

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE DÉPISTAGE DES
INSECTICIDES NÉONICOTINOÏDES VIA L'APPARITION D'UN SIGNAL DE
FLUORESCENCE.

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN CHIMIE

PAR
AMIRA KHELIL

MARS 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à Monsieur Daniel Chapdelaine, mon directeur de recherche, qui a acceptée de m'encadrer et de m'intégrer à son équipe, pour son engagement sans failles à mes côtés, son écoute, ses conseils avisées et ses grandes compétences scientifiques. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et soyez assuré Monsieur, de toute mon estime et mon profond respect.

Mes remerciements les plus sincères à Monsieur Mathieu Frenette, professeur à l'Université du Québec à Montréal (UQAM) qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce mémoire et d'accepter de l'évaluer. Trouvez ici Monsieur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements les plus sincères à Monsieur Benoit Daoust, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce mémoire et d'accepter de l'évaluer. Trouvez ici Monsieur, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également Dr Leanne Ohlund, assistante de recherche à l'UQAM, pour sa disponibilité et son professionnalisme dans l'analyse HPLC-MS de nos échantillons.

Mes remerciements s'adressent aussi à Dr Gwenaël Chamoulaud et Dr Alexandre Arnold, pour m'avoir prêté aide et assistance à chaque fois que je les ai sollicités, dans le cadre de mon projet d'étude.

Je remercie également Camille Cousseau et Oscar Quintana Sanchez, mes collègues de laboratoire pour les moments de complicité et de joie que nous avons partagés ensemble.

Mes pensées les plus affectueuses vont à mes parents, mon oncle, ma sœur Amel, mon frère Arezki, ma belle-sœur Sofia et ma cousine Lynda pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur soutien indéfectible tout au long de ces deux années, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont soutenue dans la réalisation de ce mémoire dans les meilleures conditions.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCTION.....	18
CHAPITRE I PARTIE THÉORIQUE.....	21
1.1 Importance des abeilles dans les écosystèmes.....	21
1.2 Insecticides néonicotinoïdes	22
1.2.1 Définition des néonicotinoïdes et importance de leur utilisation.....	22
1.2.2 Effets des néonicotinoïdes sur les abeilles	26
1.2.3 Dégradation des néonicotinoïdes	28
1.2.4 Méthodes de détection usuelle des néonicotinoïdes.....	32
1.3 Méthodes de détection par apparition d'un signal fluorescent.....	33
1.3.1 Définition du phénomène de fluorescence.....	33
1.3.2 Méthodes d'observation qualitative de la fluorescence	36
1.3.3 Méthodes d'analyse quantitative basées sur la fluorescence	37
1.3.4 Détection de l'apparition de fluorescence via la réaction impliquant un analyte et une sonde fluorescente	39
1.3.5 Détection d'ions nitrites et d'espèces azotées réactives avec des sondes fluorescentes.....	44
CHAPITRE II PARTIE EXPÉRIMENTALE	46
2.1 Matériels et méthodes.....	46
2.1.1 Substances utilisées	46
2.1.2 Appareils	47
2.2 Synthèses chimiques.....	48

2.2.1 Synthèse du complexe perchlorate de bis(acétonitrile)-3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one cuivre (II) 7	48
2.2.2 Synthèse multi-étapes de 4-(7-méthoxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromèn-4-yl)-2,6-diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle (4)	51
2.3 Photolyse de l'imidaclopride 1 , du clothianidine 2 et du thiaméthoxame 3	53
2.4 Analyses de l'imidaclopride 1 et de ses produits de dégradation par HPLC-MS	54
2.5 Détection de l'imidaclopride 1 par des sondes fluorescentes	54
2.5.1 Détection de l'imidaclopride 1 par l'acide folique 12	55
2.5.2 Détection de l'imidaclopride 1 avec le complexe organocuvré 7	56
2.5.3 Détection de l'imidaclopride 1 avec la coumarine conjuguée 11	57
2.5.4 Détection de l'imidaclopride 1 par la sonde fluorescente 2,3-diaminonaphthalène (DAN) 13	57
 CHAPITRE III RÉSULTATS ET DISCUSSION	 59
3.1 Photolyse de l'imidaclopride 1 dans le photoréacteur	60
3.1.1 Monitoring de l'imidaclopride 1 via l'absorbance UV-visible	62
3.1.2 Fluorescence de l'imidaclopride 1 irradié en solution	63
3.1.3 Analyse HPLC-MS de solutions d'imidaclopride 1 irradiées	64
3.2 Détection de l'imidaclopride 1 en utilisant des sondes fluorescentes basées sur la détection des nitrites ou de l'oxyde d'azote.	68
3.3 Détection de l'imidaclopride 1 par l'acide folique 12	68
3.4 Détection de l'imidaclopride 1 par complexe organocuvré 7	74
3.5 Détection de l'imidaclopride 1 par une coumarine conjuguée 11	78
3.6 Détection de l'imidaclopride 1 , du clothianidine 2 et du thiaméthoxame 3 par le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) 13	81
3.6.1 Analyse fluorimétrique de la détection de l'imidaclopride 1 par le DAN 13	81
3.6.2 Relation entre la durée de la photolyse de l'imidaclopride 1 et l'intensité de la fluorescence suite à la réaction avec le DAN 13	84
3.6.3 Relation entre la concentration de l'imidaclopride 1 irradié et l'intensité du spectre de la fluorescence suite à la réaction avec le DAN 13	85
3.6.4 Relation entre la concentration de l'imidaclopride 1 irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN 13	86
3.6.5 Analyse fluorimétrique de la détection du clothianidine 2 et du thiaméthoxame 3 par le DAN 13	88

3.6.6	Relation entre la concentration du clothianidine 2 irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN 13	89
3.6.7	Relation entre la concentration du thiaméthoxame 3 irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN 13	90
3.6.8	Analyse HPLC-MS de la réaction du DAN 13 avec l'imidaclopride 1 ...	92
3.7	Conclusion partielle	95
CONCLUSION		97
ANNEXE A essais triplicata de l'Intensité de fluorescence à 408 nm d'une solution de DAN 13 mélangé avec de l'imidaclopride 1 , du Clothianidine 2 et du Thiaméthoxame 3		99
APPENDICE A spectre RMN ¹ H de 3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one (6)		101
APPENDICE B spectre RMN ¹ H de 7-Hydroxy-4-méthylcoumarine (8)		102
APPENDICE C SPECTRE RMN ¹ H de 7-Méthoxy-4-méthylcoumarine (9)		103
APPENDICE D SPECTRE RMN ¹ H de 4-Formyl-7-méthoxylcoumarine (10).....		104
APPENDICE E SPECTRE RMN ¹ H de 4-(7-Méthoxy-2-oxo-2H-chromèn-4-yl)- 2,6-diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle (11).....		105
RÉFÉRENCES.....		106

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Estimation de l'utilisation agricole annuelle des néonicotinoïdes aux États-Unis (1994-2014)	25
1.2 Principaux produits de photolyse de l'imidaclopride 1	29
1.3 Produits de photolyse du clothianidine 2	30
1.4 Produits de photolyse du thiaméthoxame 3	31
1.5 Diagramme de Jablonski	36
1.6 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence.....	37
1.7 Extinction de fluorescence par transfert d'électrons photo-induit (PET) par un donneur (D).(Fu et Finney, 2018)	40
1.8 Sonde fluorescente utilisant le PET pour détecter des ions Cu ²⁺ dans un milieu cellulaire	41
1.9 Sonde fluorescente utilisant le FRET pour la mesure du pH dans les lysosomes	42
1.10 Sonde fluorescente utilisant le ICT pour détecter la molécule H ₂ S dans des cellules.	44

2.1 Synthèse du ligand 6	49
2.2 Synthèse du complexe organocuire 7	50
2.3 Schéma de la synthèse de 11 . (a) Acétoacétate d'éthyle, H ₃ PO ₄ , température ambiante, 48 h; (b) Acétone, K ₂ CO ₃ , CH ₃ I, reflux, 7 h; (c) SeO ₂ , anisole, reflux, 5 h; (d) acétoacétate de méthyle, NH ₃ , EtOH, reflux, 6 h	51
2.4 Détection de l'imidaclopride 1 par l'acide folique 12	56
2.5 Détection de l'imidaclopride 1 par le complexe organocuire 7	57
2.6 Détection de l'imidaclopride 1 par la coumarine conjuguée 11	57
2.7 Détection de l'imidaclopride 1 par le DAN 13	58
3.1 Photoréacteur utilisé pour les expériences de photolyse.....	61
3.2 Spectre d'émission de la lampe 6035 Hg (Ar), fonctionnant à 18 mA, mesuré avec le monochromateur MS257 avec des fentes de 50 µm.	62
3.3 Courbes d'absorbance de l'imidaclopride 1 non irradié et irradié pendant des durées variées	63
3.4 Courbes spectrofluorimétriques de l'imidaclopride 1 non-irradié et irradié, lors d'une excitation à une longueur d'onde de 269 nm.	64
3.5 Chromatogrammes HPLC-MS de solutions d'imidaclopride 1 qui ont été irradiées pendant des durées variées	65

3.6 Structures de l'imidaclopride (1) et de ses principaux produits de photolyse, l'imidaclopride-guanidine (4), l'imidaclopride-urée (5) et un pseudo-dimère de l'imidaclopride-urée (14)	65
3.7 Mécanisme proposé pour la photolyse de l'imidaclopride 1	67
3.8 Formation du pseudo-dimère 14 à partir de l'imidaclopride-urée 5	67
3.9 Spectre de fluorescence de la réaction de l'acide folique 12 avec le NaNO ₂ (Excitation à 370 nm).....	70
3.10 Spectre de fluorescence de la réaction de l'acide folique 12 avec l'imidaclopride 1 pré-irradié (Excitation à 370 nm).	71
3.11 Spectres de fluorescence de la réaction de l'acide folique 12 avec l'imidaclopride 1 pré-irradiée à différentes concentrations (Excitation à 370 nm)	72
3.12 Spectres de fluorescence de la réaction de l'acide folique 12 avec l'imidaclopride 1 pré-irradié à différentes concentrations (Excitation à 370 nm).	73
3.13 Spectres de fluorescence de la réaction du complexe organocuvré 7 avec NaNO ₂ à différentes concentrations (Excitation à 425 nm).	75
3.14 Test colorimétriques du complexe organocuvré 7 sans et avec des solutions pré-irradiées d'imidaclopride 1 de différentes concentrations	75
3.15 Visualisation sous une lampe UV à 365nm du complexe organocuvré 7 en absence (a) et en présence (b) d'imidaclopride 1 pré-irradié.	76

- 3.16 Spectres de fluorescence de la réaction du complexe organocuvré **7** l'imidaclopride **1** pré-irradié à différentes concentrations (Excitation à 425 nm).
..... 77
- 3.17 Visualisation sous une lampe UV à 365 nm d'une solution du complexe organocuvré **7** laissée à l'air libre pendant 2 h..... 77
- 3.18 Spectres de fluorescence de la réaction de la coumarine conjuguée **11** avec l'imidaclopride **1** et des durées d'irradiation variées (Excitation à 324 nm). 79
- 3.19 Spectres de fluorescence des produits de réaction de la coumarine conjuguée **11** avec l'imidaclopride **1** irradié pendant 120 min à différentes concentrations(Excitation à 324 nm)..... 80
- 3.20 Visualisation sous lampe UV à 365 nm, de la coumarine conjuguée **11** irradiée pendant 120 min en absence (a) et en présence d'imidaclopride **1**(b). 81
- 3.21 Réaction du 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** avec les ions nitrites en milieu acide, formant le 2,3-naphthotriazole (NAT) **15** comme produit, fluorescent 82
- 3.22 Spectres d'émission de fluorescence de la réaction du DAN **13** en absence et en présence d'ions nitrites 1,00 mM (Excitation à 365 nm). 83
- 3.23 Visualisation sous lampe UV à 365 nm du DAN **13** en absence (a) et en presence d'imidaclopride **1** non irradié (b) et irradié pendant 5 min (c), 15 min (d), 30 min (e) et 60 min (f). 84
- 3.24 Intensité de fluorescence d'une solution de DAN **13** mélangée avec de l'imidaclopride **1** irradié pendant des durées variées (Excitation à 365 nm, émission mesurée à 408 nm). 85

3.25 Spectres d'émission de fluorescence de la réaction du DAN 13 avec des solutions d'imidaclopride 1 de concentrations variées, irradiées pendant 15 min (Excitation à 365 nm).....	86
3.26 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec des solutions d'imidaclopride 1 irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).....	87
3.27 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec des solutions d'imidaclopride 1 irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).	88
3.28 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec le clothianidine 2 irradiés pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).	89
3.29 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec des solutions de clothianidine 2 irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).	90
3.30 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec le thiaméthoxame 3 irradiés pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).	91
3.31 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN 13 avec des solutions du thiaméthoxame 3 irradiées pendant 15 min à différentes concentrations allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm)	92
3.32 Chromatogramme HPLC-MS EIC de la solution de DAN 13	93

3.33 Chromatogramme HPLC-MS du mélange réactionnel constitué de la solution de DAN 13 avec le NaNO ₂	94
3.34 Chromatogramme HPLC-MS du mélange réactionnel constitué de la solution de DAN 13 et de l'imidaclopride 1 pré-irradié	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1-1 Structures des insecticides néonicotinoïdes selon leur classification chimique.....	23
Tableau 3.1 Résultats de la chromatographie HPLC-MS à la suite de la photolyse de l'imidaclopride 1	66

RÉSUMÉ

Les néonicotinoïdes, tels que l'imidaclopride **1**, le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3** sont des insecticides largement utilisés dans le monde agricole. S'ils ont démontré leur efficacité dans la lutte contre les insectes ravageurs, ils sont aussi fortement suspectés de causer le déclin des populations d'abeilles. Il peut être utile de pouvoir dépister rapidement les néonicotinoïdes dans l'environnement proche ou au sein d'une exploitation apicole, par exemple. La présente recherche part du principe que ces pesticides, comportant un groupe *N*-nitroguanidine, sont photodégradables et que cette réaction s'accompagne probablement d'un dégagement d'espèces azotées tels que des ions nitrites ou de l'oxyde d'azote. L'objectif était alors de mettre au point une méthode de dépistage des néonicotinoïdes, basée sur une adaptation de méthodes existantes pour les ions nitrites ou les oxydes d'azote, utilisant des sondes fluorescentes en particulier. Pour ce faire, l'imidaclopride **1** a été choisi comme composé modèle, ce qui a permis d'établir les conditions expérimentales permettant sa photolyse avec une lampe au mercure (raie principale à 254 nm) et l'identification des principaux produits de dégradation par HPLC-MS. Ensuite, après des essais avec quelques composés rapportés pour générer de la fluorescence en présence d'ions nitrites ou d'oxyde nitrique, on a démontré que l'ajout de 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** à l'imidaclopride **1** pré-irradié permet l'obtention d'un signal fluorescent visualisable sous une simple lampe UV à 365 nm. En outre, pour un temps d'irradiation donné (15 minutes), l'intensité du signal d'émission de fluorescence (à 408 nm) est reliée avec la concentration de l'analyte entre 0,001 mM et 1,00 mM, avec un domaine de linéarité dans l'intervalle de 0,10 mM à 1,00 mM. On a ensuite pu démontrer que, suite à une irradiation dans ces mêmes conditions, le thiaméthoxame **3** et le clothianidine **2**

produisent des espèces qui réagissent aussi avec le DAN **13**, donnant aussi un signal de fluorescence à la même longueur d'onde, avec une intensité qui est fonction de la concentration. Par ailleurs des analyses HPLC-MS ont démontré l'obtention du 2,3-naphthotriazole **15** lors d'une réaction du DAN **13** avec l'imidaclopride **1** pré-irradié. Le 2,3-naphthotriazole **15** est en fait le produit final responsable de la fluorescence observée et mesurée lorsqu'on utilise le DAN **13**.

En somme, il a été démontré que le DAN **13** peut être utilisé pour dépister la présence des néonicotinoïdes imidaclopride **1**, clothianidine **2** et la thiaméthoxame **3** et de façon indirecte, via leurs produits de photolyse, avec de bonnes sensibilités par l'apparition d'un signal de fluorescence.

Mots clés : apparition de fluorescence, clothianidine, 2,3-diaminonaphthalene, groupe *N*-nitroguanidine, imidaclopride, 2,3-naphthotriazole, pesticides néonicotinoïdes, sondes fluorescentes, thiaméthoxame.

ABSTRACT

Neonicotinoids, such as imidacloprid **1**, clothianidin **2** and thiamethoxam **3**, are insecticides widely used in agriculture. While they have demonstrated their effectiveness in controlling insect pests, they are also strongly suspected of causing the decline of bee populations. It may be useful to be able to rapidly detect neonicotinoids in the close environment or within, for example, a bee farm. The present research is based on the assumption that these pesticides, containing an *N*-nitroguanidine group, are photodegradable and that this reaction is probably accompanied by the release of nitrogen species such as nitrite or nitrogen oxide. The objective was then to develop a screening method for neonicotinoids, based on an adaptation of existing methods for nitrites or nitrogen oxides, using fluorescent probes in particular. For this purpose, imidacloprid **1** was chosen as a model compound, which made it possible to establish the experimental conditions allowing its photolysis with a mercury lamp (main line at 254 nm) and the identification of the main degradation products by HPLC-MS. Then, after tests with some compounds reported to generate fluorescence in the presence of nitrite ions or nitric oxides, it was demonstrated that the addition of 2,3-diaminonaphthalene (DAN) **13** to pre-irradiated imidacloprid **1** allows the generation of a fluorescent signal that can be visualized under a simple UV lamp at 365 nm. In addition, for a given irradiation time (15 minutes), the intensity of the fluorescence emission signal (at 408 nm) is related to the concentration of the analyte between 0.001 mM and 1.00 mM, with a linearity range in the range of 0.1 mM to 1.00 mM. It was then demonstrated that following irradiation under the same conditions, thiamethoxam **3** and clothianidin **2** produce species that also react with DAN **13**, also giving a fluorescence signal at the same wavelength, with an intensity that is a function of

concentration. Furthermore, HPLC-MS analyses have shown that 2,3-naphthotriazole **15** is obtained by reacting DAN **13** with pre-irradiated imidacloprid **1**, which is the expected fluorescent product in this project.

In sum, it has been shown that DAN **13** can be used to detect the presence of the neonicotinoids imidacloprid **1**, clothianidin **2** and thiamethoxam **3** indirectly via their photolysis products, with good sensitivity by the appearance of a fluorescence signal.

Keywords: appearance of fluorescence, clothianidin, 2,3-diaminonaphthalène, fluorescent probes , group, imidacloprid, 2,3-naphthotriazole, neonicotinoid pesticides, N-nitroguanidin, thiamethoxam.

INTRODUCTION

Les néonicotinoïdes (souvent abrégés néonics) sont une classe de composés synthétiques utilisés comme insecticides.(Harada *et al.*, 2016) Le premier néonicotinoïde, l'imidaclopride **1**, a été introduit en 1991. (Hladik *et al.*, 2018) Il existe actuellement sept composés néonicotinoïdes commerciaux classés chimiquement comme *N*-nitroguanidines (imidaclopride **1**, clothianidine **2**, thiaméthoxame **3**, et dinotéfurane), nitrométhylènes (nitenpyram) et *N*-cyanoamidines (acétamipride et thiaclopride).(Bass et Field, 2018)

Les néonicotinoïdes représentent environ un quart du marché mondial des insecticides. (Tomizawa et Casida, 2011) Leur forte utilisation est due au fait qu'ils sont sélectivement toxiques pour les arthropodes et relativement non toxiques pour les vertébrés.(Bass et Field, 2018) Ils sont donc très utiles pour protéger les cultures, les personnes, le bétail et les animaux de compagnie contre les attaques d'insectes nuisibles et la transmission de maladies. (Casida et Durkin, 2013)

De plus, les néonicotinoïdes sont des insecticides aux propriétés systémiques, c'est à dire qu'ils se répartissent dans toute la plante, et lui confèrent donc une protection de longue durée contre les insectes ravageurs suceurs.(Simon-Delso *et al.*, 2015)

Leur mécanisme d'action est surtout dû à leur effet neurotoxique sur le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR).(Cimino *et al.*, 2017) Ce récepteur est un canal ionique qui joue un rôle clé dans la signalisation nerveuse et tous les néonicotinoïdes sont hautement spécifiques à celui-ci.(Bass et Field, 2018; Tomizawa et Casida, 2005)

La sur-activation de ce récepteur par les pesticides entraîne chez les invertébrés une paralysie mortelle.(Guégan *et al.*, 2017)

En raison de leur caractère systémique, les néonics se répartissent dans toute la plante, y compris dans le pollen et le nectar, (Fairbrother *et al.*, 2014) qui sont les principales sources alimentaires des abeilles ouvrières adultes.(Haydak, 1970) Ces pesticides largement utilisés sont donc suspectés comme responsables, du moins partiellement, du déclin des abeilles qui est actuellement observé dans plusieurs pays du monde.(Mitchell *et al.*, 2017) Ce déclin suscite de grandes inquiétudes à cause des précieux services écosystémiques que les abeilles et autres pollinisateurs fournissent en fécondant les fleurs.(Whitehorn *et al.*, 2012)

Pour détecter et quantifier les pesticides incluant les néonics, des méthodes analytiques ont été développées. Actuellement la principale méthode utilisée est la HPLC-MS/MS.(Jovanov *et al.*, 2013; López-Fernández *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018) Cette méthode est très efficace, pour à la fois pour détecter et quantifier les néonics, mais sa complexité instrumentale ainsi que son coût très élevé rendent difficile son utilisation sur le terrain, comme dans des fermes à petit budget. Nous avons pensé que des méthodes reposant sur la colorimétrie ou la fluorimétrie, par exemple, pourraient être plus abordables.

L'objectif de ce travail est d'élaborer une méthode qui présente une efficacité comparable aux techniques utilisés antérieurement, mais qui présenterait un moindre coût. Les trois pesticides néonicotinoïdes les plus utilisés, soit l'imidaclopride **1**, le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3**, possèdent en commun une fonction *N*-nitroguanidine. Par ailleurs, il est connu que la photolyse de ce groupe génère des ions nitrites ou d'autres espèces azotées oxydées.(Liang *et al.*, 2019; Liu, W. *et al.*, 2006; Moza *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2020; Wamhoff et Schneider, 1999)

Notre recherche vise à vérifier l'hypothèse suivante : **une méthode d'analyse pouvant utiliser la détection des espèces azotées réactives (exemple : des ions nitrites) pour le dépistage indirect des néonicotinoïdes suite à leur photolyse.** En particulier, cette méthode s'appuie sur l'apparition d'un signal lumineux émis par des sondes fluorescentes sélectives pour les ions nitrites ou d'autres espèces azotées réactives et, de façon indirecte, ce signal fluorescent serait utilisé pour détecter les néonicotinoïdes.

Les sondes fluorescentes sont de petites molécules qui subissent une modification de leur émission de fluorescence en réponse à un événement de liaison, une réaction chimique ou un changement dans leur environnement immédiat. (Fu et Finney, 2018)

Les sondes fluorescentes utilisées dans cette étude sont la 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** (Misko *et al.*, 1993), l'acide folique **12** (Lu *et al.*, 2015) et un complexe organocuvré **7** (Rout et Mondal, 2015), qui en présence d'ion nitrite forme un produit fluorescent. Par ailleurs, une coumarine modifiée **11** (Ma *et al.*, 2014) ainsi qu'une rhodamine modifiée (Zheng *et al.*, 2008), utilisées antérieurement pour la détection d'oxyde nitrique, ont aussi été envisagées pour la détection indirecte des néonicotinoïdes. Dans ce projet, des espèces azotées telles que des ions nitrites ou encore de l'oxyde nitrique seront générés in situ par un pesticide de type *N*-nitroguanidines qui serait préalablement dégradé par photolyse.

CHAPITRE I

PARTIE THÉORIQUE

Dans ce chapitre, on abordera l'utilisation intensive des pesticides, notamment les néonicotinoïdes, et leurs effets potentiels sur le déclin des colonies d'insectes pollinisateurs, essentiellement les abeilles.

Les méthodes de détection actuelles des néonicotinoïdes seront énumérées. Ces méthodes étant complexes et coûteuses, dans ce projet nous présenterons une méthode alternative qui servira à détecter ces pesticides par apparition d'un signal fluorescent, à l'aide de sondes fluorescentes.

Les pesticides néonicotinoïdes de classe chimique *N*-nitroguanidine étant photodégradables, ils génèrent des produits de photolyse accompagnés d'espèces azotées. C'est pourquoi on rapportera quelques sondes fluorescentes antérieurement utilisées pour la détection d'espèces azotées, notamment l'ion nitrite et l'oxyde nitrique.

1.1 Importance des abeilles dans les écosystèmes

Avec près d'un million d'espèces, les insectes éclipsent toutes les autres formes de vie animale sur terre non seulement en nombre, en diversité et en biomasse, mais aussi en raison de leur importance dans le fonctionnement des écosystèmes.(Forister *et al.*, 2019) Parmi les insectes, les pollinisateurs sont l'une des classes les plus importantes. Ils influencent fortement les relations écologiques, la conservation et la stabilité des écosystèmes, la variation génétique dans la communauté végétale et la diversité

florale.(Bradbear, 2009) Les abeilles, y compris les abeilles mellifères, les bourdons et les abeilles solitaires constituent le groupe de pollinisateurs le plus important. D'un point de vue strictement utilitaire, environ 70 % des plantes cultivées pour la production de fruits, de légumes ou de graines dépendent de la pollinisation par les insectes.(Kearns et Inouye, 1997) En quelque sorte, si les pollinisateurs venaient à disparaître, l'humanité serait confrontée à une crise alimentaire mondiale.

