



HAL
open science

Conception de dispositifs enzymatiques sur supports cellulosiques pour la détection du glyphosate

Nicolas Delprat

► **To cite this version:**

Nicolas Delprat. Conception de dispositifs enzymatiques sur supports cellulosiques pour la détection du glyphosate. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10002 . tel-04809660

HAL Id: tel-04809660

<https://theses.hal.science/tel-04809660v1>

Submitted on 28 Nov 2024

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

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

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale N° 205
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 12/01/2024, par :

Nicolas DELPRAT

**Conception de dispositifs enzymatiques
sur supports celluloseux pour la
détection du glyphosate**

Devant le jury composé de :

Dr. Ingrid BAZIN	Maître de Conférences, Mines d'Alès	Rapporteure
Dr. Marie-José DURAND	Professeur des Universités, NU	Rapporteure
Pr. Thierry NOGUER	Professeur des Universités, UPVD	Rapporteur
Pr. Saïda MEBAREK	Professeur des Universités, UCBL	Présidente
Dr. Bastien DOUMECHÉ	Maître de Conférences, UCBL	Directeur de thèse
Dr. Béatrice LECA-BOUVIER	Maître de Conférence, UCBL	Invitée
Dr. Guillaume OCTOBRE	Maître de Conférence, UCBL	Invité



Remerciements

Trois mois après la défense de cette thèse, la poussière est retombée et il est temps d'écrire des remerciements en dehors de cette période agitée qu'est le doctorat. Ce travail de thèse a été le fruit d'un travail collaboratif, d'une chimère à trois domaines dont j'ai essayé, à l'image d'*E. coli* BL21(DE3) pour une protéine chimérique SviDyp-GlyphOx-CBM, d'être l'organisme hôte de cette expression. J'espère que le travail accompli, contrairement à celui de la pauvre *E. coli*, peut être qualifié d'une expression réussie.

Dans un premier temps, je tiens à remercier la séquence génétique codant pour ce projet de thèse : les docteurs **Bastien Doumèche, Béatrice Leca-Bouvier et Guillaume Octobre** (dans un ordre alphabétique). Je vous remercie tous les trois pour ce parcours qui prend aujourd'hui fin.

Un parcours qui a commencé par un rendez-vous en fin d'année 2018 lors de la recherche de mon stage de master 2. Ce fameux rendez-vous où je souhaitais prendre des renseignements et qui s'est transformé en entretien de recrutement. Il était alors hors de question de continuer sur une thèse. J'ai eu l'opportunité d'intégrer le laboratoire du GEMBAS les premiers jours de janvier 2019. Les choses en entraînant une autre, j'ai mis du temps pour finalement présenter un premier aboutissement de ce travail autour de la glyphosate oxydase en janvier 2024. Collectivement, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée pour travailler sur ce projet, de tout ce substrat que vous m'avez offert pour construire cette recherche et faire évoluer autant mes pratiques que mon projet professionnel.

Bastien, je te remercie pour l'accueil au laboratoire, l'enseignement théorique et technique ainsi que tout ce temps que tu m'as accordé. Tu as toujours été là pour répondre à mes questions, te renseigner régulièrement sur les avancées et remettre certaines pendules à l'heure. Merci d'avoir été là quand les choses ne marchaient pas en proposant des solutions parfois, littéralement, sorties du fond d'un congélateur - 80°C.

Guillaume, merci pour ton expertise en biologie moléculaire et tout le savoir-faire que tu m'as offert dans ce domaine. Tu as aussi toujours été disponible, et je suis presque déçu que la partie de biologie moléculaire du projet ait été bloquée pour un souci de transformation

dont je semble porteur d'une malédiction. Merci d'avoir été là, particulièrement en une fin de première année de thèse.

Béatrice, je ne saurai jamais trop te remercier pour ton implication dans cette *review* et le travail que Guillaume et toi avez mené pour la concrétiser. Je vous souhaite tout le bonheur du monde pour la partie II. Je me souviendrai de ton optimisme excessif qui permet de garder le cap en eaux troubles.

Je tiens aussi à remercier les docteurs **Ingrid Bazin**, **Marie-José Durand** et le professeur **Thierry Noguer** pour avoir accepté de rapporter ce travail de quatre années de thèse. Également, je remercie le professeur **Saïda Mebarek** en sa qualité d'examinatrice, et présidente du jury de thèse.

Merci aux deux tulipes qui ont maintenu les erlenmeyers de culture au travers du comité de suivi individuel (de thèse), les docteurs **Carole Chaix** et **Lionel Ballut**. Merci d'avoir répondu présents, suivi ces méandres jusqu'au delta et de vos conseils avisés et notamment du petit conseil, mine de rien : « Et pourquoi pas *Biosensors & Bioelectronics* ? ».

Numa Georges, le stagiaire de la stagiaire. Tu sais déjà tout ce qui doit être dit.

J'aimerais remercier les différents stagiaires, qui sont intervenus sporadiquement comme catalyseur dans ce projet : **Maïlis Dissais** (pour ton travail sur la SviDyP-CBM et tes expressions modernes), **Gontran Perino** (pour ton travail de caractérisation et nous avoir appris qu'en l'absence d'enzyme, pas d'activité enzymatique), **Matisse Ferrer** (pour avoir essayé de chanter pour la GlyphOx-CBM) et **Nathan Montmailler** (pour avoir insisté pour venir à deux reprises, d'avoir été à la fois « mon » premier et dernier stagiaire, pour avoir alimenté la flamme du projet et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir). Sans avoir participé directement au projet, un clin d'œil à **Laura Mapledoram**, **Alexandra Blanc**, **Louise Blanco-Garcia** et **Issa Fall** (dans mon cœur, tu resteras un stagiaire).

Une petite intention particulière à toi, **Romain Clément**, pour ces quelques mois passés ensemble dans le « grand labo » qui était jusqu'alors bien vide. Pour nos échanges, tes éclairages, tes conseils, *the father*, tout ça tout ça.

Ce travail de thèse a été incubé dans l'étuve GEMBAS, que je tiens à remercier chaleureusement. Pour éviter d'oublier malencontreusement quelques noms, je m'abstiendrai de dresser une liste nominative. Merci à vous pour avoir été là, que nous ayons partagé un coin de balance, un autoclave, des repas à la « MDH », une discussion de couloir, de la matière à penser ou encore des discussions philosophiques sur les effluves de la centrifugeuse. Merci au noyau de la MDH, qui a évolué au fil des temps, ces coups de rame sous la pluie à la nuit tombée, ... Vous voulez du houmous ?

Merci à l'équipe **MEM2** pour m'avoir toléré dans votre petit cagibi pour que je puisse m'essayer à des compositions musicales dignes de Skrillex. J'espère avoir pu, entre quelques repas partagés avec vous, faire évoluer vos goûts musicaux.

Merci aux autres équipes avec qui j'ai pu échanger : **Anastasiia, Augustin et le Dr. Michelle Fiore** pour le lyophilisateur, **Titouan** ... pour le même appareil !

Merci à tous ces éléments qui gravitent autour de l'étuve agitée, permettant son fonctionnement. Merci à vous, **Nicolas Foulon** et **Claude Bonura**, pour cette clé USB et votre soutien. J'aimerais aussi remercier tout le personnel administratif (**Céline Muller** en particulier), l'**EDISS**, le personnel de la **MDH** qui a lutté pour maintenir le moral gustatif.

Chloé Aymard, nous n'avons jamais travaillé ensemble directement, mais je te remercie pour avoir initié le projet et montré que la GlyOx-CBM s'exprimait. Qui aurait pensé qu'une erreur de commande aurait pu aboutir à un travail de thèse.

En parallèle du travail de thèse, je tiens à remercier chaleureusement **l'équipe du département Génie Biologique de l'IUT de Lyon 1** pour m'avoir accueilli lors de cet ATER. Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour l'ensemble du temps passé chez vous, de vos intentions, conseils (pour lutter comme un mur de brique parfaitement silencieux en TD), ouvert les portes de vos salles de TP. Merci à toi **Marjorie Ochs**, pour avoir pensé à moi, m'avoir appuyé et conseillé dans ma candidature et répondu à toutes mes questions sur ce milieu que je ne connaissais pas. **Carole Bougault** et **Pascal Michalon**, un grand merci pour m'avoir aidé à prendre mes marques, m'avoir fait confiance pour me confier mes premières classes et enseigné la science du bitoniau (vous savez, ce bitoniau pour la croissance des

levures ...). Je remercie aussi tous mes autres collègues avec qui j'ai pu intervenir : **Chef Gonzalez** (pour tes conseils), **Fabienne Laugerette** (pour tous ces amusements en chimie organique), **Agnès Girard-Egrot** (pour m'avoir laissé concevoir et mener ces TDs et mener l'examen portant dessus), **Laura Olivares** (pour ces salles de TP paradisiaques), **Eva Drevet Mulard** (pour ces aventures ...). Merci à tous les membres de l'équipe pédagogique pour cet accueil et avoir fait de ces périodes de cours un havre. Merci également à toutes ces têtes blondes (et moins blondes) à qui j'ai eu un plaisir infini à transmettre un savoir, savoir-faire et, je l'espère, un savoir-être.

Plus personnellement, je tiens à remercier les copains, qui ont supporté que « thèse » « thèse » « thèse » soit mon unique vocabulaire ces deux dernières années.

Un remerciement particulier aux Ph(inishe)D. Laura et Marjorie, sans votre soutien indéfectible, ces heures à la BU, ces coups de soleil, et autre, la situation aurait été bien différente. Je me réjouis de nos dénouements respectifs.

Je remercie aussi ma famille, qui a supporté les aléas de la thèse, qui a été là aux moments où ça n'allait pas. Merci mon père d'avoir organisé la suite immédiate de la soutenance (presque) avec encore plus de succès que la dite soutenance. Merci à ma mère qui a eu le courage et la volonté inébranlable de relire ce manuscrit.

Pour conclure, je remercie toutes les personnes que j'aurais dû mais à qui je n'ai pas pensé. Je vous présente mes sincères excuses et votre absence dans ces quelques pages ne présage de rien.



Sommaire

Abréviations	11
1. Divers.....	13
2. Molécules	14
Introduction générale.....	15
1 ^{ère} partie - Etude bibliographique	19
1. Les herbicides.....	21
1.1. Définitions des herbicides	21
1.2. Classification.....	21
1.3. Mode de fonctionnement des herbicides	26
1.4. Détection des herbicides : le paradoxe du glyphosate	51
2. Le glyphosate.....	52
2.1. Historique et généralités	52
2.2. Fonctionnement comme herbicide	52
2.3. Propriétés physico-chimiques	55
2.4. Effet sur la santé et sur l'environnement.....	56
2.5. Résistance au glyphosate	59
2.6. Détection du glyphosate	62
3. Les biocapteurs/essais biologiques pour la détection du glyphosate.....	65
3.1. Définitions d'un biocapteur.....	65
3.2. Biocapteurs et essais biologiques hétérogènes	68
4. Définition du projet de thèse	93
4.1. Lignes de conduite ASSURED.....	93
4.2. Définition du projet de thèse	94
5. De la glycine oxydase à la glyphosate oxydase	96
5.1. Généralités	96
5.2. Focus sur la glycine oxydase de <i>Bacillus subtilis</i>	97
5.3. De la GlyOx vers la GlyphOx	98
6. Peroxydases.....	102
6.1. Peroxydase du raifort (HRP)	103
6.2. Dye Peroxidases (DyP).....	105
7. Méthodes d'immobilisation de protéines sur un support cellulosique	112
7.1. La cellulose	113

7.2.	Méthodes physiques et chimiques d'immobilisation sur la cellulose.....	114
7.3.	Techniques d'immobilisation par affinité.....	119
7.4.	Ingénierie moléculaire pour l'immobilisation : protéine de fusion.....	122
2 ^{ème}	partie - Matériel et Méthodes	125
1.	Produits chimiques.....	127
2.	Constructions génétiques.....	127
2.1.	Plasmides utilisés : pUC57 et pET15b.....	127
2.2.	Constructions commerciales	127
2.3.	Préparation des bactéries compétentes	128
2.4.	Transformation bactérienne par choc thermique.....	128
2.5.	Mini-préparation d'ADN.....	129
2.6.	GlyphOx-CBM obtenue par mutagenèse ponctuelle	130
3.	Expressions de protéines.....	134
3.1.	Protocole d'expression.....	134
3.2.	Optimisation du protocole d'expression de la GlyphOx-CBM.....	135
3.3.	Purification des GlyOx et GlyphOx	136
3.4.	Dosage de protéines.....	137
3.5.	SDS-PAGE.....	137
4.	Préparation des plaques 96 disques de papier	138
5.	Immobilisation de protéines	139
5.1.	Spécificité de l'interaction CBM-polymère.....	139
5.2.	Immobilisation sur papier.....	139
5.1.	Immobilisation sur coton.....	140
6.	Analyse des produits par résonance magnétique nucléaire	142
7.	Mesures d'activité par colorimétrie	142
7.1.	Principe général.....	142
7.2.	Activité des enzymes en solution	143
7.3.	Activité des enzymes immobilisées sur papier.....	145
7.4.	Activité des enzymes immobilisées sur coton.....	145
7.5.	Traitement d'image (après scan ou photographie).....	146
8.	Méthodes électrochimiques	146
8.1.	Fabrication des électrodes sérigraphiées sur papier.....	146
8.1.	Principe.....	148
8.2.	Détection de l'H ₂ O ₂ par voltampérométrie cyclique.....	150
9.	Mesures de chimiluminescence du luminol.....	151
9.1.	Principe général.....	151

9.2.	Acquisition des images	151
9.3.	Traitement du signal.....	151
10.	Caractérisation du système de détection du glyphosate sur coton-tige	152
10.1.	Etudes d'interférences	152
10.2.	Etudes de l'impact de matrices environnementales.....	154
3 ^{ème}	partie - Expression de protéines de fusion	155
1.	De la GlyOx-CBM à la GlyphOx-CBM	157
1.1.	Expression des deux GlyOx : GlyOx et GlyOx-CBM.....	157
1.2.	Expression de la GlyphOx-CBM	157
1.3.	Caractérisation	164
1.4.	Immobilisation et mesures d'activité immobilisée	166
1.5.	Caractérisation de l'enzyme immobilisée	168
2.	Conclusion	169
4 ^{ème}	partie - Détection du peroxyde d'hydrogène sur support papier	171
1.	Détection électrochimique sur électrodes sérigraphiées	173
2.	Détection colorimétrique du peroxyde d'hydrogène avec la HRP.....	181
3.	Détection colorimétrique avec la SviDyP-CBM	187
4.	Conclusion et « problématique »	192
5 ^{ème}	partie - Coton-tige enzymatique pour la détection du glyphosate	195
1.	Immobilisation sur coton-tige	197
1.1.	Confirmation de l'immobilisation.....	198
1.2.	Impact de la multiplication des cycles d'incubation / lavage.....	200
1.3.	Stabilisation de l'échantillon	200
2.	Détection par colorimétrie.....	201
2.1.	Détection du glyphosate	201
2.2.	Etude des interférences	205
2.3.	Matrices environnementales	208
2.4.	Problématique.....	209
3.	Chimiluminescence	210
3.1.	Détection du glyphosate	211
3.2.	Interférences	212
3.3.	Matrices environnementales	213
3.4.	Limitations.....	214
4.	Conclusion	214
	Conclusions et perspectives	217
	Références bibliographiques.....	223

Abréviations

1. Divers

6-His	Etiquette composée de 6 histidines
AChE	Acétylcholinestérase
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHAS	Acétolactase synthase
ALS	Acétolactate synthase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation
ARN	Acide ribonucléique
CBM	Carbohydrate binding module (module de liaison aux glucides)
CCD	Charge coupled device (ou dispositif à transfert de charge)
ChOx	Choline oxydase
CL	Chimiluminescence
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CMA	Concentration maximale admissible
DARF	Dose aiguë de référence
DJA	Dose journalière acceptable
DO	Densité optique (absorbance mesurée à 600 nm sans indication contraire)
DXP	Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase
DyP	Dye peroxydase
ECL	Electrochimiluminescence
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPSPS	5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
GlyOx	Glycine oxydase
GlyphOx	Glyphosate oxydase
Gp	Glyphosate
HRAC	<i>Herbicide Resistance Action Committee</i>
HRP	Horseradish peroxidase (peroxydase du raifort)
IARC	International agency for research on cancer (ou CIRC : Centre international de recherche sur le cancer)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Lysogeny broth
LoD	Limite de détection (<i>limite of detection</i>)
LoQ	Limite de quantification
MAP	Microtubule associated protein
MM	Marqueur moléculaire
NAEO	Niveau acceptable d'exposition des opérateurs
PCR	Polymerase chain reaction (ou réaction en chaîne par polymérase)
PDS	Phytoène désaturase
PpDyP	DyP de <i>Pseudomonas putida</i>
PPi	Pyrophosphate
PS-I	Photo-système I
PS-II	Photosystème II

QuERChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
RNAse	Enzyme hydrolysant les ARN
ROS	Reactive oxygen species
SCF	Skp, Cullin, F-box
SviDyP	DyP de <i>Saccharomonospora viridis</i>
TB	Terrific broth

2. Molécules

(6-)FAM	Etiquette 6-Carboxy-fluorescein
4-AAP	4-aminoantipyrine
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
ATP	Adénosine triphosphate
CDDA	Allidochlore
CoA	Co-enzyme A
DFPP	Diflufenzopyr
DMP	2,6-diméthoxy phénol
DSP	dithiobis(succinimidyl propionate)
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMOc	Fluorénylméthoxycarbonyle
HDCBS	Acide 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonic
IAA	Acide indole-3-acétique (auxine)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione
PB	Bleu de Prusse (Prussian blue)
PEP	Acide phosphoénolpyruvique
PQ	Plastoquinone
PW	Blanc de Prusse (Prussian white)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
GTP	Guanosine triphosphate
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

Introduction générale

Afin de répondre aux demandes alimentaires croissantes de la société et lutter contre les infestations, l'agriculture moderne a de plus en plus recours à des substances phytosanitaires pour protéger les espèces végétales cultivées contre les insectes, plantes nuisibles ou les maladies et en améliorer les rendements.

L'utilisation de telles substances peut conduire à des effets secondaires sur la biodiversité (l'impact de l'utilisation des néonicotinoïdes sur les populations d'abeilles et l'implantation d'espèces végétales génétiquement modifiées au détriment des espèces endémiques étant les plus connus) ou sur l'Homme en favorisant ou initiant des troubles pathologiques. Ces effets secondaires nocifs constituent un terreau fertile à de nombreux débats sociétaux dont l'éventuel prolongement de l'utilisation du glyphosate en décembre 2023 en Europe est un parfait exemple.

Usuellement, des techniques analytiques lourdes (chromatographie en phase gazeuse couplée ou non avec une spectrométrie de masse) sont utilisées pour détecter les herbicides dans les matrices environnementales. Ces techniques nécessitent l'appel à un laboratoire d'analyse spécialisé, impliquant des coûts importants, un long délai de réponse et ne permettent pas d'effectuer une analyse sur place.

L'utilisation de biocapteurs permet au contraire des analyses directement sur le terrain, dans des délais courts pour un coût faible et ne nécessitant pas de personnel qualifié. Ils permettent ainsi un suivi simplifié de la concentration en herbicide dans l'environnement. Outre l'augmentation du nombre de données que l'utilisation de tels biocapteurs pourraient apporter, ils peuvent aussi être utilisés comme outils d'alerte afin d'identifier et suivre les contaminations.

Ce travail de thèse se base sur le glyphosate, l'herbicide le plus utilisé actuellement au monde, et l'un des plus difficiles à détecter. Sur le constat de l'absence ou presque de biocapteur à signal « on » spécifique du glyphosate, l'objectif de cette thèse a été de proposer une méthode de conception d'un biocapteur enzymatique spécifique du glyphosate assemblé en un minimum d'étapes et permettant la détection du glyphosate dans une matrice d'eau de surface facilement, avec un nombre très limité d'interventions de l'utilisateur. Un tel système se basera sur une glyphosate oxydase spécifique du glyphosate immobilisée sur un support cellulosique. En présence de glyphosate, cette enzyme génère du peroxyde d'hydrogène qui est ensuite détecté grâce à l'utilisation d'une peroxydase et d'un système de détection adapté.

Cette thèse s'inscrit dans le financement d'une bourse de thèse de trois ans par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) et d'un ATER à mi-temps financé par l'Université Claude Bernard Lyon 1 (au sein de l'IUT associé).

Ce manuscrit commence par une première partie bibliographique, permettant de resituer le projet de thèse dans le contexte environnemental, sociétal et scientifique. Cette partie donnera un aperçu des différents herbicides avant de se concentrer sur le glyphosate, cas d'étude choisi pour ce travail de thèse. A partir de cet exemple, un état de l'art des moyens de détection du glyphosate sera réalisé comme exemple pour présenter les différentes stratégies de conception de biocapteur pour la détection d'herbicides afin de déterminer les caractéristiques auxquelles doit répondre la proposition de ce travail de thèse. Dans un deuxième temps, les enzymes utilisées dans ce travail seront décrites, ainsi que la stratégie d'immobilisation.

L'expression des protéines et leur immobilisation feront l'objet de la troisième partie. Dans une quatrième partie, il sera fait état des résultats obtenus pour la détection du peroxyde d'hydrogène. Enfin, dans une cinquième partie, les travaux ayant abouti au dispositif de détection du glyphosate sous format de cotons-tiges fonctionnalisés seront présentés et discutés.

Enfin, un bilan des résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse sera présenté, et ce manuscrit se conclura par les perspectives pouvant être envisagées quant à la poursuite de ce projet.

1^{ère} partie - Etude bibliographique

1. Les herbicides

1.1. Définitions des herbicides

Les pesticides sont définis comme des composés permettant de (European Commission, 2023) :

- Prévenir, détruire et tenir sous contrôle un organisme nuisible ou une maladie
- Protéger les plantes (ou produits végétaux) au cours de leur production, stockage ou transport

Ils comprennent les herbicides (végétaux), fongicides (champignons), insecticides (insectes), acaricides (acariens), nématicides (nématodes), molluscicides (mollusques), régulateurs de croissance, répulsifs et rodenticides (rongeurs).

Ce travail s'intéressera plus particulièrement aux herbicides, c'est-à-dire aux composés ou préparations phytosanitaires à base d'un composé actif présentant la caractéristique de tuer des végétaux entrant en compétition avec les cultures.

1.2. Classification

Le comité d'action sur la résistance aux herbicides (HRAC, *Herbicide Resistance Action Committee*) résulte de la réunion, sous l'égide de CropLife International, de plusieurs industries phytosanitaires ou agroalimentaires afin de travailler, en partie, sur les phénomènes de résistance aux herbicides chez les plantes. Parmi les membres sont présents BASF, Bayer CropScience, Corteva AgriScience, FMC, GOWAN, Sumitomo, Syngenta et UPL.

C'est aussi cet organisme qui est à l'origine d'une classification harmonisée des herbicides. Mise à jour en 2010 puis 2020, cette classification, devenue numérique, classe les différentes familles de composés chimiques par rapport à leur cible moléculaire (par exemple, le glyphosate comme inhibiteur de l'EPSPS, classe 9) à l'origine de leur effet herbicide. 26 cibles ont été identifiées, le nombre de cibles pouvant être amené à évoluer selon les recherches pour trouver de nouvelles molécules herbicides ou identifier leur mode d'action précis. La classe 0 est composée des herbicides dont la cible moléculaire n'a pas été identifiée (HRAC, 2010).

Ces 26 cibles moléculaires (classes 0 à 34) sont ensuite regroupées par le comité en trois grandes catégories selon le dérèglement majeur observé conduisant à la mort du végétal, qui peut être :

- l'activation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (classes HRAC 5, 6, 10, 12 à 14, 22, 27, 32 à 34),
- le dérèglement du métabolisme cellulaire (classes HRAC 1, 2, 9, 15, 18, 28 à 31),
- la perturbation de la division cellulaire et de la croissance (classe HRAC 3, 4, 19, 23 et 24).

Une quatrième catégorie regroupe les herbicides dont le mode d'action n'est pas connu (famille de composés 0). Cette classification est présentée dans le Tableau 1, qui contient les différentes familles de composés en citant les molécules herbicides.

Tableau 1 - Classification HRAC des herbicides

Activation de la production d'espèces réactives de l'oxygène

- 5 Inhibition du photosystème II (PSII)** (ligand de la Serine 264 de la protéine D1 et autres ligands (que la classe 6)
- | | |
|------------------|---|
| Amides | <i>Chloranocryl/dicryl, pentanochlor, propanil</i> |
| Phénylcarbamates | <i>Chlorprocarb, desmedipham, phenisopham</i> |
| Pyridazinone | <i>Brompyrazon, chloridazon/pyrazon</i> |
| Triazines | <i>Atrazine, cyanazine, procyazine, simazine, terbutryne</i> |
| Triazinones | <i>Ethiozin, hexazinone, metribuzin</i> |
| Triazolinones | <i>Amicarbazone</i> |
| Uraciles | <i>Bromacil, lenacil, terbacil</i> |
| Urées | <i>Diuron, benzthiazuron, bromuron, fenuron, isoproturon, neburon</i> |
- 6 Inhibition du PS II** de la photosynthèse (ligand de l'His 215 de la protéine D1)
- | | |
|--------------------|--|
| Nitriles | <i>Bromofenoxim, bromoxynil, ioxynil</i> |
| Phenyl-pyridazines | <i>Pyridate</i> |
| Benzothiadiazinone | <i>Bentazon</i> |
- 10 Inhibition de la glutamine synthase**
- | | |
|------------------|--|
| Ac.phosphoniques | <i>Glufosinate-ammonium, bialaphos/bilanafos</i> |
|------------------|--|
- 12 Inhibition de la phytoène désaturase**
- | | |
|-----------------------|--|
| Phényl-ethers | <i>Picolinafen, diflufenican, beflubutamid</i> |
| Hétérocycles N-phenyl | <i>Flurochloridone, norflurazon</i> |
| Hétérocycles diphenyl | <i>Fluridone, flurtamone</i> |
- 13 Inhibition de la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXP)**
- | | |
|-----------------|-----------------------------|
| Isoxazolidinone | <i>Clomazone, bixlozone</i> |
|-----------------|-----------------------------|
- 14 Inhibition de la protoporphyrinogène oxydase**
- | | |
|------------------------|--|
| Ethers diphenyls | <i>Acifluorfen, bifenox, fluoronitrofen, oxyfluorfen, nitrofen</i> |
| Phénylpyrazoles | <i>Pyraflufen-éthyl</i> |
| N-Phényl-oxadiazolones | <i>Oxadiargyl, oxadiazon</i> |
| N-Phényl-triazolinones | <i>Azafenidin, carfentrazone-éthyl, sulfentrazone</i> |
| N-Phényl-imides | <i>Fluthiacet-méthyl (procide), butafenacil, saflufenacil, pentoxazone, chlorphthalim, cinidon-ethyl, flumipropyn, trifludimoxazin</i> |
| Autres | <i>Pyraclonil</i> |
- 22 Détournement d'électrons du PS-I (découplants)**
- | | |
|-------------|------------------------------------|
| Pyridiniums | <i>Cyperquat, diquat, paraquat</i> |
|-------------|------------------------------------|
- 27 Inhibition de la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase**
- | | |
|------------|---|
| Tricétones | <i>Mésotrione, sulcotrione, tembotrione, fenquino-trione, benzobicyclon (procide)</i> |
| Pyrazoles | <i>Benzofenap, pyrasulfotole, topramezone, pyrazoxyfen</i> |
| Isoxazoles | <i>Isoxaflutole</i> |
- 32 Inhibition de la solanesyl diphosphate synthase**
- | | |
|---|------------------|
| - | <i>Aclonifen</i> |
|---|------------------|
- 33 Inhibition de l'homogentisate-solanesyltransférase**
- | | |
|--------------------|------------------------|
| Phenoxy-pyridazine | <i>Cyclopyrimorate</i> |
|--------------------|------------------------|
- 34 Inhibition de la lycopène cyclase**
- | | |
|----------|-----------------|
| Triazole | <i>Amitrole</i> |
|----------|-----------------|

Ciblage du métabolisme cellulaire

- 1 Inhibition de l'acétylCoA carboxylase (synthèse des lipides)**
 Cyclohexanediones (DIMs) *Alloxydim, cycloxydim, sethoxydim*
 Aryloxyphenoxy-propionates (FOPs) *Diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fluazifop-butyl*
 Phénylpyrazoline *Pinoxaden*
- 2 Inhibition de l'acétolactase synthase**
 Pyrimidinyl benzoates *Pyrifthalid, pyriminobac-methyl*
 Sulfonanilides *Pyrimisulfan, triafamone*
 Triazolopyrimidine (Type 1) *Cloransulam-methyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam,*
 Triazolopyrimidine – (Type 2) *Penoxsulam, pyroxsulam*
 Sulfonyleureas *Amidosulfuron, azimsulfuron, chlorsulfuron, sulfometuron-methyl*
 Imidazolinones *Imazamethabenz-methyl, imazethapyr*
 Triazolinones *Propoxycarbazone-Na, thiencarbazone-methyl*
- 9 Inhibition de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase**
 - *Glyphosate*
- 15 Inhibition de la synthèse des très longues chaînes d'acides gras**
 Azolyl-carboxamides *Cafenstrole, fentrazamide, ipfencarbazone*
 α-Thioacétamides *Anilofos, piperophos*
 Isoxazolines *Pyroxasulfone, fenoxasulfone*
 Oxiranes *Indanofan, tridiphane*
 α-Chloroacétamides *Acétochlore,alachlore, allidochlore (CDAA), métazachlore, pethoxamide*
 α-Oxyacétamides *méfénacet, flufénacet*
 Thiocarbamates *Butylate, cycloate, dimépiperate, prosulfocarbe, benthiocarb*
 Benzofuranes *Benfuresate, ethofumesate*
- 18 Inhibition de la dihydroptéroate synthase**
 Carbamate *Asulam*
- 28 Inhibition de la dihydroorotate synthase**
 - *Tetflupyrolimet*
- 29 Inhibition de la synthèse de la cellulose**
 Triazolecarboxamide *Flupoxam*
 Benzamide *Isoxaben*
 Alkylazines *Triaziflam, indaziflam*
 Nitriles *Dichlobénil, chlorthiamid*
- 30 Inhibition de la thioestérase d'acides gras**
 Ether de benzyle *Cinmethylin, methiozolin*
- 31 Inhibition des phosphatases de protéines à sérine/thréonine**
 - *Endothall*

Ciblage de la division cellulaire et de la croissance

3 Inhibition de l'assemblage des microtubules

Dinitroanilines	<i>Benefin (ou benfluraline), butraline, nitriline, prodiamine</i>
Pyridines	<i>Dithiopyr, thiazopyr</i>
Phosphoroamidates	<i>Butamifos, DMPA</i>
Acide benzoïque	<i>Tétrachlorotéréphtalate de diméthyle (DCPA)</i>
Benzamides	<i>Propyzamide (ou pronamide)</i>

4 Action agoniste sur le récepteur hormonal de l'auxine

Autres	<i>Benazolin-ethyl</i>
Benzoates	<i>Dicamba, chloramben, TBA</i>
Phénoxy-carboxylates	<i>2,4,5-T, 2,4-D, 2,4-DB, dichlorprop, MCPA, MCPB</i>
Phényl-carboxylates	<i>Chlorfenac, chlorfenprop</i>
Pyridine-carboxylates	<i>Aminopyralide, clopyralide, florypyrauxifen, halauxifen, piclorame</i>
Pyridyloxy-carboxylates	<i>Triclopyr, fluroxypyr</i>
Pyrimidine-carboxylates	<i>Aminocyclopyrachlor</i>
Quinoline-carboxylates	<i>Quinclorac, quinmerac</i>

19 Inhibiteur du transport des auxines

Aryl-carboxylates	<i>Naptalam, Diflufenzopyr</i>
-------------------	--------------------------------

23 Inhibition de l'organisation des microtubules

Carbamates	<i>Barban, carbétamide, chlorbufam, chlorpropham</i>
------------	--

24 Découplants

Dinitrophénols	<i>Dinosam, dinoseb, DNOC, dinoterb</i>
----------------	---

Mode d'action encore inconnu

-	-	<i>Cumyluron, difenzoquat, napropamide, tebutam, dalapon, perfluidone</i>
---	---	---

Abréviations. Ac. : acides, PS : PhotoSystème.

1.3. Mode de fonctionnement des herbicides

Dans ce manuscrit, les différents modes d'action des herbicides seront décrits, en se basant non plus sur le classement des herbicides par l'HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) mais sur les différentes fonctions biologiques propres aux organismes végétaux affectés. En effet, certaines classes d'herbicides inhibant la même fonction peuvent être classées dans différentes catégories par l'HRAC : les classes 2, 9 et 10 toutes trois impliquées dans la perturbation de la biosynthèse des acides aminés sont par exemple classées dans deux catégories différentes.

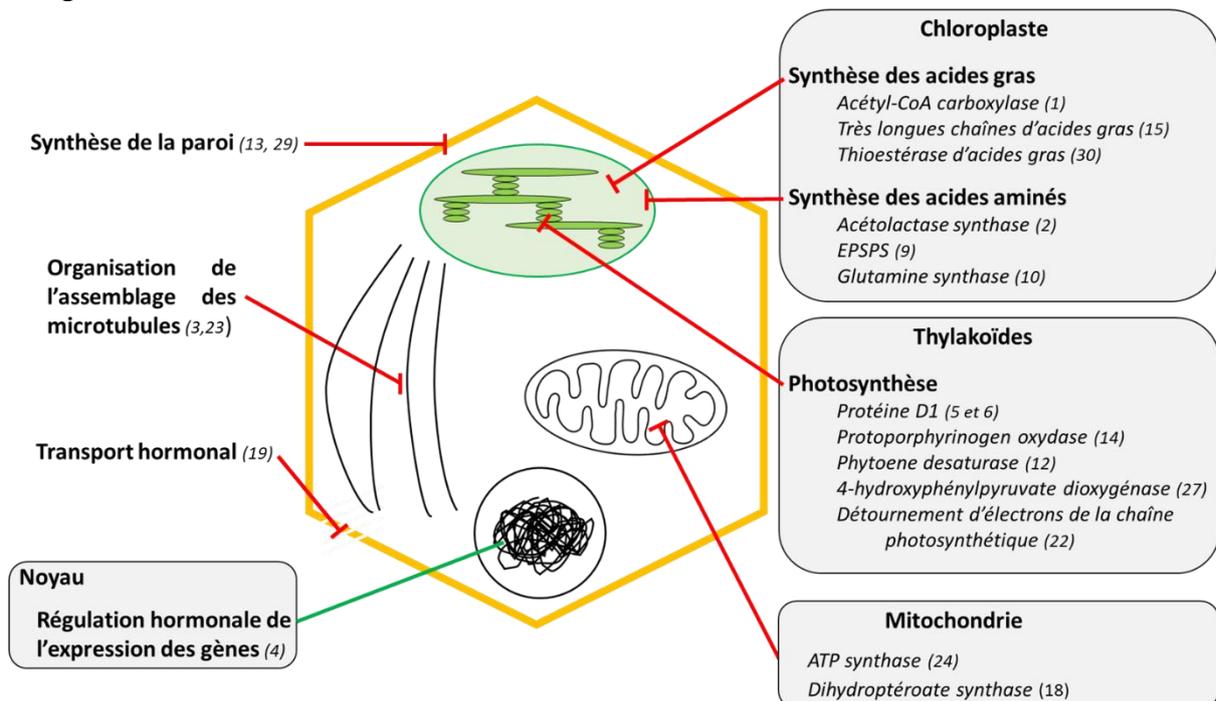


Figure 1 - Fonctions biologiques des végétaux ciblées par les herbicides. Les perturbations par inhibition sont indiquées en rouge et les perturbations par activation en vert. Les parenthèses contiennent le numéro de classification HRAC des composés chimiques concernés. Adapté de Délye et al. 2013.

La Figure 1 représente une vue schématique de la cellule végétale. La présence d'une paroi cellulosique (composée de cellulose) et de chloroplastes (sièges de la biosynthèse des acides aminés et des acides gras *de novo*) contenant les thylakoïdes (siège de la photosynthèse) sont deux caractéristiques majeures de la cellule végétale. Comme les cellules animales, elles sont aussi dotées d'un noyau, de mitochondries, de transporteurs hormonaux (seul le cas de l'auxine sera décrit ici, car ciblé par des molécules herbicides) et de structures de microtubules dynamiques impliqués dans la division cellulaire mais aussi dans la morphologie de la cellule. A chaque élément sont associées les classes d'herbicides, regroupées par organites puis par cible moléculaire. Il est à ce stade intéressant de noter que si la très grande majorité des

composés à action herbicide agissent par inhibition d'une fonction biologique, la classe HRAC 4 agit comme activateur.

On peut alors remarquer la diversité des mécanismes ciblés par les herbicides, justifiant parfois l'utilisation d'un mélange d'herbicides afin d'améliorer l'efficacité de la formulation commerciale et limiter l'apparition naturelle de phénomènes de résistances.

1.3.1. Photosynthèse

1.3.1.1. Brève description de la photosynthèse

La photosynthèse est une fonction biologique unique des cyanobactéries, des plantes terrestres et des algues. Ces deux dernières espèces possèdent des chloroplastes dont un schéma est présenté en Figure 2. Les chloroplastes sont des organites intracellulaires entourés d'une enveloppe lipidique contenant le stroma provenant de l'endosymbiose d'une cyanobactérie au cours de l'évolution. Ils contiennent en particulier les thylakoïdes qui sont des sous-compartiments entourés par la membrane thylakoïde qui délimite le lumen. Ces thylakoïdes se retrouvent empilés dans le chloroplaste sous forme de *granum*, un thylakoïde de taille plus importante (lamelle) permettant de relier plusieurs *grana*.

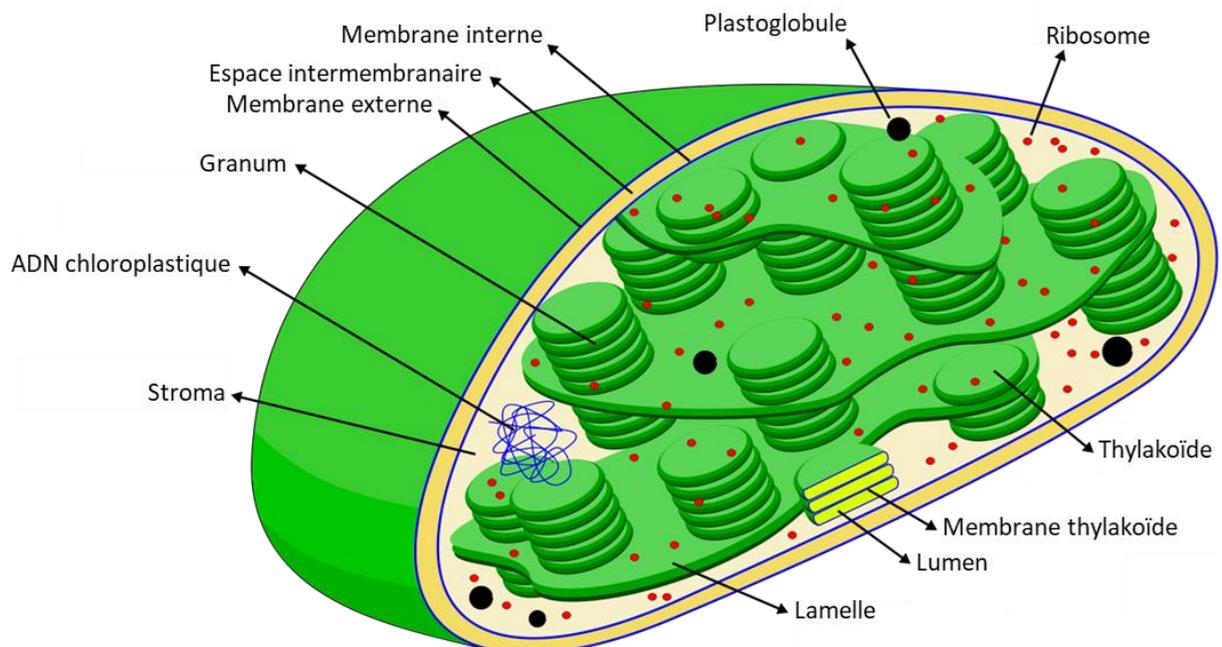


Figure 2 - Schéma d'un chloroplaste faisant apparaître les principales structures caractéristiques (adapté de Wikipedia (https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Scheme_Chloroplast-en.svg))

Pour simplifier la suite de la lecture du chapitre, un schéma de la coupe transversale d'un chloroplaste est proposé en Figure 3, permettant de replacer les différents types de compartiments et de bien distinguer le *stroma* du *lumen*.

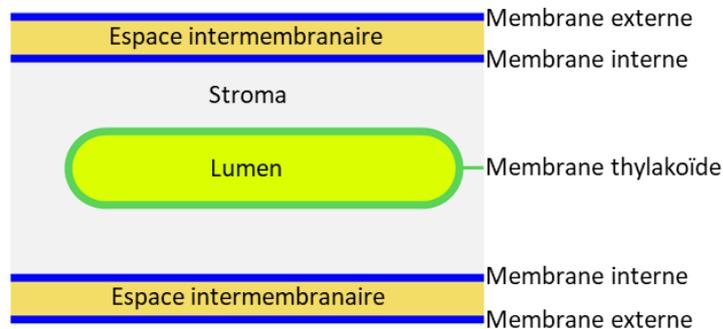


Figure 3 - Schéma de la coupe transversale d'un chloroplaste. Le chloroplaste est entouré par l'enveloppe chloroplastique, composée par une membrane externe et une membrane interne qui sont séparées par l'espace intermembranaire. L'intérieur du chloroplaste est appelé stroma. Le lumen quant à lui, contenu par les thylakoïdes, est isolé du stroma par la membrane thylakoïde.

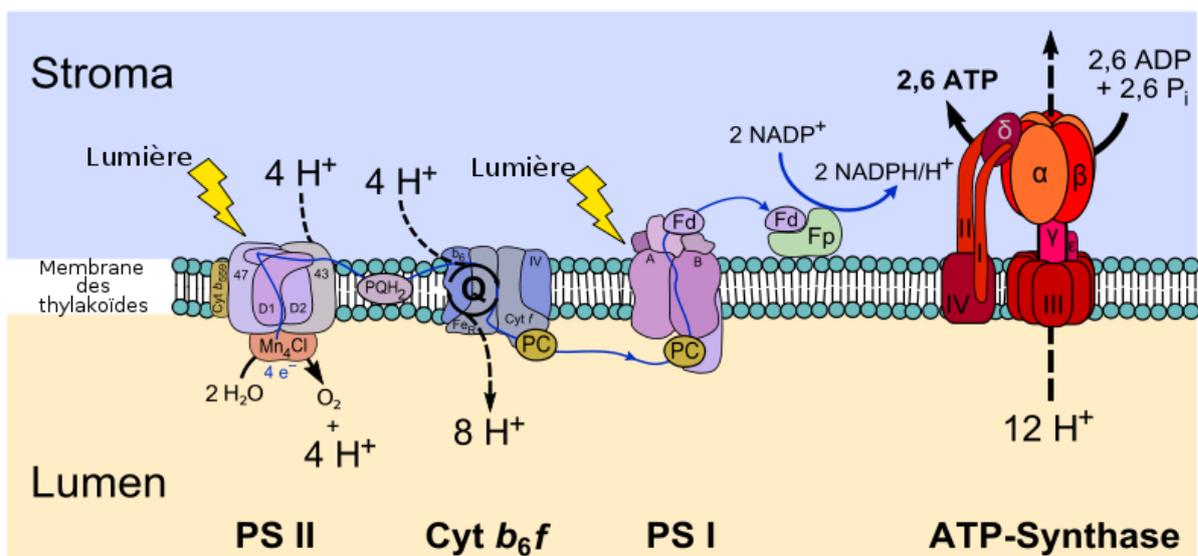


Figure 4 – Schéma de la chaîne du transfert des électrons dans les membranes des thylakoïdes lors de la photosynthèse claire (https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Thylakoid_membrane-fr.svg)

La photosynthèse est composée de deux phases :

- Une phase dite « **sombre** », ou enzymatique, qui se déroule dans le stroma indépendamment de la présence de lumière où l'énergie sous forme chimique permet la synthèse de glucides, d'acides aminés et d'acides gras à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. C'est le cycle de Calvin-Benson (dit cycle de Calvin).

- Une phase dite « **claire** », ou photochimique, qui se déroule dans les thylakoïdes en présence de lumière, où l'énergie photonique est convertie par la plante en énergie chimique (ATP, NADPH) (Figure 4).

La machinerie permettant la conversion de l'énergie photonique en énergie chimique est composée de complexes protéiques transmembranaires (et de molécules associées) insérés dans la membrane des thylakoïdes. Elle est composée en particulier du système photosynthétique II (PSII) séparé en deux parties : le centre actif de réaction photochimique (transmembranaire et côté stroma) et le complexe tétranucléaire de manganèse (appelé complexe d'oxydation de l'eau, Mn_4O_5Ca) situé côté lumen (noté *Mn₄Cl(uster)* sur la Figure 4).

Le centre actif de réaction photochimique est constitué de deux protéines homologues (D1 et D2) possédant chacune 5 hélices α membranaires (Figure 5). Ces deux protéines sont étroitement associées à des cofacteurs impliqués dans le transfert d'électrons : P680 (un cluster de molécules de chlorophylle *a*), deux phéophytines, deux plastoquinones (Q_B et Q_A

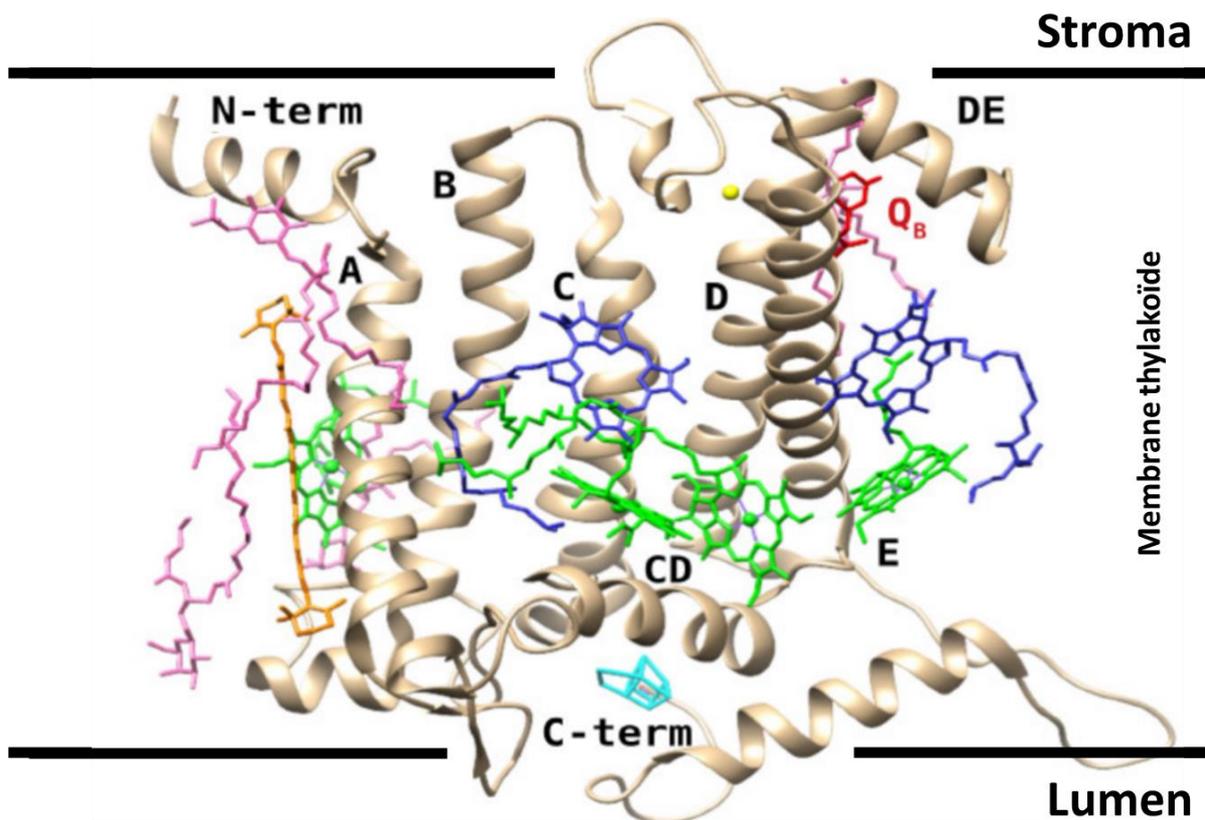


Figure 5 – Représentation de la protéine D1 du photosystème II, recontextualisé dans la membrane thylakoïde séparant le stroma et le lumen (les limites de la membrane thylakoïde sont placées à but informatif). Le complexe d'oxydation de l'eau est représenté en cyan, la plastoquinone Q_B en rouge, l'ion fer en jaune, la chlorophylle en vert, les molécules de phéophytines en bleu marine, un bêta-carotène en orange et les lipides en rose. Adapté de (Battaglino et al., 2021).

interagissant respectivement avec D1 et D2) et des β -carotènes (permettant la protection de la chlorophylle contre la suroxydation par les photons) (Battaglino et al., 2021; Husu et al., 2013) (Figure 5).

En présence de lumière, l'énergie photonique est captée par les molécules de chlorophylle qui composent P680, qui devient excité et réduit la phéophytine (Phéo) pour former le couple $P680^+Pheo^-$. P680 oxyde ensuite le complexe Mn_4O_5Ca par l'intermédiaire de la Tyr161 de D1. 4 réactions successives d'oxydation au niveau du complexe d'oxydation de l'oxygène vont, à partir de deux molécules d'eau, produire deux molécules de dioxygène, quatre protons qui migrent dans le lumen (pour former le gradient de proton dans le lumen faisant fonctionner l'ATP synthase) et quatre électrons. De son côté, la $Phéo^-$ réduit la plastoquinone Q_A (D2), permettant le transfert électron par électron du complexe d'oxydation de l'oxygène à la plastoquinone Q_B (D1) qui subit alors deux réductions successives afin de former la plastoquinone réduite ($PQ^{2-}, 2H^+$) qui est libéré du PSII (sous forme de PQH_2), permettant le transfert des électrons dans le reste de la chaîne photosynthétique (en direction du complexe cytochrome b_6f). (Battaglino et al., 2021; Buonasera et al., 2010; Husu et al., 2013).

Lorsque PQH_2 arrive au niveau du complexe cytochrome b_6f , les électrons sont transférés au cytochrome et les protons sont transférés dans le lumen (augmentant la différence de concentration de protons dans le lumen) afin de régénérer PQ. Les électrons sont alors pris en charge (un par un) par la plastocyanine qui permet leur transport, dans le lumen, jusqu'au photosystème I. Brièvement, l'énergie lumineuse est de nouveau captée par P700. Les électrons gagnent alors en énergie et poursuivent leur transfert jusqu'à être pris en charge par la ferrédoxine. Cette dernière transite dans le stroma jusqu'à la ferrédoxine-NADP⁺ réductase, catalysant la réduction du NADP⁺ (qui est l'accepteur final des électrons) pour former du NADPH, H^+ (Figure 4).

Ce transfert électronique s'accompagne de la formation d'un gradient de proton de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes, entre le lumen et le stroma. Ce gradient de proton permet la diffusion des protons passivement au travers de l'ATP synthase, un complexe protéique transmembranaire, qui permet de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP.

1.3.1.2. Inhibition du transport électronique d'origine photosynthétique

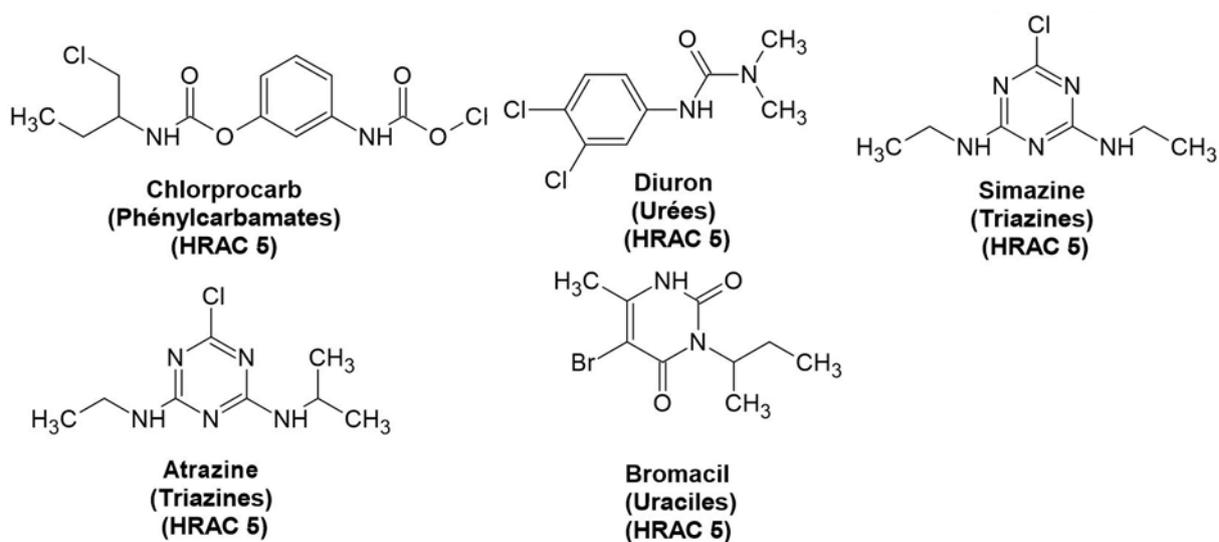


Figure 6 - Structures chimiques des herbicides du groupe HRAC 5 les plus utilisés

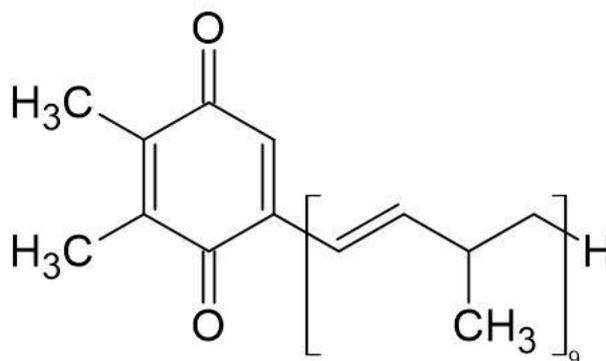
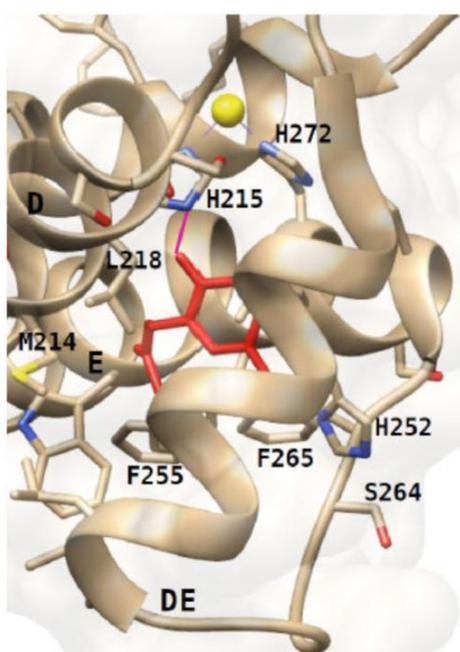


Figure 7 – A gauche : Modèle structural obtenu par cristallographie aux rayons X du site de liaison de Q_B (en rouge) dans la protéine D1 (en gris). Les résidus H215 (faisant une liaison hydrogène avec Q_B , en rose) et Ser264, sont situés très près du site d'interaction. (Battaglino et al., 2021). A droite : structure chimique d'une plastoquinone (plastoquinone-9).

Les herbicides des groupes HRAC 5 et 6 (Figure 6) sont des inhibiteurs compétitifs de l'interaction entre Q_B et la protéine D1. En se fixant à la place de la plastoquinone, ils provoquent un arrêt du transfert d'électron (Husu, 20 et 21) au niveau de Q_B . Ser264 et His215 sont deux résidus d'acides aminés particulièrement importants dans l'inhibition de la photosynthèse par des herbicides. His215 est impliqué dans l'interaction avec le Fer non

héminique (avec His272). Ce résidu, tout comme Ser264, stabilise la tête cétonique de la plastoquinone par liaison hydrogène (Figure 7). Ces deux résidus sont particulièrement conservés chez les organismes photosynthétiques (Battaglino et al., 2021)

1.3.1.3. Inhibition de la synthèse de la chlorophylle

La chlorophylle et les hèmes sont synthétisés, chez les organismes photosynthétiques, par la voie métabolique du tétrapyrrole. Il semble être communément admis que cette voie métabolique se déroule dans le chloroplaste mais il semblerait que les deux dernières étapes de la synthèse des hèmes (catalysées par la protoporphyrinogène oxydase et la ferrochélatase) se déroulent en parallèle dans le chloroplaste et la mitochondrie (Jacobs et al., 1991; Smith et al., 1993).

La protoporphyrinogène oxydase (EC. 1.3.3.4), en particulier, est la dernière enzyme de la voie de synthèse des tétrapyrroles, se séparant pour former la chlorophylle sous l'action d'une Mgchélatase, ou des hèmes ou des phytochromes (phytochromobiline, phytocobiline) sous l'action d'une ferrochélatase. L'inhibition de la protoporphyrinogène oxydase conduit à la destruction par peroxydation des membranes cellulaires et au blanchissement des tissus (Böger et al., 2002; Chatterjee and Kundu, 2015).

Cette enzyme catalyse l'oxydation du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX au niveau des membranes des thylakoïdes. Les herbicides de la classe HRAC 14 agissent comme inhibiteur de la fixation du protoporphyrinogène du fait de leurs structures bicycliques. L'accumulation du protoporphyrinogène dans les thylakoïdes conduit à sa fuite dans le cytoplasme où il est oxydé de manière non spécifique, conduisant à une accumulation de protoporphyrine. Cette molécule est relativement instable et peut être oxydée spontanément ou en présence de lumière, générant alors des espèces réactives de l'oxygène, conduisant à la peroxydation des lipides et la destruction de la membrane (Böger et al., 2002; Tripathy and Pattanayak, 2012).

1.3.1.4. Inhibition de la synthèse des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des composants essentiels de la chaîne photosynthétique. Ils jouent un rôle dans le transfert des électrons dans le PSII et ont surtout une fonction de protection des photosystèmes contre l'oxydation de la chlorophylle photoexcitée en présence d'un stress lumineux très important (Böger et al., 2002).

Deux désaturases sont impliquées dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Elles permettent l'oxydation (introduction de doubles liaisons carbone-carbone) enzymatique du phytoène en β -carotène (la phytoène désaturase, PDS) puis en lycopène (β -carotène désaturase)(Böger, 1996).

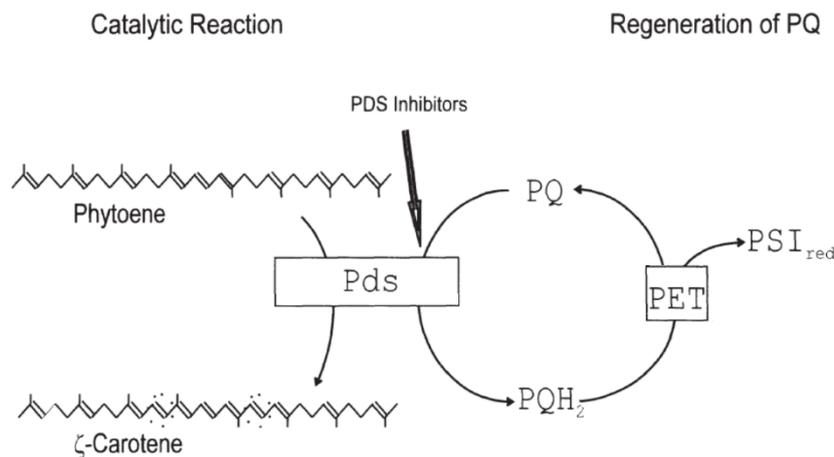


Figure 8 – Réaction enzymatique catalysée par la phytoène désaturase dans la voie de synthèse des caroténoïdes. Adaptée de Böger et al., 2002. PDS : Phytoen desaturase, PQ : plastoquinone (forme réduite), PET : Photosynthetic electron transport, PSI : Photosystem I

La **phytoène désaturase** en particulier est un homotétramère ancré dans la membrane lipidique des chloroplastes. Elle présente un canal hydrophobe avec lequel le phytoène peut interagir du fait de sa longue chaîne carbonée. Une fois le phytoène fixé, une décyplastoquinone peut interagir avec l'enzyme de manière séquentielle, nécessitant que la protéine soit au moins sous forme d'un homodimère. La PDS est une flavoprotéine : l'activité de l'enzyme implique la réduction du FAD en FADH₂, ensuite réoxydé par la décyplastoquinone qui se fixe elle aussi dans le canal hydrophobe précédemment mentionné. Cette PQ est ensuite régénérée *via* le transport d'électrons de la chaîne photosynthétique (Figure 8). Les herbicides agissant comme inhibiteur de la PDS (**classe HRAC 12**) se fixent au niveau du site de fixation de la PQ, bloquant la régénération du FAD et stoppant l'activité enzymatique. La plante meurt alors par manque de protection contre la lumière (Böger, 1996; Böger et al., 2002; Brausemann et al., 2017).

Il est aussi possible de bloquer la synthèse de la plastoquinone en inhibant la **4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase**. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation de la tyrosine. Elle catalyse la conversion du 4-hydroxyphénylpyruvate en 2,5-dihydroxyphénylacétate (acide homogentisique) par décarboxylation, hydroxylation aromatique et migration d'un substituant en un seul cycle catalytique. L'acide homogentisique

est le précurseur des plastoquinones (co-facteur de la synthèse des caroténoïdes comme vu précédemment) et de tocophérols, ces derniers étant des dérivés de la vitamine E qui est elle-même impliquée dans la régulation du stress oxydant dans la plante (Figure 9) (Moran, 2005).

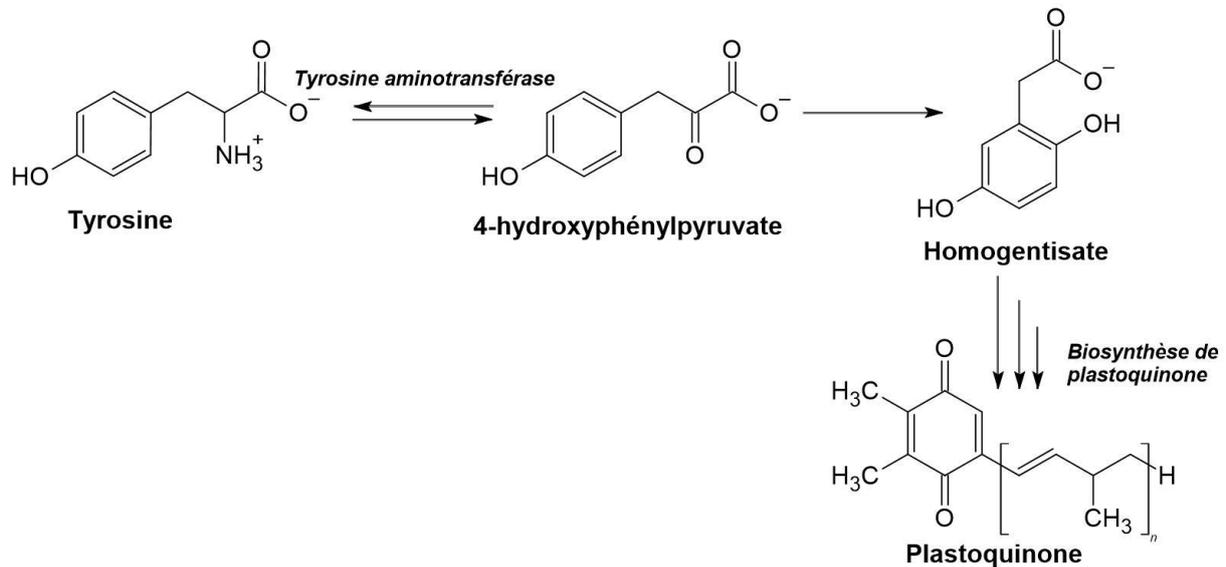


Figure 9 - La 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase catalyse la conversion du 4-hydroxyphénylpyruvate en acide homogentisique qui est un précurseur de la synthèse des plastoquinones. D'après (Moran, 2005).

L'inhibition de cette enzyme par analogie structurale des composés herbicides (de classe HRAC 27) avec le substrat naturel de l'enzyme (Figure 9), conduit donc à la non-régénération des caroténoïdes par absence de plastoquinone, d'où la génération d'un stress oxydatif qui ne peut par ailleurs plus être régulée par les tocophérols. De plus, il semblerait que la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase soit aussi impliquée dans la synthèse de la plastoquinone de la chaîne photosynthétique, liant le PSII au complexe cytochrome, d'où un arrêt du transfert électronique en cas d'inhibition (Böger et al., 2002; Moran, 2005; Van Almsick, 2009).

1.3.1.5. Inhibition du transfert électronique lors de la photosynthèse

Comme évoqué précédemment (Figure 4), un transfert d'électrons s'opère tout au long de la chaîne photosynthétique, sortant en particulier du PSII au PSI en passant par le complexe cytochrome b_6/f . Les herbicides de la famille du paraquat (classe HRAC 22) sont caractérisés par leur capacité à interférer avec le transfert électronique de la chaîne photosynthétique, détournant les électrons pour former des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde qui conduit à la synthèse de peroxyde d'hydrogène ou de radicaux hydroxyles) (Figure 10), provoquant un fort stress oxydatif qui détruit les membranes lipidiques des organites et provoque la mort du végétal exposé (Bonneh-Barkay et al., 2005; Fujii et al., 1990; Suntres, 2002).

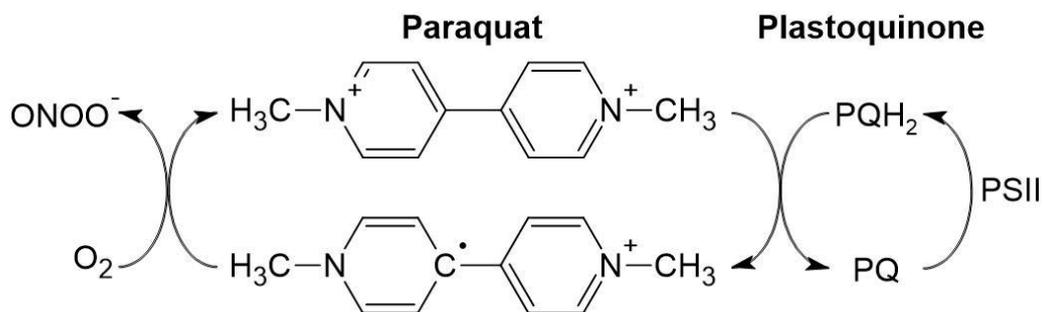


Figure 10 - Le paraquat interfère avec les électrons issus de la photosynthèse, conduisant à la formation de composés réactifs de l'oxygène. PQ : plastoquinone réduite. PQH₂ : plastoquinone oxydée. Adapté de (Blanco-Ayala et al., 2014).

