



**HAL**  
open science

## Biotransformation des phénylurées hydroxylées par la laccase de *Trametes versicolor* : identification des métabolites et influence des paramètres structuraux

Claude Jolival, Bruno Kokel, Francois Boyer, Lucien Kerhoas, Christian Mougine

### ► To cite this version:

Claude Jolival, Bruno Kokel, Francois Boyer, Lucien Kerhoas, Christian Mougine. Biotransformation des phénylurées hydroxylées par la laccase de *Trametes versicolor* : identification des métabolites et influence des paramètres structuraux. XXXIème Congrès du Groupe Français des Pesticides, May 2001, Lyon, France. 2001. hal-01600187

**HAL Id: hal-01600187**

**<https://hal.science/hal-01600187>**

Submitted on 4 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

C. Jolivalt<sup>+</sup>, B. Kokel<sup>\*</sup>, F.D. Boyer<sup>+</sup>, L. Kerhoas<sup>+</sup>, A. Kollmann<sup>+</sup>, C. Mougin<sup>+</sup>

<sup>+</sup> INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France. jolivalt@versailles.inra.fr

<sup>\*</sup> Laboratoire de Bioorganique et Biotechnologies, UMR CNRS-ENSCP n°7375, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05, France.

### Objectifs

Dans le cadre de l'étude de l'écodynamique des substances à caractère polluant, nous nous sommes intéressés à l'impact des champignons filamenteux lignolytiques et de leurs systèmes enzymatiques associés sur la biotransformation des xénobiotiques. Plus précisément, nous nous sommes focalisés sur la biotransformation des phénylurées par la laccase de *Trametes versicolor*. Les phénylurées les plus couramment utilisées comme herbicides ne sont pas transformées par la laccase. Par contre, les isomères *para* et *ortho* hydroxylés de phénylurées se sont avérés être de bons substrats de cette enzyme. Ces dérivés sont susceptibles de se former au champ après traitement des cultures, par oxydation photochimique ou métabolisation par certaines plantes ou microorganismes des sols. Il est donc intéressant d'explorer leurs voies putatives de biodégradation. Pour chacun des cinq dérivés étudiés, un suivi cinétique de la réaction de dégradation par la laccase a été réalisé, mettant en évidence l'importance du pH tant sur la cinétique de dégradation que sur la nature des produits formés.



Laccase de *Coprinus cinereus*, d'après V. Ducros, Nature Struct. Biol. P 310 5(4), 1998

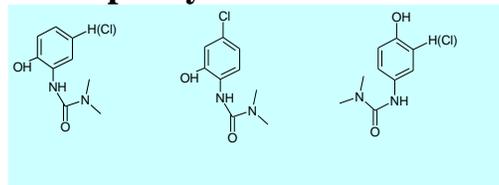
### Propriétés des laccases

Les laccases (EC.1.10.3.2) catalysent l'oxydation de molécules aromatiques de type phénoliques ou anilines par formation d'un radical, conduisant à la réduction de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O.

Production des laccases:

- 7 jours de culture de *Trametes versicolor* (souche de la collection de l'unité de phytopathologie de l'INRA, de Versailles)
- Induction par la 2,5-xylydine

### Structure des phénylurées testées

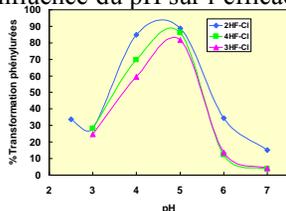


2HF (-Cl) N',N'-diméthyl-N-(5-chloro,2-hydroxyphényl)urée  
3HF(-Cl) N',N'-diméthyl-N-(5-chloro,4-hydroxyphényl)urée  
4HF (-Cl) N',N'-diméthyl-N-(5-chloro,4-hydroxyphényl)urée

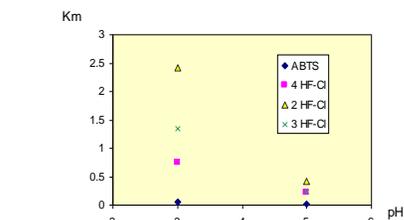
### Transformation des phénylurées

Détermination des paramètres cinétiques de la transformation par la laccase

Influence du pH sur l'efficacité de la transformation

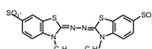


substrat	K <sub>m</sub> (mM)			k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )		
	pH = 3	pH = 5	pH = 6	pH = 3	pH = 5	pH = 6
ABTS	0.06	0.085		217	64	
2 HF(-Cl)	2.4	0.41		434	149	
3 HF(-Cl)	1.2	0.24		87	63	
4 HF(-Cl)	0.74	0.22		82	97	
4 HF	4.4	0.6	0.14	72	47	65



Conditions expérimentales :  
Phénylurée initialement à 0.1 g/L dans tampon CP 0.1 M aéré à 30°C  
Laccase : 0.011 unité avec 2HF(-Cl) / 0.05 unité avec 4HF(-Cl) et 3HF(-Cl)  
Durée incubation 15 minutes  
Analyses : HPLC colonne C8/ débit 1 mL/min / détection λ=244 nm  
gradient acétonitrile/eau 0-100% en 30 minutes

ABTS : 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonate)

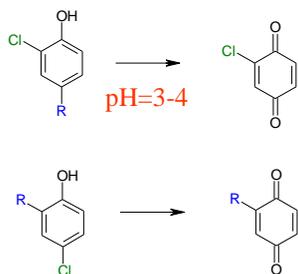


Modèle : cinétique michaélienne  
E+S → ES → E+P

Forte discrimination entre les substrats à pH 3, qui disparaît à pH 5.

Profil comparable pour toutes les phénylurées testées

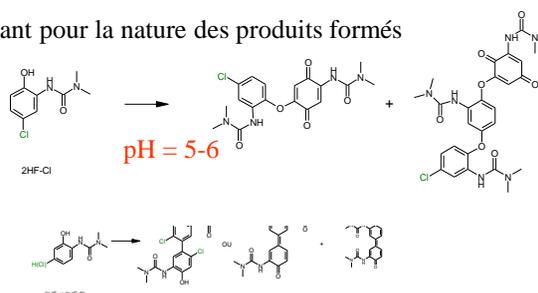
4 < pH optimal < 5



1,4-*para*-quinone

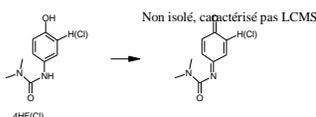
### Identification des métabolites

Le pH de la solution est déterminant pour la nature des produits formés



Majoritaire 90%

Minoritaire 10%



Chacun des produits formés a été isolé et caractérisé par RMN, électrospray-MS, IR. Les propriétés des *para*-quinones ont été comparées à celles des produits commerciaux correspondants.

### Conclusion

- À pH acide, coupure de la liaison C-N ou déhalogénéation en *para*.
- À pH plus élevé, (pH > 5) la position des groupements substitués sur le cycle benzénique devient discriminante. Lorsque le groupement hydroxylé et l'urée sont en position *para* sur le cycle, l'action de la laccase conduit à la formation d'une semi-quinone alors que pour l'isomère en position *ortho*, différents oligomères peu solubles sont formés.