Au cours des dernières décennies, un déclin important des populations d'insectes a été observé, en particulier le syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (en anglais, *colony collapse disorder*). Celui-ci est influencé par de multiples facteurs biotiques et abiotiques.(Evans *et al.*, 2009) Bien que les causes réelles soient encore en cours d'analyse, l'utilisation intensive de pesticides chimiques, et notamment les néonicotinoïdes, contre les insectes nuisibles peut avoir contribué au déclin des pollinisateurs comme espèces non ciblées.(Blacquiere *et al.*, 2012)

Quand bien même la vie humaine ne puisse pas perdurer sans les services écologiques rendus par les pollinisateurs, il est difficile de leur attribuer une valeur économique, même approximative. Malheureusement, ceci peut conduire à attribuer à leur conservation une priorité de financement ou d'action plus faible que d'autres besoins pour lesquels les valeurs, économiques ou autres, apparaissent plus importantes.(Losey et Vaughan, 2006)

1.2 Insecticides néonicotinoïdes

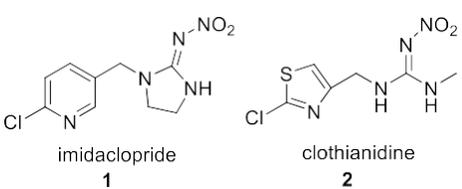
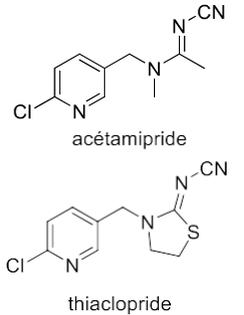
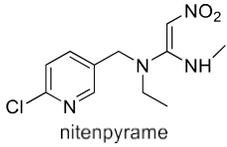
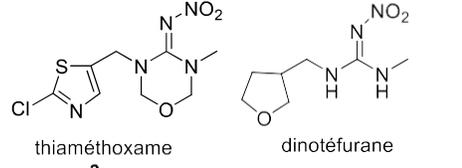
1.2.1 Définition des néonicotinoïdes et importance de leur utilisation

Afin de nourrir la population mondiale en croissance rapide, les pesticides de synthèse ont été reconnus très importants pour la protection des cultures dans les systèmes agricoles intensifs. En effet, on pense que l'utilisation des pesticides synthétiques augmente d'environ un cinquième les rendements des cultures.(Blacquiere *et al.*, 2012)

Néanmoins dans les années 1980, de nombreux insectes ravageurs ont développé une résistance aux pesticides largement utilisés, tels que les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. Dans ce contexte de résistance accrue aux insecticides existants, les composés néonicotinoïdes, inspirés de la nicotine, ont été présentés comme ayant plusieurs attributs clés qui ont conduit à leur adoption rapide dans les environnements agricoles et urbains.(Simon-Delso *et al.*, 2015)

Le professeur Shinzo Kagabu a reçu le prix international de l'American Chemical Society en 2010 en reconnaissance de sa découverte de l'imidaclopride **1** et du thiaclopride.(Kagabu, 2011) Cette découverte a ouvert la voie à « l'ère néonicotinoïde » dans la lutte antiparasitaire, cinq composés apparentés ayant rapidement suivi. (Tomizawa et Casida, 2011) Ces pesticides néonicotinoïdes sont maintenant commercialisés et peuvent être chimiquement classifiés comme *N*-nitroguanidines (imidaclopride **1**, clothianidine **2**, thiaméthoxame **3**, et dinotéfurane), nitrométhylènes (nitenpyrame) et *N*-cyanoamidines (acétamipride et thiaclopride).(Bass et Field, 2018) (tableau 1.1).

Tableau 1-1 Structures des insecticides néonicotinoïdes selon leur classification chimique.

N-nitroguanidines	N-cyanoamidines	Nitrométhylènes
 <p>imidaclopride 1</p> <p>clothianidine 2</p>	 <p>acétamipride</p> <p>thiaclopride</p>	 <p>nitenpyrame</p>
 <p>thiaméthoxame 3</p> <p>dinotéfurane</p>		

Le succès commercial des néonicotinoïdes s'explique par les éléments suivants (Elbert *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2001; Simon-Delso *et al.*, 2015):

- Une nature systémique, c'est-à-dire qu'une fois absorbés par les racines ou les feuilles, ils sont diffusés dans toutes les parties de la plante. Ceci les rend efficacement toxiques pour les insectes ravageurs. La toxicité persiste pendant une période de temps variable selon la plante, son stade de croissance, la nature du pesticide et la quantité appliquée, ce qui confère à la plante une protection de longue durée.
- Leur interaction avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) du système nerveux central des insectes, entraîne la paralysie mortelle chez ces derniers. Cette interaction se base sur le fait que les néonicotinoïdes contiennent un fragment 6-chloro-3-pyridyle ressemblant à la nicotine et à l'épibatidine, qui sont tous deux de puissants agonistes des récepteurs nAChR.
- Une efficacité de liaison inférieure aux récepteurs nicotiniques des vertébrés, par rapport aux invertébrés, qui procure une toxicité sélective pour les arthropodes. Ceci est renforcé par le fait que les insectes possèdent un système nerveux plus riche en nAChR.
- Une polyvalence d'application, en particulier en tant que traitement des semences. Ils peuvent être utilisés comme enrobage des graines, trempage du sol ou granulés, par pulvérisations foliaires, injection directe dans les troncs d'arbres ou par pulvérisation chimique. Les méthodes autres que la pulvérisation directe aident à réduire le contact avec les insectes et réduisent l'exposition pour les vertébrés. Ceci est l'une des principales raisons pour lesquelles ces produits synthétiques sont de plus en plus utilisés pour la protection des cultures.

En raison de leur grande efficacité contre une gamme d'insectes nuisibles, les néonicotinoïdes sont l'une des classes chimiques d'insecticides les plus importantes dans le monde. Ils sont enregistrés dans plus de 120 pays et particulièrement actifs contre de nombreux insectes ravageurs suceurs. En 2014, la part de marché des néonicotinoïdes dans le monde était supérieure à 25% de tous les insecticides. Le thiaméthoxame **3**, l'imidaclopride **1** et le clothianidine **2** représentent près de 85% du total des néonicotinoïdes vendus. Les principales régions qui les utilisent sont l'Amérique latine, l'Asie et l'Amérique du Nord (75%). L'Europe ne représente que 11% du total des ventes mondiales.(Bass *et al.*, 2015)

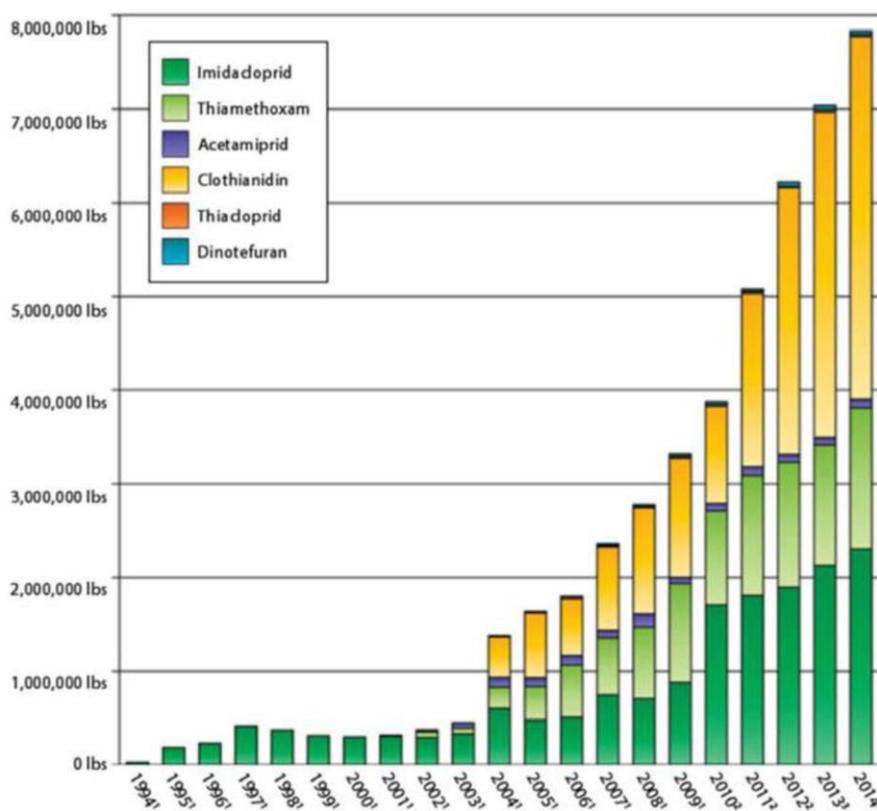


Figure 1.1 Estimation de l'utilisation agricole annuelle des néonicotinoïdes aux États-Unis (1994-2014).(Hopwood *et al.*, 2016)

1.2.2 Effets des néonicotinoïdes sur les abeilles

Le déclin des pollinisateurs dans l'environnement est influencé par de multiples facteurs, y compris les facteurs biotiques à savoir, les agents pathogènes, les parasites, l'indisponibilité des ressources en raison de la perte d'habitat et les facteurs abiotiques comme les changements climatiques et la présence de polluants toxiques. Bien que les causes réelles soient encore en cours d'analyse, l'utilisation intensive de pesticides chimiques, notamment les néonicotinoïdes, contre les insectes nuisibles peut avoir contribué à la perte des pollinisateurs.(Blacquiere *et al.*, 2012)

Certains chercheurs pensent que l'utilisation à grande échelle des néonicotinoïdes pourrait avoir un lien avec le déclin des populations d'abeilles, car leur mode d'action systémique fait qu'on retrouve des traces de pesticides dans toute la plante, incluant le pollen et le nectar, principale nourriture des pollinisateurs. Combiné avec la persistance des néonicotinoïdes dans le sol et dans l'eau, l'absorption par les cultures et les plantes rend ces pesticides biodisponibles pour les pollinisateurs, à des concentrations sublétales pendant la majeure partie de l'année.(Krupke *et al.*, 2012)

En outre, à proximité de zones traitées aux néonicotinoïdes, les apiculteurs ont observé différents troubles de comportement et signes inquiétants, tels que des abeilles désorientées, rassemblées en petits groupes sur le sol et présentant un comportement de recherche de nourriture anormal. Il a aussi été constaté des mortalités massives d'abeilles au printemps, allant jusqu'à la disparition de colonies entières d'abeilles. Cependant, aucun de ces signes, pris individuellement, ne peut constituer un effet unique des néonicotinoïdes. D'autres facteurs (ex. : dommages causés par des parasites, conditions météo difficiles, impacts d'autres produits agrochimiques, etc.) pourraient produire des signes similaires, ce qui complique l'établissement d'un lien de causalité avec l'empoisonnement aux néonicotinoïdes. (Krupke *et al.*, 2012) Dans le secteur agricole, les néonicotinoïdes, principalement l'imidaclopride **1**, le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3**, sont utilisés dans l'enrobage des semences pour une grande variété

de cultures tels que le colza, le tournesol, les céréales, etc. Cependant lors des semis, une petite proportion (<2%) est perdue sous forme de poussière. Cette poussière aérienne peut, à elle seule, être suffisante pour provoquer la mortalité directe des abeilles se trouvant à proximité. (Goulson, 2013)

La recherche portant sur les effets des néonicotinoïdes sur les pollinisateurs est presque exclusivement limitée à l'abeille domestique, *Apis mellifera* qui est l'espèce de prédilection. Il s'agit d'une espèce économiquement importante, facilement disponible en grand nombre et pour laquelle les protocoles d'analyses sont déjà existants.

Des études ont montré que l'imidaclopride **1**, la clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3** sont tous très toxiques pour les abeilles *A. mellifera* (LD₅₀ par voie orale : 0,004 à 0,005 pg par abeille, LD₅₀ par contact : 0,02 à 0,08 µg par abeille), bien que ces quantités soient encore sensiblement supérieures à celles généralement rencontrées par les abeilles dans l'environnement. Par ailleurs, l'acétamipride et la thiaclopride, sont de plusieurs ordres de grandeur moins toxiques pour les abeilles *A. mellifera* que les autres néonicotinoïdes (LD₅₀ par voie orale : 15-17 pg par abeille, LD₅₀ par contact : 8 à 39 µg par abeille). En plus de leur toxicité intrinsèquement moindre, le thiaclopride et l'acétamipride ont des demi-vies plus courtes dans l'environnement (3-74 jours dans le sol pour le thiaclopride, 31-450 pour l'acétamipride) par rapport à l'imidaclopride **1** (28-1250 jours), la clothianidine **2** (148-6931 jours) et la thiaméthoxame **3** (7-353 jours), ce qui les rend moins persistants dans l'environnement et par là même, moins toxiques. (Lundin *et al.*, 2015)

On doit noter que même si les néonicotinoïdes se dégradent dans l'environnement, leurs différents métabolites peuvent à leur tour provoquer des effets néfastes sur les colonies d'abeilles. C'est le cas par exemple du thiaméthoxame **3**, qui se dégrade en clothianidine **2** qui est également toxique et même, commercialisé comme pesticide. De la même façon, il a été constaté qu'une utilisation intensive de l'imidaclopride **1**

et/ou de ses métabolites provoque l'apparition rapide de symptômes de neurotoxicité, tels qu'une hyperréactivité, une hyperactivité et des tremblements. Après plusieurs heures, ces symptômes ont progressivement disparu et les abeilles ouvrières sont devenues hyporéactives et hypoactives. (Suchail *et al.*, 2001)

Enfin, les études sur les résidus ne fournissent généralement qu'une mesure de l'exposition à un moment donné. Le profil d'exposition dans le temps, c'est-à-dire la durée pendant laquelle les abeilles sont affectées par des concentrations variables de néonicotinoïdes sur le terrain, reste généralement inconnu. Néanmoins il n'est pas simple d'évaluer la réelle dangerosité des néonicotinoïdes sur les abeilles, car les quantités de pesticides utilisés lors des études sont souvent supérieure à celle utilisées par les agriculteurs sur le terrain. (Lundin *et al.*, 2015) À partir de ce constat, il est difficile d'affirmer que le déclin des abeilles est lié exclusivement, ou même majoritairement, à l'utilisation des pesticides néonicotinoïdes.

1.2.3 Dégradation des néonicotinoïdes

Plusieurs recherches ont été menées pour étudier le sort des néonicotinoïdes et de leurs produits de photolyse par la lumière solaire, principalement dans des solutions aqueuses. Une fois libérés dans l'environnement, ils peuvent atteindre les milieux aquatiques, atmosphériques et terrestres et être en contact avec de nombreux organismes vivants. Différentes études de photolyse ont été menées sur l'imidaclopride **1** (Liu, W. *et al.*, 2006; Moza *et al.*, 1998; Wamhoff et Schneider, 1999) en solution aqueuse, irradié par des lampes au mercure dont les intensités maximales varient de 257 à 290 nm. Les voies de photolyse de celui-ci étaient variées, d'où la difficulté de les représenter par un schéma unique. Néanmoins les principaux produits de photolyse sont représentés par la figure 1.2.

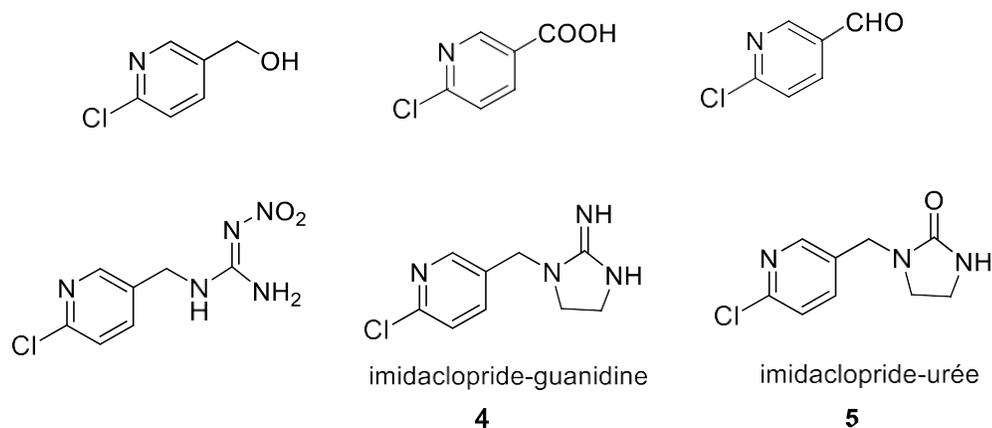


Figure 1.2 Principaux produits de photolyse de l'imidaclopride **1**.

Les résultats les plus importants auxquels ont abouti ces tests de photolyse (Liu, W. *et al.*, 2006; Moza *et al.*, 1998; Wamhoff et Schneider, 1999) sont:

- La dégradation de l'imidaclopride **1** n'a pas été observée lorsque la solution aqueuse de celui-ci était maintenue dans l'obscurité.
- La photolyse affecte uniquement le fragment imidazolidine de la molécule tandis que le fragment 6-chloropyridine reste inchangé.
- La photolyse semble être initiée par le clivage de la liaison N-NO₂.
- Le produit de photolyse majoritaire est l'imidaclopride-urée **5** (Figure 1.2). celui-ci peut être formé par clivage de liaison de N-NO₂ de la *N*-nitroguanidine, menant d'abord à un dérivé guanidine (imidaclopride-guanidine **4**), qui est ensuite hydrolysé, formant ainsi l'imidaclopride-urée **5**.

Une hydrolyse a également été effectuée à différents pH. (Liu, W. *et al.*, 2006) Les résultats montrent que dans un milieu acide ou neutre, l'imidaclopride **1** est plutôt stable et ne s'hydrolyse que lentement. Cependant, la vitesse d'hydrolyse augmente lorsque la solution est alcaline, le principal produit étant l'imidaclopride-urée **5**.

Une étude de la dégradation du clothianidine **2** et du thiaméthoxame **3** a également été menée. (Li *et al.*, 2018) L'objectif de cette dernière était d'étudier les effets de différentes sources lumineuses sur la dégradation de ces deux pesticides dans différents sols agricoles. Les trois sources de lumière étaient : la lumière du soleil, une source de lumière ultraviolette A (UVA) et B (UVB). Il a été constaté que les effets du type de sol étaient insignifiants, l'effet le plus significatif provenant de la source lumineuse. En effet, les UVB ont provoqué les dégradations les plus rapides des deux insecticides. Ces deux molécules, lorsqu'elles sont dégradées par photolyse, forment quatre produits principaux pour le clothianidine **2** et trois pour le thiaméthoxame **3**. On notera que la clothianidine **2** est l'un des produits de photolyse du thiaméthoxame **3**. Ces photolyses sont représentées dans les figures 1.4 et 1.5.

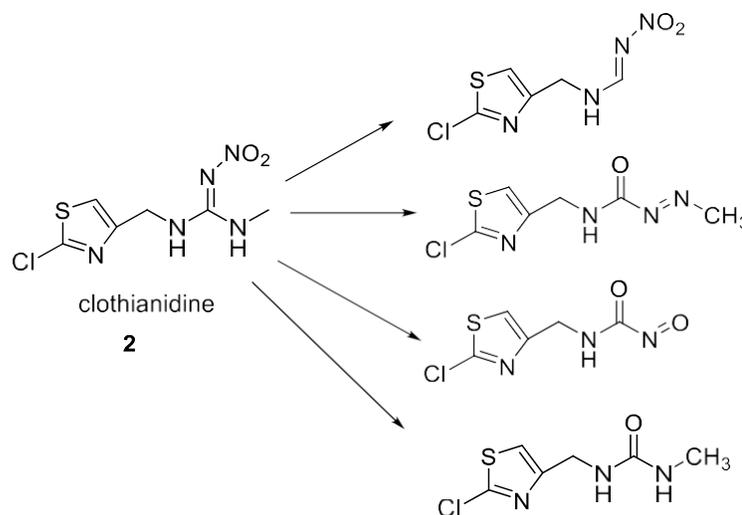


Figure 1.3 Produits de photolyse du clothianidine **2**.

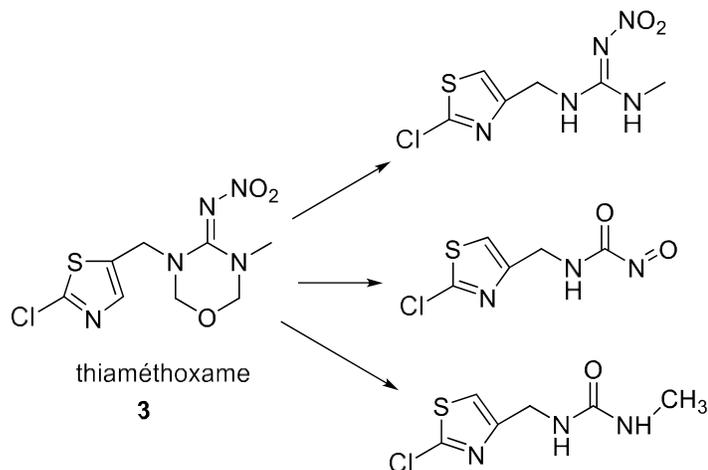


Figure 1.4 Produits de photolyse du thiaméthoxame **3**.

Une étude récente a été menée à l'effet d'évaluer la photolyse de cinq néonicotinoïdes (imidaclopride **1**, acétamipride, clothianidine **2**, thiaméthoxame **3** et dinotéfurane). (Liang *et al.*, 2019) À l'issue de cette étude, il a été constaté que pour néonicotinoïdes, le taux de photolyse augmente avec l'augmentation du pH et que les voies de dégradation consistent principalement en des processus de photolyse suivie d'hydrolyse.

Sans surprise, en ce qui concerne l'imidaclopride **1**, le clothianidine **2**, le dinotéfurane et le thiaméthoxame **3**, l'obtention de la plupart des produits de photolyse est tributaire du clivage de la liaison N-NO₂, cette liaison étant la plus faible pour ces quatre molécules. À partir de tous ces résultats, il a été à chaque fois supposé que la photolyse des néonicotinoïdes entraîne la perte de NO₂⁻.

Cependant, la nature même des espèces d'azote oxydées n'était pas explicite lors des études de photolyse des *N*-nitroguanidines citées plus haut.

Lors d'une récente étude relative à la photolyse de l'imidaclopride **1** (Palma *et al.*, 2020), des espèces azotées oxydées ont été observées, par chromatographie ionique pour les ions nitrites et nitrates (NO_2^- et NO_3^-), et à l'aide d'un réacteur à flux gazeux et d'un analyseur de NO_x , pour l'oxyde nitrique et le dioxyde d'azote (NO et NO_2). Par ailleurs, les auteurs ont montré que les espèces azotées oxydées générées par la photolyse de l'imidaclopride **1** peuvent être amenées à réagir avec des substrats sujets à la nitrosation, tel que le phénol, le résorcinol et le tryptophane. Les auteurs ont également exploré les aspects théoriques de la photolyse de l'imidaclopride **1**. En effet, des calculs quantiques ont proposé que la photolyse de l'imidaclopride **1** implique un clivage homolytique de la liaison $\text{RN}-\text{NO}_2$ à l'état triplet ainsi que la formation de l'intermédiaire $\text{NO}_2\cdot$ menant à la formation de NO_x , en phase gazeuse et aqueuse. Les espèces NO_x formées à différentes proportions sont NO , NO_2 , NO_2^- et NO_3^- . Ceci confirme la formation des ions nitrites NO_2^- et permet donc d'envisager la possibilité d'utiliser les sondes fluorescentes qui détectent les nitrites, pour une détection indirecte de ces néonicotinoïdes.

1.2.4 Méthodes de détection usuelle des néonicotinoïdes

L'utilisation croissante des néonicotinoïdes dans le traitement systématique des semences des cultures constitue une cause sérieuse de pollution des ressources en eau et de l'environnement, et par conséquent, la contamination des sources de nourriture. À cet effet, des méthodes de détection et de quantification des néonicotinoïdes ont été développées.

Parmi la littérature abondante sur l'analyse des néonicotinoïdes, la grande majorité repose sur les séparations par HPLC. Certaines études analytiques ont permis la détermination simultanée de quatre insecticides néonicotinoïdes (acétamipride, imidaclopride **1**, thiaclopride et thiaméthoxame **3**) dans des solutions de miel et des matrices de fruits et légumes à l'aide de méthodes HPLC-MS (Di Muccio *et al.*, 2006; Fidente *et al.*, 2005) ainsi que par HPLC-TLS (Guzsvány *et al.*, 2007) avec des limites

de détection de l'ordre du $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppm). Des études plus récentes ont permis la détection des sept insecticides néonicotinoïdes dans des produits agricoles, alimentaires, des échantillons de miel et de pollen, et ce, par chromatographie liquide équipée d'un détecteur UV (Watanabe *et al.*, 2007), ou encore d'un spectromètre de masse en tandem UPLC-MS/MS (Liu, S. *et al.*, 2010), HPLC-MS/MS (Chen, M. *et al.*, 2013; Jovanov *et al.*, 2013; López-Fernández *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2018) et chromatographie liquide capillaire avec détecteur UV (Carbonell-Rozas *et al.*, 2020) avec des limites de détection allant jusqu'au $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ppb). L'une d'elle s'a permis la détermination de tous les insecticides néonicotinoïdes et de certains de leurs métabolites par HPLC-MS/MS (Gbylik-Sikorska *et al.*, 2015).

Toutes ces méthodes ont permis une détection rapide et efficace des néonicotinoïdes à des limites de détection très basses. Néanmoins, elles présentent plusieurs inconvénients, à savoir, une complexité d'utilisation, un cout très élevé et la non-faisabilité sur le terrain.

À partir de ce constat, on se propose de mettre au point une méthode qui allierait la simplicité et l'efficacité à un moindre coût.

1.3 Méthodes de détection par apparition d'un signal fluorescent

1.3.1 Définition du phénomène de fluorescence

La luminescence est une émission de photons, donc de lumière, ultraviolette, visible ou infrarouge, provenant d'une espèce excitée. Il y a différentes façons d'exciter une molécule, entre autres l'excitation par absorption électromagnétique; on parle alors de photoluminescence. Dans la photoluminescence, on distingue la fluorescence, la phosphorescence et la fluorescence retardée. (Valeur, 2003)

Le phénomène de fluorescence peut être décrit par le diagramme de Jablonski (voir la figure 1.5), à travers les étapes d'absorption et de relaxation.

L'absorption survient quand une molécule absorbe un photon, il en résulte une augmentation de l'énergie de la molécule, ou une excitation. Celle-ci se traduit par le passage d'un de ses électrons d'un état énergétique fondamental à un état excité, habituellement du singulet fondamental S_0 vers un singulet excité, habituellement S_1 ou S_2 . L'absorption est très rapide (durée τ d'environ 10^{-15} à 10^{-14} s) par rapport aux autres processus.

C'est lors de la relaxation, soit lorsque l'électron quitte un état excité vers un état de plus basse énergie (dont l'état fondamental), que la molécule émet de l'énergie, sous différentes formes incluant la forme lumineuse. Dans les processus de relaxation, on distingue la conversion interne, la fluorescence, le croisement inter-système et la phosphorescence.

A. Processus de conversion interne

Aussitôt que le photon est absorbé, la molécule se retrouve automatiquement dans l'un des nombreux niveaux vibrationnels (v_1, v_2, v_3 , etc.) associé à l'état électronique excité S_1 ou encore S_2 ou S_3 . Un processus non radiatif (sans dégagement de lumière) ramène l'électron au niveau vibrationnel de base v_0 de l'état S_1 de façon très rapide, elle se produit sur une échelle de temps de 10^{-12} à 10^{-10} s.

B. Processus de fluorescence

À partir du niveau v_0 de l'état S_1 , l'électron promu peut perdre son excédent d'énergie par émission d'un photon, via le processus de fluorescence. La molécule revient à l'état électronique fondamental S_0 dans l'un des niveaux vibrationnels qui lui sont associés.

Le spectre de fluorescence enregistré (donc la lumière émise) présente une plus grande longueur d'onde par rapport au spectre d'absorption. Ceci s'explique par la perte d'énergie non radiative causée par les relaxations vibrationnelles qui ont eu lieu lors de la conversion interne vue précédemment.

Après la conversion interne, on peut observer, au lieu de la fluorescence, soit une relaxation non radiative (croisement inter-système), soit plus rarement un retour retardé à l'état fondamental avec émission de lumière, appelé phosphorescence.

