîne butyle. Ainsi, la coupure à pH acide se produit entre la fonction phosphoramide et la chaîne latérale.

Il est important de noter qu'aucune conversion du **NBPT** en **NBPTO** n'est observée lors de ce protocole. Cette transformation ne s'applique que dans les sols. Il est donc probable qu'elle soit l'effet d'une activité bactérienne.

La libération de *n*-butylamine dans la solution a pour effet d'augmenter le pH de la solution. Lors de l'utilisation d'une solution tampon de type acétate, nous avons notamment observé, par spectrométrie de masse, l'apparition de *n*-butylacétamide, produit de la réaction entre la *n*-butylamine et l'acide acétique du tampon (figure 7.16).

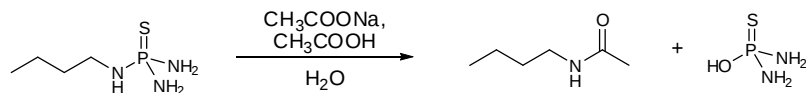


FIGURE 7.16. Dégradation du NBPT dans un tampon acétate acide (pH 5,5)

De ce fait, il a été nécessaire d'utiliser un tampon d'une concentration suffisante pour minimiser ce phénomène (tampon acétate 250 mM pour 120 mM de **NBPT**). Ces conditions opératoires ont permis, en une semaine, d'observer une dégradation importante du **NBPT** dans les conditions acides (figure 7.17). Le suivi de la concentration du **NBPT** en fonction du temps a permis de déterminer que la cinétique de dégradation obéit à une équation d'ordre 1 par rapport au **NBPT** (figure 7.18).

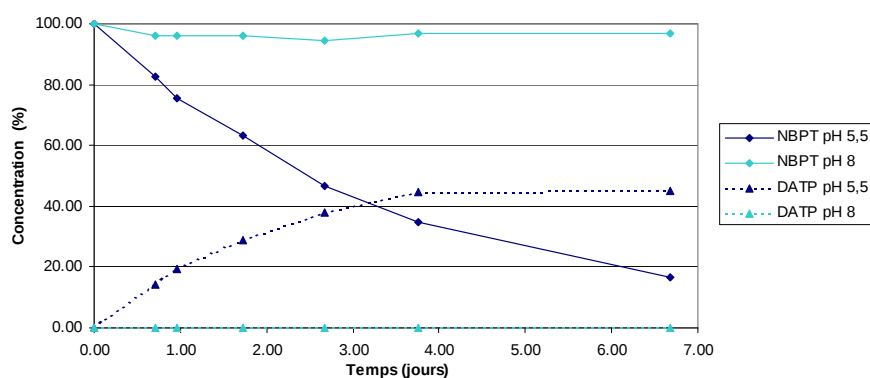
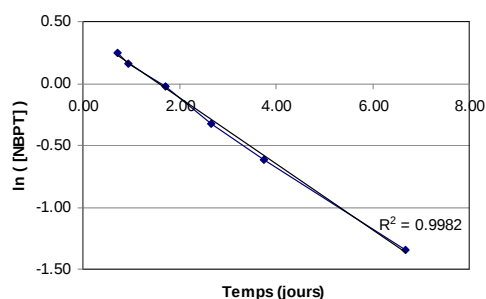


FIGURE 7.17. Suivi par RMN ^{31}P de la dégradation du **NBPT** et de la production de **DATP** à pH 5,5 et pH 8.

$$-\frac{d[\text{NBPT}]}{dT} = k \cdot [\text{NBPT}]$$

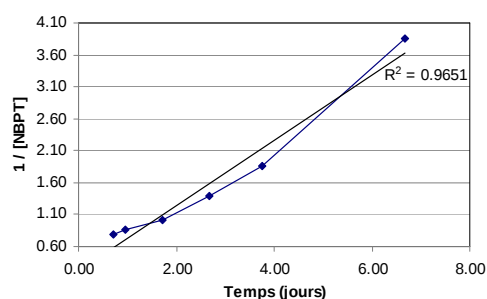
$$\ln([\text{NBPT}]) = -k \cdot T + \ln[\text{NBPT}]_0$$



(a)

$$-\frac{d[\text{NBPT}]}{dT} = k \cdot [\text{NBPT}]^2$$

$$\frac{1}{[\text{NBPT}]} = k \cdot T + \frac{1}{[\text{NBPT}]_0}$$



(b)

FIGURE 7.18. Évaluation de l'ordre de la cinétique de dégradation du **NBPT**, (a) pour une cinétique d'ordre 1 et (b) pour une cinétique d'ordre 2. Le tracé du logarithme de la concentration en **NBPT** en fonction du temps correspond à une droite, ce qui signifie que la cinétique de dégradation du **NBPT** est un ordre 1 par rapport au **NBPT**.

Ce protocole de test est également généralisable au suivi de dégradation d'autres phosphoramides. Il permet dès lors d'éloigner les formulations ou modulations inefficaces.

8. Stabilisation du NBPT par des formulations

Dans le but de protéger le **NBPT** des dégradations en milieu acide, il est envisagé de construire autour de la molécule un environnement favorable à sa préservation. Cependant, le **NBPT** doit rester libre de se dégager de cet habillage, et être relargué progressivement, pour exercer ses propriétés inhibitrices sur les uréases. Les interactions mises en jeu doivent donc être basées sur un équilibre entre la molécule enrobée et la molécule libre.

Diverses formulations ont été formées et étudiées à l'aide du suivi de la dégradation du **NBPT** en solution acide par RMN ^{31}P . Une formulation solide a tout d'abord été imaginée à partir de la wollastonite, un produit commercialisé par le groupe Roullier et sélectionné pour ses propriétés d'adsorption des molécules organiques et son pouvoir tamponnant. Ces deux facteurs nous ont également orienté vers les acides humiques, extraits et largement étudiés chez Timac Agro International à Pampelune (Espagne), dans le but de concevoir une formulation de type liquide. Nous nous sommes également intéressés à des polysaccharides hydrosolubles pour leur propriétés structurales propices à certaines encapsulations : des polysaccharides algaux pour commencer, puis l'amidon, un polysaccharide non ionique. Enfin, nous nous sommes tournés vers les cyclodextrines, molécules hydrosolubles capables de former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de composés par interactions hydrophobes.

8.1. Adsorption sur la wollastonite

Structure et propriétés de la wollastonite

La wollastonite est un matériau naturel inorganique du groupe des silicates de calcium (CaSiO_3). Le cristal de wollastonite est constitué de chaînes parallèles de silicates tétraédrique comportant trois tétraèdres par unité de répétition (figure 8.1.a). Elles sont arrangées par paire et sont reliées entre elles par des atomes de calcium à l'environnement octaédrique [63]. La structure résultante est pseudo-symétrique, de telle manière que la wollastonite est l'un des rares exemples de cristaux ne possédant aucune symétrie. Ainsi, il est très difficile d'étudier sa surface avec précision, et par conséquent les interactions existant entre la surface du cristal et les molécules environnantes [59].

L'un des atouts de ce matériau réside dans sa surface poreuse (figure 8.1.b), capable d'adsorber des composés organiques. Ceux-ci sont alors maintenus dans un environnement basique grâce à la libération d'ions Ca^{2+} par la surface du cristal en milieu aqueux (figure 8.2). Ce phénomène a pour effet d'augmenter le pH de la solution environnante jusqu'à pH 10 [102].

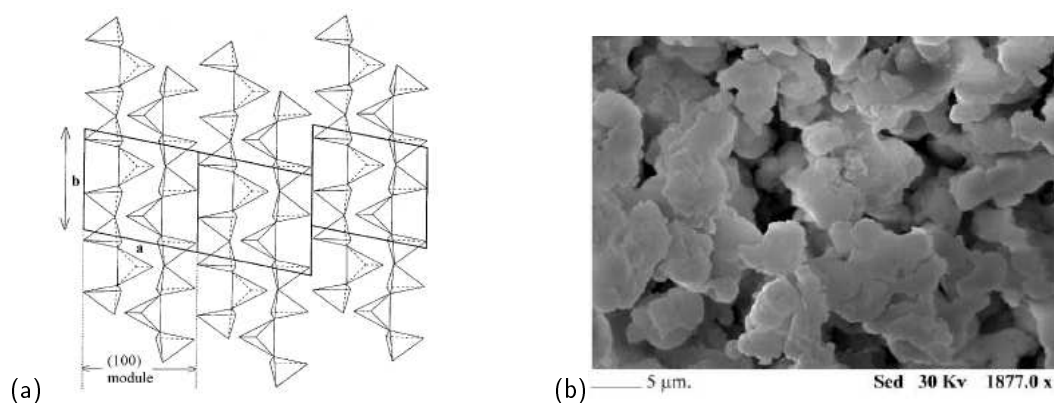
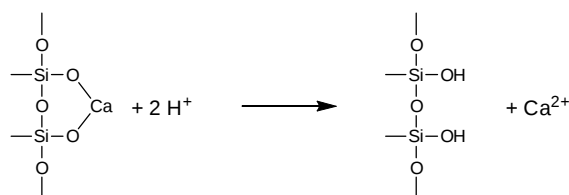


FIGURE 8.1. (a) Représentation schématique de la structure d'une wollastonite et (b) image par microscopie électronique de la surface d'une wollastonite. [63].

FIGURE 8.2. Représentation schématique de l'échange $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ à la surface de la wollastonite

Effet de la wollastonite sur la vitesse de dégradation du NBPT

La wollastonite a été retenue pour développer une nouvelle formulation solide du **NBPT**. Un suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide a donc été réalisé en présence de différentes quantités de wollastonite par rapport au **NBPT**, soient des ratios massiques wollastonite/**NBPT** allant de 1:2 à 6:1 (figure 8.3). Cette cinétique de dégradation a été comparée à celle du **NBPT** formulé sous forme d'Agrotain.

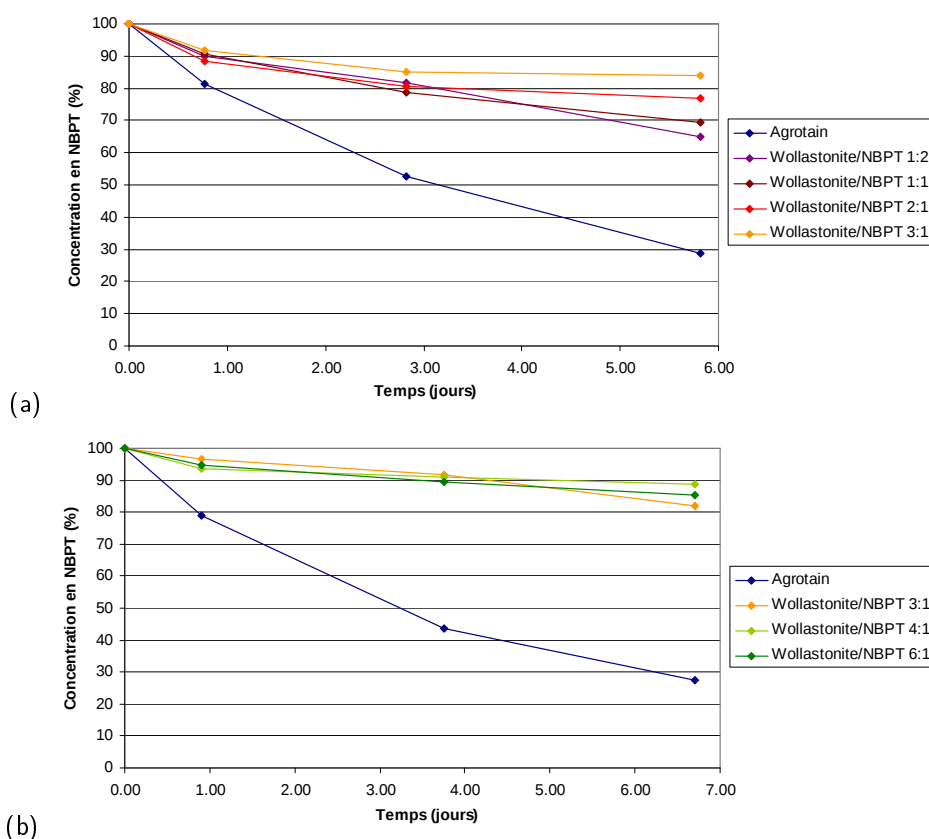


FIGURE 8.3. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence de wollastonite. (a) Évaluation des ratios massiques wollastonite/**NBPT** 1:2 à 3:1. (b) Évaluation des ratios massiques wollastonite/**NBPT** 3:1 à 6:1.

Une première observation des graphiques laisse penser qu'il existe un effet protecteur de la wollastonite sur le **NBPT**. Cette protection semble même croître avec la quantité de wollastonite introduite, en tendant vers un maximum. Cependant les graphiques ne sont pas représentatifs dans ce cas, puisque, lors du suivi, le pH du milieu a peu à peu augmenté, jusqu'à atteindre un pH 8. **Par conséquent, la stabilisation visible sur les courbes est probablement majoritairement due au pouvoir tamponnant de la wollastonite.**

Il a été envisagé de mesurer l'inhibition des uréases *in vitro* de formulations wollastonite/**NBPT**, à l'aide d'un protocole fourni par l'équipe de José-Maria GARCIA-MINA de Timac Agro International, basé à Pampelune

(Espagne). L'activité d'un inhibiteur d'uréases est évaluée à travers son IC_{50} , la concentration en complexe qui inhibe 50 % des JBU. Pour des solutions de concentrations différentes, le pourcentage d'inhibition est mesuré à l'aide d'un dosage colorimétrique de l'ammonium produit par la dégradation de l'urée à pH 7 à 37°C.

Quelques formulations de différents ratios massiques ont été préparées par solubilisation du **NBPT** dans du CH_2Cl_2 , ajout de wollastonite, puis évaporation du solvant sous pression réduite. Dans le cas présent, des difficultés ont été rencontrées, notamment lors des dilutions successives dans l'eau, à cause de la caractéristique solide et insoluble dans l'eau de ces formulations. L'activité de la formulation wollastonite/**NBPT** de ratio 5:1 a quand même pu être évaluée et l' IC_{50} obtenue est de 100 nM, soit la même que celle de l'Agrotain. D'après ce résultat, il est probable que l'affinité du **NBPT** pour la wollastonite soit relativement faible.

Les formulations à base de wollastonite ne s'adaptent pas bien à une étude *in vitro*. L'évaluation de l'activité *in vivo* est donc primordiale pour déterminer l'intérêt ou non de ce type de formulation. Des formulations de ratio 1:1 à 4:1 ont été envoyées à Xavier SARDA à l'INRA de Caen pour subir des tests d'inhibition *in vivo* (figure 8.4). Quel que soit le ratio étudié, il n'y a pas de différence significative entre l'effet de l'Agrotain et celui des formulations wollastonite/**NBPT**. Notamment dans les sols acides, l'urée a été totalement consommée en moins de 10 jours dans tous les cas (figure 8.4.b).

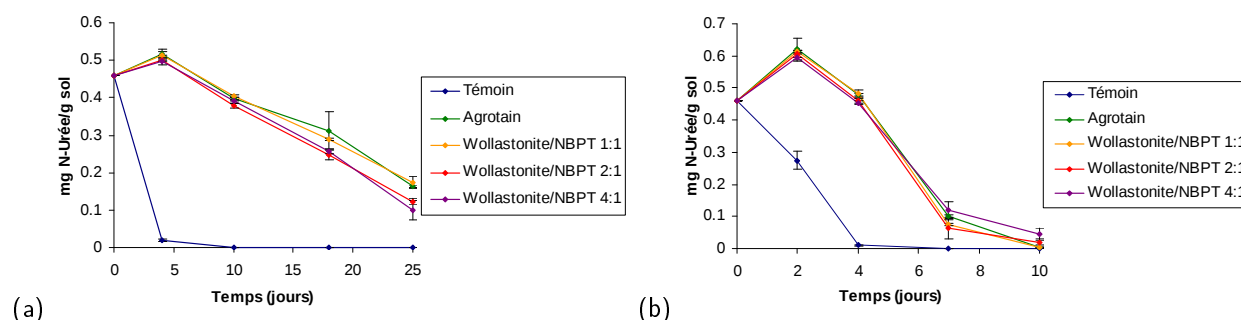


FIGURE 8.4. Activité uréique de formulations wollastonite/**NBPT** de différents ratios (a) en sol alcalin et (b) en sol acide.

D'après les tests d'inhibition des uréases *in vitro* et *in vivo*, il semble que l'affinité entre la wollastonite et le **NBPT** soit trop faible pour une adsorption efficace. Il est possible que ce dernier soit trop rapidement relâché dans les sols. Les formulations de type wollastonite/**NBPT** semblent donc incapables de protéger le **NBPT** de sa dégradation dans les sols acides.

8.2. Encapsulation dans des acides humiques

Les acides humiques (AH) constituent la majorité des substances organiques des sols. Ils sont formés à partir de résidus de plantes et de déchets organiques, par des processus micro-biologiques encore très peu connus (figure 8.5) [87]. Ces composés sont connus en agronomie pour améliorer la croissance des plantes [67]. Ils possèdent aussi des propriétés remarquables en matière de pouvoir tamponnant, de complexation de substances organiques ou de formation de colloïdes. Pourtant, la chimie des acides humiques est rendue très compliquée par la grande complexité des substances étudiées.

Structure et propriétés des acides humiques

La structure des AH peut être extrêmement variable. Elle ne contient ni régularité ni unité répétitive. Cependant, les méthodes de dosages de groupements fonctionnels, ainsi que des analyses par RMN, permettent de déterminer le type de fonctions présentes, ainsi que leurs proportions. Des méthodes par dégradations sélectives peuvent aussi révéler les unités structurales qui composent ces macromolécules. Enfin, l'analyse élémentaire donne les proportions des différents atomes dans l'extrait. Ces différentes analyses ont pu donner une idée sur la structure des acides humiques.

Les substances humiques sont composées de résidus aromatiques généralement fonctionnalisés (phénols, quinones, acides benzoïque, biphenyles...) auxquels sont liées des éléments aliphatiques (alcane, acides gras...), ainsi que des sucres et des peptides (figure 8.6). Les groupements fonctionnels principaux sont :

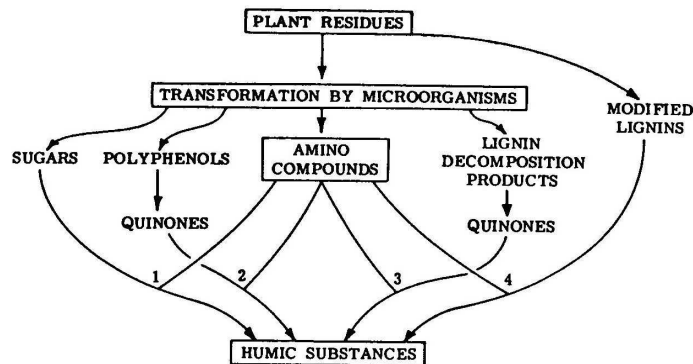


FIGURE 8.5. Mécanisme de formation des substances humiques. Les composés aminés synthétisés par les micro-organismes réagissent avec les lignines modifiées (voie 4), les quinones (voie 2 et 3) et les sucres réducteurs (voie 1) [87].

- des acides carboxyliques (aromatiques ou aliphatiques)
- des hydroxyles (phénoliques ou aliphatiques)
- des amines primaires, secondaires ou tertiaires
- des carbonyles (cétones ou quinones)

Ce sont ces groupements fonctionnels qui confèrent leurs propriétés physico-chimiques aux AH [84].

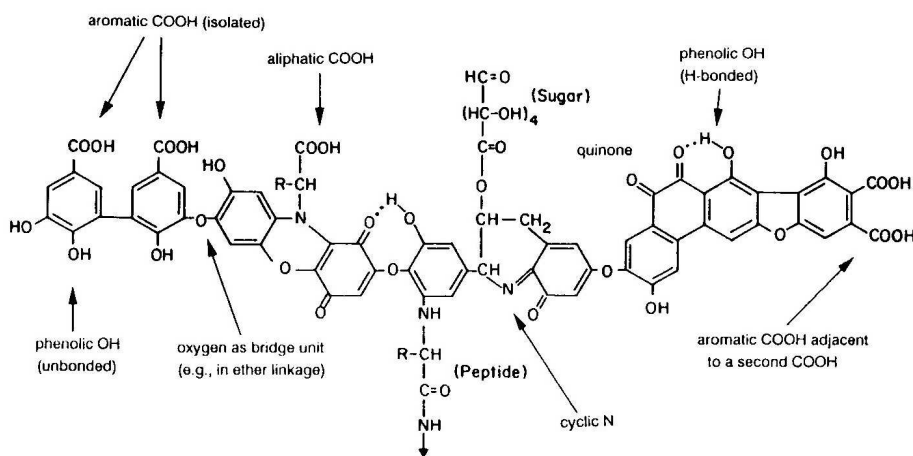


FIGURE 8.6. Structure hypothétique des AH. [84]

Le pouvoir tamponnant des AH est très puissant. Ceux-ci peuvent maintenir les sols dans une gamme de pH limitée, la plupart du temps, optimale pour la croissance des plantes. Ce phénomène est dû au grand nombre de fonctions acide carboxylique et hydroxyle contenues dans ces substances, qui leur confèrent une très forte capacité d'échange de protons à un pH proche du neutre (figure 8.7).

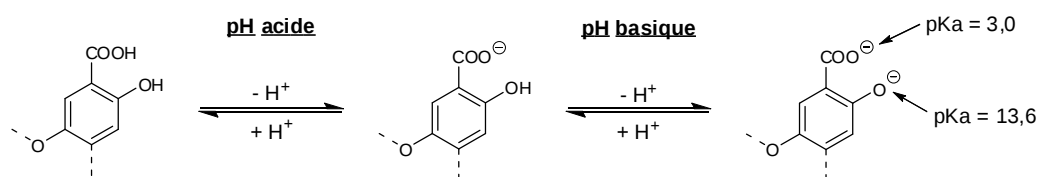


FIGURE 8.7. Modèle simplifié de l'influence du pH sur la structure des AH [84].

Les nombreux groupes fonctionnels sont également d'une importance majeure dans les propriétés colloïdales des AH en solution, qui s'avèrent être fortement dépendantes du pH. En effet, en solution neutre et alcaline, les particules sont dans un état étiré, en raison des répulsions électroniques entre les charges négatives (COO^-). En revanche, une contraction est observée à de faibles pH, allant jusqu'à l'agrégation à des pH très acides. Ceci s'explique par la diminution des répulsions électroniques, et la formation de nouvelles interactions intra-moléculaires, de type liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes [85].

Enfin, la structure des acides humiques est impliquée dans l'adsorption de petites molécules organiques, via de très nombreuses interactions (liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals, liaisons ioniques, interactions hydrophobes, π -stacking...). Parfois, les acides humiques peuvent même réagir chimiquement avec des molécules organiques, et sont la cause de la dégradation de ces dernières dans les sols [86].

Effet des acides humiques sur la vitesse de dégradation du NBPT

Des AH, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 8.1, ont été fournis par la société Timac Agro de Pampelune (Espagne).

TABLEAU 8.1. Caractéristiques structurales des AH utilisés pour les tests de stabilisation du NBPT.