1.3.2. Inhibition de la biosynthèse des acides aminés

1.3.2.1. Inhibition de la glutamine synthétase

La glutamine synthétase (ou glutamate ammonium ligase) (E.C. 6.3.1.2) est une protéine de 8 sous-unités existant sous plusieurs isoformes, dépendant de sa localisation (cytosolique, chloroplastique, racinaire ou nodulaire). Globalement, cette enzyme est localisée à proximité des lieux de production d'ammoniaque (principalement les chloroplastes et les nodules) afin d'utiliser au mieux cette ressource azotée. Elle catalyse la conversion du glutamate et de l'ammoniaque en glutamine à l'aide d'ATP-Mg (Figure 11). Cette enzyme est également étroitement liée avec la glutamate synthase qui permet de synthétiser deux molécules de glutamate à partir d'une glutamine et d'une molécule de 2-oxoglutarate (intermédiaire du cycle de Krebs) (Figure 11). La glutamine produite permet par la suite de transporter l'azote dans la cellule et elle est précurseur dans la biosynthèse des protéines, d'autres acides aminés

(donneur d'azote par transamination) ou d'acides nucléiques ou encore dans la biosynthèse de la chlorophylle.

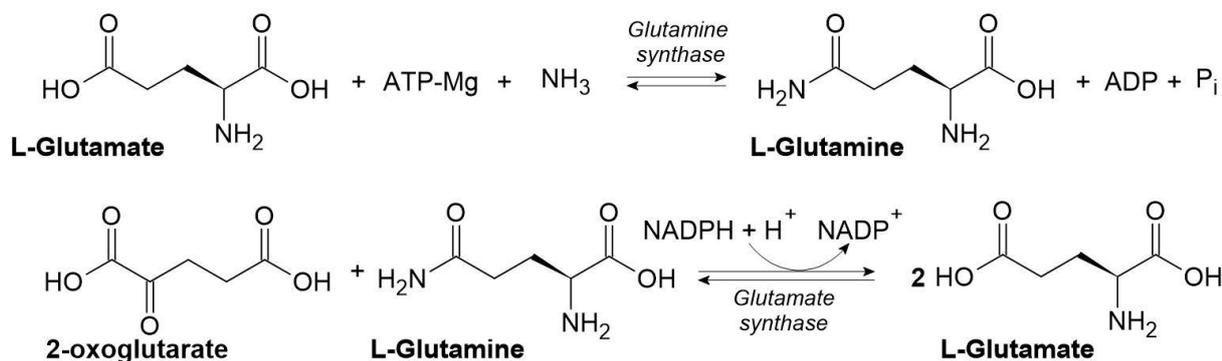


Figure 11 - Réaction chimique de la glutamine synthétase et de la glutamate synthase

L'inhibition de la glutamine synthétase impacte principalement les plantes lors de la phase claire de la photosynthèse. Les molécules à action herbicide de la classe HRAC 10, dont le glufosinate est la molécule la plus connue (Figure 12), sont des analogues structuraux du glutamate. Cette inhibition entraîne une accumulation d'ammoniaque dans la plante, ce qui détruit les cellules et inhibe directement les réactions du photosystème I et du photosystème II. Un taux élevé d'ammoniaque dans les plantes réduit les gradients de pH de part et d'autre de la membrane thylakoïde, impactant donc la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase. Plus récemment, l'attribution des effets toxiques du glufosinate à l'accumulation d'ammoniaque a été remise en cause. La carence en glutamate et glutamine serait en fait à l'origine d'une accumulation de métabolites de la photorespiration comme le glyoxylate, le phosphoglycolate et le glycolate. L'accumulation de glycolate en particulier inhibe la Rubisco activase (Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase), protéine chaperonne d'une enzyme clef du cycle de Calvin-Benson (Rubisco). Son inhibition conduit à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, la peroxydation des membranes lipidiques et la mort de la plante (Böger et al., 2002; Brunharo et al., 2019; Takano et al., 2019; Vallejo et al., 2017).

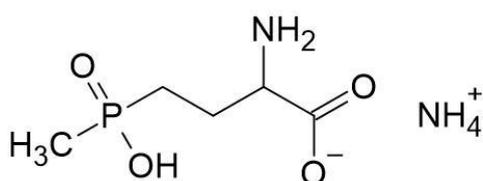


Figure 12 - Structure du glufosinate (sel d'ammonium) représentant de la classe HRAC 10 inhibant la glutamine synthétase (CAS 77182-82-2).

1.3.2.2. Inhibition de la synthèse des acides aminés aromatiques : EPSPS

Un seul herbicide est impliqué dans l'inhibition de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques : le glyphosate. Le glyphosate étant le cas d'étude de cette thèse, son mode de fonctionnement sera détaillé par la suite (cf. 2.2).

1.3.2.3. Inhibition de l'acétolactate synthase (classe 2)

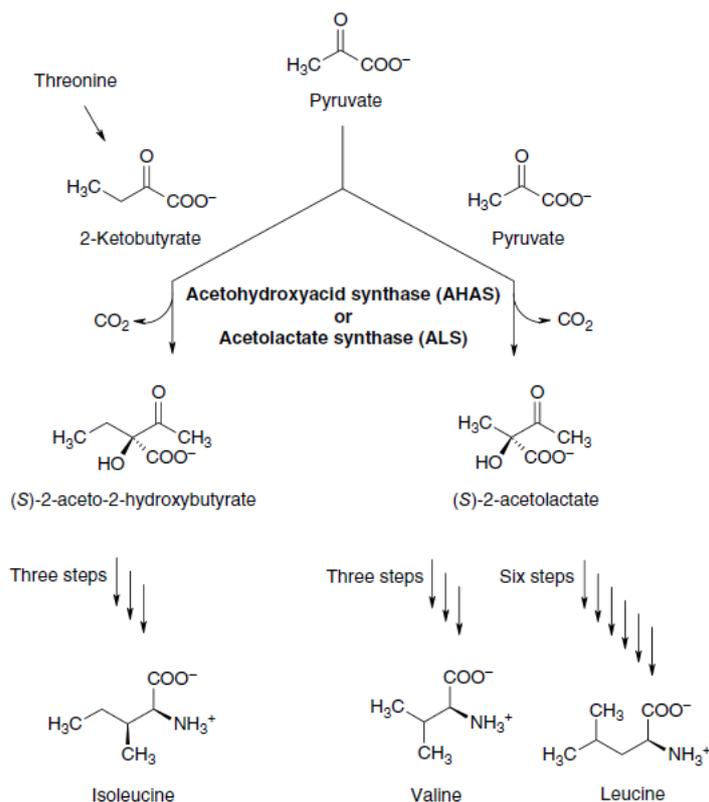


Figure 13 - Voie de biosynthèse des acides aminés ramifiés chez la plante (isoleucine, leucine et valine) (Gutteridge and Thompson, 2019)

L'acétohydroxyacid synthase (AHAS), ou acéto-2-hydroxyisovalérate synthase (EC 2.2.1.6), est la première enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (valine, leucine, isoleucine) chez les algues, bactéries, champignons et plantes. Elle catalyse la condensation d'une molécule de pyruvate et d'une molécule de 2-cétobutyrate (synthétisée à partir d'une molécule de thréonine) pour former du (S)-2-acéto-2-hydroxybutyrate (précurseur de l'isoleucine) ou la condensation d'une molécule de deux molécules de pyruvate pour former du (S)-2-acéto-2-hydroxyisovalérate (précurseur de la valine et de la leucine), libérant dans les deux cas une molécule de dioxyde de carbone (Figure 13). Chez les plantes, l'AHAS est une protéine homodimérique localisée dans le chloroplaste, chaque sous-unité étant composée de trois domaines (α , β et γ) et de trois cofacteurs : thiamine pyrophosphate, FAD non catalytique et un ion bivalent

(Mg²⁺). Le site actif se trouve à l'interface des deux monomères, à l'interface du domaine α de l'une des sous-unités et du domaine γ de l'autre. C'est le domaine γ qui est impliqué dans l'interaction avec la thiamine pyrophosphate grâce en partie à son groupe pyrophosphate qui interagit avec l'ion magnésium, lui-même coordonné avec plusieurs résidus (Schloss, 1994). Le FAD quant à lui se lie avec le domaine β . La nature de l'ion bivalent semblant ne pas avoir d'importance, l'ion bivalent ne semble pas être impliqué fortement dans la catalyse (Schloss, 1994). De même, se trouvant à grande distance de la thiamine pyrophosphate, le FAD ne semble pas prendre part directement à la réaction catalysée.

En 2019, une cinquantaine de composés parmi plusieurs familles chimiques sont décrits comme inhibiteurs de l'AHAS. De manière générale, il semble admis que les noyaux aromatiques des molécules herbicides interagissent au niveau du canal d'accès au centre catalytique, bouchant l'accès à ce dernier (Garcia et al., 2017; Gutteridge and Thompson, 2019).

1.3.3. Inhibition de la biosynthèse des acides gras

Les végétaux sont capables de transporter des sucres et des acides aminés sur des grandes distances à travers la plante grâce à la sève. Cependant, ce n'est pas le cas pour les acides gras dans les cellules composant les feuilles (mésophylles) : ils doivent alors être synthétisés dans chaque cellule.

La synthèse *de novo* des acides gras, à partir du précurseur malonyl-COA, prend place dans les plastes : ils franchissent ensuite l'enveloppe plasmique. Selon les besoins de plantes, ils peuvent être modifiés dans le cytoplasme, ou dans le plaste (Figure 14).

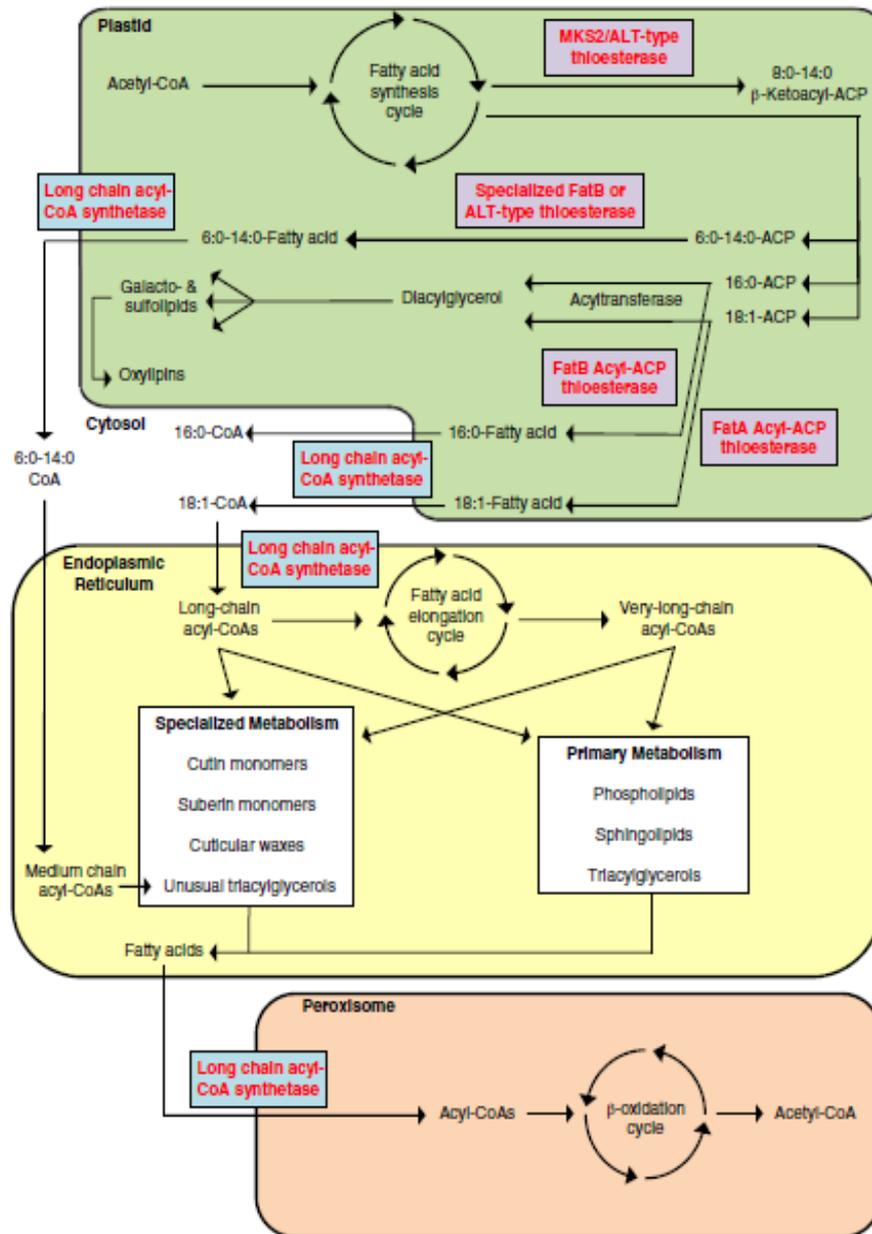


Figure 14 - Représentation du métabolisme des acides gras chez la plante (Kalinger et al., 2020). La biosynthèse de novo des acides gras se déroule dans les chloroplastes avant d'être gardés sur place par transfert sur une molécule de glycérol ou exportés dans le cytosol pour entrer dans d'autres voies métaboliques comme la synthèse des acides gras à longues chaînes.

1.3.3.1. Inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase

Le malonyl-CoA ne peut pas franchir l'enveloppe plasmique et doit être synthétisé à la fois dans le cytoplasme et le chloroplaste. Dans le chloroplaste, il est utilisé principalement dans la synthèse des acides gras mais dans le cytoplasme, il est précurseur de plusieurs voies métaboliques : l'élongation des acides gras, la biosynthèse des flavonoïdes (dont les anthocyanes) et phytoalexines, la malonylation d'acides aminés de la série D et de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (régulation de la production d'éthylène).

L'acétyl-CoA-carboxylase (EC. 6.4.1.2) est une enzyme chloroplastique et cytoplasmique biotinylée. Une molécule de dioxyde de carbone (sous forme carbonate, HCO_3^-) se fixe sur la biotine de la protéine grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Cette molécule de dioxyde de carbone est ensuite condensée sur de l'acétyl-CoA afin de former du malonyl-CoA.

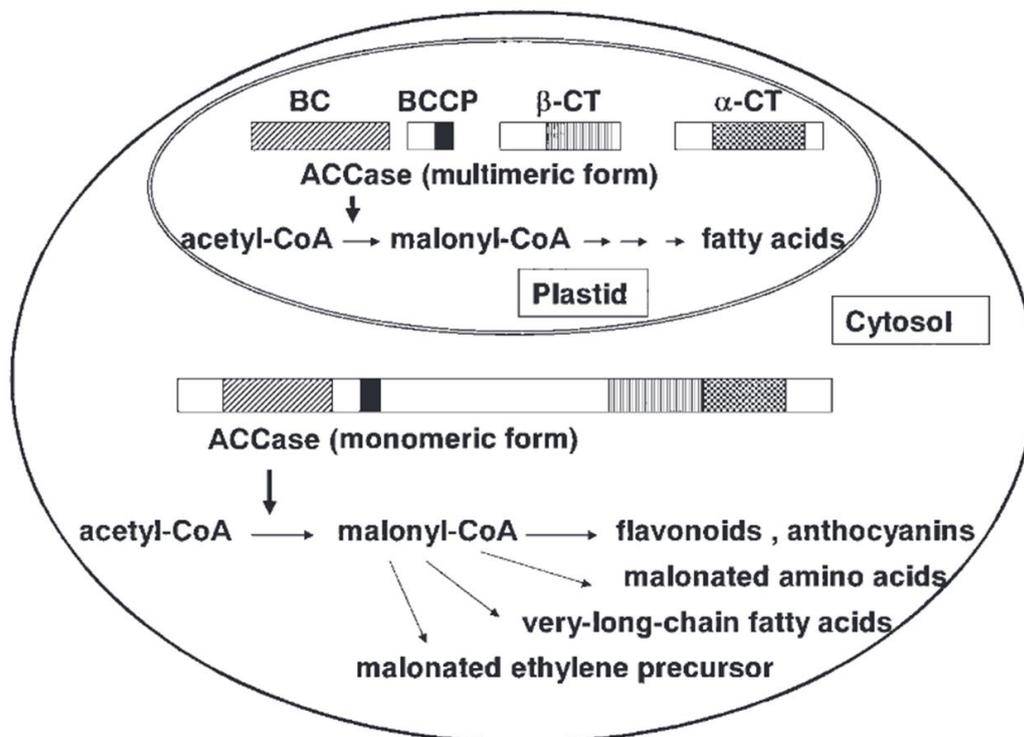


Figure 15 - L'Acétyl-CoA carboxylase est présente chez la plupart des plantes sous deux formes : une forme hétérotétramérique dans le chloroplaste et une forme monomérique dans le cytoplasme. Adapté de Sasaki and Nagano, 2004.

L'acétyl-CoA-carboxylase est une enzyme hétérotétramérique : elle est composée de quatre sous-unités dont la synthèse est coordonnée : la *biotin carboxyl carrier*, la biotine carboxylase, et les sous-unités α et β de la carboxyltransférase. La stœchiométrie des sous-unités varie selon l'organisme. Chez les plantes, cette forme tétramérique est retrouvée dans le plaste mais une forme monomérique composée d'un polypeptide multifonctionnel est observée dans le cytoplasme (Figure 15), impliquée dans d'autres processus métaboliques. Il est à noter que seule cette forme de polypeptide multifonctionnel ou monomérique, existe chez la majorité des eucaryotes, dont l'humain.

Cette forme monomérique est insensible aux herbicides. Toutefois, la forme hétéromérique étant essentielle aux premières étapes de synthèse des acides gras est sensible

à ces herbicides, rendant la plante globalement sensible. La forme monomérique est par ailleurs la seule forme retrouvée pour la famille des graminées (comme le riz ou le blé), où elle est dupliquée dans les gènes, l'une des deux versions contenant une séquence de translocation vers le plaste. Une hypothèse avancée pour la disparition de la forme hétéromérique serait l'acquisition accidentelle du peptide signal de translocation, causant, au fil du temps, une diminution de l'utilisation de cette forme hétéromérique, probablement plus coûteuse en énergie. (Böger et al., 2002; Sasaki and Nagano, 2004)

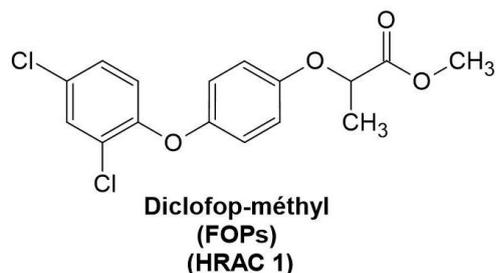


Figure 16 - Structure chimique du diclofop-méthyl, un herbicide du groupe HRAC 1 inhibant l'acétyl-CoA-carboxylase. FOPs : Aryloxyphénoxypropanoates.

Trois familles de molécules sont actuellement connues pour inhiber l'acétyl-CoA-carboxylase : les cyclohexanediones, les énantiomères *R* des aryloxyphénoxypropanoates (Figure 16) et les phénylpyrazolines (Böger et al., 2002; HRAC, 2022). Les deux premières familles agissent comme inhibiteurs non compétitifs vis-à-vis des substrats de l'enzyme (acétyl-CoA, ATP-Mg, HCO³⁻) et il est suggéré qu'elles interagissent toutes au niveau du même site inhibant l'étape de carboxylation (Böger et al., 2002). Il semble que ces herbicides interagissent effectivement au niveau de l'interface des deux sous-unités α et β carboxyltransférases (Yu et al., 2010; Zhang et al., 2004).

1.3.3.2. Inhibition de la thioestérase d'acides gras

Comme mentionné précédemment, les acides gras chez les plantes sont synthétisés *de novo* dans le chloroplaste, par élongation d'une chaîne acyle liée par une liaison thioester à une *acyl carrier protein* (ACP) jusqu'à ce qu'elle atteigne 16 à 18 carbones. Afin de répartir ces acides gras entre le plaste et le cytoplasme, deux enzymes entrent en jeu. D'un côté, l'acyltransférase permet la transacylation de la chaîne d'acide gras sur un glycerol-3-phosphate, permettant de le retenir dans le plaste. De l'autre côté, la liaison avec l'ACP est hydrolysée par l'ACP-thioestérase, permettant l'adressage de l'acide gras libre dans le cytosol. Autrement formulé, la localisation de l'acide gras dépend de la manière dont il est

dissocié de l'ACP. L'inhibition de l'ACP-thioestérase conduit à la déplétion en acides gras précurseurs dans le cytosol, perturbant les fonctions physiologiques de la plante.

Il existe deux familles d'ACP-thioestérase (FATA et FATB), retrouvées dans la quasi-totalité des végétaux, très proches structuralement : elles sont toutes les deux décrites comme deux structures en « *hotdogs* » (une hélice α hydrophobe entourée de 5 à 7 brins antiparallèles formant des feuilletts β) reliées par une boucle. Les structures *hotdogs* sont connues pour être impliquées dans l'oligomérisation des protéines. Les deux familles se distinguent par leurs activités, FATA semblant être sélective des chaînes de 18 atomes de carbone et FATB des chaînes de 16 atomes de carbone (Kalinger et al., 2020).

Les herbicides de la classe HRAC 30 inhibant l'ACP-thioestérase ciblent les deux familles d'enzymes (FATA et FATB)(classe HRAC 30). Même si des sites d'interactions entre l'herbicide et les enzymes sont mis en évidence expérimentalement par co-cristallisation, la raison de l'inhibition ne semble pas explicite dans la littérature. De même, l'état d'oligomérisation de ces protéines ne semble pas encore totalement défini (Campe et al., 2018; Johnen et al., 2022; Kalinger et al., 2020).

1.3.3.3. Inhibition de la synthèse des acides gras à très longues chaînes

On parle d'acides gras à très longues chaînes pour des acides gras (saturés ou non) à plus de 18 carbones. Ils sont particulièrement retrouvés dans les cires végétales, les grains de pollen ou sur les surfaces des plantes. En particulier, la cire cuticulaire de la surface des plantes assure une fonction de barrière, permettant de protéger la plante contre les maladies, les nuisibles et évitant une perte d'eau trop importante. Les triacylglycérols à longues chaînes servent de stockage de lipides dans les graines. Les sphingolipides et phospholipides à très longues chaînes semblent aussi avoir des fonctions structurelles comme constituants de la membrane cellulaire : ils stabilisent les domaines courbes de la membrane et participent à la construction des radeaux lipidiques. Les sphingolipides à très longues chaînes sont également impliqués dans les réponses environnementales comme la régulation des cellules de garde (couple de cellules formant le pore stomatique) dépendante de l'acide abscissique ou le déclenchement de la mort cellulaire programmée. Enfin, les acides gras à très longues chaînes sont impliqués dans les processus de prolifération des plantes et la régulation phytohormonale.

Très conservée chez les plantes, l'élongation des acides gras à longues chaînes prend place dans le réticulum endoplasmique grâce à un complexe multienzymatique d'acyl-CoA élongases caractérisées par au moins quatre fonctions différentes (Figure 17), permettant l'addition d'un malonyl-CoA (synthétisé par acétyl-CoA carboxylase (cf. 1.3.3.1) sur un acide gras accepteur (de plus de 18 atomes de carbone) via un processus proche de celui de la synthèse d'acides gras de novo dans le chloroplaste (Krähmer et al., 2019)

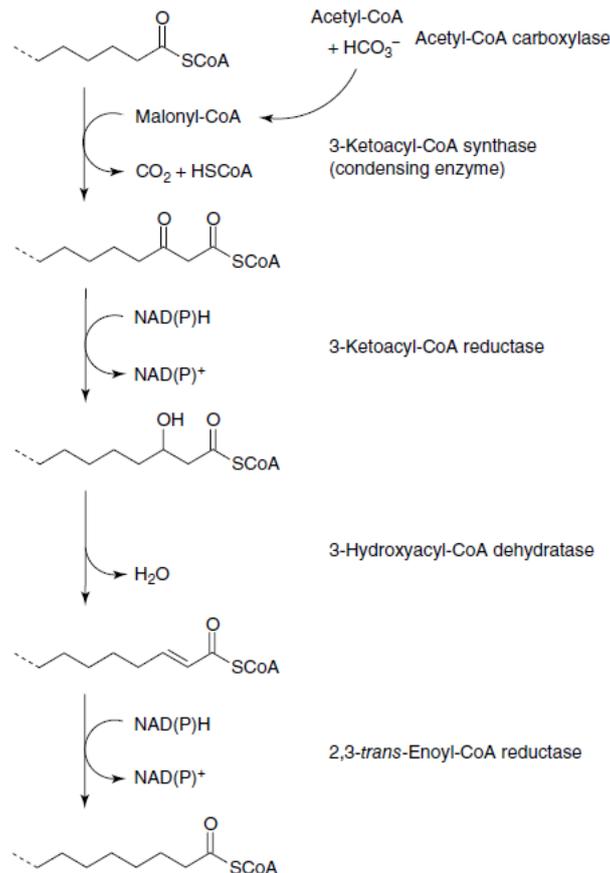


Figure 17 - Schématisation des quatre étapes permettant l'élongation des chaînes d'acides gras dans le réticulum endoplasmique (Krähmer et al., 2019)

Le mécanisme d'inhibition de la biosynthèse des acides gras à très longues chaînes par les herbicides de classe 15 ne semble pas clairement identifié. Il semble toutefois établi que l'étape de condensation du malonyl-CoA est, d'une part l'étape cinétiquement limitante, et d'autre part l'étape inhibée par les herbicides. L'attaque nucléophile des herbicides sur la cystéine de la triade catalytique de l'enzyme est à ce jour le mécanisme proposé.

1.3.4. Inhibition d'autres fonctions biologiques

1.3.4.1. Synthèse de l'ATP – Agent découplant de la chaîne respiratoire

L'ATP synthase est une enzyme ubiquitaire chez tous les êtres vivants : elle est présente dans les bactéries, les cellules animales (mitochondrie), végétales (plaste) et champignons. Brièvement, le fonctionnement des chaînes respiratoire et/ou photosynthétique créent un gradient de protons entre deux compartiments (la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire de la mitochondrie ou le lumen et le stroma des chloroplastes). La différence de concentration en protons (force protonotrice) de chaque côté de la membrane thylakoïde dans laquelle est insérée l'ATP synthase apporte l'énergie nécessaire pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Figure 1).

Un agent découplant de la chaîne de la phosphorylation oxydative est un composé dont la présence permet de déstabiliser ce gradient de protons. Ces molécules, du fait de l'ubiquité de ces complexes protéiques, ont des effets perturbateurs chez les plantes (herbicides) mais aussi chez les insectes (insecticide) et chez les champignons (fongicides). Ces composés, déstabilisant un gradient de proton et non des éléments spécifiques pouvant être propres à une espèce, n'ont ainsi presque pas de spécificité, d'où une forte toxicité pour l'ensemble de la niche écologique, dont l'Homme.

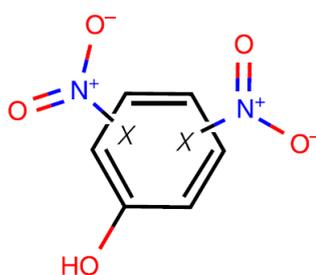


Figure 18 - Structure générale des dinitrophénolates (Earley, 2019)

La famille des dinitrophénolates (Figure 18) est la famille la plus connue pour ses effets découplants (classe HRAC 24). Ils jouent un rôle de transport passif de protons de l'intérieur du plaste vers l'extérieur, à travers la membrane, réduisant le gradient de proton et diminuant l'efficacité de l'ATP synthase. Neutres lors du passage de la membrane, les dinitrophénols relarguent leurs protons dans le stroma et du fait du potentiel de membrane, reviennent vers le stroma une fois chargés négativement (Figure 19) (Earley, 2019; Janz, 2014).

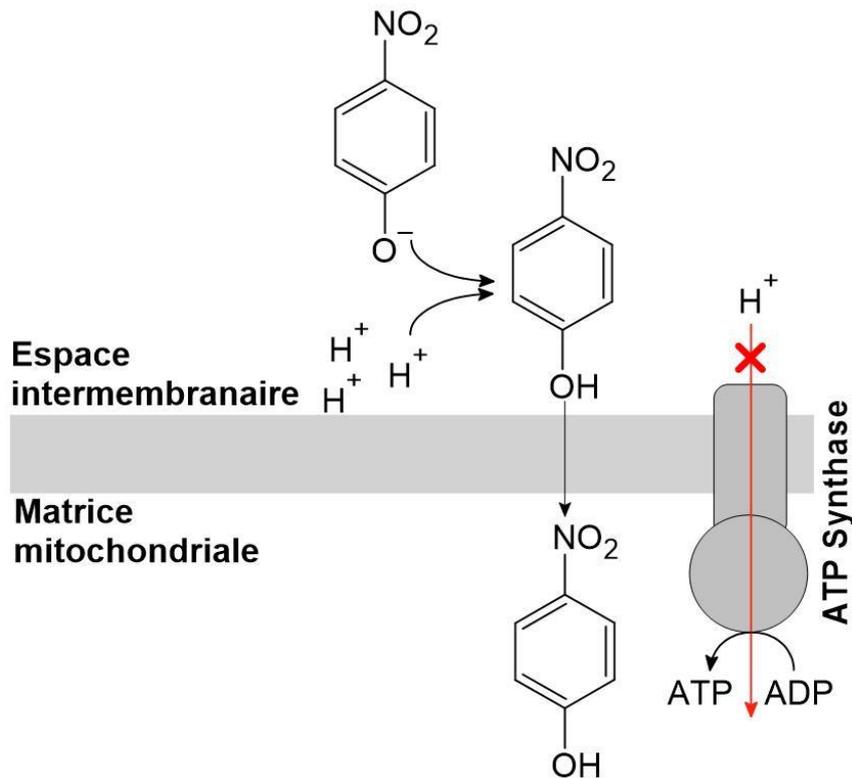


Figure 19 - Mécanisme de transport de protons à travers la membrane plasmique par les dinitrophénols (la forme générique étant utilisée sur la figure), diminuant le gradient de proton nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase. Adapté de (Earley, 2019).

1.3.4.2. Inhibition de la synthèse de la paroi cellulosique

La cellule végétale présente la caractéristique d'être entourée par une paroi cellulaire composée notamment de cellulose. La biosynthèse de la cellulose chez les plantes supérieures est essentielle à la croissance et à la division des cellules ainsi qu'à la formation et à la différenciation des tissus.

La cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales par un complexe protéique (*cellulose synthase complex*) adoptant une forme de rosette. La composition exacte de ce complexe n'est pas clairement définie, variant d'un complexe composé de 36 sous-unités ou 18 sous-unités, cette dernière composition semblant privilégiée (McFarlane, 2023). Chaque sous-unité catalyse la synthèse d'une chaîne β -(1→4)-D-Glucane à partir de saccharose et l'UDP-glucose.

L'inhibition de la synthèse de la cellulose par les composés de la classe HRAC 29 est identifiée par intégration de glucose marqué radioactivement. Cependant, les cibles spécifiques ne sont pas connues, ce qui n'est pas surprenant, la biosynthèse de la cellulose et son intégration dans la plante restant à ce jour un sujet d'étude (Dietrich and Laber, 2011).

1.3.4.3. Destruction de l'organisation des microtubules

Les microtubules sont des fibres creuses impliquées dans le cytosquelette des cellules eucaryotes et dans la formation du fuseau mitotique. Elles sont formées par la polymérisation de dimères d' α et β -tubuline avec consommation de guanosine triphosphate : 13 protofilaments s'associent afin de former le microtubule. Chaque extrémité de ces fibres est à la fois le siège de la polymérisation et de la dépolymérisation de la fibre. On peut toutefois parler d'orientation des fibres. En effet, la polymérisation est particulièrement rapide au pôle positif de la fibre exposant la tubuline β . Au pôle négatif, la tubuline α étant exposée au solvant, on observe une dépolymérisation plus rapide. C'est pourquoi les microtubules sont des structures dynamiques, dans le cas où les deux extrémités du microtubule sont libres (Figure 20).

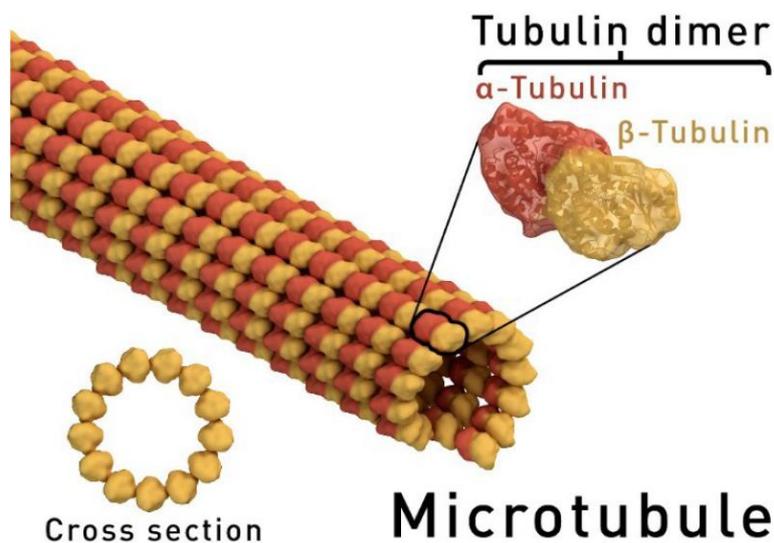


Figure 20 - Représentation d'un microtubule. Ces microtubules résultent de la polymérisation de dimères de tubulines α et β en forme de spirale, permettant la construction du tubule. Le pôle positif du tubule est ici visible grâce à l'exposition des tubulines β au niveau de la coupe transversale (Chen et al., 2021).

Les microtubules sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques, comme l'accompagnement de la formation de la paroi des cellules végétales (pendant l'interphase), la formation de microtubules corticaux ancrés à la membrane plasmique pour donner une forme à la cellule. Ils sont également impliqués lors de la mitose dans la formation du fuseau bipolaire permettant le positionnement puis la séparation des chromosomes vers les pôles opposés de la cellule.

Les herbicides impliqués dans l'inhibition de l'organisation des microtubules sont absorbés principalement au niveau des racines. A l'intérieur de la plante, ils sont particulièrement

concentrés au niveau des méristèmes, lieux de croissance de la plante. Ces herbicides agissent par perturbation du fuseau de microtubules dans la prométaphase tardive, empêchant la séparation des chromosomes.

Deux hypothèses sont formulées quant aux modes d'action des herbicides des classes HRAC 3 et 23. La première propose l'interaction des molécules herbicides avec les protéines associées aux microtubules (*microtubule associated proteins*), impliquées dans la stabilisation et la croissance de la fibre. La deuxième hypothèse repose sur une interaction avec les hétérodimères de tubuline, bloquant la polymérisation lorsqu'un complexe dimère-tubuline est ajouté à la fibre. Dans les deux cas, la synthèse des fibres de tubuline est ralentie ou bloquée, conduisant à un raccourcissement global des fibres du fait de la dépolymérisation.

En présence d'herbicide, les fibres sont ainsi raccourcies, ne permettant plus de former le fuseau mitotique normalement responsable de la séparation des chromosomes vers les pôles de la cellule au cours de la mitose. De même, les microtubules ainsi raccourcis ne permettent plus d'empêcher l'expansion isodiamétrique cellulaire, empêchant l'allongement des racines qui prennent des formes sphériques anormale (Chen et al., 2021; Krämer and Schirmer, 2019).

1.3.4.4. Modification de la régulation hormonale par l'auxine

Les auxines sont une classe de phytohormones végétales. On distingue 5 types d'auxines formées à partir de tryptophane, dont l'acide indole-3-acétique (IAA) est la plus décrite. L'IAA est ainsi une hormone de petite taille. C'est un régulateur majeur du développement et de la croissance de la plante. Sa concentration est donc étroitement régulée à plusieurs niveaux : biosynthèse, transport, localisation, dérivation et dégradation.

Les herbicides imitant l'auxine (classe HRAC 4) sont constitués d'un groupement aryl substitué avec des fonctions acides carboxyliques (Figure 21). En 2019, une vingtaine de composés commerciaux étaient dénombrés. En particulier, l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D), introduit dans les années 1940, représente probablement le début de l'utilisation de composés synthétiques pour lutter contre les « indésirables » dans l'agriculture. A la différence de l'auxine naturelle, les composés synthétiques sont dotés d'une longue durée de vie et ne peuvent pas être pris en charge par les mécanismes de régulation de l'auxine, d'où une accumulation de ces composés causant un déséquilibre de cette régulation. Il est intéressant de noter qu'à l'inverse de tous les autres

herbicides qui agissent en tant qu'inhibiteur d'enzyme (action antagoniste), les herbicides analogues de l'auxine ont une activité agoniste.

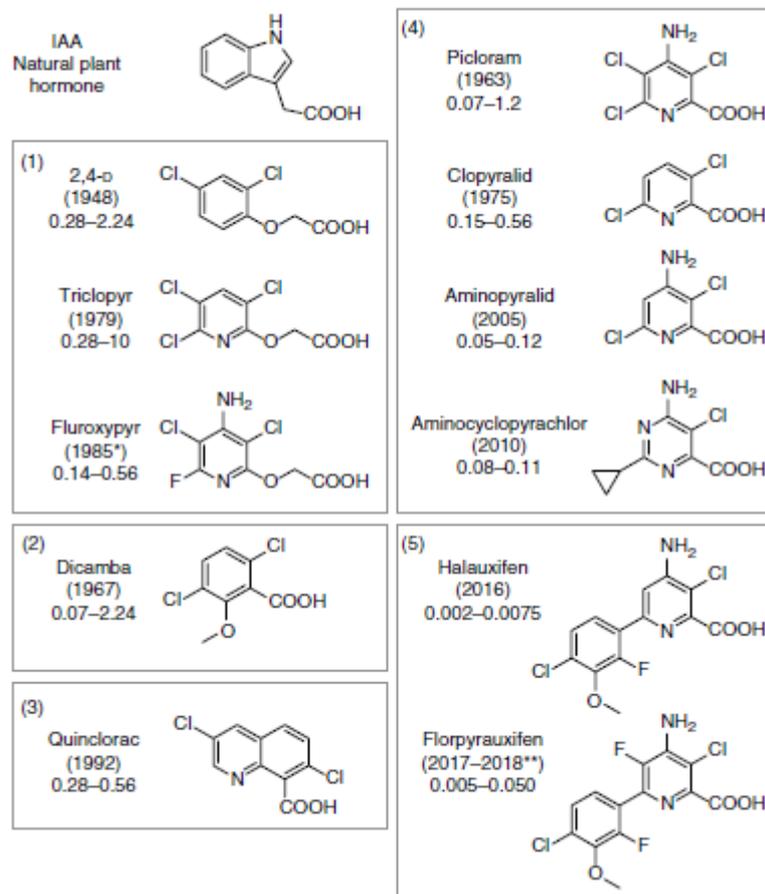


Figure 21 - Comparaison structurale des herbicides synthétiques par rapport à l'auxine naturelle

La transcription des gènes de réponse aux auxines est régulée par deux protéines : la protéine ARF qui est un facteur de transcription reconnaissant l'élément de réponse aux auxines qui est l'homodimère d'Aux-IAA qui agit comme répresseur d'ARF. En absence d'auxines, Aux-IAA est associé avec ARF, bloquant l'activation de la transcription par ARF. TIR-1/ARF s'associe avec le complexe Skp, Cullin, F-box (SCF, qui est un complexe protéique ayant une activité E3 ubiquitine ligase) afin de former le complexe SCF^{TIR-1/AFB}. En présence d'auxines, TIR1/AFB interagit avec l'auxine qui agit alors comme une « glue moléculaire » pour capturer le régulateur transcriptionnel Aux-IAA. Ce dernier va alors être ubiquitiné, l'orientant vers le protéasome pour protéolyse. L'inhibition d'ARF est alors levée et la transcription des gènes de réponse aux auxines est activée (Figure 22)(Kou et al., 2022; Walsh et al., 2011).

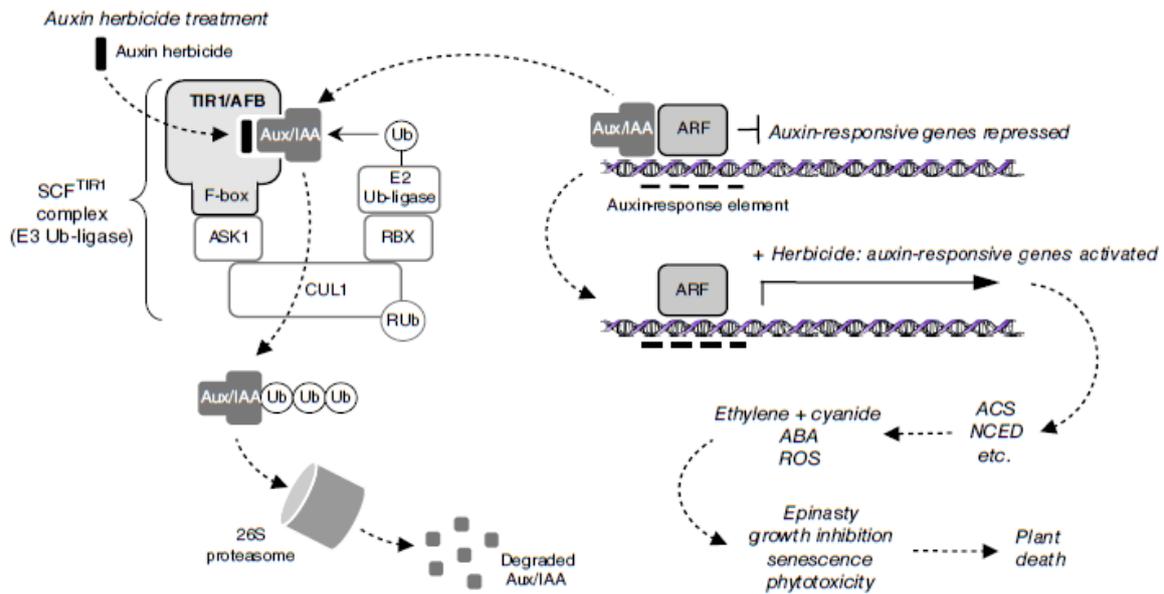


Figure 22 - Mécanisme d'action des herbicides analogues de l'auxine (Walsh et al., 2011).

L'activation de la transcription des gènes de réponse aux auxines par ARF entraîne, entre autres, une surproduction d'éthylène et d'acide abscissique. L'excès d'éthylène entraîne une épinnastie des tissus (courbure des feuilles vers le bas) et une sénescence prématurée. La production de cette hormone s'accompagne également de libération de cyanure comme produit secondaire, ayant des effets toxiques. L'excès d'acide abscissique quant à lui provoque la fermeture des stomates, provoquant des perturbations sur les processus photosynthétiques et la production de ROS, conduisant à l'inhibition de la croissance et la sénescence (Grossmann, 2010, 2007; Walsh et al., 2011).

1.3.4.5. Perturbation du transport hormonal (auxine)

Tous les composés analogues des auxines ne sont pas reconnus par les récepteurs des transporteurs naturels de l'auxine. Ils peuvent pour certains être internalisés par le transporteur AUX/LAX (dont le 2,4-D en particulier) mais ce n'est pas le cas pour la majorité des composés (Hoyerova et al., 2018) : ces derniers doivent être internalisés par diffusion passive transmembranaire et piégeage sous forme d'acides faibles. Ils existent alors sous forme protonée dans la paroi végétale (pH 5,5) mais sont dissociés dans le cytosol (pH 7,0). De même, ils ne peuvent majoritairement pas être éliminés de la cellule par les transporteurs passifs (PIN) ou actifs d'auxines (Figure 24) (on notera que le 2,4-D et le MCPA le peuvent). Ces transporteurs permettent la régulation fine des gradients spatiaux et temporels d'auxine au sein de la cellule.

Deux composés ont des comportements particuliers : le naptalam (acide N-naphthylphthalamique) et le diflufenzopyr (DFPP) (Figure 23). Ces deux composés qui ne sont pas des molécules analogues des auxines sont connus pour inhiber le transport de cette dernière. L'inhibition des transports des auxines est encore mal connue (Teale and Palme, 2018).

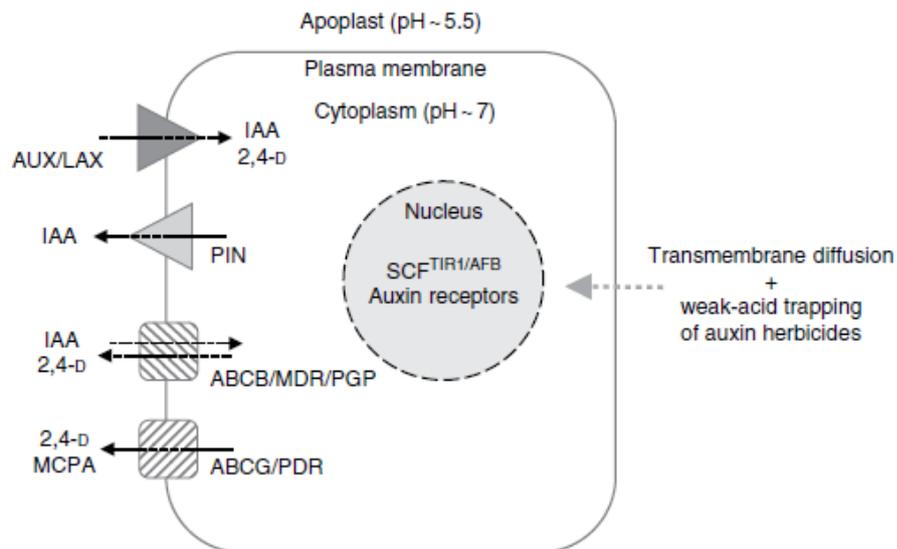


Figure 24 - Transporteurs membranaires régulant l'auxine dans le milieu intercellulaire (Walsh et al., 2011).

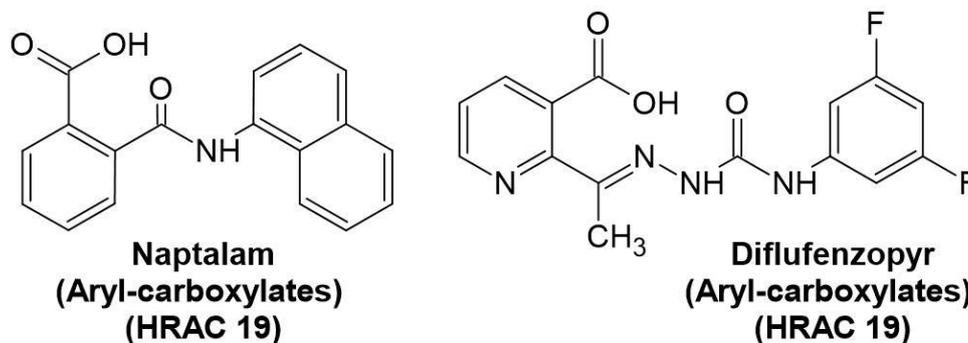


Figure 23 - Structures des deux composés chimiques de la classe HRAC 19 : le naptalam et le diflufenzopyr

Une étude récente, sur le naptalam, semble conclure que la molécule interagit directement avec les transporteurs PIN, transporteurs passifs de l'auxine du milieu intra-cellulaire au milieu extracellulaire. Cependant, le naptalam est décrit comme interagissant également avec les transporteurs ABCB : cette molécule synthétique pourrait être un analogue d'une molécule endogène permettant de contrôler les différents complexes de transport de l'auxine. Toujours est-il que la présence de ces molécules bloque les transporteurs, perturbant la régulation de l'auxine et entraînant des effets pathologiques, expliquant ainsi l'activité herbicide,

notamment des anomalies de développement au niveau racinaire qui ont pu être décrites précédemment (cf. 1.3.4.3) (Abas et al., 2020; Teale and Palme, 2018; Walsh et al., 2011).

1.4. Détection des herbicides : le paradoxe du glyphosate

Parmi l'ensemble des herbicides, le glyphosate est probablement celui le plus utilisé au monde à l'heure actuelle dans l'agriculture moderne. Etant donné la demande de moyens analytiques pour sa détection (Huhn, 2018; Valle et al., 2019), ce travail de thèse s'appuiera sur cet herbicide comme cas d'étude.

2. Le glyphosate

2.1. Historique et généralités

Synthétisé en 1950 par le Dr Henri Martin travaillant pour la société Cilag AG (intégrée depuis à Johnson & Johnson), le glyphosate ou N-(phosphonométhyl)glycine (Figure 25A), ne débouche alors sur aucune application pharmaceutique. Dans les années 1960, le glyphosate est utilisé comme agent détartrant pour les canalisations du fait de ses propriétés de chélation du calcium ou du magnésium. L'activité herbicide du glyphosate est mise en lumière par John Franz, travaillant pour Monsanto. Ces travaux mènent alors à la commercialisation d'une préparation à base de glyphosate en 1974 par la même société (devenue depuis Bayer) : le RoundUp®.

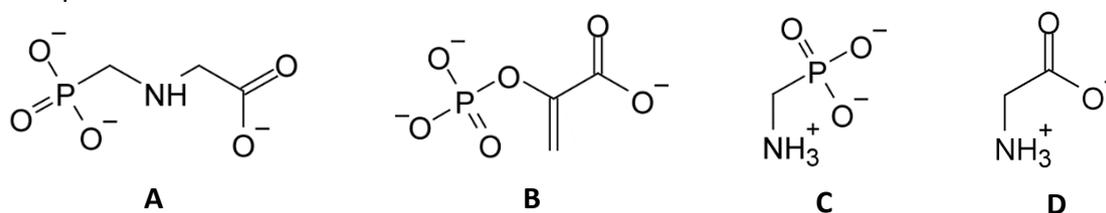


Figure 25 - Structures moléculaires du glyphosate (A), du phosphoénolpyruvate (PEP ; B), de l'acide aminométhylphosphonique (AMPA ; C) et de la glycine (D).

2.2. Fonctionnement comme herbicide

Le glyphosate est utilisé actuellement comme herbicide organophosphoré systémique à large spectre, c'est-à-dire qu'il tue les plantes de manière non spécifique et atteint toutes les parties de la plante. Son utilisation, en premier lieu comme désherbant total avant semis évolue avec l'introduction de semences rendues résistantes par génie génétique (principalement du soja, du coton et du maïs), permettant une application agricole sans travail du sol, c'est-à-dire sans désherbage mécanique. Il est aussi utilisé comme désherbant par les particuliers, l'industrie et les municipalités.

Breveté par Monsanto et commercialisé sous l'appellation « RoundUp® » comme solution herbicide commerciale, le glyphosate tombe dans le domaine public en 2000 ouvrant le marché à de nouvelles industries phytosanitaires (Bayer, Adama Agricultural Solutions Limited, UPL Limited, BASF SE et Syngenta AG étant les acteurs majoritaires à l'heure actuelle). En 2016, au moins 300 préparations étaient commercialisées par une quarantaine de sociétés. Le glyphosate est à ce jour l'herbicide le plus utilisé au monde (825 000 tonnes en 2014) (Benbrook, 2016). En 2023, d'après l'agence d'étude et projection de marché

MordorIntelligence, le marché du glyphosate représente 8,50 milliards de dollars américains, laissant supposer une croissance dans les années à venir (estimation à 12,2 milliards en 2028). A titre d'indication, les doses de glyphosate utilisées varient entre 1,5 et 4,3 kg.ha⁻¹, selon l'environnement (aquatique ou terrestre) et selon la nature de la culture (IARC, 2015).

Associé à des tensio-actifs, le glyphosate est internalisé par la plante au niveau du feuillage. Il migre ensuite au niveau des racines où il agit en tant qu'inhibiteur compétitif réversible (Jaworski, 1972; Pollegioni et al., 2011; Steinrücken and Amrhein, 1980) de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS ou 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ; EC 2.5.1.19) du fait de son analogie structurale avec le phosphoénolpyruvate (PEP ; Figure 25B). L'EPSPS est une enzyme de la voie du shikimate impliquée dans la biosynthèse de certains acides aminés aromatiques chez les plantes et certaines bactéries (Figure 26).

Cette enzyme catalyse la 6^{ème} étape de la voie du shikimate, c'est à dire le transfert du groupement énoypyruvyl du PEP sur le shikimate-3-phosphate (S3P) afin de synthétiser le 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP). L'arrêt de la biosynthèse des acides aminés aromatiques entraîne l'arrêt de la production de tous les composants en dérivant, comme les protéines, l'auxine, l'acide folique, les précurseurs de la lignine, les flavonoïdes, les plastoquinones... (Pline et al., 2002). Le glyphosate présente également des effets complémentaires au blocage de la synthèse des acides aminés aromatiques. Il semblerait qu'il soit aussi à l'origine d'une diminution de la photosynthèse et d'une augmentation du stress oxydatif dans la plante, ces processus étant interconnectés avec la voie du shikimate (Gomes et al., 2017). La présence du glyphosate semble également diminuer l'absorption des minéraux par les plantes (Siehl, 1997). L'accumulation de ces effets conduit à la mort du végétal.

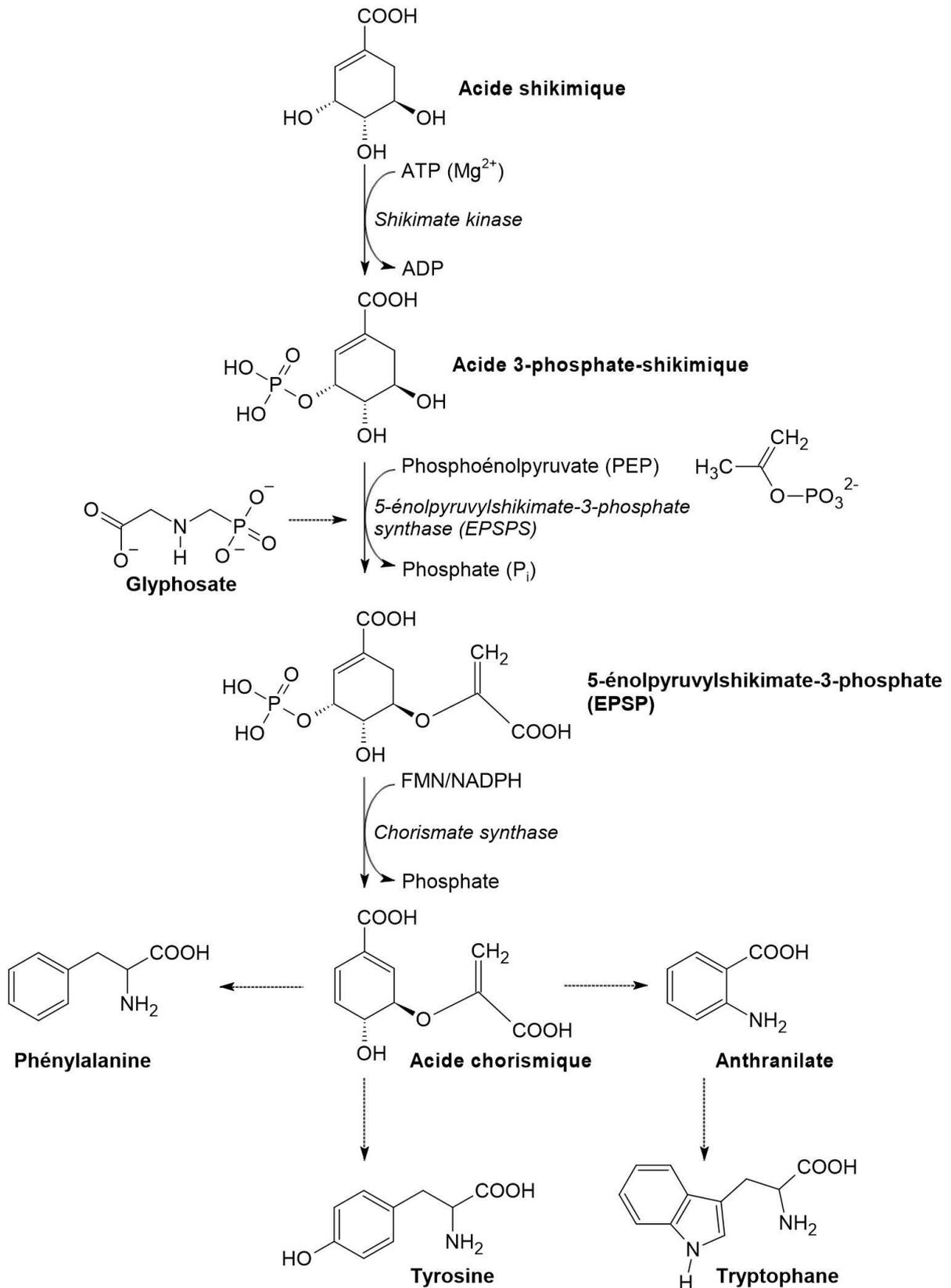


Figure 26 – Inhibition par le glyphosate de la voie de synthèse des acides aminés aromatiques (par la voie du shikimate) (traduit et adapté de Pollegioni et al., 2011)

L'utilisation du glyphosate est autorisée en France en agriculture jusqu'au 15 décembre 2023 (sa reconductibilité étant au cœur de débats sociétaux à l'heure de l'écriture de ce manuscrit). Pour les particuliers, il est néanmoins interdit et tous les produits liés à cet usage ont été retirés du commerce en septembre 2020 (loi Labbé de 2017) et le gouvernement français a lancé un plan d'action pour sortir du glyphosate en juin 2018. L'ANSES, de son côté, a réalisé une étude publiée en 2020 sur les alternatives au glyphosate, conduisant à une modification des conditions d'utilisation des formulations à base de glyphosate sur le territoire, notamment à son interdiction en cas d'alternatives possibles. Dans le cadre des vignes et arbres fruitiers, l'utilisation d'herbicide peut être remplacée par un désherbage mécanique entre les rangs ou par le recours à des surfaces enherbées. Pour les grandes cultures, il est possible de réaliser un labour entre deux cycles annuels de culture.

2.3. Propriétés physico-chimiques

Du fait de ses groupements phosphonate, amine et acide carboxylique, cinq formes ioniques de glyphosate peuvent être retrouvées selon le pH du milieu (Figure 27) (Sprankle et al., 1975), lui accordant un caractère fortement polaire, d'où une faible solubilité dans les solvants organiques, usuellement utilisés en chimie analytique. Il ne possède en outre pas de propriétés optiques intrinsèques (absorbance comme fluorescence) (Huhn, 2018; Valle et al., 2019).

Afin d'augmenter sa solubilité en phase aqueuse, le glyphosate (solubilité de 11,6 g.L⁻¹ sous forme d'acide glyphosique) est généralement formulé sous forme de sel d'isopropylamine (comme pour le RoundUp®)(solubilité de 1050 g.L⁻¹) ou sous forme de sel de triméthylsulfonium (> 1000 g.L⁻¹) (Tableau 2).

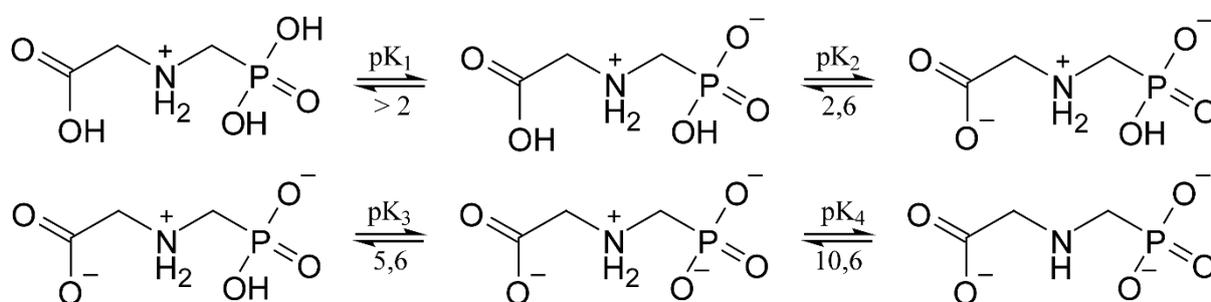


Figure 27 - Représentation des différentes formes ioniques du glyphosate. Adapté de Sprankle et al., 1975.

Tableau 2 - Présentation des différentes formes de glyphosate

Composé	CAS	MM (g.mol ⁻¹)	Formule chimique
Acide glyphosique	1071-83-6	169,07	C ₃ H ₈ NO ₅ P
Glyphosate mono-ammonium	40465-66-5	186,1	C ₃ H ₇ NO ₅ P.NH ₄
Glyphosate di-ammonium	69254-40-6	203,13	C ₃ H ₆ NO ₅ P.(NH ₄) ₂
Glyphosate isopropylamine	38641-94-0	228,18	C ₃ H ₈ NO ₅ P.C ₃ H ₉ N
Glyphosate de sodium	34494-03-6	191,1	C ₃ H ₇ NO ₅ P.Na
Glyphosate triméthylsulfonium	81591-81-3	245,23	C ₃ H ₉ S.C ₃ H ₇ NO ₅ P

2.4. Effet sur la santé et sur l'environnement

Le glyphosate inhibant une voie de synthèse d'acides aminés absente chez l'homme et les animaux, il peut être considéré comme ne pouvant pas avoir d'effet toxique chez ceux-ci. Néanmoins, sa toxicité fait débat depuis maintenant deux décennies et de nombreuses études ont été réalisées, visant à infirmer ou à affirmer la toxicité du glyphosate. Trancher sur cette question n'est pas le sujet de ce travail, mais quelques éléments de discussion peuvent être apportés.

En 2017, une procédure judiciaire a été menée contre Monsanto aux Etats-Unis d'Amérique. De nombreux documents internes à l'entreprise sont alors déclassifiés : ce sont les « Monsanto papers ». Ces documents font apparaître la première inquiétude formulée auprès de Monsanto en 1999 par le Dr. James Parry qui s'interroge sur l'impact du glyphosate sur le matériel génétique d'un individu, pouvant conduire à un cancer.

En 2015, l'IARC (International Agency for Research on Cancer) classe le glyphosate comme cancérigène probable chez l'Homme. Le rapport de l'étude indique qu'il existe des preuves limitées chez l'Homme mais suffisantes chez les animaux quant à la cancérigénicité du glyphosate. Une corrélation positive a été observée avec le lymphome de type non-Hodgkinien chez l'Homme. L'exposition au glyphosate et à des formulations à base de glyphosate entraîne des effets génotoxiques sur les humains (expériences *in vitro*) et chez les animaux. L'augmentation de dégâts chromosomiques a été mise en avant lors de l'exposition d'individus à des préparations à base de glyphosate (Paz-y-Miño et al., 2011, 2007). Enfin, des études chez des animaux de laboratoire et des espèces aquatiques ainsi qu'*in vitro* chez l'Homme ont mis en avant l'induction d'un stress oxydatif en présence de glyphosate, de

préparations à base de glyphosate ou d'acide aminométhylphosphonique (AMPA), le produit d'oxydation du glyphosate (Figure 25C) (IARC, 2016, 2015).

Toujours en 2015, l'EFSA (*European Food Safety Authority*) autorise le maintien de l'autorisation d'utilisation du glyphosate en Europe. Dans son rapport, les experts considèrent que les études épidémiologiques et les études expérimentales animales ne permettent pas d'établir un lien clair entre l'exposition au glyphosate et le risque de développement de cancers chez l'Homme. Trois seuils sont également proposés : la dose aiguë de référence (DARF) et la dose journalière acceptable (DJA) pour les consommateurs sont fixées à $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ tandis que le niveau acceptable d'exposition des opérateurs (NAEO) est fixé à $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ par jour (European Food Safety Authority (EFSA), 2015a, 2015b). La mise à jour de cette revue des risques liés au glyphosate, publiée en 2023, ne contient pas de conclusion majeure nouvelle mais met en avant les carences de la littérature scientifique. En particulier, les experts pointent l'absence d'évaluation des risques alimentaires et, pour les plantes aquatiques, de l'effet de l'une des impuretés du glyphosate non clairement identifiée. L'autorisation d'utilisation du glyphosate dans l'Union Européenne est ainsi maintenue jusqu'en décembre 2023 (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023).

Cette divergence de conclusions met en avant la complexité entourant l'éventuelle toxicité du glyphosate. Une notion revient régulièrement dans le débat : la nature physicochimique du glyphosate utilisé lors des études. En effet, comme évoqué plus haut (cf. 2.3), le glyphosate peut être présent sous forme d'acide glyphosique, mais aussi de sels d'isopropylamine, par exemple. La forme de glyphosate utilisée est très importante du fait de la faible solubilité dans l'eau de la forme acide (11 g.L^{-1}) comparée à la très forte solubilité du sel ($> 1000 \text{ g.L}^{-1}$). Powell et al. démontrent dès 1991 que la toxicité du glyphosate varie selon la forme utilisée : elle est faible pour l'acide libre, supérieure pour la forme de sels d'isopropylamine et encore plus importante pour la préparation de Roundup® (Powell et al., 1991; Tsui and Chu, 2003).

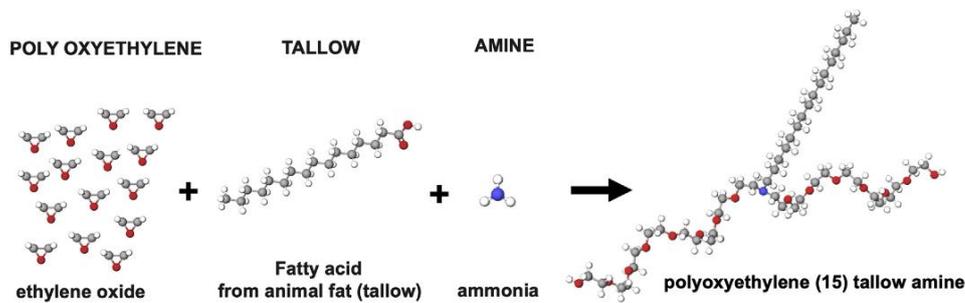


Figure 28 - Synthèse et structure du POE-Tallowamine (Mesnage et al. 2019)

De plus, le glyphosate n'est que le principe actif des préparations commerciales à base de glyphosate : il est accompagné de nombreux composés et surfactants dont le rôle est d'augmenter l'activité herbicide du glyphosate, notamment en favorisant sa pénétration dans les plantes. Lors d'une étude portant sur les adjuvants polyéthoxylés (POE), le POE-15 ou POE-tallowamine (Figure 28) (principal adjuvant des herbicides à base de glyphosate) a été identifié comme présentant des effets négatifs sur la respiration cellulaire et sur l'intégrité membranaire entraînant la nécrose. Il apparaît également que les formulations sont plus toxiques que le glyphosate lui-même (Mesnage et al., 2013). Les effets des adjuvants sont néanmoins très peu étudiés car classifiés comme inertes (Huhn, 2018; Mesnage et al., 2015). Ce constat est renforcé par une autre étude en 2014 montrant que l'exposition de cellules de lignées d'hépatomes humains à des formulations à base de glyphosate (Roundup UltraMax de Monsanto) induisait un stress oxydatif qui n'est pas observé en présence d'acide glyphosique ou d'AMPA seuls (Chaufan et al., 2014). Le glyphosate est ainsi suspecté de présenter une toxicité intrinsèque qui est amplifiée par les adjuvants.

En 2015, l'EFSA indique ne considérer que le glyphosate sans adjuvant, l'évaluation de chaque formulation phytopharmaceutique relevant des états membres de l'Union Européenne. L'IARC, quant à elle, regroupe dans son étude le glyphosate seul et différentes formulations et tire les mêmes conclusions dans les deux cas (European Food Safety Authority (EFSA), 2015b, 2015a; IARC, 2016). Portier et al. pointent également la différence des études prises en compte : l'IARC considérant l'ensemble des études scientifiques revues par les pairs accessibles au public et ne tenant pas compte des études confidentielles réalisées par les industries phytosanitaires. De plus, les auteurs critiquent les critères de choix des études retenues par l'EFSA dans son évaluation des risques (Portier et al., 2016).