C. Processus de croisement inter-système

Le croisement inter-système est une voie de relaxation non radiative de l'électron, entre deux états excités, soit de l'état singulet S_1 vers l'état triplet T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$). Par rapport aux processus précédents, le croisement inter-système est habituellement moins rapide (10^{-9} à 10^{-7} s).

D. Processus de phosphorescence

La phosphorescence est une émission de photons qui s'observe notablement plus tard (10^{-6} s à plusieurs secondes, voire quelques minutes) après l'excitation, si la durée de vie de l'état triplet est assez longue, ce qui est favorisé par une basse température. Ce processus survient grâce à la transition $T_1 \rightarrow S_0$. Le spectre de phosphorescence est situé à des longueurs d'onde plus grandes que celui de la fluorescence. (Rouessac et Rouessac, 1997)

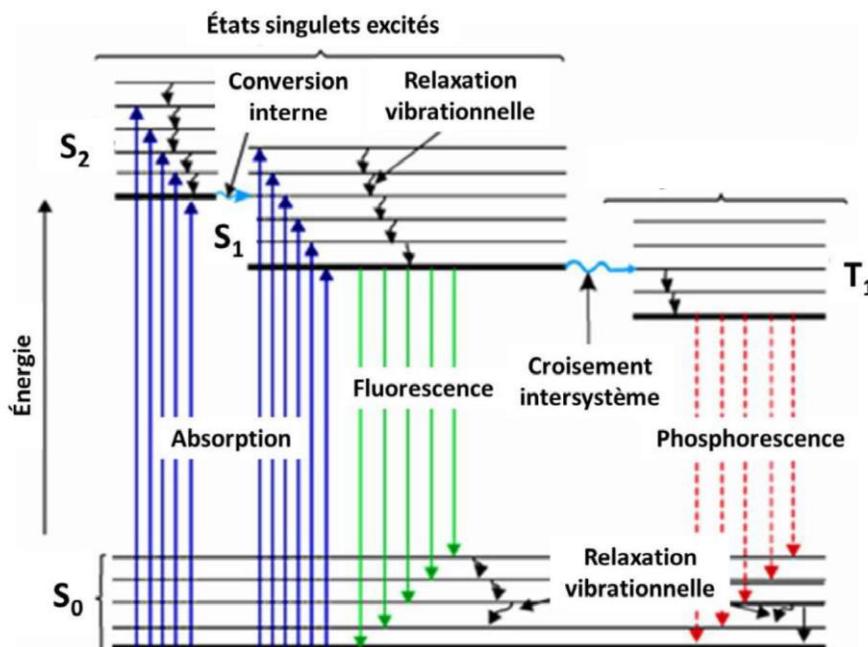


Figure 1.5 Diagramme de Jablonski. (Gagnon, 2014)

1.3.2 Méthodes d'observation qualitative de la fluorescence

La détection et la quantification des molécules fluorescentes sont basées sur la spectrofluorimétrie. Lors de l'excitation d'une molécule à une longueur d'onde fixe, on obtient un spectre d'émission (figure 1.6), qui montre l'intensité de la fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission. La différence entre les longueurs d'onde de l'excitation maximale et du maximum de l'émission est appelée déplacement de Stokes. Cette fluorescence peut également être observée visuellement, de façon qualitative, sous une lampe UV. (Guay, 2017)

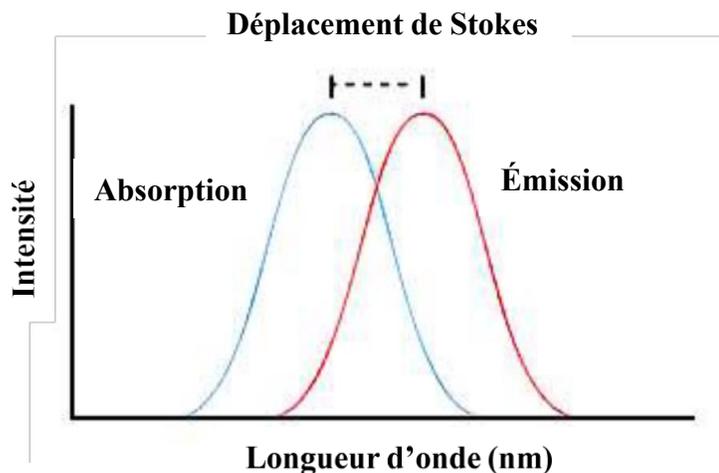


Figure 1.6 Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence. (Guay, 2017)

1.3.3 Méthodes d'analyse quantitative basées sur la fluorescence

Une étude quantitative de la fluorescence peut être réalisée dans la mesure où il existe une relation de proportionnalité entre la concentration de la solution et l'intensité de la fluorescence à une longueur d'onde donnée. Des équations permettent de décrire cette relation.

D'abord, le rendement quantique détermine l'efficacité d'une molécule à fluorescer et est défini par l'équation 1 :

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_a} \quad (\text{Équation 1})$$

Où I_f est le nombre de photons émis et I_a est le nombre de photons absorbés. On notera que : $0 < \Phi_f < 1$

En posant : $I_a = I_0 - I_t$

Où I_t est l'intensité de lumière transmise (ou qui passe à travers l'échantillon) et I_0 est l'intensité d'irradiation procurée à l'échantillon par le spectromètre

$$I_f = \Phi_f(I_0 - I_t) \quad \text{ou, écrit autrement : } I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right) \quad (\text{Équation 2})$$

Comme A est égal à $\log(I_0/I_t)$, (A étant l'absorbance) l'équation 2 devient:

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A}) \quad (\text{Équation 3})$$

Or

$$10^{-A} = 1 - 2,303A + \frac{(2,303)^2}{2!} - \dots + \dots$$

Si la solution est diluée, l'absorbance A sera très faible, donc le terme 10^{-A} serait proche de $1 - 2,303A$

L'équation 3 peut être simplifiée comme suit

$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot A$$

Soit

$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (\text{Équation 4})$$

Pour les très faibles concentrations $A \ll 0,01$ on peut donc écrire

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot C \quad \text{où K est une constante.} \quad (\text{Équation 5})$$

Donc d'après l'équation 5, pour les solutions diluées, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration de la solution.

1.3.4 Détection de l'apparition de fluorescence via la réaction impliquant un analyte et une sonde fluorescente

Les sondes fluorescentes sont des molécules qui voient leur émission de fluorescence modifiée en réponse à un événement de liaison, à une réaction chimique ou à un changement dans leur environnement immédiat. La plupart des sondes fluorescentes sont basées sur des mécanismes par lesquels l'émission de fluorescence peut être contrôlée, à la hausse ou à la baisse. Ces mécanismes sont principalement : le transfert d'électron photoinduit (PET), le transfert d'énergie de résonance de Förster (FRET) et la modulation du transfert de charge intramoléculaire (ICT). (Fu et Finney, 2018)

1.3.4.1 Transfert d'électron photoinduit

Le transfert d'électron photoinduit (*Photoinduced Electron Transfer*, PET) implique le transfert d'électrons d'un donneur (D) à un fluorophore à l'état excité. (Figure 1.7) Ceci abaisse l'énergie nette de l'état excité du fluorophore et bloque la relaxation $\pi^* \rightarrow \pi$, ce qui conduit à l'extinction de fluorescence. Pour que le PET ait lieu, l'énergie de l'électron à donner doit se situer entre les énergies des orbitales π et π^* du fluorophore. Dans une situation initiale où un fluorophore est « éteint » par le mécanisme PET d'un donneur à proximité, l'arrivée d'un analyte qui perturbe le site donneur abolit le processus PET et rétablit la fluorescence du fluorophore. Une caractéristique importante de cette approche est la liaison réversible, qui permet de mesurer à la fois les augmentations et les diminutions de la concentration d'un analyte. (De Silva *et al.*, 2009; Fu et Finney, 2018)

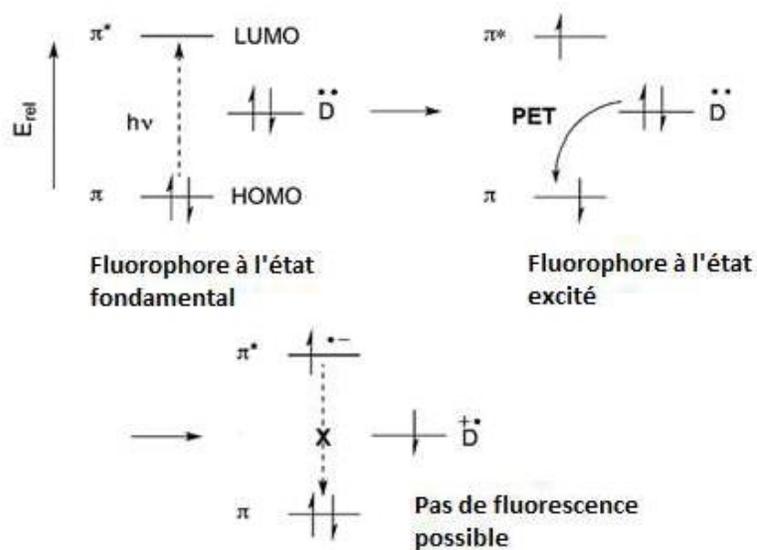


Figure 1.7 Extinction de fluorescence par transfert d'électrons photo-induit (PET) par un donneur (D). (Fu et Finney, 2018)

Exemple de détection impliquant le PET.

La sonde montrée à la figure 1.8 est basée sur un fluorophore de type fluorescéine et d'une amine tertiaire, comme donneur intramoléculaire, qui éteint la fluorescence de la partie fluorescéine par un processus PET. La présence d'un ion Cu^{2+} invalide le site donneur, accaparant la paire d'électrons non liants de l'amine dans une liaison de coordination. Cela conduit à l'élimination du PET intramoléculaire et permet à la sonde de devenir émissive. (Fu et Finney, 2018)

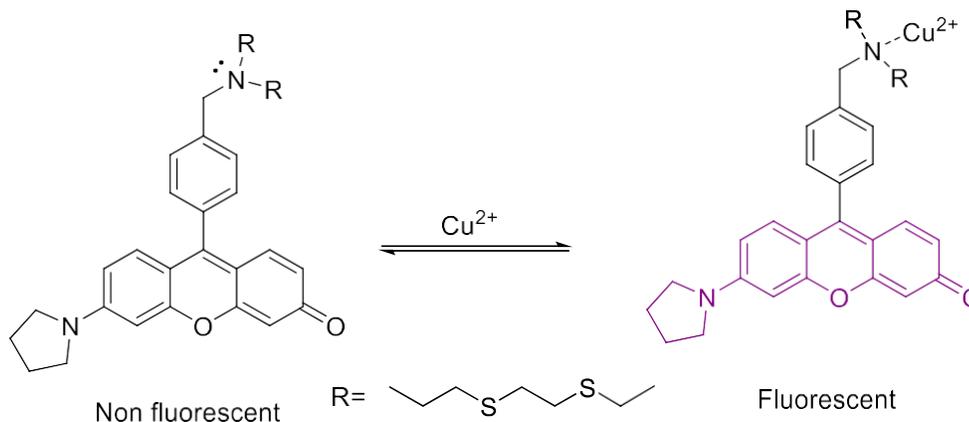


Figure 1.8 Sonde fluorescente utilisant le PET pour détecter des ions Cu^{2+} dans un milieu cellulaire.(Fu et Finney, 2018)

1.3.4.2 Transfert d'énergie de résonance de fluorescence

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) est un processus physique par lequel l'énergie est transférée de manière non radiative d'un fluorophore moléculaire excité (donneur) à un autre fluorophore non excité (accepteur) au moyen d'un couplage dipôle-dipôle intermoléculaire.(Sekar et Periasamy, 2003) En conséquence, la fluorescence de la molécule donneuse est éteinte et la molécule réceptrice devient fluorescente.(Didenko, 2001) Le taux de transfert d'énergie dépend de nombreux facteurs, tels que l'étendue de chevauchement spectral, l'orientation relative de la transition dipôle et, plus particulièrement, la distance entre donneur et accepteur L l'intensité du transfert diminuant de façon drastique lorsque la distance passe de 1 nm à 10 nm. (Chen, G. *et al.*, 2013)

Exemple de détection impliquant le FRET.

Dans l'exemple de la figure 1.9, le donneur est un groupe aminocoumarine et l'accepteur est un groupe dérivé de la rhodamine. En milieu basique ou neutre, la forme lactame de la rhodamine n'étant pas conjuguée, ce fluorophore est non-fluorescent. En milieu acide par contre, la protonation convertit la forme lactame de la rhodamine en amide, rendant alors le fluorophore conjugué et fluorescent. Grâce au processus de FRET, plutôt que d'exciter la portion rhodamine directement, l'activation survient de façon indirecte via l'excitation de la portion aminocoumarine, qui transfère alors son énergie à la portion rhodamine, qui elle, réémettra la lumière. Le processus de transfert étant intramoléculaire, la distance entre le donneur et l'accepteur est bien en-dessous de 10 nm. (Fu et Finney, 2018)

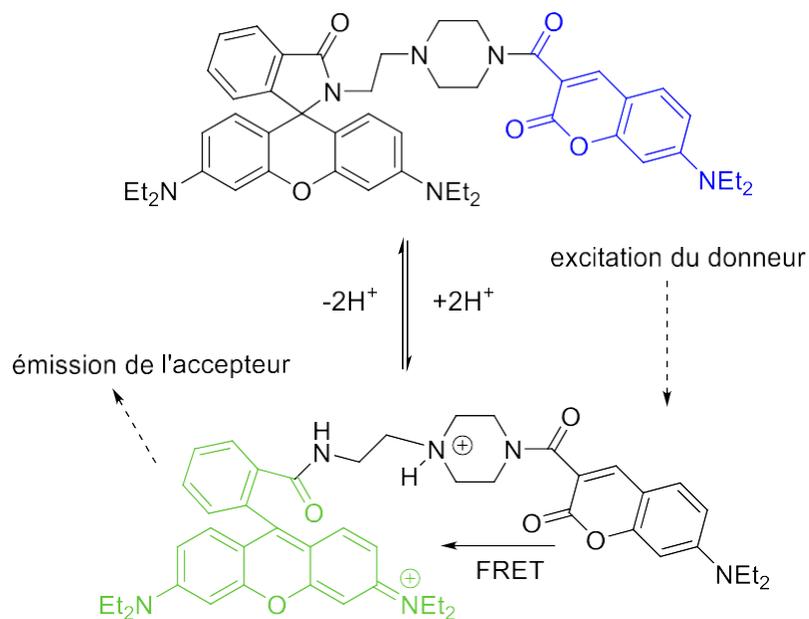


Figure 1.9 Sonde fluorescente utilisant le FRET pour la mesure du pH dans les lysosomes.(Fu et Finney, 2018)

1.3.4.3 Transfert de charge intramoléculaire

Parfois on observe un transfert de charge et donc, d'un électron, d'un groupement donneur à un groupement accepteur qui appartiennent à la même molécule. Le processus de transfert de charge intramoléculaire (*Intramolecular Charge Transfer*, ICT) se produit généralement dans l'état photo-excité atteint par une molécule en raison de l'absorption de lumière d'une longueur d'onde appropriée. La photoexcitation facilite le transfert d'un électron d'une partie d'une molécule à une autre partie. Les groupements donneur et accepteur doivent être conjugués, donc connectés via un pont d'électrons π . (Misra et Bhattacharyya, 2018)

Exemple de détection impliquant le ICT.

Dans l'exemple de la figure 1.10, une sonde a été utilisée pour détecter le sulfure d'hydrogène (H_2S), combinant par conjugaison, le système donneur-accepteur BODIPY-aldéhyde. En absence de H_2S , le BODIPY (riche en électrons) transfère une partie de sa charge négative vers le cycle benzénique appauvri en électrons par les groupes aldéhyde et acrylate. Cela rend le système fluorescent. En présence de H_2S , la formation du cycle sulfuré annihile le pouvoir électrophile du cycle benzénique et le transfert de charge est annulé, faisant disparaître la fluorescence. C'est donc une détection d'analyte par extinction de fluorescence. (Fu et Finney, 2018)

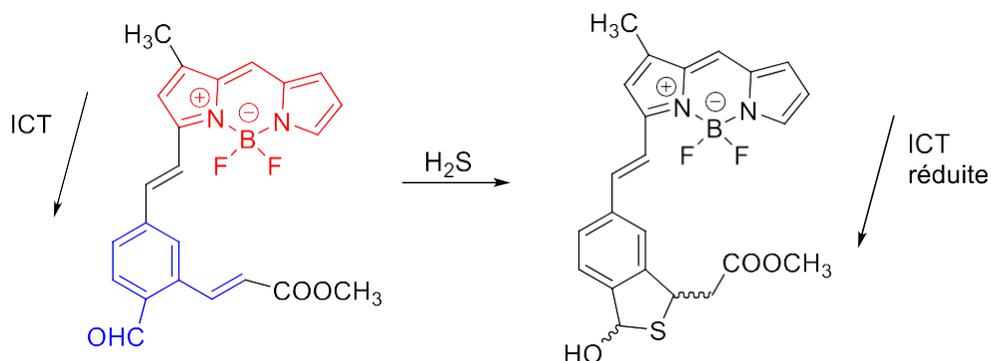


Figure 1.10 Sonde fluorescente utilisant le ICT pour détecter la molécule H_2S dans des cellules. (Fu et Finney, 2018)

1.3.5.d) Détection d'ions nitrites et azotés réactifs avec des sondes fluorescentes

Pour rappel, il est connu que la photolyse des néonicotinoïdes de classe chimique *N*-nitroguanidines (imidaclopride **1**, clothianidine **2**, thiaméthoxame **3**, et dinotéfurane) entraîne le dégagement d'ions nitrites ou d'autres espèces azotées. Il est donc envisageable d'utiliser des méthodes servant à détecter ces espèces réactives de l'azote pour la détection des néonicotinoïdes de façon indirecte.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses méthodes pour la détection et la détermination des ions nitrites et d'autres espèces azotées ont été rapportées. Il s'agit notamment de la spectrophotométrie, de la chimioluminescence, de l'électrochimie, de la chromatographie, de l'électrochimoluminescence et de la spectrofluorimétrie. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. (Wang *et al.*, 2017)

La méthode qui nous intéresse dans ce projet est la spectrofluorimétrie. Ce choix repose sur sa sensibilité élevée procurant de faibles limites de détection, sa bonne sélectivité ainsi que ses protocoles relativement simples.

Les méthodes spectrofluorimétriques sont basées sur les changements d'intensité de fluorescence, en particulier des sondes fluorescentes qui, lorsqu'elles réagissent avec l'ion nitrite, subissent une nitrosation ou une diazotation. C'est cette spécificité chimique de l'ion nitrite, soit un pou voir électrophile pouvant donner des composés de l'azote conjugués, qui permet aux sondes fluorescentes de détecter cet anion. (Wang *et al.*, 2017)

Comme les néonicotinoïdes peuvent dégager aussi d'autres espèces azotées tel que l'oxyde nitrique, des sondes fluorescentes habituellement utilisées pour la détection de l'oxyde nitrique seront également évaluées dans notre étude.

Parmi les sondes fluorescentes qui, selon la littérature, fonctionnent bien dans le cadre de la détection des ions nitrites et des autres espèces azotées dont l'oxyde nitrique, certaines ont retenu notre attention en raison de leur accessibilité ainsi que la simplicité des protocoles pour les utiliser.

Nous citerons le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** (Misko *et al.*, 1993), l'acide folique **12** (Lu *et al.*, 2015) et un complexe organocuvré **7** (Rout et Mondal, 2015). Ces trois molécules ont été rapportées à la base pour la détection des ions nitrites.

Par ailleurs une coumarine modifié **11** (Ma *et al.*, 2014) ainsi qu'une rhodamine modifiée (Zheng *et al.*, 2008), utilisées à la base pour la détection de l'oxyde nitrique, ont été testées dans le cadre de notre projet.

CHAPITRE II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre concerne la détection de l'imidaclopride **1** via ses produits de photolyse par des sondes fluorescentes. La première partie sera réservée à la synthèse de certaines sondes fluorescentes qui ne sont pas disponibles commercialement.

Dans la deuxième partie, la dégradation de l'imidaclopride **1** sera étudiée par UV-visible, fluorimétrie et HPLC-MS. La troisième et dernière partie sera consacrée à l'étude de la détection de l'imidaclopride **1** via ses produits de photolyse par différentes sondes fluorescentes.

2.1 Matériels et méthodes

Toutes les mesures et expériences ont été effectuées à température ambiante, soit 22°C.

2.1.1 Substances utilisées

Les néonicotinoïdes purs étaient des standards analytiques qui provenaient de Sigma-Aldrich pour la thiaméthoxame **3** et le clothianidine **2** et de Fluka pour l'imidaclopride **1**. Tous étaient d'une pureté de 99,9%.

Les produits organiques et inorganiques fins tels que l'acétate d'éthyle, l'acétoacétate d'éthyle, l'acétoacétate de méthyle, l'acétone, la 2-acétylpyridine, l'acide chlorhydrique, l'acide folique, l'anisole, le carbonate de potassium anhydre, le

chloroforme, le chlorure d'ammonium, le chlorure de sodium, le diméthylsulfoxyde, le 2,3-diaminonaphthalène (pureté $\geq 98,0\%$), le dioxyde de sélénium, l'éthanol, l'iodométhane, le perchlorate de cuivre (II) hexahydraté, 1-pyrèncarboxaldéhyde, le résorcinol et le sulfate de magnésium provenaient de Sigma-Aldrich.

L'acide phosphorique 80,0% provenait d'Anachemia, le chloroforme deutéré de Cambridge Isotope Laboratories, la solution tampon pH=10 de chez Fisher Scientific, le toluène de chez EMD Millipore (Sigma), l'acétonitrile de grade HPLC 190 de Caledon Laboratories et l'eau de grade HPLC de Sigma-Aldrich.

Toutes les substances ont été utilisées telles que reçues.

2.1.2 Appareils

Les expériences de photolyse ont été réalisées par irradiation dans un photoréacteur maison, utilisant une lampe à décharge contenant des vapeurs de mercure et de l'argon (marque Oriel, modèle *Pencil Style* PS-6035) comme source de lumière UV. La lampe était alimentée via un bloc fournissant un courant alternatif de 18 mA à 2300 V (CA, 60 Hz), de la marque Entela, modèle PS-1. Cette lampe au mercure présente plusieurs raies d'émission dans la région UV-visible entre 200 et 800 nm, l'émission maximale étant à 254 nm. L'intensité du rayonnement UV est d'environ $74 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (à 25 cm) selon le fabricant de la lampe. Avec le réacteur utilisé, les échantillons étaient placés à une distance de 8 cm de la lampe.

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à UV/vis/NIR de Perkin Elmer, modèle Lambda 750. Les spectres d'émission de fluorescence et les mesures de fluorimétrie ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre de luminescence de Perkin Elmer, modèle LS-45. L'analyse HPLC-MS a été réalisée à l'aide d'un système Agilent, HPLC Modèle 1200, couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (*Time of flight*) Modèle 6210 utilisant une source d'ions Electrospray.

L'analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) a été réalisée avec un spectromètre opérant à 300 MHz (canal des protons) de marque Bruker, modèle Ultrashield 300.

2.2 Synthèses chimiques

2.2.1 Synthèse du complexe perchlorate de bis(acétonitrile)-3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one cuivre (II) **7**

La synthèse du complexe organocuivre **7** a été effectuée, tel que décrite dans la publication de Rout et coll. (Rout et Mondal, 2015), avec quelques modifications.

Synthèse du ligand : 3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one **6**

Dans un ballon de 10 mL, ont été mélangés du 2-acétylpyridine (0,0100 mL, 0,0891 mmol), du 1-pyrèncarboxaldéhyde (0,0232 g; 0,1007 mmol) et de l'éthanol (2 mL). À la solution formée, de l'hydroxyde de sodium aqueux 1,5 M (0,1000 mL, 5,326 mmol) a été ajouté. Ce mélange a été agité pendant 4 h à température ambiante, le précipité orangé résultant a été isolé par filtration puis, recristallisé dans l'éthanol pour donner le ligand **6** sous forme d'aiguilles jaunes (0,0164 g, 55 %), dont la pureté a été vérifiée par l'enregistrement du spectre RMN ^1H . (Appendice A)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.15 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 8.84 – 8.77 (m, 1H), 8.69 – 8.55 (m, 3H), 8.32 – 8.17 (m, 5H), 8.15 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.11 – 7.99 (m, 2H), 7.93 (td, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 (ddd, $J = 7.6, 4.7, 1.3$ Hz, 1H).

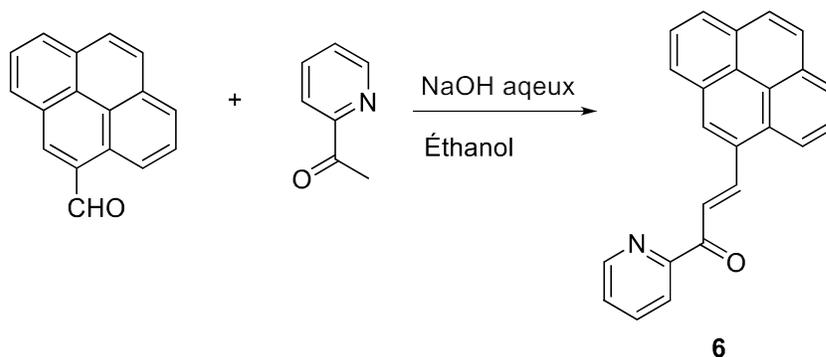


Figure 2.1 Synthèse du ligand **6**. (Rout et Mondal, 2015)

Synthèse du complexe perchlorate de bis(acétonitrile)-3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one cuivre (II) **7**

Le perchlorate de cuivre (II) hexahydraté (0,0118 g, 0,0318 mmol) a été dissous dans de l'acétonitrile (1 mL). À cette solution, le ligand **6** (0,0092 g, 0,028 mmol) a été ajouté lentement sous agitation constante. L'agitation a été maintenue pendant 1 h à température ambiante. Le mélange résultant a été concentré sous vide partiel, additionné de toluène (0,2 mL), puis gardé au congélateur pendant 3 jours. La suspension a été filtrée et le complexe perchlorate de bis(acétonitrile)-3-(pyrén-8-yl)-1-(pyridin-2-yl)prop-2-én-1-one cuivre (II) **7** a été obtenu sous la forme d'un solide de couleur violet foncé (0,0112 g, rendement de 60 %).

Partant du fait que le complexe organocuiuré **7** est paramagnétique, on ne peut pas effectuer d'analyse RMN ^1H car les pics seraient trop larges et perdraient donc en résolution. En outre, ils pourraient ne pas être visibles car ils se confondraient avec la ligne de base. Ils pourraient également donner lieu à des déplacements chimiques négatifs. On ne pourrait donc pas compter sur cette analyse pour effectuer une caractérisation de ce composé.