Carbones aliphatiques	28-32 %
Carbones O-alkyliques	9-20 %
Carbones aromatiques	16-31 %
Carbones phénoliques	9-13 %
Carbones carbonyliques	16-26 %
Degré d'aromaticité	0,52-1,04
Rapport $C_{\text{Hydrophobe}}/C_{\text{Hydrophile}}$	1,16-3,06
Acidité totale	5-10 meq/g C
Pourcentage de carbone organique	2,81 %

Un test préliminaire de dégradation du **NBPT** en présence d'un très large excès de ces AH a tout d'abord été réalisé (figure 8.8). L'effet du pouvoir tamponnant des acides humiques est visible sur les résultats de ce test. En effet, malgré la forte concentration du tampon acide utilisé, le pH de la solution contenant les AH a augmenté jusqu'à devenir basique, ce qui explique la diminution de la cinétique de dégradation du **NBPT** observée ici.

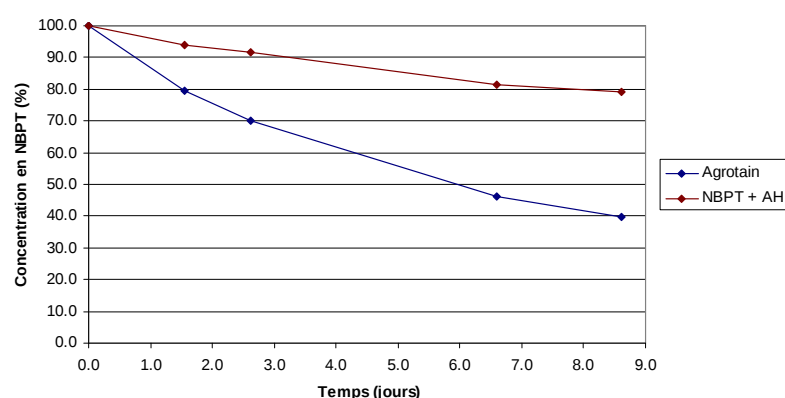


FIGURE 8.8. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'un large excès d'acides humiques.

Une expérience supplémentaire a été réalisée sur des mélanges de différences ratios massiques $C_{\text{orga}}(\text{AH})/\text{NBPT}$ (figure 8.9). Après mise en solution du **NBPT** avec les acides humiques, les mélanges n'ont pas été acidifiés à l'aide d'une solution tampon, mais par l'intermédiaire d'une résine échangeuse d'ions chargée en protons, jusqu'à obtention d'un pH 5,5. Ainsi, les AH devraient piéger les molécules adsorbées en se rétractant.

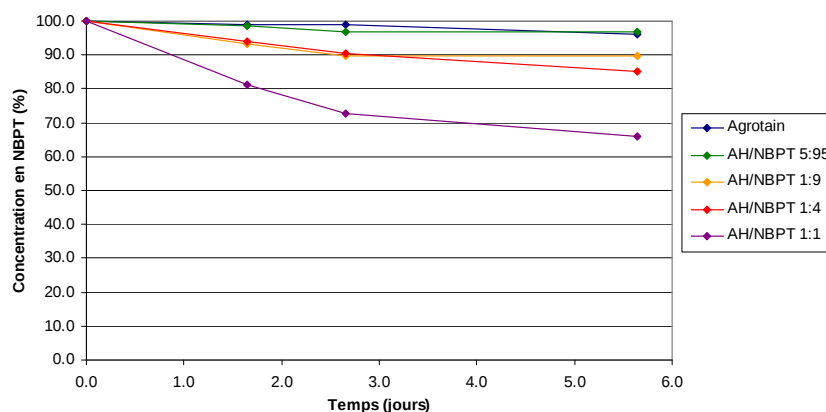


FIGURE 8.9. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide non tamponné en présence d'acides humiques introduits à différents ratios $C_{orga}(AH)/NBPT$.

Une différence significative a tout d'abord été observée sur le mélange témoin : la dégradation est bien plus lente qu'en présence d'une solution tampon. En effet, l'hydrolyse acide du **NBPT** s'accompagne de la libération de *n*-butylamine dans le milieu, qui capte alors les protons et neutralise le pH. La variation de pH due à ce phénomène est négligeable lors de l'utilisation d'une solution tampon fortement concentrée. Mais il est largement visible dans le cas présent. La quantité d'AH apportée dans le mélange a une forte influence sur la cinétique de dégradation du **NBPT**. Lorsqu'une très faible quantité est apportée (ratio $C_{orga}(AH)/NBPT$ 5:95), aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin. En revanche, à partir d'un ratio $C_{orga}(AH)/NBPT$ 1:9, la vitesse de dégradation du **NBPT** augmente avec la proportion en AH. Deux hypothèses peuvent être apportées pour expliquer ce phénomène :

- Le potentiel neutralisant de la *n*-butylamine relarguée est contrebalancé par le pouvoir tamponnant des AH. Plus la quantité d'AH est élevée, moins le pH augmente au fur et à mesure de la dégradation du **NBPT**.
- Plus la quantité en AH est importante, plus ils peuvent potentiellement adsorber de **NBPT**. Ces derniers, piégés dans la substance humique acidifiées se trouveraient à proximité de sites acides auxquels ils sont sensibles et se dégraderaient donc plus rapidement.

Des expérimentations sur les sols ont par la suite été réalisées. Un mélange de type AH/**NBPT** de ratio $C_{orga}(AH)/NBPT$ 1:1 a été préparé et envoyé à l'INRA de Caen où des tests d'inhibition des uréases dans les sols ont été réalisés (figure 8.10). Dans les sols alcalins comme dans les sols acides, nous n'observons pas de prolongation de l'effet du **NBPT** dans le temps. Dans les deux cas, il apparaît même une diminution significative de l'efficacité de l'inhibiteur. Par comparaison avec les résultats obtenus lors de la seconde expérimentation *in vitro*, nous pouvons supposer que cette diminution d'activité est liée à une dégradation plus rapide du **NBPT** en présence d'acides humiques.

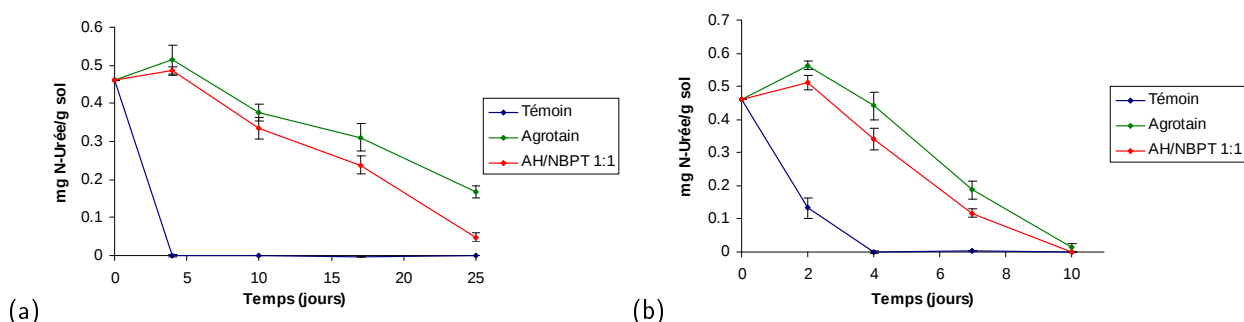


FIGURE 8.10. Activité uréique de la formulation AH/**NBPT** de ratio $C_{orga}(AH)/NBPT$ 1:1 (a) en sol alcalin et (b) en sol acide.

Introduits dans des sols acides, les groupes fonctionnels des acides humiques se protonnent et retrouvent alors un caractère acide. De ce fait, le pouvoir tamponnant de cette substance ne suffit pas à maintenir un environnement neutre ou basique autour du **NBPT**. En revanche, il est probable que les acides humiques interagissent avec le **NBPTO**, ou même, qu'ils participent à sa dégradation dans les sols acides (figure 8.11).

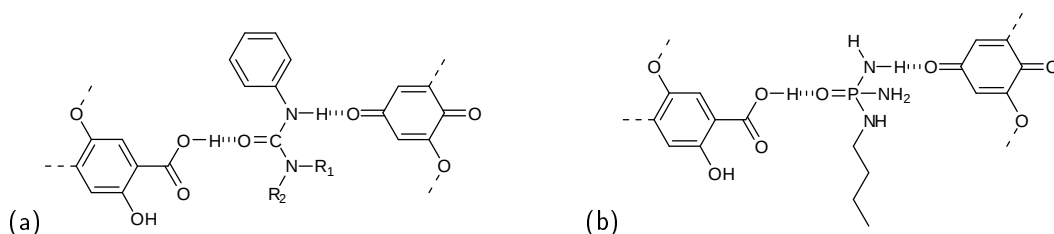


FIGURE 8.11. (a) Interactions impliquées lors de l'adsorption des urées substituées sur les acides humiques [86]. (b) Estimation des interactions possibles lors de l'adsorption supposée du **NBPTO** sur les acides humiques.

Ces résultats montrent que le pH des sols, bien que le plus important, n'est pas le seul facteur influent sur la dégradation de l'inhibiteur. La composition des sols, notamment le taux de matière organique a également un effet visible. En l'occurrence, nous pouvons supposer que la longévité du **NBPT** diminue avec la richesse en humus du sol.

8.3. Stabilisation par des polysaccharides

Dans une chaîne polysaccharidique, chaque monomère, en libre rotation autour de la liaison glycosidique, tend à adopter l'orientation de plus basse énergie. Une chaîne polysaccharidique adopte dès lors une structure géométrique dans l'espace, par exemple en rubans, en hélices, ou aléatoire, qui constitue sa structure secondaire. Plusieurs chaînes polysaccharidiques peuvent également interagir entre elles pour former la structure tertiaire. Il en résulte tout un réseau de chaînes, par endroits organisé, par endroits désordonné, appelé la structure quaternaire. Ces organisations confèrent aux polysaccharides des propriétés particulières, qui leurs valent de nombreuses applications, notamment en agro-alimentaire [27].

Nous avons imaginé des formulations hydrosolubles à base de polysaccharides, en utilisant les propriétés structurales de ces derniers pour encapsuler le NBPT. Par exemple, il serait envisageable que certains polysaccharides de structure hélicoïdale soient capables de s'enrouler autour de l'inhibiteur. Nous avons donc mené des expérimentations à partir de divers polysaccharides.

8.3.1. Polysaccharides algaux

La production de polysaccharides par les algues surpasse largement celle des végétaux supérieurs. Outre leur fonction de réserve d'énergie, ces biopolymères ont également des fonctions structurales pour la construction des tissus flexibles et visqueux des algues, des fonctions de rétention d'eau et même des propriétés d'échanges d'ions [72]. Les polysaccharides algaux occupent une place de choix parmi les biopolymères utilisés en industrie.

Les agar, les carraghénanes

Les carraghénanes sont des polysaccharides présents dans les algues rouges (*Rhodophyceae*). Les polysaccharides de la famille des carraghénanes ont la particularité de porter des groupements sulfates. Ils sont la répétition linéaire d'un enchaînement de deux monomères sulfatés : un β -D-galactopyranose de conformation 4C_1 lié en (1 $\rightarrow$ 4) à un 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose de conformation 1C_4 lié en (1 $\rightarrow$ 3). Tandis que les κ -carraghénanes portent un groupement sulfate par unité répétitive, positionné sur le C-4 du résidu β -D-galactose (figure 8.12.a), les ι -carraghénanes possèdent deux groupements sulfate par unité répétitive, sur le C-4 du β -D-galactose et sur le C-2 du 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose (figure 8.12.b). Ces deux polysaccharides s'organisent en doubles hélices.

Les λ -carraghénanes sont la répétition d'un résidu β -D-galactopyranose sulfaté en C-2, suivi d'un résidu α -D-galactopyranose sulfaté en C-2 et C-6, liés alternativement en (1 $\rightarrow$ 4) et (1 $\rightarrow$ 3). Tous les monomères sont de conformation 4C_1 (figure 8.12.c). Il en résulte une structure tertiaire en rubans [28].

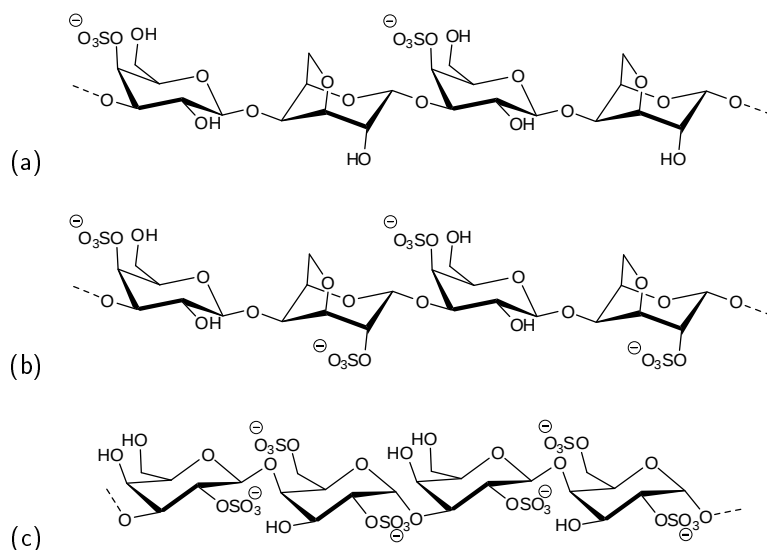


FIGURE 8.12. Structures primaires (a) des κ -carraghénanes, (b) des ι -carraghénanes et (c) des λ -carraghénanes.

Le suivi par RMN ^{31}P de dégradation du **NBPT** en milieu acide tamponné a été réalisé en présence d'une saturation de κ -, ι - et λ -carraghénanes (figure 8.13). **Cependant, malgré leurs structures tertiaires remarquables, aucun de ces polysaccharides n'a induit d'effet protecteur.**

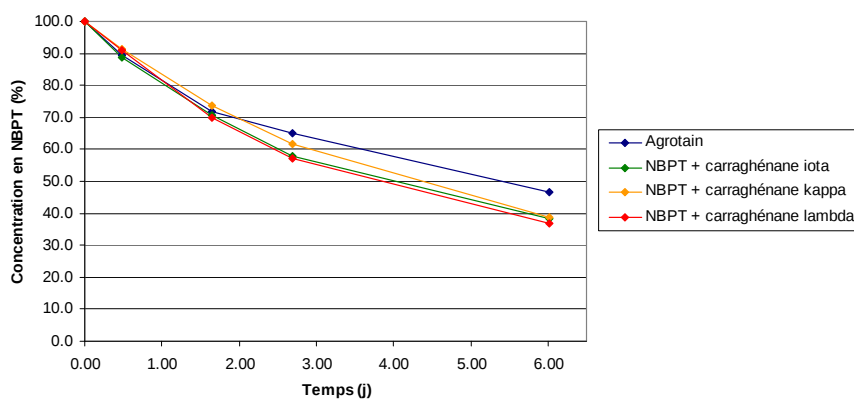


FIGURE 8.13. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'une saturation de carraghénanes.

Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides extraits des algues brunes (*Phaeophyceae*). L'alginate est la forme basique de l'acide alginique, copolymère non branché de résidus acide β -D-mannuronique (M) et acide α -L-guluronique (G) liés en (1 $\rightarrow$ 4) (figure 8.14). L'alginate de sodium, dont les groupements acides uroniques sont sous la forme de sels de sodium ($-\text{COONa}$), est très hydrosoluble.

La chaîne polymérique des alginates est structurée en blocs :

- les blocs M constitués exclusivement d'acides mannuroniques
- les blocs G constitués exclusivement d'acides guluroniques
- les blocs GM, plus rares, composés d'un mélange entre les deux types de monomères.

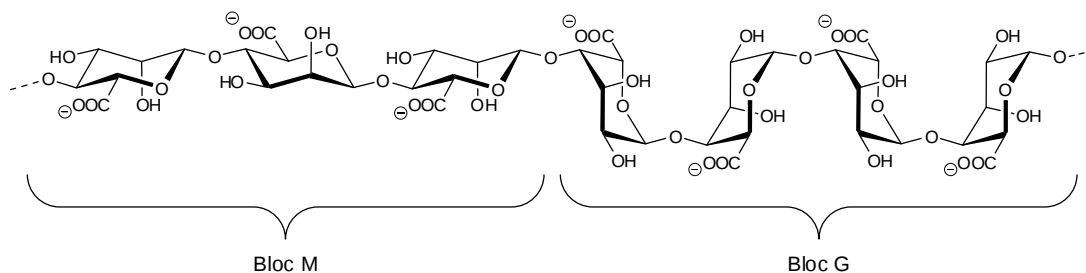


FIGURE 8.14. Structure primaire des alginates.

Les propriétés structurales particulières des alginates viennent de la conformation des monomères. En effet, les acides β -D-mannuroniques sont de conformation 4C_1 tandis que les acides α -L-guluroniques sont en 1C_4 . Il en résulte la formation de cavités caractéristiques dans les blocs G, qui peuvent accueillir des cations divalents (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ...). Ainsi, en présence de sels de calcium, les chaînes polysaccharidiques des blocs G se rassemblent autour des ions, créant alors un réseau de chaînes entrecroisées, qui se traduit par la formation d'un gel (figure 8.15) [28]. Cette propriété donne aux billes d'alginate de calcium un intérêt particulier dans le cas du **NBPT**.

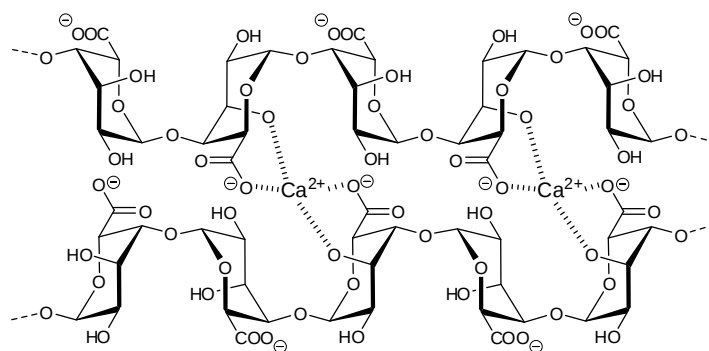
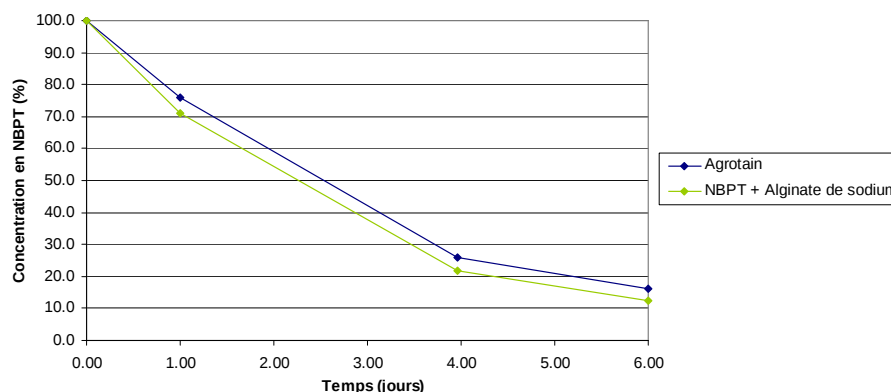


FIGURE 8.15. Structure tertiaire en boîte-à-œufs

Un suivi par RMN ${}^{31}\text{P}$ de la dégradation du **NBPT** en milieu acide tamponné a tout d'abord été réalisé en présence d'une solution aqueuse saturée en alginate de sodium (figure 8.16). **Cependant, les courbes correspondant au test et au témoin se suivent sans différence significative, montrant l'absence d'effet protecteur dans le cas de ce polysaccharide.**

FIGURE 8.16. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'une saturation en alginate de sodium.

Avant d'envisager le même test sur les alginates de calcium, il est nécessaire d'évaluer la capacité des billes à encapsuler le **NBPT**. Pour cela, des billes d'alginates ont été formées par introduction, goutte à goutte, d'une solution à 1 % massique en alginate de sodium et 0,2 M de **NBPT** dans une solution à 2 % massique en carbonate de calcium. Ces billes ont été rincées et placées dans de l'eau distillée. Le relargage du **NBPT** a été dosé par spectrométrie UV à 238 nm.

Lors de la production de 1 mL de billes d'alginates, 0,2 mmol de **NBPT** ont été introduites. Cependant, 33 % du **NBPT** ont d'ores et déjà été perdus dans la solution de calcium. Il est probable qu'une partie ait également été perdue dans l'eau de rinçage. Le relargage du **NBPT** a été quantifié dès la mise en solution de 1 mL de billes d'alginates dans 2 mL d'eau distillée (Figure 8.17.a). Un relargage rapide a été observé, et au bout de seulement 20 minutes, la concentration de **NBPT** a atteint un palier à environ 30 mM. Les billes ont alors été retirées et de nouveau placées dans 2 mL d'eau distillée (Figure 8.17.b). De nouveau, un palier a été atteint au bout de 20 minutes, qui tend vers une concentration finale de environ 10 mM. Il semble donc que le relargage ait lieu jusqu'à l'obtention d'un équilibre de concentration entre l'intérieur et l'extérieur des billes. De plus ce relargage est très rapide. Cette expérience montre que les billes d'alginates ne retiennent pas le **NBPT**, et ne peuvent donc pas être utilisées pour de l'encapsulation.

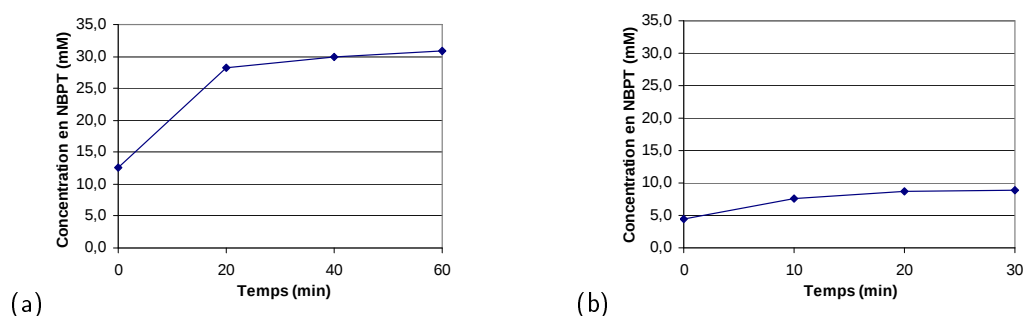


FIGURE 8.17. (a) Suivi du relargage du **NBPT** contenu dans les billes d'alginates lors de la mise en solution de 1 mL de billes d'alginate dans 2 mL d'eau distillée. (b) Suivi du relargage du **NBPT** contenu dans les mêmes billes d'alginate après remplacement des 2 mL d'eau distillée.

Les carraghénanes, comme les alginates sont des polysaccharides ioniques. Cette particularité leur confère leur hydrosolubilité et participe largement à la stabilisation de leur structure secondaire particulière. Cependant, le **NBPT** est une molécule faiblement hydrosoluble, qui possède une chaîne aliphatique hydrophobe. L'absence d'interactions entre le **NBPT** et ces polysaccharides très polaires n'est donc pas surprenante. Nous nous sommes alors tournés vers des polysaccharides neutres.

les agars et les laminarines

Les agars sont des polysaccharides présents dans les algues rouges (*Rhodophyceae*). La structure primaire des agars est très proche de celle des κ - et ι -carraghénanes. Ils sont la répétition linéaire d'un enchaînement de deux monomères : un β -D-galactopyranose de conformation 4C_1 lié en (1 $\rightarrow$ 4) à d'un 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose de conformation 1C_4 lié en (1 $\rightarrow$ 3) (figure 8.18). Des groupements méthyle peuvent apparaître sur le β -D-galactose en position C-6 et en position C-2 sur le 3,6-anhydro- α -L-galactose. En solution, ce polysaccharide s'organise en double hélice, plus compacte que chez les κ -carraghénanes et les ι -carraghénanes, stabilisée par la formation de liaisons hydrogène entre les hydroxyles.