2.5. Résistance au glyphosate

Comme mentionné précédemment, le glyphosate est utilisé en association avec des semences transgéniques rendues artificiellement résistantes au glyphosate. Plus globalement, l'introduction d'une résistance à un herbicide s'effectue *via* deux stratégies : l'expression d'une forme insensible à l'herbicide de l'enzyme cible et l'introduction d'un moyen de détoxification (Pollegioni et al., 2011)

Dans le cas du glyphosate, c'est l'utilisation d'une 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) insensible au glyphosate qui est utilisée, comme l'EPSPS d'*Agrobacterium* sp. CP4 ou encore une forme mutée de l'EPSPS. Toutefois, l'accumulation de l'herbicide dans la plante est le principal inconvénient de cette stratégie, étant donné qu'il peut interférer avec le développement de la plante et ainsi réduire les rendements agricoles (Pline et al., 2002).

L'introduction d'une voie de détoxification permet quant à elle d'éliminer l'agent actif et ainsi empêcher son accumulation, rendant la plante plus résistante et permettant l'utilisation de l'herbicide au cours de son développement.

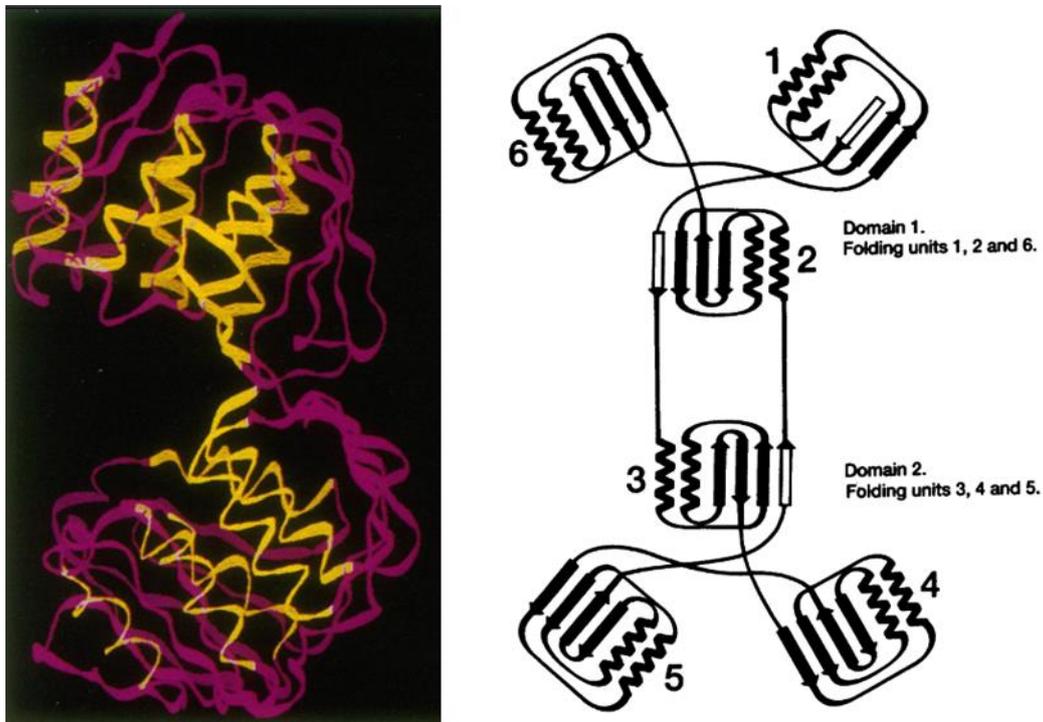


Figure 29 – Représentation en ruban de l'EPSPS cristallisée et analysée aux rayons X (à gauche) et illustration schématique de l'EPSPS (à droite). Les deux domaines globulaires sont particulièrement visibles et les sous-unités forment un motif tonneau alpha/beta inside-out (Stallings et al., 1991).

La première structure de l'EPSPS (Figure 29) est obtenue (sans substrat) en 1991 par un groupe de recherche de Monsanto, révélant l'existence d'un motif tonneau alpha/beta

inside-out très particulier avec deux domaines globulaires, composés chacun de trois unités de repliement identiques, connectés par une région charnière à deux brins (Stallings et al., 1991).

La cristallisation avec du shikimate-3-phosphate et du glyphosate une décennie plus tard tend à montrer que l'enzyme adopte un changement conformationnel dû au rapprochement des deux domaines globulaires lors de l'interaction avec le shikimate-3-phosphate. Ce changement de conformation induit un environnement chargé favorisant la fixation du glyphosate ou du PEP (Schönbrunn et al., 2001). Ce mécanisme est confirmé par l'obtention d'une nouvelle structure cristallisée en 2003 (Eschenburg et al., 2003) (avec l'intermédiaire tétraédrique), confirmant que glyphosate et PEP interagissent de manière similaire. Ces caractéristiques structurales ont été rapportées sur d'autres organismes, comme *Streptococcus pneumoniae* et *Agrobacterium* sp CP4 (Funke et al., 2006; Park et al., 2004).

Le succès du glyphosate est attribué à sa simplicité de structure et sa forte spécificité pour l'EPSPS : aucune autre enzyme végétale n'est décrite comme étant inhibée par le glyphosate. Cette constatation laisse supposer que le glyphosate n'agit pas vraiment comme analogue structural du PEP mais comme analogue de son intermédiaire de réaction (qui n'est, pour autant, pas défini avec certitude). De nombreuses modifications ont été effectuées sur le glyphosate conduisant le plus souvent à une diminution drastique du pouvoir inhibiteur. Le glyphosate reste et demeure la meilleure molécule ciblant l'EPSPS (Franz et al., 1997). Il est à noter toutefois qu'une étude a montré que l'acétylcholinestérase de certaines espèces de poissons est inhibée par le glyphosate à des concentrations de l'ordre du mg.L^{-1} (Menéndez-Helman et al., 2012).

Les sites d'interaction entre le glyphosate ou le PEP avec l'EPSPS étant extrêmement proches, l'augmentation de la résistance au glyphosate (due à la baisse de l'affinité pour l'EPSPS) entraîne souvent une baisse de l'affinité pour le PEP et donc une catalyse moins efficace (Pollegioni et al., 2011).

Deux classes d'EPSPS existent. La classe I regroupe les enzymes de plantes et de nombreuses bactéries Gram-négatives (telles que *E. coli*). Ces enzymes sont caractérisées par une forte inhibition à des faibles concentrations de glyphosate (de l'ordre du μM). La classe II est constituée des enzymes des microorganismes (comme *Agrobacterium* sp. CP4) présentant

une résistance naturelle au glyphosate et pour lesquelles une forte variabilité de séquence génétique de l'EPSPS par rapport aux enzymes de classe I est observée.

Les deux premières mutations uniques conférant à l'EPSPS une résistance pour le glyphosate sont identifiées chez *Salmonella typhi* (Comai et al., 1983) et chez *Klebsiella pneumoniae* (Sost and Amrhein, 1990) : G96A et P101S.

La mutation G96A se trouve au niveau du centre actif de l'EPSPS. Le groupement méthyl de la chaîne latérale de l'alanine est à l'origine d'une gêne stérique au niveau du site de fixation du glyphosate et donc du PEP. Autrement dit, si la fixation du glyphosate sur l'enzyme est empêchée, la fixation du PEP l'est tout autant et une chute de l'activité catalytique est observée (Sost and Amrhein, 1990).

La mutation P101S chez *Salmonella typhi* est plus intéressante car située à 9 Å du centre actif dans une hélice α du domaine globulaire N-terminal (Figure 30). Elle n'intervient donc pas directement sur la fixation du glyphosate : elle change l'orientation de la glycine 96 et de la thréonine 97 qui, elles, sont impliquées dans l'interaction avec le groupement phosphonate du glyphosate. Il en résulte une légère tolérance au glyphosate mais une forte conservation de l'activité catalytique vis-à-vis du PEP (Healy-Fried et al., 2007). Il est à noter que l'équivalent de cette mutation est retrouvé chez toutes les plantes devenues sur le terrain naturellement résistantes au glyphosate.

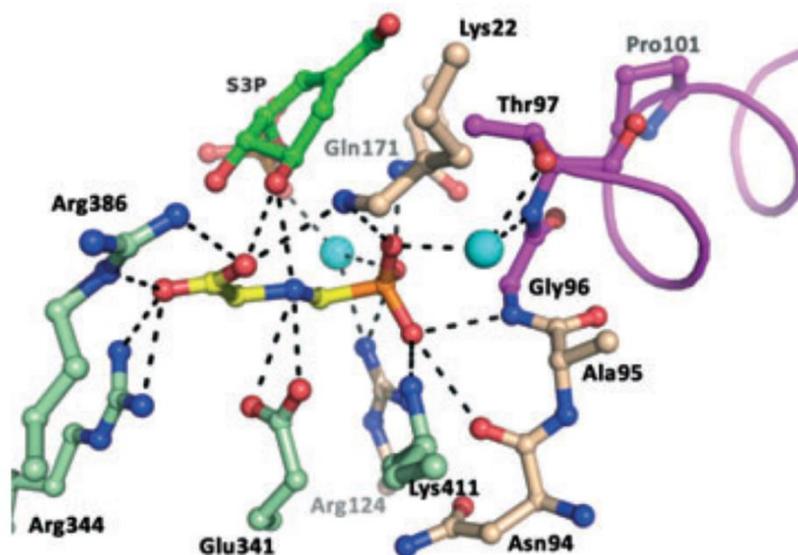


Figure 30 - Site de fixation du glyphosate dans l'EPSPS de *E. Coli* (PDB 1g6s). Les molécules d'eau sont colorées en cyan, et les résidus impliqués dans la fixation du glyphosate sont colorés en violet. En particulier, la proline 101 joue sur l'orientation des Thr97 et Gly96 qui sont impliqués dans la fixation du ligand (Pollegioni et al., 2011).

D'autres mutations multiples sont décrites dans la littérature. En particulier, le transfert de la double mutation T102I et P106S (**T97I et P101S** chez *E. coli*) dans *Zea mays* est à l'origine de la première plante transgénique résistante au glyphosate (maïs GA21) commercialisée par Monsanto. On parle alors de TIPS EPSPS, des enzymes caractérisées par une résistance au glyphosate et conservant une forte affinité pour le PEP. La TIPS EPSPS de *E. coli* a été cristallisée en 2009, révélant que la double mutation résulte d'un changement d'orientation de la glycine 96, défavorisant l'interaction du glyphosate et d'un éloignement de la chaîne latérale de l'isoleucine 97, facilitant l'interaction du PEP. La simple mutation, T97I quant à elle est à l'origine d'une légère tolérance au glyphosate et d'une forte diminution de l'affinité pour le PEP en l'absence de compensation par la mutation P101S (Funke et al., 2009).

Enfin, la C4 EPSPS a été identifiée chez *Agrobacterium* sp CD4, isolée sur un site de production de glyphosate. Cette protéine est caractérisée par une résistance au glyphosate et une bonne efficacité catalytique permettant la production de plantes transgéniques résistantes au glyphosate (Roundup® Ready NK603 Corn event) (Barry et al., 1997). Si la structure de cette enzyme est très différente des autres EPSPS décrites (la plaçant dans la classe II), ses caractéristiques sont attribuées aux acides aminés Ala100 et Leu105 qui sont assimilables aux deux mutations de la TIPS EPSPS d'*E. coli*. En particulier, l'Ala100 n'a aucune influence sur la fixation du PEP mais sa mutation en une glycine restitue la fixation du glyphosate dans la molécule et donc sa capacité inhibitrice (Funke et al., 2006).

2.6. Détection du glyphosate

Comme évoqué en 1.4, le « paradoxe du glyphosate » nait du constat que le glyphosate reste l'un des herbicides les plus difficiles à détecter malgré sa très forte utilisation en agriculture (Valle et al., 2019).

Afin de pouvoir être dosé, le glyphosate doit être extrait des matrices environnementales (eau de surface, boue ...). Le glyphosate chélate les cations métalliques bi- ou trivalents présents naturellement dans les sols, nuisant à son rendement d'extraction et donc à son analyse quantitative. Il établit également des interactions avec les oxydes de métaux et avec les surfaces de silicates tels que le verre ou les capillaires de silice utilisés dans les procédés analytiques (Huhn, 2018).

La méthode **QuEChERS** (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) est une méthode classique d'extraction des herbicides réalisée sans modification chimique. Elle inclut l'extraction des composés par transfert de phase dans de l'acétonitrile et l'ajustement du pH. Se retrouvant dans la phase organique, les analytes sont ensuite séparés par chromatographie liquide ou gazeuse puis analysés grâce à leurs temps de rétention et/ou par spectrométrie de masse par exemple. L'extraction se basant sur le transfert des analytes de la phase aqueuse à la phase organique, la méthode QuEChERS n'est applicable ni au glyphosate ni à l'AMPA du fait de leur très faible solubilité en phase organique (Anastassiades et al., 2003; Huhn, 2018; Schenck and Hobbs, 2004).

Deux normes pour le dosage du glyphosate existent dans le cadre de la qualité de l'eau potable, souterraine et de surface :

- La norme **ISO 21458:2008**, intitulée « Qualité de l'eau – Dosage du glyphosate et de l'AMPA – Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et détection fluorimétrique » affichant une limite de détection de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ISO-21458, 2008).
- La norme **ISO 16308:2014**, intitulée « Qualité de l'eau – Détermination du glyphosate et de l'AMPA – Méthode par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection par spectrométrie de masse en tandem » permettant une détection entre $0,03$ et $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ISO 16308, 2014).

Ces deux techniques comprennent un pré-traitement et la modification chimique du glyphosate afin de diminuer la polarité du composé par greffage de 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) sur le groupement amine du glyphosate ou de l'AMPA et de permettre la détection du composé par fluorescence ou spectrométrie de masse.

La limite de contamination acceptée pour le glyphosate dans les eaux est de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($0,6 \text{ nmol.L}^{-1}$) en Europe et de $700 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($4,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) aux Etats-Unis, d'où le besoin de techniques analytiques sensibles (Valle et al., 2019).

Afin d'atteindre ces limites, des méthodes d'analyse « classiques » ont été décrites dans la littérature et font l'objet d'articles de synthèse (Mazuryk et al., 2023; Valle et al., 2019). Ces techniques, pour la quantification du glyphosate, sont appliquées en laboratoire avec des appareillages analytiques complexes, coûteux et nécessitant un personnel formé. Ceci induit

également des temps de réponse longs et ne permet pas une analyse *in situ*. Enfin, si de nombreuses méthodes pour la détection du glyphosate ont été rapportées dans la littérature, peu d'entre elles ont été testées avec des matrices environnementales (Valle et al., 2019).

Les essais biologiques et les biocapteurs représentent une alternative analytique répondant à ces contraintes.

Ce travail de thèse s'inscrit comme une réponse à ces problématiques de détection. Les essais biologiques et les biocapteurs représentent une alternative analytique caractérisée par l'utilisation d'un élément biologique comme élément de reconnaissance. Dans ce travail, nous nous attacherons à concevoir un dispositif analytique simple, robuste, peu onéreux, utilisable par le plus grand nombre et permettant d'avoir un résultat rapide sur site.

Des essais biologiques et des biocapteurs (ces termes seront discutés par la suite) pour la détection du glyphosate ont déjà été proposés. Dans la prochaine partie, les différents éléments de reconnaissance biologique pouvant être utilisés pour la conception de biocapteurs / essais biologiques seront balayés en prenant pour exemple les dispositifs décrits dans la littérature pour la détection du glyphosate.

3. Les biocapteurs/essais biologiques pour la détection du glyphosate

3.1. Définitions d'un biocapteur

Le premier « biocapteur » a été décrit en 1962 par Clark et Lyons pour la quantification du glucose (Clark and Lyons, 1962).

La glucose oxydase (GOx) est alors utilisée, immobilisée sur une membrane perméable recouvrant une électrode à oxygène en platine. Le glucose et l'oxygène peuvent diffuser à travers la membrane et sont consommés par la GOx pour être convertis en acide gluconique et H₂O₂. Une fois tenu compte de la diffusion du glucose et de l'oxygène, le courant mesuré dépend des concentrations d'oxygène et de glucose du côté analytique de la membrane.

En dépit du fait que de multiples biocapteurs sont décrits depuis 60 ans, la notion de biocapteur reste actuellement un sujet en débat. L'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) définit un biocapteur comme un « *dispositif utilisant des réactions biochimiques spécifiques catalysées par des enzymes purifiées, des systèmes immunologiques, des tissus, des organites ou des cellules entières afin de détecter des composés chimiques généralement grâce à des signaux électriques, thermiques ou optiques* » (traduit de l'anglais). Cette définition ne fait état que de la nature biologique de l'élément de reconnaissance conduisant à un signal de manière spécifique grâce à une réaction chimique (IUPAC, 1992). La commission d'enrichissement de la langue française propose une définition relativement similaire, décrivant un biocapteur comme « un dispositif d'analyse chimique qui comprend une molécule ou un complexe moléculaire biologique reconnaissant un composé minéral ou organique, puis le transformant en une espèce chimique, ainsi qu'un capteur analytique détectant et quantifiant cette espèce » (JORF, 2021).

Une autre définition plus précise est donnée par Anthony Turner qui introduit la notion d'association avec un transducteur. Un biocapteur est alors défini comme « *un dispositif analytique combinant un élément de détection d'origine biologique intimement associé ou intégré à un transducteur physico-chimique aboutissant à la production d'un signal électronique digital qui est proportionnel à la concentration de l'analyte (ou d'un ensemble de composés). Cette approche est caractérisée par une extrême simplicité d'utilisation et l'utilisation d'instruments simples et peu coûteux* » (traduit de l'anglais). Turner justifie

l'utilisation d'éléments biologiques du fait de leur spécificité, permettant ainsi l'analyse de faibles concentrations d'analytes dans des matrices complexes (Turner, 1989; Turner et al., 1987). Une grande diversité d'éléments de reconnaissance peut être utilisée, allant d'éléments biologiques (tissus, organites, récepteurs cellulaires, enzymes, anticorps, ADN ...) à des éléments biomimétiques (récepteurs synthétiques, catalyseurs biomimétiques, ligands combinatoires, polymères à empreinte moléculaire, ...) en passant par des éléments d'origine biologique (aptamères, protéines et anticorps recombinant modifiés par ingénierie moléculaire ...). Les transducteurs quant à eux peuvent être optiques, électrochimiques, thermiques, piézoélectriques, magnétiques ou micromécaniques (Mehrotra, 2016; Turner, 1989; Turner et al., 1987).

3.1.1. Des définitions ambiguës

Les multiples définitions d'un biocapteur se ressemblent, se recouvrent parfois mais introduisent de nombreuses ambiguïtés au niveau de l'association intime entre l'élément de reconnaissance biologique et le transducteur, de la formation du signal et de la proportionnalité entre le signal et la concentration de l'analyte.

En effet, l'IUPAC introduit la notion de réaction chimique spécifique médiée par l'élément de reconnaissance biologique. Les systèmes immunologiques sont caractérisés par des interactions anticorps-ligands très spécifiques mais n'aboutissant à aucune réaction chimique. Il est ainsi nécessaire selon les techniques de marquer avec une étiquette ou une enzyme les analytes modifiés (dans le cas d'un test immunologique par compétition par exemple) ou l'anticorps secondaire (dans le cas d'un ELISA).

3.1.2. Essais homogènes, hétérogènes et biocapteurs

Cela étant, la notion d'association intime entre l'élément de reconnaissance biologique et le transducteur reste l'ambiguïté majeure. Il est souvent admis que l'immobilisation de l'élément de reconnaissance biologique est l'élément caractéristique d'un biocapteur en opposition à un essai biologique. Cependant, la surface utilisée pour l'immobilisation n'est pas clairement définie.

Sassolas et al. proposent une définition alternative dans le cadre des aptamères, pouvant être étendue aux autres éléments de reconnaissance biologiques (Sassolas et al., 2011). Les **essais homogènes** regroupent les dispositifs dont l'élément de reconnaissance biologique est

en phase liquide, sans séparation ou immobilisation. Lorsque l'élément de reconnaissance biologique est immobilisé sur une surface autre que le transducteur, on parle alors d'**essais hétérogènes**. Enfin, les **biocapteurs** reposent sur l'immobilisation de l'élément de reconnaissance biologique sur le transducteur (Tableau 3)(Sassolas et al., 2011).

Tableau 3 - Tableau récapitulatif des caractéristiques des essais biologiques homogènes, hétérogènes et biocapteurs par rapport aux méthodes conventionnelles d'analyse.

	Méthodes conventionnelles	Essai biologique		Biocapteur
		Homogène	Hétérogène	
Élément de reconnaissance biologique	-	+	+	+
Immobilisation ...	-	-	+	+
... sur le transducteur	-	-	-	+

3.1.3. Capteurs à signal « on » ou « off ».

Selon le type de signal, on différencie les capteurs en deux parties. En premier lieu, on définit les biocapteurs à **signal « on »** où le signal mesuré évolue de la même manière que la concentration de l'analyte : plus la concentration en analyte est forte, plus le signal est important. Le signal peut même directement être proportionnel dans la gamme de travail à la concentration d'analyte. Autrement dit, **le signal est observé uniquement en présence de l'analyte**. A l'inverse, on parle de **signal « off »** lorsque le signal décroît lorsque la concentration d'analyte augmente. C'est le cas pour les capteurs se basant sur une inhibition, **l'analyte diminuant le signal observé**.

En général, les capteurs à signal « off » se basant sur une inhibition se trouvent confrontés à des problèmes de spécificité. En effet, malgré la sélectivité de l'élément de reconnaissance biologique, l'inhibition n'est pas obligatoirement sélective (Luque de Castro and Herrera, 2003). L'acétylcholinestérase (AChE), décrite dans de nombreux capteurs pour la détection de pesticides est un exemple (Pundir and Chauhan, 2012) : elle est décrite comme étant inhibée par le paraoxon, le monocrotophos, le chlorpyrifos-ethyl oxon, le maneb, le thifensulfuron, le carbofuran, le dichlorvos, le methyl-parathion, le malathion, l'oxydemeton methyl, le carbaryl, le primicard, l'adicarb, l'azinphos, entre autres. Si la majorité des études indiquent que l'AChE est utilisée majoritairement pour la détection des pesticides (herbicides comme insecticides) organophosphorés et carbamates (Pundir and Chauhan, 2012), il n'en demeure pas moins que

la diminution du signal ne permettra pas l'identification d'un composé en particulier. D'après la base de données BRENDA (Chang et al., 2021), l'ACHé est décrite comme étant inhibée par presque 300 composés.

Le même constat peut être réalisé avec la HRP (peroxydase du raifort) qui est décrite pour la détection du glyphosate (Delprat et al., 2023) mais aussi pour la détection de métaux lourds et autres herbicides (Bucur et al., 2018).

A l'inverse, les capteurs à signal « on » produisent un signal qui est spécifique de l'analyte, permettant généralement la détection d'un composé en particulier. Dans tous les cas, la conception de biocapteurs doit passer par une étude de la spécificité et de la robustesse des mesures, en utilisant des matrices environnementales adaptées aux analytes envisagés.

3.2. Biocapteurs et essais biologiques hétérogènes

Dans ce manuscrit, nous considérerons la définition de biocapteur proposée par (Sassolas et al., 2011), le lieu de l'immobilisation de l'élément de reconnaissance biologique justifiant la qualification de biocapteur (immobilisation sur le transducteur) ou d'essai hétérogène (cf. 3.1.2). Un état de l'art des systèmes de détection pour la détection du glyphosate sera réalisé, en insistant sur les systèmes de biocapteurs. L'ensemble des systèmes est résumé dans le Tableau 5, mentionnant également les essais biologiques qui ne seront pas développés.

3.2.1. Cellules entières

Comme évoqué précédemment (cf. 2.2), le glyphosate agit comme un herbicide et induit l'arrêt du développement, voire la mort de la plante. Cet effet herbicide provoque une diminution de la photosynthèse, bien que le glyphosate n'agisse pas directement sur le processus photosynthétique (Tableau 1). C'est pourquoi des cellules photosynthétiques (algues et cyanobactéries) peuvent être utilisées à des fins analytiques.

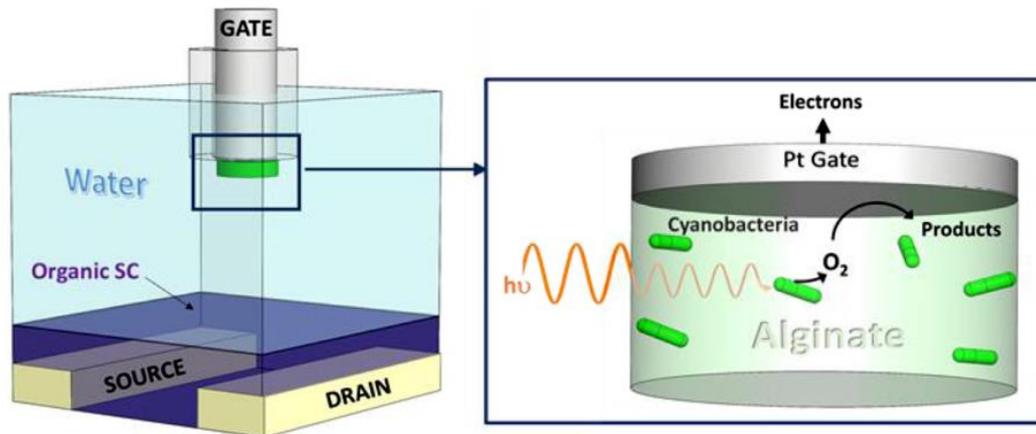


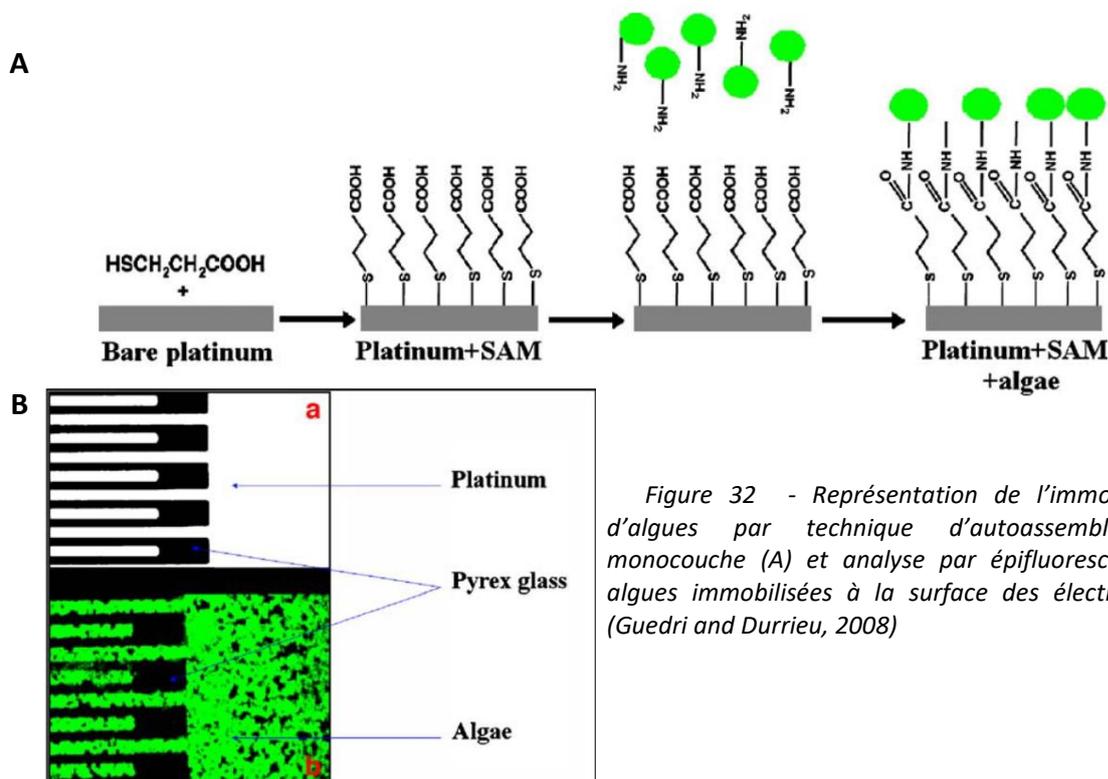
Figure 31 – Dispositif de transistor organique à effet de champ pour la détection du glyphosate grâce à des cyanobactéries piégées dans un hydrogel d’alginate à la surface de la grille.

Par exemple, *Anabaena flosaquae* est une cyanobactérie filamenteuse (nommée algue bleue) photosynthétique. Le Gall et al. décrivent alors en 2021 un transistor organique à effet de champ à grille fonctionnalisée par un hydrogel (*hydrogel-gated organic field-effect transistor*) dans lequel les cyanobactéries sont emprisonnées dans un hydrogel d’alginate au contact de l’électrode « grille » constituée de platine et interfacée par une couche de poly(DPP-DTT), un semi-conducteur organique. Le biocapteur est constitué également de deux électrodes d’or nommées « source » et « drain » séparées par de l’eau comme composant diélectrique (Figure 31).

Cette technique se base sur la modification du champ électrique entre la source et le drain par la grille où prend place la réduction du dioxygène créé par la photosynthèse des cyanobactéries, permettant une amplification des variations au niveau de la grille (Le Gall, 2020; Le Gall et al., 2021). Ceci permet une amplification du signal et abaisse la limite de détection du signal. Une baisse de signal est mesurée après une heure de mise en présence avec 10 μM (1700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) d’acide glyphosique. Il est à noter qu’une diminution de la réduction du dioxygène plus importante est mesurée en présence de concentrations plus faibles de diuron qui lui, cible spécifiquement le photosystème II.

Un deuxième exemple est décrit en 2011 par Durrieu *al.*, se basant sur l’activité estérase membranaire de deux algues (*Dunaliella tertiolecta* et *Paeodactylum tricorutum*) qui sont immobilisées sur des électrodes par technique d’autoassemblage en monocouche. Brièvement, la surface des électrodes d’or est traitée avec de l’acide 3-mercaptopropionique qui s’immobilise de manière covalente au moyen de son atome de soufre, formant une monocouche active. Les algues sont ensuite immobilisées par liaison covalente sur cette

monocouche par dépôt et incubation (Guedri and Durrieu, 2008)(Figure 32). Les mesures sont basées sur la détection des variations de conductivité de la zone sensible (liées aux espèces ioniques produites par les estérases localisées au niveau de la membrane externe de l'algue) par rapport à la condition contrôle. Les auteurs montrent que le système permet de détecter la présence d'herbicide grâce à la diminution de la conductivité au niveau de l'électrode. Néanmoins, il ne s'agit que d'une preuve de concept, permettant des analyses qualitatives et non quantitatives. Il semble qu'il soit possible de détecter des concentrations de glyphosate de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$, a priori par conductimétrie en utilisant des cellules non-immobilisées. Toutefois, cela nécessite une incubation de 48 heures des algues en présence de glyphosate pour mesurer un signal : aucune différence de signal n'est en effet détectée après 24 heures. De plus, un défaut de spécificité peut être identifié, une diminution du signal est mesurée après une incubation en présence d'AMPA, de diuron et de ses composés de dégradation. Il est intéressant toutefois de noter que dans le cas du diuron, une inhibition du signal est observée au bout de 2 heures seulement.



Globalement, les biocapteurs à microalgues ne permettent pas la détection de faibles concentrations et nécessitent des temps d'incubation relativement longs (48 h par exemple dans le dernier exemple décrit). Les algues étant des organismes végétaux photosynthétiques, les biocapteurs à micro-algues sont particulièrement utilisés pour la détection d'herbicides

photosynthétiques (classes HRAC 5, 6 et 22). Ils manquent cependant de spécificité, notamment lorsqu'ils sont utilisés pour la détection d'autres classes d'herbicides, comme le glyphosate. Ils peuvent néanmoins être utilisés contre des outils d'alerte globaux, basés non pas sur une limite de détection mais sur des limites écotoxicologiques.

3.2.2. Anticorps

Les immunocapteurs sont, après les capteurs enzymatiques, les éléments de reconnaissance biologiques permettant d'atteindre les meilleures limites de détection. L'affinité de l'anticorps pour son ligand permet de résoudre les problèmes de sélectivité. Classiquement, appliqués au glyphosate, ces systèmes utilisent la compétition d'interaction entre le glyphosate libre de l'échantillon et du glyphosate marqué (avec de la HRP par exemple) vis-à-vis des anticorps anti-glyphosate. En présence de glyphosate libre, une quantité moindre de glyphosate marqué sera retenue, d'où une diminution du signal observé.

De manière générale, les dispositifs ELISA s'accompagnent d'une détection par colorimétrie ou fluorescence : lorsque l'anticorps est immobilisé, on parlera d'essais hétérogènes. D'autres techniques de détection peuvent être utilisées dans le cadre d'immunocapteurs : la voltampérométrie cyclique (Bettazzi et al., 2018), la spectroscopie de réflectance de la lumière blanche (Stavra et al., 2020), l'électrochimiluminescence (Guerrero-Esteban et al., 2021) ou encore la spectroscopie d'impédance électrochimique (Dhamu et al., 2021; Poudyal et al., 2023, 2022).

Pour la première fois en 1999, Clegg et al. décrivent un anticorps reconnaissant le glyphosate obtenu par injection de la molécule couplée à de la BSA dans des lapins. L'anticorps est alors utilisé dans un test ELISA. Une sensibilité de $7,6 \text{ mg.L}^{-1}$ est alors décrite, avec une gamme linéaire de 10 à 1000 mg.L^{-1} . Les auteurs indiquent que ces caractéristiques peuvent être améliorées en concentrant l'échantillon avant la mesure avec un évaporateur rotatif, atteignant alors une LOD de $76 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (Clegg et al., 1999).

Cet anticorps est utilisé par la suite lors de la conception de microbilles magnétiques fonctionnalisées par Rubio et al. en 2003. Il s'agit a priori du système commercialisé (ou du moins de son précurseur) par Abraxys. La conception de ces microbilles est relativement simple : les billes sont activées avec du glutaraldéhyde et un anticorps de chèvre (dirigé contre le fragment constant des anticorps de lapin) est immobilisé sur les billes en présence d'acide

2-(N-morpholino)ethanesulfonique. Les billes sont ensuite incubées avec les anticorps anti-glyphosate (obtenus à partir de lapins). L'analyse est réalisée de manière similaire au protocole présenté en Figure 33, le produit de réaction de la HRP étant détecté par colorimétrie via l'utilisation d'un substrat chromogène de l'enzyme, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Rubio et al. décrivent alors une sensibilité de $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour un domaine linéaire de 1 à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Depuis, de nombreux tests immunologiques ont été décrits, améliorant les limites de détection de l'ordre du $\mu\text{g.L}^{-1}$ au ng.L^{-1} , utilisant principalement deux anticorps commercialisés par deux producteurs : Abraxis (utilisant a priori le protocole mis au point par (Clegg et al., 1999) et Fitzgerald (anticorps de poulet).

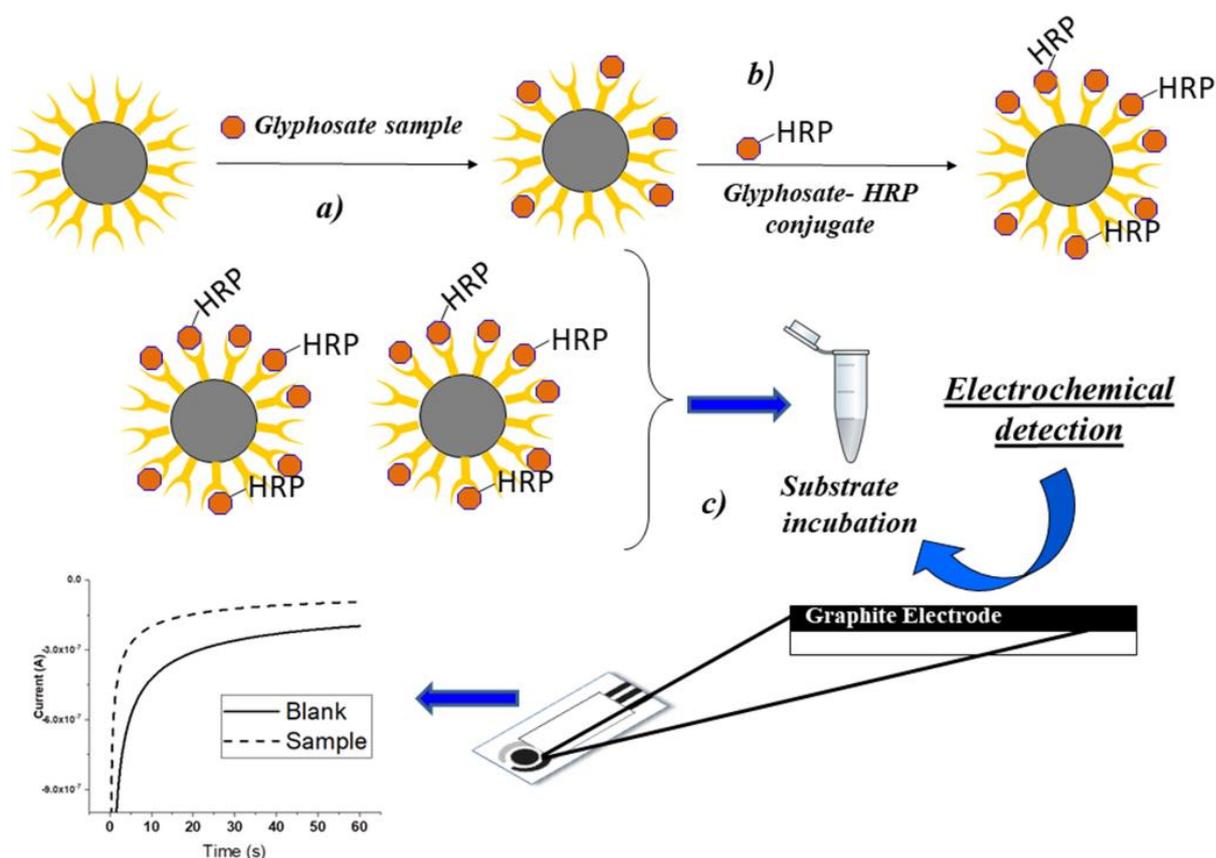


Figure 33 - Bettazi et al. proposent un essai biologique hétérogène, où des anticorps spécifiques du glyphosate sont immobilisés sur des billes magnétiques. Lors de l'incubation en présence de glyphosate libre dans l'échantillon (a), ces molécules interagissent avec les anticorps. Un conjugué de glyphosate-HRP est ensuite ajouté au milieu (b), afin de se fixer sur les anticorps. Les billes sont ensuite incubées en présence du substrat de la HRP (c) et les produits de réaction sont quantifiés par électrochimie (Bettazzi et al., 2018).

Si la plupart des immunocapteurs (basés sur des principes d'ELISA) sont associés à une détection par spectrophotométrie ou par fluorescence, Bettazzi et al. utilisent les propriétés électrochimiques du TMB (substrat de la HRP) pour adapter le test à des mesures électrochimiques (Bettazzi et al., 2018). Toutefois, le mode opératoire de ce système de détection ne peut être considéré comme un biocapteur. En effet, les auteurs utilisent le système de microbilles magnétiques d'Abraxis sur lesquelles sont greffés les anticorps anti-glyphosate. Ces billes sont incubées dans l'analyte, le glyphosate libre interagissant avec les anticorps (Figure 33 a). Un conjugué de glyphosate-HRP est ensuite additionné, permettant l'immobilisation du conjugué sur les anticorps (Figure 33 b). Les billes sont ensuite récupérées grâce à leurs propriétés magnétiques et sont incubées avec le substrat de la HRP (Figure 33 c). Après un temps d'incubation, la phase liquide est prélevée et le produit de la réaction par la HRP est dosé par électrochimie. Au final, les billes portant l'anticorps ne sont jamais en interaction avec le transducteur, d'où la classification dans les essais biologiques hétérogènes. Ce dispositif présente une limite de détection de 5 ng.L^{-1} et une courbe de calibration non linéaire a été mesurée jusqu'à $10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$. Ce dispositif est aussi un bon exemple des limitations liées à l'utilisation des immunocapteurs : les temps importants d'incubation et multiples étapes demandant l'intervention de l'opérateur.

Enfin, un accent peut être porté sur la stratégie proposée en 2020 par Dhamu et al. reprise récemment par la suite par Poudyal et al en 2021. Les auteurs proposent un système « direct », ne se basant pas sur la compétition du glyphosate libre de l'échantillon avec du glyphosate marqué. Dans ces systèmes, l'anticorps de poulet anti-glyphosate est immobilisé sur des électrodes d'or grâce à du Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP), et l'interaction du glyphosate avec les anticorps produit un changement de caractéristique de la surface qui peut être quantifié par spectroscopie d'impédance électrochimique (Lazanas and Prodromidis, 2022). Il s'agit du seul biocapteur à signal « on » décrit, à notre connaissance, dans l'utilisation d'anticorps pour la détection du glyphosate. Selon la version du système utilisé et les matrices testées, les auteurs affichent des sensibilités variant entre 0,1 et $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les deux articles les plus récents (Dhamu et al., 2021; Dhamu and Prasad, 2020; Poudyal et al., 2023, 2022).

3.2.3. Aptamères

Les aptamères sont des séquences polynucléotidiques courtes et simple brin, d'ADN ou d'ARN. Ils sont caractérisés par une structure particulière et leur capacité à se lier à des ligands avec de fortes affinité et spécificité. Souvent comparés aux anticorps, ils semblent être des éléments de reconnaissance efficaces. De plus, à la différence des anticorps, les aptamères ne sont pas sensibles aux protéases, possèdent de hautes résistances thermiques et sont faciles à produire in vitro sans grande variation entre les différentes productions. Toutefois, dans le cadre de la détection de petites molécules comme les herbicides, la séparation des anticorps ayant interagi avec ces molécules constitue le principal écueil (Phopin and Tantimongcolwat, 2020; Sassolas et al., 2011).

A priori, seuls deux aptamères ont été identifiés comme interagissant avec le glyphosate (dont l'un semble commun à plusieurs composés organophosphorés) (Tableau 4).

Tableau 4 - Récapitulatif des deux aptamères décrits comme interagissant avec le glyphosate

Séquence nucléotidique des aptamères (5' – 3')	Références
(FAM-)AGCTTGCTGCAGCGATTCTTGATCGCCACAGAGCT	(Jiang et al., 2020)
(TTTTTTT)GCTAGACGATATTCGTCCATCCGAGCCCGTGGCGGGCTT TAGGACTCT GCGGGCTTCGCGGCGCTGTCAGACTGAATATGTC	(Shao et al., 2023)

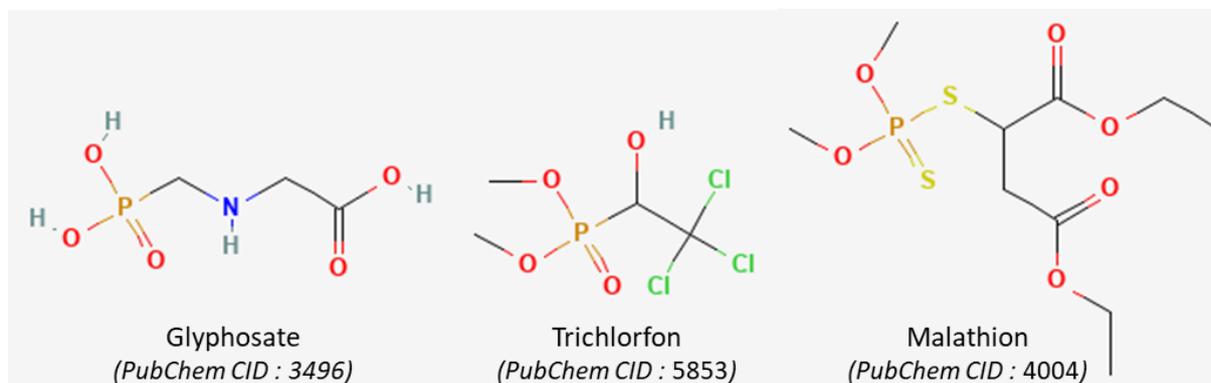


Figure 34 - Structures chimiques du glyphosate, trichlorfon et malathion, trois pesticides organophosphorés détectés par Jiang et al. (source : PubChem)

En 2020, Jiang et al. publient un aptamère caractérisé par son interaction avec trois molécules organophosphorées dont les structures sont présentées en Figure 34 : le glyphosate (herbicide), le trichlorfon (acaricide) et le malathion (insecticide). Pour construire leur essai biologique hétérogène, les auteurs utilisent des nanoparticules magnétiques décorées avec des groupements NH₂ à leur surface. Deux polynucléotides sont synthétisés :

l'aptamère interagissant avec le glyphosate, fusionné avec une étiquette 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) à son extrémité 5' (caractérisée par un signal fluorescent intense) et son ADN complémentaire, avec une étiquette thiol (groupement -SH) en extrémité 5'.

Les nanoparticules magnétiques sont activées par un bain de sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyle)cyclohexane-1-carboxylate, puis les ADN de capture sont immobilisés par pontage covalent à partir de leur groupement thiol (Figure 35). Les propriétés magnétiques des nanoparticules permettent leur séparation des différents milieux réactionnels puis lavage de manière simple (grâce à un champ magnétique). Les aptamères sont ensuite ajoutés au milieu, s'hybridant sur leurs ADN complémentaires.

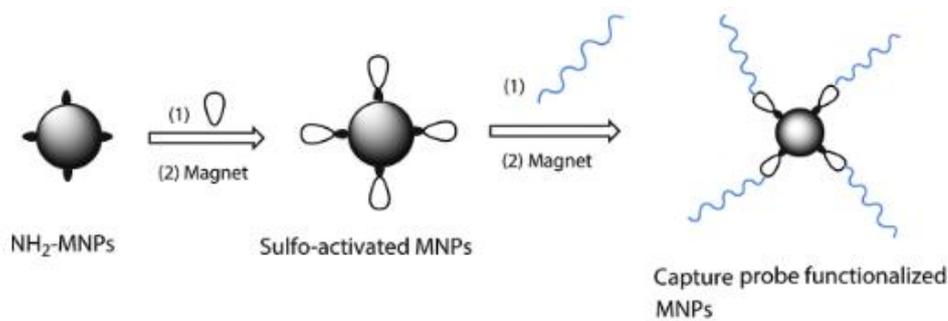


Figure 35 - Immobilisation de l'ADN complémentaire (représenté sous forme de fil bleu) fusionné avec une étiquette thiol sur la nanoparticule magnétique au niveau des groupements NH₂ activés par du sulfosuccinimidyl 4-(N-maléimidométhyle)cyclohexane-1-carboxylate (représenté sous forme de pétale blanc) (Zhang et al., 2018).

Ces nanoparticules fonctionnalisées sont introduites dans l'échantillon et incubées pendant deux heures à 37°C. Les molécules de glyphosate libres interagissent avec l'aptamère qui change de structure et se dissocie de son ADN complémentaire. Les nanoparticules sont retirées avec un champ magnétique afin de ne garder que les aptamères devenus libres. La fluorescence des groupements FAM est par la suite mesurée par spectrométrie ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 535 \text{ nm}$) en microplaque. Après deux heures d'incubation, les auteurs indiquent des limites de détection de 72,20 ng.L⁻¹, 88,80 ng.L⁻¹ et 195,37 ng.L⁻¹ pour le trichlorfon, le glyphosate, et le malathion, respectivement. Aucun signal n'est obtenu en présence de monocrotophos (autre insecticide organophosphoré) et carbaryl (carbamate). Ce dispositif est aussi testé avec des échantillons de carotte et salade supplémentés en glyphosate avec succès, obtenant des sensibilités similaires à celles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée avec un détecteur photométrique à flamme. Toutefois, il ne semble pas possible de différencier les différents composés s'ils se trouvent

tous les trois dans le même échantillon, causant de possibles problèmes de spécificité (Jiang et al., 2020).

Shao et al. proposent également un essai hétérogène pour la détection du glyphosate par PCR quantitative en 2023. Sur des microbilles magnétiques, les auteurs immobilisent un oligonucléotide polyA modifié par une extrémité NH₂. L'aptamère est synthétisé avec une tête polyT permettant son hybridation sur le polyA. L'ADN complémentaire de l'aptamère est ensuite introduit dans le milieu et hybridé. Au final, c'est donc un ADN double brin qui est immobilisé sur la microbille magnétique.

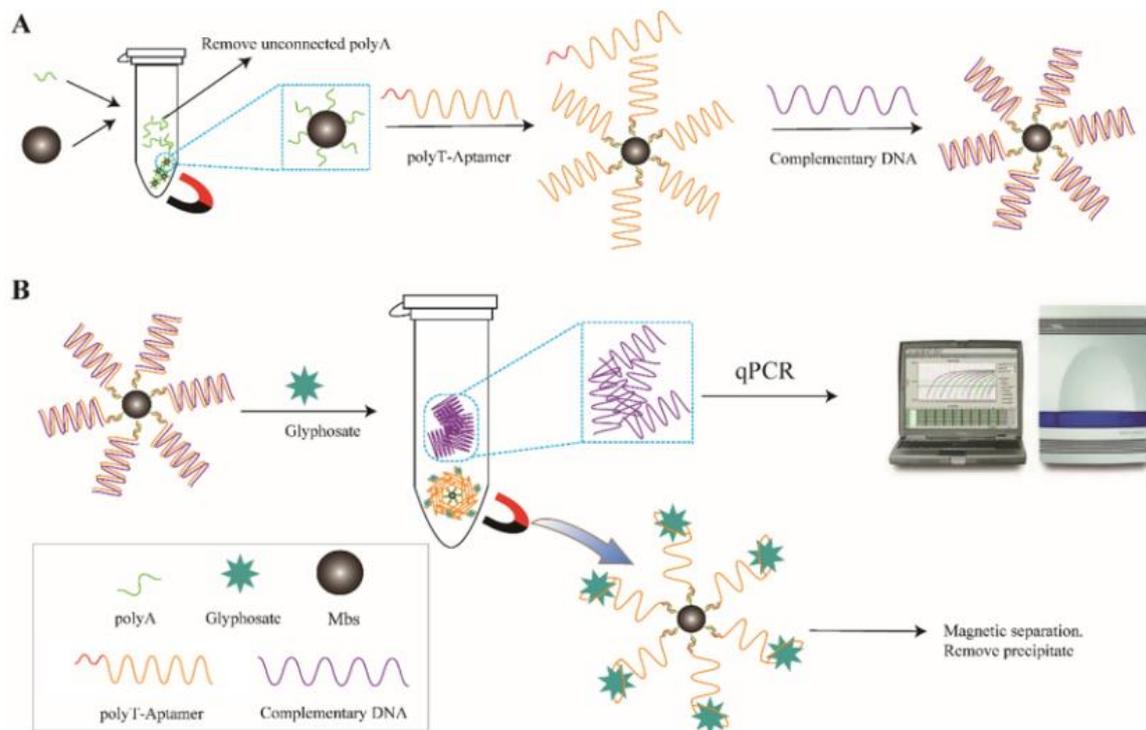


Figure 36 - (A) Des aptamères (synthétisés avec une tête polyA) interagissant avec le glyphosate sont immobilisés sur les microbilles magnétiques portant à leur surface des peptides polyA. Ces aptamères immobilisés sont ensuite saturés par hybridation avec leur ADN complémentaire afin d'obtenir les billes fonctionnalisées. (B) La détection du glyphosate se passe en deux temps. Dans un premier temps, les billes fonctionnalisées sont incubées pendant trois heures dans l'échantillon. Les molécules de glyphosate vont alors provoquer la libération des ADN complémentaires en interagissant avec l'aptamère. Les ADN complémentaires libres sont ensuite quantifiés par PCR quantitative (Shao et al., 2023).

Les billes fonctionnalisées sont ensuite placées dans l'échantillon et incubées pendant trois heures. Pendant cette incubation, les molécules de glyphosate libres vont interagir avec l'aptamère, provoquant la dissociation de l'ADN complémentaire. A la fin de l'incubation, les billes sont retirées de l'échantillon grâce à leurs propriétés magnétiques et l'ADN complémentaire dissocié est dosé par PCR quantitative. Les auteurs indiquent une limite de détection de 101 µg.L⁻¹ (et un domaine de linéarité de 0,1 à 5073 mg.L⁻¹). Cette technique

appliquée à un échantillon d'eau de rivière n'a pas révélé d'effet de matrice et aucun faux signal positif n'est obtenu en présence d'autres herbicides (acétamipride, chlorpyrifos, diméthoate, trichlorfon, méthomyl et propoxur) (Shao et al., 2023).

Pour conclure, si l'utilisation d'aptamères à des fins analytiques permet une détection du glyphosate relativement sensible, elle implique un temps d'incubation très important (deux à trois heures)

3.2.4. Autres interactions

Enfin, trois dispositifs pour la détection du glyphosate relativement originaux sont décrits dans la littérature, utilisant comme élément de reconnaissance biologique un oligopeptide (Ding and Yang, 2013), une protéine (la *phosphonate binding protein* d'*E. Coli*) (N'Guetta et al., 2020) et la peroxydase de courgette (Muenchen et al., 2018).

Utilisation d'un peptide à des fins analytiques

En 2013, Ding et Yang identifient, à partir d'une bibliothèque de phages, un peptide de 12 résidus d'acides aminés (TPFDLRPSSDTR) capable d'interagir avec le glyphosate. Contrairement aux anticorps, et outre leur facilité de synthèse, les oligopeptides présentent une très bonne stabilité dans des conditions complexes. Après avoir identifié cet oligopeptide, un espaceur (GGGC) est ajouté au peptide à l'extrémité C-terminale. Le peptide est alors immobilisé grâce à la fonction thiol de la cystéine sur une surface d'or. En contact avec l'échantillon, le peptide interagit avec le glyphosate en solution et la modification des plasmons de surface qui en résulte peut être mesurée par résonance plasmonique de surface (SPR). Cette technique permet la détection du glyphosate à partir de $98 \mu\text{g.L}^{-1}$, avec un domaine de linéarité jusqu'à $845 \mu\text{g.L}^{-1}$, et ce sans interférences avec la glycine ($1,2 \text{ mg.L}^{-1}$), le thiaclopride ($4,04 \text{ mg.L}^{-1}$) et l'imidaclopride ($4,9 \text{ mg.L}^{-1}$) (Ding and Yang, 2013)

Il s'agit, *a priori*, du seul peptide décrit dans la littérature, reconnaissant de manière spécifique le glyphosate. Les auteurs, par ailleurs, n'ont pas communiqué par la suite.

L'usage de la phosphatase binding protein pour la détection du glyphosate

Les *periplasmic binding proteins* bactériennes (PBPs) sont des protéines présentes dans l'espace intermembranaire des bactéries Gram négatives, impliquées dans la reconnaissance et le transport de petites molécules à travers la membrane interne afin de les internaliser. Elles participent ainsi à la perception de son environnement par la bactérie et chez certaines espèces, au *quorum sensing*. Ces protéines sont caractérisées par un changement très important de la conformation tridimensionnelle par un mouvement de flexion de charnière (*hinge-bending motion*) lorsqu'elles se lient à leur substrat (Figure 37). Ce changement important de conformation est exploité dans la conception de biocapteurs pour la détection des ligands naturels en modifiant la protéine ou en modifiant la poche de reconnaissance pour permettre la reconnaissance de nouveaux éléments (Edwards, 2021; Grünwald, 2014).

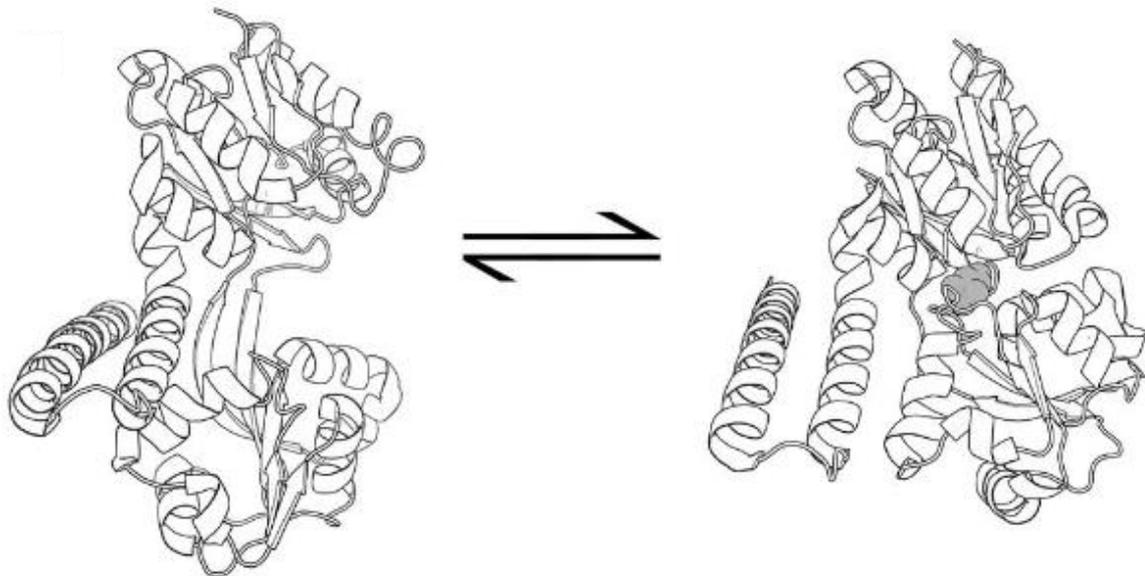


Figure 37 - Changement conformationnel de la phosphatase binding protein induit par l'interaction de la protéine avec son substrat naturel (N'Guetta et al., 2020)

En particulier, la *phosphatase binding protein* est une protéine de la famille des PBPs. Son ligand naturel est 2-aminoéthyl phosphonate (2-AEP), avec un K_d de 5 nM et présentant une analogie structurale avec le glyphosate (Figure 38). Le glyphosate interagit lui aussi avec la protéine mais avec une affinité très faible (K_d de 650 μ M). La cristallisation de la protéine a permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le 2-AEP : Tyr47, Tyr93, Ser127, Thr128 et Ser129 pour le groupement phosphonate, Glu177 et Asp205 pour le groupement amine (Alicea et al., 2011). Dans leur étude, N'Guetta et al. modifient par ingénierie moléculaire ces deux dernier résidus : ils obtiennent alors le simple mutant E177N,

présentant un K_d de 8 μM pour le glyphosate (80 fois inférieur à la protéine naturelle), et améliorent encore l'affinité jusqu'à un K_d de 4,2 μM en tronquant les 9 résidus à l'extrémité C-terminale.



Figure 38 – L'analogie structurale entre le glyphosate (à gauche) et le 2-aminoethyl phosphonate (à droite), substrat de la « phosphatase binding protein » fait de cette dernière un élément de choix pour la reconnaissance du glyphosate, en modifiant la poche de reconnaissance de la protéine.

Cette protéine a pu ensuite être utilisée dans un essai biologique pour la détection du glyphosate. Un fluorophore (la coumarine) est conjugué par incubation avec la protéine en présence de 1 mM de tris(2-carboxyéthyl)phosphine. Une extinction de la fluorescence est observée lors de la fixation du glyphosate, permettant sa détection à partir de 170 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (pour le glyphosate comme pour le RoundUp®) (N'Guetta et al., 2020). Il s'agit cependant bien d'un essai biologique homogène, l'enzyme n'étant jamais immobilisée, mais l'originalité de l'élément de reconnaissance peut être mentionnée.

Enfin, dans leurs travaux, Muenchen et al. immobilisent de la peroxydase de courgette (*Cucurbita pepo*) sur la pointe d'un *cantilever* de microscope à force atomique (AFM) grâce à de l'autoassemblage en monocouche. L'interaction entre l'analyte (glyphosate) en solution et la protéine induit un changement de conformation de cette dernière, conduisant à un changement de la tension de surface qui peut être mesuré et converti en tension électrique. Une LOD de 28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ est alors obtenue. Toutefois, il semble que les auteurs n'aient pas réalisé d'étude de spécificité et l'effet des matrices environnementales n'est pas évalué (Muenchen et al., 2018).

Tableau 5 - Description des différents dispositifs de détection du glyphosate en fonction des différents éléments de reconnaissance biologique utilisés. Adapté de (Delprat et al., 2023)

Eléments de reconnaissance	Méthodes de détection	Principe	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
<i>Aptamères (essai biologique hétérogène)</i>				
Aptamère (cf. Tableau 4)	Fluorescence	Compétition	$88,80 \times 10^{-3}$	(Jiang et al., 2020)
Aptamère (cf. Tableau 4)	qPCR	Interaction	101	(Shao et al., 2023)
<i>Biocapteurs enzymatiques</i>				
Acétylcholinestérase	Transistor à effet de champ	Inhibition	$6,4 \times 10^{-8}$	(Yu et al., 2021)
Acétylcholinestérase and choline oxydase	ECL (Luminol-Au)	Inhibition	85×10^{-3}	(Liu et al., 2020)
Phosphatase acide	Chronoampérométrie	Inhibition	15×10^{-3}	(Butmee et al., 2021)
<i>Atemoya</i> peroxydase	SWV	Inhibition	30	(Oliveira et al., 2012)
Glycine oxydase	Chronoampérométrie	Réact. enzym.	512	(Johnson et al., 2022)
HRP	Voltammétrie cyclique	Inhibition	1,70	(Songa et al., 2009a)
HRP	SWV	Inhibition	5,44	(Roman et al., 2020)
HRP	Voltammétrie cyclique	Inhibition	223×10^{-6}	(Cahuantzi-Muñoz et al., 2019)
HRP	SWV	Inhibition	45×10^{-3}	(Kergaravat et al., 2021)
HRP	Chronoampérométrie	Inhibition	25	(Zambrano-Intriago et al., 2023)
Tyrosinase	Chronoampérométrie	Inhibition	1,1	(Sok and Fragoso, 2019)
Uréase	Potentiométrie	Inhibition	500	(Vaghela et al., 2018)
<i>Essais biologiques enzymatiques</i>				
Acétylcholinestérase	Absorbance	Inhibition	0,05	(Kukkar et al., 2021)
Acétylcholinestérase	Absorbance	Inhibition	0,1	(Tan et al., 2017)

Acetylcholinesterase	Colorimétrie	Inhibition	0,56	(Wei et al., 2021)
	Fluorescence	Inhibition	0,48	(Wei et al., 2021)
Acetylcholinesterase	Absorbance	Inhibition	25	(Zhao et al., 2023)
EPSPS	Absorbance	Inhibition	8,45	(Döring et al., 2019)
EPSPS	RICM	Interaction	$1,69 \times 10^{-3}$	(Rettke et al., 2020)
Glyphosate oxydase	CL	Réact. enzym	89,5	(Qin et al., 2020)
HRP	Colorimétrie	Inhibition	2000	(Ibarra Bouzada et al., 2021)
HRP	Fluorescence	Inhibition	4	(Ibarra Bouzada et al., 2021)
HRP	SWV	Inhibition	85×10^{-6}	(Kergaravat et al., 2021)
HRP	ECL (Quantum Dots)	Inhibition	17×10^{-3}	(Zhang et al., 2015)
Trypsine	Fluorescence	Inhibition	37×10^{-3}	(Li et al., 2019)
<i>Immunocapteurs</i>				
Anticorps	Absorbance	Compétition	7600	(Clegg et al., 1999)
Anticorps	Absorbance	Compétition	0,1	(Bhullar, 1999; Lee et al., 2002)
Anticorps (Clegg et al., 1999)	Absorbance	Compétition	0,6	(Rubio et al., 2003)
Anticorps (Abraxis)	Fluorescence	Compétition	0,021	(González-Martínez et al., 2005)
Anticorps (Abcam)	Fluorescence	Compétition	0,062	(Lee et al., 2013)
Anticorps (Abraxis)	Voltammétrie cyclique	Compétition	0,005	(Bettazzi et al., 2018)
Anticorps (Agrisera AB)	Fluorescence	Compétition	$405 \cdot 10^3$	(Viirlaid et al., 2019)
Anticorps (Fitzgerald)	WLRS	Compétition	0,01	(Stavra et al., 2020)
Anticorps (Abraxis)	ECL	Compétition	0,009	(Guerrero-Esteban et al., 2021)

Anticorps (Fitzgerald)	EIS	Compétition	10	(Dhamu et al., 2021; Dhamu and Prasad, 2020)
Anticorps (Fitzgerald)	EIS	Interaction	0,1	(Poudyal et al., 2022)
Anticorps (Fitzgerald)	EIS	Interaction	1	(Poudyal et al., 2023)
Anticorps (Abraxis)	Absorbance	Compétition	0,05	(Eurofins, 2023)
<i>Biocapteurs basés sur des interactions</i>				
<i>E. coli</i> phosphonate-binding protein (PhnD)	Fluorescence	Interaction	169	(N'Guetta et al., 2020)
Oligopeptide (TPFDLRPSSDTR)	SPR	Interaction	98	(Ding and Yang, 2013)
Zucchini peroxydase	AFM-assisted cantilever	Interaction	28	(Muenchen et al., 2018)
<i>Biocapteurs à cellules entières</i>				
Anabaena flos-aquae	Transistor à effet de champ	Inhibition	1690	(Le Gall et al., 2021)
<i>Essais à cellules entières</i>				
<i>Scenedesmus acutus</i> or <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inspection visuelle ou spectrophotométrie	Inhibition	10 × 10 ³ (ac. gp) 15 × 10 ³ (gbf)	(Prudkin-Silva et al., 2021)
<i>D. tertiolecta</i> ou <i>P. tricornutum</i>	Fluorescence	Inhibition	1	(Durrieu et al., 2011)

CL : Chimiluminescence, ECL : Electrochimiluminescence, EIS : *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (spectroscopie d'impédance électrochimique), ac. gp : acide glyphosique, gbf : glyphosate based formulation (formulation à base de glyphosate), RICM : *Reflection Interference Contrast Microscopy* (microscopie à réflexion interférentielle), SPR : *Surface Plasmonic Resonance* (résonance plasmonique de surface), SWV : *Square wave voltammetry* (voltampérométrie à ondes carrées), Réact. enzym : Réaction enzymatique, WLRS : White Light Reflection Spectroscopy (Spectroscopie de réflectance de la lumière blanche)

3.2.5. Enzymes

La quasi-totalité des systèmes de détection du glyphosate utilisant une enzyme se basent sur l'inhibition de cette enzyme par le glyphosate (signal « *off* »). Etant donné la nature du transducteur, seuls les systèmes électrochimiques décrits peuvent être considérés comme des biocapteurs, l'enzyme étant immobilisée au niveau de l'électrode. Dans le cas d'une détection par fluorescence, absorbance ou luminescence, l'enzyme n'étant pas immobilisée sur la photodiode ou la caméra CCD, on considérera qu'il s'agit d'essais biologiques hétérogènes (cf.3.1.2).

Dans le cadre de la détection enzymatique du glyphosate, deux enzymes se distinguent : la HRP et l'acétylcholinestérase (AChE). D'autres enzymes sont utilisées dans la conception de capteurs à signal « *off* » pour la détection du glyphosate : l'uréase (Vaghela et al., 2018), la tyrosinase (Sok and Fragoso, 2019), la phosphatase acide (Butmee et al., 2021), la trypsine (Li et al., 2019) ou la peroxydase d'*Atemoya* (Oliveira et al., 2012) ou encore l'EPSPS (Döring et al., 2019; Rettke et al., 2020).