Avant de procéder à des analyses fluorimétriques, on a au préalable effectué des *pré-scans* avec un spectrofluorimètre afin de connaître toutes les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de ce composé. Les spectres visualisés correspondent en grande partie aux spectres d'absorbance et d'émission de l'article de référence. On a donc de bonnes raisons de penser qu'on a le même complexe que celui utilisé par les auteurs de cet article.

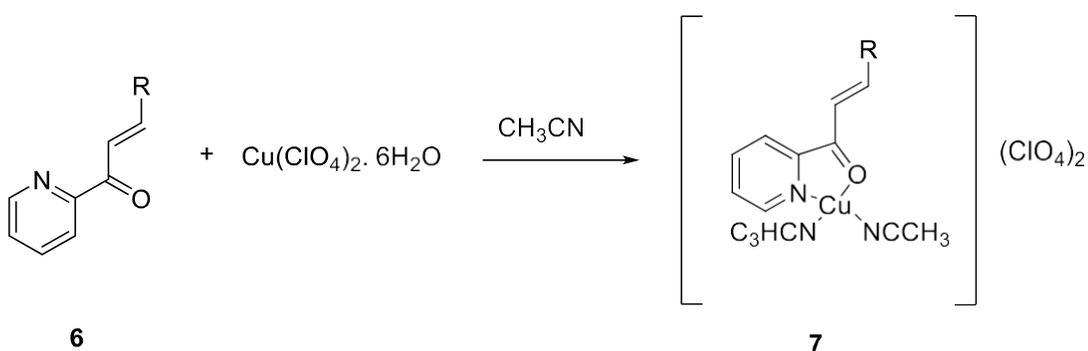


Figure 2.2 Synthèse du complexe organocuire 7. (Rout et Mondal, 2015)

2.2.2 Synthèse multi-étapes de 4-(7-méthoxy-2-oxo-2H-chromèn-4-yl)-2,6-diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle (4)

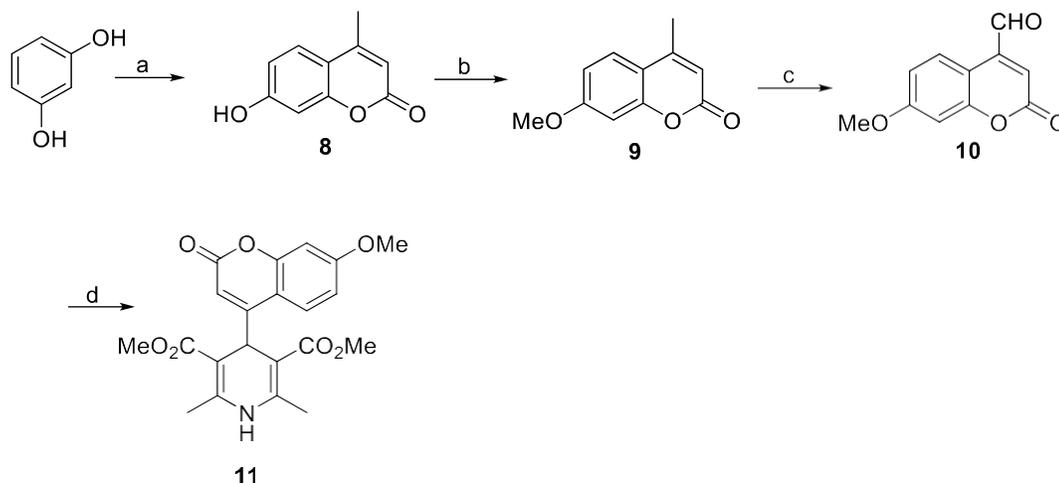


Figure 2.3 Schéma de la synthèse de 11. (a) Acétoacétate d'éthyle, H_3PO_4 , température ambiante, 48 h; (b) Acétone, K_2CO_3 , CH_3I , reflux, 7 h; (c) SeO_2 , anisole, reflux, 5 h; (d) acétoacétate de méthyle, NH_3 , EtOH, reflux, 6 h. (Ma *et al.*, 2014)

La synthèse a été effectuée tel que décrite par Ma et coll. (Ma *et al.*, 2014) avec quelques modifications.

a) 7-Hydroxy-4-méthylcoumarine (8)

Dans un ballon de 25 mL ont été introduits, du résorcinol (1,1807 g, 10,73 mmol), de l'acétoacétate d'éthyle (1,30 mL, 9,80 mmol) et de l'acide phosphorique concentré à 85% (5,2 mL). Le mélange a été agité à température ambiante pendant 48 h. L'avancement de la réaction a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Ensuite le mélange réactionnel a été versé dans de l'eau (1,5 mL). Le solide a été recueilli par filtration et purifié par recristallisation dans de l'éthanol à 95 %. Le composé (1) a été obtenu sous la forme d'une poudre blanche (1,1216 g, rendement de 65 %), dont la pureté a été vérifiée par l'enregistrement du spectre RMN ^1H . (Appendice B)

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.54 (s, 1H), 7.57 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.79 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.11 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 2.35 (d, J = 1.2 Hz, 3H).

b) 7-Méthoxy-4-méthylcoumarine (**9**)

Dans un ballon de 25 mL ont été introduits, le composé **8** (0,3514 g, 1,994 mmol), de l'acétone (3 mL) et du carbonate de potassium anhydre (0,6010 g, 4,349 mmol). Le mélange a été chauffé au reflux pendant 10 min puis de l'iodométhane (0,140 mL, 2,25 mmol) a été ajouté goutte à goutte. Le mélange résultant a été chauffé au reflux pendant 7 h, il a été ramené ensuite à température ambiante. Des solutions de chlorure d'ammonium et d'acide chlorhydrique dilué (1,00 M) ont été ajoutés jusqu'à dissolution des solides puis le mélange a été extrait 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. L'extrait a été lavé avec de la saumure, séché avec du sulfate de magnésium, filtré puis concentré sous vide partiel. Le composé (**2**) a été obtenu sous la forme de cristaux blanc (0,3031 g, rendement de 80 %), dont la pureté a été vérifiée par l'enregistrement du spectre RMN ^1H . (Appendice C)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 8.7 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.14 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.40 (d, J = 1.3 Hz, 3H).

c) 4-Formyl-7-méthoxycoumarine (**10**).

Dans un ballon de 25 mL ont été introduits, le composé **9** (0,2919 g, 1,536 mmol), du dioxyde de sélénium (0,6148 g, 5,541 mmol) et de l'anisole (15 mL). Le mélange réactionnel a été chauffé au reflux pendant 5 h. La suspension résultante a été filtrée à chaud. Le filtrat a été ramené à température ambiante et concentré sous vide partiel. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair avec du gel de silice comme phase stationnaire et un mélange d'acétone et de chloroforme (1 : 99) comme éluant. Le

composé (3) a été obtenu sous forme d'un solide cristallin jaune (0,1786 g, rendement de 57 %), dont la pureté a été vérifiée par l'enregistrement du spectre RMN ^1H . (Appendice D)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.07 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.95 –6.89 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.90 (s, 3H).

d) 4-(7-Méthoxy-2-oxo-2*H*-chromèn-4-yl)-2,6-diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle (**11**)

Le composé **10** (0,1735 g, 0,8504 mmol), de l'acétoacétate de méthyle (0,600 mL, 4,70 mmol) et une solution d'ammoniaque concentrée 18 M (0,130 mL, 2,34 mmol) ont été dissous dans de l'éthanol (10 mL) et le mélange a été chauffé au reflux pendant 6 h. Le mélange réactionnel a été ramené à température ambiante et concentré sous vide partiel. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair avec du gel de silice comme phase stationnaire et un mélange d'acétone et de chloroforme (1 : 99) comme éluant. Le composé (4) a été obtenu sous forme d'un solide amorphe jaune (0,0564 g, 13 %), dont la pureté a été vérifiée par l'enregistrement du spectre RMN ^1H . (Appendice E)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.78 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.51 (s, 6H), 2.33 (s, 6H).

2.3 Photolyse de l'imidaclopride **1**, du clothianidine **2** et du thiaméthoxame **3**.

Dans un ensemble de tubes à essai de 1,5 mL ont été mélangés 100 μL d'imidaclopride **1** (1 mM dans l'acétonitrile, ou autre concentration tel que mentionné plus loin), 20 μL d'eau pure et 80 μL d'acétonitrile. Ces solutions ont été ensuite transférées dans des

cellules en quartz de 1 cm de côté puis, irradiées dans le photoréacteur pour des durées variées, soit 5, 15, 30 et 60 min. Pour chacune de ces solutions, des mesures d'absorbance UV-visible ont été effectuées avec le spectrophotomètre UV-vis-NIR. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec le spectromètre de luminescence (ci-après, fluorimètre) en réglant l'excitation à 269 nm. Les largeurs de fente de l'excitation et de l'émission étaient respectivement de 10 nm et 15 nm.

2.4 Analyses de l'imidaclopride **1** et de ses produits de dégradation par HPLC-MS

Des analyses HPLC-MS ont également été effectuées à partir de solutions d'imidaclopride **1** avant et après une photolyse. L'analyse HPLC a été effectuée avec une colonne Agilent Eclipse Plus C18 (diamètre interne de 3 mm, longueur de 50 mm, granulométrie de 1,8 μm). La phase mobile était constituée à partir des solutions A (eau additionnée de 0,1 % d'acide formique aqueux) et B (acétonitrile additionné de 0,1 % d'acide formique aqueux). Le gradient variait comme suit : 0,5 % B pendant 1 minute, allant progressivement sur une durée de 10 minutes jusqu'à 90 % B, maintenue 2 minutes. Le débit de phase mobile était de 0,4 mL/min et le volume d'injection était de 5 μL . Les conditions relatives au spectromètre de masse étaient : gamme m/Z 115-1000, l'ionisation en mode positif à 350 °C et 4000 V suivie d'une fragmentation à 100 V.

2.5 Détection de l'imidaclopride **1** par des sondes fluorescentes

Les sondes fluorescentes qui ont été utilisées sont l'acide folique **12** (Lu *et al.*, 2015), un complexe organocuivre **7** (Rout et Mondal, 2015), une coumarine conjuguée **11** (Ma *et al.*, 2014) et le 2,3-diaminonaphthalène **13** (Misko *et al.*, 1993).

Dans le cadre de notre projet d'étude, on a dans un premier temps vérifié les conditions permettant de détecter les ions nitrites avec les sonde fluorescentes (à l'exception de la

coumarine conjuguée **11** du fait que c'est une sonde qui a servi à détecter du monoxyde d'azote et qu'elle ne présente pas de réponse fluorescente en présence de nitrite, selon les auteurs. Comme mentionnée plus haut, la photolyse de l'imidaclopride **1** génère différentes espèces azotées dont le NO; on a donc émis l'hypothèse que cette molécule pourrait détecter l'imidaclopride **1** via ses produits de photolyse). Dans un deuxième temps, on a tenté d'adapter cette méthode à la détection des nitrites vraisemblablement générés par la photolyse de l'imidaclopride **1**.

2.5.1 Détection de l'imidaclopride **1** par l'acide folique **12**

Dans un tube à essai, ont été mis de l'eau de grade HPLC (1 mL), de l'acide folique **12** 2,00 mM (8,0 μ L) et du HCl aqueux 2,00 M (5,0 μ L). Au mélange préparé précédemment, une solution aqueuse de NaNO₂ 1,00 mM (20,0 μ L) a été ajoutée. Après une période d'incubation de 10 min, cette solution a été irradiée dans le photoréacteur pendant 3 min. À cette solution, du NaOH aqueux 1,00 M (10,0 μ L) a été ajouté. Des mesures d'intensité de fluorescence ont été effectuées par l'enregistrement de spectres d'émission lors d'une excitation à 370 nm.

L'objectif principal de ce projet d'étude étant la détection de l'imidaclopride **1** et d'autres néonicotinoïdes, l'expérimentation a consisté à remplacer le nitrite de sodium par de l'imidaclopride **1** pré-irradié pendant 30 min à différentes concentrations allant de 0,001 mM à 1,00 mM. (Voir le protocole de photolyse cité plus haut.) La détection de l'imidaclopride **1** par l'acide folique **12** est illustrée par la figure 2.4. Des mesures d'intensité de fluorescence ont été effectuées par l'enregistrement de spectres d'émission lors d'une excitation à 370 nm.

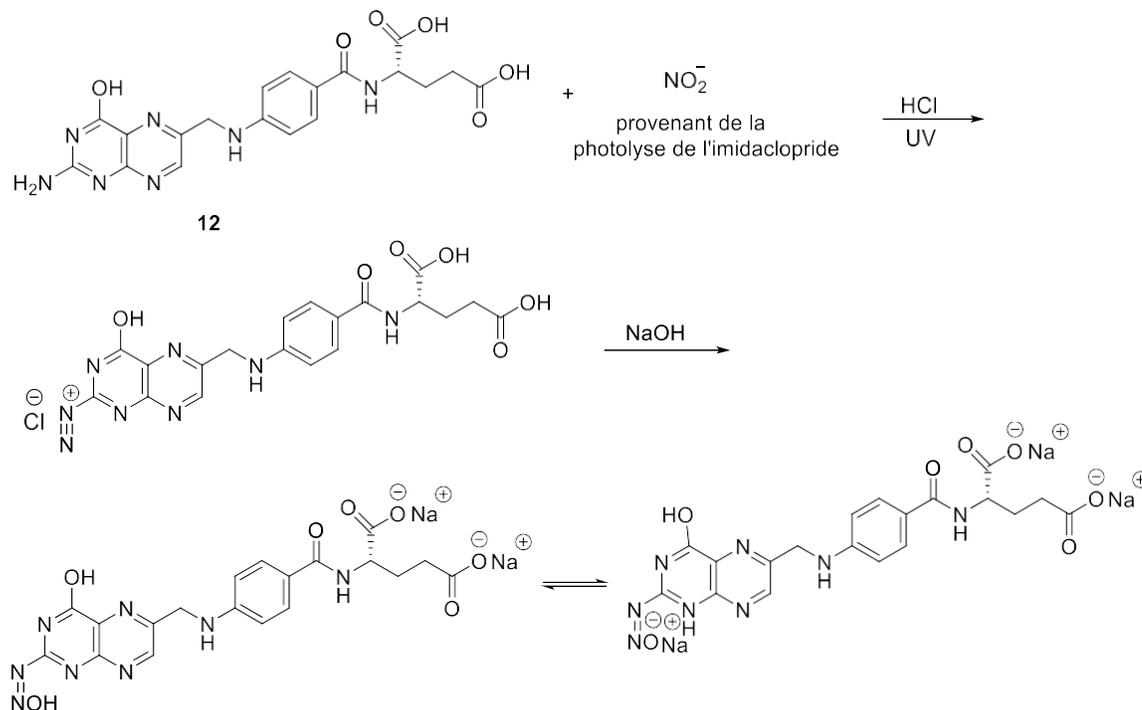


Figure 2.4 Détection de l'imidaclopride **1** par l'acide folique **12**.

2.5.2 Détection de l'imidaclopride **1** avec le complexe organocuvré **7**

Cinq solutions de travail ont été préparées par la dilution d'une solution concentrée de complexe organocuvré **7** aqueux 10,0 mM (10,0 μL) avec de l'acétonitrile de grade HPLC (1 mL). L'une d'elles a été conservée comme témoin. Aux quatre autres solutions de travail, du nitrite de sodium (100 μL) a été ajouté à différentes concentrations (0,01 mM à 1,00 mM). Après une période d'incubation de 15 min, pour chacune de ces solutions, une mesure de la fluorescence a été effectuée par l'enregistrement de spectres d'émission à une longueur d'onde d'excitation à 430 nm.

L'objectif de cette étude étant la détection de l'imidaclopride **1** et d'autres néonicotinoïdes, on a procédé au remplacement du nitrite de sodium par de l'imidaclopride **1** pré-irradié pour une durée de 30 min à différentes concentrations (0,01 mM à 1,00 mM). (Voir le protocole de photolyse cité plus haut.) Cette réaction

DAN **13**. Cette solution de DAN **13** (20, μL) a été mélangée à une solution aqueuse de NaNO_2 , 1,00 mM (200 μL). Cette solution a été incubée pendant 10 min, puis une solution tampon pH=10 (200 μL) a été ajoutée. Les spectres d'émission de fluorescence de cette solution ont été enregistrés sous excitation à une longueur d'onde de 365 nm.

Après avoir étudié la fluorimétrie des produits de réaction de DAN **13** avec le nitrite de sodium, ce dernier réactif a été remplacé par des solutions d'imidaclopride **1** préirradiées. (Voir le protocole de photolyse cité plus haut, concentrations d'imidaclopride **1** et temps d'irradiation variés.) Les spectres d'émission de fluorescence de ces solutions ont été enregistrés sous excitation à une longueur d'onde de 365 nm, longueur d'onde de forte absorption du naphthotriazole **15**. Cette réaction est illustrée par la figure 2.7.

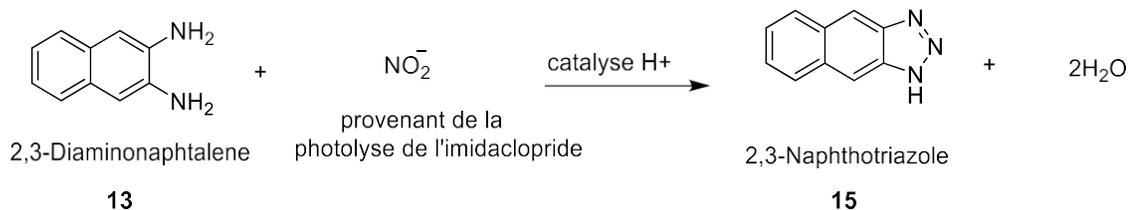


Figure 2.7 Détection de l'imidaclopride **1** par le DAN **13**.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, sont d'abord présentés les résultats de suivi de l'irradiation de l'imidaclopride **1** par la spectrophotométrie UV-Visible, par la spectrofluorimétrie et par la chromatographie HPLC-MS. On a constaté que le principal produit de cette photolyse est l'imidaclopride urée **5**. D'après des études plutôt récentes, ce produit est accompagné d'espèces azotées, dont l'ion nitrite (NO_2^-) et l'oxyde nitrique (NO). Ceci nous a poussé à explorer la possibilité d'utiliser des sondes fluorescentes, qui ont servi dans le passé à la détection de l'ion nitrite ou de l'oxyde nitrique, en vue maintenant de détecter l'imidaclopride **1** de façon indirecte.

En conséquence, dans la deuxième partie de ce chapitre seront présentés les résultats de nos tentatives en vue de la détection de l'imidaclopride **1** avec quatre sondes fluorescentes. Les sondes étudiées sont l'acide folique **12**, un complexe organocuvré **7**, une coumarine conjuguée **11** et le 2,3-diaminonaphthalène **13**.

La sonde 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** a donné les meilleurs résultats dans la détection de l'imidaclopride **1** par l'apparition d'un signal fluorescent visualisable sous une lampe UV à 365 nm. Cette sonde a réussi à détecter l'imidaclopride **1** jusqu'à des concentrations aussi basses que 1 μM . Elle a aussi servi dans la détection du thiaméthoxame **3** et du clothianidine **2**, deux néonicotinoïdes qui font partie de la même classe chimique que l'imidaclopride **1**, soit celle des *N*-nitroguanidines. Enfin, ces résultats ont été vérifiés et confirmés par une analyse HPLC-MS. Lors de cette analyse,

il a été constaté que la réactivité de l'imidaclopride **1** pré-irradié avec la 2,3-diaminonaphthalène **13** donne le même produit que lors de la réaction de cette sonde avec des ions nitrites. Ce produit est le 2,3-naphthotriazole **15**, qui émet un signal fluorescent. Ceci étant l'objectif que l'on s'est fixé dans ce projet d'étude.

3.1 Photolyse de l'imidaclopride **1** dans le photoréacteur

Les expériences de photolyse ont été réalisées par irradiation dans un photoréacteur maison (figure 3.1), constitué d'une lampe à décharge contenant des vapeurs de mercure et d'argon Hg (Ar), alimentée via un bloc fournissant un courant alternatif de 18 mA à 2300 V (CA, 60 Hz). Ce photoréacteur a sept emplacements pour échantillons, chacun se situant à une distance de 8 cm par rapport à la lampe. Ces échantillons peuvent être placés dans des tubes cylindriques en quartz (du type utilisé pour la RMN) ou des cuvettes à section carrée en quartz. **Attention : Les rayonnements UV-C générés par cette lampe peuvent endommager la peau et les yeux, donc le photoréacteur est enclavé dans un habitacle fermé.**



Figure 3.1 Photoréacteur utilisé pour les expériences de photolyse.

Le spectre d'émission de la lampe est représenté sur la figure 3.2 et provient du site du fabricant Newport.

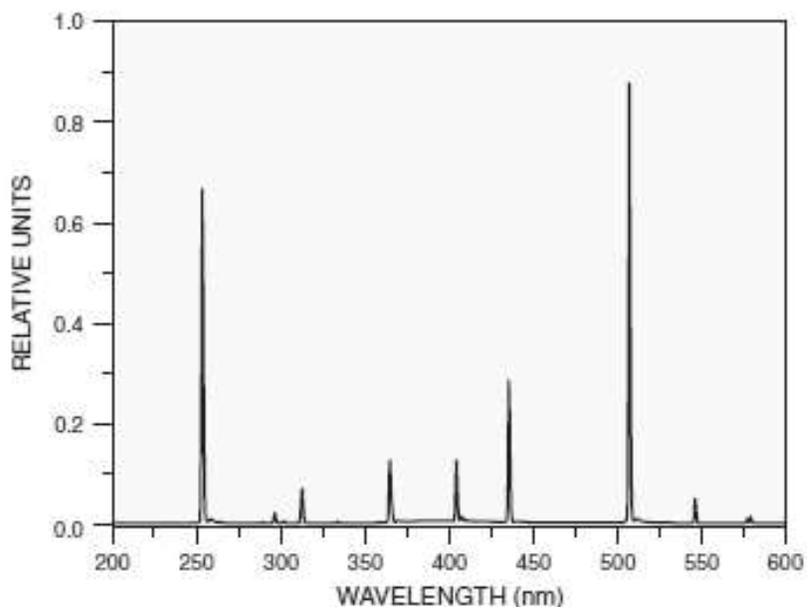


Figure 3.2 Spectre d'émission de la lampe 6035 Hg (Ar), fonctionnant à 18 mA, mesuré avec le monochromateur MS257 avec des fentes de 50 μm .

3.1.1 Monitoring de l'imidaclopride **1** via l'absorbance UV-visible.

Selon Badawy et al. (Badawy *et al.*, 2019), l'absorbance à 269 nm peut être utilisée comme pic caractéristique de l'imidaclopride **1**. En effet, en testant plusieurs solutions d'imidaclopride **1** à différentes concentrations, il a été constaté que l'intensité de la bande d'absorbance à 269 nm est proportionnelle à la concentration en imidaclopride **1**.

Dans le cas du présent projet, il a été observé qu'après la photolyse de l'imidaclopride **1** (1,00 mM dans l'acétonitrile), l'intensité du pic à 269 nm diminuait avec l'augmentation du temps d'irradiation. (Figure 3.3) Par ailleurs, l'absorbance résiduelle après 30 et même seulement 15 min, est nettement réduite si on la compare à l'absorbance de l'imidaclopride **1** non irradié. Ceci s'explique par la dégradation de l'imidaclopride **1**, donc sa diminution au sein de la solution.

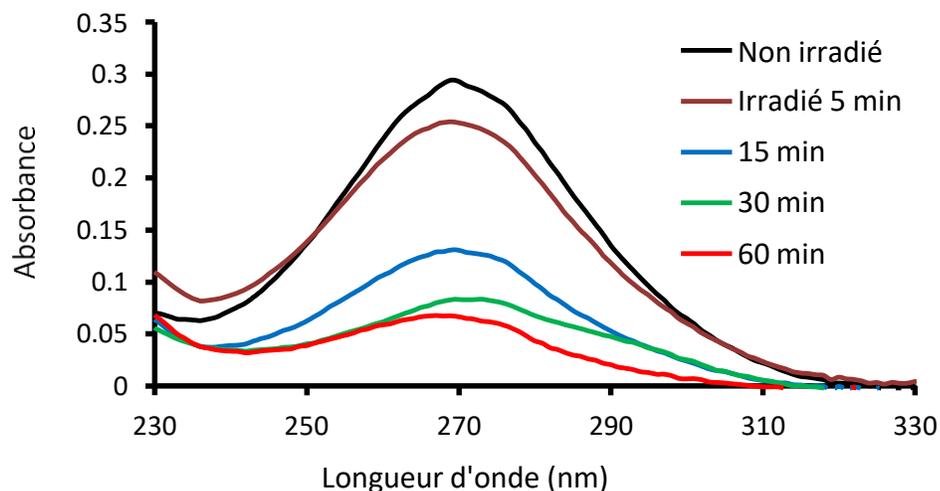


Figure 3.3 Courbes d'absorbance de l'imidaclopride **1** non irradié et irradié pendant des durées variées.

3.1.2 Fluorescence de l'imidaclopride **1** irradié en solution

La spectrofluorimétrie indique que la molécule d'imidaclopride **1** n'est pas fluorescente et on a pu vérifier qu'il en est de même pour ses produits de photolyse. (Figure 3.4). Ni la spectrométrie d'Absorbance UV-visible, ni la spectrofluorimétrie n'étant des méthodes d'analyse structurale, on ne peut pas se prononcer sur l'identité du ou des composés contenus dans les solutions de l'imidaclopride **1** après irradiation. En vue d'identifier le contenu de ces solutions, une analyse HPLC-MS a été effectuée.

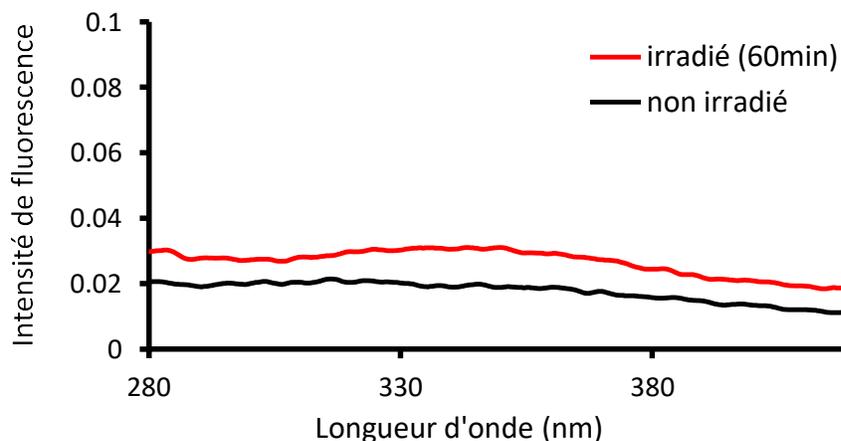


Figure 3.4 Courbes spectrofluorimétriques de l'imidaclopride **1** non-irradié et irradié, lors d'une excitation à une longueur d'onde de 269 nm.