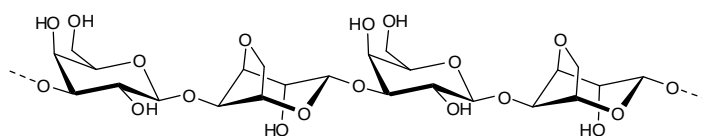


FIGURE 8.18. Structures primaires des agars.

La laminarine, extraite des algues brunes est un polysaccharide linéaire constitué d'unités β -D-glucopyranoses liées en (1 $\rightarrow$ 3) (figure 8.19). Quelques liaisons en (1 $\rightarrow$ 6) peuvent parfois apparaître. Ce polymère est hydrosoluble et possède une structure tertiaire en triple hélice [105, 60].

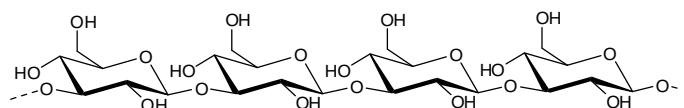
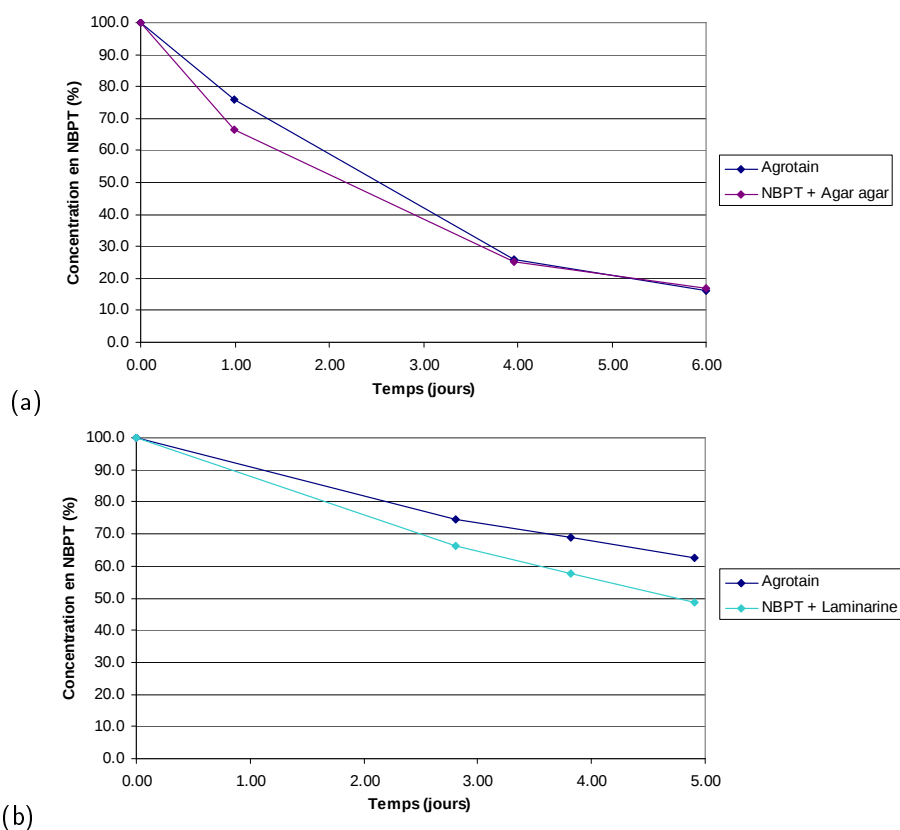


FIGURE 8.19. Structure primaire des laminarines.

Le suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide a été réalisé en présence d'une saturation d'agar-agar et de laminarine (figure 8.20). Une fois encore, aucun effet protecteur n'est visible sur les graphiques.

FIGURE 8.20. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'une saturation (a) d'agar agar et (b) de laminarine.

8.3.2. Amidon

L'amidon est le polysaccharide hydrosoluble le plus disponible. Présent dans de nombreux végétaux supérieurs, l'amidon est une réserve énergétique pour les plantes, mais également un constituant essentiel de l'alimentation humaine. Il est habituellement extrait des graines de céréales ou des pommes de terre. Ce polymère de glucose est essentiellement composé d'amylose et d'amylopectine, dont les proportions varient selon la source d'extraction.

L'amylose est un polymère linéaire, composé de résidus α -D-glucopyranose liés en (1 $\rightarrow$ 4) (figure 8.21.a). Les nombreux hydroxyles présents sur ce polymère lui attribuent un caractère hydrophile. Cependant, ces chaînes linéaires ont tendance à s'orienter parallèlement les unes aux autres et à s'associer à l'aide de liaisons hydrogène, ce qui a pour effet de réduire leur hydrosolubilité. L'amylose en solution est connu pour s'enrouler en hélice autour

de l'iode, des lipides, des tensioactifs, et de certaines molécules organiques. Il en résulte la formation d'un complexe d'inclusion [46].

L'amylopectine est un polysaccharide fortement ramifié, constitué de résidus α -D-glucopyranoses liés en (1 $\rightarrow$ 4) (figure 8.21.b). Les ramifications sont issues de liaisons α -(1 $\rightarrow$ 6). Étant donné son fort poids moléculaire et son grand nombre de ramifications, l'amylopectine est très peu mobile et contribue à la faible hydrosolubilité de l'amidon. Les ramifications de l'amylopectine ont tendance à s'organiser en double hélice. Certaines de ces doubles hélices peuvent même se rassembler en clusters organisés.

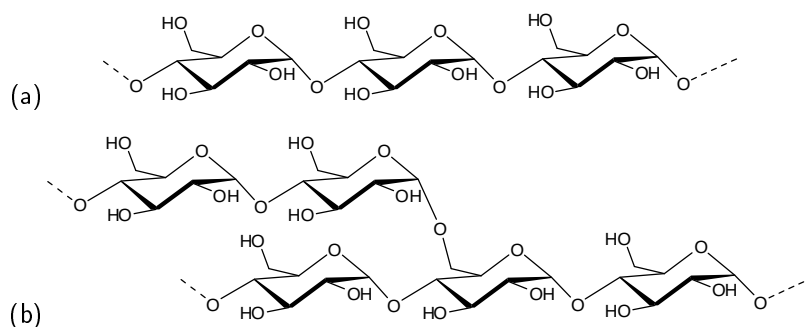


FIGURE 8.21. Structure primaire de (a) l'amylose et de (b) l'amylopectine

A cause de leur structure ordonnée, les granulés d'amidon sont insolubles dans l'eau froide. Mais agités dans l'eau bouillante, la structure de l'amidon se désordonne irréversiblement, et le caractère hydrophile des chaînes polysaccharidiques augmente. De l'empois d'amidon est alors formé [29].

Le suivi de la dégradation du **NBPT** a été réalisé en milieu acide, en présence d'un large excès d'empois d'amidon commercial de source indéterminée (Figure 8.22). Cette fois, une diminution de la vitesse de dégradation par rapport au témoin a été observée, qui laisse supposer une interaction bénéfique entre le polymère et la molécule.

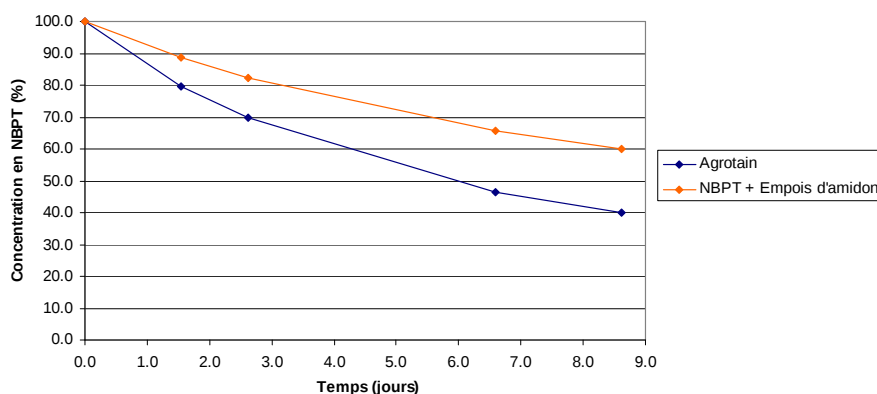


FIGURE 8.22. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'un large excès d'empois d'amidon.

Ce premier essai étant positif, il a été envisagé de prolonger l'étude vers des amidons de sources connues (blé, maïs, riz et pomme de terre), qui se différencient par leur pourcentage en amylose et amylopectine. Ces amidons, insolubles dans l'eau ont été déstructurés au laboratoire par mise en solution, chauffage à 100°C et agitation pendant 3 minutes. Cependant, lors de cette seconde expérience, les courbes relatives à la dégradation du **NBPT** en présence de diverses sources d'amidon se confondent avec le témoin (figure 8.23.a). Il n'y a donc pas d'effet protecteur dans ce cas. L'amylose seul a également été évalué en raisons de ses propriétés structurales, mais ne présente pas plus d'effet (figure 8.23.b).

Seul l'empois d'amidon testé initialement a montré un effet protecteur. Cela pourrait être dû à une meilleure déstructuration, générant une importante hydrosolubilité. Ainsi, il a été possible d'en introduire une bien plus grande

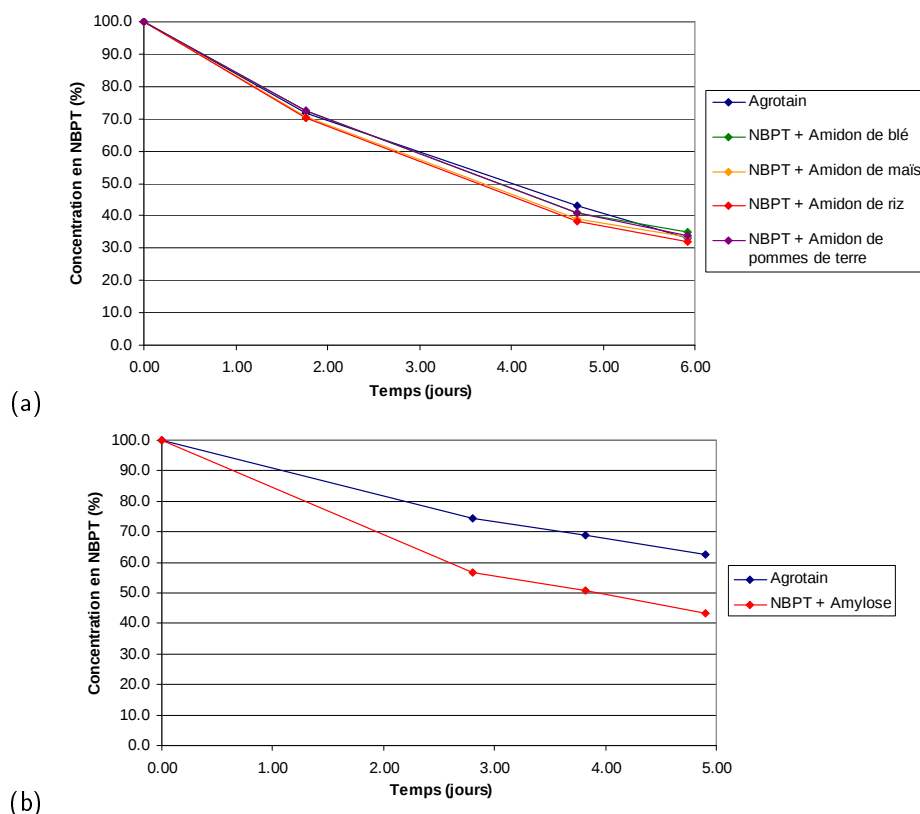


FIGURE 8.23. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'une saturation (a) d'amidons de différentes sources et (b) d'amylose.

quantité lors du test. Pour mieux désordonner la structure des amidons au laboratoire, il aurait été préférable de les agiter pendant plusieurs heures dans l'eau bouillante. L'hypothèse de départ a tout de même été vérifiée : il peut exister une interaction entre le **NBPT** et un polysaccharide.

8.4. Stabilisation par des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques pouvant comporter 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose (respectivement les α -, β - et γ -cyclodextrines) liées entre elles en (1 $\rightarrow$ 4) (figure 8.24). Elles sont produites à partir de l'amidon par voie enzymatique [23]. Leur particularité réside dans leur structure. Ce sont des molécules-cages qui ont la propriété d'encapsuler diverses molécules apolaires. Elles sont couramment utilisées comme telles pour la conception de formulations dans l'industrie pharmaceutique [74], en agro-alimentaire ou dans le domaine phytosanitaire [79].

Une cyclodextrine forme une couronne possédant en son centre une cavité apolaire hydrophobe, tandis que l'extérieur de la molécule, riche en groupements hydroxyle, lui confère son caractère hydrosoluble. En solution aqueuse, le micro-environnement lipophile présent dans la cavité permet la formation d'interactions de type Van der Waals entre la cage et les molécules hydrophobes du milieu. Si la taille de la cyclodextrine et celle de la ou des molécules hôtes sont en adéquation, il se forme un complexe d'inclusion plus ou moins stable permettant la solubilisation en phase aqueuse de molécules très hydrophobes. Ces dernières sont alors en équilibre dynamique entre leur état libre et leur état complexé, défini par la constante d'association du complexe d'inclusion.

Supposant la possibilité d'une interaction entre le **NBPT** et une cyclodextrine, nous avons souhaité développer une formulation à base de cet oligosaccharide. Le **NBPT**, molécule hydrophobe, pourrait être encapsulé au cœur de la molécule cyclique, l'isolant partiellement du milieu acide environnant.

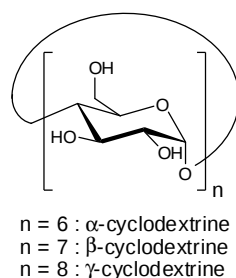
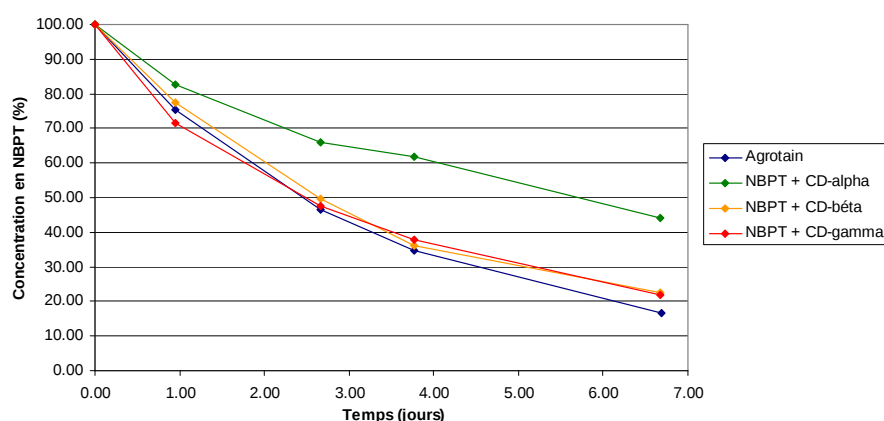


FIGURE 8.24. Structure des cyclodextrines.

8.4.1. Optimisation de la formulation

Choix de la cyclodextrine appropriée

La cyclodextrine doit être de taille adéquate pour permettre l'encapsulation du **NBPT**. Le suivi de la dégradation du **NBPT** en milieu acide tamponné a été effectué pour des solutions aqueuses saturées en α -, β - ou γ -cyclodextrines ($CD\alpha$, $CD\beta$ et $CD\gamma$). (Figure 8.25).

FIGURE 8.25. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence d'une saturation en cyclodextrines de différentes tailles de cavité.

Les courbes de dégradation du **NBPT** en présence $CD\beta$ ou de $CD\gamma$ coïncident avec celle de l'Agrotain. En présence de ces deux cyclodextrines, aucune diminution de la cinétique de dégradation du **NBPT** n'est visible. Leur taille ne semble pas adaptée à la formation d'un complexe d'inclusion. En revanche, l'hydrolyse acide du **NBPT** en présence de $CD\alpha$ est significativement ralentie, ce qui témoigne d'une interaction probable entre les deux molécules. Ceci laisse supposer que la taille de la $CD\alpha$ est adaptée à l'inclusion du **NBPT**, ce qui reste à vérifier.

Recherche du ratio optimal

La $CD\alpha$ semble protéger le **NBPT**, mais quelle proportion entre les deux entités est nécessaire pour obtenir un effet maximal? Étant donné la petite taille du **NBPT**, il serait peu judicieux d'envisager la formation d'un complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** de ratio molaire 2:1 ou plus. En revanche, il ne semble pas impossible de pouvoir encapsuler plusieurs molécules de **NBPT** dans une seule cavité. De ce fait, seuls les complexes d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** de ratios 1:1 à 1:3 ont été jugés suffisamment probables. Un test de stabilité en milieu acide tamponné a donc été mené sur des mélanges $CD\alpha$ /**NBPT** de proportions molaires 1:1 à 1:3 (Figure 8.26).

L'effet protecteur de la $CD\alpha$ sur le **NBPT** dépend manifestement des quantités relatives entre la molécule hôte et invité. D'après les résultats, la formulation de ratio $CD\alpha$ /**NBPT** 1:3 se dégrade plus vite que la formulation de ratio 1:2, qui elle-même est plus fragile que la formulation de ratio équimolaire. L'augmentation du nombre

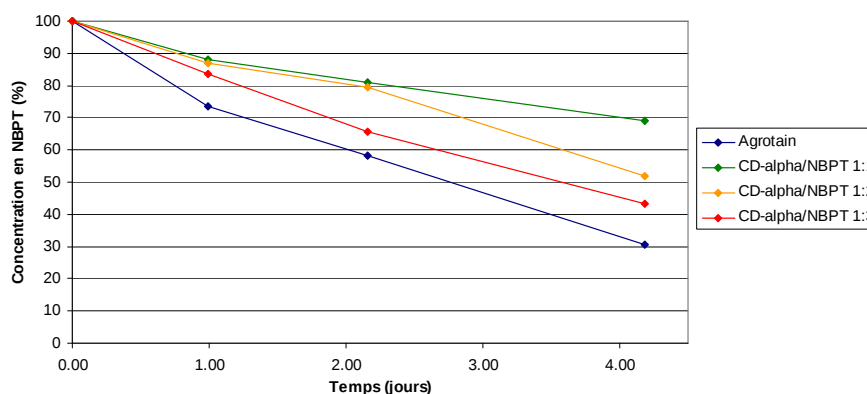


FIGURE 8.26. Suivi de dégradation du **NBPT** en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) en présence de différents ratio $CD\alpha$ /**NBPT**.

d'équivalents de **NBPT** par rapport à la $CD\alpha$ augmente la vitesse de dégradation en milieu acide de façon notable, ce qui peut concorder avec la présence croissante de **NBPT** libre dans le milieu. De ce fait, le ratio 1:1 correspond probablement au ratio d'un complexe d'inclusion. Cette hypothèse doit cependant être vérifiée par la mise en évidence et la caractérisation du complexe supposé.

8.4.2. Caractérisation de la formulation retenue

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence la formation d'un complexe d'inclusion. Certaines propriétés physico-chimiques varient en fonction des interactions hôte-invité, comme le spectre IR [36], le spectre UV-visible [69, 43], la tension de surface [21] ou les déplacements chimiques en RMN du proton [37]. L'étude et la quantification de ce type de variations fournissent de nombreuses informations sur la structure du complexe d'inclusion et conduisent notamment au ratio et à la valeur de la constante d'association.

Mise en évidence d'interactions cyclodextrine/**NBPT**

Dans le cas où un complexe d'inclusion serait formé, l'environnement proche des protons de la cyclodextrine et de la molécule invitée ne serait pas le même que lorsque ces molécules sont libres en solution. Des variations de déplacements chimiques devraient alors être observées par RMN 1H . Les déplacements chimiques observés sur le spectre RMN 1H d'un mélange $CD\alpha$ /**NBPT** de ratio 1:1 dans le D_2O sont différents de ceux des protons correspondants dans des mélanges de proportions différentes (figure 8.27). Ces variations sont observées de façon flagrante sur les protons du **NBPT**, mais également sur certains protons de la $CD\alpha$ de façon plus discrète. **Il se forme donc un complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** que nous avons par la suite cherché à caractériser.**

Détermination du ratio du complexe (Méthode de "Job's Plot")

Il est possible de déterminer le ratio d'un complexe d'inclusion par la méthode de "Job's plot" qui peut s'adapter à des mesures par RMN 1H [62]. La méthode de "Job's plot" se base sur le fait que les variations de déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des protons de l'hôte ($CD\alpha$) et de l'invité (**NBPT**) sont directement reliées à la concentration en complexe. En particulier, lorsque l'on observe les variations d'un proton de l'une des deux entités X dans un mélange de ratio r_X , la valeur calculée $\Delta\delta_X \cdot r_X$ est proportionnelle à la concentration en complexe formé. Cette concentration est à son maximum lorsque le ratio du mélange correspond à celui du complexe d'inclusion. Il est alors possible de tracer $\Delta\delta_X \cdot r_X$ en fonction de r_X pour déterminer le ratio du complexe d'inclusion à partir du maximum de la courbe obtenue.

Afin de déterminer le ratio du complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT**, des mélanges de **NBPT** et de $CD\alpha$ ont été préparés dans D_2O , de manière à avoir un ratio molaire en **NBPT** (r) différent pour chaque solution, tout en gardant la même concentration totale en molécules. Ces mélanges ont ensuite été analysés par RMN du proton et comparés avec les spectres des molécules pures. Le graphique Job a pu être tracé (figure 8.28).

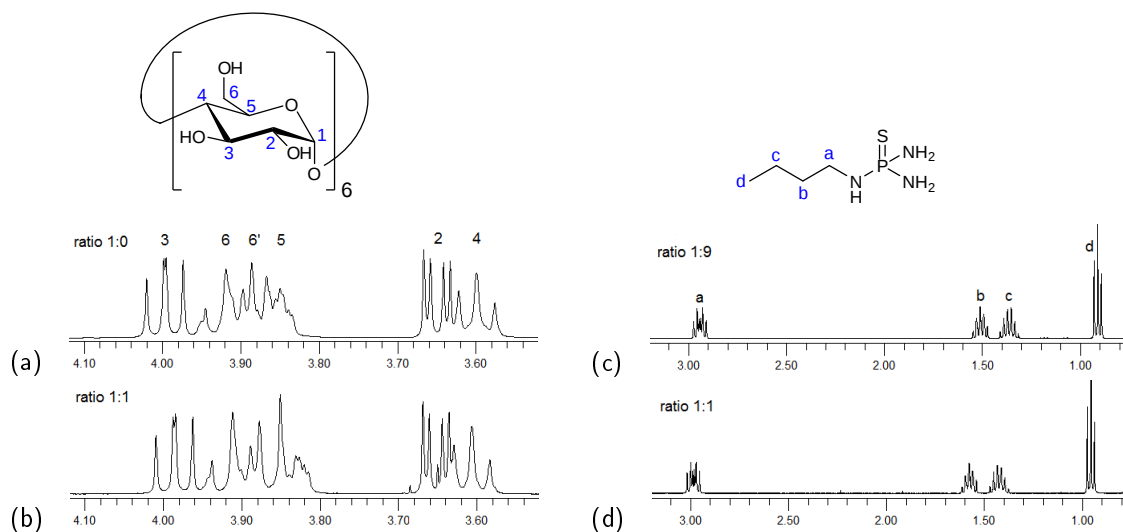


FIGURE 8.27. Mise en évidence des variations de déplacement chimiques entre différents mélanges $CD\alpha/NBPT$: (a) Spectre RMN 1H partiel de la $CD\alpha$ pure (b). Spectre RMN 1H partiel d'un mélange $CD\alpha/NBPT$ 1:1. (c) Spectre RMN 1H partiel d'un mélange $CD\alpha/NBPT$ 1:9. (d) Spectre RMN 1H partiel d'un mélange $CD\alpha/NBPT$ 1:1.