3.2.5.1. Utilisation de la peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase, HRP*)

La HRP est l'enzyme la plus utilisée pour la détection du glyphosate. Cette enzyme est souvent associée à des techniques de mesure électrochimiques (chronoampérométrie, voltampérométrie cyclique, voltampérométrie à ondes carrées) mais aussi, dans des essais biologiques, à des techniques d'absorbance et fluorescence (Ibarra Bouzada et al., 2021) ou encore d'électrochimiluminescence (Zhang et al., 2015).

Réduction directe du peroxyde d'hydrogène en eau par la HRP

Le premier système de détection utilisant la HRP pour la détection du glyphosate est décrit par Songa et al. en 2009. Ce système se base sur un polymère de poly(2,5-diméthoxyaniline)-acide poly(4-styrènesulfonique) électropolymérisé et électrodéposé sur des électrodes d'or. Ce polymère est ensuite oxydé en présence de HRP, oxydation pendant laquelle l'hème de l'enzyme interagit avec la surface du polymère par interactions électrostatiques, permettant un transfert des électrons de l'hème à l'électrode (Figure 39).

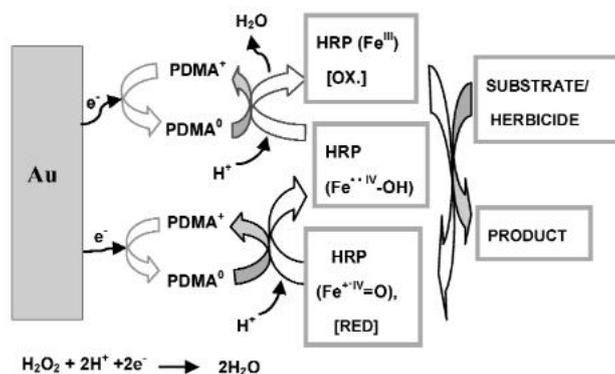


Figure 39 – Détection du glyphosate par inhibition de la HRP immobilisée sur un polymère de PDMA, médiateur électrochimique permettant le transfert des électrons de l'électrode vers la HRP (Songa et al. 2009).

En présence de peroxyde d'hydrogène et à l'imposition d'un potentiel de réduction, l'électrode cède les électrons permettant la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, d'où l'augmentation de l'intensité du signal mesurée par voltampérométrie cyclique (intensité du pic de réduction) ou chronoampérométrie. C'est cette intensité qui diminue en présence d'herbicide du fait de l'inhibition de l'enzyme par le glyphosate. Une relation de linéarité entre l'intensité (ou pourcentage d'inhibition) et la concentration en glyphosate est déterminée, permettant de mesurer des concentrations en glyphosate à partir de $1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ par voltampérométrie cyclique et $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ par chronoampérométrie. Cependant, le glufosinate et l'AMPA sont décrits comme pouvant également être détectés, à des doses similaires pour le glufosinate (Songa et al., 2009c, 2009a, 2009b)

La réduction du peroxyde d'hydrogène en eau par la HRP est utilisée plus récemment par Cahuantzi-Muñoz et al., 2019. Dans ce dispositif, la HRP est adsorbée à la surface d'électrodes de graphite-epoxy sur des nanotubes de carbone multi-feuillets. Dans ce cas, le pic de réduction est mesuré par voltampérométrie cyclique et permet la détection du glyphosate à partir de $0,22 \text{ ng.L}^{-1}$, ce qui est la meilleure sensibilité pour les biocapteurs à HRP à ce jour. Ce dispositif est testé avec des échantillons de maïs supplémentés en glyphosate, permettant de mettre en avant la robustesse du dispositif dans une matrice complexe. Par ailleurs, aucune interférence avec le chlorpyrifos (un insecticide organophosphoré) n'a été observée (Cahuantzi-Muñoz et al., 2019).

Hydroquinone comme substrat de la HRP

L'hydroquinone est un substrat de la HRP. En présence de peroxyde d'hydrogène, la HRP catalyse la double oxydation d'une molécule d'hydroquinone donnant une molécule de benzoquinone. Cette benzoquinone peut être ensuite régénérée électrochimiquement au contact de l'électrode lors de l'imposition d'un potentiel de 0,5 V vs Ag/AgCl (Figure 40).

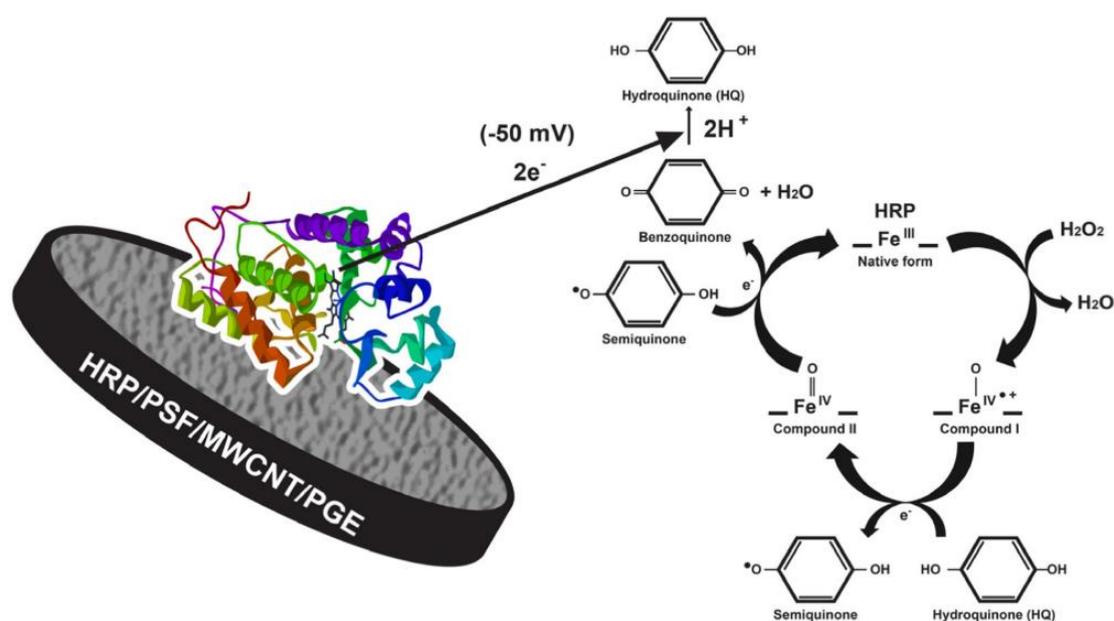


Figure 40 - La HRP catalyse l'oxydation de l'hydroquinone en benzoquinone. Cette dernière est ensuite réoxydée par l'électrode, menant à une augmentation de l'intensité du courant de réduction (Zambrano-Intriago et al., 2023)

Dans leurs travaux, Zambrano-Intriago et al. utilisent une mine de crayon en graphite connectée avec un fil de cuivre. La HRP est immobilisée sur cette électrode par piégeage (procédure d'inversion de phase) dans une membrane de polysulfone (PSF) dopée aux nanotubes de carbone multi-lamellaires. Les auteurs proposent ainsi un dispositif sous forme de crayon qui peut être plongé dans un échantillon supplémenté en peroxyde d'hydrogène. En présence de glyphosate, la HRP est inhibée et la formation de benzoquinone plus faible, entraînant une diminution de l'intensité du courant de réduction qui peut être liée à la concentration en glyphosate. Le dispositif a été testé avec de l'eau de rivière et de l'eau potable supplémentées en glyphosate et préalablement filtrées, le pH ayant été ajusté à 6,0. Les auteurs indiquent une LOD de 25 µg.L⁻¹, un domaine de linéarité de 0,1 à 10 mg.L⁻¹ ainsi qu'un coût de 2 dollars. Aucune interférence avec les diméthoate, méthomyl et mésosulfuron-méthyl n'a été mesurée (Zambrano-Intriago et al., 2023).

Le même substrat (hydroquinone) est utilisé par Roman et al. selon un concept similaire, immobilisant cette fois la HRP sur un film de polyalanine préalablement électropolymérisé sur du silicone. La détection du glyphosate se fait après une incubation pendant 20 minutes du dispositif dans l'échantillon supplémenté en glyphosate par technique de voltampérométrie à onde carrée, avec une LOD de $5,44 \mu\text{g.L}^{-1}$ annoncée pour la détection du glyphosate (Roman et al., 2020).

o-phénylendiamine comme substrat de la HRP

La *o*-phénylendiamine (ou 1,2-diaminobenzène) est un autre substrat de la HRP qui catalyse sa dimérisation en 2,3-diaminophénazine (Figure 41) qui a des propriétés colorimétriques (orange brun, alors que la forme réduite est jaune), fluorescentes et électrochimiques (le dimère peut être réduit au contact de l'électrode)(Garcia de la Rosa et al., 2006). L'inhibition de cette réaction par le glyphosate, et donc de la synthèse de 2,3-diaminophénazine, peut ainsi être mise à profit pour la détection du glyphosate par voie électrochimique (Figure 41) (Kergaravat et al., 2021), colorimétrique ou par fluorescence (Ibarra Bouzada et al., 2021).

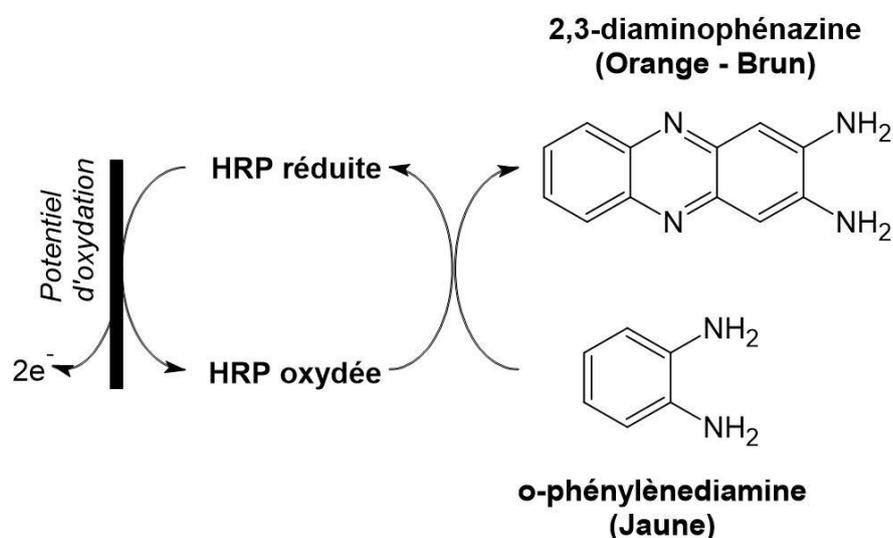


Figure 41 - Oxydation de la HRP au contact de l'électrode conduisant à la réduction de la *o*-phénylendiamine en 2,3-diaminophénazine, de couleur marron. Adapté de (Kergaravat et al., 2021).

En particulier, Kergaravat et al. immobilisent de la HRP fusionnée à de la biotine sur des électrodes (fonctionnalisées, avec de la streptavidine immobilisée à leurs surfaces grâce à du 1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) et du N-hydroxy-succinimide (NHS). Comme précédemment, la présence de glyphosate induit une diminution du signal obtenu par voltampérométrie à ondes carrées. La LOD annoncée est de $0,045 \mu\text{g.L}^{-1}$ (15% d'inhibition), avec un domaine linéaire de $0,08$ à $11 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kergaravat et al., 2021).

3.2.5.2. Utilisation de l'acétylcholinestérase

La deuxième enzyme la plus utilisée est l'**acétylcholinestérase (AChE)**, qui est utilisée dans de nombreux dispositifs analytiques comme mentionné en 3.1.3, principalement dans le cadre de la détection des herbicides organophosphorés ou carbamates (Pundir and Chauhan, 2012). Le glyphosate inhibe alors l'hydrolyse de l'acétylcholine (ou acétylthiocholine) en choline (ou thiocholine) et acide acétique (Figure 42), le suivi de la réaction se faisant en analysant la concentration de choline (ou thiocholine).

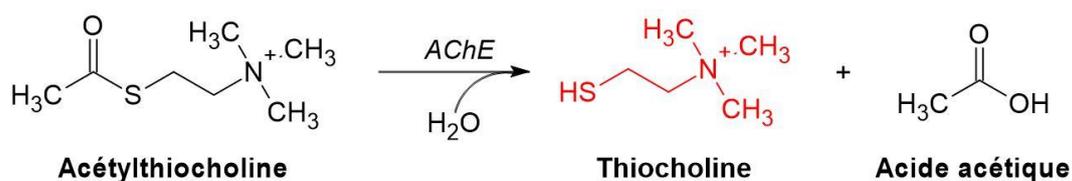


Figure 42 - Hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'AChE

Le test d'Ellman est un test classique de mesure de la thiocholine, s'appuyant sur la rupture du pont disulfure du 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) en présence du groupement thiol, libérant de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) présentant un pic d'absorbance à 412 nm (Figure 43) (Ellman et al., 1961). L'inhibition de l'AChE conduit ainsi en présence de glyphosate à une diminution de l'absorbance à 412 nm proportionnelle (dans une certaine gamme) à la quantité de glyphosate dans le milieu.

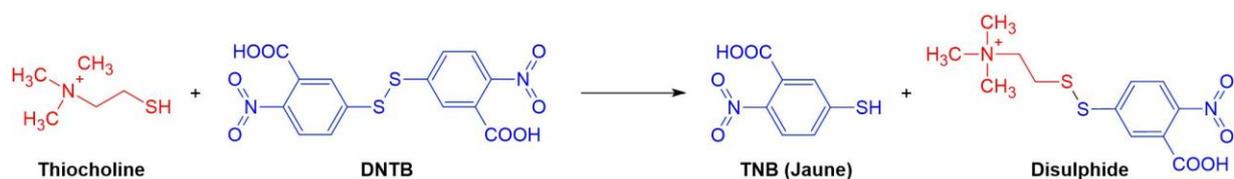


Figure 43 – Dosage de la thiocholine par le test d'Ellman par mesure de l'absorbance du TNB à 412 nm

Cette technique est reprise en 2021 par Kukkar et al., en utilisant une AChE encapsulée dans une structure zéolithique d'imidazolate (Kukkar et al., 2021).

Immobilisée sur la grille d'un transistor à effet de champ avec du chitosane, la acétylthiocholinestérase produit de la thiocholine qui, sous l'effet de la lumière, peut être dégradée et produire des électrons au niveau de l'électrode, conduisant à une modification du courant entre la source et le drain. L'inhibition de cette réaction conduit à une diminution de la modification de ce courant et permet ainsi de doser le glyphosate (tout comme le glufosinate et le malathion) présent dans le milieu réactionnel, conduisant à des limites de détection remarquablement basses, de l'ordre de $6,4 \cdot 10^{-8} \mu\text{g.L}^{-1}$ après une incubation de 9 minutes. Les auteurs indiquent toutefois des interférences partielles avec l'imidaclopride (insecticide) et le carbaryl, en plus des détections du glufosinate et du malathion (Yu et al., 2021). Cependant, l'enzyme est immobilisée sur la grille. Comme évoqué plus haut, c'est la variation du courant passant de la source au drain qui est mesurée : on peut ainsi supposer que la source et particulièrement le drain constituent le transducteur. Dans ce travail, ce dispositif sera ainsi qualifié d'essai biologique hétérogène.

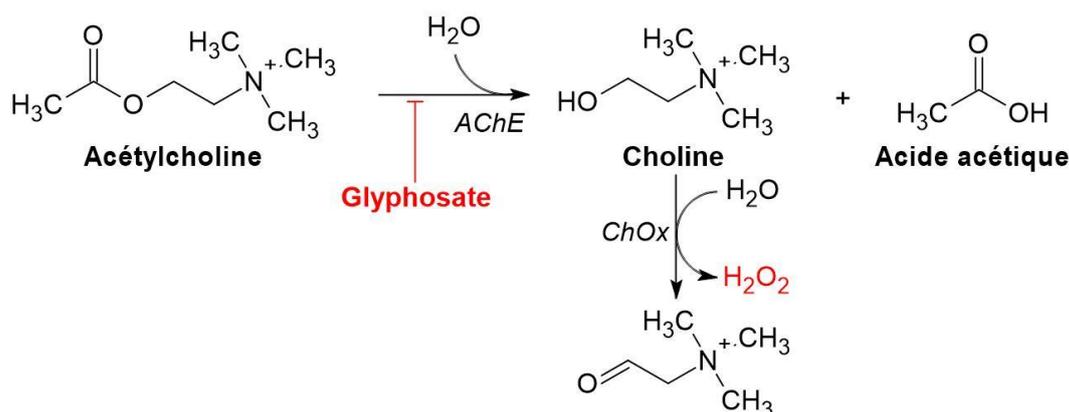


Figure 44 - Inhibition par le glyphosate de la production de peroxyde d'hydrogène par le système bi-enzymatique AChE/ChOx mis en place par Liu et al., 2020

La choline oxydase (ChOx) catalyse l'oxydation de la choline en produisant du peroxyde d'hydrogène. Liu et al. co-immobilisent l'AChE et la ChOx sur des électrodes de carbone vitreux modifiées par des nanoparticules d'or et un complexe L-Cys-Cu(II). En absence de glyphosate, la présence d'acétylcholine génère du peroxyde d'hydrogène (Figure 44) qui est converti en signal lumineux, simultanément par chimiluminescence du luminol catalysée par le Cu(II) imitant une peroxydase et par électrochimiluminescence (Figure 45). En présence de glyphosate, l'inhibition de l'AChE diminue la quantité de peroxyde d'hydrogène produite et on observe une complexation du glyphosate avec le Cu(II), conduisant à un relargage du cuivre et donc à une diminution de la catalyse de la réaction de chimiluminescence. Une diminution après une heure d'incubation du signal de luminescence résulte de cette double inhibition et

peut être reliée à la concentration de glyphosate jusqu'à une LOD annoncée de $0,085 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les auteurs ne décrivent aucune interférence en présence de deltaméthrine, de acridine, de chlorpyrifos, de carbendazim et lors des tests avec des matrices environnementales (Liu et al., 2020).

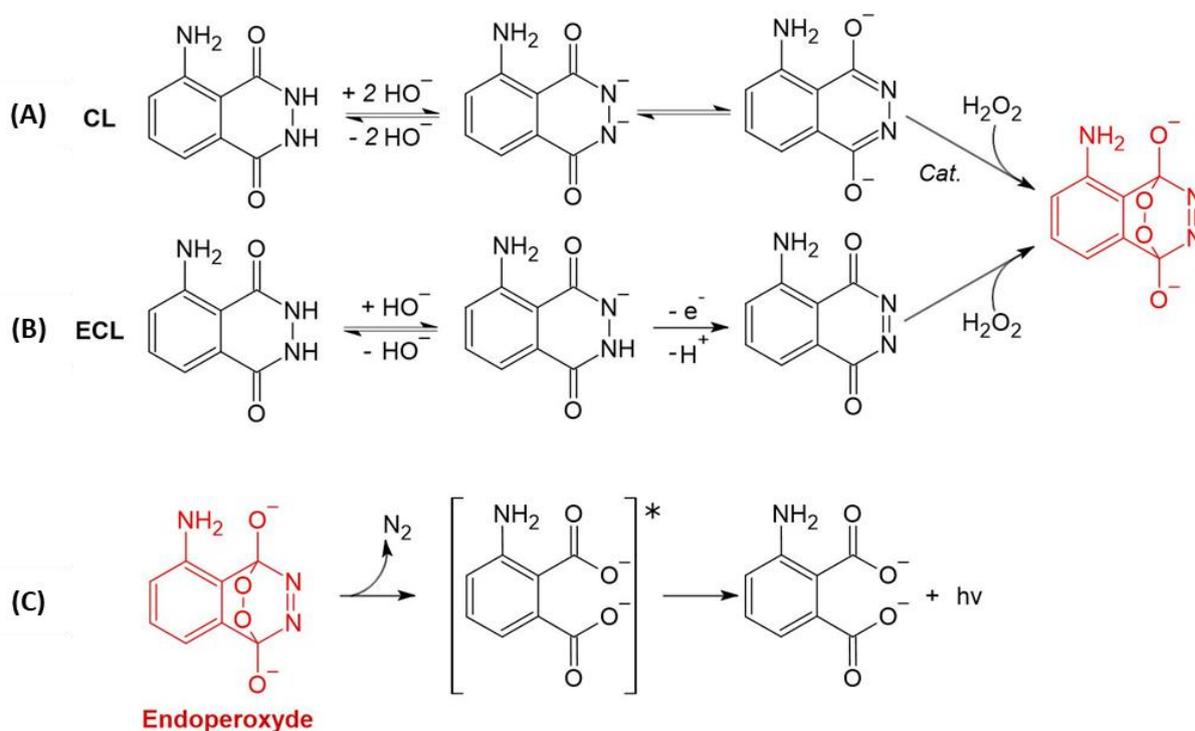


Figure 45 - Détection du peroxyde d'hydrogène par réactions de chimiluminescence (CL) impliquant une peroxydase ou un métal (A) ou d'électrochimiluminescence (ECL) du luminol impliquant l'application d'un potentiel (B), aboutissant à la formation d'un ion endoperoxyde (en rouge). Cet ion endoperoxyde se transforme en 3-aminophthalate excité (par élimination d'une molécule de N_2) qui libère son énergie sous forme de photons lors de son retour à l'état fondamental (C). Adapté de (Darwish et al., 2023; Kim and Pyun, 2009; Sakura, 1992).

La thiocholine est aussi à l'origine de l'agrégation de nanoparticules de $^{100}\text{sCO-Au}$ mesurable par spectrophotométrie (changement de couleur de rouge à violet) ou par spectroscopie Raman améliorée en surface (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) au bout d'une quinzaine de minutes. Ce test a été montré robuste dans des échantillons de bière mais aucune étude de spécificité n'a été présentée (Tan et al., 2017). Le même principe peut être appliqué avec des particules d'or : le soufre de la thiocholine réagit alors avec des nanoparticules d'or, créant une liaison covalente Au-S et provoquant l'agrégation des nanoparticules qui changent de couleur (rouge vers bleu). La concentration de glyphosate est mesurée par la suite par spectrophotométrie ou analyse d'image sur une photographie. Ce dispositif permet ainsi la détection du glyphosate (LOD de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$) mais les auteurs indiquent que le dispositif ne permet pas à ce jour de discriminer plusieurs herbicides dans le même

échantillon (Zhao et al., 2023). Enfin, ce principe est utilisé par Wei et al. en utilisant des nanoparticules d'or (changement de couleur de rouge à gris) avec une analyse par traitement d'image (photographie) ou des quantum dots (changement de couleur de vert vers jaune puis rouge du fait d'une extinction de fluorescence causée par un phénomène de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET)) avec une analyse par fluorescence (Wei et al., 2021). Cependant, l'ensemble des auteurs de ces trois derniers systèmes évoquent l'interférence d'autres pesticides (herbicides et insecticides en particulier) et donc un manque de spécificité.

3.2.5.3. Deux dispositifs enzymatiques de détection à signal « on » pour la détection du glyphosate

Comme mentionné précédemment, les biocapteurs à signaux « off » souffrent d'un manque de sélectivité, étant sensibles à des familles de pesticides ou à la présence de métaux. Les capteurs à signaux « on » quant à eux permettent généralement une meilleure spécificité. Deux capteurs à signaux « on » sont décrits pour la détection du glyphosate.

Même s'il est plus récent, le premier dispositif que nous décrivons ici est conceptuellement plus simple (Johnson et al., 2022). Du fait de la proximité structurale entre le glyphosate et la glycine, Johnson et al. mettent à profit la faible spécificité de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis* qui catalyse, en plus de l'oxydation de la glycine, celle du glyphosate, générant de l' H_2O_2 à partir du dioxygène, accepteur final des électrons.

Le transducteur dans ce cas est une électrode, obtenue par irradiation d'un film de polyimide avec un laser à dioxyde de carbone afin de former du graphène. Des nanoparticules de platine sont ensuite réduites (- 0,5 vs Ag/AgCl) afin de les électrodéposer sur le graphène. L'enzyme est ensuite immobilisée sur l'électrode par piégeage dans du glutaraldéhyde. L'imposition d'un potentiel de 0,6 V vs Ag/AgCl permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en dioxygène. Par conséquent, plus le nombre de réductions au niveau de l'électrode est important, plus l'intensité de courant de réduction est importante (Figure 46). Les auteurs arrivent ainsi à pouvoir détecter par chronoampérométrie en seulement 150 secondes la présence de glyphosate à partir de $51 \mu g.L^{-1}$, avec un domaine de linéarité de 1,7 à $55 mg.L^{-1}$.

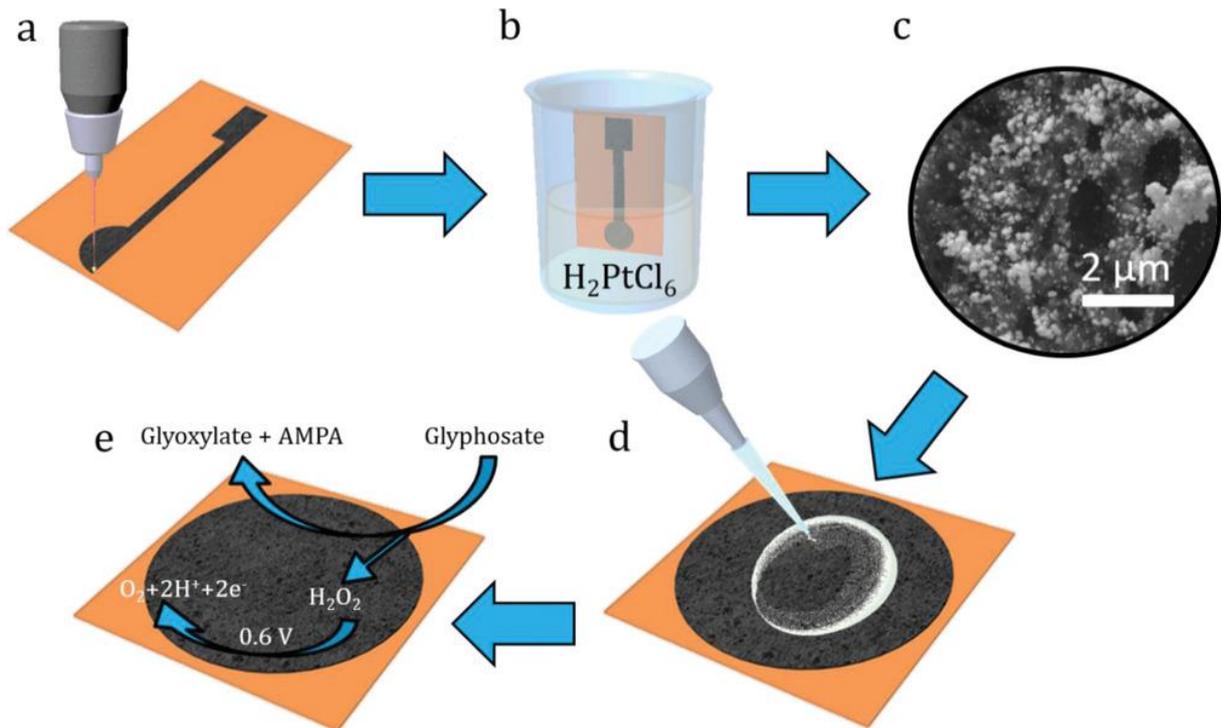


Figure 46 – Schéma de la conception du biocapteur proposé par Johnson et al. L'électrode est composée de graphène obtenu à partir de polyimide irradié avec un laser à dioxyde de carbone (a). Les nanoparticules de platine sont électrodéposées sur le graphène (b), permettant la catalyse de la réduction du peroxyde d'hydrogène lors de l'imposition d'un potentiel de 0,6 V (e). Ce peroxyde d'hydrogène est un produit de l'oxydation du glyphosate catalysée par la glycine oxydase immobilisée avec du glutaraldéhyde (Johnson et al., 2022).

Il est évident que la présence de glycine dans l'échantillon nuit fortement à la mesure. Etant donné que le site de fixation du glyphosate est le même site que celui de la glycine, le glyphosate est considéré comme un inhibiteur compétitif. Si les caractéristiques cinétiques de l'enzyme ont été déterminées en présence de glycine (K_M de 1,9 mM, $k_{cat} = 16,3 s^{-1}$), l'étude n'a pas été réalisée en présence de glyphosate. Toutefois, Pedotti et al. ont décrit et caractérisé la même glycine oxydase de *Bacillus subtilis* (Pedotti et al., 2009a, 2009b). Ils rapportent alors pour l'enzyme sauvage un K_M de 0,7 mM (k_{cat} de $0,6 s^{-1}$) vis-à-vis de la glycine et un K_M de 87 mM (k_{cat} de $0,91 s^{-1}$) vis-à-vis du glyphosate (son origine n'étant pas indiquée) : si la vitesse catalytique est relativement similaire, il existe une différence notable d'affinité, d'où un risque important de mesure fautive en présence de glycine, même faible. Cependant, ce dispositif est évalué en présence de $8,5 mg.L^{-1}$ de glyphosate et d'une combinaison de potentiels interférents (insecticides et herbicides) : aucune déviation significative n'est observée en présence—d'autres herbicides (atrazine, dicamba, 2,4-D), des insecticides organophosphorés ou des néocotinoïdes. On notera toutefois l'écart-type de mesure important (25 % du signal).

Enfin, l'effet de la matrice est évalué sur des échantillons d'eau de rivière filtrée, des résidus de maïs et des résidus de soja supplémentés par $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ (10 mM) de glyphosate. Aucun effet significatif n'est mesuré (92, 109 et 125 % de taux de recouvrement respectivement).

Le deuxième dispositif est en réalité un essai biologique homogène : aucun processus d'immobilisation de l'élément de reconnaissance n'est engagé (Qin et al., 2020). Comme précédemment, c'est l'analogie structurale entre la glycine et le glyphosate qui sert de fondement à la conception de cet essai. Qin et al. présentent en 2020 l'expression d'une glyphosate oxydase obtenue par évolution dirigée à partir de la glycine oxydase de *Bacillus cereus*. Cette nouvelle protéine, rendue spécifique au glyphosate, permet la catalyse de l'oxydation du glyphosate en AMPA et glyoxylate concomitante à la réduction de l' O_2 en H_2O_2 . La première étape de ce test consiste donc à incuber à pH 7 l'échantillon supplémenté en glyphosate en présence de l'enzyme afin d'accumuler le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est ensuite dosé par chimiluminescence du luminol, catalysée par des spores de *Bacillus subtilis* (Figure 47).

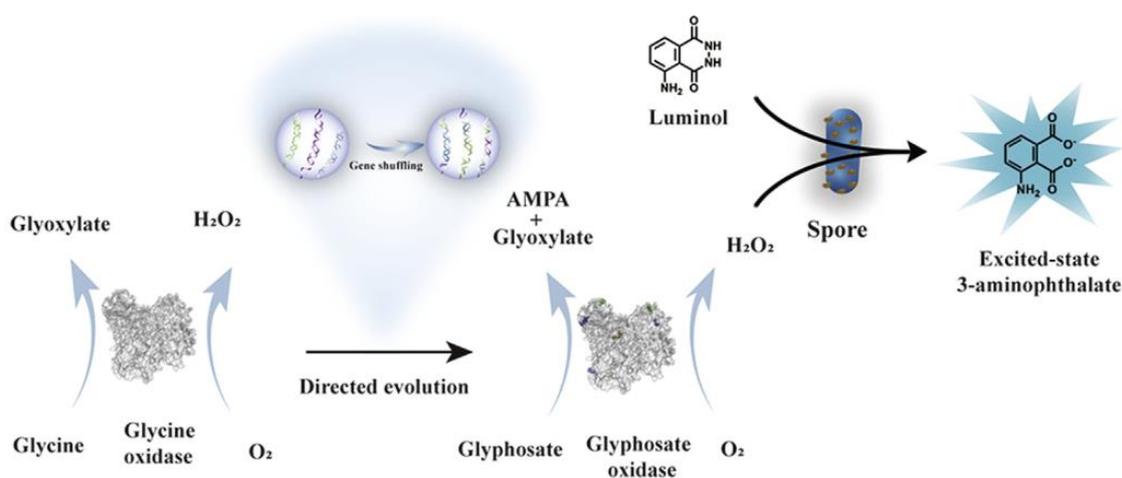


Figure 47 – Une glyphosate oxydase a été obtenue par Qin et al. à partir de la glycine oxydase de *Bacillus cereus* par évolution dirigée. Incubée en présence de glyphosate, elle catalyse l'oxydation du glyphosate et produit du peroxyde d'hydrogène. En présence de spores de *Bacillus subtilis*, le peroxyde d'hydrogène est dosé par chimiluminescence (Qin et al., 2020).

Ce capteur est caractérisé par une limite de détection de $90 \mu\text{g.L}^{-1}$. La luminescence mesurée varie linéairement avec la concentration de glyphosate de $0,09$ à 75 mg.L^{-1} , nécessite un temps de réaction important (une heure d'incubation, le temps de mesure de la chimiluminescence n'étant pas mentionné) et implique une intervention intermédiaire de l'utilisateur. Ceci étant, cet essai n'est pas sensible à la glycine, l'AMPA, au glufosinate et aux ions phosphates (PO_4^{3-}). L'analyse d'une eau de lac supplémentée en glyphosate semble indiquer l'absence d'effet de matrice.

4. Définition du projet de thèse

4.1. Lignes de conduite ASSURED

Dans les années 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé a défini les principaux critères caractérisant un test idéal de dépistage dans le cadre médical : ce sont les critères ASSURED (Land et al., 2019). Même si ces critères ont été définis pour les dispositifs médicaux, ces notions peuvent être étendues à la conception de biocapteurs environnementaux.

A(ffordable)	Le coût du dispositif de détection est une notion très importante à prendre en compte. Les méthodes analytiques classiques (GC-MS par exemple) engagent des coûts matériels très importants, que ce soit au niveau matériel, maintenance ou consommables. Il est difficile de définir la notion d'accessibilité financière mais le coût définit en grande partie l'étendue d'utilisation d'un tel dispositif, un faible coût permettant un usage massif.
S(ensitive)	Le dispositif se doit d'être sensible afin d'éviter les faux négatifs et de respecter les normes en vigueur. Dans le cadre environnemental, les moyens de détection se doivent de présenter la meilleure sensibilité possible, les analytes n'étant présents qu'en de faibles quantités.
S(pecific)	Le dispositif se doit d'être spécifique, afin d'éviter les faux positifs. Les herbicides étant testés dans des matrices complexes, une étude de spécificité avec des analogues structuraux de l'analyte et les principaux composants des matrices visées peut être menée. A défaut, il est aussi possible d'envisager le dispositif comme un outil d'alerte, pouvant être validé par un second moyen de détection, éventuellement moins abordable.
U(ser-friendly)	Ces dispositifs doivent pouvoir être utilisés en un minimum d'étapes ne nécessitant pas de formation ou de connaissances préalables.
R(apid)	Les résultats doivent être accessibles rapidement (15 à 60 minutes) après la collecte de l'échantillon. Le dispositif doit également être robuste, c'est-à-dire capable de résister aux conditions d'utilisation et à la chaîne
R(obust)	d'approvisionnement (température, humidité, stress mécanique), si possible

sans conditions spéciales de transport ou stockage (réfrigération par exemple).

E(equipment-free)	Idéalement, l'utilisation de ce dispositif ne doit pas nécessiter d'équipement spécial. Le recours à de petits appareils portables fonctionnant à l'énergie solaire ou à l'aide d'une batterie peut être envisagé.
D(deliverable)	Il s'agit de l'étape suivant la conception du dispositif analytique. Elle concerne la mise en place de la logistique et de la chaîne d'approvisionnement et de distribution permettant l'acheminement du dispositif jusqu'à l'utilisateur final.

4.2. Définition du projet de thèse

Comme décrit précédemment, l'ensemble des systèmes enzymatiques pour la détection du glyphosate se basent sur l'inhibition de l'enzyme associée. Seuls deux dispositifs proposent une détection du glyphosate par signal « on ». Le premier, de Qin et al. propose un dispositif basé sur une glyphosate oxydase, mais l'analyse demande de multiples interventions de l'utilisateur et le délai de réponse est très long dû aux nombreuses incubations (Qin et al., 2020). Le second, de Johnson et al. se base sur le manque de spécificité de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*, lui permettant d'oxyder le glyphosate en AMPA et glyoxylate, ce qui libère du peroxyde d'hydrogène qui peut ensuite être détecté (Johnson et al., 2022). Toutefois, il est à noter que ces deux travaux n'étaient pas encore publiés lors de la définition du projet de thèse et à son début (thèse commencée en 2019).

De ces constats, le projet de thèse a pour objectif de concevoir et réaliser un biocapteur à signal « on », facile à assembler et produire avec un minimum d'étapes, économique, et permettant une détection du glyphosate dans des matrices environnementales d'eaux de surface de manière simple, *in situ*, avec un minimum de manipulations de l'utilisateur et permettant une réponse rapide.

Ce travail de thèse s'appuie donc sur l'utilisation d'une oxydase spécifique du glyphosate. L'oxydation du glyphosate produit du glyoxylate, de l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) et du peroxyde d'hydrogène (ce dernier étant synthétisé à partir de l'O₂, accepteur d'électrons). Ce dernier peut alors être détecté électrochimiquement (grâce à l'utilisation du bleu de Prusse comme médiateur électrochimique) ou à l'aide d'une peroxydase en

combinaison avec des substrats chromogènes ou conduisant à une réaction de chimiluminescence. Les choix de l'oxydase et des peroxydases seront respectivement discutés dans les chapitres 5 et 6 de cette étude bibliographique. Ces protéines seront par la suite immobilisées grâce à un module protéique reconnaissant de manière spécifique le support d'immobilisation cellulosique (chapitre 7). Un schéma récapitulatif est proposé en Figure 48.

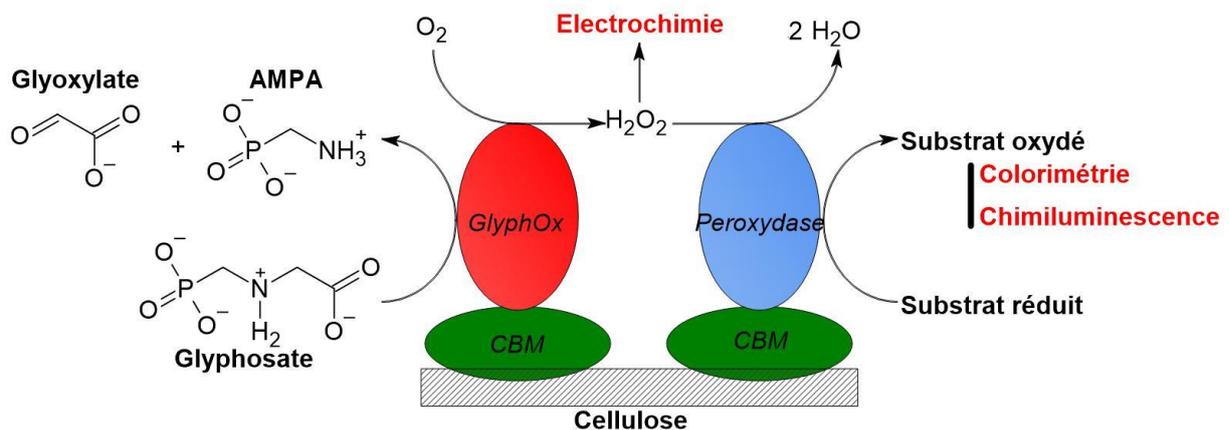


Figure 48 - Schéma récapitulatif du projet de thèse. Le glyphosate sera oxydé avec une oxydase spécifique (GlyphOx) produisant du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut être détecté par électrochimie à l'aide du bleu de Prusse. En associant une peroxydase, le peroxyde d'hydrogène peut être détecté par colorimétrie ou par chimiluminescence. Afin d'immobiliser les enzymes sur un support, elles peuvent être exprimées sous forme de protéines de fusion avec un module protéique (CBM : Carbohydrate Binding Module) connu pour interagir spécifiquement avec la cellulose.

5. De la glycine oxydase à la glyphosate oxydase

5.1. Généralités

Les oxydases, dont le produit de réaction est le peroxyde d'hydrogène, sont de bons candidats pour la conception de biocapteurs. En effet, le peroxyde d'hydrogène peut être détecté par exemple par colorimétrie, électrochimie, fluorescence ou chimiluminescence. Si de nombreuses techniques d'analyse sont connues, la détection du peroxyde d'hydrogène reste toutefois un défi dans certains cas (Uematsu, 2022). De plus, les oxydases ne nécessitent pas de cofacteurs additionnels puisque leur seul cosubstrat est l'oxygène dissout.

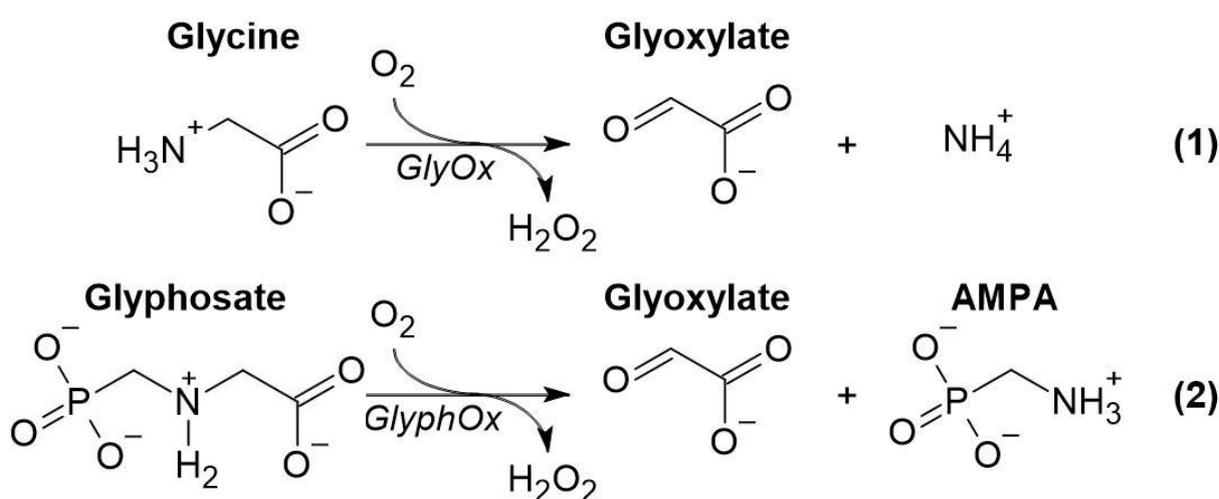


Figure 49 - Réaction d'oxydation de la glycine (1) et du glyphosate (2).

La glycine oxydase de *Bacillus subtilis* a été récemment utilisée pour détecter le glyphosate grâce à l'analogie structurale entre le glyphosate et la glycine (Figure 25 A et D), avec une limite de détection de 3,03 μM (Johnson et al., 2022). Naturellement, l'enzyme catalyse l'oxydation de la glycine en glyoxylate et ion ammonium (Figure 49.1) mais en présence de glyphosate, c'est l'oxydation du glyphosate en glyoxylate et aminométhylphosphonate (AMPA, Figure 25C) qui est catalysée (Figure 49.2). Toutefois, le glyphosate n'est par essence pas le substrat naturel de la glycine oxydase et par conséquent, un sérieux manque de spécificité est à prévoir en cas de présence de glycine dans l'échantillon dosé.

En 2019, Pedotti et al. observent un changement de spécificité en faveur du glyphosate après l'ajout de trois mutations ponctuelles (G51S, A54R et H244A) dans la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*. Le K_M pour le glyphosate diminue de 87 mM à 0,5 mM, tandis que le k_{cat} ne semble pas affecté (1,05 s^{-1} vs 0,91 s^{-1}) (Pedotti et al., 2009b).

Plus récemment, des mutations similaires à G51S/A54R (K81R/S202C/I332V/M342V) ont été introduites dans la glycine oxydase de *Bacillus licheniformis*, aboutissant à une nouvelle glyphosate oxydase caractérisée par un K_M de 1,6 mM pour le glyphosate et un k_{cat} de $0,13 \text{ s}^{-1}$ (Zhang et al., 2016). Enfin, deux mutants obtenus à partir de la glycine oxydase de *Bacillus cereus* ont été décrits en 2020 dans le cadre du développement d'un essai biologique par chimiluminescence caractérisé par une limite de détection de $90 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Qin et al., 2020).

Dans le cadre de ce projet de thèse, considérant que la sensibilité d'un biocapteur dépend directement de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M), la glyphosate oxydase obtenue à partir de *Bacillus subtilis* a été choisie comme étant, au moment de la définition du projet de thèse, l'enzyme la plus prometteuse.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons exclusivement à la glyphosate oxydase décrite par Pedotti et al. (Pedotti et al., 2009b). Dans un premier temps, une description de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis* sera réalisée. Dans un deuxième temps, les processus d'obtention de cette glyphosate oxydase seront évoqués en apportant des éclairages structuraux à ce changement de spécificité.

5.2. Focus sur la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*

Identifiée en 1997 lors du séquençage complet de *Bacillus subtilis* (bactérie gram-positive)(Kunst et al., 1997), la glycine oxydase est surexprimée dans *E. coli* et étudiée pour la première fois l'année suivante (Nishiya and Imanaka, 1998). Elle est alors décrite comme une enzyme catalysant principalement à pH basique et température moyenne (45°C) l'oxydation de la sarcosine (N-méthylglycine), de la N-éthylglycine, de la glycine, et dans une moindre mesure d'autres acides aminés (D-alanine, D-valine, D-proline) ou dérivés d'acides aminés (D-2-aminobutyrate, N-méthyl-D-alanine) (Nishiya and Imanaka, 1998).

Son étude est reprise plus récemment par le groupe de Loredano Pollegioni qui rapporte son expression avec une étiquette 6-His et sa purification en 2002 (Job et al., 2002a, 2002b). La glycine oxydase apparaît alors comme une enzyme tétramérique de 180 kDa liée à un cofacteur FAD de manière non covalente. L'ajout de FAD (ou FMN) au milieu réactionnel enzymatique n'entraîne pas d'augmentation de l'activité, semblant traduire une interaction étroite entre l'enzyme et son cofacteur. Cependant, l'activité de l'apoprotéine (protéine sans FAD) est reconstituée (à hauteur de 50 %) en présence de FAD en excès et de glycérol

(30 % v/v) après 5 heures d'incubation (Caldinelli et al., 2009). Une interaction très forte est mesurée en présence de glycolate (glycine dont la fonction amine est remplacée par un groupement hydroxyle), alors décrit comme inhibiteur compétitif, permettant sa cristallisation (Job et al., 2002a, 2002b). Le pH optimal de l'enzyme est mesuré entre pH 9 et 10 (le pH optimal pour la conservation étant plutôt situé à 7-8). La forme oligomérique tétramérique est stable entre pH 6,5 et 10 (Pedotti et al., 2009a).

5.3. De la GlyOx vers la GlyphOx

En 2009, Pedotti et al. proposent une glyphosate oxydase obtenue à partir de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*, dans l'objectif de concevoir un nouveau système de détoxification du glyphosate dans le cadre de la conception de plantes transgéniques.

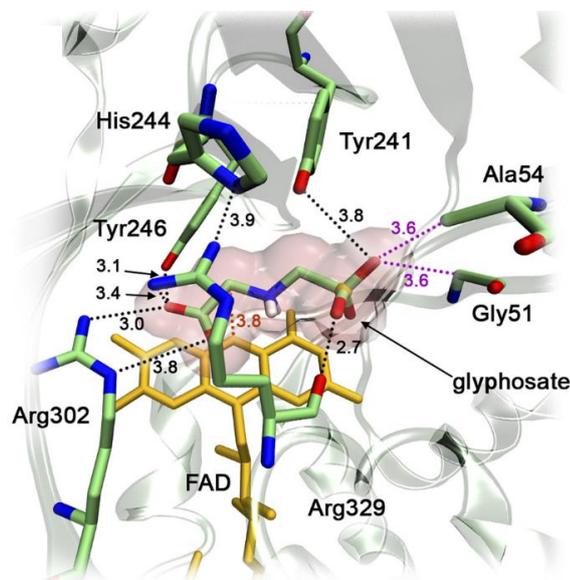


Figure 50 - Docking du glyphosate dans le centre actif de la glycine oxydase de *Bacillus Subtilis*, à partir de la structure PDB 1RYI). Cette simulation permet d'identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans l'interaction avec le glyphosate (Pedotti et al., 2009b)

Par docking entre la glycine oxydase et le glyphosate (Figure 50) les auteurs observent que le glyphosate s'insère parfaitement dans le site actif de l'enzyme, le carbone α du glyphosate se positionnant au niveau de l'azote du cycle isoalloxazine du FAD, la distance de 3,4 Å permettant un transfert hydride. Le groupement carboxylique du glyphosate interagit avec la chaîne latérale de l'arginine 302 et le phosphonate pointe vers l'entrée du centre actif, formant potentiellement une liaison hydrogène avec la glycine 51, l'alanine 54 et les chaînes latérales des tyrosine 241 et arginine 329.

A partir de ces constatations, les auteurs ont défini les acides aminés constituant potentiellement le site catalytique et ont réalisé des cycles de mutagenèse de saturation au niveau des 11 résidus identifiés (Met49, Gly51, Ala54, Met95, Tyr241, His244, Tyr246, Met261, Arg302, Arg329 et Asn330).

Les substitutions uniques provoquent une diminution du rendement d'expression, sauf pour la mutation H244A où le taux d'expression est doublé. Il est également observé qu'une mutation au niveau de l'arginine 302 provoque une perte totale d'activité, confirmant son implication cruciale dans l'interaction avec le substrat. Si les constantes de vitesse varient peu, les K_M en revanche varient beaucoup, augmentant pour la glycine et diminuant pour le glyphosate, conduisant à une augmentation globale de la constante de spécificité (Équation 1).

$$\text{Constante de spécificité (cs)} : \frac{k_{cat,app}}{K_{M,app}} \quad (\text{Équation 1})$$

$$\text{Rapport des cs} : \frac{\frac{k_{cat,app}}{K_{M,app}} (\text{glyphosate})}{\frac{k_{cat,app}}{K_{M,app}} (\text{glycine})} \quad (\text{Équation 2})$$

En particulier, une augmentation du rapport des constantes de spécificité (Équation 2) d'un facteur 4000 est observée avec la mutation G51R, pour laquelle le $K_{M,app}$ pour la glycine augmente d'un facteur 40 et celui pour le glyphosate diminue d'un facteur 20. C'est ce clone qui est sélectionné pour un deuxième cycle de mutagenèse de saturation, ajoutant une deuxième mutation à la construction.

Après trois cycles de mutagenèse, le clone G51S/A54R/H242A (appelé GlyphOx par la suite) est caractérisé comme le clone le plus prometteur, avec l'augmentation d'un facteur 150 de la constante de spécificité pour le glyphosate et une augmentation d'un facteur 12 500 du rapport des constantes de spécificité pour le glyphosate et la glycine (par rapport à la glycine oxydase sauvage), augmentation principalement due aux modifications des K_M (Tableau 6). Des expériences de saturation montrent que tout comme l'enzyme sauvage, le FAD du triple mutant n'est pas lié de manière covalente à l'enzyme. La comparaison des spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain semble n'indiquer aucune modification majeure des

structures secondaires et tertiaires de la protéine. De même, il semble que la stabilité thermique soit comparable entre le triple mutant et l'enzyme sauvage.

Tableau 6- Comparaison des caractéristiques cinétiques de la glycine oxydase sauvage et de son triple mutant G51R/A54R/H244A

	Glycine		Glyphosate		$\frac{k_{cat}}{K_m}(\text{glyphosate})$ $\frac{k_{cat}}{K_m}(\text{glycine})$
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	
GlyOx	0,60 ± 0,03	0,7 ± 0,1	0,91 ± 0,04	87 ± 5	0,012
GlyphOx	1,5 ± 0,1	105 ± 11	1,05 ± 0,05	0,5 ± 0,03	150

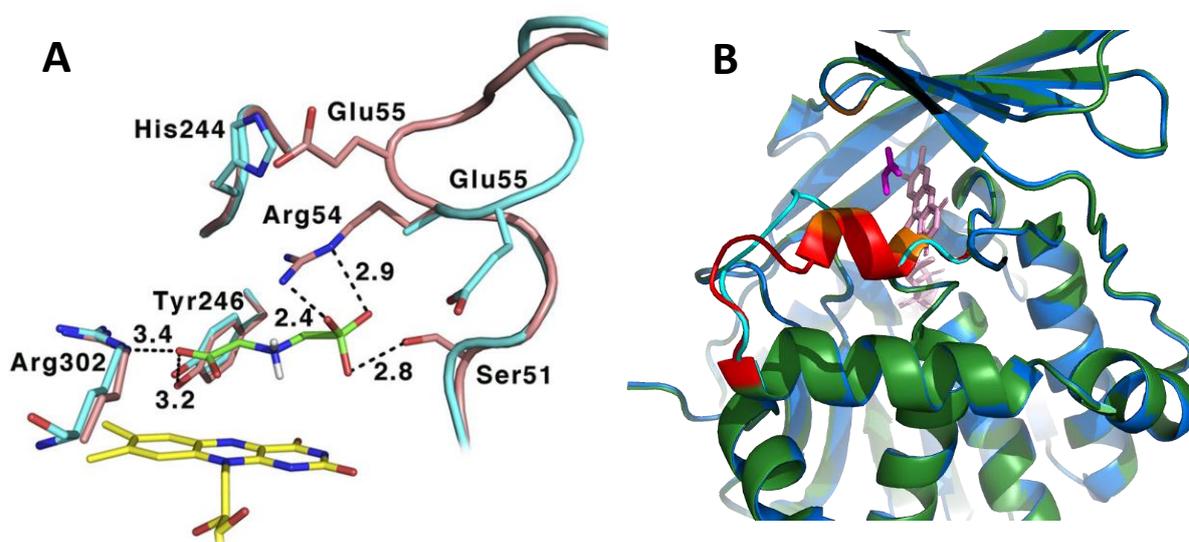


Figure 51 - (A) Superposition des structures de la GlyOx (code PDB 1ryi ; cyan) et de la GlyphOx (code PDB 3if9 ; rose). La modification de l'orientation de la boucle $\alpha 2\alpha 3$ (qui se trouve sur la droite, symbolisée entre les résidus 51 et 55) peut être observée, orientant les résidus 51 et 54 de la GlyphOx favorisant la stabilisation du groupement phosphonate du glyphosate en vert. Le FAD est représenté en jaune (Pedotti et al., 2009b).

(B) Alignement de la GlyOx (code pdb 1ryi ; vert et rouge) et de la GlyphOx (code PDB 3if9 ; bleu et cyan). Les résidus 50 à 60 (boucle $\alpha 2\alpha 3$) sont représentés en rouge et cyan. Les résidus mutés pour obtenir la GlyphOx (51, 54 et 244) sont représentés en orange, le FAD en rose et le substrat en fuchsia.

A partir de la structure obtenue par cristallisation avec du glycolate (échange du groupement amine avec un groupement hydroxyle sur la glycine), les auteurs n'observent pas de changement majeur ni sur la structure quaternaire de l'enzyme, ni sur l'interaction avec le FAD, ni sur le site actif. Une modification de la boucle connectant les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (composée des résidus 50 à 60) est en revanche rapportée, cette boucle étant située au-dessus du centre actif. Cette boucle a été décrite comme élément mobile à l'intérieur du tétramère de GlyOx (Mörtl et al., 2004; Settembre et al., 2003) : si elle n'est pas impliquée dans les contacts inter-protéines ou inter-cristaux, il semble que sa position change selon la présence et la nature du ligand dans le centre actif. Cette hypothèse est renforcée par sa

correspondance avec une région mobile d'une sarcosine oxydase monomérique homologue, où un rôle de régulation sur l'accessibilité du centre actif est proposé par les auteurs (Mörtl et al., 2004; Wagner et al., 2000). De plus, cette boucle contient en particulier les deux premières mutations (G51S et A54R) dont les résidus d'acides aminés se trouvent alors dans une configuration permettant de stabiliser le groupement phosphonate du glyphosate à l'entrée du site actif (notamment par l'introduction d'une charge positive par la chaîne latérale de l'arginine, Figure 51A) et de défavoriser le positionnement de la glycine dans le cas de R54, ce qui permet d'augmenter la sélectivité de l'enzyme pour le glyphosate (Tableau 6). D'après les structures déterminées après cristallisation, il apparaît que les résidus G51 et A54 sont impliqués dans une hélice présente dans la GlyOx qui disparaît dans la GlyphOx.

L'alanine 244 (H244A) est quant à elle située dans une épingle à cheveux entre les feuillettes β 12 et β 13 de la protéine à proximité de la boucle précédemment évoquée (Figure 51B). Son rôle n'est pas clairement élucidé, mais elle permet l'augmentation de l'expression d'un facteur deux. Néanmoins, un effet synergique est observé en présence de la double mutation G51S/A54R, se traduisant par une augmentation de l'expression protéique et une augmentation de l'activité de l'enzyme. Pedotti et al. supposent que le raccourcissement de la taille de la chaîne latérale (histidine vers alanine) diminue la gêne stérique avec la Gly55 et facilite, indirectement, l'interaction de l'Arg54 avec le glyphosate (meilleur positionnement de la boucle α 2 α 3).

6. Peroxydases

La superfamille des peroxydases (EC. 1.11.1) regroupe 29 classes d'oxydoréductases réagissant avec des peroxydes accepteurs d'électrons. Cette superfamille est divisée en deux catégories : les peroxydases héminiques et les peroxydases non héminiques. Ces dernières regroupent des haloperoxydases, des alkylhydroperoxydases, des thiol peroxydases, des NADH peroxydases et des catalases à manganèse. Dans le reste de ce chapitre, seules les peroxydases à hème seront décrites.

Les peroxydases héminiques sont des oxydoréductases caractérisées par un hème associé à une histidine comme ligand proximal et catalysant la transformation en radical d'un donneur phénolique en présence de peroxyde d'hydrogène (Figure 52).

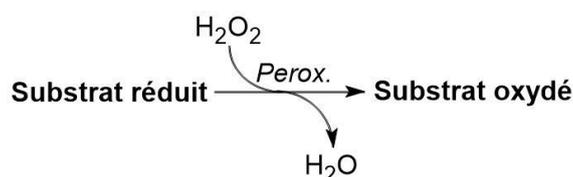


Figure 52 - Réaction générale catalysée par les peroxydases

Dans ce travail, nous utiliserons surtout le couple 4-aminopyrine (4-AAP) et acide 2-hydroxy-3,5-dichlorobenzenesulfonique (HDCBS). Le 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) et l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique (ABTS) sont deux autres substrats connus. Le peroxyde d'hydrogène comme accepteur d'électrons. Les peroxydases sont distribuées très largement dans la nature, notamment chez les plantes et quelques animaux. Elles font partie des premières enzymes découvertes (Chang et al., 2021).

Les peroxydases héminiques sont classiquement réparties en six superfamilles : les peroxydases de plantes, les peroxydases animales, les peroxydases de type DyP, les peroxydases di-héminiques (cytochrome c peroxydase par exemple), les haloperoxydases (dont seule une partie possède un hème) et les catalases (Savelli et al., 2019).

La superfamille des **peroxydases de plantes** regroupe les enzymes d'origine eucaryote végétales et fongiques mais aussi les enzymes procaryotes. Généralement monomériques, elles sont associées avec un hème métallique de manière non covalente. Elles sont elles-mêmes classées en trois sous-classes basées sur les analogies structurales et une supposée évolution commune. Une quatrième classe peut être envisagée pour classer les peroxydases n'entrant dans aucune autre catégorie.

- **Classe I** : Cette classe regroupe les **peroxydases retrouvées dans les plastes et les mitochondries qui sont d'origine procaryote**. Elles sont caractérisées par l'absence de glycosylation, de pont disulfure, d'ion calcium ou de peptide de sécrétion.
- **Classe II** : Cette classe regroupe les **peroxydases sécrétées de champignons**. Elles sont caractérisées par la présence d'un peptide de sécrétion, présentent 5% de glucides, deux ions calcium et quatre ponts disulfures conservés. Les enzymes impliquées dans la dépolymérisation de la lignine appartiennent à cette famille.
- **Classe III** : Cette classe regroupe les **peroxydases sécrétées de plantes**. A l'image des protéines de la classe II, elles sont caractérisées par un peptide de sécrétion placé à l'extrémité N-terminale, présentent deux atomes conservés de calcium, quatre ponts disulfures conservés, une teneur en glucide jusqu'à 25% et une région hélicoïdale supplémentaire. C'est dans cette catégorie qu'est classée la peroxydase du raifort (HRP).

Les **peroxydases animales** quant à elles sont généralement liées de manière covalente avec leur hème métallique. En 2003, seulement deux sous-classes étaient décrites : une première contenant les haloperoxydases (regroupant alors les eosinophil-peroxydases, les lacto-peroxydases, les myelo-peroxydases et les thyroid-peroxydases) et une deuxième regroupant les prostaglandines synthases (Azevedo et al., 2003). Aujourd'hui, les peroxydases animales se sont vues attribuer d'autres sous-familles : les *linoleate diol synthases*, les *α dioxygénases*, les *dual oxidases*, les *peroxidases*, les *peroxynectines* et les peroxydases de vertébrés non mammifères.

Les **catalases** sont des enzymes tétramériques héminiques catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène mais aussi parfois quelques réactions d'oxydation (Azevedo et al., 2003). Elles sont retrouvées dans les peroxysomes, limitant la concentration du peroxyde d'hydrogène dans les cellules afin de prévenir les dommages oxydatifs. Elles font partie des enzymes ayant un k_{cat} parmi les plus élevés (Dounce, 1983).

6.1. Peroxydase du raifort (HRP)

La peroxydase la plus connue est celle du raifort. Décrite en 1810 par L. A. Planche par l'apparition d'une forte coloration lors de la mise en contact d'un morceau de raifort et d'une teinture de résine de guaiac, sa structure primaire est découverte en 1976 par Welinder. De

nombreuses isoenzymes ont été décrites dans la littérature, caractérisées par des points isoélectriques différents, des taux de glycosylation différents et des propriétés cinétiques différentes (Azevedo et al., 2003).

L'oxydation catalysée par la HRP se déroule en trois étapes : une première étape où l'enzyme est oxydée par le peroxyde d'hydrogène et deux étapes où l'enzyme est réduite jusqu'à son état natif en oxydant ses substrats grâce à deux transferts mono-électroniques. Les donneurs d'électrons peuvent être divers : composés phénoliques, amines aromatiques, thioanisoles et iodures entre autres.

L'utilisation de donneurs d'électrons chromogènes ou ayant des propriétés optiques intrinsèques permet un dosage facile du peroxyde d'hydrogène en présence d'HRP par spectrophotométrie ou par spectrofluorimétrie. L'utilisation de luminol ou autres composés dérivés d'hydrazides permet l'émission de lumière catalysée par la HRP et permet donc une détection du peroxyde d'hydrogène par chimiluminescence.

Peu importe l'isoforme, la peroxydase du raifort est plus ou moins glycosylée selon l'organisme la produisant. Son expression en système procaryote permet de s'affranchir de ces modifications post-traductionnelles mais la précipitation de la protéine dans les corps d'inclusion lors de l'expression rend la production de la HRP recombinante difficile. L'absence de glycosylation permet en outre l'utilisation de la HRP dans un contexte thérapeutique où les glycosylations peuvent déclencher une réponse du système immunitaire (Humer et al., 2020). Dans les années 90, Smith et al. proposent un protocole d'extraction de la HRP à partir des corps d'inclusion : la protéine peut alors être extraite des corps d'inclusion avec un rendement de 2 à 3 % par dénaturation à l'urée, puis renaturation et activation en présence de calcium, d'hème, d'urée et de glutathion oxydé (Smith et al., 1990). 25 ans plus tard, aucune solution de production d'HRP recombinante ne permet d'obtenir des rendements suffisants pour des applications biotechnologiques. Des essais ont été menés pour s'affranchir d'une étape de renaturation et améliorer la disponibilité de l'hème. Ils conduisent à une amélioration des rendements jusqu'à 10 mg.L⁻¹ de culture, mais restent loin des concentrations obtenues par extraction de plantes (Krainer and Glieder, 2015). Plus récemment, l'expression d'une HRP sous forme de fusion avec la phosphoglycérate kinase d'*E. coli* a été envisagée, conduisant à la production d'une enzyme purifiée soluble non glycosylée à raison de 72 mg.L⁻¹ de culture. La co-expression avec une ferrochélatase semble également faciliter la formation des ponts

disulfures dans le cytoplasme et simplifier les protocoles d'expression (Chauhan and Kang, 2018). L'extraction de la HRP des corps d'inclusion reste toujours une stratégie étudiée. Humer et al. proposent en 2020 un protocole de purification conduisant à l'isolement de HRP non glycosylée (et sans autres isoformes) à hauteur de 960 mg.L⁻¹ de culture (Humer et al., 2020).

D'autres hôtes pour la production d'HRP recombinante ont été étudiés : levures, cellules d'insectes, larves, plantes. Toutefois, on note une diversité importante au niveau du rendement, de la qualité (pureté, isoformes, glycosylation) et des coûts de production. Une tendance à l'hyper-glycosylation est observée lors de l'expression en systèmes eucaryotes (Spadiut and Herwig, 2013).

6.2. Dye Peroxidases (DyP)

Les DyPs constituent une superfamille de peroxydases à hème (Colpa et al., 2014; Silva et al., 2023). Découverte en 1995 dans un champignon (*Geotrichum candidum* Dec 1), la protéine DyP est décrite en 1999 comme impliquée dans la décoloration de pigments (Kim et al., 1995; Kim and Shoda, 1999). Depuis, d'autres enzymes similaires (qualifiées par extension de protéine de type DyP) ont été identifiées majoritairement chez les bactéries (93 % des séquences décrites) et les champignons (6 %) (Paysan-Lafosse et al., 2023). Quatre classes de DyPs (Colpa et al., 2014; Savelli et al., 2019) ont été définies par critères phylogénétiques :

- Classe A : Enzymes bactériennes extra-cytoplasmiques ou extracellulaires (associées à une séquence signal « Twin Arginine Translocation » (TAT)-dépendante)
- Classe B et C : Enzymes bactériennes cytoplasmiques
- Classe D : Enzymes de champignons

En 2015, une nouvelle classification est proposée sur la base d'alignement des séquences prenant également en compte les structures tertiaires des protéines. La classe A est renommée en classe I (Intermédiaire), la classe B en classe P (**P**rimitive) et les classes C et D sont regroupées au sein de la classe V (**aV**ancée) (Sugano and Yoshida, 2021).

Les DyPs ont pour caractéristique structurale une structure dimérique en tonneaux $\alpha + \beta$ (Yoshida and Sugano, 2015), les structures des classes I et V étant construites sur celle des classes P avec des régions additionnelles. Les acides aminés importants caractérisant les DyPs étant dans la partie commune, il semblerait que les régions additionnelles trouvées pour les

protéines de la classe V soient impliquées dans des fonctions additionnelles (Yoshida and Sugano, 2015). Par conséquent, les enzymes de la classe P présentent les plus petites tailles alors que celles de la classe V affichent les plus grandes tailles.