3.1.3 Analyse HPLC-MS de solutions d'imidaclopride **1** irradiées

Tout d'abord, une injection de l'imidaclopride **1** non irradié en HPLC-MS a permis de constater que, dans les conditions utilisées, le pic à 6,06 min correspond à ce néonicotinoïde. (Figure 3.5) Ensuite, on voit que la surface du pic d'imidaclopride **1** diminue avec l'augmentation du temps d'irradiation. Par ailleurs, la diminution de l'imidaclopride **1** coïncide avec l'apparition d'autres composés, dont les plus importants correspondent aux pics apparaissant à 3,20 min (imidaclopride-guanidine, **4**) et à 5,32 min (imidaclopride-urée, **5**) (Voir la figure 3.6 pour les structures des composés identifiés dans le chromatogramme HPLC.). Ces produits de dégradation ont été identifiés par leur masse moléculaire (Tableau 3.1) ainsi qu'en raison de leur conformité avec les précédents trouvés dans la littérature appropriée (Liu, W. *et al.*, 2006; Moza *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2020; Wamhoff et Schneider, 1999). Enfin, le pic qui apparaît à 6,19 min et de masse 405,099 pourrait correspondre à la formule moléculaire $C_{18}H_{18}Cl_2N_6O$ et à la structure 14 de la figure 3.8, laquelle a été déduite du spectre de masse seulement. Cependant, étant donné que cette masse a une haute résolution, cela nous permet de croire avec une bonne marge de confiance que c'est la bonne molécule.

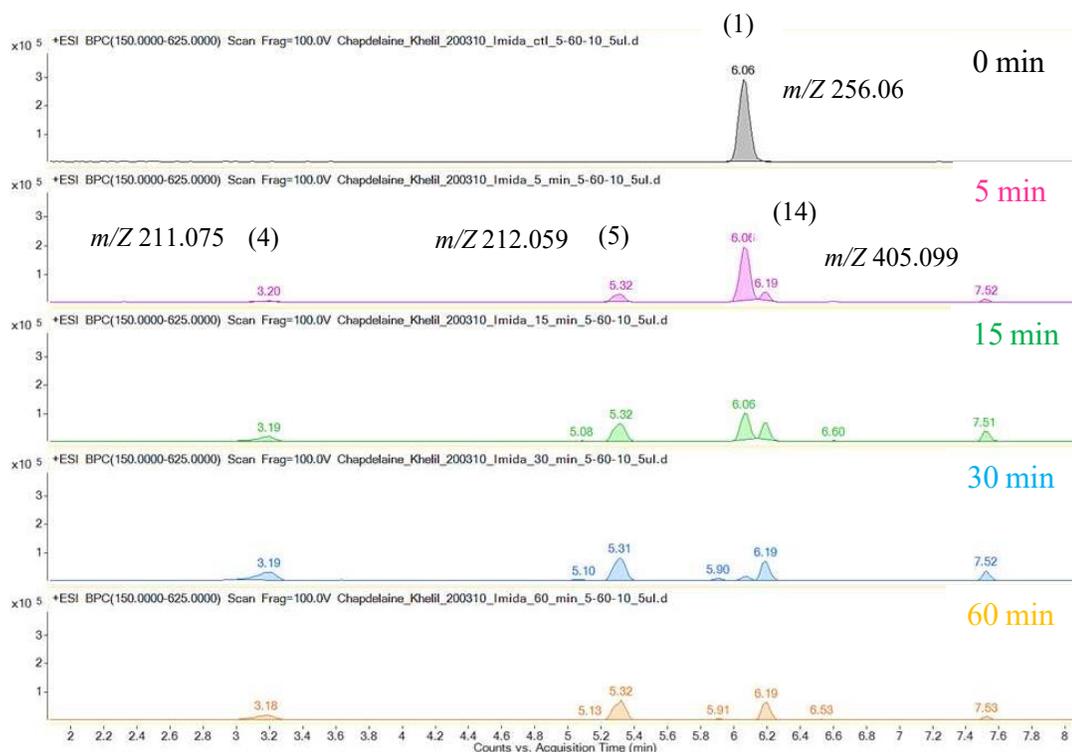


Figure 3.5 Chromatogrammes HPLC-MS de solutions d'imidaclopride **1** qui ont été irradiées pendant des durées variées.

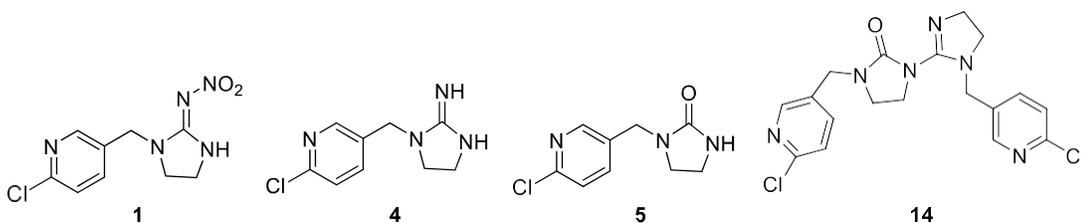


Figure 3.6 Structures de l'imidaclopride (**1**) et de ses principaux produits de photolyse, l'imidaclopride-guanidine (**4**), l'imidaclopride-urée (**5**) et un pseudo-dimère de l'imidaclopride-urée (**14**).

Le tableau 3.1 illustre les formules chimiques, les masses exactes, les temps de rétention ainsi que les aires sous la courbe de l'imidaclopride **1** et des principaux produits de photolyse obtenus suite à l'irradiation de l'imidaclopride **1**.

Tableau 3.1 Résultats de la chromatographie HPLC-MS à la suite de la photolyse de l'imidaclopride **1**.

Composé	Formule chimique	Masse exacte calculée (Da)	Masse Observée MH ⁺ (Da)	tr (min)	Erreur (ppm)	Aire des pics chromatographiques (en % du total)				
						0 min	5 min	15 min	30 min	60 min
1 (imidaclopride)	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.0523	256.0596	6.06	1.48	100	74,0	35,5	6,5	0,5
4 (l.-guanidine)	C ₉ H ₁₁ ClN ₄	210.0672	211.0745	3.19	2.37	0	0,3	14,3	26,0	20,2
5 (l.-urée)	C ₉ H ₁₀ ClN ₃ O	211.0512	212.0585	5.31	1.96	0	13,2	28,1	41,0	46,9
14 (pseudo-dimère)	C ₁₈ H ₁₈ Cl ₂ N ₆ O	404.0919	405.0992	6.19	0.72	0	12,5	22,1	26,5	32,4

Un mécanisme réactionnel de cette photolyse est proposé à la figure 3.7. Tel que proposé par Moza et al. (Moza *et al.*, 1998), l'irradiation avec la lumière ultraviolette (ici la lampe au mercure) provoque le bris homolytique de la liaison covalente la plus faible, soit celle liant le C_2 à l'azote du groupe guanidine. groupe nitro

Cela provoque

d'une part, la libération d'espèces azotées réactives telles que des ions nitrites et du monoxyde d'azote, et d'autre part, un dérivé imidaclopride-guanidine **4**. Des transferts d'électrons et de protons doivent intervenir, mais le déroulement exact de ces événements n'est pas clair. Ensuite, l'intervention nucléophile d'une molécule d'eau provoque l'hydrolyse de la fonction guanidine pour donner l'imidaclopride-urée **5**, ce produit étant pressenti comme très stable. En effet, la concentration du dérivé guanidine augmente au début de la photolyse, mais plafonne rapidement et c'est le dérivé urée qui prédomine après 30 minutes d'irradiation. (Chromatogrammes de la figure 3.5).

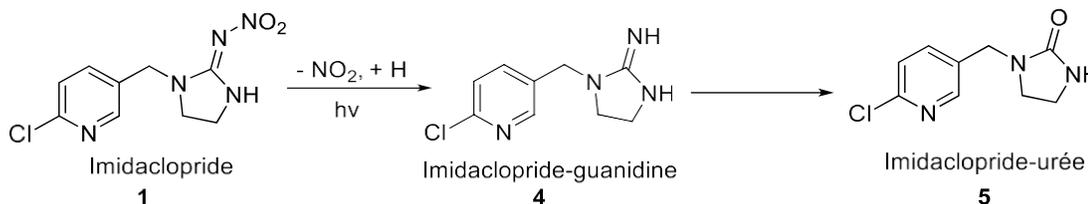


Figure 3.7 Mécanisme proposé pour la photolyse de l'imidaclopride **1**.

L'apparition du pseudo-dimère **14** peut raisonnablement résulter d'une dimérisation par la condensation de deux molécules d'imidaclopride-urée **5**, incluant une déshydratation (figure 3.8).

Le mécanisme de formation de ce pseudo-dimère **14** n'est pas certain, du fait de l'habituelle faible nucléophilie de l'azote dans les urées. Cependant, il n'est pas exclu que la formation du dimère implique des espèces réactives avant l'obtention de l'imidaclopride-urée **5**. Des recherches supplémentaires seront nécessaires pour confirmer la structure, ainsi que le mécanisme de formation de ce produit dérivé important de la photolyse de l'imidaclopride.

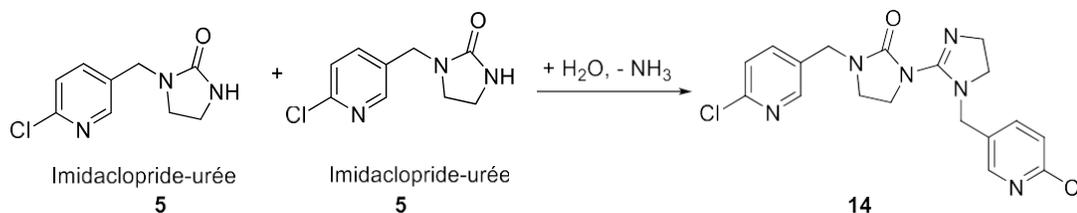


Figure 3.8 Formation du pseudo-dimère **14** à partir de l'imidaclopride-urée **5**.

En somme, au cours de l'expérimentation en laboratoire, le principal produit obtenu lors de la photolyse de l'imidaclopride **1** est l'imidaclopride-urée **5**. Celui-ci est formé par le clivage de la liaison N-NO₂ suivi d'une hydrolyse, ainsi que la formation de NO_x dont des ions nitrites NO₂⁻ et/ou de l'oxyde nitrique, tel que décrit dans un récent article de Palma et al. (Palma *et al.*, 2020). Par conséquent, il serait donc possible

d'utiliser des sondes fluorescentes, comme celles qui ont servi antérieurement dans la détection des ions nitrites, pour détecter l'imidaclopride **1** de façon indirecte.

3.2 Détection de l'imidaclopride **1** en utilisant des sondes fluorescentes basées sur la détection des nitrites ou de l'oxyde d'azote.

La méthode investiguée dans la présente recherche pour la détection indirecte de l'imidaclopride **1** est la spectrofluorimétrie basée sur des changements d'intensité de fluorescence. Pour ce faire, on utilisera des sondes fluorescentes. Lorsqu'elles réagissent avec des ions nitrites, celles-ci subissent une nitrosation ou une diazotation. Ceci modifie l'émission de fluorescence de ces sondes, soit en l'augmentant (*turn-on*), soit en la diminuant (*turn-off*). Dans notre étude, la stratégie de fluorescence *turn-on* a été privilégiée car en passant d'un signal nul à l'apparition d'un nouveau signal, il est plus évident, visuellement parlant même à l'œil nu, de détecter ce signal.

Les sondes fluorescentes qui ont été utilisées sont l'acide folique **12** (Lu *et al.*, 2015), un complexe organocuvré **7** (Rout et Mondal, 2015), une coumarine conjuguée **11** (Ma *et al.*, 2014) et le 2,3-diaminonaphthalène **13** (Misko *et al.*, 1993).

Dans le cadre de notre projet d'étude, on a dans un premier temps vérifié les conditions permettant de détecter des ions nitrites avec les sondes fluorescentes qui semblaient appropriées, excluant la coumarine conjuguée **11** car elle est utilisée pour détecter l'oxyde nitrique. Dans un deuxième temps, on a tenté d'adapter cette méthode à la détection des nitrites générés par la photolyse de l'imidaclopride **1**.

3.3 Détection de l'imidaclopride **1** par l'acide folique **12**

La première sonde sélectionnée a été l'acide folique **12**. Ce choix s'explique par le fait que cette molécule est un composé commercialement disponible et abordable.

Lorsqu'elle réagit avec des ions nitrites, celle-ci subit une diazotation, ce qui rend cette sonde sélective aux nitrites. Selon Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2015), lorsque cette sonde réagit avec des nitrites, un signal fluorescent, se manifestant par une coloration bleue sous une lampe UVA (365 nm) a été observé. Par ailleurs, avec un spectrofluorimètre, une bande d'émission à 445 nm a été observée, celle-ci augmentant graduellement avec l'augmentation de la concentration de nitrites. Toujours selon les auteurs, la limite de détection de cette sonde pouvait atteindre 18 nM d'ions nitrites dans l'eau.

Tout d'abord, il a été vérifié dans la présente étude que, mis dans des conditions acides (HCl 2 M), l'acide folique **12** ne présentait pas de fluorescence. (Figure 3.9) Noter que le HCl est simplement la source de protons nécessaire pour que la diazotation puisse avoir lieu, lorsque les nitrites sont présents. Cependant, lorsque la solution d'acide folique **12** a été ajouté aux ions nitrites puis irradié pendant 3 min dans le photoréacteur utilisant une lampe à décharge aux vapeurs de mercure Hg(Ar), une émission de fluorescence est apparue à 445 nm. Par la suite, en ajoutant de l'hydroxyde de sodium en vue d'obtenir un milieu plus alcalin, l'intensité de cette fluorescence a augmenté considérablement. Ceci concorde avec la littérature au niveau qualitatif mais on se doit de mentionner que l'acide folique **12** s'est avéré très peu soluble dans l'eau.

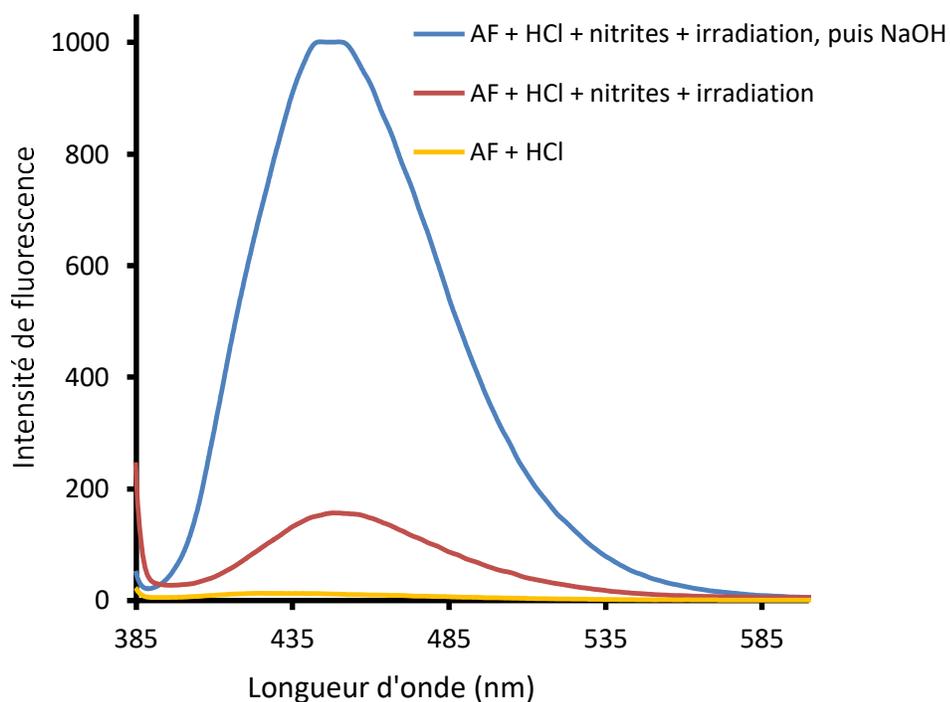


Figure 3.9 Spectre de fluorescence de la réaction de l'acide folique **12** avec le NaNO_2 (Excitation à 370 nm).

Sachant que l'acide folique **12** donne une réponse fluorescente en présence d'ions nitrites, il importait de savoir si une réponse semblable découlerait d'une exposition aux produits de photolyse de l'imidaclopride **1**. À cet effet, lorsque l'acide folique **12** a été mis en présence d'une solution d'imidaclopride **1** pré-irradié de concentration 1,00 mM, le fluorimètre a permis de constater une augmentation de l'intensité de la fluorescence par rapport au contrôle sans imidaclopride **1**. (Figure 3.10) Ici aussi, en rendant le pH plus alcalin via l'ajout d'hydroxyde de sodium, l'intensité de la fluorescence a augmenté de manière significative.

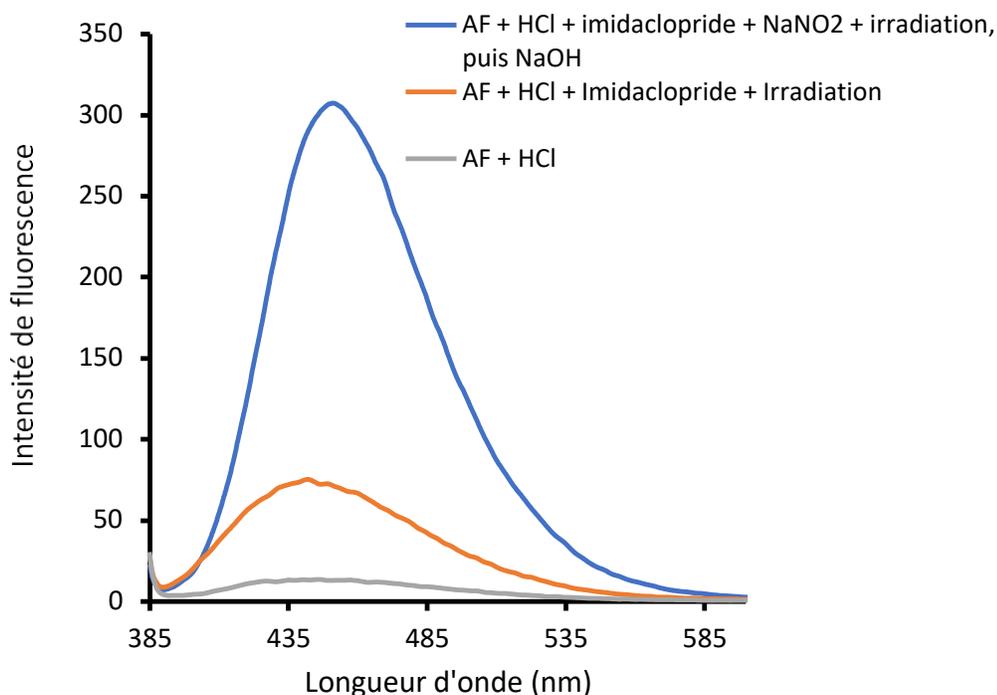


Figure 3.10 Spectre de fluorescence de la réaction de l'acide folique **12** avec l'imidaclopride **1** pré-irradié (Excitation à 370 nm).

Comme l'acide folique **12** produit de la fluorescence lorsqu'il est mis en présence d'imidaclopride **1** irradié, il importait ensuite de savoir si l'intensité du signal peut servir de façon quantitative. L'acide folique **12** a donc été mis en présence de solutions d'imidaclopride **1** pré-irradié pendant 30 min à différentes concentrations. Dans la figure 3.11, on voit que l'intensité d'émission de fluorescence à 445 nm varie de façon incohérente avec l'augmentation de la concentration de l'imidaclopride **1** dans l'intervalle allant de 0,001 mM à 1,00 mM. Il est normal que l'intensité de fluorescence ne soit pas proportionnelle à la concentration, étant donnée le large intervalle de concentrations, couvrant trois ordres de grandeur. Cependant, il est illogique que pour la concentration 0,001 mM en imidaclopride, l'intensité de fluorescence obtenue soit plus importante que les concentrations 0,01 mM à 0.1 mM.

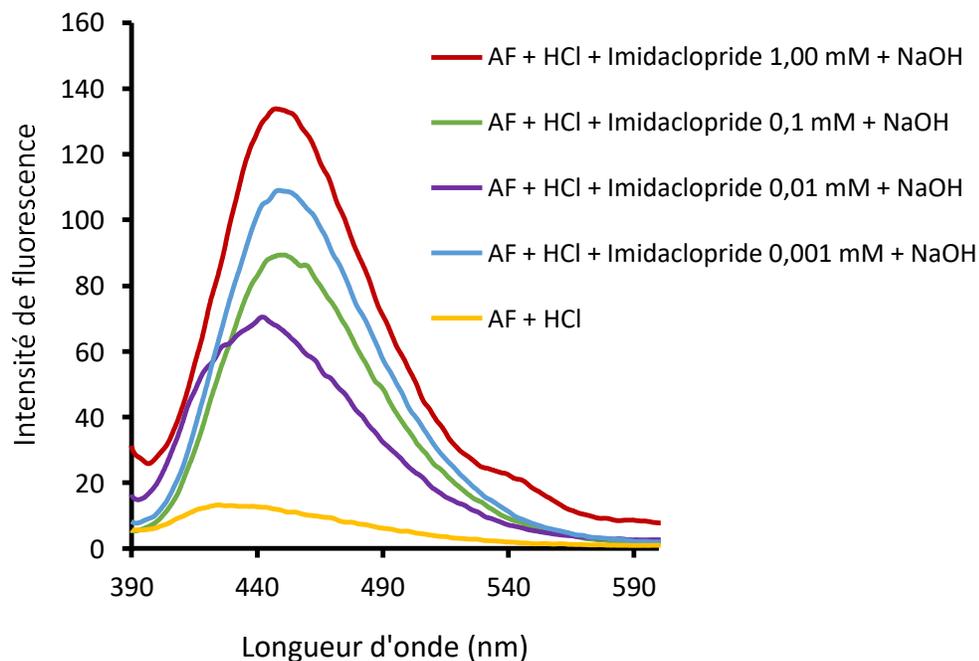


Figure 3.11 Spectres de fluorescence de la réaction de l'acide folique **12** avec l'imidaclopride **1** pré-irradiée à différentes concentrations (Excitation à 370 nm).

Comme l'augmentation du pH cause une importante augmentation de l'intensité de fluorescence, il était suspecté que les résultats erratiques des différentes solutions pourraient résulter de l'imprécision de la quantité de NaOH ajouté et donc, du pH. En conséquence, en vue de préserver un pH constant, la solution de NaOH a été remplacée par une solution tampon pH=10. L'intensité d'émission de fluorescence à 445 nm a alors augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'imidaclopride **1**, dans l'intervalle 0,001 mM à 1,00 mM (Figure 3.12). L'intensité de fluorescence était équivalente pour les mélanges impliquant les solutions 0,001 mM et 0,01 mM d'imidaclopride **1**, ce qui pourrait constituer la limite de détection du processus.

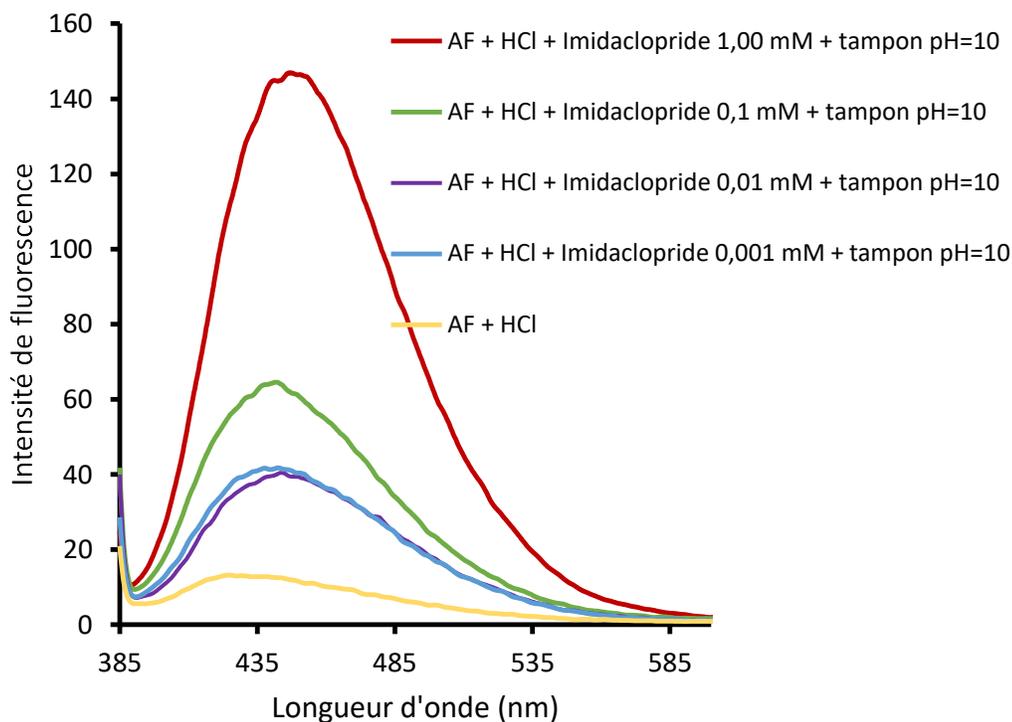


Figure 3.12 Spectres de fluorescence de la réaction de l'acide folique **12** avec l'imidaclopride **1** pré-irradié à différentes concentrations (Excitation à 370 nm).

À partir de ces résultats, il a été constaté qu'en faisant réagir l'imidaclopride **1** pré-irradié avec l'acide folique **12**, on obtient un signal fluorescent à 445nm. Par contre, même en utilisant un tampon de pH=10 au lieu de NaOH pour obtenir un pH alcalin, il s'est avéré impossible d'observer une linéarité entre l'intensité de la fluorescence et la concentration d'imidaclopride **1** entre 0,01 mM et 1,00 mM. De plus, il était même difficile d'obtenir des intensités équivalentes lors d'essais multiples. Cela rend impossible l'établissement d'une courbe d'étalonnage, qui serait requise pour obtenir une méthode quantitative.

On peut supposer que les problèmes de linéarité et surtout, de reproductibilité, découlent du fait que, l'acide folique **12** n'ayant pas une solubilité suffisante dans l'eau pour aboutir à une solution claire de 2 mM, on obtient plutôt une suspension. Les

suspensions étant des mélanges instables, cela expliquerait les résultats non reproductibles obtenus. En vue de résoudre ce problème, on a testé la solubilité de l'acide folique **12** dans différents solvant organiques : acétone, acétonitrile, acétate d'éthyle, alcool isopropylique et méthanol. Le solvant qui a le mieux solubilisé l'acide folique **12** était le méthanol. Cependant, cette solubilité n'était pas complète, même à une aussi faible concentration que 2 mM, il restait encore des résidus insolubles.

3.4 Détection de l'imidaclopride **1** par complexe organocuivré **7**

La deuxième sonde utilisée était un complexe organocuivré **7**. Celle-ci a été sélectionnée en raison de l'accessibilité du ligand de type pyrénylchalcone **6**, facile à synthétiser en deux étapes. Selon Rout *et al.* (Rout et Mondal, 2015), les ions nitrites réduisent sélectivement le centre Cu (II) en Cu (I) en présence d'eau dans une solution d'acétonitrile.