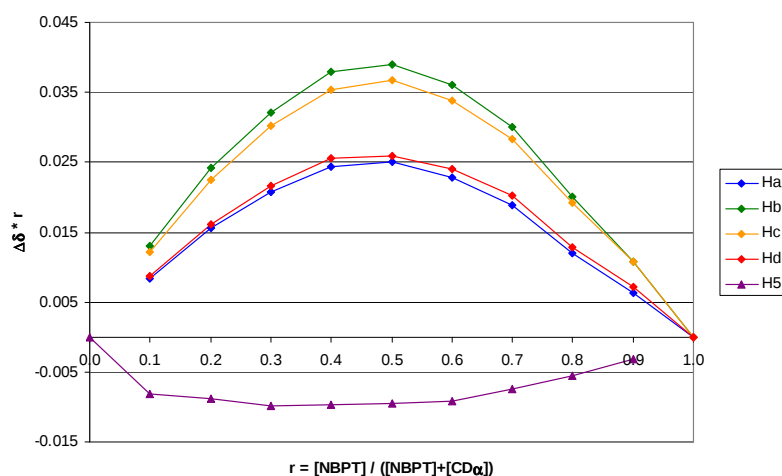


FIGURE 8.28. Recherche du ratio du complexe d'inclusion $CD\alpha/NBPT$ par la méthode de Job's plot

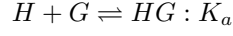
Le tracé des courbes concernant la cyclodextrine est imprécis en raison d'une trop faible amplitude de variation de ses déplacements chimiques. En revanche, les courbes relatives aux protons du NBPT sont très régulières. Le maximum est atteint pour $r = 0,5$ ce qui correspond à un complexe d'inclusion de ratio 1:1. La cavité de la $CD\alpha$ est donc capable d'abriter une et une seule molécule de NBPT.

Mesure de la constante d'association (méthode de Benesi-Hildebrand)

La formation d'un complexe d'inclusion se caractérise également par un équilibre dynamique entre les formes libre et complexée des molécules mises en jeu. Cet équilibre est quantifiable à travers la constante d'association du complexe, qui peut se mesurer par différentes méthodes.

La méthode de Benesi-Hildebrand [13] a été à l'origine développée pour les études par spectroscopie UV, mais a été par la suite adaptée pour les mesures par RMN. Les équations sont développées à partir de l'équilibre énoncé

ci-dessous :



où H correspond à l'hôte ($CD\alpha$), G correspond à l'invité (**NBPT**) et HG correspond au complexe d'inclusion.

La constante d'association (K_a) s'exprime alors suivant l'expression (8.1) en fonction des concentrations des espèces présentes dans le milieu ($[H]$, $[G]$ et $[HG]$). Par ailleurs, le déplacement chimique observé en RMN pour un proton donné de la molécule invitée (δ_{obs}) peut s'exprimer, suivant l'expression (8.2), sous la forme d'un barycentre entre le déplacement chimique de ce proton dans la molécule libre (δ_G) et dans la molécule complexée (δ_{HG}).

$$K_a = \frac{[HG]}{[H].[G]} \quad (8.1)$$

$$\delta_{obs} = \frac{[G].\delta_G + [HG].\delta_{HG}}{[G] + [HG]} \quad (8.2)$$

Il est alors possible de développer de ces deux équations, en les associant aux équations de conservation de la matière (8.3) et (8.4) qui prennent en considération les quantités initialement introduites en molécules hôte et invitée ($[H]_0$ et $[G]_0$). Il en résulte l'expression (8.5).

$$[G] = [G]_0 - [HG] \quad (8.3)$$

$$[H] = [H]_0 - [HG] \quad (8.4)$$

$$\frac{1}{K_a} = [H]_0 \cdot \frac{\delta_{HG} - \delta_G}{\delta_{obs} - \delta_G} - [H]_0 - [G]_0 + [G]_0 \cdot \frac{\delta_{obs} - \delta_G}{\delta_{HG} - \delta_G} \quad (8.5)$$

En se plaçant dans les conditions de Benesi-Hildebrand, telles que la quantité introduite en molécule hôte est très supérieure à celle de la molécule invitée ($[H]_0 \gg [G]_0$), l'expression (7.5) se simplifie pour donner l'équation de Benesi-Hildebrand (8.6)

$$\frac{1}{\delta_{obs} - \delta_G} \simeq \frac{1}{K_a.[H]_0.(\delta_{HG} - \delta_G)} + \frac{1}{\delta_{HG} - \delta_G} \quad (8.6)$$

plus couramment exprimée sous la forme suivante :

$$\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} \simeq \frac{1}{K_a.[H]_0.\Delta\delta_{HG}} + \frac{1}{\Delta\delta_{HG}}$$

où $\Delta\delta_{obs}$ est la variation de déplacement chimique observée par rapport à la molécule invitée libre, et $\Delta\delta_{HG}$ la variation de déplacement chimique qui serait observée en présence d'un complexe d'inclusion pur.

D'après cette équation, le tracé de $\frac{1}{\Delta\delta_{obs}}$ en fonction de $\frac{1}{[H]_0}$ correspond à une droite qui coupe l'axe en $\frac{1}{\Delta\delta_{HG}}$ et dont la pente est $\frac{1}{K_a.\Delta\delta_{HG}}$.

Les méthodes de Scatchard et de Scott sont toutes deux des variantes graphiques de la méthode de Benesi-Hildebrand [37]. La première, basée sur l'équation (8.7) permet la mesure de K_a et de $K_a.\Delta\delta_{HG}$ à partir du tracé de $\frac{\Delta\delta_{obs}}{[H]_0}$ en fonction de $\Delta\delta_{obs}$. La seconde s'appuie sur l'équation (8.8) pour déterminer $\frac{1}{\Delta\delta_{HG}}$ et $\frac{1}{K_a.\Delta\delta_{HG}}$ grâce au tracé de $\frac{[H]_0}{\Delta\delta_{obs}}$ en fonction de $[H]_0$.

$$\frac{\Delta\delta_{obs}}{[H]_0} \simeq -K_a.\Delta\delta_{obs} + K_a.\Delta\delta_{HG} \quad (8.7)$$

$$\frac{[H]_0}{\Delta\delta_{obs}} \simeq \frac{1}{\Delta\delta_{HG}}.[H]_0 + \frac{1}{K_a.\Delta\delta_{HG}} \quad (8.8)$$

Il existe des cas où la méthode de Benesi-Hildebrand et ses variantes rencontrent leurs limites. Parfois, des problèmes de solubilité empêchent l'introduction d'un fort excès de l'une des espèces par rapport à l'autre. Dans ce cas, il est toujours possible d'appliquer la méthode de Rose-Drago [77]. Il est également possible d'étudier les complexes d'inclusion de ratio 1:2, mais dans ce cas, les calculs se compliquent énormément, et font intervenir l'utilisation de matrices [5]. Des programmes informatiques existent pour faciliter la mesure dans le cas où la méthode de Benesi-Hildebrand n'est pas applicable [78].

Le complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** étant de ratio 1:1, et aucun problème de solubilité n'ayant été rencontré, nous avons pu appliquer la méthode de Benesi-Hildebrand pour déterminer sa constante d'association. Différents mélanges, constitués d'une quantité fixe de **NBPT** et une quantité variable de $CD\alpha$ en fort excès (au moins 10 fois supérieure) ont été préparés. Ces mélanges ont été analysés par RMN du proton. Les spectres obtenus ont été comparés à ceux de la $CD\alpha$ et du **NBPT** purs afin de mesurer les variations de déplacements chimiques des différents protons et de tracer le graphique de Benesi-Hildebrand (figure 8.29). Les droites obtenues ont permis d'évaluer la constante d'association du complexe à 94 M^{-1} , soit sensiblement en faveur de la formation du complexe.

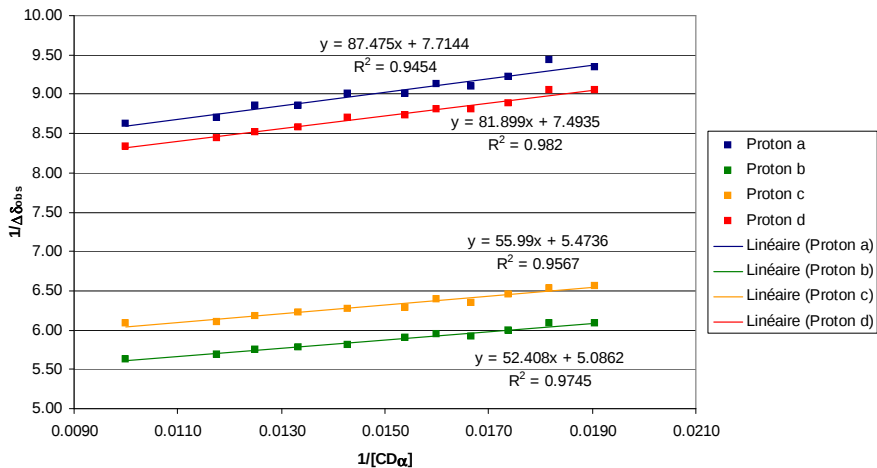
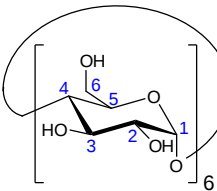
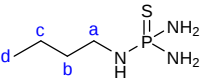


FIGURE 8.29. Recherche de la constante d'association du complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** par la méthode de Benesi-Hildebrand

Étude de la structure du complexe d'inclusion

L'étude du spectre RMN 1H du mélange de ratio 1:1 a pu apporter des informations sur la structure du complexe formé (tableau 8.2). En ce qui concerne le déplacement chimique des protons de la $CD\alpha$ (1 à 6'), la plus forte variation correspond au proton 5, soit celui qui est situé à l'intérieur de la cavité de la molécule hôte. Dans le cas du **NBPT**, les protons de la chaîne aliphatique (a à d) subissent tous une variation de déplacement chimique, en particulier ceux des deux carbones centraux b et c. L'interaction hôte/invité se situe donc entre le butyle du **NBPT** et l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine.

TABEAU 8.2. Déplacements chimiques des molécules libres et de leur équivalent complexé en RMN du proton.

	$CD\alpha$	multiplicité	$\delta\ CD\alpha\ pure\ (ppm)$	$\delta\ ratio\ 1 : 1\ (ppm)$	$\Delta\delta\ (ppm)$
	H ₁	d	5,070	5,070	$ \Delta\delta < 0,005$
	H ₂	dd	3,650	3,649	$ \Delta\delta < 0,005$
	H ₃	dd	3,997	3,987	-0,010
	H ₄	t	3,599	3,607	+0,007
	H ₅	td	3,850	3,831	-0,019
	H ₆	dd	3,932	3,925	-0,007
	H _{6'}	dd	3,892	3,883	-0,009
	NBPT	multiplicité	$\delta\ NBPT\ pur\ (ppm)$	$\delta\ ratio\ 1 : 1\ (ppm)$	$\Delta\delta\ (ppm)$
	H _a	dt	2,936	2,986	+0,050
	H _b	m	1,500	1,578	+0,078
	H _c	m	1,351	1,425	+0,074
	H _d	t	0,904	0,956	+0,052

Ce constat est confirmé par une expérience RMN complémentaire, le T-ROESY, qui met en évidence la proximité spatiale des protons, même lorsque ceux-ci ne sont pas liés de façon covalente (figure 8.30). Le spectre 2d obtenu montre clairement chacune des interactions inter-moléculaires existantes dans le complexe. Le proton 5 de la $CD\alpha$ est proche des 5 protons portés par les deux carbones terminaux de la chaîne aliphatique du **NBPT**. Le proton 3 de la $CD\alpha$, quant à lui, est situé à proximité de la totalité de la chaîne butyle, et plus particulièrement des atomes centraux (figure 8.30.a). Grâce à cette étude, il est possible d'estimer la conformation spatiale du complexe formé (figure 8.30.b). Ces estimations pourraient être confirmées à l'aide de logiciels de modélisation moléculaires, ou dans le cas où il est possible de cristalliser le complexe, par la méthode diffraction des rayons X.

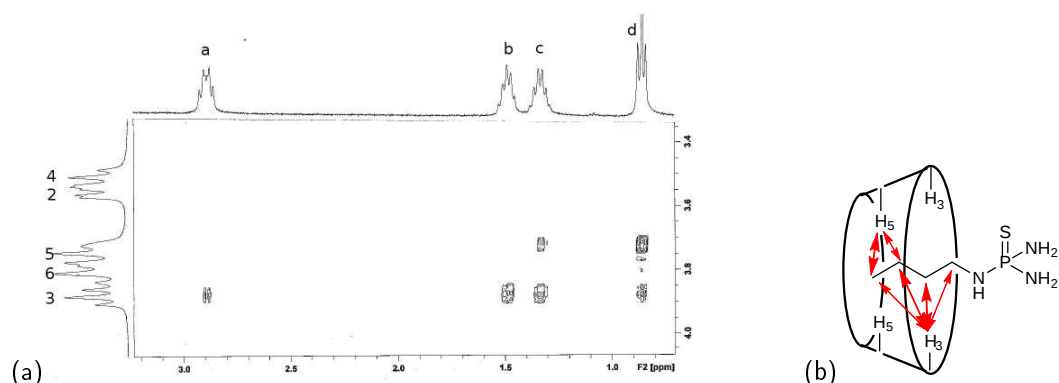


FIGURE 8.30. (a) Détail du spectre RMN T-ROESY du complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT**, zoomé sur la zone inter-moléculaire. (b) Estimation de la géométrie du complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT**. Les flèches représentent les interactions visibles sur le T-ROESY.

8.4.3. Mesure de l'activité de la formulation

L'équilibre entre les formes libre et complexée du **NBPT** dans le complexe d'inclusion a été mis en évidence et quantifié à travers la constante d'association. Nous avons supposé que la forme complexée du **NBPT** limiterait la dégradation de la molécule en milieu acide tandis que sa forme libre permettrait la conservation d'une activité inhibitrice.

Un échantillon de formulation $CD\alpha$ /**NBPT** de ratio 1:1 a été préparé par agitation dans l'eau d'une quantité équimolaire en **NBPT** et en $CD\alpha$. Après solubilisation totale, le mélange a été lyophilisé. L'activité inhibitrice de cette préparation a été évaluée *in vitro*. La valeur obtenue est de 1,5 μ M, soit 15 fois plus élevée que l' IC_{50} du **NBPT** libre (100 nM). La complexation du **NBPT** s'accompagne, comme supposé, d'une perte d'activité notable, qui est cependant bien relative dans le cas où sa présence en milieu acide serait prolongée dans le temps.

Un échantillon de la formulation $CD\alpha$ /**NBPT** de ratio 1:1 a été envoyé à l'INRA de Caen. L'activité de cette formulation a été comparée dans les sols à celle de l'Agrotain. Les graphiques obtenus sont présentés figures 8.31.a et 8.31.b. Aucune différence significative n'a été observée entre l'activité de l'Agrotain et celle de la formulation à base de cyclodextrine. Même si la valeur de la constante d'association indique que la formation d'un complexe d'inclusion $CD\alpha$ /**NBPT** est favorisée, ce phénomène n'est pas suffisant pour prolonger l'effet du **NBPT** dans le temps. Nous pouvons supposer que le **NBPT** se libère rapidement dans les sols pour exercer son activité inhibitrice, mais n'est pas capable de revenir dans la cavité de la cyclodextrine. Une autre explication serait que les cyclodextrines aient une durée de vie relativement courte face à l'activité bactérienne des sols.

Des tests supplémentaires ont été réalisés à l'aide de formulations $CD\alpha$ /**NBPT** de ratio 2:1 et 5:1, préparées suivant le même principe que précédemment (figure 8.31.c et 8.31.d). Cependant, l'introduction d'une plus grande quantité de cyclodextrine ne change rien au résultat obtenu. Encore une fois, nous n'observons pas de différence significative entre les courbes relatives aux nouvelles formulations et celle de l'Agrotain. L'encapsulation dans des cyclodextrines n'est donc pas suffisante pour diminuer la cinétique de dégradation du **NBPT** dans les sols.

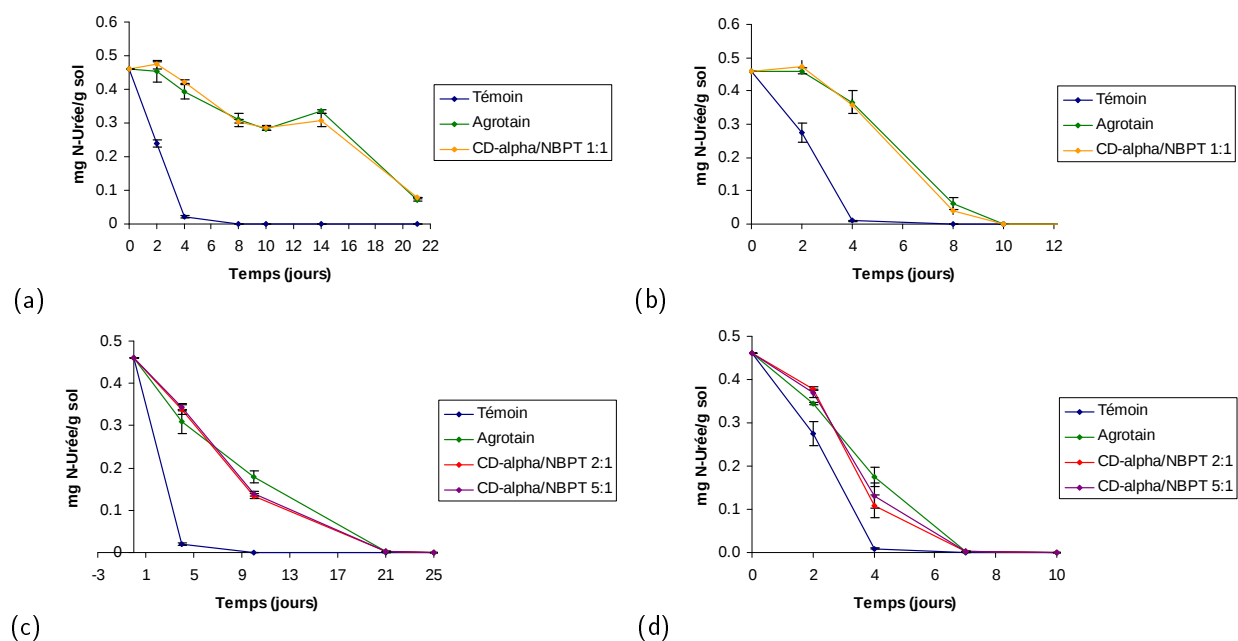


FIGURE 8.31. Activité uréique de la formulation $CD\alpha/NBPT$ de ratio 1:1 (a) en sol alcalin et (b) en sol acide. Activité uréique de la formulation $CD\alpha/NBPT$ de ratio 2:1 et 5:1 (c) en sol alcalin et (d) en sol acide.

8.5. Conclusion

Dans le but de stabiliser le **NBPT** en milieu acide, nous avons tenté de formuler le **NBPT** de différentes façons afin de construire autour de la molécule un environnement proche favorable. Différentes formulations ont été imaginées, à l'aide de wollastonite, d'acides humiques, de polysaccharides ou de cyclodextrines. Elles ont pu être évaluées grâce à la mise en place d'un protocole de suivi de dégradation du **NBPT** à pH acide par RMN du phosphore (tableau 8.3).

Parmi les différentes formulations imaginées, trois ont ainsi pu être retenues : à base de wollastonite, d'acides humiques et d' α -cyclodextrine. Les stabilisations observées *in vitro* à l'aide de wollastonite et d'acides humiques sont majoritairement dues au pouvoir tamponnant des composés utilisés. Elles ont été envoyées à l'INRA de Caen pour subir des tests complémentaires d'efficacité sur les sols. Malheureusement, aucune d'entre elles n'a été concluante pour une utilisation dans les champs. Les acides humiques, plutôt que de tamponner l'environnement proche du **NBPT**, s'acidifient au contact des sols acides. Il semblerait même qu'un taux de matière organique élevé dans les sols accélère le processus de dégradation du **NBPT**. Quant à la wollastonite, elle semble avoir une affinité insuffisante pour le **NBPT**, ce qui expliquerait le résultat insatisfaisant relatif à la formulation correspondante dans les sols.

Nous avons pu constater une faible stabilisation du **NBPT** induite par l'utilisation d'empois d'amidon. Ceci nous a conforté vers le développement d'une formulation à base de cyclodextrine, oligosaccharide cyclique produit à partir de l'amidon par voie enzymatique. La formulation **NBPT**/ $\text{CD}\alpha$ a pu être caractérisée précisément : un complexe d'inclusion de ratio 1:1 se forme en solution aqueuse, avec une constante d'association d'une valeur de 94 M^{-1} . Mais même si cette valeur indique que la formation du complexe est favorisée, ce dernier semble se dissocier trop rapidement dans les sols, sans possibilité de se reformer.

Même si les formulations développées lors de cette étude n'ont pas permis améliorer l'efficacité du **NBPT** en sols acides, la formulation **NBPT**/ $\text{CD}\alpha$ représente un intérêt significatif. En effet, le complexe d'inclusion formé est parfaitement hydrosoluble, ce qui faciliterait l'épandage du **NBPT** dans les cultures. Ceci pourrait permettre de remplacer les nombreux additifs présents dans l'Agrotain par une cyclodextrine, molécule biodégradable et biocompatible, dans une démarche de respect de l'environnement.

TABLEAU 8.3. Récapitulatif des essais de stabilisation du **NBPT**

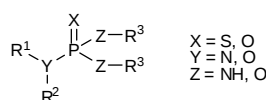
Formulant		Stabilisation <i>in vitro</i>	Activité <i>in vitro</i>	Activité <i>in vivo</i>	Remarques
Wollastonite		Oui	Ratio 5:1, $\text{IC}_{50} = 100 \text{ nM}$	Pas d'amélioration	Stabilisation due à un effet de pH.
Acides humiques		Oui	-	Pas d'amélioration	Stabilisation due à un effet de pH.
Polysaccharide	Carraghénanes	Non	-	-	Test effectué avec les carraghénanes ι , κ et λ .
	Alginate	Non	-	-	Pas d'encapsulation dans les billes d'alginates.
	Agar-agar	Non	-	-	-
	Laminarine	Non	-	-	-
	Amidon	Oui	-	-	Empois d'amidon : faible stabilisation <i>in vitro</i> . Autres sources : pas de stabilisation
	Amylose	Non	-	-	-
Cyclodextrine	α	Oui	Ratio 1:1, $\text{IC}_{50} = 1,5 \text{ }\mu\text{M}$	Pas d'amélioration	Formation d'un complexe de ratio 1:1 ($K_a = 94 \text{ M}^{-1}$)
	β	Non	-	-	-
	γ	Non	-	-	-

9. Modulations chimiques du NBPT

9.1. Nouvelles molécules cibles

9.1.1. Étude des modulations existantes

De nombreuses espèces de la famille des phosphoramides sont connues pour inhiber efficacement les uréases. Des études ont déjà été menées afin de sélectionner de meilleurs candidats inhibiteurs d'uréases que le **NBPT** [31, 38]. Les molécules étudiées correspondent à la formule générale présentée ci-dessous.