La fonction exacte des DyPs n'est pas précisément connue mais les DyPs de classe D sont étudiées dans l'étude de la dégradation de la lignine (Ahmad et al., 2011; Salvachúa et al., 2013; Silva et al., 2022). La majorité des DyPs de champignons étant secrétées, ces enzymes ne semblent pas particulièrement impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène intra-cellulaire (Sugano and Yoshida, 2021).

Dans ce travail, deux DyPs seront utilisées comme système rapporteur pour la détection du peroxyde d'hydrogène : une DyP de *Saccharomonospora viridis* (SviDyP) et une autre de *Pseudomonas putida* (PpDyP).

6.2.1. *Saccharomonospora viridis* DyP (SviDyP)

Identifiée par analyse bioinformatique, la peroxydase de type DyP de *Saccharomonospora viridis* (actinomycète thermophile) est une protéine de 404 acides aminés appartenant aux DyP de la classe A. Elle peut être exprimée comme enzyme recombinante dans une souche d'*E. coli* BL21. Elle est décrite comme pouvant décolorer des pigments triarylméthane, anthraquinoniques ou azo dans des conditions neutres à alcalines. Le pH optimal mesuré est de 7,0 : l'activité enzymatique chute de 40 % à pH 8 et de 60 % à pH 9. L'enzyme semble stable après incubation dans différents pH supérieurs à pH 5 suivie d'une mesure à pH 7.0 à 60°C. Son activité dans le bio-blanchiment de la pâte kraft d'eucalyptus est décrit (Yu et al., 2014).

A des fins de biocatalyse ou pour la conception de biocapteurs, la SviDyP a été exprimée sous forme de protéine de fusion avec différentes oxydases : alditol oxydase (HotAldO), 5-hydroxymethylfurfural oxydase (HMFO), chitooligosaccharide oxydase (ChitO) et eugenol oxydase (EugO). Outre le succès de l'expression de ces protéines de fusion au prix dans certains cas d'une perte d'activité des oxydases, les auteurs ont montré la possibilité de coupler des réactions où les produits des oxydases sont utilisés comme substrat de la peroxydase malgré l'écart de pH optimum de chaque enzyme (Colpa et al., 2017).

Ces deux travaux concernant la SviDyP mettant en avant l'activité alcaline de l'enzyme, elle semble être une enzyme rapportrice de choix pour la détection du peroxyde d'hydrogène en conditions basiques.

6.2.2. *Pseudomonas putida* DyP (*PpDyP*) mutée

La majorité des DyPs sont connues pour être plus actives à pH 4-5 (Aalbers and Fraaije, 2019). La DyP de *Pseudomonas putida* (bacille à Gram négatif trouvé dans le sol) ne fait pas exception avec un pH optimal décrit de 4,3.

Cette enzyme, DyP de classe P, décrite en 2014 (Santos et al., 2014) est un sujet d'étude du groupe de Lígia Martins depuis maintenant une dizaine d'années (Borges et al., 2022; Brissos et al., 2017; Mendes et al., 2015; Santos et al., 2014). Le centre actif est composé de 4 résidus aminés conservés impliqués : la H197 proximale et les résidus D132, N136 et R214 distaux (Figure 53).

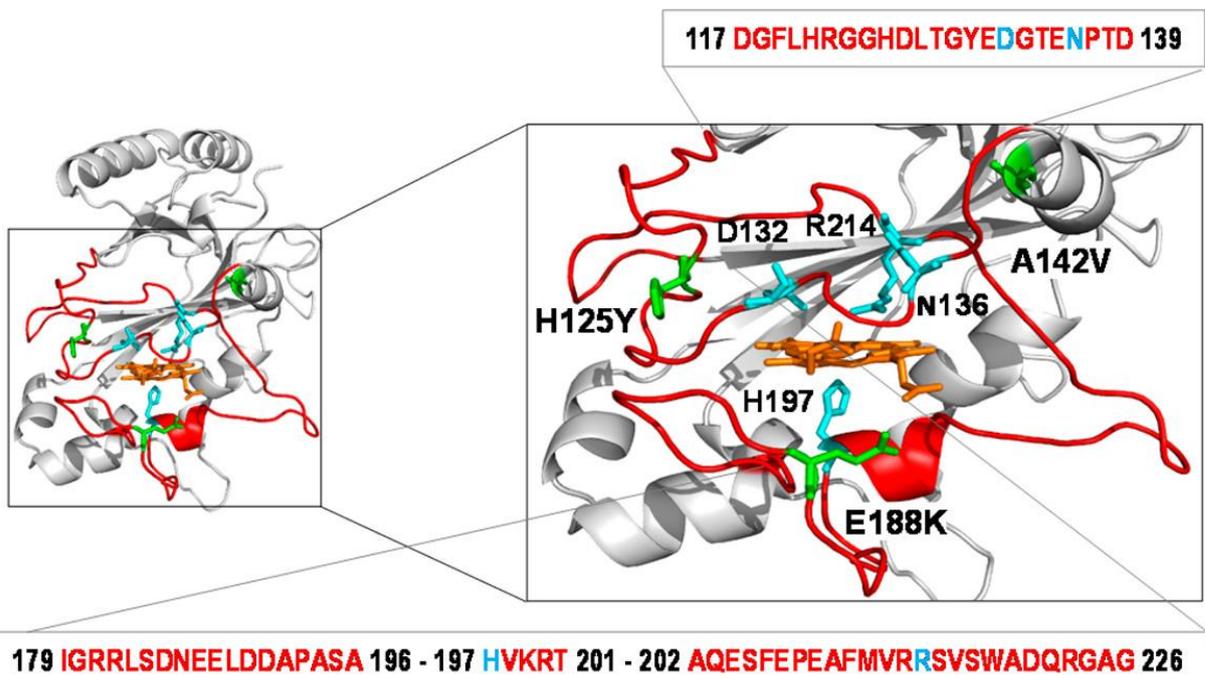


Figure 53 – Modèle de la *PpDyP* mettant en avant les résidus D132, N136 et R214 distaux et la H197 proximale fortement conservés (en cyan) entourant l'hème (orange). Les mutations constituant la 6E10 sont indiquées en vert (Brissos et al., 2017).

6.2.2.1. Obtention d'un triple mutant de la PpDyP présentant un changement de pH optimal majeur

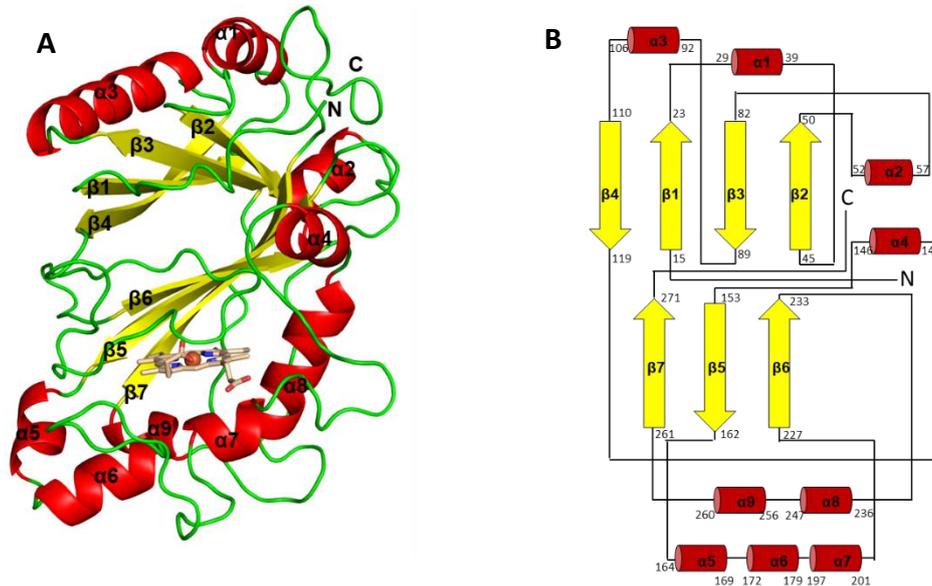


Figure 54 - (A) Représentation « cartoon » (A) et diagramme topologique (B) d'un monomère de la PpDyP. Les hélices α sont colorées en rouge, les brins β en jaune et les boucles en vert. Les hélices et brins sont numérotés. L'hème est représenté au centre. Le nombre et la répartition spatiale des hélices et brins met en avant le motif caractéristique $\alpha+\beta$ ferrédoxine (Borges et al., 2022).

En 2017, Brissos et al. font état d'un triple mutant de la PpDyP obtenu après trois cycles de mutagenèse aléatoire (error-prone PCR), résultant en l'introduction de trois mutations dans la souche sauvage : H188K, A142V et H125Y. Ce mutant (nommé 6E10) est caractérisé par une amélioration de l'efficacité catalytique significative pour le 2,6-diméthoxy phénol (augmentation d'un facteur 100) mais surtout par un changement du pH optimal de 4 unités, allant de 4,5 à 8,5 (Brissos et al., 2017).

La DyP de *Pseudomonas putida* a été cristallisée en 2022 (Borges et al., 2022), en même temps que le double mutant 29E4 (H188K, H125Y) et le triple mutant 6E10 (H188K, A142V, H125Y). Comme pour les autres DyPs, la structure en motif $\alpha+\beta$ ferrédoxine est confirmée, par rapport au modèle construit par Santos et al. en 2014 (Figure 54) Il est constitué de deux domaines similaires contenant des feuilletts β antiparallèles respectivement de 4 ($\beta 1-\beta 4$) et 3 ($\beta 5-\beta 7$) brins entourés de chaque côté par deux groupes d'hélices α ($\alpha 1-\alpha 4$ et $\alpha 5-\alpha 9$).

La structure du triple mutant 6E10 présente la même architecture tridimensionnelle que la souche sauvage (RMSD de 0,4 Å) et elle est retrouvée en solution sous forme d'homodimère ou d'homotétramère. L'interface du dimère est constituée de deux groupes d'hélices α

($\alpha 3$ et $\alpha 5$) et d'un brin β ($\beta 4$). L'interface tétramérique quant à elle est constituée de deux autres groupes d'hélices α ($\alpha 2$ et $\alpha 9$) et de deux brins β ($\beta 1$ et $\beta 3$).

L'hème de la PpDyP est localisé dans une cavité, plus petite que celle des autres DyPs, dont le contour permet le transfert électronique entre le radical porphyrine et le substrat immobilisé. Elle est délimitée par un réseau de liaisons hydrogènes comprenant 4 résidus chargés (E135, R181, E188, and E204) (Figure 55f). Cette cavité est connectée au solvant par deux canaux : T1 et T2 (Figure 55a, b et c). Le premier canal, T1, est considéré comme le canal d'entrée du peroxyde d'hydrogène : on y trouve les résidus catalytiques distaux (D132 et R124) (Figure 55d) dont le rôle dans le clivage hétérolytique du peroxyde d'hydrogène est encore débattu (Lučić et al., 2021; Sugano and Yoshida, 2021). Les dimensions du canal T1 (hauteur et longueur) sont similaires entre le mutant 6E10 et la souche sauvage. Le canal T2 (Figure 55e) quant à lui est plus court pour le triple mutant (11,5 Å au lieu de 14 Å), et semble spécifique de la PpDyP, n'ayant pas été retrouvé dans les autres DyP cristallisées où l'accès potentiel à ce tunnel est bloqué par la chaîne latérale d'une arginine fortement conservée.

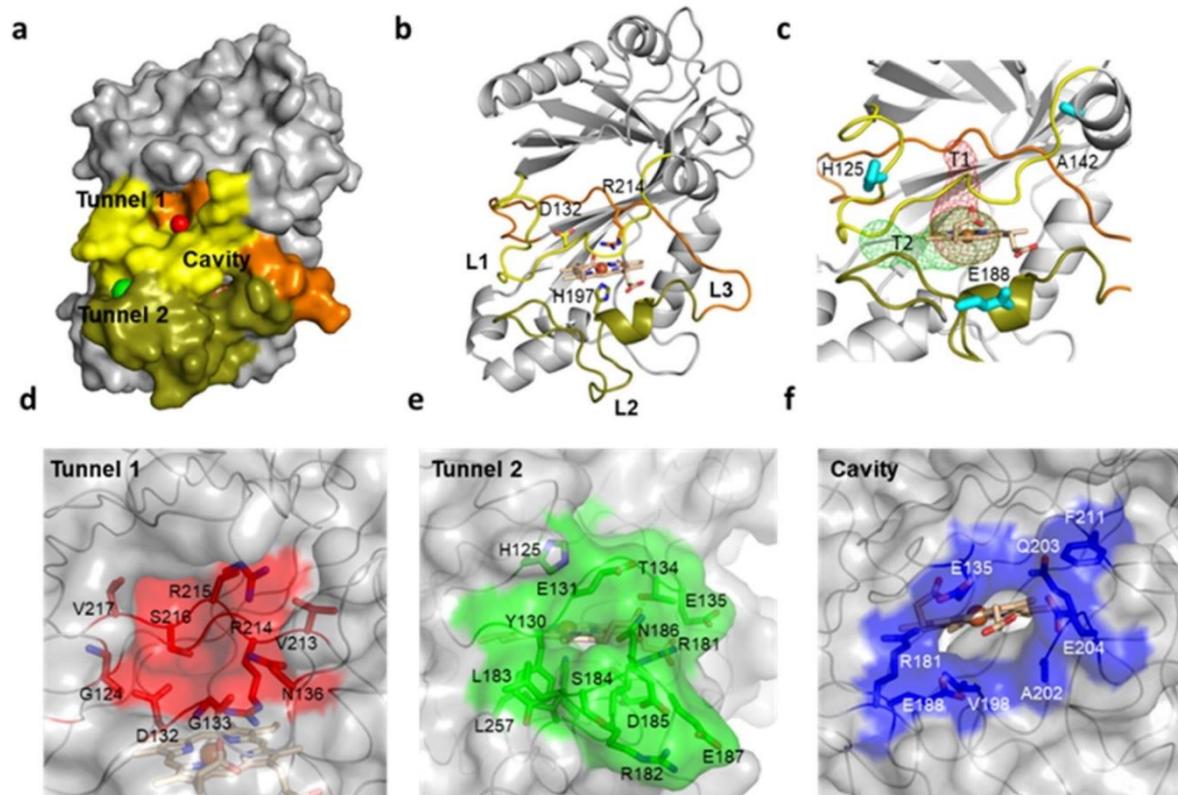


Figure 55 - Représentation de l'accès à la cavité contenant l'hème d'après les surfaces accessibles au solvant (a) ou « cartoon » (b) pour la 6E10. Cet accès est permis par deux canaux (T1 et T2) formés par les boucles L1 (jaune, résidus 120 à 139), L2 (verte, résidus 179 à 205) et L3 (orange, résidus 206 à 226). Les deux canaux (c) sont représentés avec un maillage (rouge pour T1 et vert pour T2), les acides aminés mutés étant représentés en cyan. Les surfaces accessibles au solvant correspondant aux résidus composant T1 (d), T2 (e) et la cavité (f) sont représentées respectivement en rouge, vert et bleu.

La poche de l'hème de la PpDyP est délimitée par trois boucles conservées : L1 (120 à 139), L2 (179-205) et L3 (206-226). Les boucles L1 et L3 sont localisées sur le côté distal de l'hème et contiennent les acides catalytiques conservés D132 et R214. L2 quant à elle est du côté proximal de l'hème et contient la H197 conservée impliquée dans l'immobilisation de l'hème (Figure 55a et b). Ces trois boucles sont très fortement associées aux mutations constituant la 6E10 : H125Y est retrouvée dans la boucle L1, A142V dans une région charnière proche de la boucle L1 et E188K dans la boucle L2.

6.2.2.2. La mutation A142V au cœur des différences majeures entre PpDyP sauvage et 6E10

La comparaison de la souche sauvage, du double mutant 29E4 et du triple mutant 6E10 met en évidence l'importance cruciale de la mutation A142V qui semble être au cœur des différences majeures avec la souche sauvage.

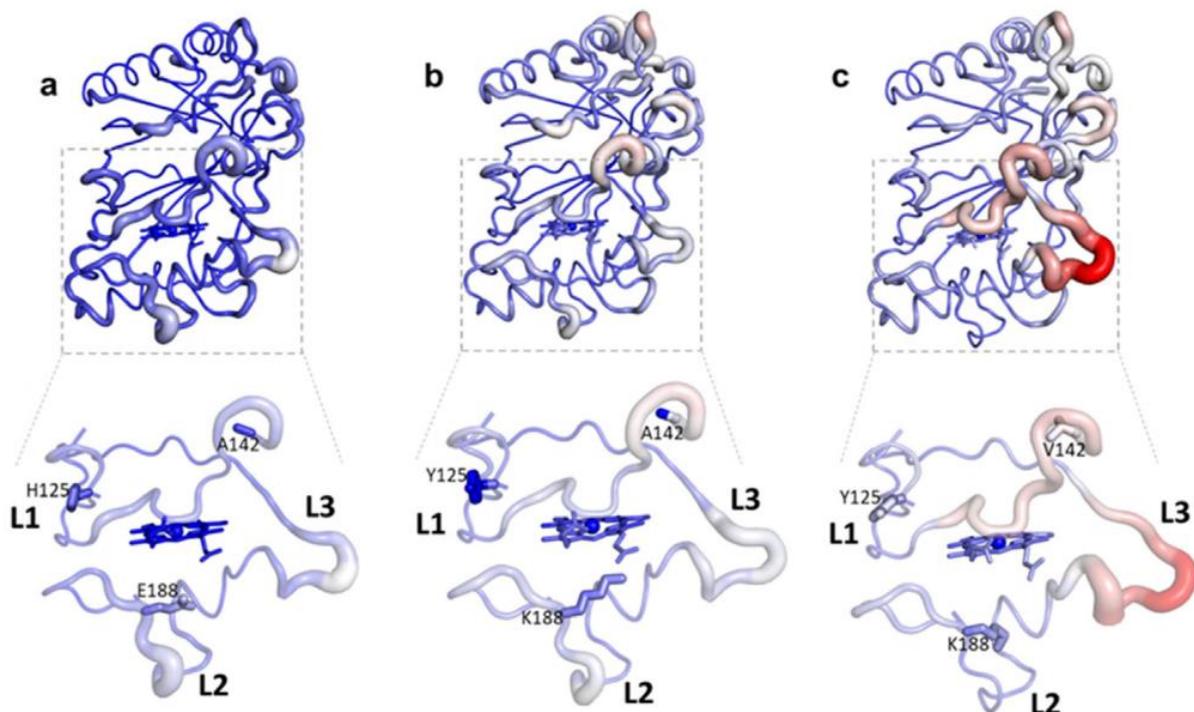


Figure 56 - Représentations « cartoon » d'un monomère de PpDyP sauvage (a), double mutant (b) et triple mutant (c), la coloration étant une représentation du facteur B normalisé : bleu représentant une faible flexibilité et rouge une forte flexibilité. Les boucles L1, L2 et L3 entourant le site de fixation de l'hème et les résidus mutés sont mis en avant (Borges et al., 2022).

L'analyse de la flexibilité des structures cristallographiques (*normalized B-factors analysis*) (Sun et al., 2019) du double mutant ne montre pas de changement majeur de flexibilité (Figure 56 a et b). En revanche, l'introduction de la mutation A142V (pour rappel, dans une région

charnière de la boucle L1) conduit à une augmentation majeure de la flexibilité de la boucle L3 dans la 6E10 par rapport à la souche sauvage (Figure 56c). Suite aux potentiels changements structuraux de cette boucle, A142V introduit une plus grande fluctuation de l'exposition au solvant des résidus dans la région de ces boucles.

La souche sauvage et le double mutant présentent la **même stabilité**. Cependant, une plus faible stabilité est observée pour le triple mutant qui présente toutefois une augmentation de l'activité catalytique d'un facteur 50 vis à vis du 2,6-diméthoxy phénol (DMP).

De même, aucun **changement de pH optimum** n'est observé entre la souche sauvage et le double mutant. L'introduction de la mutation A142V entraîne, outre une amélioration des efficacités catalytiques pour l'ABTS (Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) et le DMP, un changement de quatre unités pH, passant de 4,5 à 8,5. Les deux premières mutations (H125Y et H188K) n'améliorent que les caractéristiques catalytiques de l'enzyme.

Il a été montré que le pH optimal des DyP est très fortement lié à l'aspartate distal, fortement conservé chez les DyP (Pfanzagl et al., 2018; Shrestha et al., 2021, 2017), même si d'autres résidus d'acides aminés constituant la cavité dans laquelle est placé l'hème semblent jouer un rôle potentiel. Dans la 6E10, il semble que cet aspartate (D132) soit protoné à pH 4, ce qui devrait empêcher l'activation du peroxyde d'hydrogène (par déshydrogénation) et bloquer la catalyse. Les changements de pH optimal observés seraient donc davantage dus à l'augmentation de la flexibilité des boucles, jouant sur les réseaux d'interactions électrostatiques à la surface de la poche de l'hème, influençant le pH optimal de la catalyse. En effet, Borges et al. démontrent en 2022 que la cavité contenant l'hème présente une surface plus électropositive que la souche sauvage, justifiant cette dérive du pH optimal vers des conditions plus alcalines.

7. Méthodes d'immobilisation de protéines sur un support cellulosique

Afin de concevoir un essai à un prix abordable, la glyphosate oxydase doit être immobilisée à bas coût, conditionnant le choix d'un matériau et une immobilisation en un minimum d'étapes et sans purification préalable de la protéine.

L'utilisation du papier comme support pour un biocapteur n'est pas nouvelle : en 1957, Free et al. immobilisaient par adsorption une glucose oxydase, une peroxydase et de l'orthotoluidine pour la détection du glucose dans les urines (Free et al., 1957). En présence de glucose, la glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose en gluconolactone, produisant du peroxyde d'hydrogène. Comme évoqué dans la partie sur les biocapteurs pour la détection du glyphosate, ce peroxyde d'hydrogène peut être quantifié en utilisant une peroxydase qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, catalyse l'oxydation de son substrat chromogène. Dans ce cas précis, en présence de glucose, une couleur bleue apparaît.

Les matériaux à base cellulosique (papier, coton, tissu, ...) ont trouvé un regain d'intérêt depuis les travaux fondateurs de Martinez et al. en 2007 dans le cadre de la mise au point de test diagnostique du fait de leur faible coût, de la facilité de destruction par incinération et de leurs propriétés fluidiques (Desmet et al., 2016; Kummari et al., 2023; Martinez et al., 2007; Pradela-Filho et al., 2023). De plus, les matériaux cellulosiques peuvent servir également de matrices d'immobilisation pour les protéines étant donné que la chimie de la cellulose est polyvalente (Credou and Berthelot, 2014).

Les techniques d'immobilisation des éléments de reconnaissance biologiques sont bien décrites dans la littérature et traitées par de très nombreuses revues (Credou and Berthelot, 2014; Datta et al., 2013; Kong and Hu, 2012; Koudelka-Hep et al., 1997; Maghraby et al., 2023; Prieto-Simon et al., 2008; Sassolas et al., 2012). Dans cette partie, les techniques d'immobilisation d'enzymes appliquées à un support cellulosique (papier, coton, ...) seront décrites brièvement (Credou and Berthelot, 2014; Kong and Hu, 2012) et la méthode d'immobilisation choisie dans le cadre de ce projet de thèse sera discutée.

7.1. La cellulose

La cellulose est un polymère de glucose produit par les cellules végétales (et certaines bactéries). Les molécules de glucose sont liées entre elles par une liaison glycosidique entre les groupements hydroxyles équatoriaux portés par les carbone C1 d'une molécule et carbone C4 d'une autre molécule de glucose : on parle de liaison β -(1 \rightarrow 4) (Figure 57). Le nombre de résidus dans une chaîne de cellulose varie selon l'organisme d'origine. A titre d'exemple, on compte entre 800 à 10 000 résidus de glucose dans la cellulose du coton.

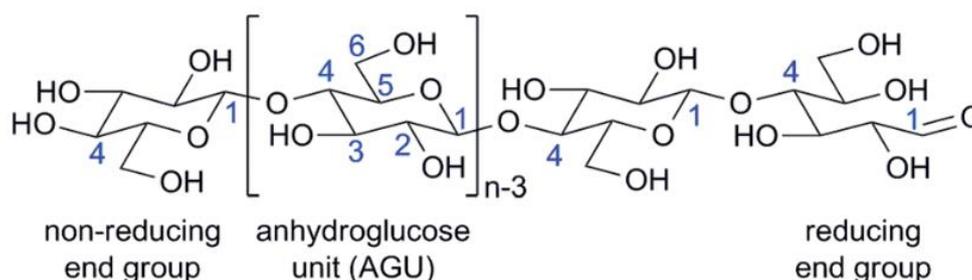


Figure 57 - Structure d'une fibre de cellulose. La cellulose est un polymère de glucose lié en β -(1 \rightarrow 4), n étant le degré de polymérisation, c'est-à-dire le nombre d'unités glucose dans la fibre. La fibre de cellulose est caractérisée par une extrémité réductrice, et une extrémité non réductrice (Credou and Berthelot, 2014).

La fibre de cellulose, du fait de sa nature glucidique, porte un très grand nombre de fonctions hydroxyles (-OH). Ces fonctions permettent d'établir des liaisons hydrogène intramoléculaires (au sein de la même chaîne ; Figure 58) ou intermoléculaires (entre deux molécules de cellulose). Ces groupements hydroxyles permettent également des liaisons avec d'autres composés, permettant l'immobilisation de ces derniers sur la fibre. De plus, la nature cyclique du glucose conduit à de grandes surfaces planes lui permettant de former des liaisons hydrophobes avec d'autres molécules.

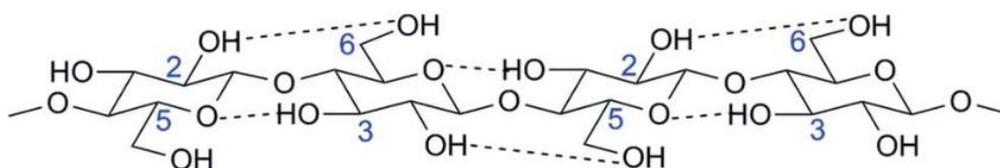


Figure 58 - La cellulose est riche en groupements hydroxyles permettant la stabilisation des fibres par l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires (Credou and Berthelot, 2014).

La cellulose existe sous différentes formes allomorphes ($I\alpha$, $I\beta$, II, III₁, III₂, IV₁ et IV₂), dépendant du traitement chimique ou physique effectué. La cellulose cristalline, naturelle, est présente sous deux isoformes : $I\alpha$ et $I\beta$. L'isoforme $I\alpha$ est constitué de fibres de cellulose empilées de manière aléatoire dont l'angle entre les chaînes varie. De son côté, l'isoforme $I\beta$

est constitué de fibres parfaitement parallèles les unes aux autres (empilement). Le ratio α/β dépend de l'organisme (Pérez and Samain, 2010).

Visibles sur les Figure 57 et Figure 58, chaque unité glucose composant la cellulose présente trois groupements hydroxyles, sur les carbones C2, C3 et C6. C'est sur ces groupements qu'ont lieu les fonctionnalisations chimiques de la cellulose, par oxydation, amination, estérification, étherification ou encore co-polymérisation radicalaire. Ces fonctionnalisations chimiques ne seront pas décrites mais elles jouent un rôle majeur dans la création de liaisons covalentes (comme évoqué dans le paragraphe 7.2.2)

7.2. Méthodes physiques et chimiques d'immobilisation sur la cellulose

7.2.1. Méthodes physiques

L'immobilisation physique de biomolécules sur un support repose sur l'établissement de liaisons faibles entre le support cellulosique et la biomolécule, ou sur le piégeage physique (pour le confinement) des biomolécules au niveau du support. Si ces techniques sont douces et ne nécessitent pas de modification de la biomolécule, elles reposent sur un équilibre (sauf dans le cas du confinement) ne permettant pas forcément d'immobiliser une grande quantité de biomolécules. De plus, l'orientation des biomolécules immobilisées n'étant pas contrôlée, une perte d'activité peut être observée.

7.2.1.1. Adsorption

L'adsorption peut être considérée comme la méthode d'immobilisation physique la plus élémentaire : elle consiste à mettre en présence les biomolécules d'intérêt avec la cellulose. Comme évoqué précédemment, la cellulose est un glucane (un polymère de glucose) : elle est ainsi composée de cycles et de groupements hydroxyles lui conférant des propriétés hydrophiles et anioniques. Les biomolécules peuvent ainsi interagir avec la cellulose par des interactions non covalentes (forces de Van der Waals, interactions hydrogène ou ioniques) (Figure 59). La liaison est alors réversible, non spécifique et l'orientation de l'immobilisation

est imprévisible : une perte d'activité peut ainsi être observée. Toutefois, l'absence d'autres traitements ou modifications chimiques limite le risque de dénaturation.

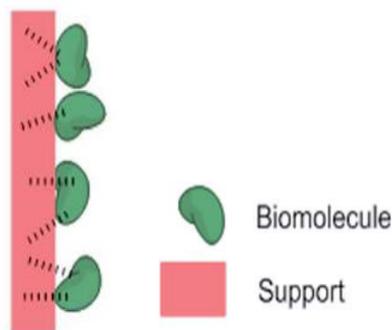


Figure 59 - Les biomolécules peuvent être immobilisées par adsorption, établissant des interactions faibles avec le support cellulosique (Credou and Berthelot, 2014)

7.2.1.2. Recours à des particules de support

Les particules de support (*carrier particles*) sont des particules poreuses d'environ 500 nm de diamètre, de silice ou d'autres polymères interagissant avec la cellulose en s'intégrant au sein des porosités du papier (2,5 à 40 μM). Les biomolécules sont quant à elles piégées ou encapsulées dans ces particules de support par physisorption, couplage covalent ou par affinité (ces méthodes sont décrites par la suite). Cette technique permet la localisation des biomolécules à la surface du support papier (Figure 60). Bien qu'elles soient protégées de l'environnement, une perte d'efficacité peut être observée en raison de la limitation du transfert de masse (la taille des pores des billes jouant un rôle important) ou de la distance entre les biomolécules et leurs substrats.

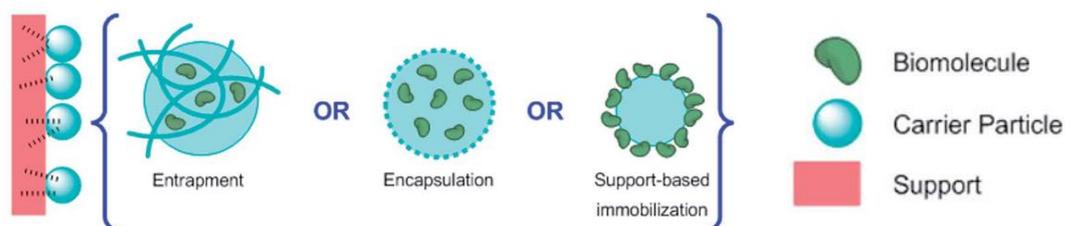


Figure 60 – Immobilisation de biomolécules à la surface de billes de silice par confinement, encapsulation ou interaction de surface. Ces billes sont ensuite déposées dans les pores de la matrice cellulosique où elles sont immobilisées par adsorption (Credou and Berthelot, 2014).

A proprement parler, le classement de cette technique dans les méthodes physiques peut être remis en question. En effet, l'adsorption des particules de support sur le papier peut justifier ce choix, mais il ne s'agit pas vraiment de l'immobilisation des biomolécules, l'immobilisation de ces dernières sur les particules pouvant être réalisée par d'autres techniques que physiques (par affinité par exemple).

7.2.1.3. Confinement

La technique de confinement est généralement associée à une première étape d'adsorption. Les biomolécules sont préalablement immobilisées sur un support, qui est ensuite recouvert d'une membrane semi-perméable. Cette membrane va s'adsorber sur les

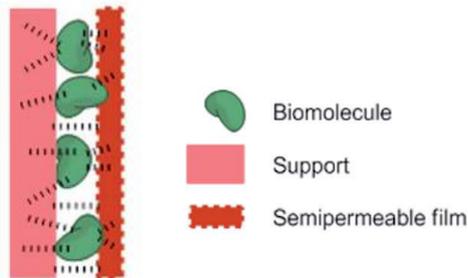


Figure 61 - Immobilisation de biomolécules sur un support cellulosique. Les biomolécules interagissent dans un premier temps avec le support, puis une membrane poreuse est appliquée. Cela permet un maintien des biomolécules au contact du support et la filtration des espèces arrivant au contact des biomolécules (Credou and Berthelot, 2014)

biomolécules et empêcher leur diffusion dans le milieu en cas de perte d'interaction (Figure 61). Elle permet aussi une filtration (par la taille) des espèces arrivant au contact des biomolécules immobilisées. Elle peut aussi être fonctionnalisée pour favoriser ou défavoriser certaines espèces en fonction de leurs propriétés chimiques.

La membrane la plus utilisée est la membrane de dialyse, constituée de cellulose de type II (l'isoforme le plus stable).

7.2.2. Méthodes chimiques

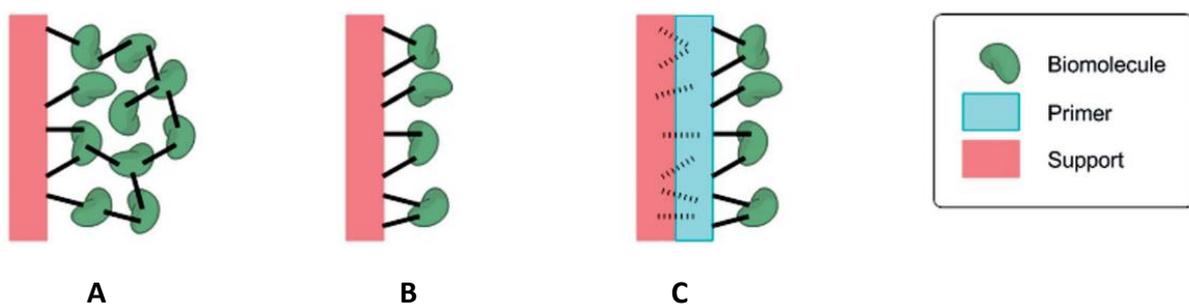


Figure 62 - Il existe trois techniques d'immobilisation de biomolécules sur la cellulose : la réticulation (A), le pontage covalent direct (B) et le pontage avec un polymère lui-même interagissant avec la cellulose (C) (Credou and Berthelot, 2014)

Immobiliser une biomolécule grâce à une technique chimique revient à créer des liaisons covalentes entre les biomolécules et la cellulose. Elles permettent une immobilisation irréversible sur le support. Cette immobilisation, contrairement aux méthodes physiques décrites précédemment, nécessite l'activation de l'un des deux partenaires et résulte en la

modification chimiques des deux. Trois méthodes existent et sont présentées dans la **Figure 62** : la réticulation, la liaison covalente directe et la liaison à un polymère.

7.2.2.1. Immobilisation par réticulation

Cette technique permet non seulement de réaliser des pontages covalents entre la biomolécule et le support mais aussi entre les différentes biomolécules (d'où une structure tridimensionnelle très importante formant une couche plus ou moins épaisse à la surface du support) par l'utilisation de réactifs bi ou multifonctionnels. Du fait de la nature covalente de l'immobilisation, il s'agit d'une technique qui permet d'immobiliser un grand nombre de biomolécules (**Figure 62A**).

Néanmoins, cette technique est plutôt onéreuse. Le côté aléatoire de cette technique est probablement son plus grand point faible. Les biomolécules sont liées entre elles de manière aléatoire, le processus de fixation n'est pas contrôlé et la quantité de molécules immobilisée n'est pas maîtrisée, d'où une carence de reproductibilité entre les différentes expérimentations. Le nombre et la localisation des points d'ancrage étant aléatoires, il peut en résulter une rigidification de la structure de la molécule conduisant à une perte d'activité.

Cela étant, la réticulation a l'avantage d'être une technique mono-étape, revenant à mettre en présence les biomolécules et l'agent de réticulation sur un support. Le glutaraldéhyde est l'agent de réticulation le plus connu, se liant aux amines primaires des résidus d'acides aminés (pour les protéines) à ses deux extrémités. Les groupements imines résultant de cette réaction peuvent par la suite être réduits en amines secondaires pour augmenter la stabilité de la liaison. La cellulose n'ayant initialement pas d'amine, il est nécessaire de la fonctionnaliser avec un polymère par exemple.

La cellulose peut également être fonctionnalisée avec du chitosane, un polymère de glucosamine. Du fait de sa proximité structurale avec la cellulose, il s'adsorbe fortement à sa surface, adsorption renforcée par sa nature cationique, la cellulose étant légèrement anionique dans l'eau.

7.2.3. Immobilisation par liaison covalente directe

La biomolécule peut être immobilisée par liaison covalente sur son support, à l'aide des spécificités chimiques des résidus présents à sa surface (**Figure 62B**). Dans le cadre d'une

protéine, on citera notamment les groupes thiols (cystéines), amines (lysine), carboxyles (acides aspartique et glutamique) et hydroxyles (sérine et thréonine).

En général, c'est la fonction amine des lysines qui est prise en considération étant donné sa présence en nombre en périphérie. Comme la réticulation, une même molécule peut engager plusieurs pontages, ayant des effets sur son activité notamment si ces pontages ont lieu au niveau du site catalytique. Toutefois, cette technique se différencie de la précédente dans le sens où aucun pontage intermoléculaire entre biomolécules n'a lieu.

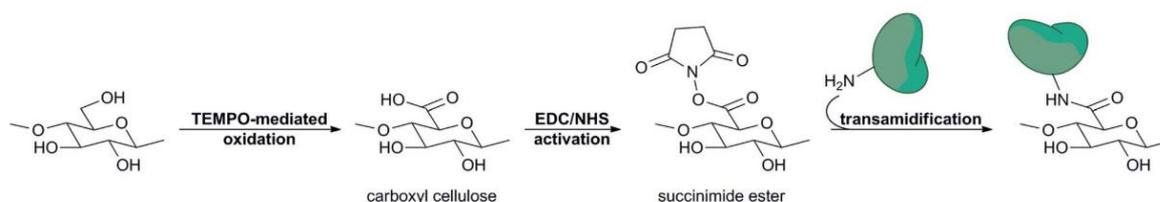


Figure 63 - Immobilisation d'une biomolécule sur de la cellulose grâce à l'amine primaire d'une lysine. La cellulose est préalablement activée par oxydation pour former un ester succinique, qui permet l'établissement d'une liaison covalente amide entre la biomolécule et la cellulose par transamidation (Credou and Berthelot, 2014).

Comme décrit précédemment, le groupement hydroxyle porté par le carbone C6 est décrit comme étant le plus réactif mais il ne peut pas réagir avec les amines, ce qui nécessite une étape de fonctionnalisation de la cellulose. Cette dernière consiste en l'oxydation de la fonction hydroxyle primaire portée par le carbone C6 pour former un acide carboxylique. Cette fonction est ensuite activée par du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) et du N-hydroxysuccinimide (NHS) pour former l'ester succinimide correspondant. La fonction amine de la biomolécule interagit avec la cellulose active et se lie de manière covalente par transamidation, créant une liaison amide (Figure 63).

7.2.4. Immobilisation par liaison à un polymère

Cette méthode est sensiblement identique à l'immobilisation par liaison covalente décrite précédemment. La seule différence est qu'il n'y a pas de pontage direct entre la biomolécule et la cellulose. La biomolécule se fixe en réalité sur un autre polymère (comme du chitosane) ayant les fonctions chimiques nécessaires à la réaction de pontage. La nature de la cellulose n'est ainsi pas modifiée chimiquement et interagit avec ce polymère dont l'adsorption est stabilisée par des liaisons faibles (Figure 62C).

7.3. Techniques d'immobilisation par affinité

La stratégie d'immobilisation par affinité est caractérisée par la forte interaction non covalente, réversible ou irréversible, de deux partenaires biologiques. Dans la mise en place de cette méthode, une modification du support d'immobilisation et de la biomolécule sont nécessaires. Un avantage non négligeable de cette stratégie est de pouvoir contrôler l'orientation de la biomolécule lors de l'immobilisation (et donc une meilleure disponibilité pour le substrat). Une augmentation de la stabilité de la biomolécule et de la charge immobilisée peut être observée. Ces techniques sont parfois utilisées à des fins de purification (profitant de l'aspect réversible de la réaction). Plusieurs méthodes d'immobilisation sont décrites, se différenciant par la nature des partenaires.

Dans cette partie, nous évoquerons l'immobilisation des protéines par affinité. La majorité des techniques se basant sur l'affinité ne s'appuient pas vraiment sur la nature cellulosique du support, demandant une fonctionnalisation préalable de la cellulose par l'ajout d'un partenaire d'interaction. C'est le cas des interactions ligand/protéine (7.3.1), métal/protéine (7.3.2), qui, finalement, peuvent être appliquées à tout type de support. Nous terminerons en évoquant une technique d'immobilisation spécifique à l'utilisation de supports cellulosiques se basant sur l'existence de domaines protéiques capables de se lier spécifiquement à la cellulose.

7.3.1. Interaction ligand/protéine

Cette technique est basée sur l'existence de couples protéine / ligand caractérisés par des interactions fortes et très spécifiques. L'avidine (ou streptavidine) / biotine et la calmoduline / phénothiazine sont les deux couples les plus connus. Dans ce cas, support et protéine n'interagissent pas directement : ils sont tous les deux modifiés en les fusionnant à l'un des deux partenaires d'interaction. En prenant le cas de l'avidine et de la biotine, les deux configurations peuvent être retrouvées : immobilisation de l'avidine sur la cellulose (par les

techniques décrites ci-dessus) et biotinylation de la protéine à immobiliser, ou biotinylation de la cellulose et expression sous forme de protéine de fusion protéine-avidine.

Le système avidine/biotine est très utilisé et des solutions commerciales de biotinylation ou de protéines préalablement biotinylées existent déjà.

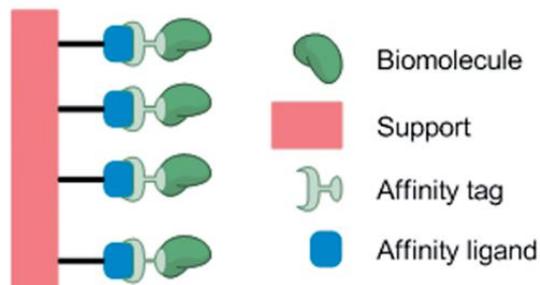


Figure 64 - Une protéine peut être immobilisée sur un support grâce à l'interaction entre une protéine (tag d'affinité) et un ligand (affinity ligand). Le support et la protéine sont fonctionnalisés par l'un des deux partenaires, permettant l'immobilisation indirecte de la protéine sur le support

7.3.2. Interactions ions métalliques / chélateur

L'interaction non covalente entre un ion métallique et son chélateur est spécifique, forte et rapide. L'étiquette « 6-His» (constituée d'un enchainement de 6 histidines) est l'étiquette d'affinité la plus utilisée pour l'expression (sous forme de protéine de fusion) et la purification des protéines grâce à sa petite taille et son impact faible sur les caractéristiques et la fonction de la protéine (charge, poids moléculaire, etc.).

La modification covalente du support avec de l'acide nitrilotriacétique (NTA) ou de l'acide imidodiacétique (IDA) associé à du Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} permet la rétention des protéines marquées 6-His sur le support (Figure 65). Le choix du métal permet de moduler la force et la spécificité de l'interaction (Tableau 7). Autrement dit, la force de l'interaction 6-His/ Cu^{2+} est très importante mais la spécificité de l'interaction entre l'ion et l'étiquette est faible par rapport à celle entre l'ion et les histidines naturelles de la protéine. A l'inverse, l'interaction de 6-His avec le cobalt est faible, mais la spécificité est importante. Le nickel apparaît comme un compromis, justifiant son usage très fréquent dans le cadre de purifications.

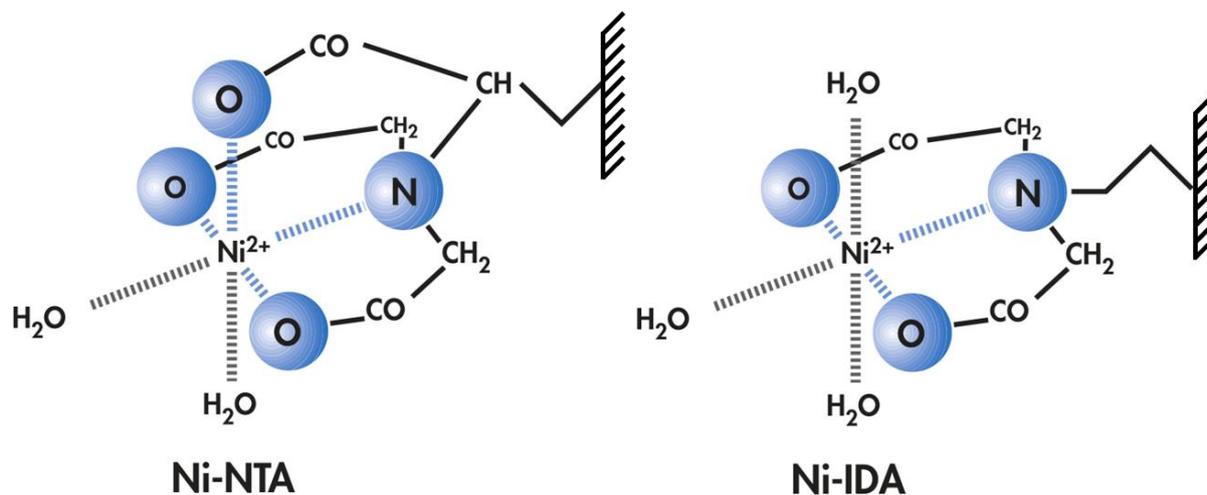


Figure 65 -Exemples de chélation du nickel avec une résine à base d'acide nitrilotriacétique (NTA) ou d'acide iminodiacétique (IDA) liée physiquement au support (source : Qiagen).

Tableau 7 - Comparaison des forces d'interaction et des spécificités d'interactions avec des histidines intrinsèques de trois ions métalliques (cuivre, cobalt et nickel).

Atome	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺
Force d'interaction	-	+	++
Spécificité de l'étiquette 6-His par rapport aux His intrinsèques	++	+	-

Ces interactions sont toutefois réversibles : l'équilibre d'interaction entre le métal et l'étiquette 6-His peut être modifié en présence d'imidazole (le noyau imidazole constituant la chaîne latérale de l'histidine) (Figure 66). En présence d'une forte concentration d'imidazole, ce dernier va entrer en compétition avec l'étiquette 6-His et déstabiliser l'interaction.

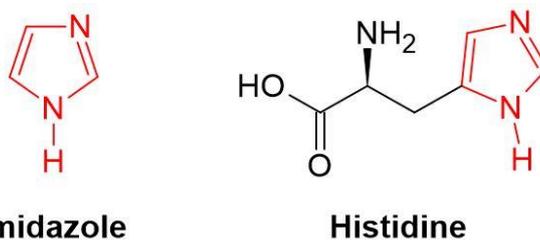


Figure 66 - Structures chimiques de l'histidine et de l'imidazole

7.3.3. Interaction polymère / domaine protéique

Des modules de liaison aux glucides (CBM ou « carbohydrate binding module ») sont trouvés dans les enzymes ayant des glucides (cellulase, xylane, laminarinase, chitinase...) comme substrat (Boraston et al., 2004). Ils permettent l'immobilisation des enzymes à proximité de leurs substrats du fait de l'interaction des CBM avec ces derniers. Ces protéines

font notamment partie du processus de reconnaissance intercellulaire, de l'adhésion cellulaire et des interactions hôte-pathogène (Bolam et al., 1998; Boraston et al., 2004). Une protéine peut présenter un seul ou plusieurs CBM (Sidar et al., 2020).

Un grand nombre de CBM ont été décrits, et le choix de ce dernier permet de moduler le support d'immobilisation. Si le CBM de type 3a de *Clostridium thermocellum* est décrit comme étant spécifique de la cellulose (Benito et al., 2022; Tormo et al., 1996), il est aussi décrit comme interagissant avec du poly(éthylène terephthalate) (PET) par *Pi stacking* des résidus aromatiques retrouvés à la base du CBM de type 3a (Figure 67). Cette interaction est décrite dans le cadre de l'immobilisation d'une cutinase-CBM sur du PET afin d'augmenter l'hydrolyse de ce dernier en augmentant la proximité spatiale entre l'enzyme et son substrat (Chen et al., 2023). Par ailleurs, d'autres CBM sont décrits comme spécifiques d'autres polymères : le CBM 56 d'une glucanase de *Paenibacillus barengoltzii* a été utilisé en 2019 afin de permettre l'immobilisation d'une chitosanase sur du curdlane (glucane β -1,3) (Qin et al., 2019).

7.4. Ingénierie moléculaire pour l'immobilisation : protéine de fusion

L'expression des protéines sous forme de protéines fusionnées avec un CBM est une stratégie intéressante pour les immobiliser sur un matériau à base de cellulose (Boraston et al., 2004). Ponctuellement, la stratégie d'expression en tant que protéine de fusion avec un CBM est décrite comme augmentant l'expression protéique et la solubilité de la protéine ainsi obtenue (Ko et al., 2021).

7.4.1. Le CBM de type 3a de *Clostridium thermocellum*

En particulier, nous avons choisi la famille-3a CBM (CBM3a) de *Clostridium thermocellum*. Le CBM, cristallisé par Tormo et al. fait partie de la protéine A (CipA), une protéine impliquée dans l'organisation structurale du celulosome de *Clostridium thermocellum* (Tormo et al., 1996).

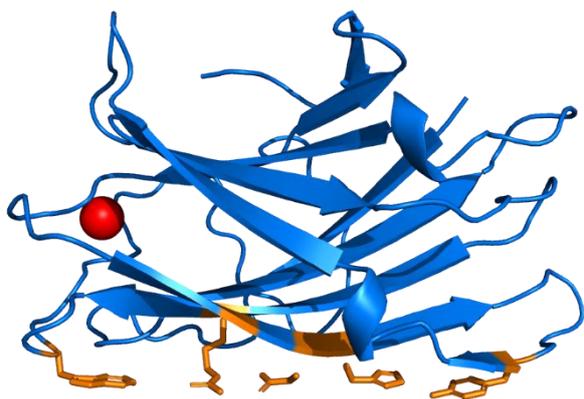


Figure 67 – Représentation tridimensionnelle du CBM-3a de *Clostridium thermocellum* (1nbc). Les résidus représentés en orange sont les résidus interagissant avec la cellulose, permettant la fixation du CBM sur son support. En rouge, l'atome calcium.

Ce CBM est caractérisé par une surface plane constituée de résidus aromatiques et polaires, qui est supposée interagir avec les fibres de cellulose cristalline. La détermination de la structure tridimensionnelle met en exergue la présence d'un atome de calcium au sein d'un groupement de fixation du calcium (Tormo et al., 1996). Son rôle n'est toutefois pas clairement défini (Yaniv et al., 2012)

Le choix de ce CBM, outre sa spécificité pour la cellulose, se justifie par son utilisation déjà décrite dans la littérature dans quelques constructions analytiques. Ce CBM a été utilisé dans plusieurs stratégies d'ingénierie enzymatique qui sont décrites ci-après.

7.4.2. Ingénierie moléculaire

Benito et al. ont appliqué cette stratégie, dans un but de purification, en exprimant une alcool déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* avec le CBM3a de *Clostridium thermocellum* afin de permettre la purification de la protéine sur de la cellulose amorphe régénérée (*regenerated amorphous cellulose*), l'élution étant réalisée avec une concentration élevée de glucose (Benito et al., 2022). Dans le même esprit, la phosphatase alcaline a pu être immobilisée sur les microparticules de cellulose en fusionnant la protéine avec le CBM2a de *Cellulomonas fimi*. Dans cet exemple, le CBM2a a été placé en extrémité N-terminale et C-terminale de la phosphatase sans impact notable sur l'expression, l'immobilisation et l'activité de la protéine de fusion (Singh et al., 2018).

Afin de capturer des brins et des hybrides d'ADN marqués dans un cadre de détection de maladies infectieuses, le domaine ZZ (domaine de la protéine A de *Staphylococcus* reconnaissant les IgG *via* leur fragment F_c) est immobilisé sur un dispositif microfluidique à base de papier sous forme de protéine de fusion avec le CBM3a de *Clostridium thermocellum*. Une augmentation du signal de 2 à 4 fois est alors observée (Rosa et al., 2014). De même, l'association de CBM sur des anticorps entiers ou sur leur partie variable isolée permet de les

immobiliser préférentiellement sur un support papier (par rapport à un support nitrocellulosique). Utilisée dans un essai de flux latéral, cette stratégie permet d'obtenir des réponses plus élevées pour la détection de la gonadotrophine et de l'anticorps Covid-19 (Elter et al., 2021).

Pour conclure, ce projet de thèse s'inscrit dans un besoin de moyens de détection du glyphosate moins onéreux, plus simple que les méthodes traditionnelles d'analyse faisant appel à toute une batterie analytique. Avant ce travail de thèse, à notre connaissance, seuls des biocapteurs et essais biologiques hétérogènes à signal « off » étaient décrits dans la littérature, souffrant d'un manque de spécificité.

L'objectif de cette thèse est de proposer un dispositif de détection du glyphosate à signal « on » dans l'état d'esprit des lignes de conduite ASSURED, à savoir un dispositif analytique simple, robuste, peu onéreux, utilisable par le plus grand nombre et permettant d'avoir un résultat rapide sur site.

Pour cela, nous nous appuierons sur la glyphosate oxydase préalablement décrite par Pedotti et al. en 2009, obtenue par triple mutation à partir de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*. Cette enzyme sera exprimée sous forme de protéine de fusion avec le CBM3a de *Clostridium thermocellum* afin de permettre l'immobilisation de la protéine sur un support cellulosique en une seule étape à partir du lysat bactérien.

Cette enzyme de fusion catalyse l'oxydation du glyphosate en produisant, entre autres, du peroxyde d'hydrogène. Son couplage avec un système de détection du peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une peroxydase, elle-même également potentiellement immobilisée, sera un axe d'étude de ce travail.

2^{ème} partie - Matériel et Méthodes

1. Produits chimiques

Le sel d'acide 2-Hydroxy-3,5-dichlorobenzènesulphonique di-sodique (HDCBS), le 4-aminoantipyrine (4-AAP), la solution d'acrylamide/bis-acrylamide, l'ammonium persulfate, l'albumine de sérum de boeuf (BSA), le dithiothréitol (DTT), la glycine, le lysogeny broth (LB), N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine (TEMED), le sodium dodécyl sulfate (SDS), le tryptone et l'extrait de levure sont acquis auprès de Sigma Aldrich (France). Le glyphosate isopropylammonium vient de ABCR (Germany). Le mélange "EPA 8151 herbicide acid mix" vient de Sigma Aldrich (France) and le mélange "Pestanal standard 17 solution" a été acquis auprès de Supelco (France). L'acide chlorhydrique (HCl), le KH_2PO_4 , le sodium pyrophosphate (PPi) et le véronal (sodium 5,5-diéthylbarbiturate) ont été acquis chez Prolabo (VWR, USA). Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) a été produit par Merck (USA). La catalase provient de Fluka (Switzerland), le K_2HPO_4 de chez Roth (Germany). Les cotons-tiges (100% coton avec tige en papier, Lot 174 573) ont été achetés chez Super U (France). Le « NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) solution" (NP0007) vient de Invitrogen (USA). Les *E. coli* BL21 (DE3) et les *E. coli* TOP10 ont été préparées au laboratoire.

2. Constructions génétiques

2.1. Plasmides utilisés : pUC57 et pET15b

Deux plasmides ont été utilisés pendant ce travail. pUC57 est utilisé comme vecteur de clonage et intervient lors des étapes d'ingénierie moléculaire (mutagenèse ponctuelle, évolution dirigée, ...). Le pET15b quant à lui est utilisé comme vecteur d'expression. L'inversion du gène d'intérêt dans le site de clonage place ce dernier sous le contrôle du promoteur T7, inductible par ajout d'IPTG (opéron lactose) avec une étiquette 6-His à l'extrémité N-terminale.

2.2. Constructions commerciales

Les gènes codant pour la glycine oxydase de *Bacillus subtilis* (Uniprot O31616) contenant les mutations G51S/A54R/H244A suivis du gène CBM3a de la protéine cellulosomale d'échafaudage A de *Clostridium thermocellum* (résidus 368-522, Uniprot Q06851) ont été insérés dans le plasmide pET15b (Pedotti et al., 2009b; Tormo et al., 1996). De même, les gènes codant le variant 6E10 de la peroxydase de *Pseudomonas putida* portant les mutations

H125Y/A142V/E188K (Uniprot Q88HV5) et la peroxydase de type sauvage de *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 ont été clonés en amont du CBM (Borges et al., 2022; Brissos et al., 2017; Colpa et al., 2017; Yu et al., 2014). Les plasmides correspondants pET15b-GlyphOx-CBM, pET15b-6E10-CBM et pET15b-SviDyp-CBM ont été obtenus auprès de Genscript (Piscataway, New Jersey, États-Unis). Les séquences des constructions sont fournies dans les informations complémentaires (Delprat et al., 2023). Après transformation dans des *E. coli* BL21(DE3) chimiocompétentes, les clones sont sélectionnés sur des plaques LB supplémentées en ampicilline 100 µg.mL⁻¹.

2.3. Préparation des bactéries compétentes

Un lot de bactéries *E. coli* chimio-compétentes a été préparé. Pour ce faire, une pré-culture de bactéries *E. coli* TOP10 à 19°C sous agitation a été réalisée jusqu'à une absorbance de 4,2 à 600 nm. A partir de 0,6 mL de cette pré-culture, une culture de 250 mL est réalisée et incubée à 19°C sous agitation jusqu'à atteindre une absorbance de 0,74 à 600 nm. Le culot bactérien est alors isolé par centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C, solubilisé dans 40 mL de tampon TBjap (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM, pH 6,7) stérile supplémenté par du DMSO (2 % v/v) puis incubé pendant 10 minutes à 4°C. L'échantillon est alors centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes à 4°C avant de reprendre le culot dans 18,6 mL de TBjap supplémenté par du DMSO (7 % v/v). Après avoir été incubé à 4°C pendant 10 minutes, l'échantillon est aliquoté par volumes de 100 µL immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les aliquots de bactéries chimio-compétentes sont ensuite conservés à -80°C.

2.4. Transformation bactérienne par choc thermique

Afin de transformer 50 ng d'ADN plasmidique, un aliquot de 100 µL d'*E. coli* TOP10 est préalablement décongelé à 4°C. Une incubation de 10 minutes dans la glace en présence de l'ADN plasmidique permet à ce dernier de se concentrer au niveau des parois bactériennes. Les bactéries sont ensuite soumises à un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes permettant la déstabilisation de la paroi cellulaire et donc l'internalisation de l'ADN plasmidique. Une étape de récupération à 37°C dans 1 mL de milieu LB pendant une heure sous agitation peut être effectuée afin d'augmenter la viabilité cellulaire. L'aliquot de bactéries transformées est concentré par centrifugation dans un volume d'environ 100 µL

avant d'être étalé sur des boîtes de Petri contenant du « LB-Agar » supplémenté en ampicilline.

2.5. Mini-préparation d'ADN

Une pré-culture de 2 mL dans du milieu LB supplémenté en ampicilline ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) d'une colonie transformée par le plasmide d'intérêt est réalisée pendant la nuit, sous agitation à 37°C dans un tube incliné. La culture bactérienne étant considérée à saturation, 1,5 mL de culture est ensuite centrifugés pendant 1 minute à 20 000 g à température ambiante.

Le culot est resuspendu dans 200 μL de tampon Tris HCl 25mM à pH 8,0 supplémenté par du glucose (55 mM) et de l'EDTA (10 mM), sous agitation forte. Les bactéries sont ensuite lysées par ajout de 150 μL d'une solution de soude (0,2 M) et de SDS 1 % (m/v). L'échantillon est homogénéisé et incubé pendant 5 minutes à 4°C . La solution acquiert alors un aspect gluant dû à la présence d'ADN génomique. Le milieu est ensuite neutralisé par ajout de 150 μL de solution d'acétate de potassium (3 M) et d'acide acétique (2 M). L'échantillon est mélangé par retournement et incubé pendant 5 minutes dans la glace. Il est ensuite centrifugé à 20 000 g pendant 5 minutes à température ambiante. La précipitation des ARN est obtenue par ajout de 150 μL de chlorure de lithium (7,5 M) et incubation à -20°C . L'échantillon est ensuite à nouveau centrifugé pendant 5 minutes à 20 000 g à température ambiante. L'intégralité du surnageant (200 μL) est alors prélevé et 800 μL d'éthanol 100 % froid sont ajoutés. L'échantillon est agité fortement au vortex puis centrifugé 15 minutes à 20 000 g à température ambiante. Le surnageant est alors éliminé et le culot lavé avec 300 μL d'éthanol 70 % (v/v) froid (agitation forte puis centrifugation pendant 15 minutes à 20 000 g à température ambiante pour éliminer le surnageant). Le culot est ensuite séché à l'étuve à 42°C puis resuspendu dans 30 μL d'eau et stocké à 4°C pendant une nuit puis à -20°C .

Afin de retirer l'ARN contaminant, une digestion par l'enzyme RNase A est effectuée. Pour 30 μL d'échantillon, 0,05 U de RNase A est ajouté. L'échantillon est incubé 30 minutes à 60°C après avoir été agité par retournement. L'ADN est enfin purifié par précipitation à l'isopropanol et à l'acétate d'ammonium qui permet de favoriser la précipitation des ADN de grande taille (supérieure à quelques centaines de paires de bases).

Brièvement, 1/3 de volume d'acétate d'ammonium 7 M est ajouté à 1 volume d'échantillon. Le mélange est homogénéisé au vortex, puis 1 volume d'isopropanol est ajouté.

L'échantillon est ensuite mis à incuber pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 20 000 g à température ambiante. Le culot est alors lavé par 500 µL d'éthanol 70 % (v/v) à -20°C puis centrifugé à température ambiante pendant 15 minutes à 20 000 g. Le surnageant est éliminé et l'ADN séché à l'étuve à 42°C. Il est ensuite resuspendu dans 30 µL d'eau et stocké à 4°C pendant la nuit puis à -20°C.

2.6. GlyOx-CBM obtenue par mutagenèse ponctuelle

2.6.1. Stratégie de mutagenèse ponctuelle

Les trois mutations de substitution G71S, A74R et H264A (GGT → AGC ; GCG → CGA et CAC → GCG) sont introduites successivement dans le gène de la GlyOx par PCR à partir du plasmide pUC57-GlyOx-CBM obtenu auprès de GeneScript (Piscataway, New Jersey, Etats-Unis). Pour ce faire, un couple d'amorces homologues entre elles sur une dizaine de paires de base contenant la mutation sont utilisées (Figure 68).

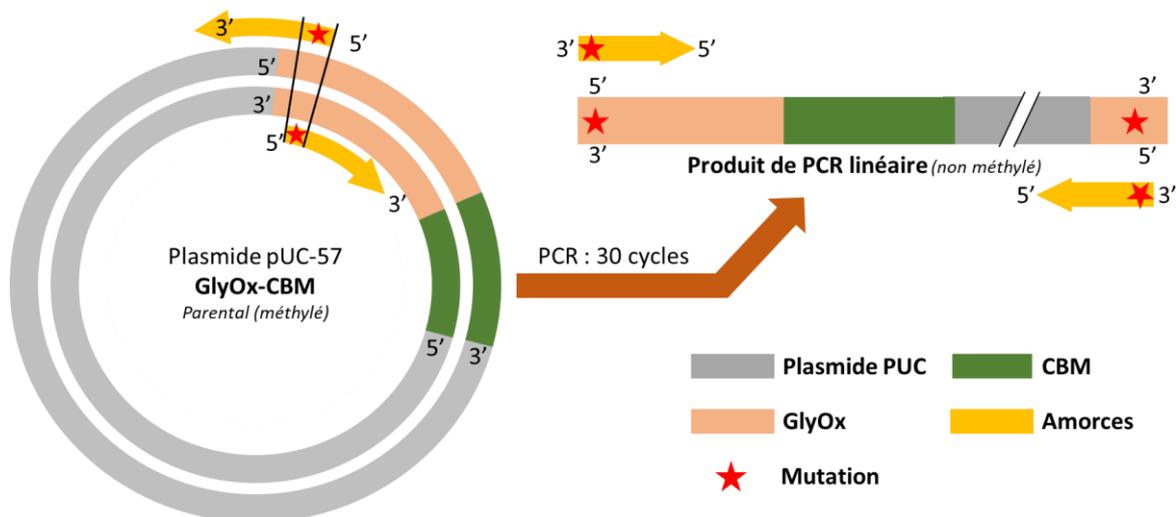


Figure 68 - Schéma de principe de l'introduction d'une mutation.

Les produits de PCR linéaires sont digérés avec 0,5 U de Dpn1 pour 10 µL de produits pendant une heure à 37°C afin de dégrader l'ADN parental circulaire bactérien. Dpn1 permet d'hydrolyser les motifs GATC méthylés, spécifiques des ADN bactériens. L'enzyme est ensuite dénaturée à 80°C pendant 20 minutes et l'ADN précipité à l'isopropanol et à l'acétate d'ammonium (cf. II.2.3).

L'ADN est ensuite transformé dans des bactéries *E. coli* TOP10 afin de le recirculariser par recombinaison endogène. Une mini-préparation d'ADN plasmidique est ensuite réalisée sur un clone afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN méthylé pour l'introduction de la mutation suivante (Figure 69).



Figure 69 – Schéma global de la stratégie de mutagenèse dirigée pour l'obtention du gène de la GlyphOx

Une fois les trois mutations introduites, le triple mutant (pUC57-GlyphOx-CBM) est séquencé afin de valider d'une part l'introduction des mutations et d'autre part l'intégrité du reste du gène.

2.6.2. Introduction des mutations

Les amorces utilisées sont les suivantes (orientation 5' – 3') :

Tableau 8 - Récapitulatif des amorces utilisées.

GO25 (s)	<u>GCTGAGCGCGCATGCGGAATGCGAG</u>	G71S
GO26 (a)	<u>GCGCGCTCAGCATACCCGCCGCC</u>	
GO29 (s)	<u>GCGCATCGAGAATGCGAGGAACGTG</u>	A74R
GO30 (a)	<u>GCATTCTCGATGCGCGCTCAGCATAAC</u>	
GO31 (s)	<u>CACGACGCGTGCTACATTGTTCCGC</u>	H264A
GO32 (a)	<u>GTAGCACGCGTCGTGATACAGGGT</u>	

En **gras** sont représentées les mutations introduites, les zones homologues sont soulignées. L'orientation des amorces est notée (s) : orientation sens ; et (a) : orientation antisens.

L'introduction de la première mutation (G → S) est réalisée dans du tampon de réaction « GC Phusion Reaction buffer » à partir de 10 ng d'ADN parental pUC-57-GlyOx-CBM, 113 ng d'amorce GO25, 111 ng d'amorce GO26 et 0,2 mM de dNTP par 1 U de Phusion polymérase (qsp 40 µL).

La deuxième mutation (A → R) et la troisième mutation (H → A) sont introduites dans du tampon de réaction « Phusion GC » à partir de 10 ng d'ADN parental issu de la mutation précédente, 50 ng d'amorce (respectivement GO29/GO30 et GO31/GO32), 0,2 mM de dNTP (qsp 50µL). La polymérisation est opérée par 1 U de Phusion polymérase.