Le résultat auquel a abouti l'article en référence (Rout et Mondal, 2015) est l'obtention d'une bande d'émission de fluorescence à 555 nm résultant d'une excitation à 425 nm. Selon les auteurs, le signal d'émission augmente graduellement avec l'augmentation de la concentration des nitrites.

Des tests spectrofluorimétriques ont été effectués d'abord avec du nitrite de sodium, puis l'imidaclopride **1**. Selon la figure 3.13 lorsqu'excité avec une longueur d'onde de 425 nm, le complexe organocuivré **7** présentait une très faible intensité de fluorescence. Cependant, lorsque la sonde a été mise en présence d'ions nitrites à différentes concentrations, on a pu observer une augmentation de l'intensité de la fluorescence. Toutefois, l'intensité de fluorescence ne semble pas dépendre fortement de la concentration des nitrites.

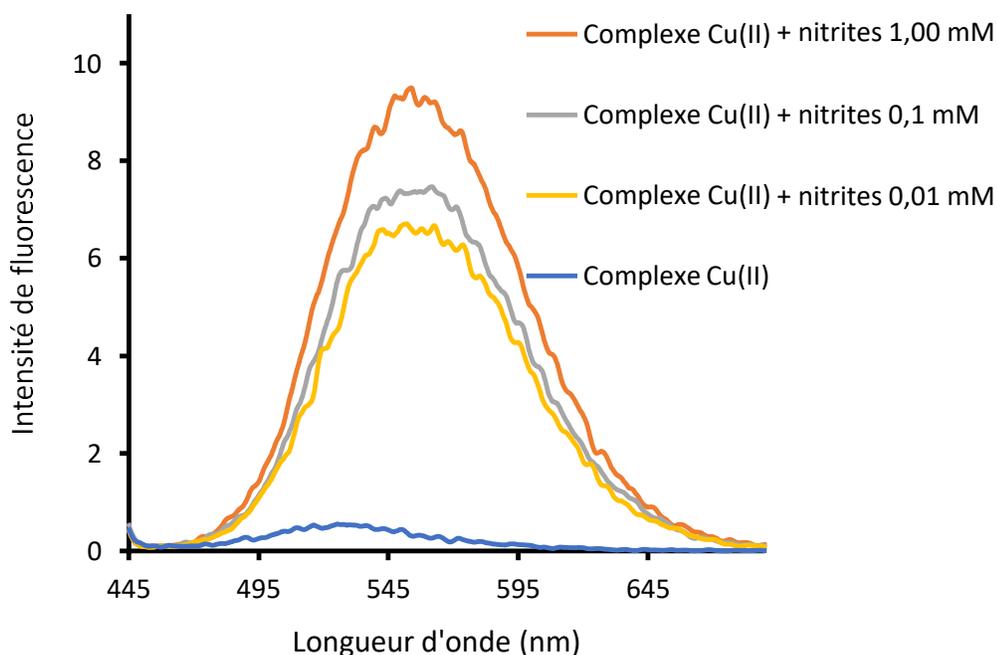


Figure 3.13 Spectres de fluorescence de la réaction du complexe organocuvré **7** avec NaNO_2 à différentes concentrations (Excitation à 425 nm).

À travers les tests effectués sur l'imidaclopride **1** pré-irradié, il a été constaté que lors de l'ajout de ce dernier à une solution de complexe organocuvré **7**, ce dernier changeait de couleur de violet à jaune. (Figure 3.14) On en a donc déduit que ce complexe organocuvré **7** pourrait servir de sonde colorimétrique, pour l'imidaclopride **1**.



Imidaclopride **1** : 0 10^{-3} M 10^{-4} M 10^{-5} M

Figure 3.14 Test colorimétriques du complexe organocuvré **7** sans et avec des solutions pré-irradiées d'imidaclopride **1** de différentes concentrations.

Le deuxième constat, conformément aux auteurs de la publication en référence, est que sous une lampe UV à 365 nm (Figure 3.15), la solution contenant de l'imidaclopride **1** pré-irradié donne un signal jaune fluorescent. Par ailleurs, la solution contenant uniquement la sonde fluorescente ne donne aucun signe de fluorescence.



a

b

Figure 3.15 Visualisation sous une lampe UV à 365nm du complexe organocuivré **7** en absence (a) et en présence (b) d'imidaclopride **1** pré-irradié.

Dans la figure 3.16, on constate que l'intensité de fluorescence augmente avec l'augmentation de la concentration en imidaclopride **1**, sans qu'on puisse prédire si c'est de façon linéaire. En fait, même si ces résultats étaient encourageants au départ, ils se sont avérés peu reproductibles en raison de l'instabilité chimique du complexe organocuivré **7**.

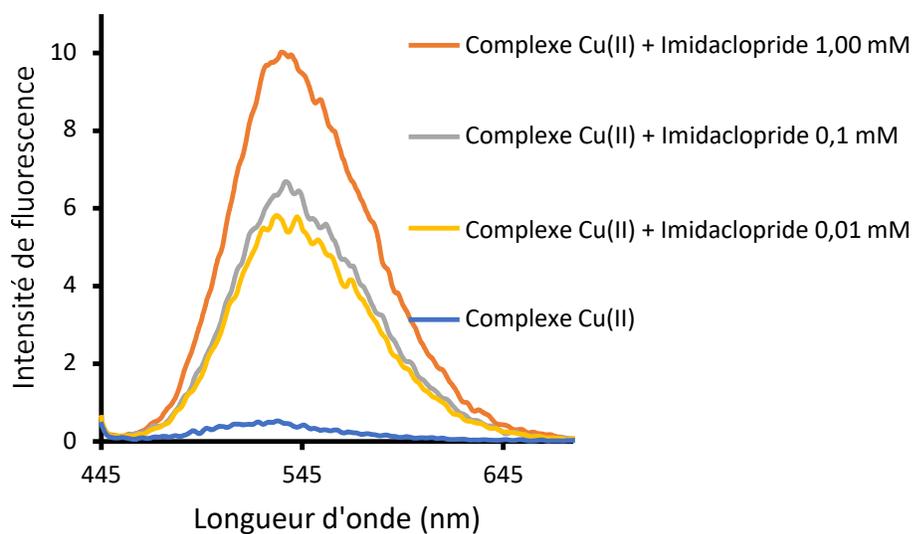


Figure 3.16 Spectres de fluorescence de la réaction du complexe organocuvré 7 l'imidaclopride 1 pré-irradié à différentes concentrations (Excitation à 425 nm).

En effet, lorsque la solution de complexe organocuvré 7 était laissée à l'air libre (Figure 3.17), elle devenait fluorescente après seulement 2 h.



Figure 3.17 Visualisation sous une lampe UV à 365 nm d'une solution du complexe organocuvré 7 laissée à l'air libre pendant 2 h.

On suppose que le complexe organocuirvé **7** subit un échange de ligand (H_2O remplacerait alors CH_3CN). Ceci sersait causé par les molécules d'eau présentes dans l'air (humidité). En effet, il a aussi été remarqué que lorsque de l'eau, même de grade HPLC, est ajoutée à cette sonde, celle-ci devient fluorescente alors qu'il n'y a pas (ou très peu) d'ions dans cette eau. Ce qui pourrait confirmer cette hypothèse d'un échange de ligand. À cause de ces interférences le complexe organocuirvé **7** ne pourrait pas être retenu pour la détection des pesticides néonicotinoïdes.

3.5 Détection de l'imidaclopride **1** par une coumarine conjuguée **11**

La troisième sonde sélectionnée est une coumarine conjuguée **11**. Cette molécule a été synthétisée en quatre étapes selon une séquence connue. En fait, elle a servi récemment à détecter le monoxyde d'azote, NO. Selon Ma *et al.* (Ma *et al.*, 2014), cette sonde affiche une sensibilité et une sélectivité très élevées aux concentrations de NO dans une large gamme de pH, avec une limite de détection de l'ordre du nM. En effet les auteurs stipulent que la sonde pure présente une intensité de fluorescence pratiquement nulle et que, suite à une réaction avec le NO, une bande d'émission intense centrée à 450 nm est apparue. En outre, une augmentation de cette bande d'émission avec l'augmentation des concentrations des NO a été observée.

À travers les travaux effectués dans notre laboratoire sur la sonde seule, ainsi que sur la sonde mélangée à de l'imidaclopride **1** (figure 3.18), il a été constaté que pour des temps d'irradiation 10 et 30 min, il n'y a quasiment pas de différence d'intensité de fluorescence entre le mélange et la sonde seule. En revanche, à partir de 120 min d'irradiation, la différence d'intensité de fluorescence entre le mélange et la sonde seule est flagrante.

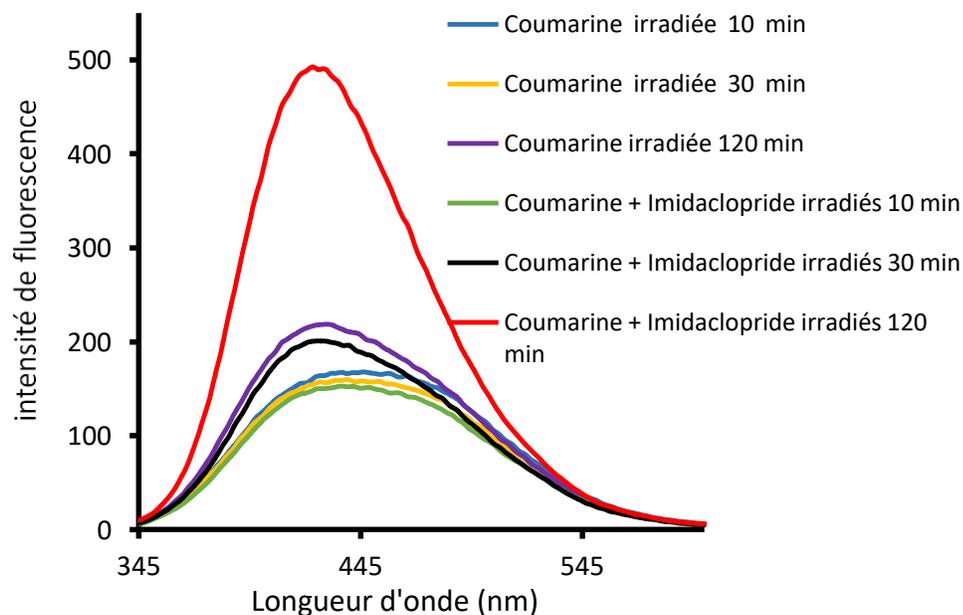


Figure 3.18 Spectres de fluorescence de la réaction de la coumarine conjuguée **11** avec l'imidaclopride **1** et des durées d'irradiation variées (Excitation à 324 nm).

Le meilleur temps d'irradiation étant à 120 min, on a étudié l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration de l'imidaclopride **1**, dans un intervalle allant de 0,001 mM à 1,00 mM. Selon la figure 3.19, lorsque de l'imidaclopride **1** non irradié, d'une concentration 1,00 mM, a été mis en réaction avec la sonde coumarine conjuguée **11**, il a été constaté une faible intensité de fluorescence. Cependant, quand la sonde fluorescente a été mise en réaction avec de l'imidaclopride **1**, maintenant irradié pendant 120 min à des concentrations 0,001 mM, 0,01 mM et 0,1 mM, la fluorescence est demeurée de faible intensité, et ce, pour les trois solutions. C'est seulement lorsque la sonde a été mise en réaction avec de l'imidaclopride **1** irradié d'une concentration 1,00 mM qu'une intensité de fluorescence beaucoup plus élevée a été observée. Même si ce dernier résultat montre un certain potentiel de la coumarine conjuguée **11**, on en a déduit que cette sonde n'est pas assez sensible pour détecter de faibles concentrations d'imidaclopride **1**.

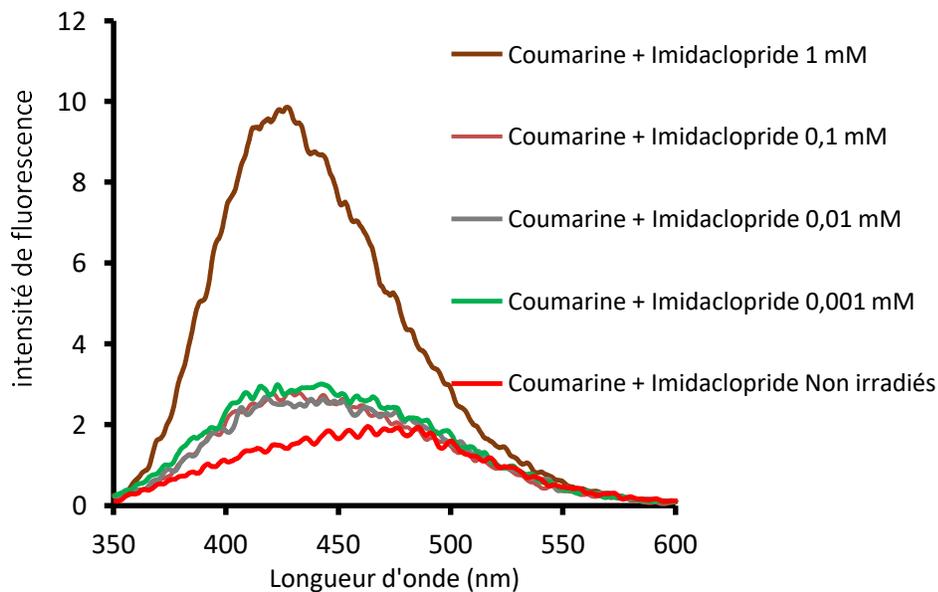


Figure 3.19 Spectres de fluorescence des produits de réaction de la coumarine conjuguée **11** avec l'imidaclopride **1** irradié pendant 120 min à différentes concentrations (Excitation à 324 nm).

En outre, quand bien même une différence d'intensité de fluorescence a pu être observée après 120 min d'irradiation pour la sonde et le mélange sonde-imidaclopride, ce résultat n'a pas pu être visualisé sous une lampe UV à 365 nm. En effet, une fluorescence est semblable, en couleur et en intensité, visuellement du moins, dans les deux cas (figure 3.20).

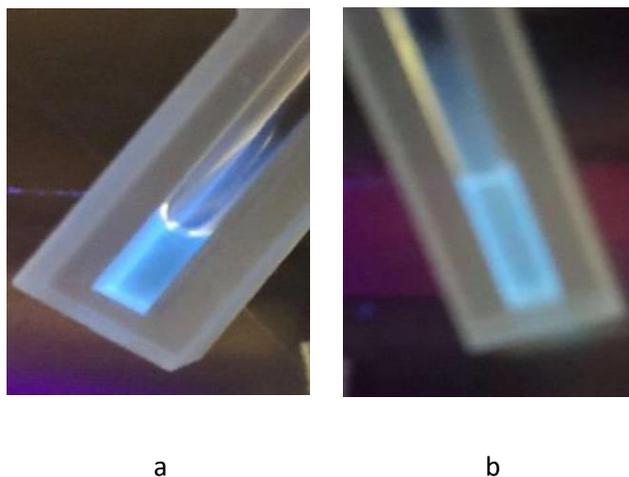


Figure 3.20 Visualisation sous lampe UV à 365 nm, de la coumarine conjuguée **11** irradiée pendant 120 min en absence (a) et en présence d'imidaclopride **1**(b).

En somme, cette sonde n'a pas été retenue dans le cadre de notre projet d'étude au motif qu'à la base, elle est déjà fluorescente suite à une irradiation, même sans analyte.

3.6 Détection de l'imidaclopride **1**, du clothianidine **2** et du thiaméthoxame **3** par le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13**

3.6.1 Analyse fluorimétrique de la détection de l'imidaclopride **1** par le DAN **13**

La quatrième sonde fluorescente testée est une molécule commercialement disponible, soit le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13**, utilisée pour la détection d'ions nitrites. Selon Misko *et al.* (Misko *et al.*, 1993), lorsque les nitrites réagissent avec cette sonde, ils la transforment en 2,3-naphthotriazole (NAT) **15**, laquelle est fluorescente. Le mécanisme implique probablement la diazotation de l'un des deux groupes amine suivie d'une fermeture de cycle (figure 3.21). Selon l'article de référence, cette sonde détecte les nitrites en donnant une bande d'émission à 410 nm (naphthotriazole **15** fluorescent), dont l'intensité augmente avec l'augmentation de la concentration des ions nitrites, avec une limite de détection de 3 pM.

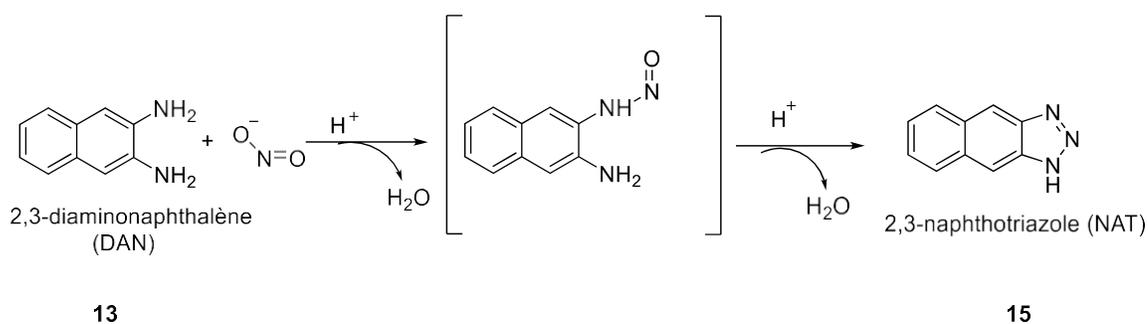


Figure 3.21 Réaction du 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13** avec les ions nitrites en milieu acide, formant le 2,3-naphthotriazole (NAT) **15** comme produit, fluorescent.

Avant de procéder à l'étude de réactivité du DAN **13** avec l'imidaclopride 1, la réactivité avec les nitrites a d'abord été étudiée afin de vérifier que cette sonde donne des résultats tels que mentionnés dans l'article de référence (Misko *et al.*, 1993).

Le DAN **13** est utilisé sous la forme d'une solution 0,30 mM dans le HCl aqueux 0,65 M. Une solution de nitrite de sodium 1,00 mM a été mélangée avec la solution de DAN **13**, le mélange a été incubé 10 minutes et ensuite, le pH a été ajusté avec du tampon pH=10. La spectrofluorimétrie a montré que lors d'une excitation à 365 nm, une bande d'émission à 408 nm apparaît clairement, tandis qu'en absence de nitrites, le même procédé ne procure pas de fluorescence. (Figure 3.22)

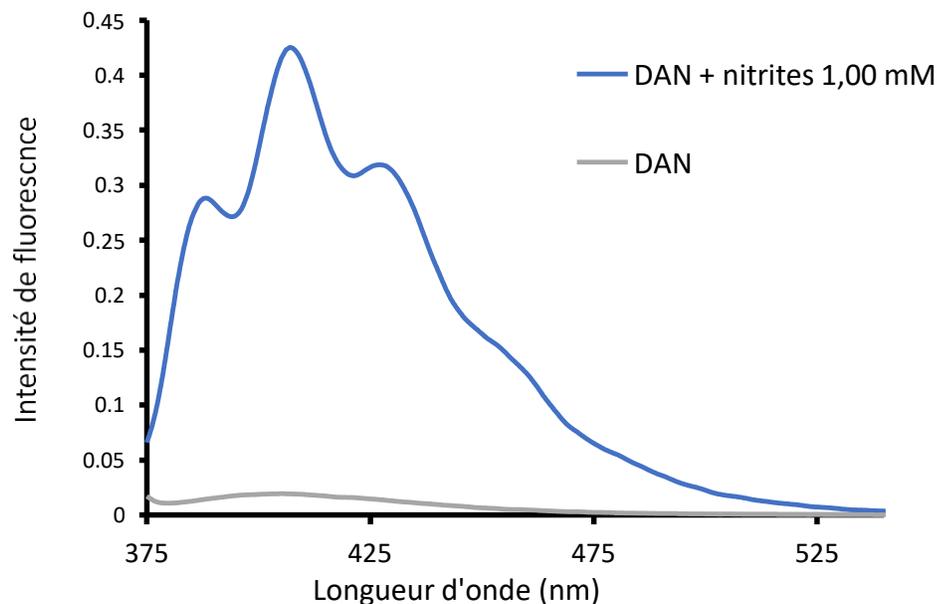


Figure 3.22 Spectres d'émission de fluorescence de la réaction du DAN **13** en absence et en présence d'ions nitrites 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

En vue d'établir le temps idéal d'irradiation, des solutions d'imidaclopride **1** (1,00 mM) ont été irradiées dans le photoréacteur pendant 5, 15, 30 et 60 min avant d'être traitées avec une solution acide de DAN **13**, d'être incubées 10 min et additionnées d'un tampon de pH=10. En visualisant ces solutions sous une lampe UV (à 365 nm), il a été constaté que le mélange d'imidaclopride **1** irradié et de DAN **13** a généré une lumière bleue, tandis que le DAN **13** lui-même n'émet pas de fluorescence sous ces conditions. (Figure 3.23)

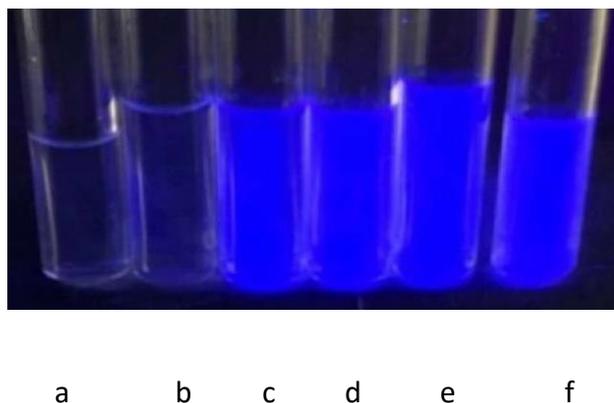


Figure 3.23 Visualisation sous lampe UV à 365 nm du DAN **13** en absence (a) et en présence d'imidaclopride **1** non irradié (b) et irradié pendant 5 min (c), 15 min (d), 30 min (e) et 60 min (f).

3.6.2 Relation entre la durée de la photolyse de l'imidaclopride **1** et l'intensité de la fluorescence suite à la réaction avec le DAN **13**

Ensuite, un spectrofluorimètre a été utilisé pour mesurer l'intensité d'émission de fluorescence lors d'une excitation à 365 nm. (Figure 3.24) La fluorimétrie a montré que l'intensité de fluorescence d'une solution de DAN **13** est quasi nulle, alors qu'une bande d'émission à 408 nm apparaît lorsqu'elle est mise en contact avec de l'imidaclopride **1** irradié. Ceci suggère que la photolyse de l'imidaclopride **1** génère des espèces qui convertissent le DAN **13**, non fluorescent, en NAT **15**, fluorescent. L'expérience a permis également de déterminer que le maximum d'intensité de fluorescence est obtenu avec une solution d'imidaclopride **1** irradiée pendant 15 min. L'irradiation prolongée à 30 et 60 min n'ayant pas mené à une augmentation de la fluorescence, les expérimentations subséquentes ont été conduites avec des solutions d'imidaclopride **1** irradiées pendant 15 min.

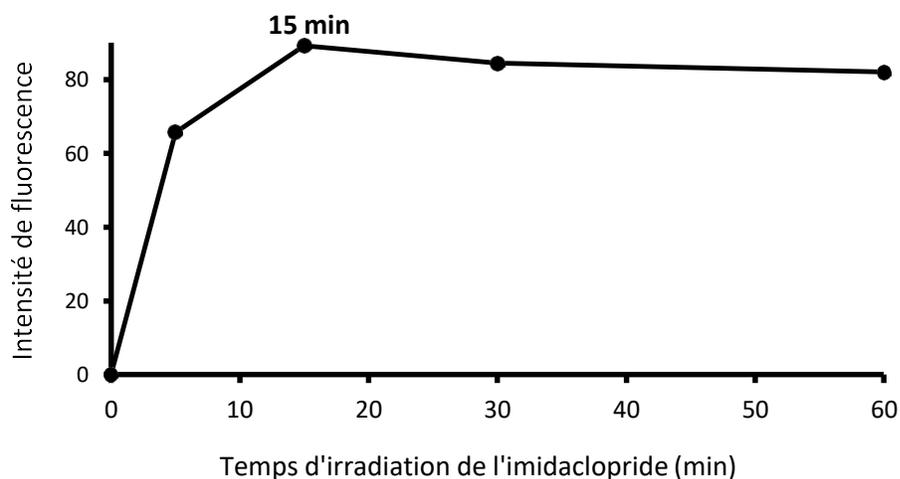


Figure 3.24 Intensité de fluorescence d'une solution de DAN **13** mélangée avec de l'imidaclopride **1** irradié pendant des durées variées (Excitation à 365 nm, émission mesurée à 408 nm).

3.6.3 Relation entre la concentration de l'imidaclopride **1** irradié et l'intensité du spectre de la fluorescence suite à la réaction avec le DAN **13**

Étant donné que la réaction de DAN **13** avec les produits de photolyse de l'imidaclopride **1** fait bien apparaître un signal fluorescent, la relation entre la concentration de l'imidaclopride **1** et l'intensité de fluorescence a ensuite été étudiée. Des solutions d'imidaclopride **1**, de concentrations allant de 0,0010 mM à 1,00 mM, ont été irradiées pendant 15 min. Elles ont ensuite été traitées avec une solution de DAN **13**, incubées 10 min puis additionnées d'un tampon de pH=10. Le spectre d'émission de fluorescence a été mesuré sous une excitation de 365 nm. (Figure 3.25) L'intensité de la fluorescence du DAN **13** est relativement nulle, mais augmente considérablement en présence d'imidaclopride **1** irradié, surtout à partir de 0,1 mM. En outre, il a été constaté que l'intensité de fluorescence à 408 nm (émission maximale) augmentait parallèlement à l'augmentation de la concentration de l'imidaclopride **1**.

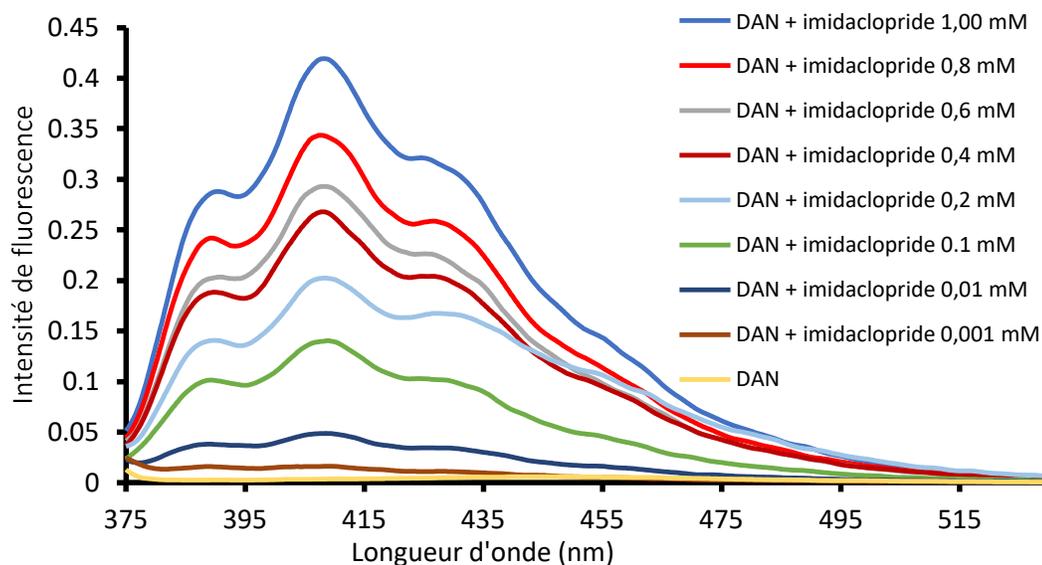


Figure 3.25 Spectres d'émission de fluorescence de la réaction du DAN **13** avec des solutions d'imidaclopride **1** de concentrations variées, irradiées pendant 15 min (Excitation à 365 nm).