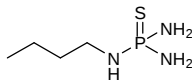
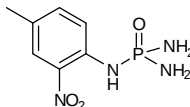
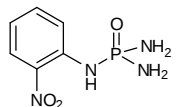


Quelques observations ont pu être énoncées. Il a ainsi été montré que, de manière générale, les composés oxygénés sont meilleurs inhibiteurs que les composés soufrés, mais plus sujet à l'hydrolyse acide. La présence de deux fonctions amides primaires est nécessaire sur le phosphore pour conserver l'activité. En effet, ces fonctions sont directement impliquées dans la complexation de l'inhibiteur sur les deux atomes de nickel du site actif. Ainsi, l'environnement proche de l'atome de phosphore ($\text{X} = \text{O}$, $\text{Y} = \text{N}$, $\text{Z} = \text{NH}$ et $\text{R}^3 = \text{H}$) doit être conservé et seuls les groupements R^1 et R^2 peuvent être modifiés.

En ce qui concerne les modifications du groupement R^1 , de bons résultats ont été trouvés pour des molécules contenant un groupement aromatique ou hétérocyclique. Lors de l'inhibition des uréases, le substituant R^1 est orienté vers l'extérieur de la cavité menant au site actif de la protéine. Le pourcentage d'inhibition est intéressant lorsque la conformation de ce groupement n'impose aucune gêne stérique. Il est encore meilleur lorsque R^1 interagit avec les acides aminés environnants par la formation de liaisons hydrogène ou d'interactions de type π -stacking. A l'heure actuelle, seul $\text{R}^2 = \text{H}$ a été expérimenté pour des questions de stratégie de synthèse.

Parmi les différentes molécules synthétisées et testées, certaines présentent également un intérêt en terme de stabilité en milieu acide. Deux d'entre elles peuvent être retenues, tant en terme d'efficacité que pour leur cinétique de dégradation [31] (tableau 9.1).

TABLEAU 9.1. Comparaison avec le **NBPT** des activités et des cinétiques de dégradations à pH acide et basique de deux inhibiteurs sélectionnés [31]

	 NBPT	 4-nitrophenylphosphoramidate	 2-nitrophenylphosphoramidate			
IC ₅₀ (JBU)	100 nM	3,5 nM	3 nM			
	% d'inhibition <i>in vivo</i>					
Temps (jours)	pH 4,5	pH 8,4	pH 4,5	pH 8,4	pH 4,5	pH 8,4
5	79	95	92	94	88	86
15	9	88	63	87	74	90
30	0	43	6	73	12	81

Dans le cas des deux modulations présentées ici, une liaison hydrogène intramoléculaire formée entre l'un des amides primaires et le groupement nitro présent sur le cycle maintient la molécule dans une conformation telle qu'elle s'intègre parfaitement dans la cavité, d'où un excellent potentiel d'inhibition par rapport au **NBPT**. Mais ce qu'il y a de plus remarquable dans ces modulations est leur gain en matière de stabilité à pH acide : au bout de

15 jours d'incubation à pH 4,5, tandis que le **NBPT** n'inhibe plus qu'à hauteur de 9 %, les deux autres possèdent encore des pourcentages d'inhibition de 63 et 74 %. Ceci peut s'expliquer par des considérations électroniques dues au caractère électroattracteur du cycle aromatique, apporté par la présence du groupement nitro en *ortho* du phosphoramide (figure 9.1).

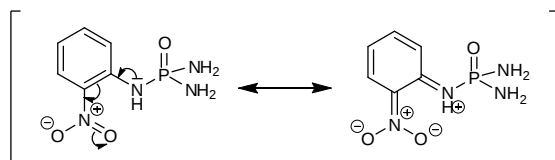


FIGURE 9.1. Formes mésomères du *N*-2-nitrophényl-phosphoramide. Mise en évidence de l'effet électroattracteur.

9.1.2. Effets électroniques stabilisants

Les molécules de type phosphotriamide sont susceptibles d'être sensibles à l'hydrolyse acide, dont la première étape est très probablement la protonation de l'oxygène, stabilisé par mésomérie (figure 9.2). Cette étape est rapide étant donné la forte électronégativité de l'oxygène de cette fonction. Dans le cas où un groupement électroattracteur est présent sur l'amide, les électrons sont délocalisés vers ce substituant, ce qui a pour effet de diminuer la nucléophilie de l'oxygène du phosphoramide (figure 9.3). Par conséquent, la cinétique de dégradation à pH acide est ralentie. Cet effet, s'il est avéré, ouvre la voie vers de nouveaux inhibiteurs d'uréases, plus efficaces que le **NBPT** dans le temps à pH acide.

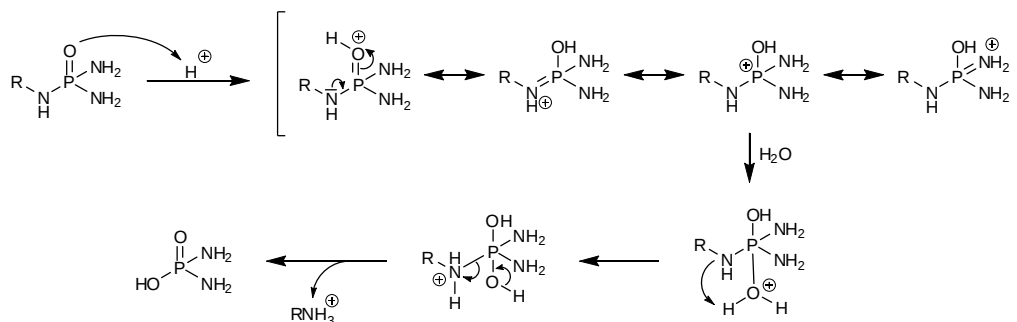


FIGURE 9.2. Mécanisme supposé d'hydrolyse acide des phosphotriamides

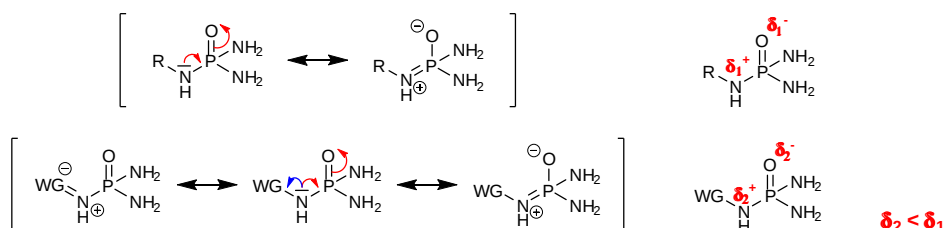


FIGURE 9.3. Influence d'un groupement électroattracteur (WG) sur la répartition des densités électroniques du phosphotriamide.

9.1.3. Nouvelles modulations du NBPT

Dans le but de limiter la cinétique de l'hydrolyse acide, deux nouvelles modulations du **NBPT** ont été imaginées. Les deux premières mettent en jeu les considérations électroniques expliquées précédemment. Pour la troisième, l'azote de la liaison P-N la plus délicate et qui n'est pas impliquée dans les interactions avec le site actif des uréases

a simplement été retiré afin de lier le substituant au phosphoramidate par une liaison P-C plus stable (figure 9.4). La synthèse des dérivés du **NBPTO** a également été envisagée afin de fournir des molécules témoin lors des tests biologiques et physico-chimiques.

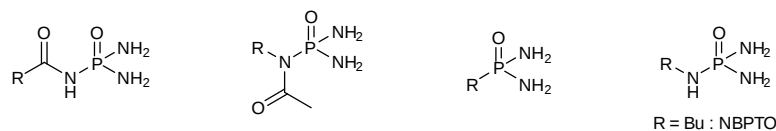


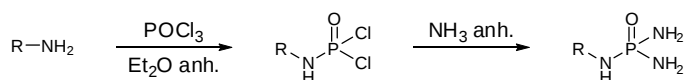
FIGURE 9.4. Molécules cibles.

Différentes stratégies de synthèses ont été imaginées pour mener à chacune de ces molécules. Le substituant R choisi pour les premières synthèses est un groupement phényle, afin de mettre plus facilement au point les conditions opératoires et de suivre l'évolution des différentes étapes de réaction par UV. Ce n'est qu'une fois le protocole bien défini à l'aide des molécules UV-visibles que nous avons envisagé de synthétiser des molécules au substituant butylique. Ensuite, les stabilités et activités de ces nouveaux inhibiteurs d'uréases ont été mesurées afin d'effectuer des comparatifs et en déduire des relations structure-propriété et structure-activité.

9.2. Synthèses des molécules cibles

9.2.1. *N*-aryl-phosphotriamides et *N*-alkyl-phosphotriamides

La synthèse de ce type de molécule est bien connue et décrite dans plusieurs publications et brevets [55, 91, 92]. C'est cette même synthèse qui est appliquée dans le procédé de production industrielle du **NBPT** [89, 88]. Elle débute par la mono-substitution du trichlorure de phosphoryle par une amine primaire. De l'ammoniac gaz anhydre est ensuite additionné dans le milieu contenant le produit dichloré pour conduire au composé recherché (figure 9.5).

FIGURE 9.5. Synthèse des *N*-aryl-phosphotriamide et des *N*-alkyl-phosphotriamide

Cependant, la première étape de cette synthèse peut difficilement dépasser les 50 % de rendements. En effet, elle s'accompagne d'une émission de HCl qui est alors capté par l'amine de départ. Le sel d'ammonium ainsi formé n'est pas enclin à réagir avec le trichlorure de phosphoryle. Il est possible d'éviter ce problème par l'ajout d'une amine tertiaire, comme la triéthylamine. En effet, une amine tertiaire est incapable de réagir avec le trichlorure de phosphoryle, évitant ainsi la formation de co-produits indésirables. En revanche, elle a pour rôle de capter d'acide chlorhydrique produit.

Pour éviter la formation de produits de di-substitution lors de la première étape, il est également judicieux d'introduire l'amine goutte à goutte dans une solution de trichlorure de phosphoryle. De ce fait, ce dernier se trouve toujours en excès, favorisant ainsi la formation du produit de mono-substitution.

Cette réaction, bien que très adaptée au milieu industriel, est difficile à mettre en place en laboratoire à cause de la forte réactivité et toxicité des différents réactifs. La présence d'eau doit être évitée pour réduire au maximum la substitution des chlores par des hydroxyles. Les étapes de purifications des produits intermédiaires doivent être réduites au maximum, et se limiter à des filtrations ou des recristallisations.

De plus, l'amination finale par l'ammoniac en milieu anhydre nécessite un montage réactionnel particulier. Sa difficulté réside dans la présence de surpressions dues à l'utilisation d'un réactif à l'état gazeux, et nécessite la présence de pièces de verreries spécifiques. Deux méthodes sont possibles. La première consiste à condenser l'ammoniac gazeux anhydre dans un bain marie de température inférieure à -33 °C, injecter le milieu réactionnel, puis revenir à température ambiante sous agitation, le tout sous atmosphère inerte (figure 9.6). La seconde, plus commode, nécessite le bullage de l'ammoniac gazeux anhydre dans le milieu réactionnel préalablement purgé à l'azote.

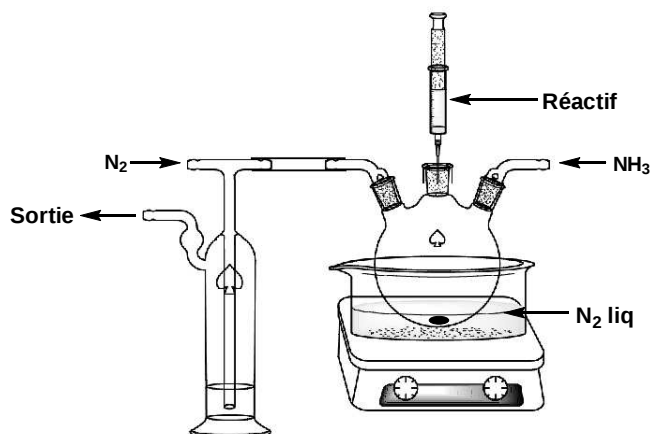
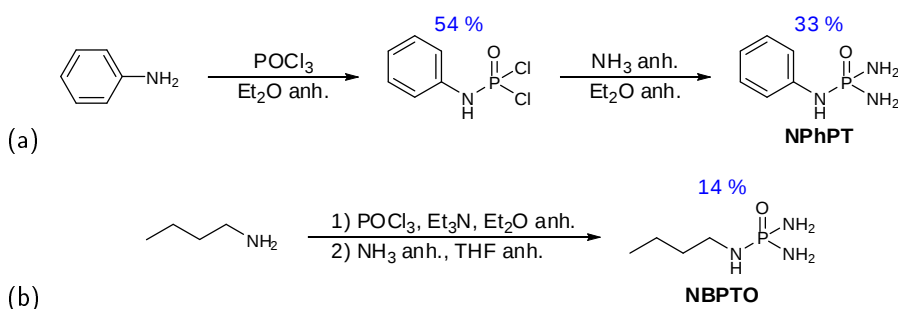


FIGURE 9.6. Montage réactionnel pour la réaction à l'ammoniac liquide

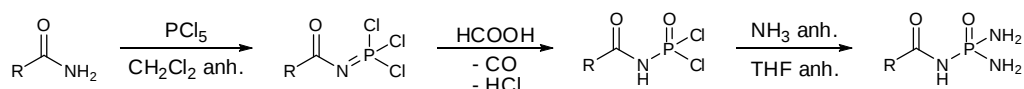
Après purification sur colonne de gel de silice, greffée ou non, cette synthèse a permis d'obtenir le *N*-phényl-phosphotriamide (**NPhPT**) avec un rendement global non optimisé de 18 % et le *N*-butyl-phosphotriamide **NBPTO** avec un rendement de 14 % (figure 9.7).

FIGURE 9.7. Schéma de synthèse (a) du **NPhPT** et (b) du **NBPTO**.

9.2.2. *N*-acyl-phosphotriamides

Les inhibiteurs d'uréases de type *N*-acyl-phosphotriamide ont été brevetés en 1985, en même temps que le **NBPT** [54], mais leur utilisation ne s'est pas répandue. Le schéma de synthèse de cette famille de molécules est bien connu dans le cas de composés aromatiques. Récemment, Il a été largement utilisé par Gholivand et son équipe pour étudier les structures de ce type de composés en vue d'applications biologiques ou en chimie de coordination [42, 40].

Cette synthèse nécessite l'utilisation de pentachlorure de phosphore, plus réactif que le trichlorure de phosphore. Il subit d'abord une disubstitution par un amide primaire, puis une oxydation par l'acide formique. Étant donné le caractère d'acide faible de ce dernier, l'atome d'azote n'est pas directement protonné [41]. Il se produit dans un premier temps l'attaque nucléophile de l'oxygène de l'acide formique sur l'atome de phosphore. La protonation de l'azote peut dès lors avoir lieu pour former un intermédiaire dichloré. Un bullage d'ammoniac gazeux anhydre produit le composé final (figure 9.8).

FIGURE 9.8. Synthèse des *N*-acyl-phosphotriamide

La synthèse du *N*-benzoyl-phosphotriamide (**NBzPT**) a été effectuée avec succès au laboratoire et, après recristallisation dans l'eau a donné accès au produit désiré avec un rendement global de 56 %. En revanche, ce schéma de synthèse n'a pas permis d'obtenir le *N*-valéroyl-phosphotriamide (**NVrPT**). Dans ce cas, la première étape de synthèse n'a pas eu lieu (figure 9.9). La présence d'un groupement aromatique en α de l'amide semble accroître sa réactivité, phénomène nécessaire au bon déroulement de la phosphorylation.

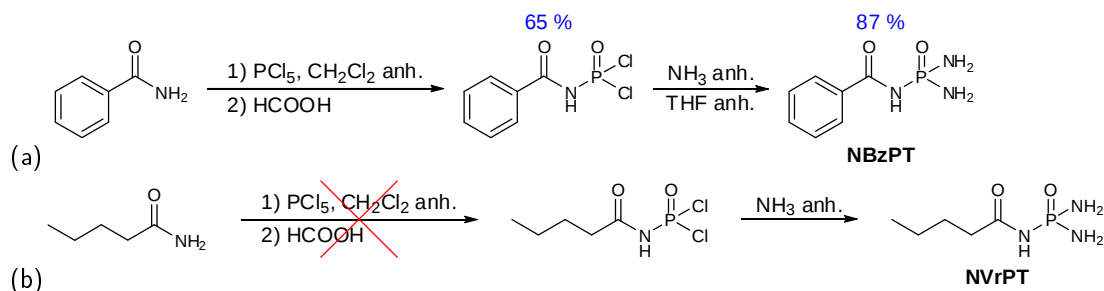


FIGURE 9.9. Schéma de synthèse (a) du **NBzPT** et (b) du **NVrPT**.

Une nouvelle stratégie de synthèse a donc été imaginée, à partir de l'acrylamide (figure 9.10). La délocalisation d'une double liaison en α de l'amide, devrait favoriser l'étape de phosphorylation, au même titre qu'un groupement aromatique. La construction du motif phosphoramidate pourrait alors se faire suivant la même stratégie que précédemment. Une dernière étape consiste alors à construire la chaîne butyle à partir de la liaison double, par le moyen d'une réaction de métathèse.

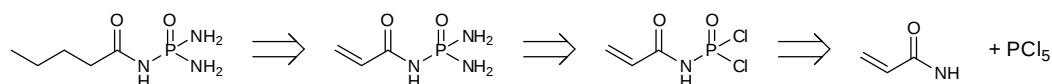


FIGURE 9.10. Schéma rétro-synthétique du *N*-valéroyl-phosphotriamide

Cependant, la phosphorylation de l'acrylamide n'a pas donné lieu au produit désiré. Nous avons eu la surprise de découvrir la formation majoritaire d'un composé cyclique (figure 9.11), comme en témoigne le spectre RMN ^1H du brut réactionnel (figure 9.12). La structure du composé chloré cyclique a été démontrée par RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P). La constante de couplage observée entre l'atome de phosphore et le carbone impliqué dans la cyclisation est de 9,8 Hz, indiquant un couplage en J^2 . Ceci témoigne de l'intercalation d'un atome, probablement un oxygène, entre le carbone terminal et le phosphore lors de la cyclisation et la formation d'un cycle à 6. Cette réaction, jusqu'alors inconnue, ouvre la voie vers une famille de molécules cycliques inédite, dont les propriétés pourront être explorées, notamment dans le domaine pharmaceutique [8, 47].

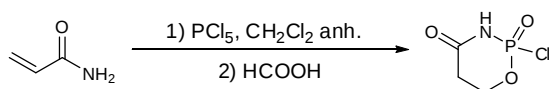


FIGURE 9.11. Cyclisation lors de la phosphorylation de l'acrylamide

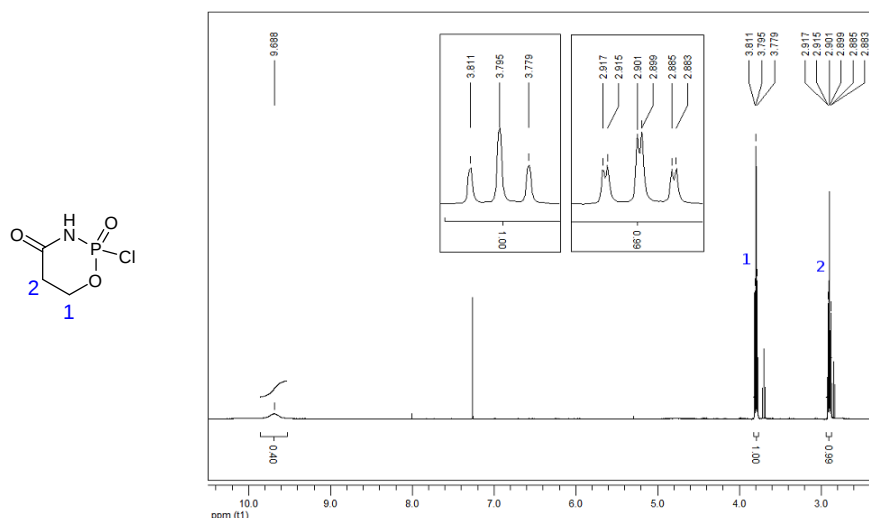


FIGURE 9.12. Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du brut de réaction de la phosphorylation de l'acrylamide.

Un mécanisme réactionnel a pu être proposé. Les deux premières étapes se produiraient comme précédemment, c'est-à-dire par l'addition du pentachlorure de phosphore sur l'amide, suivie de l'oxydation du phosphore par l'acide formique. Une seconde molécule d'acide formique pourrait ensuite intervenir suivant un mécanisme semblable à une addition de Michael. La décomposition du produit ainsi formé entraînerait la fermeture du cycle à 6 (figure 9.13).

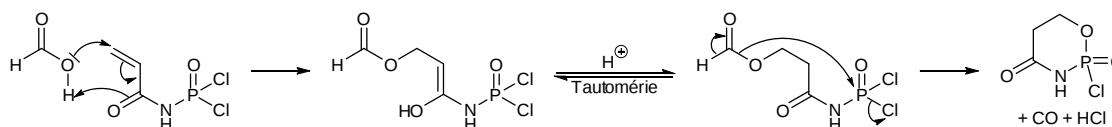


FIGURE 9.13. Mécanisme proposé pour la formation du cycle à 6

9.2.3. *N*-Acétyl-*N*-aryl-phosphotriamides et *N*-Acétyl-*N*-alkyl-phosphotriamides

La synthèse des *N*-acyl-*N*-alkyl-phosphoramides est ardue car il en existe très peu d'exemples dans la littérature. La difficulté réside dans la formation d'un amide tertiaire en α du phosphore, position fortement désactivée.

La réactivité d'un amide secondaire est trop faible pour une réaction directe avec le trichlorure de phosphoryle. Il existe des exemples d'activation à l'aide de chlorotriméthylsilane en présence de di-*iso*-propyl-éthylamine [3] ou avec du *n*-butyl lithium (figure 9.14) [1, 2]. Cependant, ces exemples ont été développés à partir d'un lactame, dont la réactivité est sensiblement différente de celle d'un amide. Les essais en laboratoire réalisés sur l'acétanilide se sont révélés infructueux, tant dans le cas d'une activation au TMSCl qu'avec du *n*-BuLi.

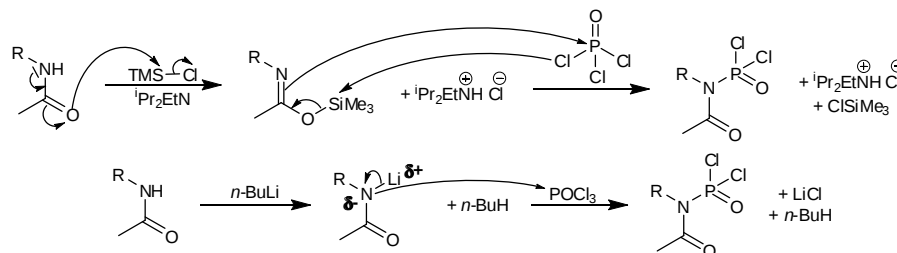


FIGURE 9.14. Synthèse décrite par Abe et al. Activation de l'amide secondaire par le TMSCl [3] et par le *n*-BuLi [2].

La synthèse a alors été abordée dans un sens différent : l'acétylation n'a lieu que dans un second temps. La première étape, commune à la synthèse des *N*-alkyl-phosphotriamides, est la phosphorylation d'une amine primaire par le trichlorure de phosphore. L'intermédiaire dichloré obtenu subit alors une acétylation par le chlorure d'acétyle en présence d'une base (figure 9.15). Ce schéma réactionnel a été proposé par Kolc et al. [54], cependant le protocole opératoire n'est pas décrit précisément.