Pour les trois conditions, le programme de PCR (Figure 70) a été réalisé par le thermocycleur « My Cycler » de Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

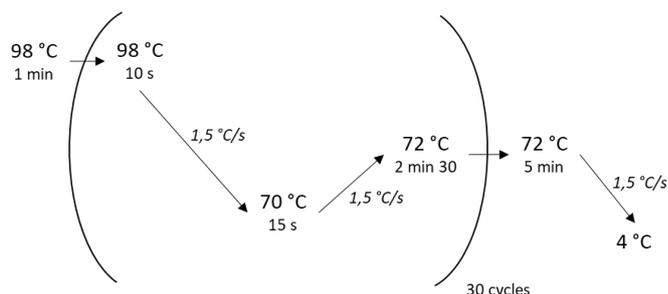


Figure 70 - Programme de PCR utilisé pour l'introduction des trois mutations dans la GlyOx-CBM de manière successive. Les différentes étapes sont :

- D (dénaturation),
- H (hybridation)
- P (polymérisation)

2.6.3. Séparation et visualisation de l'ADN

La visualisation des produits de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou de digestion est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % (m/v). Ce dernier est préparé par ajout de 400 mg d'agarose à 50 mL de tampon TBE (Tris 890 mM, acide borique 890 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0). Le mélange est porté à ébullition puis refroidi à température ambiante afin de laisser l'agarose se solidifier dans le support d'électrophorèse.

Avant de déposer l'échantillon sur le gel, 1 μ L de tampon de charge 6X (NEB) est ajouté pour 5 μ L d'échantillon d'ADN. La migration de l'ADN est réalisée dans du tampon TBE pendant 10 minutes à 50 V, puis 100 V. Le marqueur d'ADN utilisé est le « 1 kb Plus DNA Ladder » permettant d'identifier des fragments de taille comprise entre 0,1 et 10 kb.

2.6.4. Séquençage

Le séquençage des constructions plasmidiques est réalisé auprès d'Eurofins (Evry, France) à l'aide des amorces GO27, GO28 et GO33 (Tableau 9). L'alignement des séquences nucléotidiques est ensuite réalisé *via* l'algorithme BLAST du National Center for Biotechnology Information, utilisable en ligne sur <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Tableau 9 - Récapitulatif des amorces utilisées pour le séquençage.

GO27 (s)	GCCAGTGAATTCGAGCTCGG
GO28 (a)	ACGTGAACATCGTCCTGAATAAAG
GO33 (s)	GGCAGCATGGTCTTCGCTTTCTTC

2.6.5. Dosage de l'ADN

Le dosage d'ADN est effectué par mesures des absorbances à 230, 260 et 280 nm avec un trajet optique de 0,2 mm par le spectrophotomètre Jasco V730 (Jasco, Lisses, France) à l'aide d'un dispositif de mesure sur micro-volume (Traycell type 105.800) de chez Helma Analytics (Paris, France). Le coefficient d'absorption molaire de l'ADN double brin à 260 nm est de $6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ par unité d'absorbance).

2.6.6. Clonage de la GlyphOx dans pET15b

Afin d'exprimer la GlyphOx, il est nécessaire d'introduire son gène dans un vecteur d'expression, ici, pET-15b caractérisé par la présence d'une étiquette 6-His du côté N-terminal. Un gène de sélection est également présent (gène de la β -lactamase à l'origine de la résistance à l'ampicilline ; Amp^R) et le gène d'intérêt est placé sous le contrôle d'un opéron lactose couplé au promoteur de phage T7 permettant une induction de l'expression de la protéine par ajout dans la culture d'isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Figure 71).

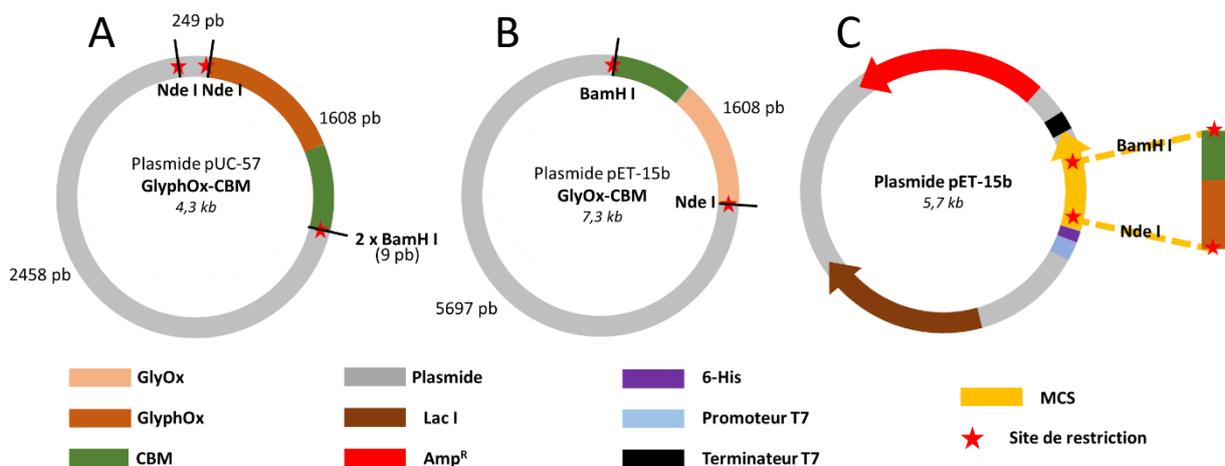


Figure 71 - Carte simplifiée des deux plasmides utilisés pour le transfert du gène de la GlyphOx dans le plasmide pET15b avec indication de la taille des fragments attendus après double digestion (A et B) et clonage dans pET15b de l'insert GlyphOx-CBM (C). Le MCS représenté n'est pas à l'échelle.

Pour ce faire, une digestion séquentielle est réalisée. Dans un premier temps, 5 μg d'ADN plasmidique (pUC57-GlyphOx-CBM ou pET15b-GlyphOx-CBM) sont digérés par 25 U d'enzyme de restriction NdeI à 37°C dans du tampon CutSmart (NEB) pendant une heure dans 40 μL finaux. L'ADN est alors précipité par ajout d'éthanol et d'acétate de sodium. Brièvement, 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M est ajouté à 1 volume d'ADN avant agitation au vortex. De l'éthanol 100 % à -20°C (2 à 2,5 volumes) est ensuite ajouté. L'échantillon est centrifugé à 20 000 g à température ambiante pendant 15 minutes. Une fois le surnageant éliminé, le culot

est lavé avec 2 à 2,5 volumes d'éthanol 70% (v/v) à -20°C et le surnageant est de nouveau éliminé après une centrifugation à 20 000 g à température ambiante pendant 15 minutes. L'ADN est ensuite séché à l'étuve à 42°C. L'ADN est ensuite resuspendu dans le tampon NEB 3.1 pour être digéré par 25 U de l'enzyme de restriction BamHI pendant une heure à 37°C. Les échantillons sont ensuite séparés sur gel d'agarose 0,8% (m/v) et les deux bandes d'intérêt sont découpées avec un scalpel après coloration au BET.

L'ADN d'intérêt est ensuite extrait de l'agarose par électro-élution. Pour ce faire, les morceaux d'agarose sont placés dans des boudins de dialyse (seuil de coupure : 3500 Da) dans 1 mL de tampon TBE stérile (Tris 890 mM, acide borique 890 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0). L'ADN est extrait en le faisant migrer pendant 30 minutes à 10 W. Le tampon de dialyse est alors extrait et l'ADN est précipité à l'éthanol et dosé.

Afin d'obtenir le pET15b-GlyphOx-CBM, 100 ng de vecteur pET15b et 100 ng d'insert GlyphOx-CBM sont mis en contact avec 400 U de T4 DNA ligase en incubant l'échantillon pendant une heure à 25°C dans le tampon « T4 DNA ligase buffer ». Des bactéries *E. coli* TOP10 sont ensuite directement transformées par le produit de ligation.

3. Expressions de protéines

3.1. Protocole d'expression

Tous les milieux de culture sont supplémentés avec 100 µg mL⁻¹ d'ampicilline. La croissance des cellules est suivie par spectrophotométrie à 600 nm avec le NanoDrop One (Thermo Scientific, USA).

3.1.1. Expression de la GlyphOx-CBM

Une pré-culture d'*E. coli* BL21(DE3) ayant été transformées avec pET15b-GlyphOx-CBM est incubée pendant une nuit dans le milieu LB à 37°C sous agitation. A partir de cette pré-culture, 500 mL de Terrific Broth (12 g.L⁻¹ de tryptone, 24 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 9.4 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 2.2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, et 4 mL.L⁻¹ de glycérol) frais sont inoculés à une absorbance à 600 nm d'environ 0,1. Cette nouvelle culture est incubée sous agitation à 37°C jusqu'à ce qu'une absorbance à 600 nm de 0,4 soit atteinte. Un choc thermique est effectué à 47°C pendant 30 minutes avant l'induction par ajout d'IPTG (0,5 mM final) et l'expression des protéines est laissée pendant 20 heures à 15°C sous agitation.

3.1.2. Expression de la GlyOx, GlyOx-CBM, 6E10-CBM et SviDyP-CBM.

Les protéines GlyOx, GlyOx-CBM, 6E10-CBM et SviDyP-CBM sont exprimées selon le même protocole. Pour ce faire, des pré-cultures d'*E. coli* BL21(DE3) transformées sont incubées pendant une nuit dans un milieu LB à 37°C sous agitation. Ces pré-cultures permettant d'inoculer le lendemain 500 mL de LB frais à une absorbance à 600 nm d'environ 0,1. L'induction par addition d'IPTG (0,5 mM final) est réalisée la culture atteint une absorbance à 600 nm de 0,6-0,8 et les cellules sont incubées pendant 20 heures à 37°C sous agitation.

3.1.3. Récolte et lyse

Les cellules sont culotées par centrifugation à 5000 g pendant 15 min à 4°C et lavées deux fois avec de l'eau distillée avant d'être remises en suspension dans 7 mL par gramme de cellules dans un tampon de phosphate de sodium 45 mM pH 8,5 additionné de 10 % de glycérol (v/v). La lyse cellulaire est réalisée par sonication à 4°C avec un homogénéisateur ultrasonique Sonopuls GM 70 (Bandelin, Allemagne ; 4 cycles de 3 min avec 1 min de récupération, 70 % de la puissance). Les lysats cellulaires sont clarifiés par centrifugation (20 000 g, 90 min, 4°C). Le lysat GlyOx-CBM est conservé à 4°C jusqu'à utilisation (quelques jours), les autres lysats étant aliquotés (300 µL à 2 mL) et conservés à -80°C.

3.2. Optimisation du protocole d'expression de la GlyOx-CBM

3.2.1. Induction précoce

L'impact du moment de l'induction (soit de l'ajout d'IPTG) a été également étudié. Initialement réalisée à une DO^{600nm} de 0,6-0,8, une induction lors que la DO^{600nm} 0,4 a été réalisée. Une activité spécifique bien supérieure a été obtenue avec une induction précoce : pour la GlyOx-CBM, nous avons donc utilisé une induction à DO^{600nm} de 0,4.

3.2.2. Choix du tampon de lyse

Le tampon de lyse utilisé est un tampon pyrophosphate 45 mM pH 8,5 supplémenté en glycérol 10 % (Pedotti et al., 2009b). Des essais en plaques 96 de cultures ont permis d'observer que l'utilisation du véronal ou borate comme tampon de lyse ne permet pas l'extraction des protéines, l'activité se retrouvant exclusivement dans le culot après isolation de la fraction soluble : aucune activité n'est mesurable dans le surnageant. En revanche, le tampon phosphate de sodium peut être aussi utilisé.

3.2.3. Utilisation de lysozyme

Le lysozyme de blanc d'œuf de poulet est une enzyme ayant des propriétés antibactériennes, du fait de la catalyse du peptidoglycane constituant la paroi bactérienne des bactéries à gram positif. Il a été utilisé à 10 g/L dans le tampon de lyse, avec une pré-incubation de 60 minutes à 4°C avant la lyse afin de permettre la stabilisation voire dégradation des membranes. La lyse est ensuite complétée par sonication. Néanmoins, la forte concentration de lysozyme ajoutée au milieu fausse les concentrations protéiques mesurées et diminue artificiellement les activités enzymatiques spécifiques des GlyOx-CBM et GlyphOx-CBM, sans gain évident apparent. Il a été décidé de ne pas utiliser de lysozyme.

3.3. Purification des GlyOx et GlyphOx

Afin de purifier les GlyOx ou GlyphOx, une chromatographie d'affinité associée à deux chromatographies d'exclusion stérique a été envisagée.

Une première chromatographie de dessalage permet d'échanger le tampon de lyse (PPi 50 mM pH 8,5) avec du tampon véronal 50 mM pH 8,5. Le PPi pouvant potentiellement chélater les ions nickel de la chromatographie d'affinité. Pour ce faire, le lysat bactérien est injecté sur une colonne de dessalage préalablement équilibrée dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5. Le débit, fixé à 5 mL.min⁻¹, est contrôlé par une Äkta Sart. Des fractions sont collectées lorsque des protéines sont éluées (détecteur UV à 280 nm) jusqu'à l'augmentation de la conductivité témoignant de l'éluion des sels. L'activité enzymatique des différentes fractions collectées est observée rapidement (par ajout du substrat en présence d'HRP, 4-AAP et HDCBS) à l'œil.

Les fractions ayant une activité sont mélangées puis injectées dans une chromatographie d'affinité. Les protéines sont alors retenues du fait de leur étiquette histidine interagissant avec les ions nickel de la colonne Ni-NTA. L'injection de l'échantillon est réalisée à 1 mL.min⁻¹, le débit du reste de la purification étant fixé à 5 mL.min⁻¹. Une fois les protéines fixées, la colonne est rincée avec du tampon véronal 50 mM pH 8,5. Elles sont ensuite éluées par un gradient d'imidazole. A nouveau, l'activité des différentes fractions est vérifiée rapidement comme précédemment, et les fractions actives sont de nouveau mélangées.

Enfin, l'imidazole est retiré de l'échantillon par chromatographie de dessalage, comme précédemment. Les fractions actives sont mélangées puis concentrées à l'aide de concentrateurs Amicon 50 kDa.

3.4. Dosage de protéines

Les protéines solubles sont quantifiées par le test de Bradford (Bradford, 1976) selon les protocoles standard et la BSA est utilisée comme étalon.

3.5. SDS-PAGE

La caractérisation de la composition protéique des échantillons est réalisée par SDS-PAGE avec des gels 12 % dont la composition est décrite ci-dessous :

Tableau 10 - Composition des gels de SDS-PAGE 12%

Composé	Gel de migration (pH 8,8)	Gel de concentration (pH 6,8)
Tris-HCl	375 mM	125 mM
Acrylamide / Bis-Acrylamide 30 % / 0.8 % (m/v)	12 %	4 %
SDS (m/v)	0,1 %	0,05 %
Ammonium persulfate (m/v)	0,05 %	0,05 %
TEMED (v/v)	0,07 %	0,1 %

Les échantillons à migrer (volume déterminé de manière à déposer 10 µg de protéines) sont supplémentés en tampon Laemmli (Tris HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10 % (m/v), glycérol 20 % (v/v), β-mercaptoéthanol 1,7 % et bleu de bromophénol 0,05 % (m/v)) puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Les échantillons sont déposés sur le gel en même temps que les marqueurs de masse moléculaire (BroadRange, BioRad, Marne-la-Coquette, France) et la migration s'effectue sous l'application d'un champ électrique de 50 V pendant 10 minutes dans un tampon de migration Tris HCl 0,025 M pH 8,5, glycine 0,2 M et SDS 0,1 % (m/v) puis à 100 V. Après migration, le gel est coloré pendant une nuit par du EZ Blue Gel Staining Reagent (Sigma, St Quentin Falavier, France) puis lavé trois fois pendant 10 minutes sous agitation dans de l'eau ultra-pure.

Pour l'identification des protéines immobilisées sur des disques de papier ou des polymères, le disque de papier est découpé à l'emporte-pièce (les polymères sont récupérés par centrifugation) et incubé dans une solution avec du bleu de charge. L'échantillon est chauffé à 95°C pendant 5 minutes : les protéines sont alors dénaturées et se désorbent de leur

support d'immobilisation. Après le chauffage, l'échantillon est centrifugé et la partie liquide est déposée.

Enfin, il est possible d'analyser le contenu protéique de bactéries directement à partir de la culture. Pour ce faire, un échantillon de 1 mL de culture bactérienne est prélevé. Les bactéries sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans du bleu de charge (100, 200 μ L totaux). L'échantillon est chauffé à 95°C pendant 5 minutes, centrifugé et une partie de la fraction liquide est déposée sur le gel.

4. Préparation des plaques 96 disques de papier

Des plaques 96 disques ont été conçues sur le même modèle que les plaques 96 puits des lecteurs de plaque (113 x 79 mm, diamètre des disques de 0,6 mm). Pour ce faire, les motifs sont imprimés avec une encre à base de cire (imprimante XeroX) sur du papier Whatman n°1. Les plaques sont ensuite mises à l'étuve à 100°C pendant 60 minutes afin de faire fondre la cire et lui permettre ainsi de passer à travers le papier, créant les barrières hydrophobes isolant les puits (Figure 72).

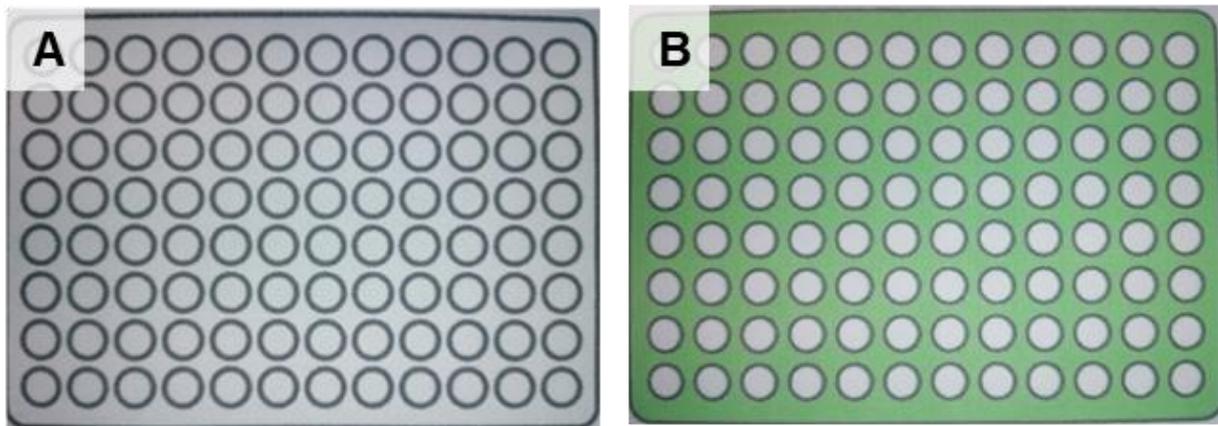


Figure 72 - Photographies de deux motifs de plaques 96 disques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse. Le diamètre des disques est de 60 mm. Les zones entre les disques peuvent être laissées nues afin de limiter la couleur du motif pour les détections colorimétriques (A) ou couverte d'un quadrillage (B). Lors de l'incubation à 100°C pendant une heure, la cire traverse le papier et forme une barrière hydrophobe isolant les disques. Les plaques font 113 x 79 mm.

5. Immobilisation de protéines

5.1. Spécificité de l'interaction CBM-polymère

Afin de vérifier l'immobilisation sur un support cellulosique des protéines de fusion avec un CBM (GlyOx-CBM et GlyphOx-CBM) et la spécificité de cette immobilisation, 4 polymères ont été incubés dans du lysat : un disque de papier Whatman n°1, de la cellulose cristalline, du chitosan (polymère glucidique) et de polyvinylalcool. Au bout de 10 minutes d'incubation, la partie solide est récupérée par centrifugation, et rincée deux fois avec du tampon véronal 50 mM pH 8,5. La fraction solide est de nouveau isolée, et les protéines retenues sont décrochées par dénaturation dans du bleu de charge et analysées par SDS-PAGE.

5.2. Immobilisation sur papier

Pour immobiliser les protéines de fusion avec le CBM3a, des plaques à 96 disques sont utilisées (cf. 4). Les plaques sont appliquées sur du papier absorbant et le lysat bactérien contenant la protéine d'intérêt est déposé (5 ou 10 μ L à la fois) sur les disques de papier : la présence de papier absorbant en-dessous de la plaque permet de créer une force capillaire entraînant l'échantillon à travers l'épaisseur du papier. Les protéines non retenues sont entraînées par le dépôt de tampon véronal 50 mM pH 8,5 (GlyOx, GlyOx-CBM, GlyphOx, GlyphOx-CBM ou 6E10-CBM) ou acétate 50 mM pH 5,0 (SviDyP-CBM) (Figure 73). La quantité de protéines immobilisée peut être augmentée en multipliant les cycles de dépôt/rinçage. Le papier absorbant est changé régulièrement pour ne pas contaminer les puits entre eux. Lors de l'utilisation des plaques non colorées (Figure 72A), il est possible de placer dessous une plaque colorée (Figure 72B) afin d'empêcher les contaminations par le dessous de la plaque.

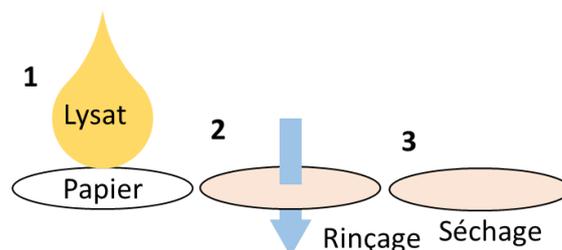


Figure 73 -Schéma du protocole d'immobilisation de protéines sur papier directement à partir du lysat bactérien les contenant.

Une fois les protéines fusionnées avec un CBM (Carbohydrate Binding Module) immobilisées, les plaques sont séchées à température ambiante. Une feuille de plastique autocollante peut être appliquée en-dessous afin de sceller les puits.

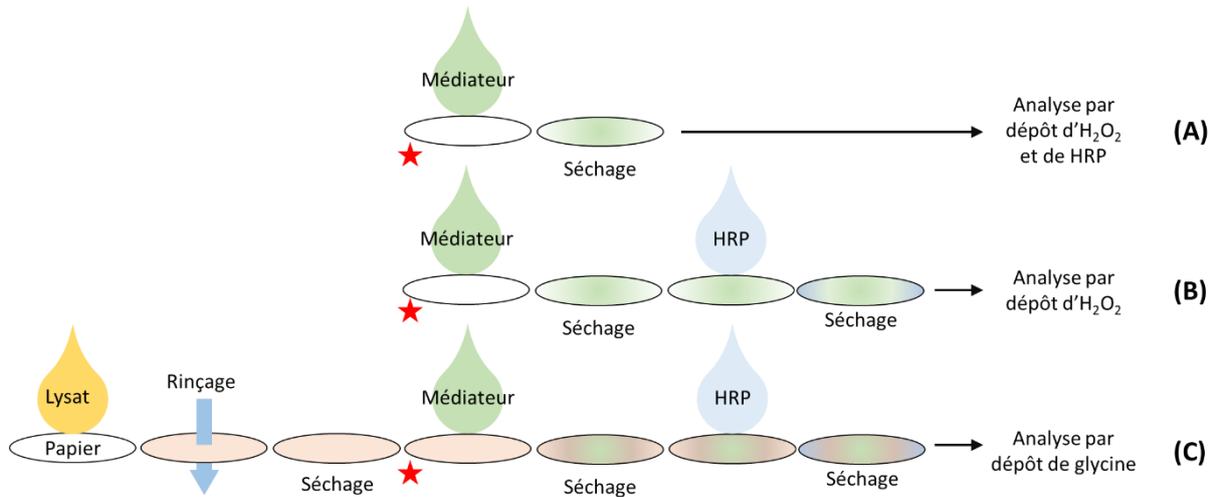


Figure 74 - Schémas chronologiques des différentes étapes de conception des disques de papier modifiés par l'ajout d'enzymes et des substrats de la peroxydase pour la détection du peroxyde d'hydrogène (A et B) ou de la glycine (C). L'étoile rouge indique le collage d'une plaque de plastique permettant de sceller le fond du puits.

Lorsque des colorants doivent être immobilisés, les protéines avec CBM sont immobilisées en amont (Figure 74C). En effet, le rinçage des protéines non retenues pourrait entraîner les médiateurs colorimétriques qui sont solubles (aux concentrations utilisées) dans l'eau. Ainsi, 5 μ L de TBM (15 ou 30 mM) ou d'ABTS (50 mM) ou de 4-AAP (50 mM) et HDCBS (180 mM) sont déposés à la surface des disques de papier (préalablement scellés avec une plaque de plastique collante) et laissés sécher dans le noir (le TMB étant photosensible).

Si la HRP doit être immobilisée, elle est déposée après dépôt et séchage des colorants (Figure 74 B et C). Sinon, elle est ajoutée soluble en même temps que le substrat (Figure 74 A).

5.1. Immobilisation sur coton

5.1.1. Vérification de l'immobilisation des protéines

Les cotons-tiges sont incubés dans des lysats bactériens (GlyphOx-CBM, 6E10-CBM ou un mélange des deux lysats (90/10 v/v)) pendant 10 minutes à température ambiante, puis lavés par agitation pendant 20 secondes dans un tampon véronal 50 mM (pH 8,5). Les têtes de coton sont ensuite incubées avec le tampon de charge SDS-PAGE pendant 10 minutes avant d'être chauffées à 99°C pendant 5 minutes. Le coton est séparé du tampon Laemmli supplémenté en DTT (10 mM) à l'aide de colonnes de centrifugation par filtration (Macherey-Nagel) et d'une

centrifugeuse de paillasse. Les protéines ainsi remises en solution et dénaturées sont analysées par SDS-PAGE 12 % (cf. 3.5 du M&M), coloration avec le réactif de coloration de gels EZBlue™ et visualisation avec la caméra CCD LAS-1000 (Fujifilm, Japon) ou avec Gel Doc XR+ (BioRad, USA).

5.1.2. Préparation et conservation des cotons-tiges enzymatiques

La GlyphOx-CBM n'est pas stable à 4°C ou à - 80°C sous forme de lysat bactérien. Afin de conserver l'activité enzymatique sur les cotons-tiges, la lyophilisation des échantillons a été choisie afin de les conserver sous forme sèche. Le lactose et le sorbitol sont utilisés comme additifs cryoprotecteurs.

Le lactose (250 mM final) est dissous dans le lysat de GlyphOx-CBM (environ 20 mL, activité totale de 28 nmol.min⁻¹) à température ambiante. Ensuite, le lysat 6E10-CBM (environ 2,5 mL, activité totale de 4700 nmol.min⁻¹) est ajouté et le volume final est ajusté à 25 mL à l'aide d'un tampon véronal 5 mM pH 8,5. Le mélange enzymatique GlyphOx-CBM / 6E10-CBM (dans un rapport 1:9 v/v) est ainsi préparé, en présence de lactose.

Les GlyphOx-CBM et 6E10-CBM sont immobilisées sur des cotons-tiges de la manière suivante : chaque coton-tige est plongé dans 325 µL du mélange de lysats pendant 10 minutes avant d'être rincé avec 4 mL de tampon véronal 5 mM pH 8,5 supplémenté par 250 mM de lactose. Cette procédure en deux étapes (incubation/lavage) est répétée deux fois en utilisant à chaque fois 200 µL de mélange de lysats pour augmenter la charge enzymatique sur les cotons-tiges. Les cotons-tiges sont rincés avec du tampon à concentration faible (véronal 5 mM pH 8,5 supplémenté avec le cryoprotecteur) afin de diminuer la concentration en tampon sur le coton-tige et ainsi d'éviter la présence de quantités de sel très élevées au contact de l'enzyme lors du retrait de l'eau.

Les cotons-tiges enzymatiques sont congelés dans l'azote liquide immédiatement après la dernière étape de lavage et lyophilisés pendant une nuit (Alpha 2-4 LDplus, Martin Christ, Allemagne). Ils sont ensuite stockés à - 80°C. Ils peuvent être conservés dans un sachet hermétique sous atmosphère sèche à - 80°C.

6. Analyse des produits par résonance magnétique nucléaire

Les produits de réaction de la GlyphOx-CBM en présence de glyphosate ont été analysés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton (^1H) et du phosphore (^{31}P). Pour ce faire, le lysat de GlyphOx-CBM ($100\ \mu\text{L}$, $0,125\ \text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$) a été incubé avec $2,5\ \text{mM}$ de glyphosate d'isopropylamine dans un tampon pyrophosphate $10\ \text{mM}$ pH $8,5$ pendant 24 heures à 30°C . De la catalase a été ajoutée ($26\ \text{U}$) pour empêcher l'accumulation de peroxyde d'hydrogène pouvant dénaturer l'enzyme (volume de réaction de $450\ \mu\text{L}$). Avant l'analyse RMN, $50\ \mu\text{L}$ de D_2O ont été ajoutés ($10\ \%$ v/v). Les spectres de RMN ^1H et ^{31}P ont été mesurés avec un spectromètre $400\ \text{MHz}$ (Bruker) par le CCRMN (ICBMS, Université Lyon 1, France).

7. Mesures d'activité par colorimétrie

Toutes les expériences spectrophotométriques sont réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques Berthold Tristar 5, sauf indication contraire.

7.1. Principe général

Dans cette thèse, la détection du peroxyde d'hydrogène est l'élément central de l'ensemble des tests d'activité enzymatique. En effet, il s'agit de la molécule qui sera dosée lors des tests d'activité des peroxydases ou des oxydases (en couplage avec une peroxydase).

La glycine oxydase et la glyphosate oxydase sont des oxydases, produisant par conséquent du peroxyde d'hydrogène, l' O_2 étant l'accepteur final des électrons produits lors de l'oxydation du substrat (*id est* glycine ou glyphosate). Les autres produits de ces oxydases (que ce soit le glyoxylate, les ions ammonium pour la glycine ou l'AMPA pour le glyphosate) n'ont pas de propriétés intrinsèques intéressantes à des fins analytiques alors que le peroxyde d'hydrogène est un produit classiquement dosé.

Les peroxydases seront donc au cœur de ce projet : elles permettent le dosage du peroxyde d'hydrogène, catalysant sa réduction en H_2O grâce à l'oxydation concomitante d'un substrat. Associées à la GlyphOx ou à la GlyOx, elles permettent le dosage du glyphosate ou de la glycine respectivement. Les peroxydases sont alors utilisées comme systèmes rapporteurs à l'aide de trois substrats différents : l'ABTS, le TMB et le couple 4-AAP/HDCBS (Figure 75).

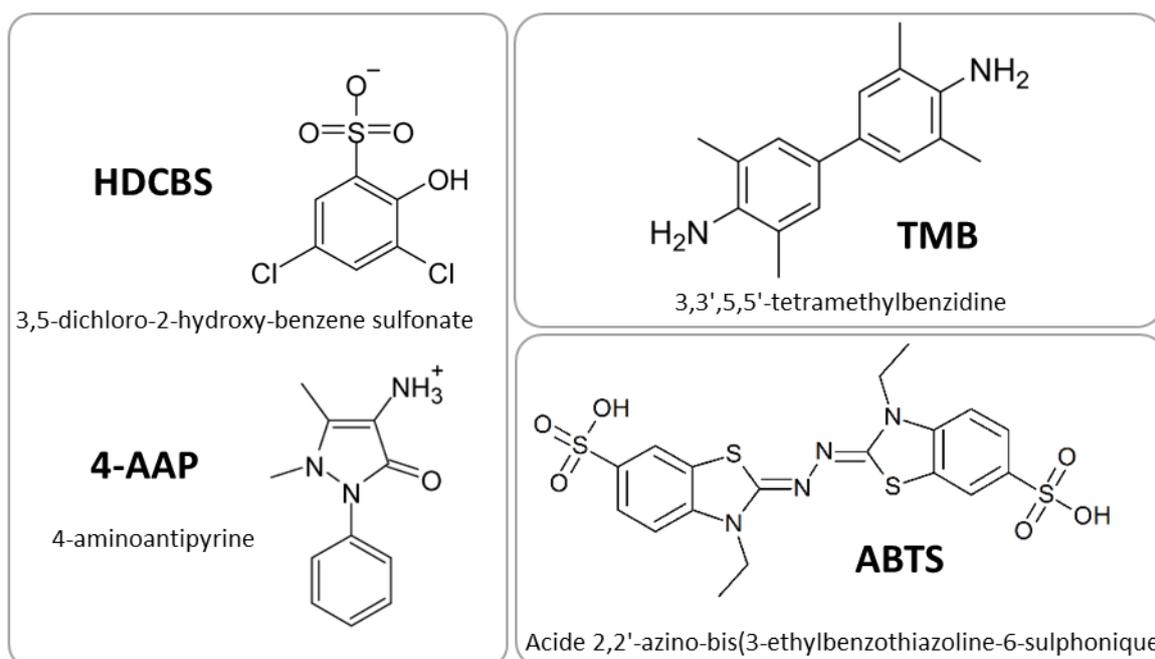


Figure 75 - Structures chimiques de l'HDCBS, 4-AAP, TMB et ABTS, substrats de la HRP. Une fois oxydés, ils peuvent être suivis par spectrophotométrie par exemple (510 nm pour le couple HDCBS/4-AAP, 370 nm pour le TMB et 734 nm pour l'ABTS).

7.2. Activité des enzymes en solution

Tous les essais enzymatiques sont réalisés dans un tampon véronal 50 mM pH 8,5 contenant du 4-AAP (2,5 mM), du HDCBS (9 mM) et le lysat enzymatique (6E10-CBMSviDyP-CBM, GlyOx-CBM ou GlyphOx-CBM) (Figure 76). Les milieux de réaction sont incubés à 30°C pendant 10 minutes avant d'initier la réaction enzymatique. Les activités de 6E10-CBM et SviDyP-CBM sont déclenchées par l'ajout de H₂O₂ (50 μM) et l'absorbance est mesurée à 510 nm et à 30°C pendant 600 secondes. L'activité de la GlyOx-CBM ou de la GlyphOx-CBM est mesurée en présence d'HRP (0,25 U.mL⁻¹) et la réaction est déclenchée par ajout de 10 mM de glycine ou de 2,5 mM de glyphosate d'isopropylamine (RoundUp®, Monsanto). Une activité identique est obtenue en utilisant du glyphosate d'isopropylamine pur. Les vitesses initiales sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage du H₂O₂ pour la détermination du coefficient d'extinction molaire du produit chromophore de la réaction ($\epsilon_{510\text{ nm}} = 12\ 820\ \text{M}^{-1}$) déterminé dans 200 μL de tampon véronal 50 mM pH 8,5 (Takrama and Taylor, 1991).

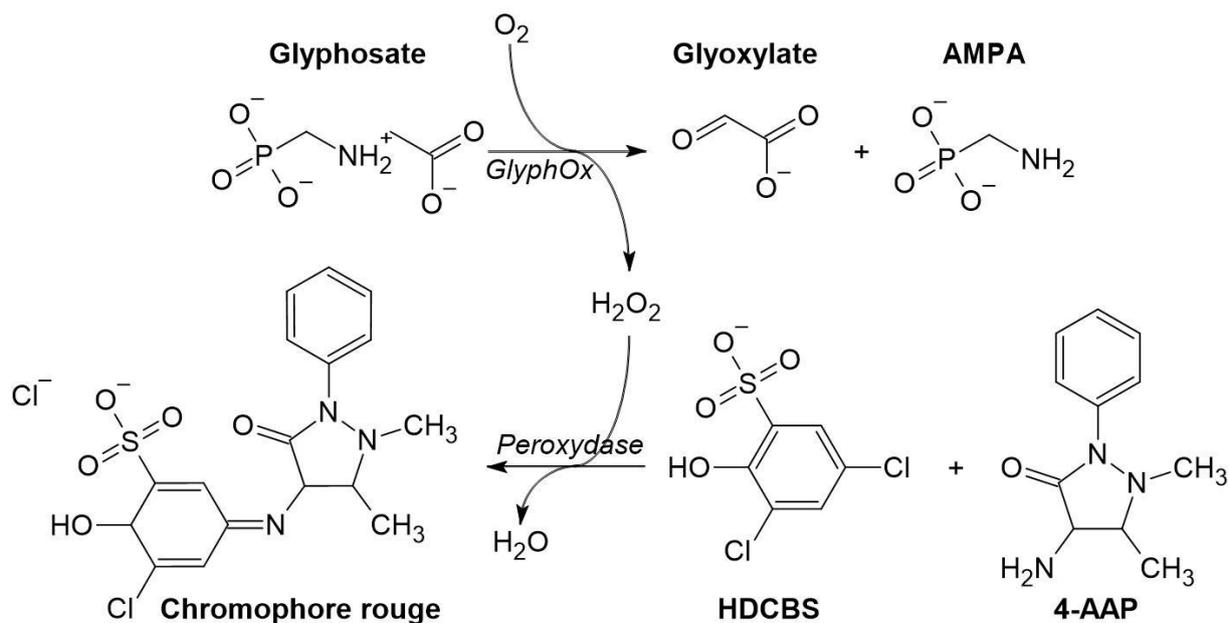


Figure 76 -Schéma montrant les réactions enzymatiques à la base du test d'activité de la glyphosate oxydase (GlyphOx) et du dosage du glyphosate grâce à l'association d'une oxydase (GlyphOx) et d'une peroxydase (6E10 ou SviDyP ou HRP). En présence de glyphosate, la glyphosate oxydase catalyse son oxydation, produit du peroxyde d'hydrogène qui est alors substrat de la peroxydase. En présence de son deuxième substrat chromogène (ici, le couple HDCBS / 4-AAP), la peroxydase catalyse l'oxydation du composé chromogène pour former un composé coloré (ici, le N-4-(anypyril)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzoquinone-monoimine), le peroxyde d'hydrogène étant l'accepteur final des électrons et étant réduit en H_2O . Le test d'activité enzymatique est basé sur la mesure d'absorbance du chromophore produit à 510 nm.

Pour déterminer la température optimale de réaction, le milieu réactionnel (50 mM de tampon véronal pH 8,5, 2,5 mM de 4-AAP, 9 mM de HDCBS, 0,25 U.mL⁻¹ de HRP) contenant 100 μ L de lysat de GlyphOx-CBM (activité spécifique de 3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ à 30°C) est incubé 10 minutes à une température donnée comprise entre 20°C et 45°C, sous agitation (500 rpm), dans une cuvette utilisant un spectrophotomètre Jasco V-730 équipé d'un dispositif Peltier ETCR-762 (Jasco, Japon). La réaction est initiée par l'ajout de glyphosate d'isopropylamine (2,5 mM dans un volume de réaction de 2 mL, $\epsilon_{510nm} = 13\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

La dépendance au pH est déterminée entre pH 5,5 et 10 en utilisant les tampons suivants : acétate de sodium (pH 5,5), imidazole (pH 6,0), HEPES (pH 7,0), phosphate (pH 7,5), véronal (pH 8,5), carbonate (pH 9,5 et pH 10,0), les mesures étant effectuées à 30°C.

7.3. Activité des enzymes immobilisées sur papier

L'activité des disques de papier sur lesquels des enzymes sont immobilisées peut être mesurée de deux manières différentes : par incubation du disque dans un milieu réactionnel ou avec les composants de ce milieu directement présents sur le papier.

7.3.1. Avec système rapporteur en solution

Le disque de papier avec la GlyOx-CBM ou la GlyphOx-CBM immobilisée est incubé dans 500 μL de milieu réactionnel composé de tampon véronal (50 mM, pH 8,5) supplémenté en glycine (10 mM) ou en glyphosate (2,5 mM) pendant 45 minutes à 30°C afin d'accumuler le peroxyde d'hydrogène. A la fin de l'incubation, 170 μL du milieu réactionnel sont prélevés et déposés dans les puits d'une plaque à 96 puits (contenance de 400 μL). 10 μL de HRP (5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10 μL de 4-AAP (50 mM) et 10 μL d'HDCBS (180 mM) sont ajoutés et la plaque est incubée 15 minutes à 30 °C. Une mesure d'absorbance à 510 nm est alors réalisée avec le lecteur de plaque.

Un protocole similaire est utilisé pour le dosage de la SviDyP immobilisée. Le disque de papier avec la SviDyP-CBM est découpé à l'emporte-pièce et est incubé dans 500 μL de tampon acétate 50 mM pH 5,5 supplémenté en TMB 15 mM et en présence de 10 μM ou 100 μM de peroxyde d'hydrogène pendant 10 minutes à 30°C. Le surnageant peut être dosé par absorbance à 370 nm mais l'activité peut aussi être visualisée par inspection visuelle, le TMB semblant se concentrer sur le papier.

7.3.2. Avec système rapporteur sur le support

Lorsque les enzymes sont co-immobilisées sur le papier avec les médiateurs de la peroxydase, la mesure de l'activité se fait directement à partir du papier. L'échantillon (5 μL contenant de la glycine, du glyphosate ou du peroxyde d'hydrogène) est alors déposé directement sur les disques de papier, qui sont incubés pendant 10 minutes à 30°C avant que l'image soit numérisée. En l'absence d'immobilisation de la HRP, cette dernière est ajoutée en même temps que le substrat.

7.4. Activité des enzymes immobilisées sur coton

Les cotons-tiges enzymatiques GlyphOx-CBM/6E10-CBM sont laissés quelques minutes à température ambiante et immergés dans 1 mL de milieu réactionnel (0-10 mM de glyphosate

d'isopropylamine, 2,5 mM de 4-AAP et 9 mM de HDCBS préchauffés à 30°C) pendant 10 minutes sans agitation. Ensuite, l'absorbance de la solution est mesurée à 510 nm et l'image des cotons-tiges est acquise par une caméra de smartphone (Vivo, China) ou par numérisation (*scanner* Epson Perfection, USA).

7.5. Traitement d'image (après scan ou photographie)

La quantification des images colorées est réalisée avec le logiciel ImageJ (version 1.54d). L'image originale est divisée en trois canaux (rouge, vert et bleu), ce qui donne trois images, plus une image transformée en niveaux de gris. Toutes les images ont des intensités de pixels comprises entre 0 et 255. Des régions d'intérêt (ROI) circulaires identiques sont définies sur la tête de chaque coton-tige et l'intensité moyenne des pixels de la ROI est utilisée pour la quantification de chaque zone. L'intensité moyenne des pixels du contrôle a été soustraite de celle de l'échantillon correspondant. Au moins 3 cotons-tiges ont été analysés par condition expérimentale.

L'intensité moyenne des pixels corrigée a été ajustée à une hyperbole selon l'Équation 3 :

$$PI_{\text{canal}} = \frac{PI_{\text{max}} \times [\text{Glyphosate}]}{K_M + [\text{Glyphosate}]} \quad \text{Équation 3}$$

PI_{canal} étant l'intensité moyenne corrigée des pixels d'une ROI, PI_{max} l'intensité moyenne corrigée maximale des pixels à une concentration de glyphosate saturante, $[\text{Glyphosate}]$ la concentration de glyphosate en mM et K_M la constante apparente de Michaelis-Menten pour l'essai.

8. Méthodes électrochimiques

8.1. Fabrication des électrodes sérigraphiées sur papier

Le système électrochimique utilisé dans le cadre de ce travail est un système à trois électrodes composé d'une électrode de référence (Ag/AgCl), d'une électrode de travail (carbone) et d'une contre-électrode (carbone). Ces trois électrodes sont sérigraphiées sur le papier sur un motif de cire créant une barrière hydrophobe et des connecteurs permettant de relier les électrodes au circuit électriques sont sérigraphiées à base d'encre d'Ag/AgCl (Figure 77, Figure 79). Ces électrodes sont sérigraphiées au laboratoire grâce à une machine à sérigraphier DEK 248 (Weymouth, Royaume Uni) et de deux masques spécifiques du modèle

d'électrode à sérigraphier (un premier masque pour l'encre de carbone et un deuxième pour l'encre d'Ag/AgCl).

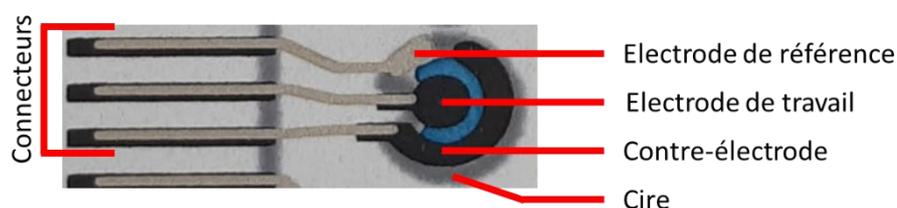


Figure 77 - Photographie d'un système à trois électrodes sérigraphié sur papier.

Les électrodes de carbone sont sérigraphiées dans un premier temps (encre 423 SS d'Acheson), suivi d'une cuisson à 50°C pendant 35 minutes. Les électrodes d'Ag/AgCl sont sérigraphiées dans un deuxième temps (encre 6038 SS d'Acheson), suivi d'une nouvelle cuisson à 50°C pendant 35 minutes.

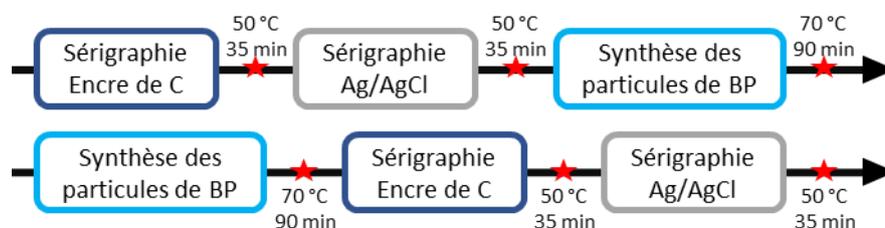
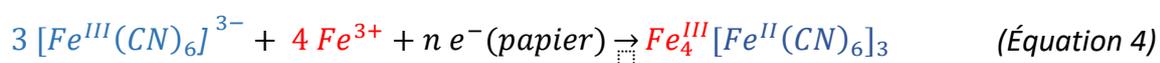


Figure 78 - Schéma des étapes de fabrication des électrodes sur papier fonctionnalisées par la synthèse de particules de bleu de Prusse in situ.

Des particules de bleu de Prusse sont synthétisées et associées aux électrodes. Pour cela, deux façons de procéder ont été utilisées, la synthèse des particules de bleu de Prusse pouvant être effectuée avant la sérigraphie (et donc subir les deux cuissons à 50°C de 35 minutes et le processus de la sérigraphie) ou après la sérigraphie (Figure 78). En fin de fabrication, les électrodes sont rigidifiées en collant un film plastique sur la face comportant les électrodes, en laissant les connecteurs libres.

Dans ce travail, la synthèse des particules de bleu de Prusse a été réalisée directement sur le papier (dont le motif a préalablement été imprimé avec de la cire et fondu) à partir du dépôt d'un mélange extemporané équimolaire de FeCl_3 et $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Le papier va agir comme donneur d'électrons, du fait de ses fonctions hydroxyle et aldéhyde, permettant la synthèse des particules de bleu de Prusse (Équation 4). La présence d'impuretés dans le papier (comme des cendres) peut également être à l'origine de ce don d'électrons.



Après dépôt du mélange sur les électrodes, celles-ci sont laissées 5 minutes sur la paillasse avant d'être incubées pendant 90 minutes à 70°C. Les électrodes sont ensuite sorties de l'étuve et stockées à l'abri de la lumière. 4 concentrations en fer total dans le mélange de précurseurs sont testées : 5, 10, 25 et 50 mM (Figure 79).

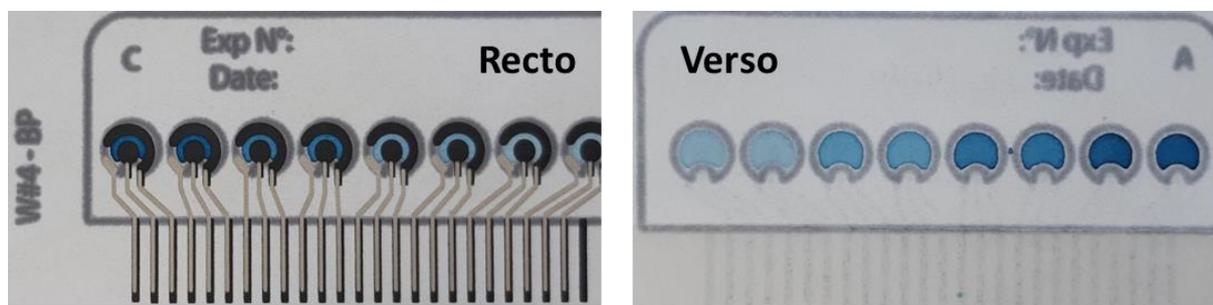


Figure 79 – Photographie d'une plaque (recto et verso) de 8 électrodes sérigraphiées. Les différentes électrodes sont séparées par un motif imprimé à base de cire puis fondu pour que la cire traverse le papier. Des particules de bleu de Prusse ont été synthétisées directement sur le papier à partir d'un mélange équimolaire de $FeCl_3$ et $K_3Fe(CN)_6$ (avec des concentrations en fer total de 5, 10, 25 et 50 mM (2 électrodes pour chacune)). Les électrodes de travail et les contre-électrodes sont sérigraphiées à partir d'une encre de carbone et les électrodes de référence à partir d'une encre d'Ag/AgCl. La connexion des différentes électrodes entre la zone de dépôt de l'échantillon et les connecteurs est sérigraphiée avec une encre d'Ag/AgCl.

8.1. Principe

Le bleu de Prusse agit comme un médiateur électrochimique. Sous sa forme réduite, blanc de Prusse (PW), il est oxydé en présence de peroxyde d'hydrogène pour former du bleu de Prusse (PB) qui peut être re-réduit en blanc de Prusse au niveau de l'électrode en imposant un potentiel négatif proche ou au-delà du potentiel de réduction (Figure 80). Le peroxyde d'hydrogène peut être réduit en eau sur une électrode de platine mais le potentiel à appliquer est très important, pouvant conduire à des réductions non spécifiques. L'utilisation d'un médiateur électrochimique permet de baisser ce potentiel (et dans notre cas, de ne pas devoir utiliser d'électrode platine), permettant d'éviter les interférences électrochimiques d'autres composés du milieu testé.

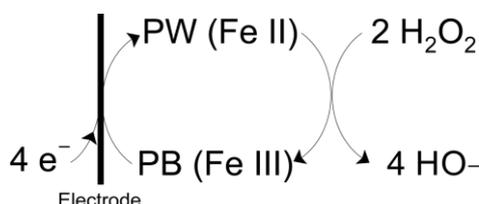


Figure 80 – En présence de peroxyde d'hydrogène, le blanc de Prusse est oxydé pour former du bleu de Prusse. Ce bleu de Prusse peut ensuite être réduit au niveau de l'électrode lors de l'application de potentiels négatifs.

La voltampérométrie cyclique (ou voltammétrie cyclique) permet de caractériser électrochimiquement un composé présentant des propriétés d'oxydo-réduction. Elle est

définie par la mesure de l'intensité de courant lors de l'application d'une gamme de potentiel variant de manière cyclique (Figure 81). D'après ce voltampérogramme, le potentiel d'oxydation du blanc de Prusse (en bleu de Prusse) est de -0,15 V et le potentiel de réduction du bleu de Prusse (en blanc de Prusse) est de -0,3 V. Un balayage vers les potentiels positifs permet d'oxyder le composé et un balayage vers les potentiels négatifs permet de réduire ce même composé. L'aspect cyclique de cette technique permet de mettre en avant la réversibilité éventuelle de l'oxydation et de la réduction, comme c'est le cas pour le bleu et le blanc de Prusse.

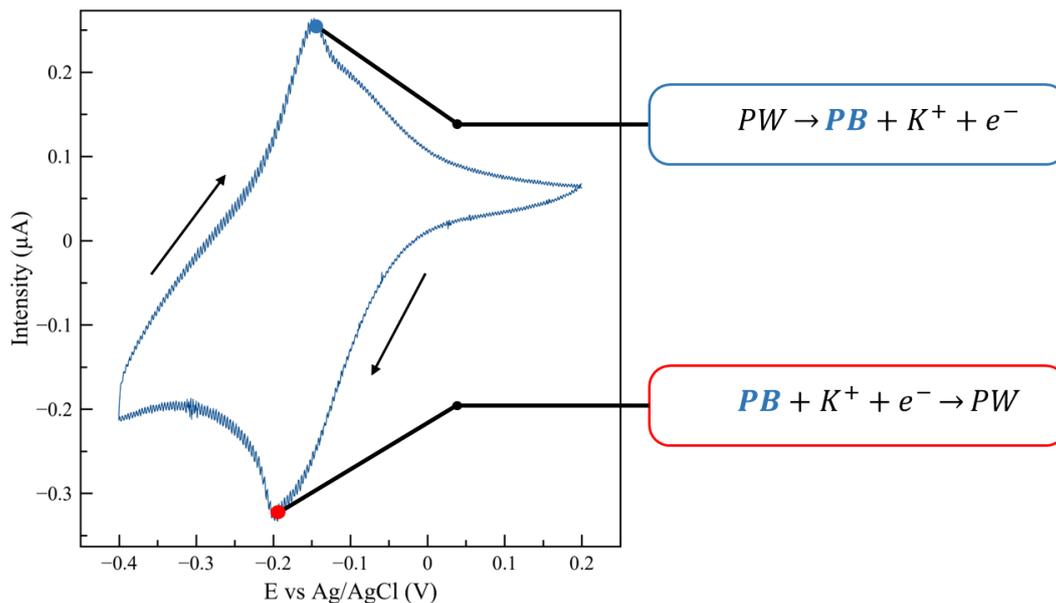


Figure 81 – Voltampérogramme obtenu dans du tampon acétate 50 mM pH 5,5 avec un système à trois électrodes (électrode de travail et contre-électrode en carbone, électrode de référence en Ag/AgCl) avec des particules de bleu de Prusse synthétisées *in situ*. Vitesse de balayage : $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Le point bleu correspond au pic d'oxydation du blanc de Prusse (PW) en bleu de Prusse (PB), et le point rouge correspond au pic de réduction du PB en PW. Les équations chimiques se déroulant à ces points sont indiquées.

Dans le cadre d'une expérience de voltampérométrie cyclique, lors de l'application de potentiels croissants, le blanc de Prusse va être oxydé électrochimiquement en bleu de Prusse et lors de l'application de potentiels décroissants, le bleu de Prusse va être réduit électrochimiquement en blanc de Prusse. En présence de peroxyde d'hydrogène, une oxydation chimique (non dépendante de l'imposition d'un potentiel) du blanc de Prusse va avoir lieu. Lors de l'application d'un potentiel variable décroissant, la réduction du bleu de Prusse se produit, ce qui va générer une augmentation significative de l'intensité de réduction pour un potentiel donné (-0,3 V par exemple, Figure 82). Outre l'augmentation de l'intensité de courant, on note également un décalage de l'épaule du pic de réduction vers les potentiels négatifs (de -0,2 V à au-delà de -0,4 V).

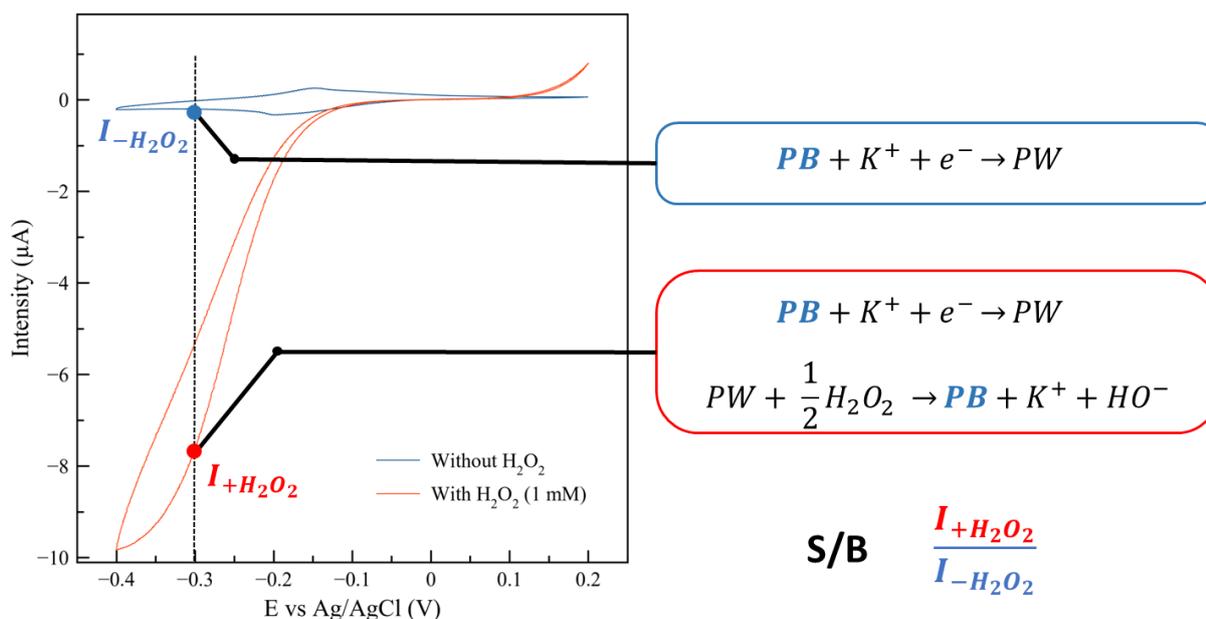


Figure 82 - Voltampérométrie obtenue dans du tampon acétate 50 mM pH 5,5 avec un système de trois électrodes (électrode de travail et contre-électrode en carbone, électrode de référence en Ag/AgCl) avec des particules de bleu de Prusse synthétisées in situ. Vitesse de balayage : $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les deux points (bleu et rouge) correspondent aux intensités de courant de réduction lorsque le potentiel de $-0,3 \text{ V}$ est appliqué en absence (bleu) ou en présence (rouge) de 1 mM de peroxyde d'hydrogène. Les équations chimiques se déroulant à ces points sont détaillées.

Afin d'évaluer les performances des électrodes, nous utiliserons le rapport signal / bruit qui est défini comme le rapport, pour une même électrode, de l'intensité mesurée au potentiel fixe de $-0,3 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène par rapport à celle mesurée en absence de peroxyde d'hydrogène (Figure 82). Soit l'équation :

$$\frac{S}{B} = \frac{I_{+H_2O_2}}{I_{-H_2O_2}} \quad (\text{Équation 5})$$

8.2. Détection de l' H_2O_2 par voltampérométrie cyclique

Tout le travail électrochimique avec les électrodes est réalisé par voltampérométrie cyclique. $30 \mu\text{L}$ de tampon (véronal 50 mM pH 8,5 ou acétate 50 mM pH 5,0 supplémenté ou non par 100 mM d'acétate de potassium) sont déposés sur les électrodes préalablement branchées à un multi-potentio-stat VMP3 (Bio-logic, Claix, France). Les expériences de voltampérométrie cyclique consistent en quatre cycles de balayage de potentiels entre $-0,4 \text{ V}$ et $+0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl avec une vitesse de balayage de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Une première expérience est réalisée sans peroxyde d'hydrogène. La partie de la goutte non entrée dans le papier est enlevée, une nouvelle goutte contenant le peroxyde d'hydrogène est déposée sur le papier, et la deuxième expérience de CV est réalisée.

9. Mesures de chimiluminescence du luminol

9.1. Principe général

La luminescence du luminol est caractérisée par la production d'un endoperoxyde, qui, par perte d'un N_2 , se transforme en 3-aminophtalate à l'état excité qui libère son énergie sous forme de photons ($\lambda_{max} = 425 \text{ nm}$) pour revenir à son état fondamental (Figure 45C). Les photons sont alors facilement détectables par une caméra CCD ou un luminomètre.

Deux voies permettent l'obtention de l'endoperoxyde à partir du luminol : la chimiluminescence (CL) et l'électrochimiluminescence (ECL). La **chimiluminescence** est caractérisée par la formation de l'endoperoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène catalysée par une peroxydase (la HRP étant la peroxydase la plus souvent utilisée) (Figure 45A). Une diazaquinone peut aussi être formée à partir du luminol en appliquant un potentiel pour oxyder le luminol. Cette diazoquinone réagit ensuite spontanément avec le peroxyde d'hydrogène pour former l'endoperoxyde (Figure 45B) : c'est l'**électrochimiluminescence** (Darwish et al., 2023; Kim and Pyun, 2009; Sakura, 1992)

Il est reconnu que les techniques de luminescence sont associées à d'excellentes sensibilités, les outils de détection de la lumière permettant de capter les photons de manière très efficace (luminomètres, caméra CCD). De plus, le temps d'exposition du capteur à la lumière émise permet une accumulation du signal afin d'augmenter encore la sensibilité.

9.2. Acquisition des images

Les cotons-tiges enzymatiques sont sortis du congélateur et sont laissés quelques minutes à température ambiante. Les échantillons sont préparés dans un microtube opaque dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5 supplémenté de 150 μM de luminol. Les cotons-tiges sont placés sous une caméra CCD (C8484-05 EM-CCD Hamamatsu, Japon) et 125 μl d'échantillons sont ajoutés sur les cotons-tiges. L'image est rapidement acquise avec la caméra CCD avec une ouverture maximale, pendant 10 minutes à température ambiante.

9.3. Traitement du signal

La caméra CCD génère une image en deux dimensions de la zone de capture, en nuances de gris, où l'intensité de chaque pixel est proportionnelle au nombre de photons ayant été captés par le détecteur. La quantification est effectuée à l'aide d'ImageJ sur l'image en niveaux de

gris en utilisant un ROI rectangulaire incluant la tête entière du coton-tige. L'intensité totale des pixels est ensuite utilisée et constitue la valeur de signal obtenu pour le coton-tige. Le signal est ensuite corrigé par soustraction de la moyenne des signaux obtenus par les cotons-tiges « blancs » (sans glyphosate pour une gamme de glyphosate par exemple).

Il est à noter que les intensités mesurées ne peuvent pas être comparées d'analyse en analyse : elles ne peuvent être réalisées qu'au sein de la même image (et donc de la même exposition).

10. Caractérisation du système de détection du glyphosate sur coton-tige

10.1. Etudes d'interférences

L'AMPA, la sarcosine, la cystéine et la glycine sont testées en tant que molécules interférentes possibles (Figure 83). La glycine est choisie comme substrat potentiel de la GlyphOx-CBM qui a été obtenue à partir d'une glycine oxydase. L'AMPA quant à lui est le produit de réaction (Figure 49). La sarcosine est sélectionnée comme analogue structural du glyphosate et de la glycine. Enfin, la cystéine est sélectionnée en tant qu'acide aminé pouvant être impliqué dans des réactions d'oxydoréduction.

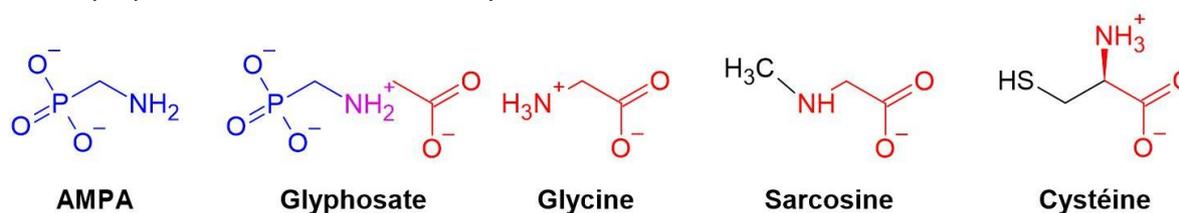


Figure 83 - Structures chimiques des molécules interférentes utilisées pour les tests de sélectivité du dispositif. Les couleurs bleu et rouge sont utilisées pour marquer les analogies structurales.

Des essais colorimétriques et chimiluminescents sont réalisés avec 100 μM de l'espèce interférente et 0 ou 250 μM de glyphosate, en utilisant des méthodes de détection colorimétriques ou par chimiluminescence comme décrites précédemment.

Des essais sont également réalisés en présence de mélanges d'herbicides, en absence ou présence (250 μM) de glyphosate (RoundUp®). La composition des mélanges 1 et 2 est donnée dans les Tableau 11 et Tableau 12. Les essais sont réalisés de manière à ce que la concentration de chaque herbicide soit de 57 μg.L⁻¹, soit plus de 500 fois la limite de détection autorisée par l'Europe (0,1 ppb par pesticide). Les mélanges d'herbicides étant dilués dans de l'acétone ou

de l'acétonitrile, les mêmes essais sont réalisés en présence de la même quantité finale d'acétone (0,057 % v/v) ou d'acétonitrile (0,57 % v/v).

Tableau 11 – Composition du mélange d'herbicides n°1

Herbicides	Groupe HRAC
<i>Dalapon</i>	0 (Unknown Mode of Action)
<i>Chloramben, dicamba</i>	4 (Benzoates)
<i>2,4-D, 2,4-DB, 2,4,5-T, 2,4,5-TP (Fénoprop), 2,4-DP-P (Dichlorprop), MCPA, MCPP (Mécoprop)</i>	4 (Phenoxy-carboxylates)
<i>Picloram</i>	4 (Pyridine-carboxylates)
<i>Bentazon</i>	6 (Benzothiadiazinone)
<i>Acifluorfen</i>	14 (Diphenyl ethers)
<i>Dinoseb</i>	24 (Dinitrophénols)
Produits de dégradation	Molécules sources
<i>Acide tétrachlorotéréphthalique</i>	Chlorthal diméthyl (groupe HRAC 3)
<i>Acide 3,5-dichlorobenzoïque</i>	Propyzamide (groupe HRAC 3)
<i>4-Nitrophénol</i>	Insecticides organophosphorés (ex. méthyl parathion)
Autre	Commentaire
<i>Pentachlorophénol</i>	Insecticide (PCP)

Abréviations : 2,4-D : Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique, 2,4-DB : acide 4-(2,4-dichlorophénoxy)butyrique, 2,4,5-T : acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique, 2,4,5-TP: acide 2-(2,4,5-trichlorophénoxy)propionique, MCPA: acide 4-chloro-2-méthylphénoxyacétique, MCPP : acide méthylchlorophénoxypropionique.

Tableau 12 - Composition du mélange d'herbicides n°2

Herbicide	Groupe HRAC
<i>Atrazine, cyanazine, sébuthylazine, simazine, terbuthylazine</i>	5 (triazines)
<i>Hexazinon,</i>	5 (triazinones)
<i>Chlorotoluron, diuron, isoproturon, linuron,</i>	
<i>méthabenzthiazuron, métobromuron, métoxuron,</i>	5 (urées)
<i>monolinuron</i>	
<i>Métazachlor</i>	15 (chloroacétamides)
Produit de dégradation	Molécule source
<i>Atrazine-deséthyl</i>	Atrazine (HRAC 5)

10.2. Etudes de l'impact de matrices environnementales

Les échantillons d'eau de rivière ont été prélevés près des berges le 12 avril 2023 aux coordonnées 45°46'19.4 "N 4°48'47.8 "E pour la Saône et aux coordonnées 45°46'32.6 "N 4°50'32.3 "E pour le Rhône. Une partie des échantillons a été filtrée sur une membrane de PES de 0,2 µm. Les échantillons ont ensuite été aliquotés et stockés à -80°C.