3.6.4 Relation entre la concentration de l'imidaclopride **1** irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN **13**

Par la suite, la relation entre l'intensité de fluorescence des produits de réaction du DAN **13** et la concentration d'imidaclopride **1** a été étudiée en mesurant l'intensité d'émission à la longueur d'onde optimum, soit 408 nm. Comme le montre la figure 3.26, l'intensité d'émission de fluorescence à 408 nm augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de l'imidaclopride **1** allant de 0,001 mM à 1,00 mM. La relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration est peu linéaire ($R = 0,9195$) sur cet intervalle, qui comprend tout de même trois ordres de grandeur.

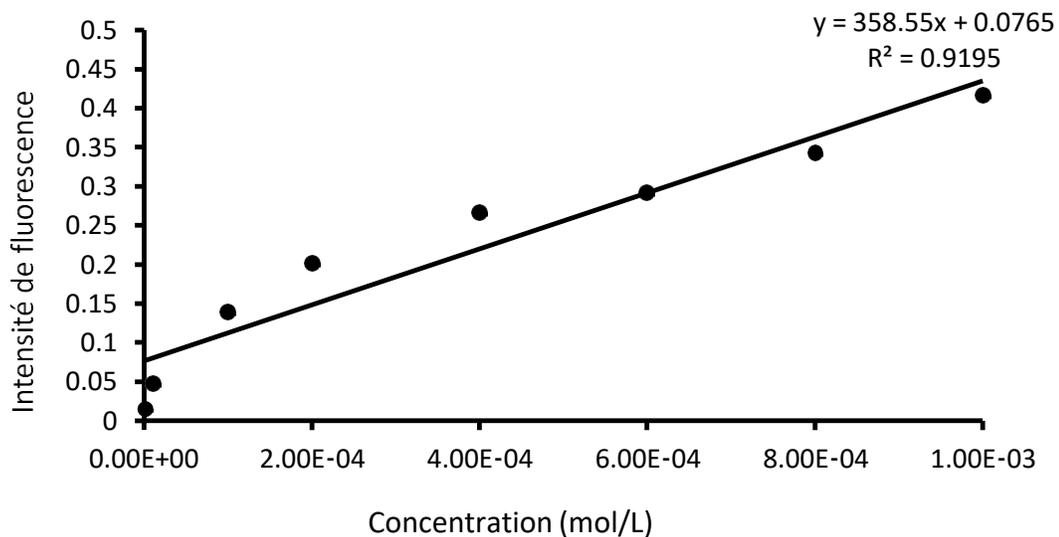


Figure 3.26 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec des solutions d'imidaclopride **1** irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

Cela dit, l'intervalle allant de 0,100 mM à 1,00 mM représente un domaine de linéarité acceptable, avec un coefficient de corrélation $R = 0,9714$, pouvant donc convenir après optimisation, pour une analyse quantitative de l'imidaclopride **1**. (Figure 3.27)

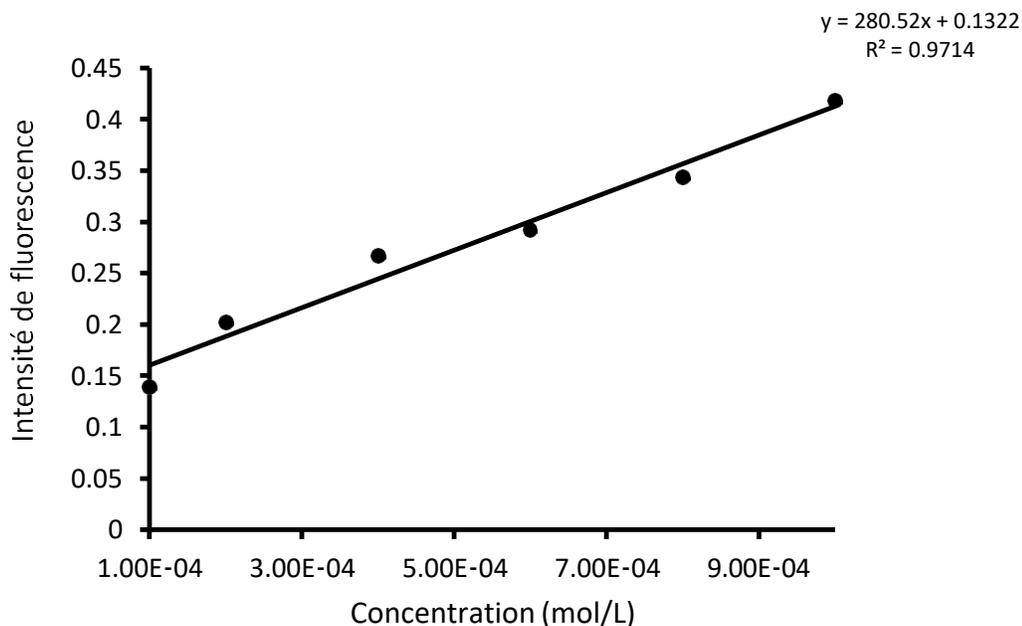


Figure 3.27 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec des solutions d'imidaclopride **1** irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

3.6.5 Analyse fluorimétrique de la détection du clothianidine **2** et du thiaméthoxame **3** par le DAN **13**

Comme le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3** appartiennent à la même classe chimique que l'imidaclopride **1**, soit des *N*-nitroguanidines, on a vérifié si elles réagissaient de la même façon avec le DAN **13**, de sorte que cette sonde soit en mesure de détecter et de quantifier ces deux autres pesticides néonicotinoïdes. À cette fin, des solutions de clothianidine **2** et de thiaméthoxame **3**, de concentrations allant de 0,0010 mM à 1,00 mM ont été irradiées pendant 15 min. Elles ont ensuite été traitées avec une solution de DAN **13**, incubées pendant 10 min puis additionnées d'un tampon de pH=10. La relation entre l'intensité de fluorescence des produits de réaction du DAN **13** et la concentration de ces deux néonics a été étudiée en mesurant l'intensité d'émission à 408 nm.

3.6.6 Relation entre la concentration du clothianidine **2** irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN **13**

Comme le montre la figure 3.28, l'intensité d'émission de fluorescence à 408 nm augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration du clothianidine **2**, allant de 0.0010 mM à 1,00 mM. Tout comme avec l'imidaclopride **1**, la relation entre l'intensité et la concentration n'est pas vraiment linéaire sur cette étendue de trois ordres de grandeur.

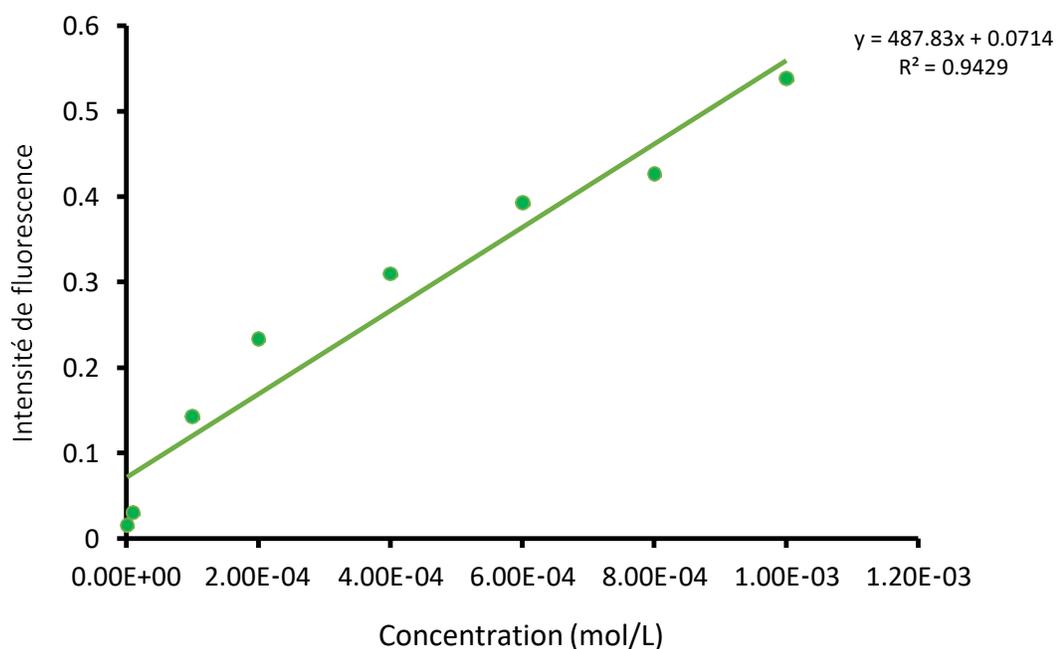


Figure 3.28 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec le clothianidine **2** irradiés pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

Néanmoins, de même que pour l'imidaclopride **1**, on observe un domaine de linéarité plutôt acceptable ($R = 0,9731$) dans l'intervalle allant de 0,100 mM à 1,00 mM pour le clothianidine **2**.

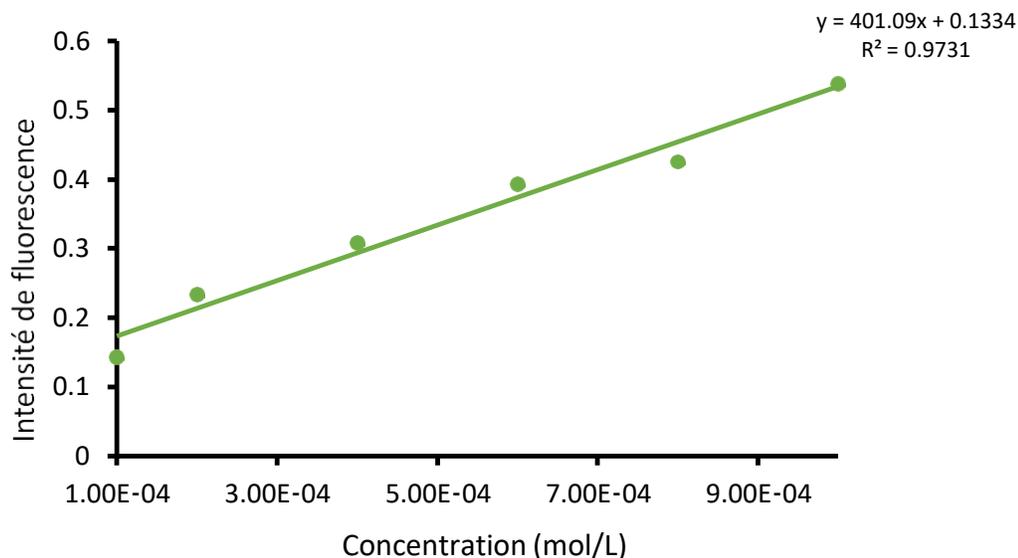


Figure 3.29 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec des solutions de clothianidine **2** irradiées pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

3.6.7 Relation entre la concentration du thiaméthoxame **3** irradié et l'intensité de la fluorescence à 408 nm suite à la réaction avec le DAN **13**

L'intensité d'émission de fluorescence à 408 nm augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration de thiaméthoxame **3**, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM. (Figure 3.30) Tout comme avec les deux précédents néonics, la relation entre l'intensité et la concentration n'est pas vraiment linéaire sur cette étendue de trois ordres de grandeur.

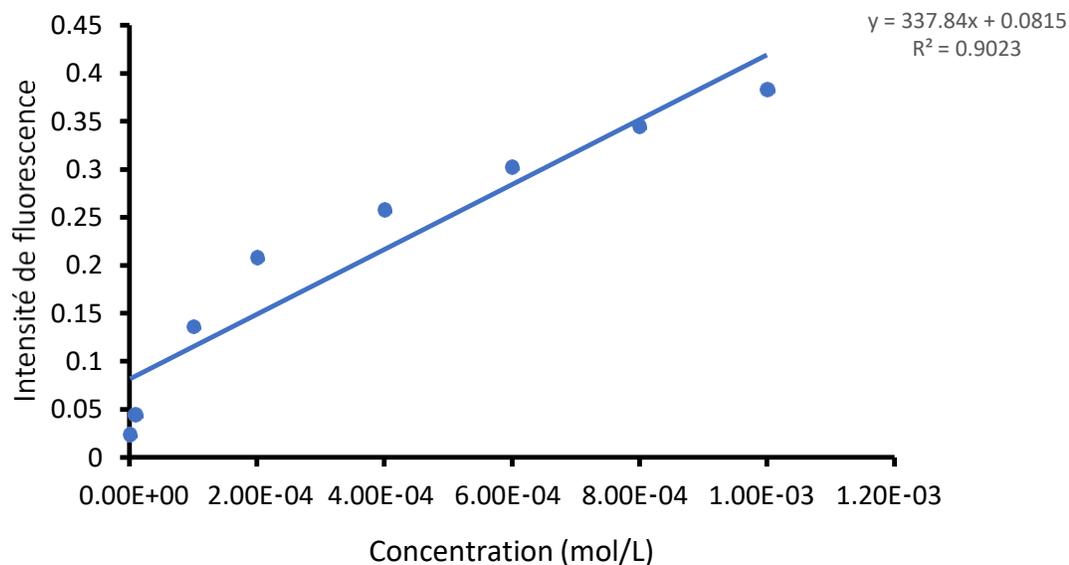


Figure 3.30 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec le thiaméthoxame **3** irradiés pendant 15 min à différentes concentrations, allant de 0,0010 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

Néanmoins, de même que pour l'imidaclopride **1** et le clothianidine **2**, on observe un domaine de linéarité plutôt acceptable ($R = 0,9599$) dans l'intervalle allant de 0,100 mM à 1,00 mM pour le thiaméthoxame **3**. (Figure 3.31)

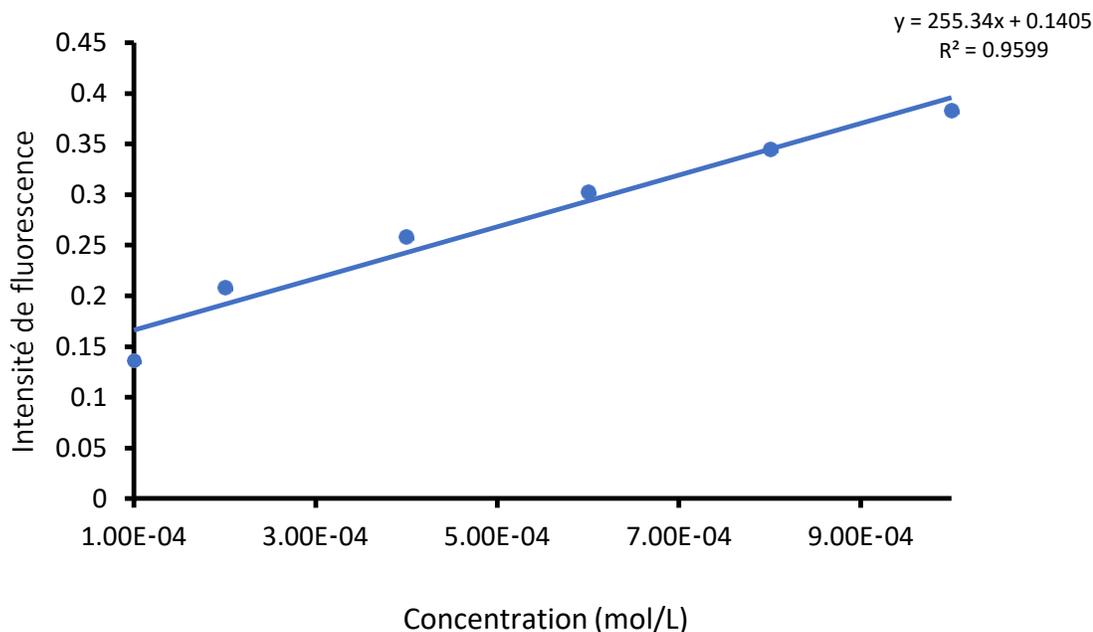


Figure 3.31 Intensité de fluorescence à 408 nm de la réaction du DAN **13** avec des solutions du thiaméthoxame **3** irradiées pendant 15 min à différentes concentrations allant de 0,100 mM à 1,00 mM (Excitation à 365 nm).

3.6.8 Analyse HPLC-MS de la réaction du DAN **13** avec l'imidaclopride **1**.

Le DAN **13** étant la sonde fluorescente qui a donné les meilleurs résultats, des analyses HPLC-MS ont été effectuées afin d'étudier le ou les produits de réaction de l'imidaclopride **1** pré-irradié avec le DAN **13**.

L'analyse HPLC a été effectuée avec une colonne Agilent Eclipse Plus C18 (diamètre interne de 3 mm, longueur de 50 mm, granulométrie de 1,8 μm). La phase mobile était constituée à partir des solutions A (eau additionnée de 0,1% d'acide formique aqueux) et B (acétonitrile additionné de 0,1% d'acide formique aqueux). Le gradient variait comme suit : 5% B, pendant 1 minute, allant progressivement sur une durée de 10 minutes jusqu'à 60% B, puis augmenté à 90% et maintenu ainsi pendant 1 minute. Le débit de phase mobile était de 0,4 mL/min et le volume d'injection était de 5 μL . Les

conditions relatives au spectromètre de masse étaient : gamme m/Z 115-1000, l'ionisation en mode positif à 350°C et 4000 V, suivie d'une fragmentation à 100 V.

D'abord, une analyse HPLC-MS de la réactivité du DAN **13** avec des ions nitrites a été réalisée afin de repérer le produit issu de la réaction de DAN **13** avec les ions nitrites, soit le 2,3-naphthotriazole **15**, tel que rapporté par Misko et coll.

En premier lieu, l'injection d'une solution de DAN **13** pur a permis, comme on le voit à la figure 3.32, de constater que le pic à 5,06 min correspond au DAN **13**. Ensuite, on a procédé à l'injection d'un mélange réactionnel constitué de la solution acide de DAN **13**, avec une solution de nitrite de sodium. (Figure 3.33) On peut conclure que le DAN **13** a complètement réagi avec les ions nitrites, car n'y a pas de pic chromatographique aux environs de 5 min. De plus, le pic qui apparaît à 7,89 min correspond au 2,3-naphthotriazole (NAT) **15**, qui est le produit attendu de cette réaction.

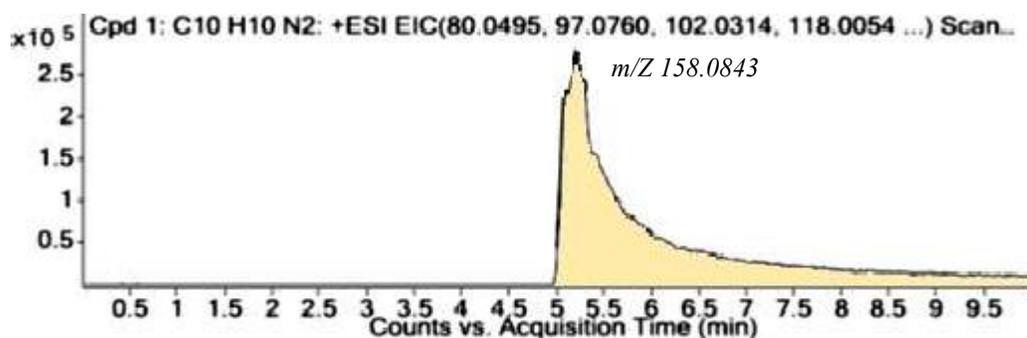


Figure 3.32 Chromatogramme HPLC-MS EIC de la solution de DAN **13**.

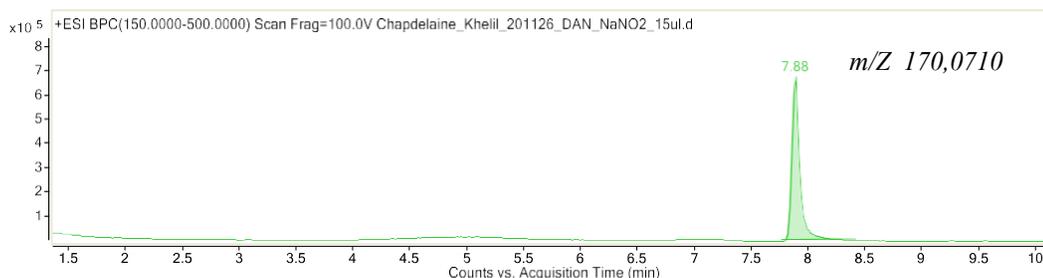


Figure 3.33 Chromatogramme HPLC-MS du mélange réactionnel constitué de la solution de DAN **13** avec le NaNO_2 .

Par la suite, l'injection du milieu réactionnel constitué d'une solution d'imidaclopride **1** pré-irradié avec la solution acide de DAN **13** a permis de confirmer le mécanisme réactionnel pressenti. Tout d'abord, on a obtenu un chromatogramme (figure 3.34) similaire à celui obtenu lors de la photolyse de l'imidaclopride **1** sans le DAN **13** (Figure 3.5), dans la mesure où l'on voit les pics qui correspondent à l'imidaclopride **1** non réagi ($t_r = 6,07$ min) et à ses principaux produits de photolyse à 3,19 min (imidaclopride-guanidine **4**) et à 5,33 min (imidaclopride-urée **5**). Par ailleurs, on voit aussi de façon intéressante, un pic supplémentaire à 7,87 min, qui correspond au 2,3-naphthotriazole **15** tel qu'on l'a identifié dans le chromatogramme de la figure 3.33. Tous ces composés ont été identifiés par leur masse moléculaire. Ceci confirme que les espèces azotées réactives de type ions nitrites, résultant de la photolyse de l'imidaclopride **1**, réagissent avec la sonde non fluorescente DAN **13**, pour produire le NAT **15**, qui est responsable de l'apparition de la fluorescence. On en conclut que la sonde DAN **13** convient au dépistage des néonicotinoïdes de classe chimique *N*-nitroguanidine.

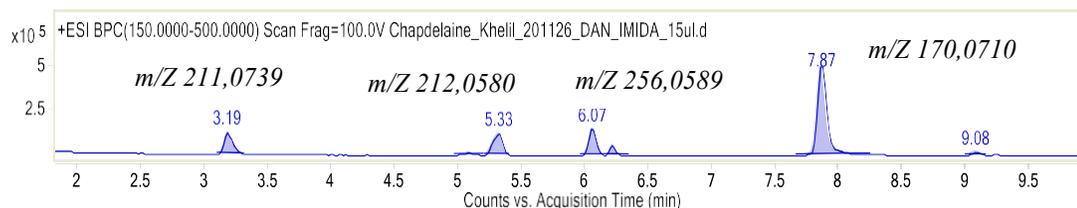


Figure 3.34 Chromatogramme HPLC-MS du mélange réactionnel constitué de la solution de DAN **13** et de l'imidaclopride **1** pré-irradié.

3.7 Conclusion partielle

En somme, les résultats obtenus ont montré que l'imidaclopride **1**, lorsqu'il subit une photolyse avec une lampe à décharge au mercure, produit rapidement des dérivés dépourvus de la fonctionnalité *N*-nitroguanidine, tels que rapporté dans la littérature. Ces produits ont été identifiés et leur ordre d'apparition a été observé par HPLC-MS. Il s'agit principalement de l'imidaclopride-guanidine **4**, de l'imidaclopride-urée **5** et d'un pseudo-dimère de cette dernière. Il était à prévoir, et cela a d'ailleurs été démontré récemment par un autre groupe, que la photolyse de l'imidaclopride **1** s'accompagnait de dégagement d'oxydes d'azote, sous la forme d'ions nitrites entre autres. Dans le but de détecter ces ions nitrites par l'apparition d'un signal de fluorescence, quatre molécules ont été investiguées à titre de sondes fluorescentes, soit l'acide folique **12**, un complexe organocuivre **7**, une coumarine conjuguée **11** avec un ester de Hantzsch et enfin, le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13**. Même si l'apparition ou du moins, l'augmentation de fluorescence, ont été observées avec les quatre sondes, le DAN **13** est le composé qui a permis de relier de façon évidente l'intensité du signal de fluorescence avec la concentration de l'analyte imidaclopride **1**. La démonstration d'une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence à 408 nm et la concentration d'imidaclopride **1** qui a été irradié, du moins dans l'intervalle de 0,100 à 1,00 mM, laisse entrevoir le potentiel de cette méthode dans la détermination de l'imidaclopride **1**. Des résultats tout à fait semblables ont été obtenus lorsque le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3**, deux néonics possédant la même fonction *N*-nitroguanidine, ont été

mis en présence de DAN **13**, à savoir que l'intensité de la fluorescence observée à 408 nm est liée à la concentration de néonic soumis à la photolyse. Un domaine de linéarité acceptable est aussi observé entre 0,100 mM et 1,00 mM pour ces deux analytes.

Par ailleurs des analyses HPLC-MS ont démontré, lors d'une réaction du DAN **13** avec l'imidaclopride **1** pré-irradié, l'obtention du 2,3-naphthotriazole **15**, lequel est le produit fluorescent attendu et nécessaire dans le présent processus de *turn-on* de fluorescence.

CONCLUSION

L'imidaclopride **1**, le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3** sont les trois pesticides néonicotinoïdes les plus utilisés actuellement dans le monde. Leur succès réside dans leur nature systémique, dans leur toxicité sélective pour les invertébrés et dans leur efficacité contre les insectes nuisibles. Cependant ces pesticides sont suspectés d'être une des causes du déclin des populations de pollinisateurs, notamment les abeilles.

Pour détecter et quantifier ces pesticides, la principale méthode utilisée dans les laboratoires modernes est l'analyse par HPLC-MS/MS. Cependant, cette méthode présente deux inconvénients majeurs, à savoir sa complexité et son coût élevé. Dans ce présent projet, l'objectif fixé était d'aboutir à une méthode permettant de détecter et de quantifier ces trois pesticides de façon sensible, simplifiée et peu coûteuse.