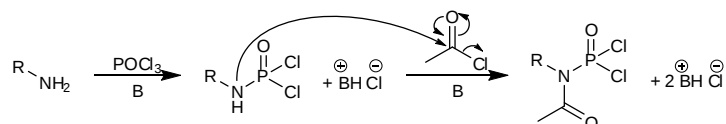


FIGURE 9.15. Synthèse décrite par Kolc et al. [54]

Les conditions opératoires de cette synthèse ont été étudiées au laboratoire. Des problèmes de réactivité ont été rencontrés lors de l'étape d'acétylation. En effet, la réaction ne se produit pas en l'absence de base, ni même en présence de pyridine, base trop faible pour déprotonner l'intermédiaire chloré. Les expériences menées en présence de triéthylamine se sont révélées tout aussi infructueuses.

Une dernière stratégie reste encore envisageable, faisant réagir sur l'amide secondaire, non pas le trichlorure de phosphore, mais le trichlorure de phosphore, bien plus réactif. L'intermédiaire obtenu est ensuite oxydé par de l'oxygène anhydre en présence de *N,N*-diméthylaminopyridine (figure 9.16) [22]. Cependant, la forte réactivité et la toxicité des réactifs utilisés ici nécessite de grandes précautions et augmente considérablement la difficulté des manipulations. À l'heure actuelle, ce schéma réactionnel n'a pas été testé et le produit n'a pas été obtenu.

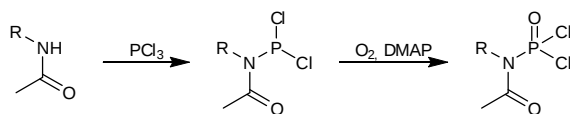


FIGURE 9.16. Synthèse décrite par Bezgubenko et al. [22]

9.2.4. Diamides phosphoniques

La méthode la plus ancienne pour synthétiser les composés de type diamides phosphoniques rejoint le procédé de fabrication de l'un des intermédiaires du Sarin. Cette synthèse consiste en la formation d'un complexe ionique à partir de trichlorure de phosphore, de chlorure d'aluminium et de chlorure d'alkyle, qui est ensuite réduit [97]. Initialement, la réduction se faisait par l'eau dans le dichlorométhane [75], mais pour limiter les risques une autre méthode a été développée : la réduction par le dioxyde de soufre dans le phtalate de diéthyle (figure 9.17) [73]. La réduction à l'aide de carboglace a également été envisagée [80] mais malgré tous ces efforts, cette synthèse reste délicate.

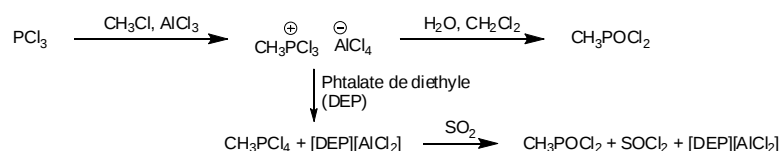


FIGURE 9.17. Synthèse du dichlorure méthylphosphonique, intermédiaire réactionnel du Sarin

Un autre type de synthèse a été envisagé à partir de diesters de phosphore ou d'acides phosphoniques mis en présence d'agents chlorants. Parmi les réactifs utilisés se trouve le pentachlorure de phosphore [39] ou le chlorure d'oxalyle [76]. Ce dernier réagit avec de bons rendements dans une réaction catalysée au DMF, et donne accès à un intermédiaire particulièrement propre grâce à la formation de co-produits exclusivement gazeux (figure 9.18).

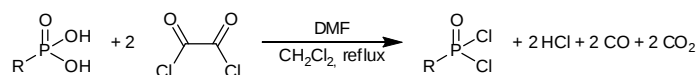
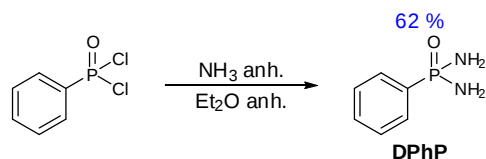


FIGURE 9.18. Dihalogénation d'un acide phosphonique par le chlorure d'oxalyle en présence de DMF

Néanmoins, l'intermédiaire dichloré étant accessible dans le commerce dans le cas d'un groupement phényle, la synthèse diamide phényl-phosphonique (**DPhP**) a été réalisée en une seule étape d'amination avec un rendement de 62 % après purification sur colonne de silice (figure 9.19).

FIGURE 9.19. Schéma de synthèse de **DPhP**.

9.2.5. Bilan

Malgré tous les essais de synthèses effectués au laboratoire, nous ne sommes parvenus à produire qu'une partie des molécules ciblées. Les synthèses réalisées avec succès sont résumées dans le tableau 9.2.

TABLEAU 9.2. Bilan des synthèses de phosphoramides

Nom	Molécule	Mode de purification	Masse obtenue	Rendement global
NBPTO		Chromatographie phase inverse (C18)	0,33 g	14 %
NPhPT		Chromatographie phase normale	0,27 g	18 %
NBzPT		Recristallisation dans l'eau	0,73 g	56 %
DPhP		Recristallisation dans l'eau	0,35 g	62 %

9.3. Évaluation de la stabilité en milieu tamponné acide

Pour commencer, nous avons voulu comparer les vitesses de dégradation des nouvelles molécules en milieu acide tamponné, par RMN ^{31}P . Ceci a posé problème pour certaines molécules qui ne sont pas suffisamment solubles dans l'eau, aux concentrations nécessaires pour ce type d'expérimentation. Dans un premier temps, les molécules hydrosolubles ont donc été comparées entre elles, ainsi qu'avec l'Agrotain (figure 9.20).

Tout d'abord, la remarque énoncée dans la bibliographie, comme quoi le **NBPTO** est bien plus instable que le **NBPT**, se vérifie ici. En effet, le **NBPTO** s'est dégradé 4 fois plus vite que le **NBPT** dès la première journée. L'utilisation dans les sols du **NBPT**, plutôt que du **NBPTO**, est donc particulièrement judicieuse.

Les inhibiteurs nouvellement synthétisés étant tous des dérivés oxygénés, il est préférable de comparer leurs propriétés à celles du **NBPTO**. Parmi ceux-là, la seule molécule hydrosoluble est le **NPhPT**. Comme nous l'avions espéré, cette molécule est bien plus résistante que le **NBPTO**, et même que le **NBPT** en milieu acide. Ainsi,

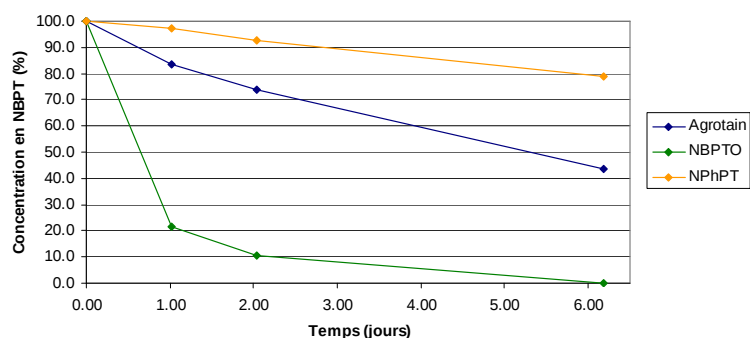


FIGURE 9.20. Concentration en solution des inhibiteurs d'uréases hydrosolubles en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5)

après 6 jours de solubilisation, alors que la totalité du **NBPTO** et la moitié du **NBPT** ont été dégradés, 80 % du **NPhPT** initialement introduit subsistent dans la solution.

Fort de ce premier résultat, nous avons souhaité évaluer la stabilité des autres inhibiteurs de synthèse. Pour surmonter leur faible hydrosolubilité, leur stabilité a été évaluée dans une solution acide à pH 5,5 consistant en 50 % d'eau, 50 % de DMSO, et les concentrations introduites initialement ont été divisées de moitié (60 mM plutôt que 120 mM). Malgré cela, une précipitation s'est quand même produite dans le cas du **NBzPT**. Il a donc été nécessaire de quantifier, non seulement la disparition de la molécule de départ (figure 9.21.a), mais également l'apparition de produits de dégradations (figure 9.21.b).

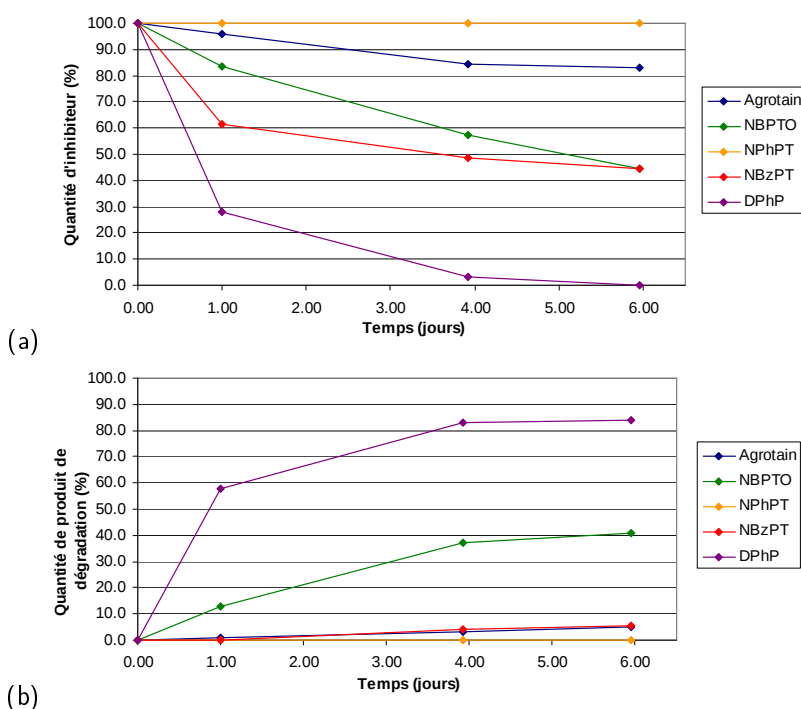


FIGURE 9.21. (a) Concentration en solution des inhibiteurs d'uréases et (b) concentration en solution de leur produit de dégradation en milieu acide (tampon acétate 250 mM, pH 5,5) contenant 50% de H₂O et 50 % de DMSO.

Cette fois encore, le **NBPTO** se dégrade bien plus rapidement que le **NBPT**. Ceci se voit tant sur le suivi de disparition du produit de départ que sur l'apparition de produits de dégradations. Nous remarquons également l'effet du DMSO sur la vitesse de dégradation de ces deux molécules, qui est bien plus lente que lors de l'expérimentation précédente.

Le **DPhP** a montré une bien piètre résistance au milieu acide. Totalement dégradé en moins de 6 jours, sa cinétique de dégradation est presque 4 fois plus rapide que celle du **NBPTO**. Cette modulation ne répond donc pas à la problématique posée et est dès à présent écartée de l'étude. La forte décroissance observée lors du suivi du **NBzPT** en solution n'est pas liée à sa dégradation, mais très majoritairement à sa précipitation dans le milieu. C'est la raison pour laquelle cette courbe ne suit pas une cinétique de disparition d'ordre 1. Le **NBzPT**, qui de prime abord paraissait la plus stable, a quand même été faiblement dégradé, comme le montre le suivi d'apparition de produits de dégradations. Enfin, il a été surprenant de ne remarquer aucune diminution de la concentration en **NPhPT**, ni aucune apparition de produit de dégradation. Ainsi, cette molécule est particulièrement résistante dans les conditions présentes.

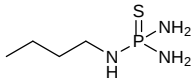
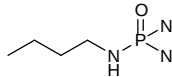
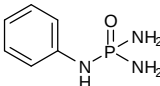
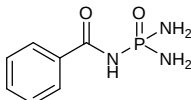
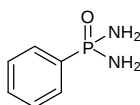
Le **DPhP** n'a pas montré les résultats espéré, bien au contraire. En revanche, le **NBzPT** et le **NPhPT** se sont montrés bien plus résistants que le **NBPTO** dans une solution de pH 5,5. Le phénomène de stabilisation par effet électronique a été vérifié. Il a ensuite fallu évaluer le potentiel d'inhibition des uréases de ces molécules.

9.4. Étude de l'inhibition des uréases

9.4.1. Activité *in vitro*

Les molécules nouvellement synthétisées ont été testées et comparées en terme d'inhibition des JBU *in vitro*. Les résultats sont résumés dans le tableau 9.3.

TABLEAU 9.3. IC₅₀ des nouveau inhibiteurs d'uréases.

Entrée	Nom	Molécule	IC ₅₀
1	NBPT		100 nM
2	NBPTO		1 nM
3	NPhPT		2 μM
4	NBzPT		25 nM
5	DPhP		4 μM

Pour commencer, le **NBPT** est 100 fois moins actif que le **NBPTO** (entrées 1 et 2), ce qui concorde avec ce qu'annonce la littérature, à savoir que le **NBPT** n'est pas réellement l'espèce active. Il s'agit en fait du **NBPTO**, produit l'oxydation du **NBPT** dans les sols. Il est donc judicieux de comparer les activités des phosphoramides et non pas de leur analogues thio-phosphoramidiques.

La comparaison du **NBPTO** avec le **NPhPT** (entrées 2 et 3) livre l'effet de la chaîne latérale sur l'inhibition des uréases. En effet, dans le cas d'une chaîne butylique, l'activité est 2000 fois plus élevée que lorsqu'il s'agit d'un phényle. Il est probable que le phényle soit trop encombré pour une insertion efficace de l'inhibiteur dans la poche du site actif. Le butyle, plus flexible permettrait alors à l'inhibiteur de pénétrer plus facilement.

Il en est de même dans le cas du **DPhP** (entrée 5). Le groupement aromatique encombrant, trop proche de la tête coordinante de l'inhibiteur, diminue l'affinité de ce dernier pour les uréases. Pourtant, l'activité de cet inhibiteur n'est pas nulle. Ainsi, l'atome d'azote central n'est pas impliqué dans le mode de liaison entre l'inhibiteur et le site actif de l'uréase. Il peut être modulé au même titre que le groupement carboné.

Le **NBzPT** (entrée 4), quant à lui, montre un potentiel d'inhibition remarquable, 80 fois supérieur à celui du **NPhPT**. Son activité se rapproche considérablement de celle du **NBPTO**, malgré la présence d'un groupement aromatique. Ceci peut avoir deux explications. D'une part, l'ajout d'un carbonyle entre le phosphoramidate et le phényle éloigne ces deux motifs l'un de l'autre, ce qui peut diminuer les tensions stériques dans le site actif. Il se peut également que l'atome d'oxygène du carbonyle soit impliqué dans une liaison hydrogène stabilisante. D'après ces conclusions, le **NVrPT**, peu encombré et porteur d'un groupement carbonyle, aurait pu montrer une activité tout à fait remarquable.

Tandis que le **DPhP** et le **NPhPT** possèdent des activités limitées vis-a-vis des JBU, le **NBzPT** suscite un grand intérêt car cette molécule a montré d'excellents résultats, tant en terme de stabilisation en milieu acide, que pour son potentiel d'inhibition des uréases *in vitro*.

9.4.2. Activité dans les sols

Pour terminer, les nouveaux inhibiteurs d'uréases ont été testés sur les sols alcalins et acides à l'INRA de Caen. Les résultats obtenus sont présentés figure 9.23.

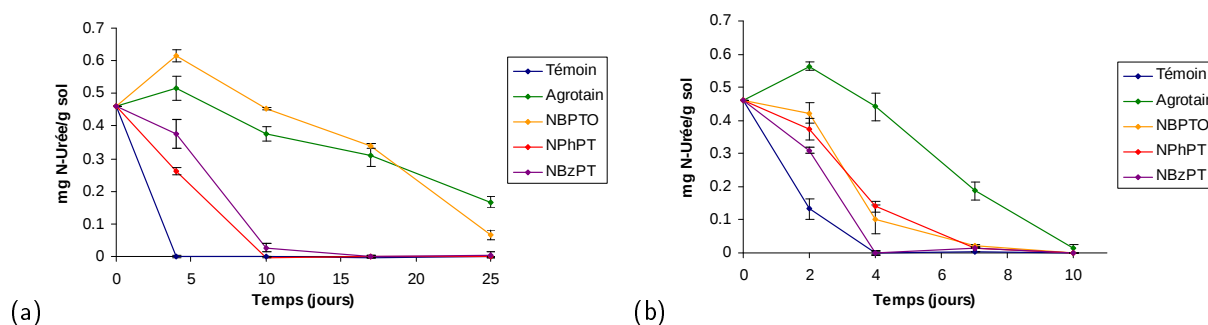


FIGURE 9.22. Activité uréique des nouveaux inhibiteurs comparés au **NBPT** et au **NBPTO** (a) en sol alcalin et (b) en sol acide.

Le **NBPTO** est connu pour être plus efficace, mais plus fragile que le **NBPT**. Ce phénomène se vérifie sur les sols alcalins (figure 9.22.a), où l'on observe, les premiers jours, une inhibition sensiblement plus faible par l'Agrotain que par le **NBPTO**, tendance qui s'inverse peu avant le 20^{ème} jour d'incubation, alors que le **NBPTO** introduit initialement s'est trop dégradé, tandis que l'Agrotain continue à relarguer graduellement cette espèce, prolongeant l'activité dans le temps. Dans les sols acides (figure 9.22.b), la stabilisation du **NBPT** par rapport au **NBPTO** est également flagrante : en présence d'Agrotain, 10 jours sont nécessaires pour consommer la totalité de l'urée, tandis qu'elle est totalement consommée en seulement une semaine, en présence de **NBPTO**.

Lors des expérimentations *in vitro*, le **NPhPT** a montré une excellente stabilité, mais une activité limitée. Il n'est donc pas surprenant de lui découvrir un effet insuffisant *in vivo*. Son efficacité en sol acide est semblable à celle du **NBPTO** (figure 9.22.b). Si, dans le cas du **NBPTO**, la faible efficacité est due à une dégradation trop importante, dans le cas du **NPhPT**, elle est le résultat de son pouvoir inhibant modeste. En revanche, en sol alcalin (figure 9.22.a), le phénomène d'hydrolyse acide du **NBPTO** n'entre pas en jeu, et la bonne activité de celui-ci par rapport au **NPhPT** est alors visible : le **NPhPT** ne retarde la consommation totale de l'urée que de 5 jours par rapport au témoin, contre 20 jours pour le **NBPTO**.

Le **NBzPT** n'a pas obtenu l'effet escompté. Le profil des courbes relatives à cet inhibiteur est similaire à celui observé pour le **NPhPT**. Pourtant les mesures effectuées *in vitro* sur cet inhibiteur ont montré des résultats tout à fait remarquables, que ce soit en matière de stabilité comme d'activité. Il est donc possible que cette molécule soit sujette à un facteur qui n'a pas été étudié au préalable, mais qui aurait une forte influence sur son efficacité dans les sols. Par exemple, il est possible d'envisager une dégradation de type bactérienne.

9.5. Conclusion

Le second axe de recherche consistait à développer des modulations chimiques des phosphoramides, stables à pH acide. Une étude des relations structure-activité, présente dans la littérature, procure une base de connaissance importante sur les éléments nécessaires à la conservation d'une activité d'inhibiteur. En nous appuyant sur l'hypothèse d'une stabilisation d'ordre électronique, provoquée par la présence d'un groupement électroattracteur situé en α de l'atome de phosphore, trois nouvelles familles de molécules ont été imaginées.

La synthèse des phosphoramides est délicate à cause des difficultés rencontrées lors des purifications de certains intermédiaires chlorés et des produits désirés. De nombreux problèmes de réactivité ont également été rencontrés. Malgré ces obstacles, quatre molécules ont pu être synthétisées. De plus, une réaction de cyclisation insoupçonnée a été constatée, ouvrant une nouvelle voie de synthèse vers une famille de molécules originales.

Les tests de dégradation *in vitro* ont confirmé la bonne stabilité du **NBzPT** et du **NPhPT** à pH acide, validant ainsi l'hypothèse d'une stabilisation d'ordre électronique. En revanche, le **DPhP** a été rapidement écarté. L'activité inhibitrice *in vitro* du **NPhPT** s'est révélée insuffisante, probablement à cause de l'encombrement du groupement aromatique. En revanche, la bonne activité mesurée dans le cas du **NBzPT** pourrait être expliquée par la formation d'une liaison hydrogène présumée sur la fonction carbonyle.

La faible efficacité du **NPhPT** observée *in vivo* n'a été d'aucune surprise étant donné la valeur obtenue lors du test d'inhibition *in vitro*. En revanche, la performance du **NBzPT** s'est révélée inférieure à l'effet escompté au vu des résultats très encourageants obtenus *in vitro*, tant en matière de stabilité que d'activité. Le passage du modèle vers l'utilisation en sols est une étape délicate étant donné les nombreux phénomènes qui entrent alors en jeu. La bonne stabilité de l'inhibiteur observée *in vitro* n'est probablement pas suffisante pour prolonger sa durée de vie face à une forte activité bactérienne. Ou encore, l'activité du **NBzPT**, pourtant très honorable dans le cas des JBU, n'est peut-être pas la même lorsqu'il s'agit d'uréases de type microbiennes.

L'étude de l'analogue soufré **NBzPT** dans les sols auraient pu montrer un intérêt. La conversion du *N*-benzoylthiophosphotriamide en **NBzPT** pourrait différer la dégradation de ce dernier et ainsi prolonger son activité. Il aurait été également intéressant de pouvoir étudier les capacités du **NVrPT**. En effet, d'après les conclusions énoncées lors des études structure-stabilité et structure-activité, nous pourrions nous attendre, dans le cas de cette molécule, à une bonne stabilité et une activité remarquable.

Experimental part

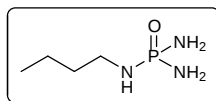
Experimental part

Chromatography Thin layer chromatography (TLC) analysis were conducted on E. Merck 60 F₂₅₄ Silica Gel nonactivated plates and compounds were visualized by UV (254 nm) and by exposure to a 0.5% solution of ninhydrine in EtOH followed by heating. For column chromatography, either Geduran Si 60 (40-63 μ m) Silica Gel or pre-packed Chromabond[®] Flash RS 15 C18 columns (732811, Macherey-Nagel) were used.

Melting point Melting points were determined on a Reichert microscope.

Nuclear Magnetic Resonance ¹H, ¹³C, ³¹P NMR spectra were recorded with a Brüker ARX 400 spectrometer at 400 MHz for ¹H, 100 MHz for ¹³C and 162 MHz for ³¹P. Chemical shifts are given in δ units (ppm). Coupling constants *J* were calculated in Herzt (Hz). Abbreviations were used to precise signal multiplicity : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet)...

Mass spectroscopy The HRMS were measured at the "Centre Regional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO, Université de Rennes 1)" with a MS/MS ZabSpec TOF Micromass using *m*-nitrobenzylic alcohol as a matrix and accelerated caesium ions for ionization.

***N*-butyl-phosphotriamide (NBPTO) :**

A solution consisting in *N*-butylamine (1.5 mL, 15.2 mmol, 1.01 eq) and triethylamine (2.2 mL, 16.5 mmol, 1.10 eq) into anhydrous Et₂O (15 mL), was slowly added to POCl₃ (1.4 mL, 15.2 mmol, 1 eq), diluted into anhydrous Et₂O (5 mL). The mixture was stirred for 1h30 under nitrogen atmosphere and at room temperature. Then, triethylammonium salts were filtered off. THF (40 mL) was added and ammonia gas was bubbled through until the pH of the solution was basic. Ammonium chloride was filtered off and the solution was dried under reduced pressure. The resulting crude material was purified by C18 reverse phase chromatography (H₂O) to give the desired product as a white solid in a 14% yield (326.0 mg, 2.2 mmol).