Afin de contrôler le pH de l'échantillon, 1 mL de tampon véronal 50 mM pH 8,5 (éventuellement supplémenté avec les substrats de la peroxydase, Tableau 13) est lyophilisé en amont dans des microtubes de 1,5 mL. L'échantillon de rivière (1 mL) est ajouté au microtube pour les essais colorimétriques et complété avec 150 µM de luminol (Tableau 13) pour les essais chimiluminescents. Les échantillons sont ensuite supplémentés avec 250 µM de glyphosate (par ajout de RoundUp®).

Tableau 13 - Préparation des milieux lyophilisés dans lesquels l'échantillon est resuspendu

		Colorimétrie	Chimiluminescence
Tampon véronal (pH 8,5)	(50 mM)	Lyophilisé	Lyophilisé
4-AAP	(2,5 mM)	Lyophilisé	-
HDCBS	(9 mM)	Lyophilisé	-
Luminol	(150 µM)	-	Ajouté avant la mesure

3^{ème} partie - Expression de protéines de fusion

1. De la GlyOx-CBM à la GlyphOx-CBM

L'enzyme catalysant l'oxydation du glyphosate de manière spécifique est la clé de voûte de ce travail de thèse : ce sera l'élément commun à l'ensemble des travaux. La première étape a donc été l'expression, non sans mal, de la glyphosate oxydase sous forme de protéine de fusion avec un CBM (Carbohydrate Binding Module). Comme décrit dans le chapitre 5 de l'étude bibliographique, la GlyphOx-CBM a été obtenue à partir de la GlyOx de *Bacillus subtilis* en réalisant trois cycles de mutagenèse dirigée pour introduire les mutations identifiées par (Pedotti et al., 2009b). Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent l'expression de la protéine, sa caractérisation et son immobilisation.

1.1. Expression des deux GlyOx : GlyOx et GlyOx-CBM

Les deux GlyOx sont exprimées facilement dans du milieu LB à partir d'*E. coli* BL21(DE3) transformées par le plasmide pET15b-GlyOx ou pET15b-GlyOx-CBM. Brièvement, les cultures dans du LB sont induites par ajout d'IPTG 0,5 mM à 37°C pendant 20 heures. Les protéines sont ensuite récupérées par lyse des bactéries par sonication puis centrifugation (cf. 3.1.2 du M&M).

Les lysats sont caractérisés par SDS-PAGE (3.5 du M&M), dosage de Bradford (3.4 du M&M) et mesure d'activité (système HRP & 4AAP/HDCBS, cf. 7.2 du M&M). L'analyse du lysat par SDS PAGE permet de visualiser une bande à 40 kDa (poids théorique : 43 kDa) correspondant à la GlyOx et une autre bande à 60 kDa (poids théorique : 61,3 kDa) correspondant à la GlyOx-CBM. Les activités spécifiques pour l'oxydation de la glycine sont quant à elles déterminées à 18 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ (GlyOx) et 22 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ (GlyOx-CBM).

1.2. Expression de la GlyphOx-CBM

L'expression de la GlyphOx-CBM sous sa forme soluble a été en revanche un échec en utilisant la procédure utilisée pour la GlyOx-CBM. La protéine est bien exprimée mais se retrouve principalement dans les corps d'inclusion. Les activités mesurées dans le lysat sont très faibles voire non mesurables dans un temps raisonnable (20 minutes). Le protocole d'expression de la GlyphOx-CBM a donc nécessité une optimisation selon les paramètres présentés ci-après.

1.2.1. Concentration en IPTG

Afin de baisser l'expression et améliorer la solubilité des protéines, nous avons essayé de baisser la concentration d'IPTG. Pour ce faire, trois concentrations d'IPTG ont été utilisées lors de l'induction : 0,1, 0,25 et 0,5 mM. Les activités spécifiques des différentes concentrations sur culture sont déterminées à des fins de comparaison (Tableau 14). Il apparaît alors que 0,5 mM reste la meilleure concentration en IPTG (des trois testées) à utiliser.

Tableau 14 - Influence de la concentration en IPTG lors de l'induction sur l'activité spécifique de la GlyphOx-CBM

[IPTG] (mM)	[Prot] (mg.mL ⁻¹)	Activité Spécifique (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
0,1	5,67	0,19
0,25	6,08	0,13
0,5	5,39	1,03

1.2.2. Changement du milieu de culture

Il existe plusieurs milieux de culture pour la culture bactérienne, et le milieu LB est le plus utilisé. Parmi d'autres, le Terrific Broth (TB), en comparaison du LB, ne contient pas de NaCl et est tamponné à pH 7,2 à l'aide de KH₂PO₄ et de K₂HPO₄. En outre il contient du glycérol (Tableau 15).

Tableau 15 - Composition des milieux de culture bactérienne LB et TB

	Lysogeny Broth	Terrific Broth
Tryptone	10 g.L ⁻¹	12 g.L ⁻¹
Yeast Extract	5 g.L ⁻¹	24 g.L ⁻¹
NaCl	5 g.L ⁻¹	-
KH₂PO₄	-	9,4 g.L ⁻¹
K₂HPO₄	-	2,2 g.L ⁻¹
Glycérol	-	4 mL.L ⁻¹

En particulier, ce milieu est décrit dans le cadre de l'expression de la pyruvate oxydase dans *E. coli* comme permettant l'augmentation de l'expression de cette protéine sous forme soluble avec une diminution de la quantité de corps d'inclusion. Dans ce cas, 88% de l'activité totale est mesurée dans le lysat obtenu avec une culture dans le TB alors qu'elle n'était que de 3%

quand le lysat est obtenu d'une culture avec du LB (Zhang et al., 2019). La comparaison des expressions dans les deux milieux a été réalisée dans le paragraphe suivant (1.2.3)

1.2.3. Supplémentation du milieu avec du sorbitol, de l'arginine et du glyphosate

La supplémentation du milieu de culture bactérien en sel, acides aminés (arginine) ou polyols (D-sorbitol, mannitol, glycérol, ...) peut faciliter l'expression des protéines cibles sous leurs formes solubles, causant un stress osmique et stimulant la synthèse ou l'internalisation d'osmolytes comme la bétaine ou le tréhalose. Ces derniers agiraient alors en tant que chaperonnes chimiques permettant, comme précédemment, d'augmenter la stabilité des protéines et de faciliter le repliement des polypeptides non repliés (Blackwell and Horgan, 1991; Diamant et al., 2001; Oganessian et al., 2007). Le D-sorbitol est en particulier très utilisé comme additif afin d'éviter la formation de corps d'inclusion. De même l'arginine est très utilisée dans les milieux de renaturation afin d'extraire les protéines des corps d'inclusion (Prasad et al., 2011; Tsumoto, 2010; Wu et al., 2011). En raison de problèmes de solubilité dans nos expériences, l'arginine a été écartée et nous avons testé les effets uniquement du sorbitol.

Nous avons également soumis les bactéries au cours de leur croissance à la présence de différentes concentrations (0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M et 100 μ M) de glyphosate (sous forme de Roundup®). La glyphosate oxydase permettant de dégrader le glyphosate, son expression privilégiée comme mécanisme de défense était une hypothèse.

Sorbitol	Glyphosate (Round-Up® à l'induction)												Milieu	
	0 μ M		0,1 μ M		1 μ M		10 μ M		50 μ M		100 μ M			
-	0,66	0,23	0,11	0,28	0,15	0,25	0,40	0,30	0,26	0,67	0,48	0,42	Terrific Broth	
	0,18	0,12	0,10	0,23	0,13	0,27	0,20	0,29	0,49	0,42	0,11	0,45		
500 mM	0,10	0,32	0,11	0,24	0,13	0,14	0,13	0,47	0,59	0,65	0,12	0,33		Lysogeny Broth
	0,09	0,16	0,22	0,23	0,15	0,23	0,14	0,46	0,53	0,87	0,14	0,39		
-	0,11	0,10	0,11	0,12	0,09	0,15	0,13	0,19	0,18	0,18	0,11	0,24	Lysogeny Broth	
	0,19	0,15	0,11	0,15	0,10	0,18	0,23	0,20	0,20	0,19	0,10	0,18		
500 mM	0,22	0,11	0,15	0,13	0,13	0,19	0,11	0,26	0,26	0,34	0,12	0,19		Lysogeny Broth
	0,19	0,11	0,09	0,14	0,14	0,21	0,10	0,27	0,16	0,23	0,10	0,11		

Figure 84 - Optimisation du milieu de culture pour améliorer l'expression de la GlyphOx-CBM. Deux milieux de culture sont testés : le Lysogeny Broth et le Terrific Broth. L'ajout de sorbitol et de glyphosate au milieu a également été testé. Les valeurs affichées sont les absorbances mesurées à 510 nm après ajout aux surnageants de 4-AAP, HDCBS et HRP et incubation à 30°C en présence de glyphosate 2,5 mM. La coloration des cases est fonction de l'activité enzymatique mesurée selon une échelle de trois couleurs : blanc, bleu et vert.

Les impacts de l'ajout de sorbitol et de glyphosate ont été étudiés lors d'une expression en boîte de 96 puits (2 mL) de culture, les différentes conditions étant menées en parallèle : en absence ou présence de sorbitol 500 mM et en absence ou présence de 0,1, 1, 10, 50 et 100 μ M de glyphosate et dans du milieu de culture LB ou TB. En fin de culture, les bactéries sont lysées avec du lysozyme pendant 90 min à 4°C puis avec des billes de verre dans un bain à ultrasons. Le lysat est isolé des débris solides par centrifugation et l'activité glyphosate oxydase est dosée au spectrophotomètre par l'ajout de glyphosate, 4-AAP, HDCBS et HRP (Figure 84).

On observe alors une augmentation de l'activité glyphosate-oxydase mesurée dans les surnageants provenant des cultures réalisées dans du TB. La présence de sorbitol n'a en revanche pas d'impact sur l'activité mesurée. Une augmentation de l'activité peut cependant être mesurée lorsque la concentration en glyphosate dans le milieu augmente, avec une activité maximale à 50 μ M de glyphosate. Néanmoins, ceci n'a pas pu être reproduit dans d'autres expériences en boîte de 96 puits de culture. L'ajout de glyphosate dans le milieu de culture n'a pas été maintenu lors du changement d'échelle vers des Erlenmeyers de 500 mL (200 mL de culture).

1.2.4. Essais avec d'autres souches d'expression et différents temps d'induction

D'autres souches d'expression ont été utilisées afin d'améliorer l'expression sous forme soluble de la GlyphOx-CBM. Quatre souches ont été sélectionnées :

- *E. coli* BL21(DE3) : il s'agit de la souche couramment utilisée dans ce travail de thèse. Elle est caractérisée par l'expression de la T7 polymérase (qui permet d'optimiser l'expression de la protéine d'intérêt placée sous le contrôle du promoteur T7) et par l'absence de protéase intrinsèque. C'est une bactérie classiquement utilisée pour l'expression de protéines recombinantes (fort niveau d'expression).
- *E. coli* SHuffle : il s'agit d'une souche caractérisée par la délétion des gènes codant pour la glutarédoxine et la thiorédoxine qui empêchent normalement la formation des liaisons disulfure dans le cytoplasme. La létalité de ces deux dernières délétions est contrebalancée par une mutation au niveau de la peroxyrédoxine. Cette souche exprime également la protéine périplasmique DsbC qui aide à la formation des liaisons disulfure dans le périplasme : privée de son peptide signal, la protéine reste dans le

cytoplasme. Cette souche est en général utilisée pour obtenir des protéines difficiles à exprimer.

- *E. coli pRIPL* : cette souche contient un plasmide qui permet l'expression d'ARNt des codons rares chez *E. coli* (R : arginine, I : isoleucine, P : proline et L : leucine), permettant d'améliorer l'expression de protéines à partir de séquences hétérologues. Une double sélection est également opérée lors de l'utilisation de ce plasmide, car pRIPL porte un gène de résistance au chloramphénicol.
- *E. coli LEMO* : cette souche est caractérisée par la régulation de l'expression de la T7 polymérase qui est placée sous le contrôle d'un promoteur régulier : l'introduction de rhamnose permet, selon la concentration, de réguler l'expression de la protéine d'intérêt.

Les différentes souches ont été transformées par le plasmide pET15b-GlyphOx-CBM par choc thermique. Elles ont ensuite été cultivées à 30°C et induites par ajout d'IPTG pour des DO entre 0,6 et 0,8. L'expression à 30°C est réalisée pendant 4 ou 20 heures. Un aliquote des cultures est prélevé et analysé par SDS-PAGE. La lyse des cellules est obtenue grâce au tampon de charge utilisé pour l'analyse SDS-PAGE (Figure 85).

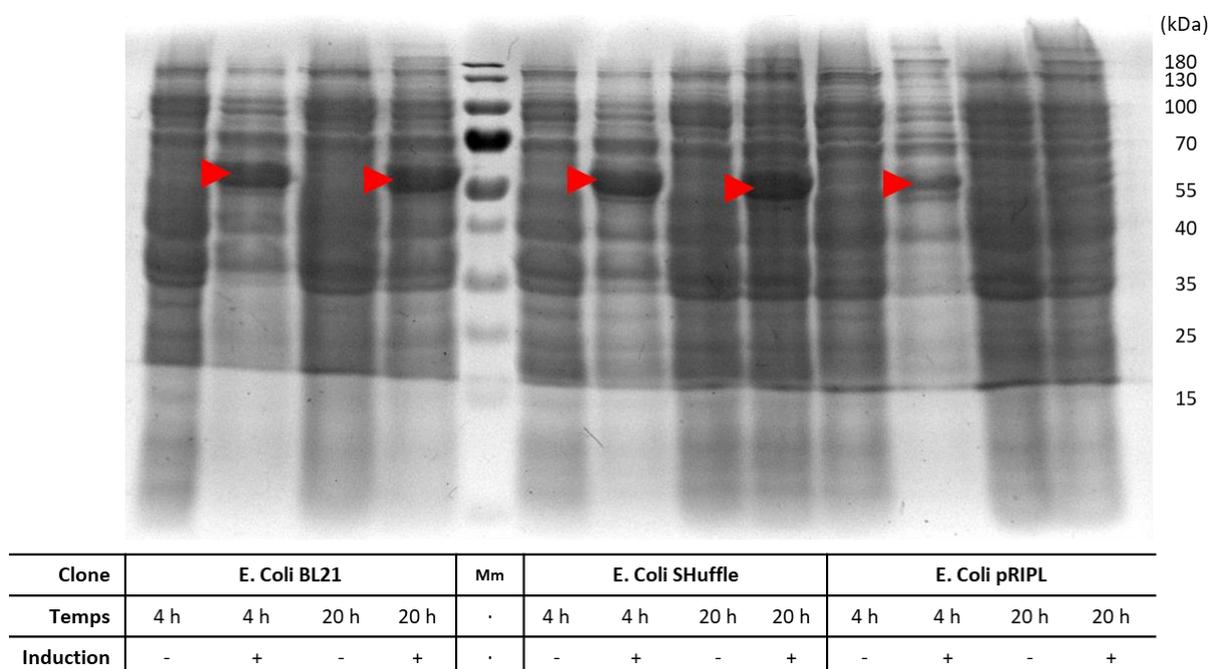


Figure 85 - Analyse de l'expression des protéines totales de trois souches bactériennes transformées par le plasmide pET15b-GlyphOx-CBM. Les bactéries cultivées à 30°C, puis induites par ajout d'IPTG (0 ou 0,5 mM) et cultivées à 30°C sous agitation pendant 4 ou 20 heures. Elles sont re-suspendues dans du tampon de charge pour SDS-PAGE et les protéines séparées par électrophorèse.

Quelle que soit la souche ou la durée d'expression, aucune fuite d'expression de la GlyphOx-CBM ne peut être observée, c'est-à-dire que la GlyphOx-CBM n'est pas exprimée en absence d'IPTG (puits notés – dans la Figure 85). Pour les souches de bactéries *E. coli* BL21(DE3) et *E. coli* SHuffle, la GlyphOx-CBM est fortement exprimée quelle que soit la durée d'induction (4 h ou 20 h) et ce de manière similaire entre les deux souches (flèches rouges sur la Figure 85). Pour la souche *E. coli* pRIPL, une faible expression est observée après 4 heures d'induction et aucune après 20 heures. Aucune expression n'a été observée avec les souches *E. coli* Lemo, et ce quelle que soit la concentration de rhamnose. Les bactéries ont ensuite été lysées par sonication, et l'activité de la GlyphOx-CBM du surnageant a été évaluée par test spectrophotométrique : aucune amélioration significative de l'activité spécifique de la GlyphOx-CBM n'a pu être obtenue comparée à l'utilisation d'une souche *E. coli* BL21 (DE3).

1.2.5. Induction à basse température précédée d'un choc thermique.

La culture à haute température de bactéries *E. coli* se traduit par l'expression de protéines chaperonnes pouvant aider au meilleur repliement des protéines exprimées (Hoffmann and Rinas, 2000; Kim et al., 2013). Une incubation à haute température augmente la quantité des corps d'inclusion par dénaturation et précipitation des protéines et augmentation des interactions hydrophobes (Restrepo-Pineda et al., 2019) mais l'utilisation d'un choc thermique (30 min à 47°C par exemple) avant l'induction et suivi d'une culture à plus basse température (à 20°C par exemple) permet l'expression des protéines chaperonnes tout en minimisant la formation de corps d'inclusion (Oganessian et al., 2007). Dans notre cas, nous avons retenu l'utilisation d'un choc thermique avant induction, suivi d'une culture à 14°C sous agitation dans une armoire réfrigérée.

Comme il peut être observé dans la Figure 86, les meilleures activités totales sont retrouvées lors de l'utilisation du TB et avec un choc thermique avant induction. Avec ce milieu de culture, le choc thermique permet, dans le cas de 20 h d'expression, une multiplication de l'activité totale par 6 (7,5 vs. 45 nmol.min⁻¹). Un profil similaire est obtenu pour le TB pour les deux durées d'induction, mais l'activité spécifique pour une culture induite pendant 20 h est largement supérieure à celle obtenue pour une culture pendant 70h (9 vs. 39 nmol.min⁻¹.mg⁻¹).

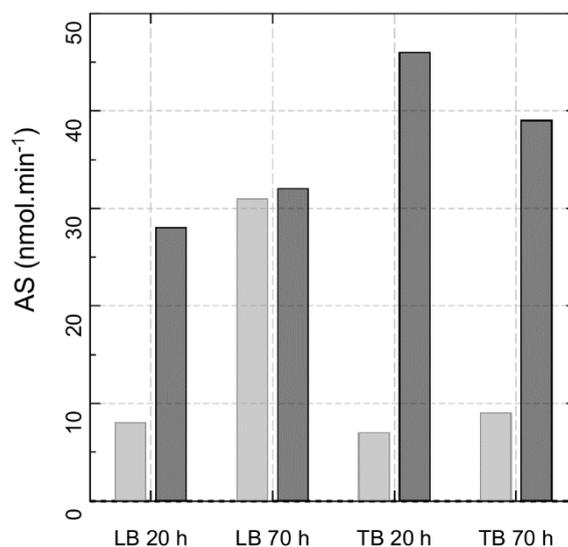


Figure 86 - Influence du choc thermique (sans en clair, avec en sombre) et de la durée d'induction sur l'activité totale GlyphOx lors de l'expression de la GlyphOx-CBM dans du LB et dans du TB.

1.2.6. Protocole retenu pour l'expression de la GlyphOx-CBM

Le protocole d'expression a par conséquent été adapté pour l'expression de la GlyphOx-CBM. La pré-culture d'E. coli BL21 (DE3) transformée par pET15b-GlyphOx-CBM est réalisée sur la nuit dans du milieu LB à 37°C. Le milieu TB (200 mL) est alorsensemencé à partir de cette pré-culture à une DO initiale de 0,1. Lorsque la DO atteint 0,4, les cultures sont incubées pendant 30 minutes à 47°C, induites par ajout d'IPTG (0,5 mM final) et cultivées sous agitation à 14°C pendant 20 heures. Les protéines sont ensuite récupérées selon le même protocole que pour la GlyOx-CBM, mais le lysat est conservé à 4°C et utilisé rapidement.

L'analyse du lysat par SDS-PAGE permet de confirmer l'expression de GlyphOx-CBM observée sous la forme d'une bande de 60 kDa (par rapport au poids moléculaire théorique de 61,3 kDa) (Figure 106). En présence de 2,5 mM de glyphosate, des activités spécifiques comprises entre 0,1 et 2 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ sont mesurées par spectrophotométrie, grâce à l'ajout de HRP et de ses substrats (4-AAP et HDCBS).

1.2.7. Purification par chromatographie d'affinité

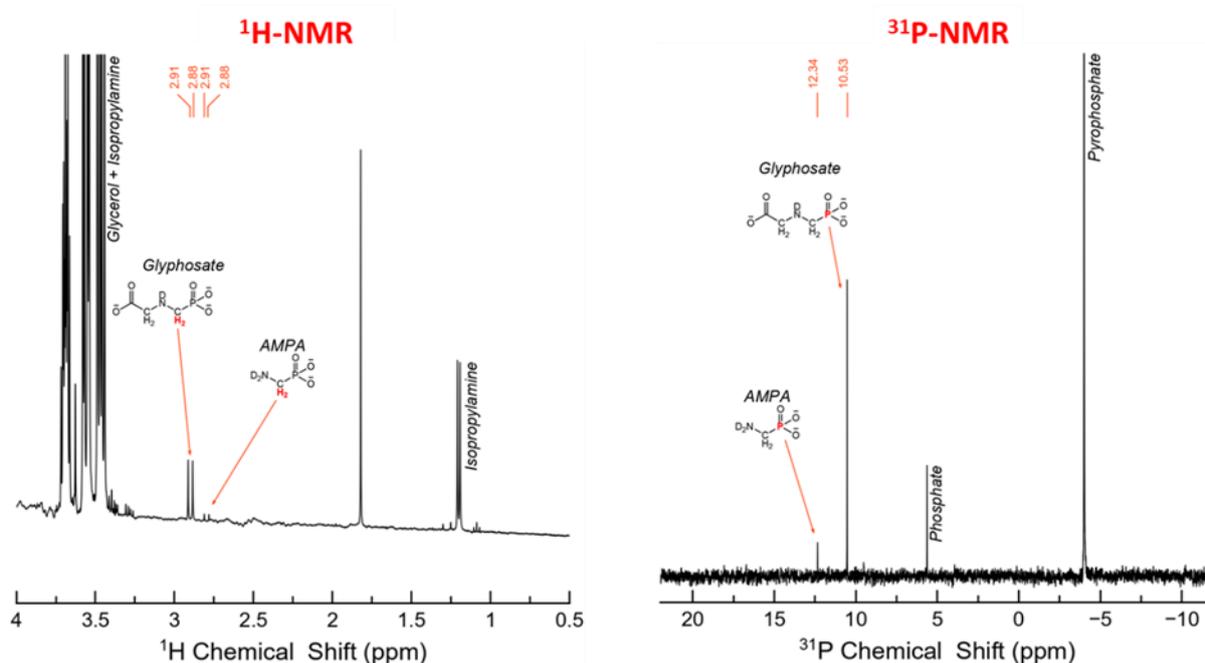
Malgré la présence de l'étiquette 6-His, la GlyphOx-CBM n'a jamais pu être purifiée à l'aide du même protocole que la GlyOx-CBM. L'activité est retrouvée après la première chromatographie (chromatographie d'exclusion) mais aucune activité n'est obtenue après la chromatographie d'affinité, quelle que soit la fraction étudiée (fraction non retenue comme

fraction d'élué). On utilisera par la suite directement la solution issue de la lyse des bactéries comme catalyseur et identifiée comme « lysat bactérien ».

1.3. Caractérisation

1.3.1. RMN

L'oxydation du glyphosate en AMPA a été vérifiée par $^1\text{H-NMR}$ et $^{31}\text{P-NMR}$ en utilisant le lysat bactérien contenant la GlyphOx-CBM comme catalyseur (Figure 87). Les spectres du milieu réactionnel avant et après incubation sont comparés, et les pics sont identifiés grâce à aux spectres de référence des différents composés (glyphosate, AMPA, tampon) isolés.



En RMN du proton ($^1\text{H-NMR}$), les deux protons du méthylène du glyphosate sont observés sous forme de doublet avec un déplacement chimique de 2,90 ppm. Après 24 heures d'incubation à 30°C, un doublet à 2,8 ppm est observé dans les spectres $^1\text{H-NMR}$. Dans le cas du glyphosate, les signaux des protons étudiés sont à la fois influencés par les groupements phosphonate et acide carboxylique alors que ceux de l'AMPA ne sont influencés que par le groupement phosphonate : le doublet de l'AMPA est donc plus blindé et peut être observé avec un déplacement chimique plus faible : 2,8 ppm vs. 2,9 ppm pour le glyphosate. Un massif peut aussi être observé vers 1,25 ppm et a été attribué au groupement isopropylamine. Enfin, un autre massif pour des déplacements chimiques supérieurs à 3,5 ppm ont été associés à l'isopropylamine et au glycérol.

En ce qui concerne la RMN du phosphore (^{31}P -NMR), le pic du phosphore du glyphosate est mesuré avec un déplacement chimique de 10,53 ppm. Après 20h d'incubation avec la GlyphOx-CBM, un nouveau pic à 12,34 ppm apparaît et a pu être attribué au phosphonate de l'AMPA, permettant ainsi de confirmer l'activité d'oxydation du glyphosate. Il est à noter également deux autres pics : le pic du pyrophosphate (tampon de lyse) et un pic attribué au phosphate.

1.3.2. Température optimale et pH optimal

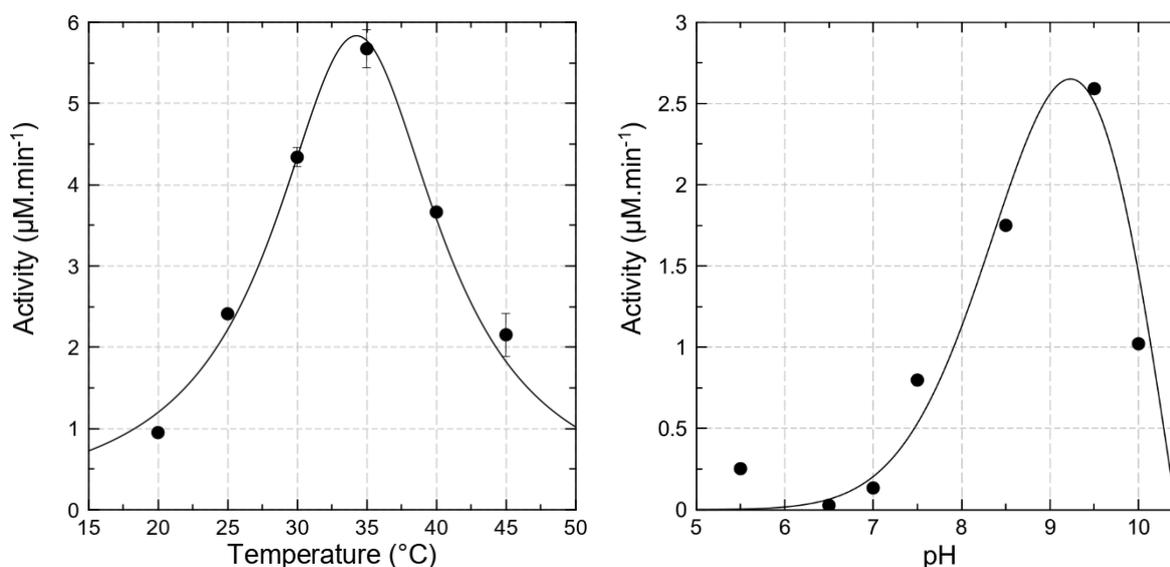


Figure 88 - Détermination de la température optimale et du pH optimal de la GlyphOx-CBM. La HRP est utilisée comme enzyme rapportrice et le suivi de la réaction est réalisé par spectrophotométrie grâce à la coloration rose issue de l'oxydation par la HRP en présence de peroxyde d'hydrogène du 4-AAP et HDCBS.

L'influence du pH sur l'activité enzymatique a été étudiée à partir de l'enzyme non purifiée dans le lysat bactérien grâce à plusieurs tampons entre pH 5,5 et 10 : acétate de sodium (pH 5,5), imidazole (pH 6,0), HEPES (pH 7,0), phosphate (pH 7,5), véronal (pH 8,5), carbonate (pH 9,5 et pH 10,0) à 30°C. Aucune activité enzymatique n'est mesurée jusqu'à un pH de 6,5. On observe ensuite une augmentation de l'activité enzymatique en fonction du pH jusqu'à un pH de 9,5. Au-delà, l'activité enzymatique chute brusquement (Figure 88).

L'activité de la GlyphOx-CBM a été mesurée pour plusieurs températures entre 20 et 45°C (Figure 88). On observe une augmentation de l'activité enzymatique entre 20 et 35°C qui semble être la température optimale. Au-delà, l'activité enzymatique mesurée diminue, témoignant d'une probable dénaturation de l'enzyme.

L'objectif principal de ce travail est de fournir un test simple sur site pour la détection du glyphosate. Par conséquent, pour les expériences ultérieures, une température de 30°C a été choisie comme température plus facile à atteindre. Le choix du pH et du tampon a été principalement guidé par les conditions de la chimiluminescence du luminol, justifiant l'utilisation du tampon véronal (Tsafack et al., 2000).

1.4. Immobilisation et mesures d'activité immobilisée

Le CBM3a, de par sa forte affinité pour la cellulose, offre la possibilité d'immobiliser spécifiquement les protéines de fusion et d'enrichir sélectivement le matériau avec des enzymes recombinantes. À notre connaissance, les cellules *E. coli* BL21 (DE3) utilisées pour l'expression de GlyphOx-CBM ou 6E10-CBM ne possèdent pas d'autres protéines portant des CBM reconnaissant spécifiquement la cellulose (voir la base de données CAZy <http://www.cazy.org/>). Cela garantit l'immobilisation spécifique des enzymes surexprimées sur la cellulose.

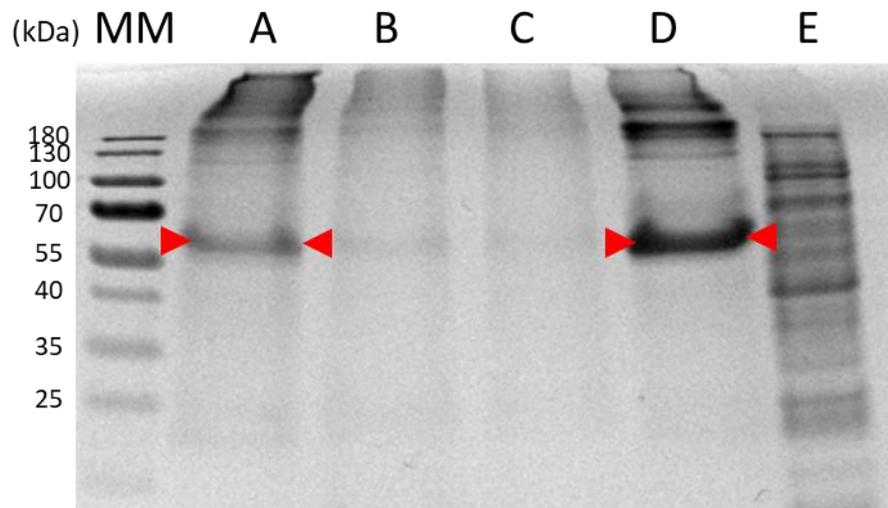


Figure 89 – SDS-PAGE des protéines immobilisées sur de la cellulose cristalline (A), du chitosan (B), du polyvinylalcool (C) ou du papier Whatman (D) à partir d'un lysat bactérien contenant la GlyphOx-CBM (E). MM : marqueur moléculaire. La GlyphOx-CBM est indiquée par des flèches rouges. Le gel de la GlyphOx-CBM présente le même profil.

La spécificité de cette interaction a été étudiée en incubant plusieurs polymères dans des lysats contenant de la GlyphOx-CBM et de la GlyphOx-CBM (150 µg de protéines totales), dont de la cellulose cristalline, du papier Whatman (le papier étant composé à base de cellulose), du chitosan (un autre polymère glucidique) et du polyvinylalcool (en tant que polyol). Les polymères sont ensuite isolés par centrifugation et lavés avec du tampon. Les protéines

immobilisées sont séparées des polymères par dénaturation dans du tampon de charge en vue de l'analyse SDS-PAGE puis séparées et identifiées par SDS-PAGE (Figure 89).

Après incubation de la cellulose cristalline et du papier dans les solutions de lysats suivie d'un lavage, on note un très fort enrichissement de la protéine d'intérêt, ainsi que la présence de quelques protéines de hauts poids moléculaires qui n'ont pas été identifiées (puits A et D, Figure 89). Très peu de protéines sont retrouvées avec le chitosan et le polyvinylalcool, confirmant la spécificité du CBM pour immobiliser les protéines de fusion. Une légère bande correspondant à la GlyphOx-CBM peut toutefois être observée, laissant penser à une faible interaction de la GlyphOx-CBM avec le chitosan, étant lui aussi un polymère glucidique.

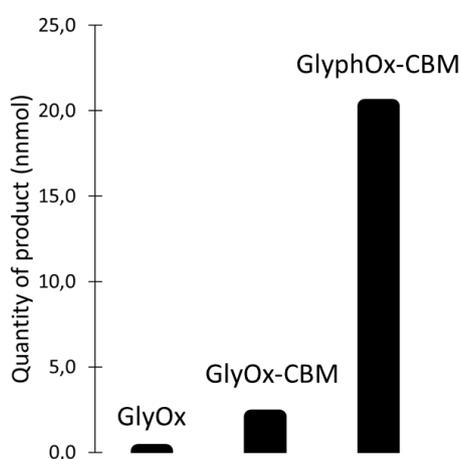


Figure 90 – Mesure de l'activité glyphosate oxydase en présence de glyphosate de disques de papier préalablement incubés (dans des lysats contenant de la GlyOx, GlyOx-CBM et GlyphOx-CBM) puis rincés. Les activités présentées proviennent du dosage du peroxyde d'hydrogène accumulé pendant 45 minutes à 30°C.

D'autres disques de papier Whatman avec les enzymes immobilisées (préparés de la même manière) sont incubés dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5 à 30°C en présence de 2,5 mM de glyphosate pendant 45 minutes. Une partie de la solution est ensuite prélevée et le peroxyde d'hydrogène accumulé est dosé par spectrophotométrie (système HRP, 4-AAP et HDCBS) (Figure 90). Aucune activité n'est mesurée pour les disques de papier incubés dans un lysat contenant de la GlyOx (sans CBM). En revanche, une faible activité est mesurée en présence de GlyOx-CBM immobilisée, et une très forte activité est retrouvée en présence de GlyphOx-CBM immobilisée. Malgré une activité spécifique de la GlyphOx-CBM bien inférieure à celle de la GlyOx-CBM (facteur 10 à 100), cette expérience montre l'enrichissement très important de cette enzyme au niveau du papier et son activité plus importante que celle de la GlyOx-CBM vis-à-vis du glyphosate. De plus, elle met aussi en avant l'immobilisation sur le papier ou sur la cellulose grâce à l'expression sous forme de protéine de fusion avec un CBM

lorsque l'on compare le signal de la GlyOx et de la GlyOx-CBM (qui possèdent des activités spécifiques similaires)

1.5. Caractérisation de l'enzyme immobilisée

De la même manière que précédemment, l'activité de la GlyOx-CBM (par rapport à la glycine) et de la GlyphOx-CBM (par rapport au glyphosate) ont été mesurées après l'incubation des disques de papier dans différents tampons (Figure 91).

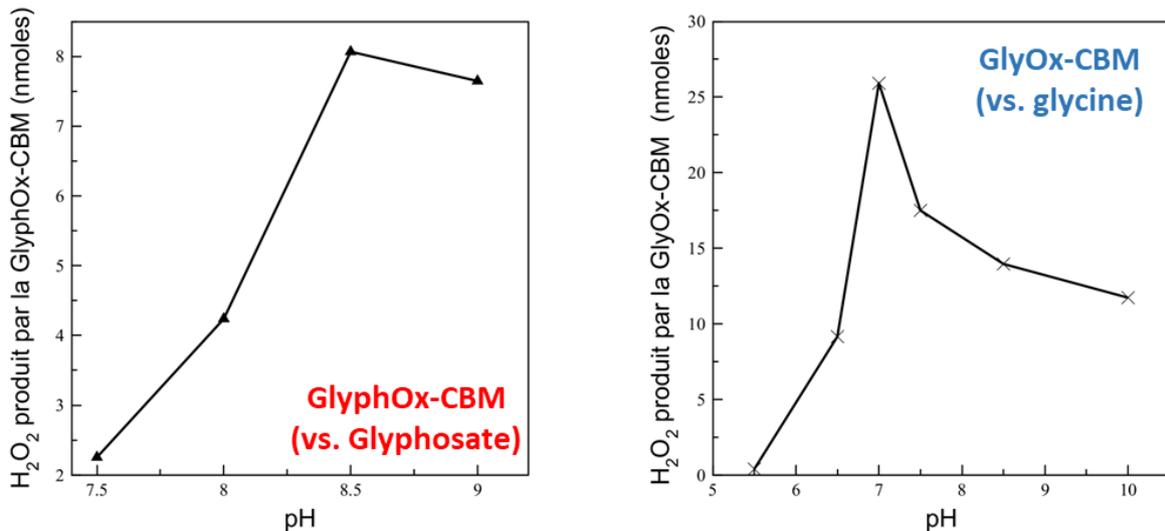


Figure 91 -Détermination du pH optimal pour la GlyOx-CBM et la GlyphOx-CBM vis-à-vis de leur substrat préférentiel (id est glycine et glyphosate). Pour ce faire, les disques de papiers avec les enzymes immobilisées sont incubés en présence de leur substrat pendant 45 minutes à 30°C. Le surnageant est ensuite prélevé et le peroxyde d'hydrogène accumulé dosé par spectrophotométrie (HRP, 4-AAP et HDCBS).

Là aussi, aucune activité enzymatique n'est détectée pour des pH acides. On observe une augmentation de l'activité enzymatique au fur et à mesure de l'augmentation du pH jusqu'à un pH de 8,5 pour la GlyphOx-CBM et de 7 pour la GlyOx-CBM. Pour les pH supérieurs, les activités enzymatiques diminuent, dans une moindre mesure pour la GlyphOx-CBM. L'immobilisation de la GlyphOx-CBM sur le papier occasionne un décalage du pH optimal de 9,5 vers 8,5, soit d'une unité pH. Dans le cas des enzymes immobilisées, la notion de micro et macro-environnement entre en compte. Du fait des contraintes de diffusion, la composition (dont le pH) du milieu au voisinage de l'enzyme diffère de celle mesurée globalement dans le milieu réactionnel.

Ce décalage de pH est également mesuré pour la GlyOx-CBM. Non immobilisée, l'enzyme a une plage de pH préférentielle de 8,5 à 9,5 contre 7,0 une fois immobilisée. Un pH de 8,5 sera donc privilégié dans la suite des travaux avec la GlyphOx-CBM.

2. Conclusion

Afin de permettre l'immobilisation d'une protéine sur un support cellulosique, nous avons choisi de l'exprimer sous forme de protéine de fusion avec un CBM, un module protéique caractérisé par une interaction forte avec la cellulose. Cette stratégie a été appliquée à la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*, avec succès. La fusion avec un CBM permet l'immobilisation de manière spécifique sur la cellulose directement à partir d'un lysat bactérien sans purification préalable.

Sur la base des travaux de Pedotti et al. publiés en 2009, nous avons pu obtenir par triple mutation de la glycine oxydase précédemment décrite une glyphosate oxydase, capable d'oxyder de manière spécifique le glyphosate. Cette protéine, exprimée sous forme de protéine de fusion avec un CBM, est capable de s'immobiliser sur un support cellulosique (papier) tout en conservant son activité enzymatique.

Toutefois, l'immobilisation des enzymes sur le papier occasionne un décalage des pH optimaux des enzymes, particulièrement visible pour la GlyOx-CBM (8,5-9,5 à 7,0 quand immobilisée) et moins marqué pour la GlyphOx-CBM (9 vers 8,5). La GlyphOx-CBM n'ayant plus d'activité à partir de pH 7,5, il est donc nécessaire de concevoir un système rapporteur sur support cellulosique permettant la détection du peroxyde d'hydrogène dans des conditions alcalines.

**4^{ème} partie - Détection du peroxyde
d'hydrogène sur support papier**

1. Détection électrochimique sur électrodes sérigraphiées

A l'origine, ce projet de thèse portait sur la conception d'un biocapteur électrochimique sur papier. Ce système se basait sur des électrodes sérigraphiées à base d'une encre de carbone incluant des particules de bleu de Prusse (un médiateur électrochimique).

Des électrodes, sérigraphiées sur PCB (*Printed Circuit Board*), ont été utilisées au sein du laboratoire par Chloé Aymard dans le cadre de la mise au point d'une technique de criblage utilisant des oxydases en solution et immobilisées pour des mesures par électrochimiluminescence et ampérométrie intermittente pulsée (Aymard et al., 2017) et plus largement de ses travaux de thèse sur le criblage d'inhibiteur des transcétolases (Aymard, 2018).

Cependant, l'encre de carbone dopée avec des particules de bleu de Prusse a entre-temps arrêté d'être commercialisée et il apparaît que les particules de bleu de Prusse contenues dans l'encre, sérigraphiées ou non, ne sont pas stables dans le temps : l'analyse par voltampérométrie cyclique des électrodes déjà sérigraphiées en début de thèse montre la dissociation des particules par l'apparition de pics de ferricyanure et de ferrocyanure se superposant aux pics de bleu de Prusse. Le réapprovisionnement en encre dopée avec des particules n'étant plus possible, il a fallu réorienter le projet.

La formation des particules de bleu de Prusse directement sur le papier a été envisagée afin de poursuivre le projet de conception d'un biocapteur électrochimique. D'après les travaux de Cinti et al., l'ajout de FeCl_3 et $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ sur le papier en un mélange équimolaire permet la formation de particules de bleu de Prusse spontanément, le papier agissant comme un réducteur (donneur d'électrons) (Cinti et al., 2018).

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer l'influence de la concentration en fer total et l'influence du tampon sur les signaux des particules de bleu de Prusse par voltampérométrie cyclique.

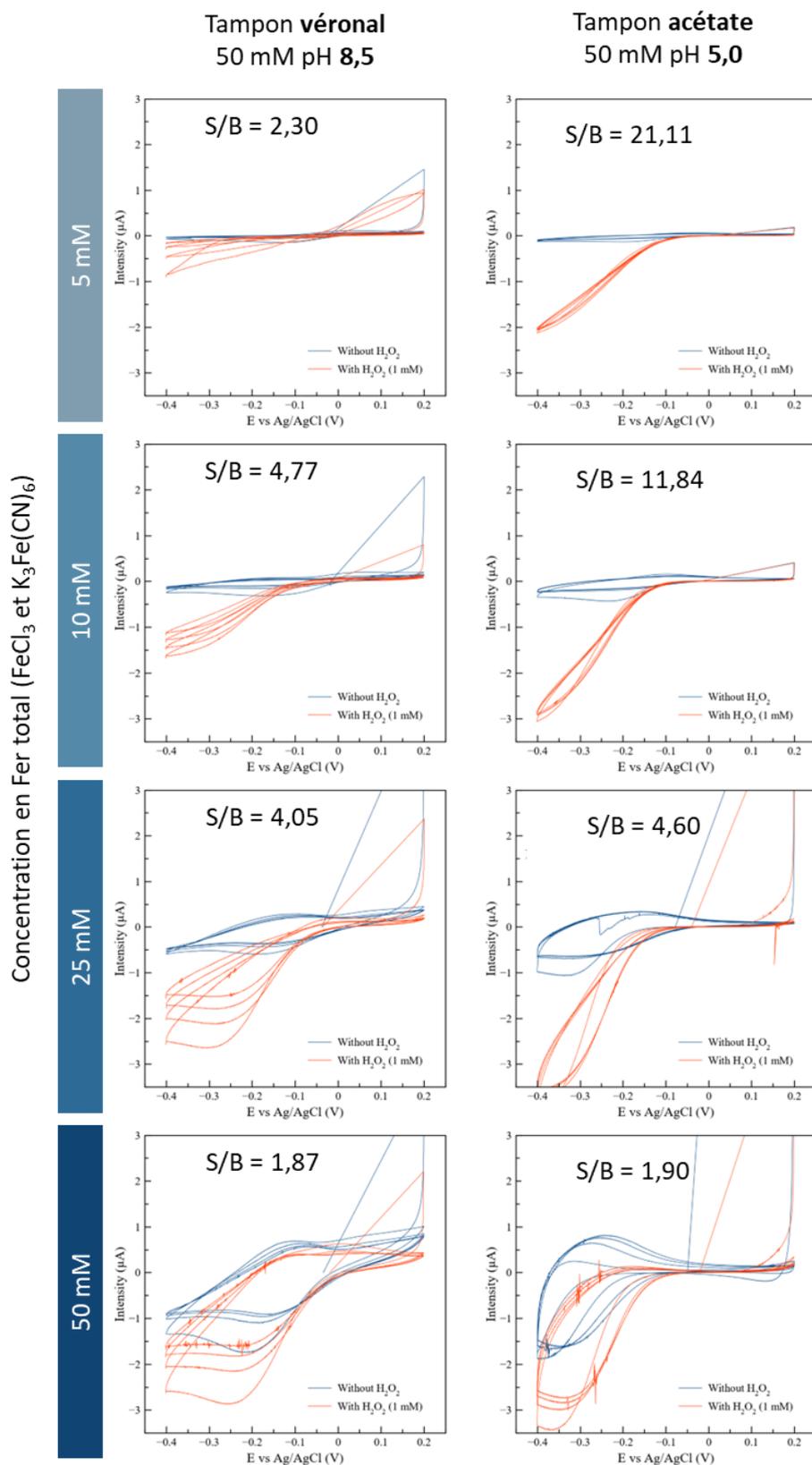


Figure 92 – Etude de l'influence du tampon (véronal 50 mM pH 8,5 à gauche et acétate 50 mM pH 5,0 à droite) et de la concentration en fer total lors de la synthèse des particules de bleu de Prusse sur des électrodes déjà sérigraphiées. Deux séries de 4 cycles de CV sont réalisées pour chaque électrode : une première en absence de peroxyde d'hydrogène (courbes bleues) et une deuxième en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène (courbes rouges). Les rapports S/B des intensités de réduction à -0,3 V au cycle 3 sont indiqués.

Pour étudier l'influence de la concentration en Fe total du milieu, des électrodes déjà sérigraphiées ont été utilisées, les particules de bleu de Prusse étant synthétisées comme décrit précédemment au verso des électrodes en utilisant quatre mélanges de concentrations différentes en fer total : 5, 10, 25 et 50 mM. Les électrodes sont ensuite caractérisées par voltampérométrie cyclique (CV) avec un balayage de potentiel de - 0,4 V à + 0,2 V dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5 ou du tampon acétate 50 mM pH 5,0. Une première expérience de CV est menée en absence de peroxyde d'hydrogène. Le tampon est ensuite enlevé et remplacé par un tampon supplémenté en peroxyde d'hydrogène (1 mM final), et une deuxième expérience de CV est réalisée dans les mêmes conditions (Figure 92).

Le premier cycle de CV en absence de peroxyde d'hydrogène (courbes bleues de la Figure 92) permet de montrer la stabilité du signal électrochimique entre les différents cycles et donc la stabilité des particules de bleu de Prusse. Cette stabilité est définie comme la conservation d'une même intensité de réduction pour un potentiel donné. En se référant à la Figure 92, avec 25 mM de fer total, on note une baisse de l'intensité de réduction mesurée lors de l'application d'un potentiel de -0,4 V au cours des cycles, résultant d'un manque de stabilité des particules.

En présence de tampon véronal, les potentiels d'oxydation (- 0,1 V) et de réduction (- 0,15 V) sont relativement bien définis et ne varient pas selon la concentration en Fe total. En présence de tampon acétate, on observe toutefois un signal de réduction plus important et un décalage des potentiels d'oxydation et réduction vers des potentiels plus négatifs : pour 50 mM en fer total par exemple, le pic de réduction est à - 0,35 V vs. Ag/AgCl avec une intensité de - 1,6 μ A contre respectivement - 0,15 V vs. Ag/AgCl et - 1 μ A dans le tampon véronal.

Le deuxième cycle de CV, en présence de peroxyde d'hydrogène, provoque un blanchissement des particules de bleu de Prusse observable à l'œil nu au cours de l'expérience. Cette observation fait écho au signal de réduction qui diminue drastiquement au fur et à mesure des cycles. Par exemple, en présence de véronal pour une concentration en Fe total de 25 mM, l'intensité du pic de réduction décroît de - 2,6 μ A au premier cycle à - 2,1 μ A au deuxième, - 1,75 μ A au troisième et - 1,5 μ A au quatrième (soit une perte de 42 % du signal entre quatre cycles). En présence d'acétate en revanche, le signal (en présence de peroxyde d'hydrogène) est beaucoup plus stable au cours des quatre cycles (sauf pour la concentration en fer total de 50 mM où une légère baisse du signal est observée) et aucune décoloration de

l'électrode n'est observée au cours de l'expérience. Le potentiel de réduction est également modifié vers des potentiels plus négatifs (vers - 0,3 V vs. Ag/AgCl). L'intensité de réduction mesurée pour un potentiel de - 0,3 V vs. Ag/AgCl augmente également selon la concentration en fer total : - 1,6 μ A pour 5 mM, - 2,2 μ A pour 10 mM et - 3 μ A pour 25 mM (- 2,7 μ A pour 50 mM). Enfin, on peut noter que l'intensité de courant mesurée pour un potentiel de réduction de - 0,3 V vs. Ag/AgCl est nettement supérieure dans du tampon acétate (-2,2 μ A pour l'électrode à 10 mM de $[\text{Fe}]_{\text{total}}$) par rapport à sa mesure dans du tampon véronal (1,1 μ A au cycle 3).

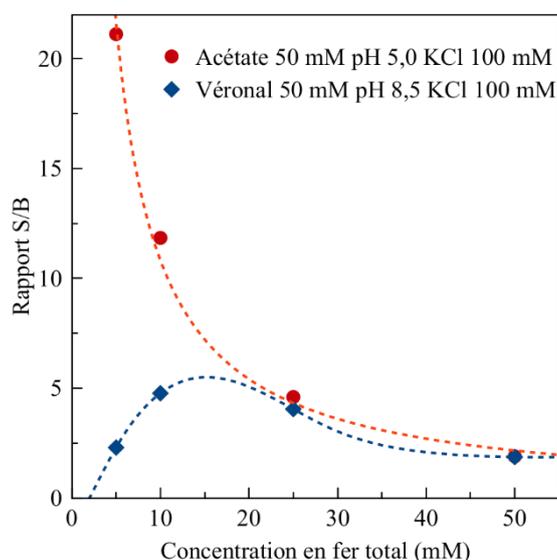


Figure 93 - Evolution des rapports signal / bruit (S/B) selon la concentration en fer total lors de la synthèse des particules de bleu de Prusse. Les données obtenues en présence d'acétate 50 mM pH 5,0 sont représentées en rouge et les données obtenus en présence de véronal 50 mM pH 8,5 sont représentées en bleu, les courbes représentant une tendance.

L'analyse du rapport signal/bruit (S/B) permet de déterminer les conditions où l'écart entre l'intensité mesurée en absence et en présence de peroxyde d'hydrogène est maximal (Figure 93). Dans du tampon véronal, l'utilisation d'une concentration de 10 ou 25 mM en Fer total lors de la synthèse des particules de bleu de Prusse semble optimale, justifiée par un rapport S/B respectivement de 4,77 et 4,05. Dans du tampon acétate à pH 5,0, le rapport S/B augmente lorsque la concentration en fer total diminue, le rapport S/B étant de 1,90, 4,60, 11,84 et 21,11 pour respectivement des concentrations en fer total de 50, 25, 10 et 5 mM. Pour la suite, les concentrations de 5 et 10 mM en fer total seront conservées (10 mM étant la concentration optimale pour des mesures dans du véronal pH 8,5).

Nous avons choisi une concentration de 10 mM en fer total afin d'analyser l'impact de la temporalité de la synthèse des particules de bleu de Prusse par rapport à la sérigraphie des électrodes. Pour ce faire, nous avons comparé deux jeux d'électrodes, l'un pour lequel la synthèse des particules est réalisée avant l'étape de sérigraphie et l'autre après celle-ci. Les électrodes sont caractérisées par voltampérométrie cyclique de la même manière que précédemment, en absence puis en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène.

Dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5, il semble difficile de déterminer une condition optimale. En effet, une meilleure stabilité du signal en présence de peroxyde d'hydrogène est obtenue en synthétisant les particules de bleu de Prusse sur le papier avant la sérigraphie : on observe une perte de 36 % de l'intensité de courant en réduction pour un potentiel de - 0,3 V vs Ag/AgCl (- 1,4 μ A au premier cycle, - 0,9 μ A au quatrième cycle). Cette perte de signal s'accompagne, comme précédemment, du blanchissement des particules de bleu de Prusse sur le papier. Malgré tout, le signal au troisième cycle (- 1,1 μ A vs - 1 μ A) et le rapport S/B (4,77 vs. 2,36) sont supérieurs lorsque les particules sont synthétisées après l'étape de sérigraphie. Ainsi, malgré le manque de stabilité du signal, dans le cas d'une mesure dans du tampon véronal pH 8,5, il est préférable de synthétiser les particules de bleu de Prusse avant la sérigraphie.

Les conclusions sont différentes lorsque la mesure est réalisée dans du tampon acétate 50 mM pH 5,0. En effet, quelle que soit la temporalité de la synthèse des particules de bleu de Prusse, le signal est stable sur les quatre cycles. Lors de la synthèse des particules avant la sérigraphie, il est intéressant de noter que le signal en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène est inférieur à celui obtenu dans du véronal 50 mM pH 8,5. (- 0,55 μ A vs. - 1,1 μ A) mais présente un meilleur rapport S/B (4,52 vs. 2,36). Toutefois, une augmentation significative de l'intensité de courant de réduction est observée lorsque les particules de bleu de Prusse sont synthétisées après la sérigraphie : le signal au troisième cycle augmente de - 0,55 μ A à - 2,2 μ A. Cette augmentation de signal s'accompagne d'une augmentation du rapport S/B qui passe de 4,52 à 11,84. A tous les points de vue, lors d'une mesure dans l'acétate 50 mM pH 5,0, la synthèse des particules de bleu de Prusse après la sérigraphie est à privilégier.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'influence de la présence d'ions potassium sur la mesure électrochimique. Pour ce faire, nous avons comparé les voltampérogrammes obtenus pour

des électrodes modifiées par ajout de bleu de Prusse (10 mM en fer total) en absence et présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène dans du tampon véronal 50 mM pH 8,5 ou acétate 50 mM pH 5,0, les deux tampons étant supplémentés (ou non) en acétate de potassium (pour l'acétate) ou en KCl (pour le véronal) (Figure 94).

Dans le tampon véronal 50 mM pH 8,5, la présence d'ions potassium ne semble pas avoir beaucoup d'effet : les signaux ne sont pas stables en absence ou présence de potassium, et une baisse d'intensité du courant de réduction s'accompagnant d'une baisse du rapport S/B (4,44 vs. 2,76 en présence de potassium) est observée en présence de potassium.

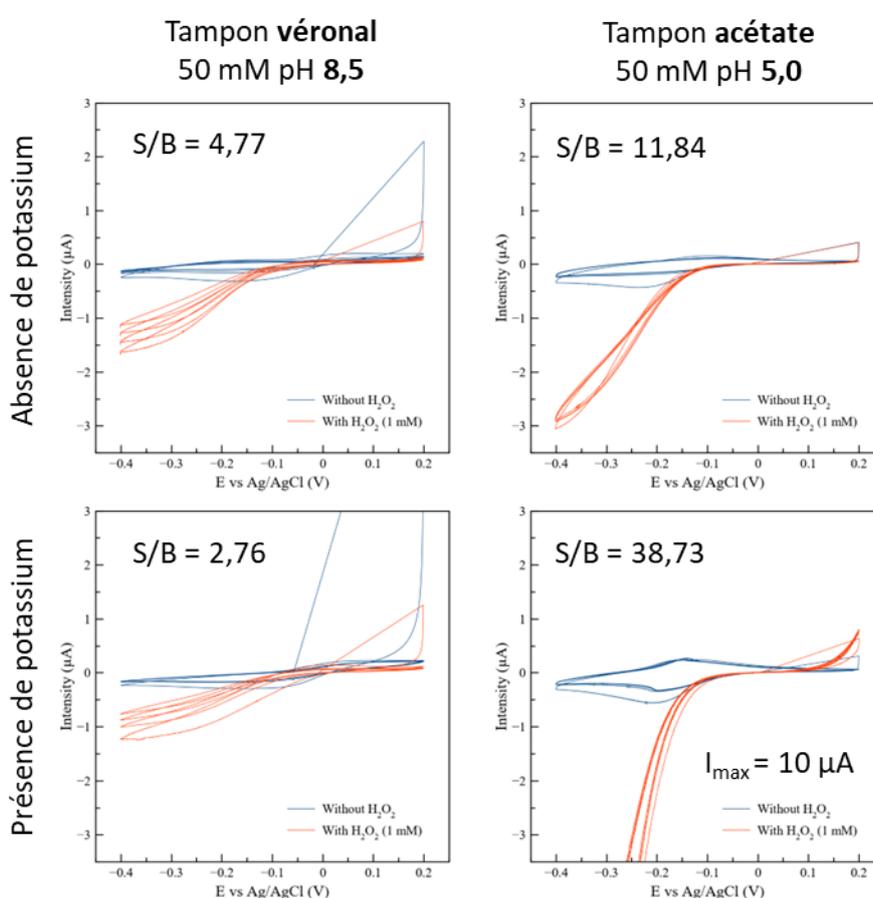


Figure 94 - Etude de l'influence d'ions potassium sur la détection électrochimique du peroxyde d'hydrogène par des électrodes fonctionnalisées avec des particules de bleu de Prusse synthétisées *in situ* (10 mM de fer total). La caractérisation des électrodes en absence (courbes bleues) puis présence (courbes rouges) de peroxyde d'hydrogène est réalisée par voltampérométrie cyclique entre -0,4 V et +0,2 V vs. Ag/AgCl dans du tampon acétate 50 mM pH 5,0 supplémenté en acétate de potassium 100 mM supplémenté en KCl 100 mM ou du tampon véronal 50 mM pH 8,5 supplémenté en acétate de potassium 100 mM. Deux séries de 4 cycles de CV sont réalisées pour chaque électrode : une première en absence de peroxyde d'hydrogène (courbes bleues) et une deuxième en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène (courbes rouges). Les rapports S/B des intensités de réduction à -0,3 V au cycle 3 sont indiqués. Vitesse de balayage : 5 mV.s⁻¹.

4ème partie - Détection du peroxyde d'hydrogène sur support papier

Dans le tampon acétate 50 mM pH 5,0, le potassium n'a aucun effet sur la stabilité du signal. En revanche, l'intensité de réduction augmente très fortement : elle passe de - 2,2 μA à - 8 μA . Cette augmentation de signal s'accompagne en outre d'une forte augmentation du rapport S/B, de 11,84 à 38,73.

Pour conclure, la détection du peroxyde d'hydrogène grâce au bleu de Prusse par CV est très dépendante du pH (et du tampon). Dans le tampon véronal 50 mM pH 8,5, on observe un blanchissement des électrodes et une instabilité du signal. L'hypothèse de la destruction des particules de bleu de Prusse à pH alcalin peut être avancée, confirmée par la littérature (Gervais et al., 2013; Karyakin, 2001; Karyakin et al., 1999; Ricci et al., 2003). La réduction du peroxyde d'hydrogène par le bleu de Prusse génère des ions hydroxydes (HO^-) qui déstabilisent les liaisons entre les groupements cyanures et les atomes de fer, conduisant au relargage du cyanure sous forme gazeuse et à la destruction de la particule. En conditions acides, les ions hydroxydes sont neutralisés mais en conditions neutre et alcaline, la concentration des ions hydroxydes au contact des particules de bleu de Prusse augmente.

La glyphosate oxydase fonctionnant à pH alcalin, il semble difficile de détecter le peroxyde d'hydrogène issu de l'oxydation du glyphosate grâce aux électrodes modifiées par des particules de bleu de Prusse, ces particules étant détruites au pH de fonctionnement de l'enzyme.

En revanche, dans le tampon acétate 50 mM pH 5,0, les résultats sont encourageants. Les particules de bleu de Prusse doivent être synthétisées directement sur le papier après la sérigraphie des électrodes. La détection du peroxyde d'hydrogène par voltampérométrie cyclique doit se faire dans du tampon acétate 50 mM pH 5,0 supplémenté en KCl 100 mM et en présence de potassium. Dans cette configuration, ce système permet la détection du peroxyde d'hydrogène à 1 mM avec un rapport signal sur bruit de 38,73.

Toutefois, les travaux n'ont pas été poursuivis étant donné la différence de pH optimaux entre l'activité de la GlyphOx-CBM et la stabilité du médiateur (bleu de Prusse) mais ce système est intéressant pour des oxydases fonctionnant à pH acide. De tels systèmes sont décrits par Cinti et coll. dans un biocapteur pour détection du glucose sur papier (Cinti et al., 2018).

Trois options de poursuite des travaux sont possibles pour pallier cette incompatibilité de pH : modifier l'enzyme par évolution dirigée afin d'obtenir une nouvelle enzyme fonctionnant à pH

acide, changer de système rapporteur ou optimiser le système rapporteur pour améliorer sa stabilité à pH alcalin.

La première option (obtenir une nouvelle enzyme fonctionnant à pH acide) a été choisie dans un premier temps, en prenant la GlyphOx-CBM, comme enzyme de départ. Néanmoins, cette stratégie a été abandonnée suite à des problèmes techniques lors d'étapes de biologie moléculaire conduisant à des taux de transformation des vecteurs insuffisants. Ces travaux ne seront pas présentés dans ce manuscrit de thèse.

Dans la poursuite de notre étude, le changement du système rapporteur a été l'option choisie. C'est son application qui constituera la suite du manuscrit.

Enfin, la troisième option a fait l'objet de travaux par Ricci et coll ainsi que par Karyakin et coll. L'ajout d'une couche de Nafion ou de nickel-hexacyanoferrate permet d'augmenter la stabilité des particules au cours des cycles de voltampérométrie mais ne semble pas résoudre ce problème de pH. Ricci et al. quant à eux synthétisent les particules de bleu de Prusse directement sur l'électrode de travail d'un dispositif d'électrodes sérigraphiées sur un film flexible en polyester. Un chauffage à 100°C pendant une heure est effectué. Les auteurs montrent alors par voltampérométrie que l'intensité du courant au pic de réduction varie peu à pH 7,0 et qu'une diminution de 10 % est observée à pH 8,0. Ce système est ensuite combiné à la co-immobilisation (grâce à du glutaraldéhyde et du nafion) de l'ACHE et la ChOx, montrant le maintien des performances à pH 8,0.

2. Détection colorimétrique du peroxyde d'hydrogène avec la HRP

Le peroxyde d'hydrogène peut être détecté grâce à l'intervention d'une peroxydase. En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase oxyde son substrat, pouvant conduire à la formation d'un composé coloré. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à trois composés : le couple 4AAP/HDBCS préalablement décrit, l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) et le 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) (Figure 75).

L'objectif est ici d'être capable de détecter du peroxyde d'hydrogène dans une configuration comprenant une peroxydase (HRP) et son (ses) substrats, chacun étant adsorbé sur une surface de papier Whatman. Avant d'évaluer la capacité de détection d'un tel système, nous avons souhaité savoir si l'utilisation d'une peroxydase déposée sur support papier, pouvait constituer une méthode de mesure adéquate pour la détection du peroxyde d'hydrogène. Le facteur Z est un paramètre utilisé en chimie analytique pour évaluer la qualité d'un test de criblage. Il est donc adapté pour valider une méthode si la mesure d'un grand nombre d'échantillons est possible. Il permet d'évaluer simultanément la robustesse et la capacité de discrimination d'un crible. Il est calculé de la manière suivante :

$$\text{Facteur } Z = 1 - \left(\frac{3 (\sigma_{\text{positif}} + \sigma_{\text{négatif}})}{|\mu_{\text{positif}} - \mu_{\text{négatif}}|} \right) \quad (\text{Équation 6})$$

Avec μ correspondant à la moyenne et σ à l'écart-type des mesures en présence (positif) ou en absence (négatif) de peroxyde d'hydrogène.

Le calcul de ce facteur permet d'identifier la qualité du système de criblage. La valeur de 1 correspond à un test idéal, les écarts-types étant nuls et la différence entre le signal positif et négatif infinie. Il est considéré que le test est satisfaisant pour des valeurs comprises entre 0,5 et 1. Entre 0 et 0,5, le test est toujours valable mais il nécessite la mise en place d'un étalon interne. Pour une valeur de 0, le test est défini comme qualitatif (oui/non) et inutilisable pour toute valeur négative.

Pour ce faire, des plaques de 96 disques sur papier ont été imprimées (correspondant au format classique d'une microplaque), les puits étant définis par un contour noir et l'espace entre les disques étant recouvert d'un maillage vert, avec une imprimante à cire, puis cuites à l'étuve pendant une heure à 100°C afin que la cire puisse pénétrer le papier et former des

puits dans la profondeur du papier. Une feuille de plastique est collée à l'arrière du papier afin de sceller le fond des puits.

Les différents puits sont ensuite préparés par ajout et séchage des substrats de la HRP. Enfin, 5 μL de peroxyde d'hydrogène 500 μM (dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 8,5 supplémenté avec 1,25 mU de HRP) sont ensuite déposés dans 1 puits sur 2, du tampon étant déposé dans les autres. La plaque est incubée pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être numérisée (Figure 95).