L'imidaclopride **1**, le clothianidine **2** le thiaméthoxame **3** appartiennent à la même classe chimique, ayant en commun une fonction *N*-nitroguanidine. Cette fonction est photodégradable et génère des espèces azotées réactives. Les expérimentations décrites dans notre travail de recherche visaient à vérifier l'hypothèse de départ, soit : **une méthode d'analyse peut utiliser la détection des espèces azotées réactives (exemple : des ions nitrites) pour le dépistage indirect des néonicotinoïdes suite à leur photolyse**. Le développement de la présente méthode s'appuyait plus précisément sur l'apparition d'un signal fluorescent émis par des sondes fluorescentes sélectives pour les ions nitrites ou d'autres espèces azotées réactives et, de façon indirecte, pour détecter ces pesticides.

Pour cela, nous avons expérimenté quatre sondes fluorescentes à savoir, l'acide folique **12**, un complexe organocuivre,⁷ une coumarine modifiée **11** et le 2,3-diaminonaphthalène (DAN) **13**.

D'abord, les résultats obtenus ont montré que l'imidaclopride **1** lorsqu'il subit une photolyse avec une lampe au mercure, produit rapidement des dérivés dépourvus de la fonctionnalité *N*-nitroguanidine, tels que rapporté dans la littérature. Cette dégradation résulte donc en la formation de dérivés organiques, dont les identités ont été confirmées par HPLC-MS, ainsi qu'en dégagement d'ions nitrites et autres oxydes d'azote, tel que rapporté dans la littérature récente. Dans le but de détecter ces ions nitrites par l'apparition d'un signal de fluorescence, les quatre molécules déjà mentionnées ont été investiguées à titre de sondes fluorescentes. Des quatre sondes, le DAN **13** est le composé qui a permis l'apparition d'un signal de fluorescence (excitation à 365 nm, émission à 408 nm) dont l'intensité est assez bien reliée avec la concentration d'analyte, de façon aussi efficace pour l'imidaclopride **1**, que pour le clothianidine **2** et le thiaméthoxame **3**. Des analyses HPLC-MS nous ont permis de montrer que l'obtention du signal fluorescent est dû à la formation du naphthotriazole **15**, de façon analogue à ce qui avait été rapporté dans le cadre de la détection des ions nitrites via une réaction avec le DAN **13**, ce qui permet de bien asseoir le mécanisme réactionnel de notre méthode.

A l'avenir il serait nécessaire de parvenir à des limites de détection plus basse que celles obtenues dans ce mémoire et ce pour pouvoir procéder à des détections sur le terrain. Dans un deuxième temps il serait possible d'effectuer des tests sur des échantillons de miel et de pollen.

En dernier lieu on pourrait concevoir un prototype de sonde pouvant être utilisé par les apiculteurs.

ANNEXE A

ESSAIS TRIPLICATA DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE À 408 NM D'UNE SOLUTION DE DAN **13** MÉLANGÉ AVEC DE L'IMIDACLOPRIDE **1**, DU CLOTHIANIDINE **2** ET DU THIAMÉTHOXAME **3**.

Afin de confirmer la reproductibilité de la détection de ces trois molécules par le DAN **13** des essais triplicata ont été effectués.

La moyenne de ces résultats a été calculé dans le but de réaliser des courbes de linéarité de l'intensité de la fluorescence à 408nm (qui est la longueur d'onde maximale) en fonction de la concentration.

Essai	Concentration Imidaclopride 1 (mol/L)							
	1,00E-03	8,00E-04	6,00E-04	4,00E-04	2,00E-04	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06
1	0,4366	0,3626	0,2659	0,2563	0,1852	0,1462	0,0529	0,0123
2	0,403	0,337	0,2993	0,2758	0,2154	0,1253	0,0423	0,0179
3	0,4153	0,3308	0,3126	0,2697	0,205	0,1469	0,0499	0,0175
Moyenne	0,4183	0,3434	0,2926	0,2673	0,2019	0,1395	0,0483	0,0159
Écart type	0,01699	0,01685	0,02406	0,00997	0,01534	0,01226	0,00543	0,00311

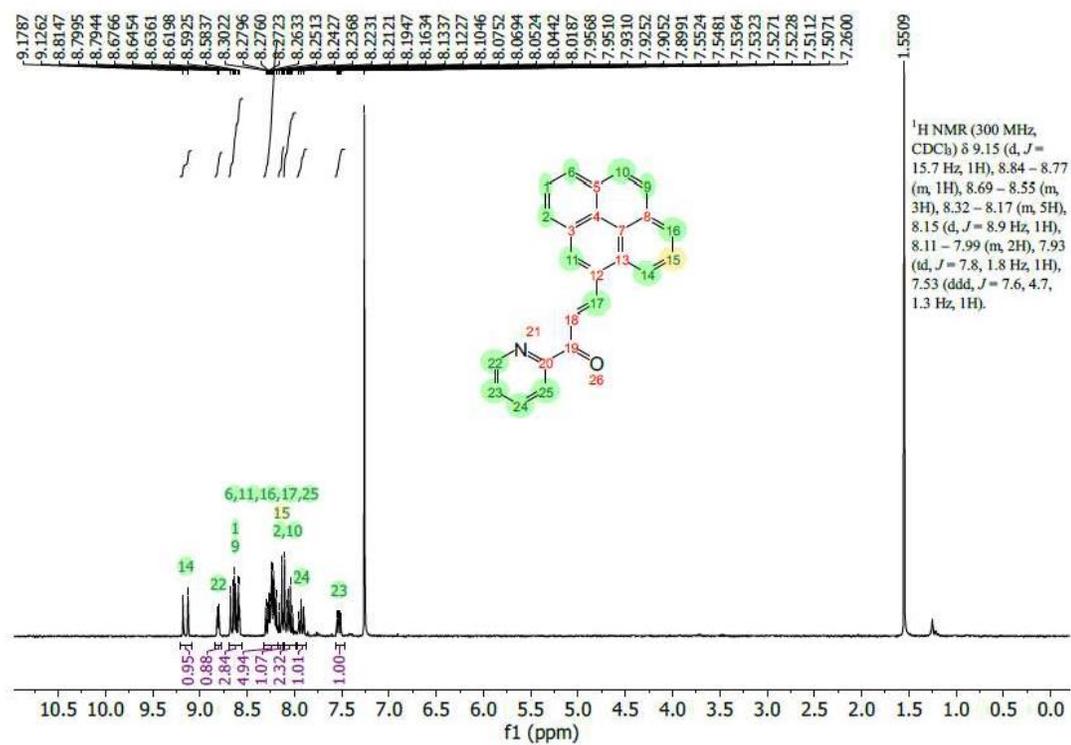
	Concentration Clothianidine 2 (mol/L)					
Essai	1,00E-03	8,00E-04	6,00E-04	4,00E-04	2,00E-04	1,00E-04
1	0,5237	0,2762	0,3823	0,3131	0,2320	0,2256
2	0,5513	0,4171	0,3823	0,3026	0,2425	0,2096
3	0,5399	0,4357	0,4140	0,3123	0,2264	0,2089
Moyenne	0,5383	0,4264	0,3929	0,3093	0,2337	0,2147
Écart type	0,01386	0,08722	0,01830	0,00586	0,00814	0,00945

	Concentration Thiaméthoxame 3 (mol/L)					
Essai	1,00E-03	8,00E-04	6,00E-04	4,00E-04	2,00E-04	1,00E-04
1	0,4071	0,3569	0,3126	0,2466	0,1965	0,1314
2	0,3529	0,3257	0,3232	0,2705	0,2099	0,1480
3	0,3899	0,3523	0,2729	0,0789	0,2185	0,1295
Moyenne	0,3833	0,3449	0,3029	0,2585	0,2083	0,1363
Écart type	0,02767	0,01684	0,02653	0,10436	0,01106	0,010174

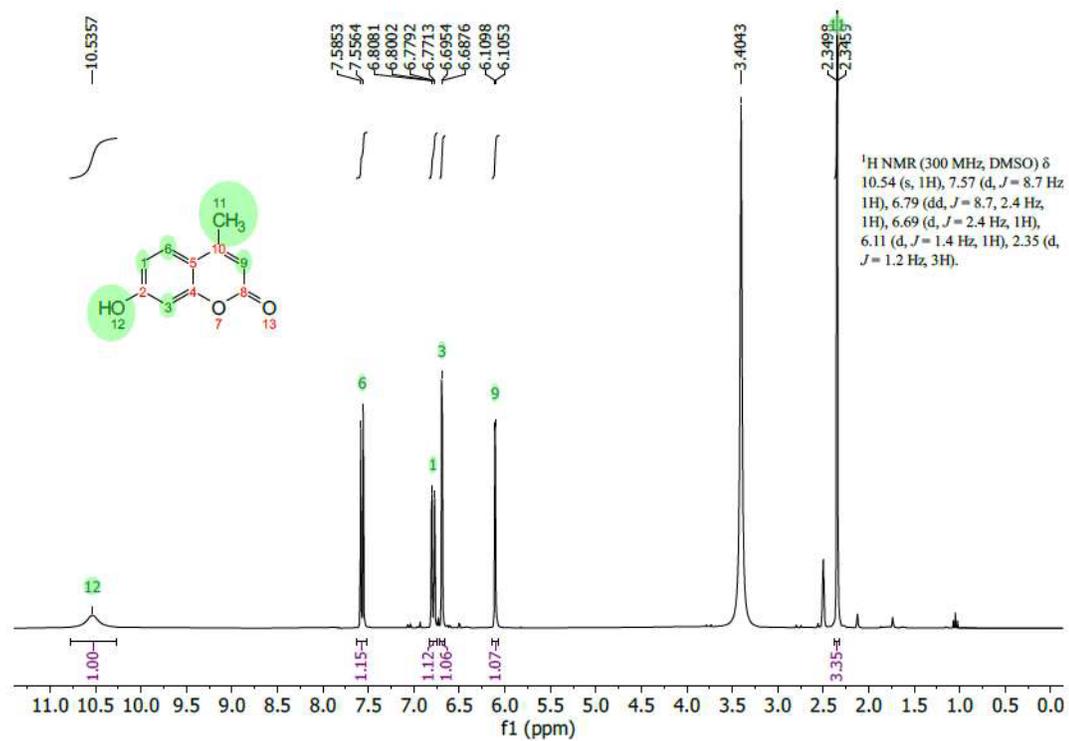
APPENDICE A

SPECTRE RMN ^1H DE 3-(PYRÉN-8-YL)-1-(PYRIDIN-2-YL)PROP-2-ÉN-1-ONE

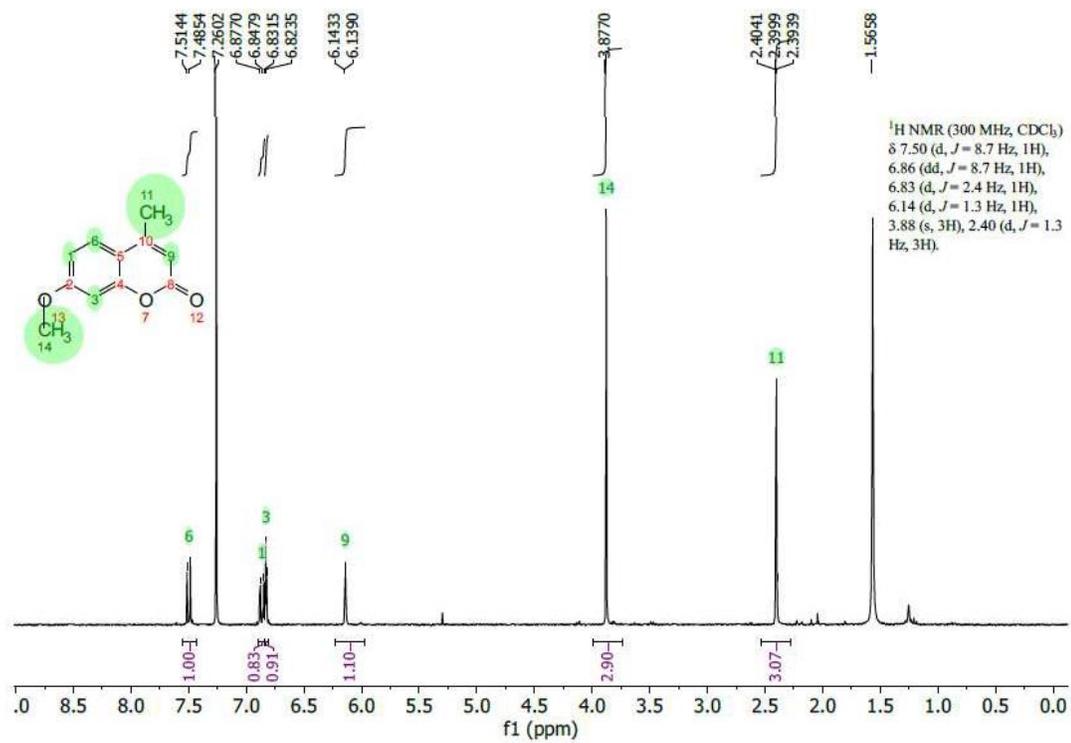
(6)



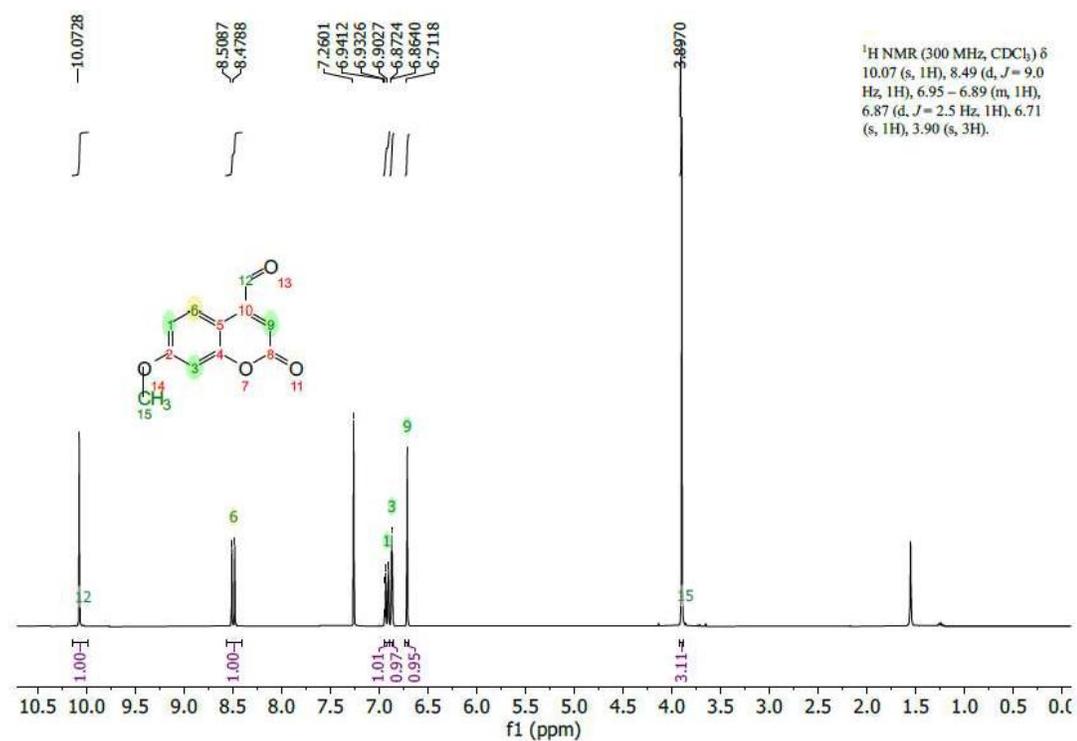
APPENDICE B

SPECTRE RMN ^1H DE 7-HYDROXY-4-MÉTHYLCOUMARINE (8)

APPENDICE C

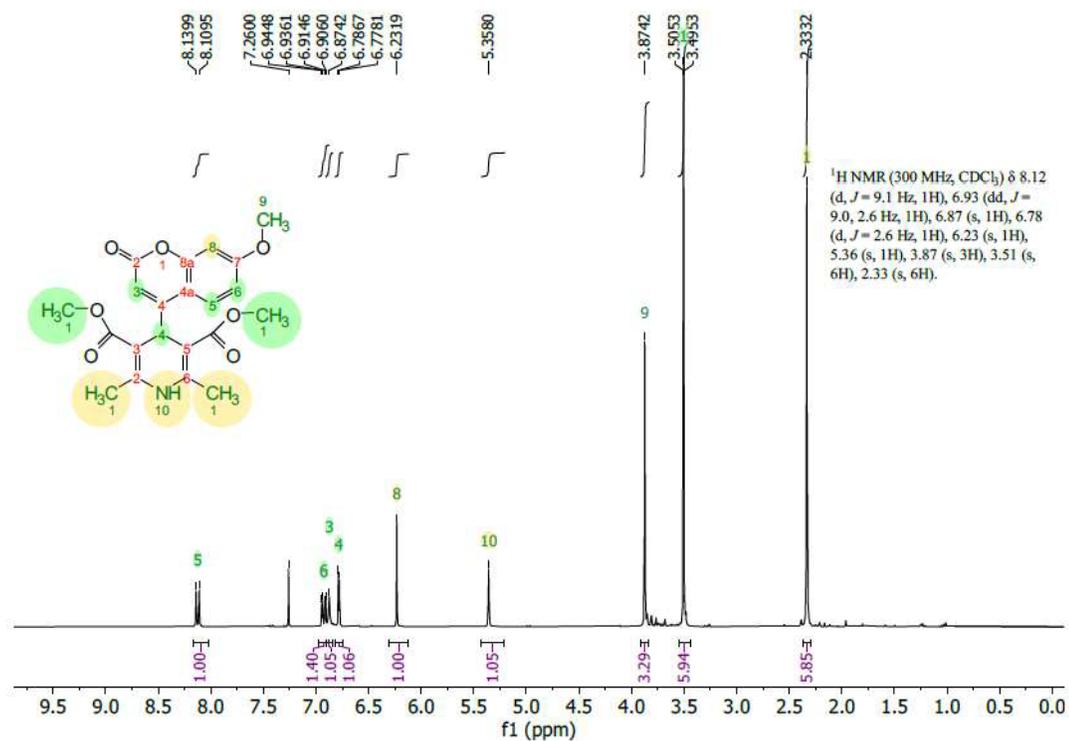
SPECTRE RMN ^1H DE 7-MÉTHOXY-4-MÉTHYLCOUMARINE (9)

APPENDICE D

SPECTRE RMN ^1H DE 4-FORMYL-7-MÉTHOXYLCOUMARINE (**10**)

APPENDICE E

SPECTRE RMN ^1H DE 4-(7-MÉTHOXY-2-OXO-2H-CHROMÈN-4-YL)-2,6-DIMÉTHYL-1,4-DIHYDROPYRIDINE-3,5-DICARBOXYLATE DE DIMÉTHYLE (11)



RÉFÉRENCES

- Badawy, M. E., Ismail, A. M. et Ibrahim, A. I. (2019). Quantitative analysis of acetamiprid and imidacloprid residues in tomato fruits under greenhouse conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(11), 898-905.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S. et Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78-87.
- Bass, C. et Field, L. M. (2018). Neonicotinoids. *Current Biology*, 28(14), R772-R773.
- Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A. et Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.
- Bradbear, N. (2009). Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. *Non-wood Forest Products*, (19).
- Carbonell-Rozas, L., Lara, F. J., del Olmo Iruela, M. et García-Campaña, A. M. (2020). Capillary liquid chromatography as an effective method for the determination of seven neonicotinoid residues in honey samples. *Journal of Separation Science*.
- Casida, J. E. et Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 58, 99-117.
- Chen, G., Song, F., Xiong, X. et Peng, X. (2013). Fluorescent nanosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(33), 11228-11245.
- Chen, M., Collins, E. M., Tao, L. et Lu, C. (2013). Simultaneous determination of residues in pollen and high-fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(28), 9251-9264.

Cimino, A. M., Boyles, A. L., Thayer, K. A. et Perry, M. J. (2017). Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environmental health perspectives*, 125(2), 155-162.

De Silva, A. P., Moody, T. S. et Wright, G. D. (2009). Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst*, 134(12), 2385-2393.

Di Muccio, A., Fidente, P., Barbini, D. A., Dommarco, R., Seccia, S. et Morrica, P. (2006). Application of solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography a*, 1108(1), 1-6.

Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31(5), 1106-1121.

Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. et Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1099-1105.

Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., . . . Underwood, R. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T. et Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 719-731.

Fidente, P., Seccia, S., Vanni, F. et Morrica, P. (2005). Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography a*, 1094(1-2), 175-178.

Forister, M. L., Pelton, E. M. et Black, S. H. (2019). Declines in insect abundance and diversity: We know enough to act now. *Conservation Science and Practice*, 1(8), e80.

Fu, Y. et Finney, N. S. (2018). Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC advances*, 8(51), 29051-29061.

- Gagnon, J. (2014). *Développement de nanosondes plasmoniques d'indium pour l'exaltation de la fluorescence dans l'UV* (mémoire). Université Laval, Québec, Canada.
- Gbylik-Sikorska, M., Sniegocki, T. et Posyniak, A. (2015). Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 990, 132-140.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Guay, M. (2017). *Utilisation de la spectroscopie de fluorescence pour la vérification du nettoyage d'un ingrédient pharmaceutique actif sur les surfaces des équipements de production* (mémoire). université Laval, Québec, Canada.
- Guégan, J.-F., Barot, S., Couvet, D., Devictor, V., Sarrazin, F., Thébaud, C. et Thevenon, S. (2017). *Biodiversité et néonicotinoïdes: revisiter les questions de recherches. Rapport du groupe d'évaluation de la recherche du conseil scientifique de la FRB : FRB*.
- Guzsvány, V., Madžgalj, A., TrebšeP, Gaál, F. et Franko, M. (2007). Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection. *Environmental Chemistry Letters*, 5(4), 203-208.
- Harada, K. H., Tanaka, K., Sakamoto, H., Imanaka, M., Niisoe, T., Hitomi, T., Kusakawa, K. (2016). Biological monitoring of human exposure to neonicotinoids using urine samples, and neonicotinoid excretion kinetics. *PloS one*, 11(1), e0146335.
- Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual review of entomology*, 15(1), 143-156.
- Hladik, M. L., Main, A. R. et Goulson, D. (2018a). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology* 52(6), 3329-3335.
- Hopwood, J., Code, A., Vaughan, M., Biddinger, D., Shepherd, M., Black, S. H., . . . Mazzacano, C. (2016). How neonicotinoids can kill bees. *Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR. Available at <http://www.xerces.org/neonicotinoids-and-bees/>* (Verified 6 March 2017).
- Jovanov, P., Guzsvány, V., Franko, M., Lazić, S., Sakač, M., Šarić, B. et Banjac, V. (2013). Multi-residue method for determination of selected neonicotinoid insecticides in honey

using optimized dispersive liquid liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, *111*, 125-133.

- Kagabu, S. (2011). Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(7), 2887-2896.
- Kearns, C. A. et Inouye, D. W. (1997). Pollinators, flowering plants, and conservation biology. *Bioscience*, *47*(5), 297-307.
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G. et Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*, *7*(1), e29268.
- Li, Y., Li, Y., Liu, Y. et Ward, T. J. (2018). Photodegradation of clothianidin and thiamethoxam in agricultural soils. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(31), 31318-31325.
- Liang, R., Tang, F., Wang, J. et Yue, Y. (2019). Photo-degradation dynamics of five neonicotinoids: Bamboo vinegar as a synergistic agent for improved functional duration. *PloS one*, *14*(10), e0223708.
- Liu, S., Zheng, Z., Wei, F., Ren, Y., Gui, W., Wu, H. et Zhu, G. (2010). Simultaneous determination of seven neonicotinoid pesticide residues in food by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(6), 3271-3278.
- Liu, W., Zheng, W., Ma, Y. et Liu, K. K. (2006). Sorption and degradation of imidacloprid in soil and water. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, *41*(5), 623-634.
- López-Fernández, O., Rial-Otero, R. et Simal-Gándara, J. (2015). High-throughput HPLC – MS/MS determination of the persistence of neonicotinoid insecticide residues of regulatory interest in dietary bee pollen. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *407*(23), 7101-7110.
- Losey, J. E. et Vaughan, M. (2006). The economic value of ecological services provided by insects. *Bioscience*, *56*(4), 311-323.

- Lu, L., Chen, C., Zhao, D., Yang, F. et Yang, X. (2015). A simple and sensitive assay for the determination of nitrite using folic acid as the fluorescent probe. *Analytical methods*, 7(4), 1543-1548.
- Lundin, O., Rundlöf, M., Smith, H. G., Fries, I. et Bommarco, R. (2015). Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS one*, 10(8), e0136928.
- Ma, S., Fang, D.-C., Ning, B., Li, M., He, L. et Gong, B. (2014). The rational design of a highly sensitive and selective fluorogenic probe for detecting nitric oxide. *Chemical Communications*, 50(49), 6475-6478.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M. et Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 22(11), 573-580.
- Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M. et Currie, M. G. (1993). A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical biochemistry*, 214(1), 11-16.
- Misra, R. et Bhattacharyya, S. P. (2018). *Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications* John Wiley & Sons.
- Mitchell, E. A., Mulhauser, B., Mulo, M., Mutabazi, A., Glauser, G. et Aebi, A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358(6359), 109-111.
- Moza, P., Hustert, K., Feicht, E. et Kettrup, A. (1998). Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere*, 36(3), 497-502.
- Palma, D., Arbid, Y., Sleiman, M., de Sainte-Claire, P. et Richard, C. (2020). New Route to Toxic Nitro and Nitroso Products upon Irradiation of Micropollutant Mixtures Containing Imidacloprid: Role of NO_x and Effect of Natural Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 54(6), 3325-3333.
- Rouessac, F. et Rouessac, A. (1997). *Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6^{ème} édition DUNOD.
- Rout, K. C. et Mondal, B. (2015). Copper (II) complex as selective turn-on fluorescent probe for nitrite ion. *Inorganica Chimica Acta*, 437, 54-58.

- Sekar, R. B. et Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology*, 160(5), 629.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., Downs, C., . . . Girolami, V. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34.
- Song, S., Zhang, C., Chen, Z., He, F., Wei, J., Tan, H. et Li, X. (2018). Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC-MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction. *Journal of Chromatography A*, 1557, 51-61.
- Suchail, S., Guez, D. et Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(11), 2482-2486.
- Tomizawa, M. et Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 247-268.
- Tomizawa, M. et Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2883-2886.
- Valeur, B. (2003). Molecular fluorescence. *Digital Encyclopedia of Applied Physics*, 477-531.
- Wamhoff, H. et Schneider, V. (1999). Photodegradation of imidacloprid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1730-1734.
- Wang, Q.-H., Yu, L.-J., Liu, Y., Lin, L., Lu, R.-g., Zhu, J.-p., Lu, Z.-L. (2017). Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate : A review. *Talanta*, 165, 709-720.
- Watanabe, E., Baba, K. et Eun, H. (2007). Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(10), 3798-3804.

- Whitehorn, P. R., O'connor, S., Wackers, F. L. et Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.
- Zheng, H., Shang, G.-Q., Yang, S.-Y., Gao, X. et Xu, J.-G. (2008). Fluorogenic and chromogenic rhodamine spirolactam based probe for nitric oxide by spiro ring opening reaction. *Organic letters*, 10(12), 2357-2360.