TLC : R_f 0.4 (4:1 CH₂Cl₂/MeOH)

³¹P NMR (162 MHz, DMSO, δ_P) : 16.28.

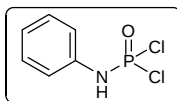
¹H NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) : 3.35 (s, 5H, **NH**, **NH₂**), 2.72 (ddd, 2H, $J_{\text{NH},1} = 14.1 \text{ Hz}$, $J_{\text{P},1} = 9.6 \text{ Hz}$, $J_{1,2} = 7.0 \text{ Hz}$, **H-1**), 1.42-1.33 (m, 2H, **H-2**), 1.32-1.22 (m, 2H, **H-3**), 0.86 (t, 3H, $J_{3,4} = 7.3 \text{ Hz}$, **H-4**).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO, δ_C) : 40.6 (**C-1**), 33.6 (d, $J_{\text{P},2} = 6.6 \text{ Hz}$, **C-2**), 19.5 (**C-3**), 13.8 (**C-4**).

ESI-HRMS : [M+Na]⁺

C ₄ H ₁₄ NaN ₃ OP	m/z calculated :	174.07722
	m/z found :	174.0771

This molecule has been previously synthesized[44, 55].

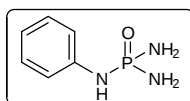
***N*-phenyl-phosphoramidic dichloride :**

POCl_3 (10.25 mL, 110 mmol, 1.5 eq) was diluted into anhydrous Et_2O (10 mL). The mixture was thermostated at 0°C . Then, a solution consisting in aniline (5 mL, 55 mmol, 1 eq) into anhydrous Et_2O (40 mL) was slowly added under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 30 min and then heated at room temperature. After one more hours stirring, triethylammonium salts were filtered off. The resulting solution was dried under reduced pressure to afford the desired product, without need of further purification (6.21 g, 30 mmol, 54%).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3 , δ_{P}) : 8.47.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 7.40-7.36 (m, 2H, **H-3**), 7.25-7.19 (m, 3H, **H-2**, **H-4**), 7.01 (d, 1H, $J_{\text{P,NH}}$ = 11.6 Hz, **NH**).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 136.3 (**C-1**), 129.7 (**C-3**), 125.2 (**C-4**), 121.1 (d, $J_{\text{P,2}}$ = 7.9 Hz, **C-2**).

***N*-phenyl-phosphotriamide (NPhPT) :**

An excess of ammonia gas was condensed at -196°C under nitrogen atmosphere. A solution, consisting in *N*-phenyl-phosphoramidic dichloride (1g, 4.8 mmol, 1eq) into anhydrous Et_2O (15 mL), was cautiously introduced. Then, the mixture was slowly heated until room temperature. Finally, the pH was controlled basic, and the resulting solid was collected by filtration. The product was extracted with MeOH, then dried under reduced pressure. A purification by chromatography column on silica gel (9:1 CH_2Cl_2 – MeOH), afford the desired product as a white solid in a 33% yield (0.27 g, 1.6 mmol).

TLC : R_f 0.6 (4:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

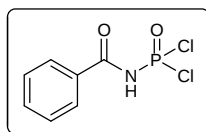
^{31}P NMR (162 MHz, DMSO, δ_P) : 8.74.

^1H NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) : 7.11-7.09 (m, 4H, **H-2**, **H-3**), 6.86 (d, 1H, $J_{P,NH} = 7.7$ Hz, **NH**), 6.71 (m, 1H, **H-4**), 3.92 (d, 4H, $J_{P,NH_2} = 3.1$ Hz, **NH₂**).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, δ_C) : 143.5 (**C-1**), 128.3 (**C-3**), 118.5 (**C-4**), 116.9 (d, $J_{P,2} = 6.9$ Hz, **C-2**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NaN}_3\text{OP}$	m/z calculated :	194.04592
	m/z found :	194.0459

***N*-dichlorophosphinyl-benzenamide :**

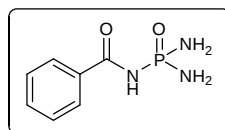
Benzenamide (4.00 g, 33.0 mmol, 1 eq) was added to a solution of PCl_5 (6.88 g, 33.0 mmol, 1 eq) into anhydrous CH_2Cl_2 (40 mL). The reaction was refluxed with stirring for 2.5 hours under nitrogen atmosphere, by which time HCl gas evolution had ceased. Solution was cooled at room temperature and formic acid (1.24 mL, 33.0 mmol, 1 eq) was slowly added. After 30 more minutes stirring, when the evolution of gas had ceased again, the mixture was cooled at 0°C to let the dichloride product crystallise. It was then filtered off, to give *N*-dichlorophosphinyl-benzenamide as a white solid in a 65% yield (5.14 g, 21.6 mmol).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO, δ_{P}) : -4.46.

^1H NMR (400 MHz, DMSO, δ_{H}) : 9.53 (d, 1H, $J_{\text{P,NH}} = 8.8$ Hz, **NH**), 7.92 (d, 2H, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, **H-2**), 7.54 (t, 1H, $J_{3,4} = 7.4$ Hz, **H-4**), 7.44 (m, 2H, **H-3**).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, δ_{C}) : 167.8 (**CO**), 133.4 (d, $J_{\text{P,1}} = 9.6$ Hz, **C-1**), 132.0 (**C-4**), 128.3, 128.0 (**C-2**, **C-3**).

This molecule has been previously synthesized [52].

***N*-benzoyl-phosphotriamide (NBzPT) :**

The *N*-dichlorophosphinyl-benzenamide (1g, 4.2 mmol, 1eq) was suspended into anhydrous THF (15 mL), and ammonia gas was bubbled through until the pH of the solution was basic. The resulting solid was collected. The desired product was recrystallised from water, to afford a white solid in a 87% yield (0.73 g, 3.7 mmol).

TLC : R_f 0.5 (8:2 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO, δ_P) : 9.61.

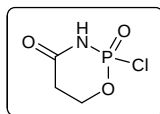
^1H NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) : 9.36 (s, 1H, **NH**), 7.99-7.95 (m, 2H, **H-2**), 7.56 (tt, 1H, $J_{3,4} = 7.4 \text{ Hz}$, $J_{2,4} = 1.3 \text{ Hz}$, **H-4**), 7.49-7.44 (m, 2H, **H-3**), 4.17 (d, 4H, $J_{P,NH_2} = 2.6 \text{ Hz}$, **NH₂**).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, δ_C) : 168.1 (d, $J_{P,CO} = 1.3 \text{ Hz}$, **CO**), 133.8 (d, $J_{P,1} = 7.3 \text{ Hz}$, **C-1**), 131.9 (**C-4**), 128.2 (**C-3**), 127.9 (**C-2**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NaN}_3\text{O}_2\text{P}$	m/z calculated :	222.04083
	m/z found :	222.0408

This molecule has been previously synthesized [12].

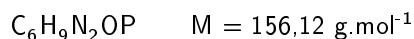
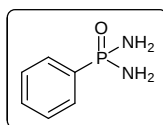
Cyclophosphoramidic chloride :

Acrylamide (2.0 g, 28.1 mmol, 1 eq) was added to a solution of PCl_5 (5.8 g, 28.1 mmol, 1 eq) into anhydrous CH_2Cl_2 (25 mL). The reaction was refluxed with stirring for 40 min under nitrogen atmosphere, by which time HCl gas evolution had ceased. Then formic acid (1.06 mL, 28.1 mmol, 1 eq) was slowly added. After 40 more minutes stirring, when the evolution of gas had ceased again the mixture was cooled at room temperature, then dried under reduced pressure. The resulting crude contained mostly the cyclophosphoramidic chloride.

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3 , δ_{P}) : 8.67.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ_{H}) : 9.68 (s, 1H, **NH**), 3.80 (t, 2H, $J_{1-2} = 6.4$ Hz, **H-1**), 2.90 (td, 2H, $J_{\text{P-1}} = 0.8$ Hz, **H-2**).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ_{C}) : 170.0 (d, $J_{\text{P,CO}} = 5.3$ Hz, **CO**), 39.9 (d, $J_{\text{P,1}} = 9.8$ Hz, **C-1**), 37.97 (d, $J_{\text{P,2}} = 1.5$ Hz, **C-2**).

Diamide phenylphosphonique (DPHP) :

The phenylphosphonic dichloride (0.5 mL, 3.6 mmol, 1eq) was suspended in anhydrous diethyl ether (10 mL) and the mixture was thermostated at -196°C under nitrogen atmosphere. An excess of ammonia gas was condensed into the mixture. Then, the stirred solution was slowly heated until room temperature. Finally, the pH was controlled basic, and the resulting solid was collected by filtration. The product was extracted with MeOH, then dried under reduced pressure. A purification by chromatography column on silica gel (9 :1 CH_2Cl_2 – MeOH), followed by a recrystallisation into water, afford the desired product in a 62% yield (0.35 g, 2.2 mmol).

TLC : R_f 0.4 (4:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO, δ_P) : 18.16.

^1H NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) : 7.80-7.74 (m, 2H, **H-2**), 7.46-7.37 (m, 3H, **H-3**, **H-4**), 4.01 (s, 4H, **NH₂**).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, δ_C) : 138.5 (d, $J_{P,1} = 146.9$ Hz, **C-1**), 130.7 (d, $J_{P,3} = 9.8$ Hz, **C-3**), 129.9 (d, $J_{P,4} = 2.8$ Hz, **C-4**), 127.5 (d, $J_{P,2} = 12.5$ Hz, **C-2**).

ESI-HRMS : $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_6\text{H}_9\text{NaN}_2\text{OP}$	m/z calculated :	179.03502
	m/z found :	179.0351

This molecule has been previously synthesized [82].

In vitro urease activity One millilitre of buffer solution ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 70 mM, pH 7), 1 mL of inhibitor solution (at different concentrations), and 10 μL of jack bean urease solution (2.8 mg/mL, Sigma U-1500 35.500) were mixed in test tubes and incubated for 30 min at 37 °C (blank solution consisted of the same mixture without inhibitor). Afterward, 1 mL of urea solution (6 mg/mL) was added, with incubation again for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 2 mL of 0.033 N HCl. Each inhibitor dose was tested in triplicate. The level of ammonium released was determined photometrically, using the ammonium Test from Merck (Ref 1.14752.0001). The inhibition percentage $\text{Inh}(\%)$ was calculated as

$$\text{Inh}(\%) = 100 - 100 \cdot \frac{A_{\text{Inh}}}{A_B}$$

where A_{Inh} and A_B are the absorbance at 692 nm in the test tubes, with and without inhibitor, respectively.

Degradation tests in acidic media by ^{31}P NMR :

Influence of formulation on the NBPT dégradation in acidic media : The necessary amount of formulation for having 10 mg of **NBPT** was mixed with 250 μL water in NMR tubes (blank solution consisted in 40 mg agrotain in 250 μL of water). The solution was heated until **NBPT** dissolution. 250 μL of acidic buffer solution ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, 500 mM, pH 5,5) was added. Then, a fused capillary containing a invariant H_3PO_4 solution in D_2O was inserted, and the degradation of **NBPT** was followed by ^{31}P NMR. The degradation of **NBPT** was deduced from the decrease of the 60.5 ppm pic's area (corresponding to the **NBPT**) compared to the constant -0.3 ppm pic's area (corresponding to the H_3PO_4).

Degradation of a phosphorus containing molecule in acidic media : 0.06 mmol of phosphorated molecule and 250 μL water were mixed together in NMR tubes (DMSO was added in the case of non soluble molecule). The solution was heated until total dissolution. 250 μL of acidic buffer solution ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, 500 mM, pH 5,5) was added. Then, a fused capillary containing a invariant H_3PO_4 solution in D_2O was inserted, and the degradation of the phosphorated molecule was followed by ^{31}P NMR. The degradation of the molecule was deduced from the decrease of the corresponding pic's area compared to the constant -0.3 ppm pic's area (corresponding to the H_3PO_4).

Characterisation of CD α /NBPT inclusion complex :

Ratio determination : Job's Plot method A solution of CD α in water (10 mM) and a solution of **NBPT** in methanol (10 mM) were prepared. Different ratio of these two solutions were mixed together in test tubes (from 0:10 to 10:0), for a total volume of 1 mL, according to the following table.

Ratio of NBPT (r) into the resulting mixture	Volume introduced (mL)	
	NBPT (10 mM)	CD α (10 mM)
1	1	0
0.9	0.9	0.1
0.8	0.8	0.2
0.7	0.7	0.3
0.6	0.6	0.4
0.5	0.5	0.5
0.4	0.4	0.6
0.3	0.3	0.7
0.2	0.2	0.8
0.1	0.1	0.9
0	0	1

Then, mixtures were lyophilised. The resulting solid was solubilised into 1 mL of D₂O, and analysed by ¹H NMR. For each ratio of **NBPT** (r) and for each proton of **NBPT** (i), the variation of chemical shift ($\Delta\delta_r^i$) was calculated as:

$$\Delta\delta_r^i = \delta_r^i - \delta_1^i$$

For each ratio of CD α ($1 - r$) and for each proton of CD α (j), the variation of chemical shift ($\Delta\delta_{1-r}^j$) was calculated as:

$$\Delta\delta_{1-r}^j = \delta_{1-r}^j - \delta_0^j$$

Where

$$r = \frac{[NBPT]}{[NBPT] + [CD\alpha]}$$

Then $r.\Delta\delta_r^i$ and $(1 - r).\Delta\delta_{1-r}^j$ were plot against r . Resulting curves went through a maximum, at the r value corresponding to the ratio of the complex.

Association constant determination : Benesi-Hildebrand method A solution of **NBPT** in water (5 mM) and a solution of $CD\alpha$ in methanol (125 mM) were prepared. Different amount of these two solution were mixed with water, according to the following table, for a total volume of 500 μ L, a constant concentration of **NBPT** (1 mM), and a varying concentration of $CD\alpha$ (from 50 to 100 mM).

Concentration into the resulting mixture (mM)		Volume introduced (μ L)		
NBPT	$CD\alpha$	NBPT (5 mM)	$CD\alpha$ (125 mM)	Water
1	100	100	400	0
1	85	100	340	60
1	80	100	320	80
1	75	100	300	100
1	70	100	280	120
1	65	100	260	140
1	62.5	100	250	150
1	60	100	240	160
1	57.5	100	230	170
1	55	100	220	180
1	52.5	100	210	190
1	50	100	200	200

Then, mixtures were lyophilised. The resulting solid was solubilised into 500 μ L of D_2O , and analysed by 1H NMR. For each concentration of $CD\alpha$ ($[CD\alpha]$), and for each proton of **NBPT** (i), the variation of chemical shift ($\Delta\delta_{[CD\alpha]}^i$) was calculated as:

$$\Delta\delta_{[CD\alpha]}^i = \delta_{[CD\alpha]}^i - \delta_0^i$$

Then, $\frac{1}{\Delta\delta_{[CD\alpha]}^i}$ was plot against $\frac{1}{[CD\alpha]}$. Resulting curves obey to a linear equation.

The association constant of the complex (K_a) and the variations of chemical shifts of **NBPT** in the pure complex ($\Delta\delta_{Cpx}^i$) were deduced from equations of the intercept and the slope of the curves:

$$intercept = \frac{1}{\Delta\delta_{Cpx}^i}$$

$$slope = \frac{1}{K_a \cdot \Delta\delta_{Cpx}^i}$$

Bibliographie

Références bibliographiques

- [1] Abe, M., Akiyama, T., Nakamura, H., Kojima, F., Harada, S., and Muraoka, Y. (2004) First synthesis and determination of the absolute configuration of sulphostin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *J. Nat. Prod.* 67, 999–1004.
- [2] Abe, M., Akiyama, T., Umezawa, Y., Yamamoto, K., Nagai, M., Yamazaki, H., Ichawa, Y. I., and Muraoka, Y. (2005) Synthesis and biological activity of sulphostin analogues, novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 785–797.
- [3] Abe, M., Nagai, M., Yamamoto, K., Yamazaki, H., Koga, I., Satoh, Y., Muraoka, Y., Kurashige, S., and Ichikawa, Y.-I. (2005) Development of a large-scale synthesis of sulphostin, a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Org. Process Res. Dev.* 9, 570–576.
- [4] Abraham, R. T., Benson, L. M., and Jardine, I. (1983) Synthesis and pH-dependant stability of purine-6-sulfenic acid, a putative reactive metabolite of 6-thiopurine. *J. Med. Chem.* 26, 1523–1526.
- [5] Al-Soufi, W., Ramos Cabrer, P., Jover, A., Budal, R. M., and Vázquez Tato, J. (2003) Determination of second-order association constants by global analysis of ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts. Application to the complexation of sodium fusidate and potassium helvolate by β - and γ -cyclodextrin. *Steroids* 68, 43–53.
- [6] Amtul, Z., Follmer, C., Mahboob, S., ur Rahman, A., Mazhar, M., Khan, K. M., Siddiqui, R. A., Muhammad, S., Kazmi, S. A., and Choudhary, M. I. (2007) Germa- γ -lactones as novel inhibitors of bacterial urease activity. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 356, 457–463.
- [7] Amtul, Z., Rasheed, M., Choudhary, M. I., Rosanna, S., Khan, K. M., and ur Rahman, A. (2004) Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles. *Biochemical and biophysical research communications* 319, 1053–1063.
- [8] Anderson, D., Bishop, J. B., Garner, R. C., Ostrosky-Wegman, P., and Selby, P. B. (1995) Cyclophosphamide : Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutation Res.* 330, 115–181.
- [9] Andrews, R. K., Dexter, A., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1986) Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). 8. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7124–7125.
- [10] Balasubramanian, A., and Ponnuraj, (2010) Crystal structure of the first plant urease from jack bean : 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J. Mol. Biol.* 400, 274–283.
- [11] Barrios, A. M., and Lippard, S. J. (2000) Interaction of urea with a hydroxide-bridged dinuclear nickel center : an alternative model for the mechanism of urease. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9172–9177.
- [12] Bayless, A. V., and Millner, O. E. n-[diaminophosphinyl]arylcarboxamides. U.S. Patent 4,182,881, 1980.
- [13] Benesi, H. A., and Hildebrand, J. H. (1949) A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 2703–2707.
- [14] Benini, S., Ciurli, S., Nolting, H. F., and Mangani, S. (1996) X-ray absorption spectroscopy study of native and phenylphosphorodiamidate-inhibited *Bacillus pasteurii* urease. *Eur. J. Biochem.* 239, 61–66.
- [15] Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Ciurli, S., and Mangani, S. (2001) Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate : novel insights into the enzyme mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6, 778–790.
- [16] Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Ciurli, S., and Mangani, S. (1998) The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65-Å resolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 268–273.
- [17] Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Mangani, S., and Ciurli, S. (2004) Molecular details of urease inhibition by boric acid : insights into the catalytic mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3714–3715.
- [18] Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., Ciurli, S., and Mangani, S. (2000) The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55 Å resolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 110–118.
- [19] Benini, S., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., Ciurli, S., and Mangani, S. (1999) A new proposal

- for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii* : why urea hydrolysis cost two nickels. *Structure* 7, 205–216.
- [20] Berlicki, L., Bochno, M., Grabowiecka, A., Bialas, A., Kosikowska, P., and Kafarski, P. (2011) N-substituted aminomethanephosphonic and aminomethane-*P*-methylphosphinic acids as inhibitors of ureases.
- [21] Bernat, V., Ringard-Lefebvre, C., Le Bas, G., Perly, B., Djedaïni-Pilard, F., and Lesieur, S. (2008) Inclusion complex of n-octyl β -D-glucopyranoside and α -cyclodextrin in aqueous solutions : Thermodynamic and structural characterization. *Langmuir* 24, 3140–3149.
- [22] Bezgubenko, L. V., Pipko, S. E., Shalimov, A. A., and Sinitsa, A. (2008) Nucleophilic catalysis of phosphorus trichloride oxygen oxidation. *Heteroatom Chem.* 19, 408–411.
- [23] Biwer, A., Antranikian, G., and Heinzle, E. (2002) Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 609–617.
- [24] Blakeley, R. L., Treston, A., Andrews, R. K., and Zerner, B. (1982) Nickel(II)-promoted ethanolysis and hydrolysis of *N*-(2-pyridylmethyl)urea. A model for urease. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 612–614.
- [25] Chen, W., Li, Y., Cui, Y., Zhang, X., Zhu, H.-L., and Zheng, Q. (2010) Synthesis, molecular docking and biological evaluation of Schiff base transition metal complexes as potential urease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 4473–4478.
- [26] Csiki, C., and Zimmer, M. (1998) Computational design of biomimetic compounds : urease an example. *J. Molec. Struct.* 442, 11–17.
- [27] Cui, S. W. In *Food carbohydrates : Chemistry, physical properties, and applications*; Group, T. . F., Ed. ; 2005 ; Chapter 5, pp 219–262.
- [28] Cui, S. W. In *Food carbohydrates : Chemistry, physical properties, and applications*; Group, T. . F., Ed. ; 2005 ; Chapter 6, pp 263–308.
- [29] Cui, S. W. In *Food carbohydrates : Chemistry, physical properties, and applications*; Group, T. . F., Ed. ; 2005 ; Chapter 7, pp 309–356.
- [30] Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1975) Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4131–4133.
- [31] Domínguez, M. J., Sanmartín, C., Font, M., Palop, J. A., San-Francisco, S., Urrutia, O., Houdusse, F., and García-Mina, J. M. (2008) Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3721–3731.
- [32] Douglass, E. A., and Hendrickson, L. L. (1991) HPLC method for the analysis of the urease inhibitor *N*-(*n*-butyl)thiophosphoric triamide and its metabolites. *J. Agric. Food chem.* 39, 2318–2321.
- [33] Estiu, G., and Merz, K. M. (2007) Competitive hydrolytic and elimination mechanisms in the urease catalyzed decomposition of urea. *J. Phys. Chem. B* 111, 10263–10274.
- [34] Estiu, G., and Merz, K. M. (2006) Catalyzed decomposition of urea. Molecular dynamics simulations of the binding of urea to urease. *Biochem.* 45, 4429–4443.
- [35] Estiu, G., and Merz, K. M. (2004) Enzymatic catalysis of urea decomposition : elimination or hydrolysis? *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11832–11842.
- [36] Ficarra, R., Ficarra, P., Di Bella, M. R., Raneri, D., Tommasini, S., Calabró, M. L., Villari, A., and Coppolino, S. (2000) Study of the inclusion complex of atenolol with β -cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 231–236.
- [37] Fielding, L. (2000) Determination of association constants (*K*_a) from solution NMR data. *Tetrahedron* 56, 6151–6170.
- [38] Font, M., Domínguez, M. J., Sanmartín, C., Palop, J. A., San-Francisco, S., Urrutia, O., Houdusse, F., and García-Mina, J. M. (2008) Structural characteristics of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. Requirements for activity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8451–8460.
- [39] Freedman, L. D., Tauber, H., Doak, G. O., and Magnuson, H. J. (1953) The preparation of some organophosphorus compounds possessing anticholinesterase activity. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1379–1381.
- [40] Gholivand, K., Alizadehgan, A. M., Mojahed, F., and Soleimani, P. (2008) Crystal structures and mass spectral fragmentation studies of some new carbacylamino-phosphate compounds. *Polyhedron* 27, 1639–1649.
- [41] Gholivand, K., Mojahed, F., Madani Alizadehgan, A., and Reza Bijanzadeh, H. (2006) Synthesis and characterisation of novel carbacylamidophosphate derivatives : crystal structure of (p-Cl-C₆H₄)C(O)NHP(O)(NC₅H₁₀)₂ and (p-Br-C₆H₄)C(O)NHP(O)(NC₅H₁₀)₂. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 632, 1570–1577.
- [42] Gholivand, K., Shariatinia, Z., Mahdih Mashhadi, S., Daepour, F., Farshidnasab, N., Reza Mahzouni, H.,

- Taheri, N., Amiri, S., and Ansar, S. (2009) Structural diversity in phosphoramidate's chemistry : Syntheses, spectroscopic and X-ray crystallography studies. *Polyhedron* 28, 307–321.
- [43] Gibaud, S., Ben Zrar, S., Mutzenhardt, P., Fries, I., and Astier, A. (2005) Melarsoprol-cyclodextrin inclusion complexes. *Int. J. Pharm.* 306, 107–121.
- [44] Goehring, M., and Niedenzu, K. (1956) Phosphorous-nitrogen compounds. I. The amides of phosphoric acid and thiophosphoric acid. *Chemische Berichte* 89, 1768–1771.
- [45] Ha, N.-C., Oh, S.-T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H., and Oh, B.-H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* 8, 505–509.
- [46] Heinemann, C., Escher, F., and Conde-Petit, B. (2003) Structural features of starch-lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions : the role of amylose and amylopectin. *Carbohydrate polymers* 21, 159–168.
- [47] Huitema, A. D. R., Tibben, M. M., Kerbusch, T., Kettenes-van den Bosch, J. J., Rodenhuis, S., and Beijnen, J. H. (2000) Simple and selective determination of the cyclophosphamide metabolite phosphoramidate mustard in human plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 745, 345–355.
- [48] Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., and Karplus, P. A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* 268, 998–1004.
- [49] Jedner, S. B., Schwöppe, H., Nimir, H., Rompel, A., Brown, D. A., and Krebs, B. (2002) Ni(II) complexes as models for inhibited urease. *Inorg. Chim. Acta* 340, 181–186.
- [50] Karplus, P. A., Pearson, M. A., and Hausinger, R. P. (1997) 70 years of crystalline Urease : what have we learned ? *Acc. Chem. Res.* 30, 330–337.
- [51] Khan, K. M., Iqbal, S., Lodhi, M. A., Maharvi, G. M., Zia-Ullah, Choudhary, M. I., ur Rahman, A., and Perveen, S. (2004) Biscoumarin : new class of urease inhibitors ; economical synthesis and activity. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1963–1968.
- [52] Kirsanov, A. V., and Makitra, R. G. (1956) Dichlorides of acylamidophosphoric acids of aromatic series. *Zhurnal Obshchei Khimii* 26, 905–907.
- [53] Kobashi, K., Hase, J. I., and Uehara, K. (1962) Specific inhibition of urease by hydroxamic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 380–383.
- [54] Kolc, J. F., Swerdloff, M. D., Rogic, M. M., and Hendrickson, L. L. U.S. Patent 4,517,003, 1985.
- [55] Kolc, J. F., Swerdloff, M. D., Rogic, M. M., Hendrickson, L. L., and Van Der Puy, M. U.S. Patent 4,530,714, 1985.
- [56] Krajewska, B. (2009) Urease I. Fonctional, catalytic and kinetic properties : A review. *J. Molec. Cat. B : Enzymatic* 59, 9–21.
- [57] Krajewska, B., and Ciurli, S. (2005) Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid-base groups of the active site by pH variation. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 651–658.
- [58] Krajewska, B., and Zaborska, W. (2007) Jack bean urease : the effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. *Bioorg. Chem.* 35, 355–365.
- [59] Kundu, T. K., Hanumantha Rao, K., and Parker, S. C. (2003) Atomistic simulation of the surface structure of wollastonite and adsorption phenomena relevant to flotation. *Int. J. Miner. Process.* 72, 111–127.
- [60] Lehtovaara, B. C., and Gu, F. X. (2011) Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1,3- β -glucans. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6813–6828.
- [61] Manunza, B., Deiana, S., Pintore, M., and Gessa, C. (1999) The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and *N*-(*N*-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biol. Biochem.* 31, 789–796.
- [62] Marçon, F., Mathiron, D., Pilard, S., Lemaire-Hurtel, A. S., Dubaele, J. M., and Djedaini-Pilard, F. (2009) Development and formulation of a 0.2% oral solution of midazolam containing γ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 79, 244–250.
- [63] Mazzucato, E., and Gualtieri, A. F. (2000) Wollastonite polytypes in the CaO-SiO₂ system. Part I. Crystallisation kinetics. *Phys. Chem. Minerals* 27, 565–574.
- [64] McCarty, G. W., and Bremner, J. M. (1989) Formation of phosphoryl triamide by decomposition of thiophosphoryl triamide in soil. *Biol. Fertil. Soils* 8, 290–292.
- [65] McCarty, G. W., Bremner, J. M., and Chai, H. S. (1989) Effect of *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide on hydrolysis of urea by plant, microbial, and soil urease. *Biol. Fert. Soil* 8, 123–127.
- [66] Mobley, H. L. T., Island, M. D., and Hausinger, R. P. (1995) Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.

- [67] Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.-M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., and García-Mina, J.-M. (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J. Plant Physiol.* 167, 633–642.
- [68] Musiani, F., Arnofi, E., Casadio, R., and Ciurli, S. (2001) Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6, 300–314.
- [69] Oana, M., Tintaru, A., Gavrilu, D., Maior, O., and Hillebrand, M. (2002) Spectral study and molecular modeling of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with some phenoxathiin derivatives. *J. Phys. Chem.* 106, 257–263.
- [70] Pearson, M. A., Overbye Michel, L., Hausinger, R. P., and Karplus, P. A. (1997) Structure of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease. *Biochem.* 36, 8164–8172.
- [71] Pearson, M. A., Park, I. S., Schaller, R. A., Michel, L. O., Karplus, P. A., and Hausinger, R. P. (2000) Kinetic and structural characterisation of urease active site variants. *Biochem.* 39, 8575–8584.
- [72] Percival, E. *Chemistry and Enzymology of marine algal polysaccharides*; Academic Press Inc., 1967.
- [73] Perry, B. J., Reesor, J. B., and Ferron, J. L. (1963) The synthesis of alkylphosphonous dichlorides from aluminium chloride-phosphorus trichloride-alkyl chloride complexes. *Can. J. Chem.* 41, 2299–2302.
- [74] Pitha, J. U.S. Patent 4,727,064, 1988.
- [75] Reesor, J. B., Perry, B. J., and Sherlock, E. (1960) The synthesis of highly radioactive isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin) containing P^{32} as tracer element. *Can. J. Chem.* 38, 1416–1427.
- [76] Rogers, R. S. (1992) general synthesis of phosphonic acid dichlorides using oxalyl chloride and DMF catalysis. *Tetrahedron Lett.* 33, 7473–7474.
- [77] Rose, N. J., and Drago, R. S. (1959) Molecular addition compounds of iodine. I. An absolute method for spectroscopic determination of equilibrium constants. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 6138–6141.
- [78] Salvatierra, D., Díez, C., and Jaime, C. (1997) Host/Guest interactions and NMR spectroscopy. A computer program for association constant determination. *J. Incl. Phenom. Molec. Rec. Chem.* 27, 215–231.
- [79] Shen, C., Wang, Y., Zhou, J., Chen, C., and Yang, X. Complexation of capsaicin with β -Cyclodextrins to improve pesticide formulations : effect on aqueous solubility, dissolution rate, stability and soil adsorption. *doi :10.1016/j.carbpol.2011.04.067*
- [80] Siddall, T. H., and Prohaska, C. A. (1963) Preparation of t-alkylphosphonic dichlorides. *J. Org. Chem.* 28, 2908–2908.
- [81] Sivapriya, K., Suguna, P., Banerjee, A., Saravanan, V., Rao, D. N., and Chandrasekaran, S. (2007) Facile one-pot synthesis of thio and selenourea derivatives : A new class of potent urease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6387–6391.
- [82] Smith, W. C., and Audrieth, L. F. (1957) Nitrogen compounds of the phosphoric and phosphonic acids. III. preparation and properties of amides of phenylphosphonic and phenylphosphonothioic acids. *The journal of organic chemistry* 22, 265–267.
- [83] Stemmler, J. A., Kampf, J. W., Kirk, M. L., and Pecoraro, V. L. (1995) A model for the inhibition of urease by hydroxamates. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6368–6369.
- [84] Stevenson, F. J. In *Humus chemistry : genesis, composition, reactions - 2nd ed.*; John Wiley & sons, I., Ed.; 1994; Chapter 12, pp 285–302.
- [85] Stevenson, F. J. In *Humus chemistry : genesis, composition, reactions - 2nd ed.*; John Wiley & sons, I., Ed.; 1994; Chapter 14, pp 325–349.
- [86] Stevenson, F. J. In *Humus chemistry : genesis, composition, reactions - 2nd ed.*; John Wiley & sons, I., Ed.; 1994; Chapter 19, pp 453–471.
- [87] Stevenson, F. J. In *Humus chemistry : genesis, composition, reactions - 2nd ed.*; John Wiley & sons, I., Ed.; 1994; Chapter 8, pp 188–211.
- [88] Sulzer, G. M., Cheng, C. H., Klobucar, W. D., and Kolich, C. H. U.S. Patent 5,883,297, 1999.
- [89] Sulzer, G. M., Cheng, C. H., Klobucar, W. D., and Kolich, C. H. U.S. Patent 5,770,771, 1998.
- [90] Sumner, J. B. (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 435–441.
- [91] Swerdloff, M. D., Kolc, J. F., Rogic, M. M., and Hendrickson, L. L. U.S. Patent 4,517,004, 1985.
- [92] Swerdloff, M. D., Van Der Puy, M., Kolc, J. F., Rogic, M. M., and Hendrickson, L. L. U.S. Patent 4,539,037, 1985.
- [93] Takishima, K., Suga, T., and Mamiya, G. (1988) The structure of jack bean urease - The complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues. *Eur. J. Biochem.* 175, 151–165.

-
- [94] Tanaka, T., Kawase, M., and Tani, S. (2004) α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 501–505.
 - [95] Tanaka, T., Kawase, M., and Tani, S. (2003) Urease inhibitory activity of simple α,β -unsaturated ketones. *Life Sci.* **73**, 2985–2990.
 - [96] Todd, M. J., and Hausinger, R. P. (1989) Competitive inhibitors of *klebsiella aerogenes* urease. Mechanism of interaction with the nickel active site. *J. Biol. Chem.* **264**, 15835–15842.
 - [97] Toy, A. D. F., and Uhing, E. H. U.S. Patent 3,897,491, 1975.
 - [98] Vassiliou, S., Grabowiecka, A., Kosikowska, P., Yiotakis, A., Kafarski, P., and Berlicki, L. (2008) Design, synthesis, and evaluation of novel organophosphorus inhibitors of bacterial ureases. *J. Med. Chem.* **51**, 5736–5744.
 - [99] Weston, C. W., Peacock, L. A., and Thornsberry, W. L. U.S. Patent 5,364,438, 1994.
 - [100] Weston, C. W., Peacock, L. A., Thornsberry, W. L., and Sutton, A. R. U.S. Patent 5,352,265, 1994.
 - [101] Xiao, Z.-P., Shi, D.-H., Li, H.-Q., Zhang, L.-N., Xu, C., and Zhu, H.-L. (2007) Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3703–3710.
 - [102] Xie, Z., and Walther, J. V. (1994) Dissolution stoichiometry and alkali and alkaline earth elements to the acid-reacted wollastonite surface at 25°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 2587–2598.
 - [103] You, Z.-L., Ni, L.-L., Shi, D.-H., and Bai, S. (2010) Synthesis, structures, and urease inhibitory activities of three copper(II) and zinc(II) complexes with 2-[2-(2-hydroxyethylamino)ethylimino] methyl-4-nitrophenol. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 3196–3199.
 - [104] You, Z.-L., Zhang, L., Shi, D.-H., and Ni, L.-L. (2009) Synthesis and crystal structure of a novel one-dimensional silver(I) complex with high urease inhibitory activity. *Inorg. Chem. Com.* **12**, 1231–1233.
 - [105] Young, S.-H., Dong, W.-J., and Jacobs, R. R. (2000) Observation of a partially opened triple-helix conformation in 1 $\rightarrow$ 3- β -glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **275**, 11874–11879.
 - [106] Zaborska, W., Krajewska, B., Kot, M., and Karcz, W. (2007) Quinone-induced inhibition of urease : Elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme. *Bioorg. Chem.* **35**, 233–242.
 - [107] ul Haq, Z., Lodhi, M. A., Nawaz, S. A., Iqbal, S., Khan, K. M., Rode, B. M., ur Rahman, A., and Choudhary, M. I. (2008) 3D-QSAR CoMFA studies on *bis*-coumarine analogues as urease inhibitors : A strategic design in anti-urease agents. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 3456–3461.
 - [108] Zambelli, B., Musiani, F., Benini, S., and Ciurli, S. (2011) Chemistry of Ni²⁺ in Urease : sensing, trafficking, and catalysis. *Acc. Chem. Res.* doi : 10.1021/ar200041k.

Conclusion générale

Dans le cadre du projet AZOSTIMER, nous avons voulu améliorer l'efficacité des engrais azotés. Pour cela, il est nécessaire de limiter les nombreuses pertes d'azotes, aux conséquences environnementales néfastes, afin d'augmenter la quantité de nutriments disponibles pour la croissance des plantes. Les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification permettent de réguler la concentration des différentes formes de l'azote dans le sol, évitant ainsi les accumulations responsables des pertes azotées. Le développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification, plus efficaces, moins fragiles et moins toxiques, est nécessaire. Nous nous étions donné comme objectif d'améliorer les performances du **MBT**, inhibiteur de la nitrification, et du **NBPT**, inhibiteur d'uréases. Trois travaux indépendants ont pour cela été réalisés : (i) la glycosylation du **MBT** et de son homologue le **MBI**, accompagnée de l'évaluation du comportement des molécules obtenues ; (ii) la construction, par formulation, d'un environnement capable d'isoler le **NBPT** des milieux acides et de ralentir sa dégradation ; (iii) la synthèse et l'évaluation de différentes familles de phosphotriamides, a priori moins instables que le **NBPT**.

Dans la première partie de ce travail, le **MBT** et le **MBI** ont été glycosylés avec succès à l'aide de glucose, lactose, cellobiose, gentiobiose et arabinofuranose. Les résultats attendus en terme d'hydrosolubilité et d'écotoxicité ont été obtenus, puisque les molécules glycosylées, à l'exception des dérivés d'arabinofuranose, ont révélé une nette amélioration de ces deux facteurs. L'activité des inhibiteurs glycosylés est restée identique à celle des molécules de départ, que ce soit *in vitro* ou dans les sols. Mais, si aucune amélioration de l'efficacité n'a été observée de prime abord, le facteur de biodisponibilité n'est pas entré en compte lors de ces tests. Le **MBI** et ses dérivés ont montré une efficacité tout à fait convaincante, en plus d'une toxicité amoindrie par rapport au **MBT**. De plus, le **MBT** et le **MBI** ont dévoilé une complémentarité d'utilisation, avec une efficacité préférentielle respectivement en sols acide et en sol alcalin. Enfin, le facteur de dégradabilité dans les sols a pu être évalué sur les dérivés du gentiobiose. Une fois encore, les objectifs ont été atteints, puisque l'inhibiteur glycosylé, pourtant stable en solution aqueuse, relargue le principe actif dans les sols par l'action des micro-organismes hétérotrophes, vérifiant ainsi le concept de pro-drogue. Enfin, une expérimentation préliminaire sur colonnes de sols a révélé une augmentation de la mobilité des molécules glycosylées, ce qui présage une amélioration de la biodisponibilité, quoique ce facteur nécessite une étude plus approfondie.

Dans le but de construire, autour du **NBPT**, un environnement défavorisant sa dégradation en milieu acide, de nombreuses formulations ont été développées, parmi lesquelles, quatre (à base d'empois d'amidon, de wollastonite, d'acides humiques et d' α -cyclodextrine) ont diminué la cinétique de dégradation du **NBPT** en solution aqueuse acide, bien qu'aucune des formulations testées sur les sols n'ait apporté d'améliorations. Il semble que les interactions existant entre le **NBPT** et les composés choisis pour l'enrober, ne soient pas suffisamment puissantes pour différer le relargage, et ainsi la dégradation du **NBPT** dans les sols. Pourtant, la mise en évidence de la formation d'un complexe d'inclusion, totalement caractérisé, entre le **NBPT** et la l' α -cyclodextrine présente un intérêt certain. En effet, cette formulation permet une solubilisation aisée dans l'eau du **NBPT**, molécule non hydrosoluble, par l'utilisation d'une molécule totalement biocompatible. Ceci permettrait de remplacer les additifs jusqu'alors utilisés, dans l'Agrotain par exemple, et de limiter l'impact écologique d'une formulation liquide.

Deux types de modulations du **NBPT** ont été imaginés pour développer des inhibiteurs d'uréases moins sensibles à l'hydrolyse acide. La première consistait à ajouter un groupement électroattracteur en α de l'azote secondaire. Dans la seconde, cet azote était simplement retiré pour remplacer la liaison P-N, préférentiellement clivée par une liaison P-C. Bien que la synthèse des phosphoramides, très délicate, a causé de nombreuses difficultés, quatre molécules ont pu être synthétisées, dont le **NBPTO**, molécule de référence. Le **DPHP** a été écarté dès les tests de dégradation *in vitro* à pH acide. Le **NPhPT** et le **NBzPT**, se sont révélées peu efficaces dans les sols acides, résultat tout à fait inattendu dans le cas du **NBzPT** étant donné son excellente stabilité et sa bonne activité *in vitro* en comparaison avec le **NBPTO**.

Malgré tout, quelques remarques ont pu être énoncées sur les relations structure-activité et structure-stabilité chimique des phosphotriamides. Nous avons pu montrer que la présence d'un groupement électroattracteur en α de l'azote limite efficacement les dégradations de ces molécules en solutions acides, ce qui valide l'hypothèse de départ. Par ailleurs, il apparaît que l'encombrement d'un groupement aromatique diminue l'activité inhibitrice des phosphotriamides. A l'inverse, une fonction carbonyle située à proximité du motif phosphorylé semble augmenter l'interaction de l'inhibiteur avec le site actif des uréases, probablement grâce à la formation d'une liaison hydrogène.

Les résultats obtenus tout au long de ces trois axes de recherche ont été très encourageants. De nombreuses hypothèses de départ ont pu être vérifiées. Dans la grande majorité des cas, les expérimentations effectuées sur

des modèles ont montré des résultats très positifs. Cependant la difficulté de ces travaux résidait dans le passage du modèle vers l'application dans les sols, et les résultats obtenus *in vivo* n'ont pas toujours été à la hauteur de nos espérances.

De nombreuses interrogations se sont posées au cours de ces recherches, concernant la compréhension des mécanismes d'inhibition des uréases et de la nitrification dans les sols, qui restent encore en suspens. Quelle est l'influence de la mobilité des inhibiteurs dans les sols sur leur efficacité? Comment le taux de matière organique du sol, et notamment la quantité d'acides humiques, peut-il modifier la vitesse de dégradation du **NBPT**? En ce qui concerne l'inhibition des uréases et de la nitrification appliquée à l'agriculture, les phénomènes élucidés lors de ce travail de thèse nous ont permis d'ajouter une pierre à l'édifice. Un certain nombre de pistes de réflexions ont pu être apportées pour les expérimentations futures à mener dans le cadre de ces études.

Development of new inhibitors of ureases and nitrification for a phytosanitary use

Fertilizers based on urea, provide plants with the amount of nitrogen necessary for their growth. In soils, urea is degraded into ammonium by ureases. Next, ammonium is oxidized to nitrite, then to nitrate in the nitrification process. This last ion is fundamental for plant nutrition. However, this artificial input induces many ecological disturbances due to nitrogen loss in the atmosphere and groundwaters. This is why urease as well as nitrification inhibitors, which balance the presence of different forms of nitrogen in soils, are challenging targets for an efficient and responsible agriculture. Within the project AZOSTIMER, we were interested in improving the efficacy of MBT, a nitrification inhibitor, and NBPT, a urease inhibitor.

Firstly, we set out to improve the water solubility, and therefore, the biodisponibility of the MBT and the analogous MBI, by applying the concept of pro-drug. These molecules were bound to sugars by glycosidic synthesis and a set of glycosylated inhibitors were produced. The physicochemical (solubility, stability) and

biological (ecotoxicity, inhibition activity) properties were later evaluated, as well as the behavior of these molecules in soils (degradability, mobility).

Secondly, we wanted to extend the activity of NBPT in acidic soils by lowering its degradation, developing either new formulations based on encapsulation of the bioactive molecule or by designing new chemical modulations. Many formulations of NBPT were created and assessed (stability in acidic media, inhibition activity in soils). Phosphoramides were synthesized and evaluated in order to highlight correlations between the structure, and the stability or the activity.

NITRIFICATION INHIBITORS / 2-MERCAPTO-BENZOTHAZOLE (MBT) / 2-MERCAPTO-BENZIMIDAZOLE (MBI) / GLYCOSYLATION / UREASES INHIBITORS / N-BUTYL-PHOSPHOTRIAMIDE (NBPT) / STABILISATION / PHOSPHORAMIDE

Développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification à des fins phytosanitaires

L'urée, apportée dans les engrais, fournit aux plantes l'azote nécessaire à leur croissance. Dans le sol, elle est convertie en ammoniac par les uréases, puis, via le procédé de nitrification, est oxydée en nitrites, puis en nitrates, éléments essentiels pour la nutrition des plantes. Mais, cet apport artificiel conduit à de nombreux déséquilibres écologiques dus à d'importants rejets d'azote au niveau atmosphérique et aquatique. C'est pourquoi les inhibiteurs d'uréases et de la nitrification, qui régulent la présence des différentes formes de l'azote dans le sol, sont d'un intérêt majeur en agriculture. Dans le cadre du projet AZOSTIMER, nous avons voulu améliorer l'efficacité du MBT, inhibiteur de la nitrification, et du NBPT, inhibiteur d'uréases.

Nous avons tout d'abord souhaité améliorer l'hydrosolubilité, et ainsi la biodisponibilité du MBT et d'un homologue, le MBI, par mise à profit du concept de pro-drogue. Ces molécules ont été conjuguées à des sucres par synthèse glycosidique et une famille d'inhibiteurs glycosylés a été préparée. Par la suite, les propriétés

physico-chimiques (solubilité, stabilité), biologiques (écotoxicité, activité) et le comportement dans les sols (dégradabilité, mobilité) ont été évalués.

Dans un second temps, nous avons voulu prolonger l'activité du NBPT dans les sols acides en limitant sa dégradation, soit par encapsulation dans une formulation, soit par modulations chimiques. De nombreuses formulations du NBPT ont été développées puis évaluées (stabilité en milieu acide, activité dans les sols). Des phosphoramides ont été synthétisés et évalués afin de mettre en évidence des relations structure-stabilité chimique et structure-activité.

INHIBITEURS DE LA NITRIFICATION / 2-MERCAPTO-BENZOTHAZOLE (MBT) / 2-MERCAPTO-BENZIMIDAZOLE (MBI) / GLYCOSYLATION / INHIBITEURS D'URÉASES / N-BUTYL-PHOSPHOTRIAMIDE (NBPT) / STABILISATION / PHOSPHORAMIDE