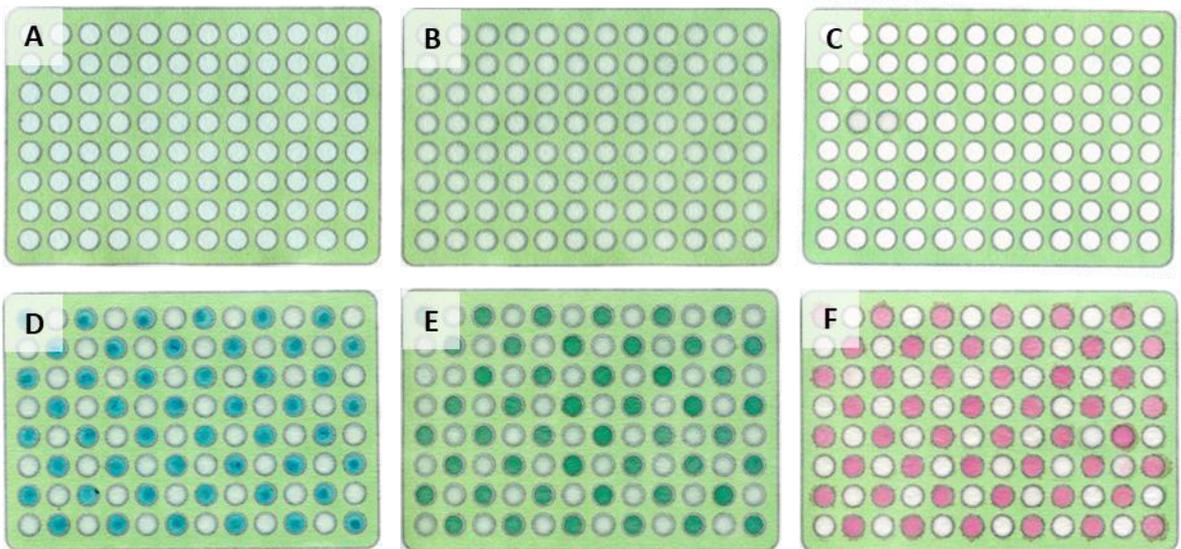


Figure 95 - Numérisation des plaques de papier sur lesquelles ont été déposés du TMB (A et D), de l'ABTS (B et E) et du 4-AAP/HDCBS (C et F) avant (A, B et C) et après dépôt (D, E et F) de 5 μL de peroxyde d'hydrogène 500 μM (2,5 nmol) dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 8,5 supplémenté en HRP

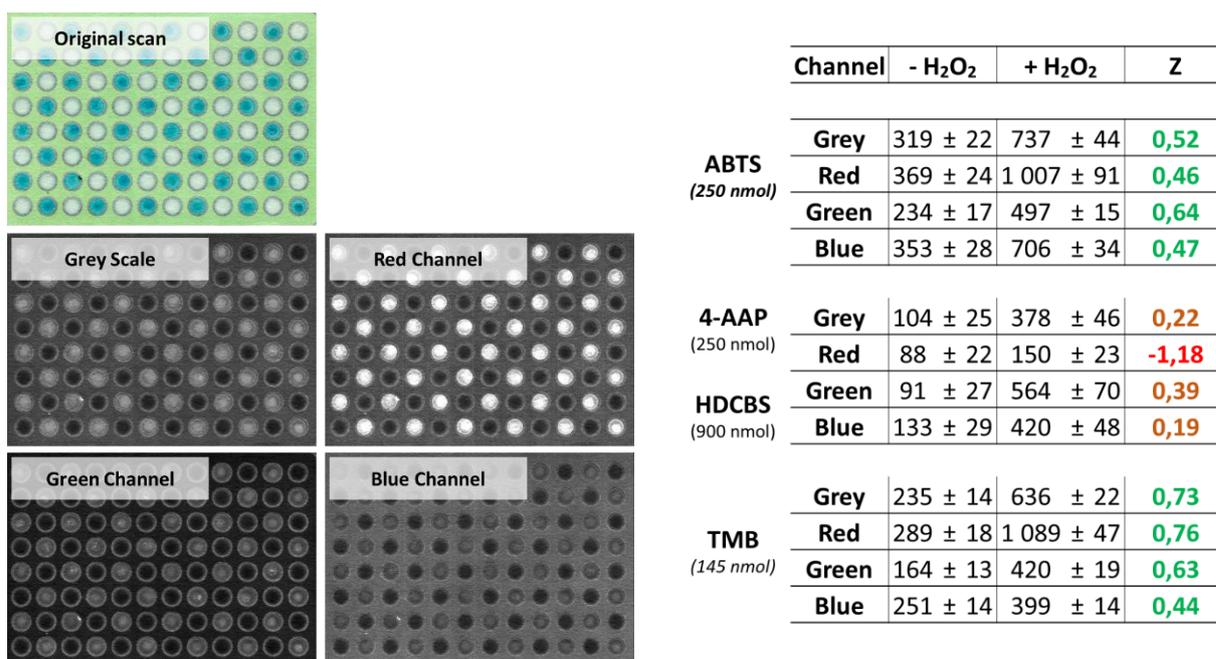


Figure 96 - Exemple d'analyse d'image pour une plaque 96 de papier avec du TMB, de la HRP et 2,5 nmol de peroxyde d'hydrogène (n=48) ou de l'eau (n=48) après 10 minutes d'incubation. L'image en Ce sont ces sommes d'intensités qui sont reportées dans le tableau de droite pour les différents composants (et pour les différents substrats, à savoir le TMB présenté, mais aussi l'ABTS et le couple 4-AAP/HDCBS). Pour chaque condition, le Z-score est calculé.

L'image numérisée en couleur est convertie en nuances de gris où les composantes de chaque couleur (rouge, vert, bleu) sont isolées pour former une nouvelle image en nuances de gris. La zone de capture circulaire est définie à l'intérieur des disques et la somme de l'intensité des pixels est déterminée grâce au logiciel ImageJ. Les 48 valeurs de signal et les 48 valeurs de blanc sont utilisées pour calculer le facteur Z. L'analyse de cette expérience (Figure 96) permet de montrer que l'usage sur papier du TMB et de l'ABTS permet une détection sans équivoque du peroxyde d'hydrogène pour des échantillons de 500 µM (5 µL d'échantillon, soit 2,5 nmol.), le facteur Z calculé pour chaque canal de couleur étant supérieur à 0,5. L'analyse des pixels verts pour l'ABTS (facteur Z de 0,64) et rouges pour le TMB (facteur Z de 0,76) apparaissent comme des meilleures analyses que la simple prise d'image en nuances de gris.

Un effet de concentration du TMB peut être identifié sous forme d'un spot de couleur plus intense au centre du puits : on peut supposer que le TMB interagit avec le papier au moment du dépôt, conduisant à une zone plus concentrée au centre du dépôt, ou que la vitesse de réaction conduit à une précipitation du TMB au centre du puits avant qu'il n'ait le temps de diffuser dans l'intégralité du disque de papier. Toujours dans le cas du TMB, il est notable de constater que le facteur Z est quasi-identique pour les canaux gris et rouge, alors que ce premier apparaît comme plus marqué lors de l'observation visuelle de l'image.

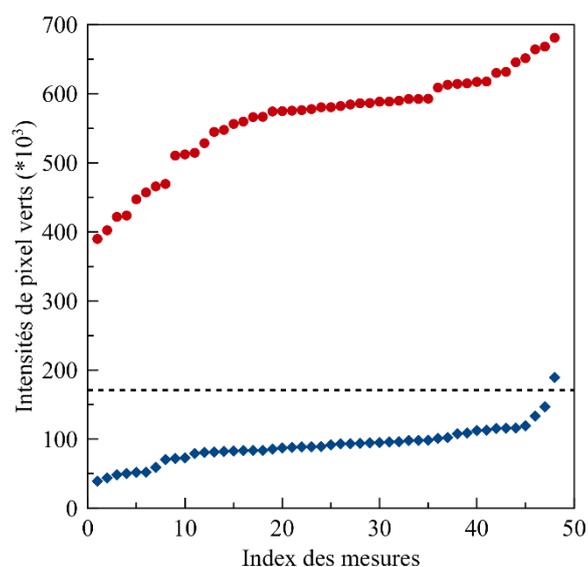


Figure 97 - Répartition de l'intensité des points sur le canal vert des disques en absence (bleu) et en présence (rouge) de 2,5 nmol de peroxyde d'hydrogène. La ligne en pointillés représente la limite de détection calculée telle que $LOD = \mu_{\text{négatif}} + 3 \sigma_{\text{négatif}}$.

Le couple 4-AAP/HDCBS ne semble pas convenir pour le criblage du peroxyde d'hydrogène à une concentration de 500 μM (5 μL , 2,5 nmol), ou bien nécessitera l'utilisation d'un étalon interne. C'est en réalité la forte dispersion des points mesurés en présence de peroxyde d'hydrogène qui occasionne un écart-type très important, d'où un facteur Z-Score très faible dans ce cas. Cette forte dispersion des points peut être observée sur la Figure 97. La comparaison de l'intensité des pixels, sur la composante verte, en présence de peroxyde d'hydrogène est clairement supérieure au bruit de fond. La raison de cette dispersion n'a pas été étudiée.

Afin d'évaluer les performances analytiques de ce système, la même expérience a été menée avec cette fois différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (50, 75, 100, 200, 300, 400 et 500 μM) dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 8,5 sur une même plaque sur laquelle les substrats de la HRP ont été déposés et séchés préalablement. Le peroxyde

d'hydrogène (dans du tampon pyrophosphate contenant 1,25 mU de HRP) est déposé et la plaque est incubée pendant 10 minutes. Elle est ensuite numérisée, et l'image est traitée avec le logiciel ImageJ (Figure 99).

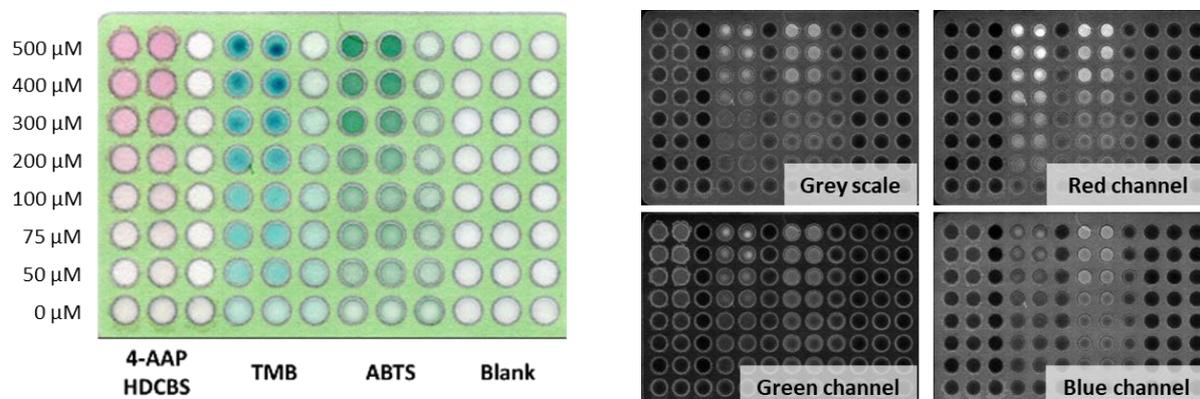


Figure 99 - Détermination des performances analytiques du système HRP/substrat. Ces deux derniers sont immobilisés et séchés sur le papier. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite déposé, laissé incubé à température ambiante pendant 10 minutes et l'image est numérisée (à gauche) avant d'être transformée numériquement (à droite) avec ImageJ.

	Channel	R ²	LOD* (µM)	LOQ* (µM)
ABTS	Grey	0.955	12	39
	Red	0.959	7	22
	Green	0.938	26	87
	Blue	0.960	8	27
TMB	Grey	0.934	26	87
	Red	0.966	21	69
	Green	0.969	28	93
	Blue	-	-	-
4AAP - HDCBS		No linear response		

Figure 98 - Résumé des performances analytiques mesurées et calculées pour le système HRP/substrat immobilisé pour la détection du peroxyde d'hydrogène (n = 2). Les LODs sont calculées telles que les valeurs obtenues pour 3 fois l'écart-type du blanc et les LOQs telles que les valeurs obtenues pour 5 fois l'écart-type du blanc.

Les signaux sont mesurés comme précédemment pour les trois substrats chromogènes selon les 4 modes de mesure : nuances de gris et composantes rouge/vert/bleu. L'analyse du signal en fonction de la concentration d'analyte (peroxyde d'hydrogène) permet d'évaluer la variation du signal par rapport à l'analyte (Figure 98).

Deux paramètres analytiques sont définis : la limite de détection et la limite de quantification. La limite de détection (LOD) correspond à la concentration de peroxyde d'hydrogène dont le signal est égal à trois fois l'écart-type de la moyenne du signal sans analyte. La limite de quantification (LOQ) quant à elle est la concentration de peroxyde d'hydrogène dont le signal est égal à dix fois l'écart-type de la moyenne du signal sans analyte.

Avec le système 4-AAP/HDCBS, aucune corrélation linéaire n'a pu être trouvée quel que soit le canal de couleur utilisé : le signal forme une sigmoïde qui sature dès 300 μM de peroxyde d'hydrogène. Pour les deux autres substrats, une relation linéaire est mesurée sur la gamme de concentrations mesurées (50 à 500 μM) avec des limites de détection et quantification similaires, de l'ordre de la dizaine de μM . L'augmentation du temps d'incubation (données non présentées) ne semble pas améliorer ces paramètres.

2.1.1. Application du système à la GlyOx-CBM

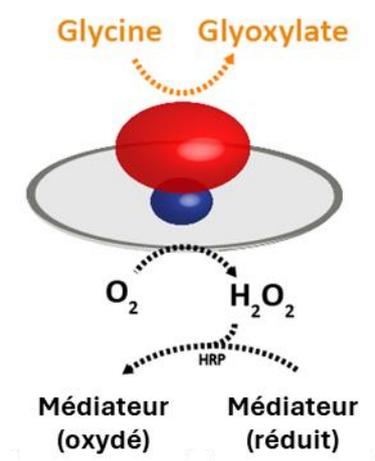


Figure 100 - Schéma de principe de la détection de la glycine. La glycine est oxydée par la GlyOx-CBM (la partie GlyOx étant schématisée en rouge et la partie CBM en bleu) produisant du peroxyde d'hydrogène qui est quantifié grâce à la HRP et ses substrats chromogènes

Avant de réaliser un assemblage avec la glyphosphate oxydase dont la solution de lysat présente une activité spécifique faible, la GlyOx-CBM est immobilisée sur le papier dans un premier temps (Figure 100). Pour ce faire, la solution de lysat est déposée en plusieurs fois sur un disque de papier. Afin d'éliminer les protéines n'ayant pas ou peu d'interactions avec le papier, un cycle de rinçage est réalisé entre chaque dépôt. La quantité de protéines totale déposée est de 20 μg . Une fois le disque de papier sec, chacun des médiateurs est à son tour déposée comme précédemment. Après ajout de 5 μL d'une solution de glycine (20 mM) et de HRP (1,25 mU) et 5 minutes d'incubation à 30°C, aucune réaction n'est visible par apparition

de couleur. Si la réaction est prolongée, cela ne permet pas d'améliorer le signal en raison des phénomènes d'évaporation.

Pour conclure, nous avons essayé de détecter du peroxyde d'hydrogène sur du papier, en séchant sur le papier les substrats chromogènes de la peroxydase et en ajoutant la peroxydase dans l'échantillon déposé. Néanmoins, lorsque nous avons immobilisé la GlyOx-CBM, aucun signal n'a été obtenu quels que soient les substrats de la HRP immobilisés. Afin de diminuer la charge protéique dans le papier, nous avons souhaité remplacer la HRP par une peroxydase exprimée sous forme de protéine de fusion, afin de permettre son immobilisation de manière spécifique. La GlyphOx-CBM fonctionnant à pH alcalin, il faut donc identifier une peroxydase fonctionnant à pH alcalin et dont l'expression dans un système bactérien a déjà été décrite.

3. Détection colorimétrique avec la SviDyP-CBM

En 2014, Yu et al. caractérisent la SviDyP, une peroxydase exprimée par *Saccharomonospora viridis*. Ils la décrivent comme une peroxydase thermostable tolérante aux pH alcalins. Comme présenté plus haut (dans la première partie), les DyP ont généralement un pH optimal acide. L'activité optimale de la SviDyP est observée à pH 7,0. A pH 8,5, l'activité résiduelle est décrite comme étant de 50%, faisant de cette enzyme une alternative à la HRP. De plus, il a été montré qu'elle était stable à des pH alcalins. Cependant, l'activité maximale de l'enzyme est mesurée à 70°C et son activité résiduelle n'est que de 10 % à 30°C.

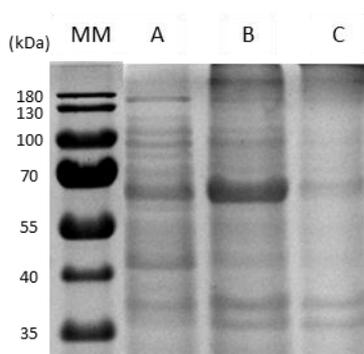


Figure 101 - Analyse de la composition en protéines du surnageant (A) et du culot (C) du lysat bactérien après expression de la SviDyP-CBM. Un échantillon de lysat déposé sur un disque de papier est rincé et les protéines immobilisées sont séparées du support par dénaturation puis analysées par SDS-PAGE (B). MM : marqueur moléculaire.

A partir de la séquence codant pour cette peroxydase, nous avons exprimé cette protéine sous forme de protéine de fusion avec le CBM de type 3a de *Clostridium thermocellum*, en utilisant le même protocole que pour l'expression de la GlyOx-CBM (Figure 101). Cependant, aucune activité dans le lysat n'a pu être mesurée, en incubant l'enzyme avec le TMB ou le 4AAP/HDCBS dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 8,5 ou du tampon acétate 50 mM

pH 5,5 en présence d' H_2O_2 . La raison de cette absence d'activité dans le lysat bactérien n'a pas été étudiée, mais il peut être supposé que la bactérie, pour se protéger du stress oxydant introduit par l'expression d'une peroxydase, a aussi surexprimé une catalase, une superoxyde dismutase ou du moins un processus de neutralisation du peroxyde d'hydrogène.

L'activité SviDyP a pu être néanmoins mesurée une fois immobilisée sur une matrice de papier. Pour ce faire, une feuille de papier présentant des disques délimités par de la cire est posée sur du papier absorbant. Le lysat est déposé sur les disques en plusieurs dépôts, avec une étape de rinçage avec du tampon pyrophosphate pH 8,5 entre chaque dépôt pour éluer les protéines ayant peu d'interactions avec le papier. Les disques sont ensuite séchés, puis découpés à l'emporte-pièce. L'analyse des protéines immobilisées sur un disque par SDS-PAGE permet de mettre en avant l'enrichissement de la SviDyP-CBM sur le papier directement à partir du lysat.

Les disques de papier avec la SviDyP-CBM immobilisée sont ensuite incubés dans du tampon acétate à pH 5,5 en présence de 10 ou 100 μM de peroxyde d'hydrogène et de TMB 15 mM à 30°C pendant 60 minutes. Le TMB semble particulièrement approprié pour la détection de l'activité d'une peroxydase sur papier considérant sa capacité à interagir avec le papier, permettant sa concentration au niveau du disque de papier (Figure 102). L'activité SviDyP sur papier peut ainsi être visualisée.



Figure 102 - Pour pouvoir observer l'activité de la SviDyP, il a été nécessaire d'immobiliser l'enzyme sur des disques de papier. Ces disques sont ensuite incubés dans du tampon acétate 50 mM pH 5,5 contenant du TMB en présence ou absence de peroxyde d'hydrogène. L'image a été acquise par numérisation à l'aide d'un scanner de bureau.

Un disque de papier avec la SviDyP immobilisée préparé de la même manière a été incubé dans du bleu de charge (pour dénaturer les protéines et rompre l'interaction du CBM avec le papier), et analysé par SDS-PAGE (Figure 101, piste B), confirmant l'immobilisation de l'enzyme et son enrichissement important dans le papier.

4ème partie - Détection du peroxyde d'hydrogène sur support papier

Dans un deuxième temps, l'activité de la SviDyP-CBM immobilisée sur du papier est étudiée en fonction du pH. Pour ce faire, trois pH ont été choisis : pH 5,5 (tampon acétate 50 mM), pH 7,0 (tampon pyrophosphate 50 mM) et pH 8,5 (tampon véronal 50 mM). Les disques de papier avec la SviDyP-CBM immobilisée sont découpés à l'emporte-pièce et incubés pendant une heure à 30°C en absence ou présence de peroxyde d'hydrogène (10 ou 100 μ M) et en présence de TMB 2,5 μ M en solution (Figure 103) avant d'être numérisés à l'aide d'un scanner de bureau

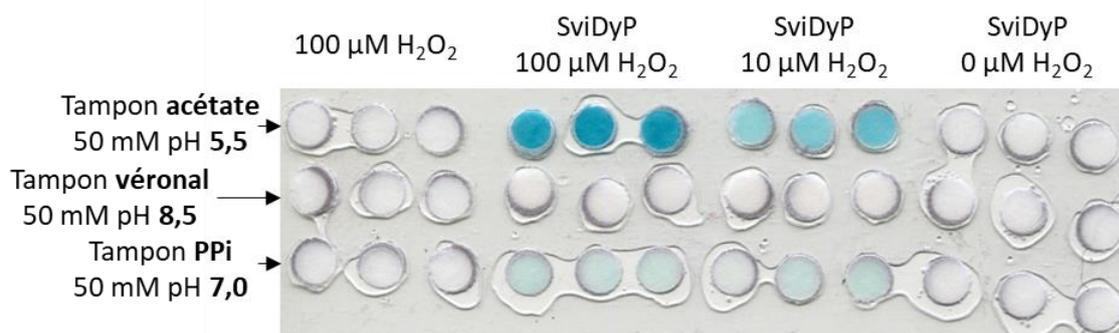


Figure 103 - La SviDyP immobilisée, en présence de TMB, présente une activité à pH acide. Si à pH neutre, une faible activité peut être observée à l'œil, aucune activité n'est observable à pH alcalin. Aucune activité parasite ne peut être observée en absence de peroxyde d'hydrogène.

En absence de peroxyde d'hydrogène ou en absence de SviDyP immobilisée, aucune coloration n'est observée au bout d'une heure d'incubation, quel que soit le tampon utilisé. En présence de 10 ou 100 μ M de peroxyde d'hydrogène, l'intensité de la coloration dépend du pH. A pH acide (tampon acétate 50 mM pH 5,5), la coloration est nettement visible, elle l'est légèrement à pH neutre (tampon pyrophosphate 50 mM pH 7,0) mais ne l'est pas du tout à pH alcalin (tampon véronal pH 8,5 50 mM). De manière intéressante, l'interaction entre le papier et le TMB est de nouveau visualisée par la concentration du pigment au départ en solution sur les disques de papier.

L'absence de coloration à pH 8,5 suggère qu'il est impossible d'utiliser la SviDyP-CBM au pH optimal de la GlyphOx-CBM (8,5) avec le TMB comme substrat chromogène de cette peroxydase.

L'utilisation du couple de substrats 4-AAP/HDCBS a dans le même type d'expérience conduit à un bruit de fond très important en l'absence d'enzyme ou de peroxyde d'hydrogène.

Dans le cadre du stage de Maïlis Dissais (L3), un biocapteur combinant une oxydase-CBM et la SviDyP-CBM au lieu d'utiliser la HRP a été assemblé. La SviDyP étant exprimée sous forme de protéine de fusion avec un CBM, nous avons supposé que son immobilisation étant

spécifique de la cellulose, nous pouvons co-immobiliser les deux protéines en diminuant le nombre de protéines immobilisées de manière non spécifique et en diminuant le nombre total de protéines sur le papier.

Dans un premier temps, plusieurs quantités de SviDyP-CBM ont été immobilisées en présence de TMB sur du papier avec un motif de 96 puits délimités par de la cire comme précédemment. L'utilisation du 4-AAP et de l'HDCBS a été abandonnée du fait de la difficulté de pénétration dans le papier à la suite du dépôt des enzymes et aux fuites observées lors du dépôt du médiateur colorimétrique, puis lors du dépôt de l'échantillon.

Ce système (SviDyP-CBM immobilisée en présence de TMB sur du papier) a été testé avec différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène afin d'évaluer ses capacités analytiques. Après 10 minutes d'incubation en présence de 10 à 50 μM de peroxyde d'hydrogène à 30°C, la plaque de papier est numérisée avec un scanner de bureau. La valeur de l'intensité de pixels de la composante « rouge » est considérée comme signal à la vue des résultats précédents. La sensibilité, calculée comme la pente de la droite de régression représentant l'intensité des pixels rouges en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène, est déterminée pour des concentrations de protéines (0 à 200 μg) utilisées pour l'immobilisation (Figure 104). La sensibilité est maximale pour 80 μg de protéines totales utilisées pour l'immobilisation. Avec cette quantité, on observe un domaine de linéarité pour des concentrations de peroxyde d'hydrogène de 10 à 50 μM ($0,73 \mu\text{M}^{-1}$) ce qui est moins performant que lorsque la HRP est adsorbée sur le papier (domaine de linéarité de 0,5 à 50 μM avec une sensibilité de $1,07 \mu\text{M}^{-1}$).

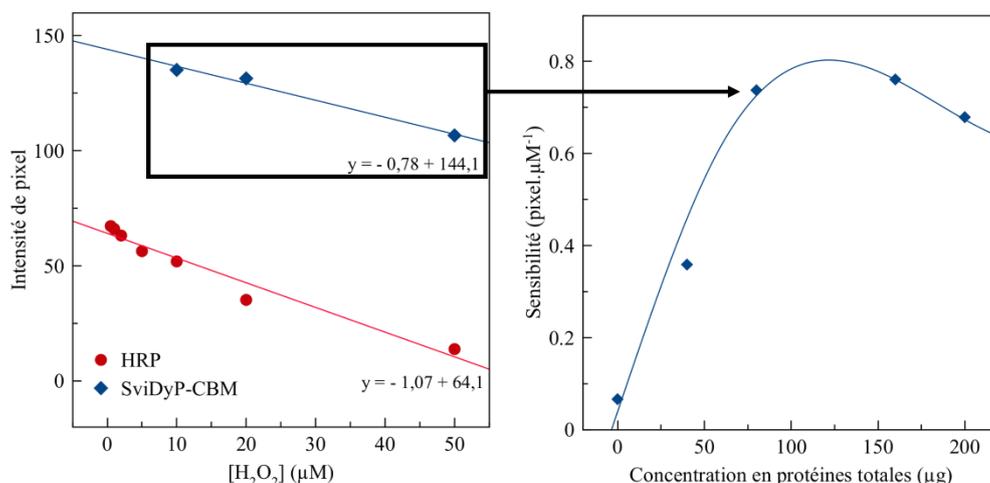


Figure 104 – Détection d'une gamme de concentration variable de peroxyde d'hydrogène avec plusieurs quantités de protéines immobilisées afin de déterminer la sensibilité du système.

Afin d'assembler le biocapteur, la GlyOx-CBM et la SviDyP-CBM ont été co-immobilisées sur le papier. La HRP a également été co-immobilisée avec la GlyOx-CBM à des fins de comparaison. Le TMB est également adsorbé sur le papier. Des solutions de glycine de 2,5 à 50 mM dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 7,0 ont été déposées sur les disques de papier délimités par de la cire. Ces derniers ont été incubés à 30°C pendant 10 minutes avant d'être numérisés (Figure 105).

Si aucune différence n'est visible à l'œil nu, l'optimisation des paramètres de numérisation de scan permet d'extraire un signal. Pour cela, les 256 niveaux d'intensité de rouge d'un pixel avant numérisation sont normalement transformés en 256 niveaux d'intensité de rouge d'un pixel après numérisation. Lors de l'acquisition il est possible de réduire la fenêtre de niveaux d'intensité (par exemple de 256 à 100) pour un même nombre de niveaux d'intensité de sortie ce qui augmente numériquement la sensibilité. Ainsi, sans transformation, 1 niveau d'intensité lors de la numérisation conduit à un niveau d'intensité après numérisation (256 pour 256). En réduisant la fenêtre d'intensité lors de la numérisation, la sensibilité augmente (exemple 100 pour 256, soit une sensibilité multipliée théoriquement par 2,56).

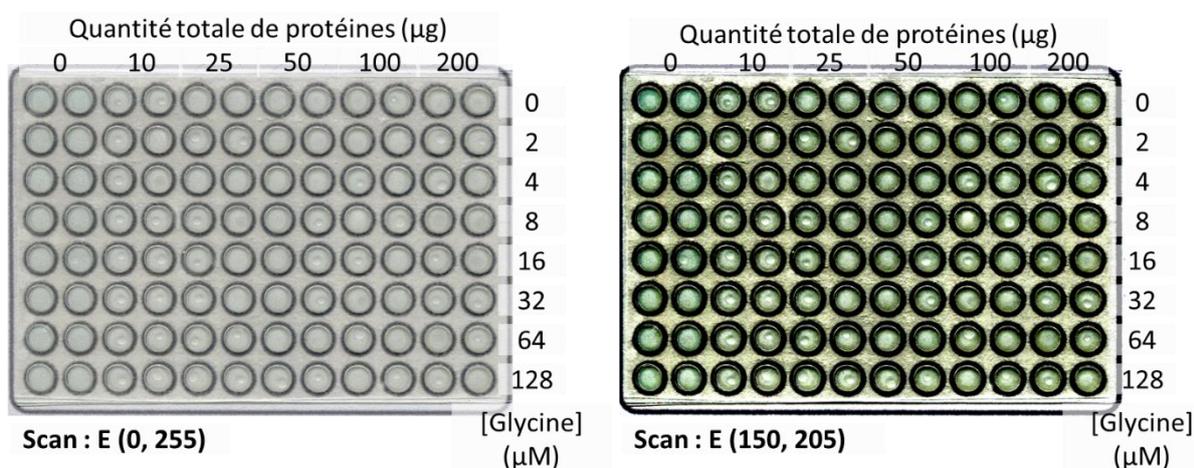


Figure 105 - SviDyP-CBM et GlyOx-CBM (plusieurs quantités) sont déposées et immobilisées sur le papier. Le TMB est ensuite ajouté sur le papier et laissé sécher. Différentes concentrations de glycine dans du tampon pyrophosphate 50 mM pH 7,0 sont déposées sur la plaque qui est incubée à 30°C pendant 10 minutes. Elle est ensuite numérisée sans modifier les paramètres de numérisation (à gauche) ou en les modifiant (150-205) (à droite).

Dans le cas présent, une fenêtre d'entrée des pixels d'intensité 105-205 est choisie permettant d'atteindre, après traitement des données, un domaine de linéarité de 16 à 64 µM pour une sensibilité de 0,12 µM⁻¹ lorsque la SviDyP-CBM est utilisée. Lorsque la HRP est utilisée, le biocapteur est légèrement plus performant (domaine de linéarité de 16 à 128 µM avec une sensibilité de 0,23 µM⁻¹).

4. Conclusion et « problématique »

Ces résultats soulèvent certaines questions. L'utilisation de la SviDyP-CBM offre l'opportunité d'immobiliser une peroxydase directement à partir d'un lysat bactérien, sans purification préalable comme cela est possible pour la GlyOx-CBM et la GlyphOX-CBM. Néanmoins, les domaines de linéarité observés pour la détection du peroxyde d'hydrogène (de 10 à 50 μM) et pour la détection de la glycine (de 16 à 128 μM) ne sont pas cohérents. En effet, la détection d'une concentration de 20 μM de glycine ne peut correspondre à la détection d'une concentration de 20 μM de peroxyde d'hydrogène car il est peu probable qu'il y ait 100 % de conversion de la glycine en peroxyde d'hydrogène durant l'analyse. Lors de mesures d'activité en cuve (lysate non immobilisé) sur des temps plus longs, le pourcentage de conversion du substrat n'a jamais dépassé des pourcentages de 10 % : autrement dit, le signal mesuré pour une concentration de 20 μM devrait être équivalent au signal mesuré en présence de 200 μM , dans le meilleur des cas. Ces constatations laissent planer un doute sur les résultats ainsi obtenus. Le fait que les signaux ne soient pas visibles par simple observation visuelle conforte ce doute et ne permet pas, dans une projection analytique in situ, une analyse simplifiée à l'œil nu.

De plus, de précédentes analyses ont montré que la GlyOx-CBM immobilisée présentait un pH optimal de 7,0, contre 8,5 pour la GlyphOx-CBM. L'activité spécifique de la GlyphOx-CBM étant plus de 10 fois plus faible que celle de la GlyOx-CBM, et malgré son enrichissement sur le papier, il est difficile d'espérer une amélioration de la sensibilité avec ce système.

Il apparaît également que l'utilisation d'une trop grande quantité d'enzymes lors de l'immobilisation conduit à imperméabiliser le papier ce qui nuit à la pénétration de l'échantillon et donc à la mesure. D'autre part, les échantillons de faible volume (5 μL) sont extrêmement sensibles à l'évaporation ce qui réduit de facto le temps de réaction.

Initialement, la SviDyP avait été sélectionnée pour son activité à pH alcalin, les auteurs (Yu et al., 2014) décrivant une activité résiduelle de 50 % par rapport au pH optimal plus acide. Néanmoins, seule 10 % de l'activité mesurable à la température optimale est mesurée à 30°C par ces auteurs. Par conséquent, les 5 % d'activité résiduelle théorique (10 % de 50 %) ne sont pas suffisants dans notre cas pour observer une activité Glycine oxydase. Dans la partie suivante, une autre peroxydase sera utilisée pour surmonter ces limitations.

4ème partie - Détection du peroxyde d'hydrogène sur support papier

Une autre remarque concernant l'immobilisation sur disque de papier concerne le protocole. L'immobilisation se fait par dépôts de solutions de lysat bactériens suivis de rinçages par un tampon de concentration 50 mM. Lors du dernier rinçage et avant séchage, la concentration de tampon est donc élevée et augmente lors du séchage, pouvant conduire à des cristaux et à porter atteinte à l'intégrité des enzymes immobilisées. Cet aspect du protocole n'a pas été étudié avec les systèmes proposés dans cette partie mais par la suite, des tampons de concentrations plus faibles seront utilisés pour éviter de tels phénomènes.

**5^{ème} partie - Coton-tige enzymatique
pour la détection du glyphosate**

Comme évoqué dans la première partie, la 6E10 est une version mutante (H125Y/A142V/E188K) de la PpDyP caractérisée par une modification du pH optimal de 4,3 (pour la souche sauvage) à 8,5 (pour la souche mutante)(Brissos et al., 2017). La stratégie que nous souhaitons employer s'appuie sur l'expression de cette peroxydase sous forme de protéine de fusion afin de permettre la co-immobilisation de la peroxydase (exprimée sous forme de protéine de fusion avec un CBM) et de la GlyphOx-CBM sur un support à base de cellulose. L'idée est d'associer localement les deux enzymes afin de catalyser dans un premier temps l'oxydation du glyphosate et la production du peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant ensuite détecté grâce à la peroxydase par colorimétrie ou par chimiluminescence.

Remarque : Dans cette partie, seules la GlyphOx-CBM et la 6E10-CBM seront utilisées. Les schémas porteront la mention « GlyphOx » et « 6E10 » car c'est l'activité qui est représentée et non l'immobilisation. Par ailleurs, une formulation à base de glyphosate (Roundup®) sera utilisée comme source de glyphosate. A des fins de simplification, seul « glyphosate » sera écrit.

1. Immobilisation sur coton-tige

De manière similaire à la SviDyp-CBM qui peut être immobilisée sur le papier, la 6E10-CBM (obtenue de la même manière que la GlyOx-CBM (cf. 3.1.2 du M&M) (activité spécifique : $100-250 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) peut être immobilisée sur un matériau cellulosique directement à partir du lysat bactérien clarifié sans étape de purification supplémentaire (cf. 5.1 du M&M).

Le coton est un matériau composé de cellulose obtenue sans étape de blanchiment par rapport aux matériaux à base de papier (Furszyfer Del Rio et al., 2022; Hubbe, 2021; Krifa, 2013). La fabrication du papier nécessite plusieurs étapes d'oxydation qui introduisent des groupes carboxylates sur la cellulose, ce qui lui confère des propriétés d'échange cationique qui ne sont pas (ou moins) présentes dans le coton (Takaichi et al., 2014). De plus, les cotons-tiges sont de faible coût (0,55 € / 400 cotons-tiges), renouvelables, incinérables et faciles à manipuler.

Présenté sous forme de cotons-tiges, le coton est utilisé à des fins d'analyse, principalement au niveau de la phase de prélèvement (tests Covid) de par ses propriétés d'absorption de liquide. Certains exemples de coton servant de support d'immobilisation

d'éléments biologiques (anticorps ou enzymes) sont néanmoins décrits dans la littérature (Albayrak and Yang, 2002; Bagherbaigi et al., 2014).

Pour immobiliser les deux enzymes sur les cotons-tiges, ces derniers sont immergés dans des lysats cellulaires de GlyphOx-CBM ou de 6E10-CBM ou dans un mélange des deux lysats. Une incubation à température ambiante permet de laisser le temps au liquide d'imbiber le coton et aux protéines d'interagir avec les fibres de cellulose. Le coton-tige est ensuite rincé avec du tampon afin d'éliminer les protéines liées de manière non spécifique.

1.1. Confirmation de l'immobilisation

Dans un premier temps, l'immobilisation des deux enzymes est vérifiée par gel de SDS-PAGE. Pour ce faire, les cotons-tiges sont incubés, après immobilisation de l'une des deux enzymes ou des deux, dans du tampon Leamlli pour dénaturer les protéines présentes sur le coton-tige et les analyser par SDS-PAGE (Figure 106).

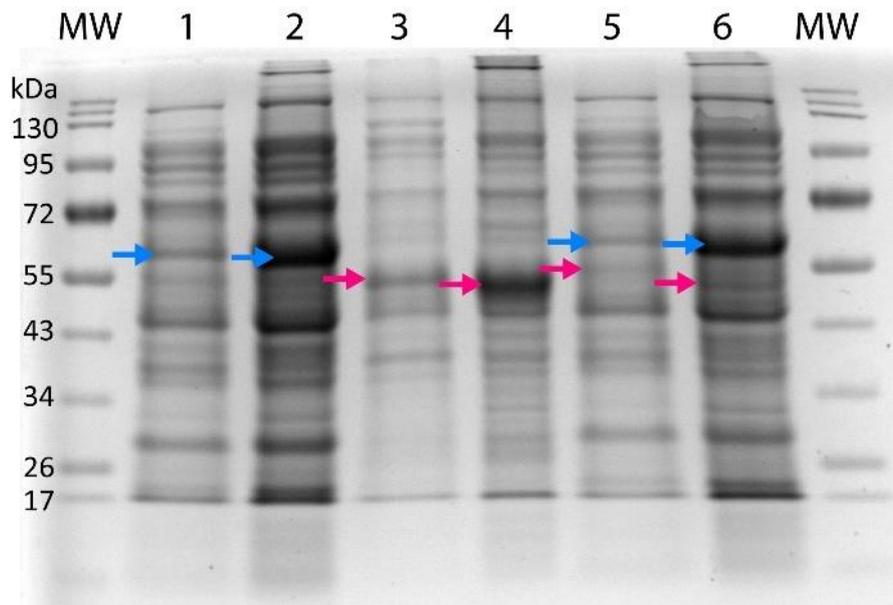


Figure 106 – Immobilisation de la GlyphOx-CBM et 6E10-CBM à la surface des têtes de coton des cotons-tiges. MW : marqueur moléculaire. La GlyphOx-CBM est mise en valeur en bleu et la 6E10-CBM est mise en évidence en rose. Les lysats cellulaires contenant la GlyphOx-CBM (piste 1) et 6E10-CBM (piste 3) ont été utilisés pour immobiliser les deux protéines sur des cotons-tiges (pistes 2 et 4 respectivement). La co-immobilisation des deux protéines (piste 6) a été réalisée à partir d'un mélange GlyphOx-CBM / 6E10-CBM dans un rapport 9:1 (piste 5). Les cotons-tiges ont été trempés dans les lysats puis rincés avec du tampon véronal : les protéines immobilisées sont ensuite retirées en incubant les cotons-tiges dans du bleu de charge.

La GlyphOx-CBM est clairement observée sur les cotons-tiges, comme le montre la présence de la bande à 60 kDa, ainsi que plusieurs autres protéines. Malgré le lavage, la GlyphOx-CBM n'est pas la seule protéine retenue sur le coton-tige. Ceci est certainement dû

au faible niveau d'expression de l'enzyme. Néanmoins, elle est clairement enrichie comme observé par l'augmentation de l'intensité de la bande (piste 1 vs piste 2 dans la Figure 106). A titre de comparaison, la glycine oxydase de type sauvage également fusionnée avec CBM3a présente un niveau d'expression plus élevé (piste 2 de la Figure 107). Lorsqu'elles sont immobilisées sur un coton-tige selon la même procédure, seules deux bandes de protéines sont observées sur la SDS-PAGE, ce qui prouve que les protéines fusionnées avec CBM3a peuvent être fortement enrichies sur les cotons-tiges (pistes 5 et 6 de la Figure 107).

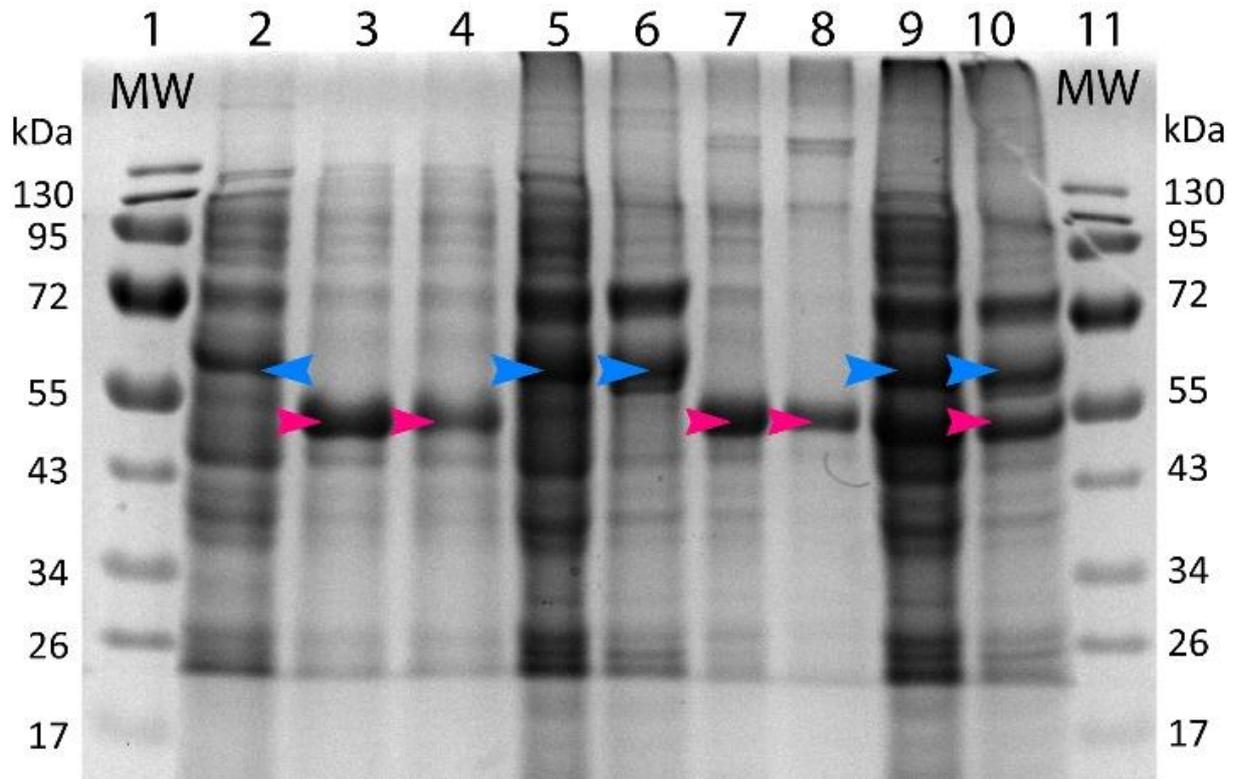


Figure 107 – Immobilisation de la GlyOx-CBM et de la 6E10-CBM à la surface des têtes de coton-tige. Les deux protéines sont immobilisées à partir d'un lysat bactérien contenant de la GlyOx-CBM (piste 2), la 6E10-CBM (pistes 3 et 4) et d'un mélange 50:50 des deux lysats (piste 9). Les protéines retenues par les cotons-tiges à partir du lysat GlyOx-CBM (pistes 5 et 6), lysat 6E10-CBM (piste 7 et 8) et mélange de lysats (pistes 9 et 10) sont analysées par SDS-PAGE. L'impact d'un lavage avec du tampon véronal 50 mM pH 8,5 après incubation du coton-tige dans le lysat a été analysé (piste 4, 8 et 10). MW : marqueur moléculaire (piste 1).

Des observations similaires peuvent être faites pour les têtes de coton trempées dans les lysats de 6E10-CBM (piste 3 vs piste 4 de la Figure 106).

La co-immobilisation des deux enzymes est vérifiée et, comme prévu, les deux protéines sont récupérées sur le coton (voie 6 de la Figure 106). Ici, la 6E10-CBM est présente mais seulement légèrement marquée car elle ne représente que 10% du mélange de lysats utilisé pour la co-immobilisation (proportion utilisée pour le système analytique). En utilisant la

glycine oxydase de type sauvage et un autre lysat 6E10-CBM dans un rapport 50/50, les deux protéines sont clairement co-immobilisées (piste 10 de la Figure 107).

1.2. Impact de la multiplication des cycles d'incubation / lavage

Plusieurs cycles d'incubation / lavage peuvent être réalisés afin, théoriquement, d'augmenter la charge du coton-tige avec la molécule d'intérêt. Pour ce faire, jusqu'à trois cycles d'immobilisation sont réalisés en changeant le lysat entre chaque cycle. Le nombre de cycles d'immobilisation semble avoir un effet positif mais l'utilisation de concentrations trop faibles de substrat ne permet pas de tirer de conclusion franche. De plus, cette optimisation ayant été réalisée pendant les tâtonnements pour arriver au coton-tige fonctionnalisé, il faudrait réaliser cette expérience de nouveau, avec en particulier le protocole final de lyophilisation.

Dans un objectif d'économie de matériel biologique (lysat de GlyphOx-CBM et de 6E10-CBM, le nombre d'incubations dans le lysat a été fixé à 2 (soient 400 µL de lysat par tête de coton-tige).

1.3. Stabilisation de l'échantillon

La GlyphOx-CBM n'est pas stable à 4°C ou - 80°C sous forme de lysat bactérien. Afin de conserver l'activité enzymatique sur les cotons-tiges fonctionnalisés, la lyophilisation des échantillons a été choisie afin de les conserver sous forme sèche. Le lactose et le sorbitol sont utilisés comme additif cryoprotecteur.

Pour ce faire, du lactose ou du sorbitol sont dissous avec le lysat contenant la GlyphOx-CBM par agitation à température ambiante. Le lysat contenant la 6E10 est ajouté par la suite (dans un rapport 1:10 v/v). Les enzymes sont immobilisées comme décrit précédemment et les cotons-tiges sont rincés avec du tampon à basse concentration (véronal 5 mM pH 8,5 supplémenté avec le cryoprotecteur) afin de diminuer la concentration en tampon sur le coton-tige et ainsi éviter des concentrations de sel très fortes au contact de l'enzyme lors du retrait de l'eau. Les cotons-tiges sont plongés dans l'azote liquide jusqu'à l'arrêt de l'ébullition et placés ensuite rapidement à - 80°C jusqu'à la lyophilisation sur la nuit après laquelle, ils peuvent être conservés à - 80°C dans un sachet hermétique sous atmosphère sèche.

2. Détection par colorimétrie

Dans la lignée des travaux précédemment présentés, nous avons choisi d'utiliser le couple 4-AAP/HDCBS comme substrat de la 6E10-CBM et donc comme système rapporteur de la production de peroxyde d'hydrogène (Figure 76).

2.1. Détection du glyphosate

Comme mentionné dans la partie bibliographique, le glyphosate n'est pas utilisé seul lors de sa dispersion en agriculture : il est utilisé en tant que formulation commerciale avec des adjuvants permettant d'augmenter son pouvoir herbicide, en particulier en facilitant son internalisation dans la plante. La composition en adjuvant n'étant pas disponible, il n'est pas possible d'étudier les éventuelles interférences de ces composés sur l'activité de la GlyphOx-CBM ou de la peroxydase. Pour s'affranchir de ces effets éventuels, les cotons-tiges enzymatiques sont testés à partir de la formulation commerciale Roundup® contenant des sels d'isopropylamine de glyphosate.

L'activité des cotons-tiges enzymatiques est testée dans un premier temps par immersion dans un tampon véronal 50 mM pH 8,5, à 30°C contenant 0-10 mM de glyphosate d'isopropylamine (par dilution de la solution commerciale Roundup®) et les co-substrats de la peroxydase (4-AAP, HDCBS) (Figure 108). Immédiatement après la mise en contact du coton-tige et du milieu réactionnel, une coloration rose apparaît sur le coton-tige et une diffusion du pigment rose est observée progressivement à l'intérieur du tube à essai. Après 10 minutes d'incubation à 30°C, le milieu réactionnel et les cotons-tiges ont été colorés. Ils sont alors séparés pour une analyse individuelle (Figure 108A et Figure 108B).

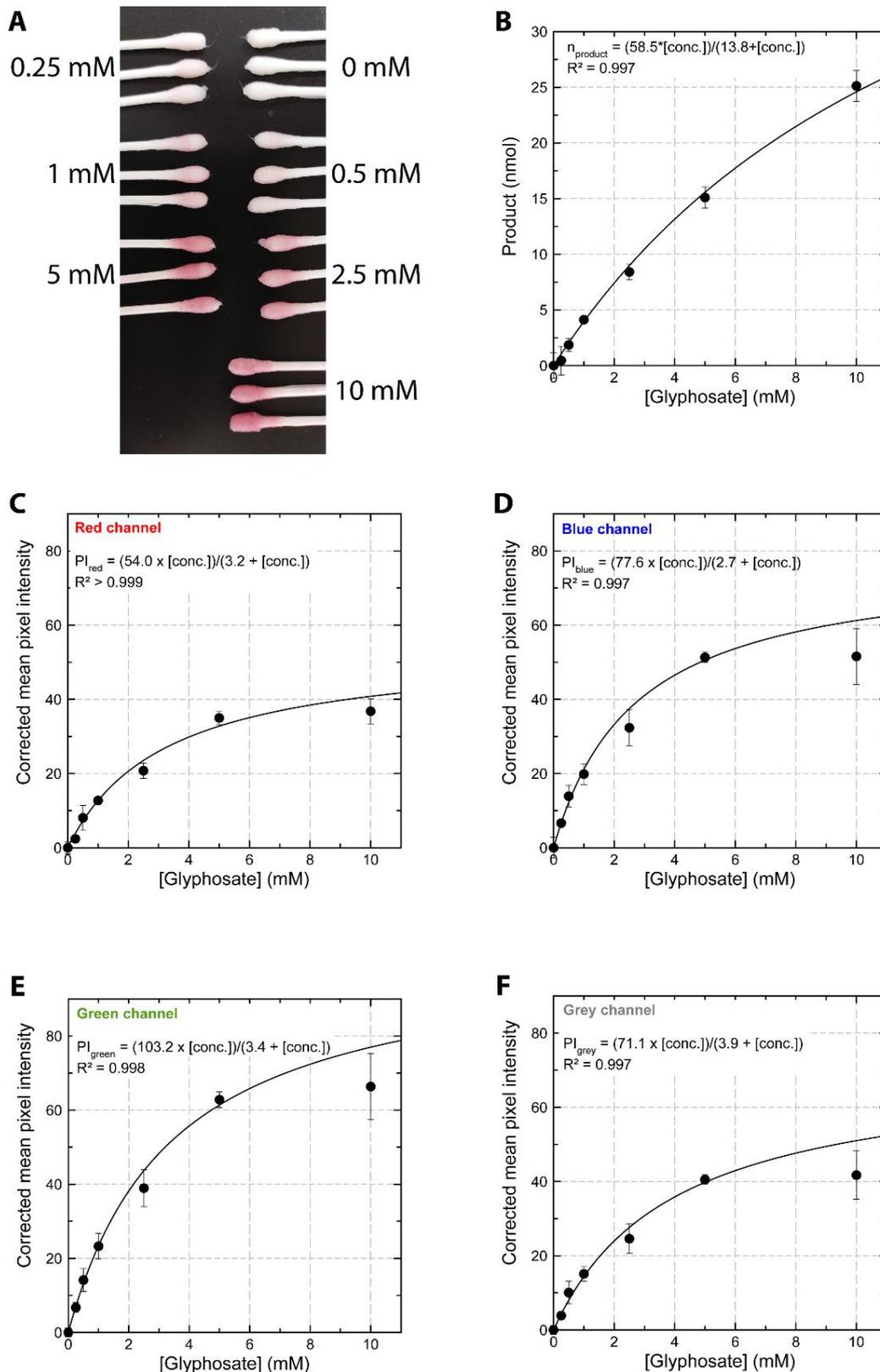


Figure 108 - Analyse colorimétrique d'une solution de glyphosate à l'aide de cotons-tiges fonctionnalisés. Photographie des cotons-tiges après 10 minutes d'incubation en présence de 0 à 10 mM de glyphosate (A). Quantification du colorant dans le milieu réactionnel déterminée par l'absorbance à 510 nm (B). L'analyse des couleurs de la photographie (A) en fonction de la concentration de glyphosate pour les canaux rouge, bleu, vert et gris est présentée en (C), (D), (E) et (F), respectivement. Les points de données sont ajustés à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten.

2.1.1. Dosage du milieu réactionnel après retrait du coton-tige

Après réaction et retrait des cotons-tiges, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 510 nm et le produit de la réaction est quantifié (Figure 108B). Un comportement hyperbolique, comme attendu pour une réaction enzymatique michaelienne, est observé, avec une partie linéaire s'étendant de 0,3 à 2,5 mM de glyphosate. Une mesure spectrophotométrique conventionnelle permet de détecter des concentrations de glyphosate aussi faibles que 250 μ M dans la solution. Pour toutes les concentrations testées, la quantité de produit récupérée dans la solution aqueuse correspond à moins de 1 % de la teneur initiale en glyphosate, ce qui suggère que des concentrations plus faibles de glyphosate pourraient probablement être détectées en utilisant des temps d'incubation plus longs. Il convient de noter que l'absorbance du milieu réactionnel reste stable après 15 minutes, ce qui suggère qu'il n'y a pas eu de désorption de l'enzyme.

2.1.2. Traitement d'image des cotons-tiges

L'utilisation la plus simple de ce dispositif consiste à tremper l'un de ces cotons-tiges dans une solution aqueuse tamponnée contenant du glyphosate et à inspecter visuellement la couleur de ce coton-tige, ce qui constitue un test OUI/NON qui ne nécessite pas de spectrophotomètre. Pour des mesures plus précises sur site, certains dispositifs portables sont proposés dans la littérature ou sont disponibles dans le commerce (Hach, 2023; Tekaya et al., 2013).

Le pigment produit par le couplage GlyphOx/6E10 se situe également au niveau de la tête en coton du coton-tige, permettant une inspection visuelle à partir de 500 μ M (voire 250 μ M) de glyphosate (Figure 108A). Pour obtenir des données plus quantitatives, une image des cotons-tiges en fin de réaction est acquise à l'aide d'un appareil photo de smartphone sous la lumière ambiante. L'image a été divisée en trois canaux de couleur ainsi qu'en niveaux de gris, comme décrit précédemment (cf M&M 7.5). L'intensité mesurée pour le coton-tige est définie comme l'intensité moyenne de pixel dans la zone de capture. Cette intensité de pixel est ensuite corrigée par soustraction de l'intensité mesurée pour le coton-tige enzymatique en absence de glyphosate. C'est cette intensité de pixel corrigée qui est ensuite reportée en fonction de la concentration de glyphosate (Figure 108 C-F).

Indépendamment du canal de couleur, les tracés sont hyperboliques, ce qui correspond à un comportement de type Michaelis-Menten. Cependant, contrairement aux mesures effectuées dans le milieu réactionnel (Figure 108B), une saturation de la couleur est observée au-dessus de 5 mM (Figure 108 C-F), ce qui suggère que le coton est saturé par le colorant. Il est intéressant de noter que toutes les courbes présentent la même valeur apparente de K_M (de 2,7 à 3,4 mM) mais des intensités maximales de pixels (PI_{max}) différentes, en fonction du canal. De toute évidence, le PI_{max} dans le canal vert est le plus élevé (intensité moyenne des pixels de 103 selon l'équation ajustée), alors qu'il n'est que de 54, 77 et 71 pour les canaux rouge, bleu et gris, respectivement. Le canal vert fournit la sensibilité la plus élevée pour l'essai ($PI_{max}/K_M = 30 \text{ mM}^{-1}$) avec une plage linéaire allant de 0,25 à 2,5 mM. La LOD est calculée selon l'Équation 7 comme étant de 120 μM .

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \sigma}{\text{Sensibilité}} \quad \text{Équation 7}$$

Avec σ , l'écart-type du blanc (0 mM de glyphosate) et sensibilité, la pente de la partie linéaire de la courbe de calibration

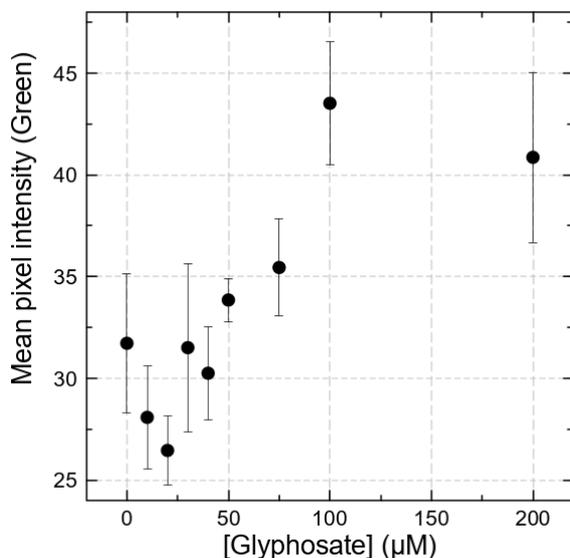


Figure 109 - Intensité moyenne des pixels du canal vert lorsque l'essai colorimétrique est effectué en utilisant une gamme de concentrations micromolaires de glyphosate (RoundUp®). L'image est acquise à l'aide de l'appareil photo d'un téléphone portable et analysée comme décrit dans la partie matériel et méthodes (cf. 7.5 du M&M), à l'exception de l'arrière-plan qui n'est pas soustrait.

La même expérience a été menée avec des concentrations de glyphosate plus faibles, de l'ordre du μM (10 à 200 μM), afin d'essayer de détecter de plus faibles concentrations. Si l'inspection visuelle permet d'identifier sans aucun doute la présence de 40 μM de glyphosate, le signal colorimétrique mesuré après 10 minutes d'incubation à 30°C ne peut être extrait du bruit de fond qu'au-dessus de 50 μM avec une variabilité significative (Figure 109).

Cette constatation met en lumière un point crucial de ce dispositif : la prise d'image. En effet, l'éclairage non contrôlé associé à l'appareil photo d'un téléphone portable est une limitation forte à la qualité des données et par conséquent à la précision de la quantification. Il est en effet possible d'identifier, par l'analyse d'un coton-tige sans glyphosate disposé dans l'ensemble de la zone d'analyse, la direction de la source lumineuse (centrale ou sur un côté).

2.1.3. Optimisation du temps d'incubation

Afin d'augmenter la sensibilité du dispositif, différents temps de réaction (10, 30 et 60 minutes) ont été testés dans l'hypothèse de l'obtention d'une coloration plus intense après un temps de réaction plus long (Figure 110)

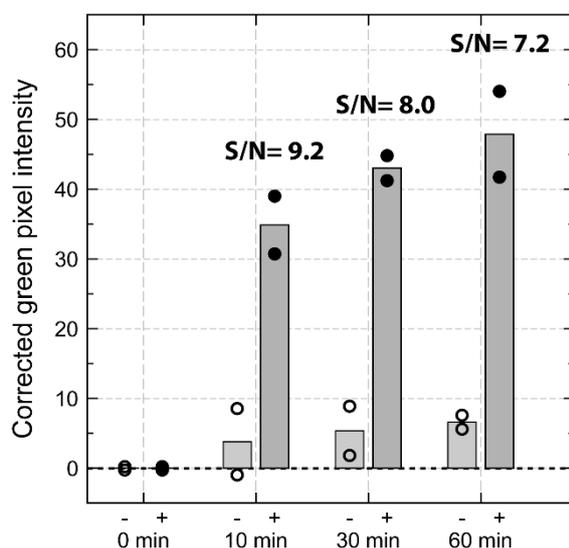


Figure 110 - Optimisation du temps de réaction pour la réaction colorimétrique. Les intensités moyennes du canal vert sont mesurées après 10, 30 et 60 minutes avec (+) ou sans (-) 250 µM de glyphosate. Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes et tous les points de données sont présentés pour montrer la variabilité de l'essai (n = 2). Les rapports signal/bruit (S/N) sont également indiqués.

On observe alors que 70% du signal mesuré au bout de 60 minutes est déjà mesurable au bout de 10 minutes, avec une augmentation du bruit de fond au fur et à mesure du temps conduisant à une diminution du rapport signal sur bruit (9,2 à 10 minutes et 7,2 au bout de 60 minutes). Dans l'optique d'un dispositif de mesure *in situ* et rapide et au regard de ces observations, la durée de 10 minutes d'incubation a été retenue pour la suite du travail.

2.2. Etude des interférences

2.2.1. Analogues structuraux

L'utilisation de la glyphosate oxydase permet la conception d'un essai biologique à signal « on », le signal étant dû à une réaction chimique spécifique de la présence de l'analyte. Cependant, de par la nature enzymatique de l'enzyme et du fait qu'elle soit obtenue à partir de la glycine oxydase, il est nécessaire d'évaluer la sélectivité du système hétérogène

développé. Pour ce faire, la glycine et la sarcosine (N-méthyl glycine) ont été choisies en tant qu'analogues structuraux du glyphosate, l'AMPA en tant que produit de réaction et la cystéine en tant qu'un autre acide aminé possédant des propriétés redox (Figure 83).

Des concentrations moyennes de glycine de l'ordre de 40 nM et de 800 nM ont été mesurées dans des échantillons réels d'eaux respectivement souterraines ou de surface dans une zone forestière de Caroline du Sud. Dans les eaux davantage polluées (eaux usées municipales de quatre villes du Texas ou d'une grande zone résidentielle de Shanghai), des concentrations de glycine comprises entre 0,2 et 22 µM ont été mesurées (Burlison et al., 1980; Huang et al., 2010).

Par ailleurs, les concentrations totales en acides aminés dissous sont de l'ordre de 0,15 µM (eaux souterraines) et de 3,6 µM (eaux de surface)(Shen et al., 2015). L'introduction de chaque molécule interférente dans l'essai à une concentration de 100 µM permet de se placer à des concentrations nettement plus élevées que les concentrations observables dans les eaux (souterraines ou de surface), 4 à 5 fois plus élevées que la concentration la plus élevée mesurée dans les échantillons d'eau pour la glycine par exemple (Figure 111A).

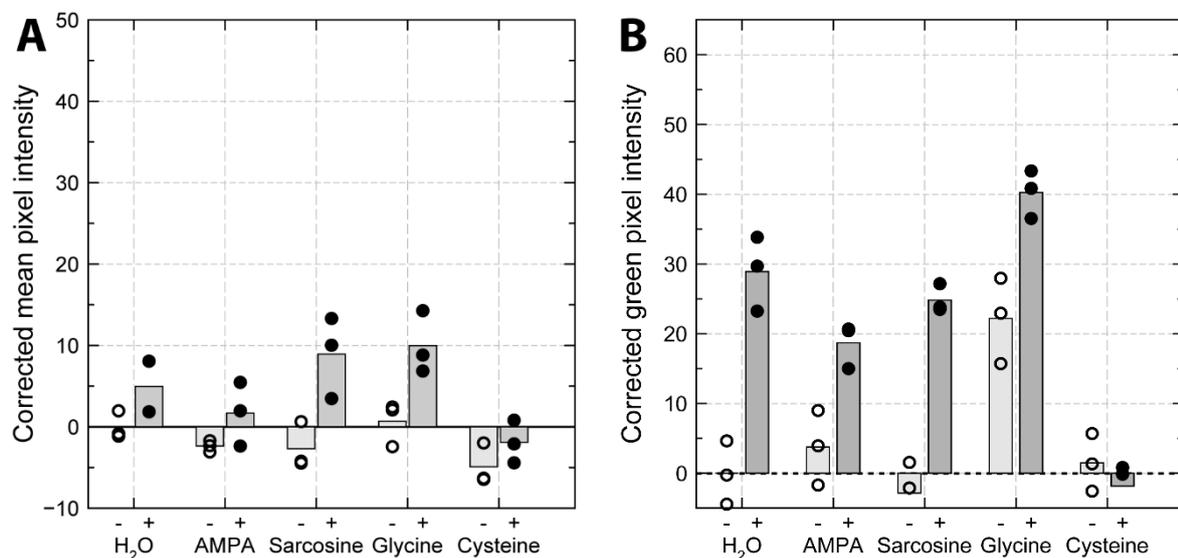


Figure 111 - Intensité moyenne corrigée des pixels (canal vert) de l'essai colorimétrique réalisé en présence d'analogues du glyphosate à 100 µM (A) ou 10 mM (B). Les histogrammes correspondent aux valeurs moyennes. Tous les points de données sont présentés pour montrer la variabilité de l'essai (n = 3). Les essais sans glyphosate (-) sont représentés par des cercles blancs et les essais avec 250 µM de glyphosate (+) sont représentés par des cercles noirs.

Pour des concentrations d'interférant de 100 μM , aucun de ces analogues du glyphosate ne modifie le signal de manière significative, à l'exception de la cystéine. En l'absence de glyphosate, aucun signal significatif n'a été observé, tandis qu'en présence de 250 μM de glyphosate, le signal a été récupéré et légèrement renforcé par la glycine et la sarcosine. Des effets synergiques sont possibles, mais il est plus probable qu'ils soient liés à l'exposition à la lumière pendant l'acquisition de l'image.

Le signal a ensuite été mesuré en présence de 10 mM d'espèces interférentes (Figure 111 B). Aucun signal significatif n'est observé en l'absence de glyphosate lorsque les espèces interférentes sont la sarcosine ou l'AMPA. Un signal est néanmoins observé en présence de 10 mM de glycine, malgré le K_M de 105 mM décrit par Pedotti *et al.*, 2009. Cela est probablement dû à l'origine moléculaire de la GlyphOx-CBM. Néanmoins, comme expliqué précédemment, cette concentration n'est pas pertinente pour les échantillons réels.

2.2.2. Le cas de la cystéine

Contrairement à la glycine, l'AMPA et la sarcosine, aucun signal n'est obtenu en présence de cystéine, que ce soit en l'absence ou en présence de glyphosate. Afin d'identifier l'origine de l'inhibition, l'activité de la 6E10-CBM (co-immobilisée avec la GlyphOx-CBM sur le coton-tige) est vérifiée en remplaçant le glyphosate par 25 μM de peroxyde d'hydrogène. Aucune activité peroxydase n'est alors détectée en présence de cystéine (Figure 112). Cela n'est pas vraiment surprenant car la cystéine a déjà été décrite comme un agent réducteur en raison de son groupe thiol et comme un inhibiteur de la peroxydase (Mitsch and White, 2020; Sariri et al., 2006; Serrano-Martínez et al., 2008). Les autres analogues n'ont eu aucun effet sur le 6E10-CBM, y compris l'AMPA.

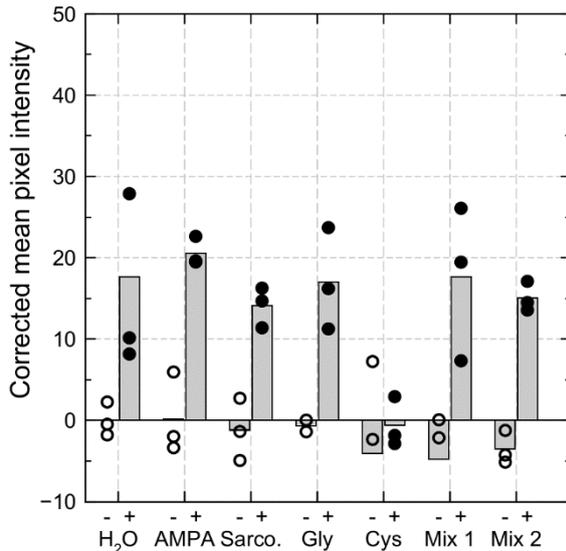


Figure 112 - Effet des espèces interférentes sur la 6E10-CBM. Les cotons-tiges sont testés de la même manière que pour la Figure 111A à l'exception du glyphosate qui est remplacé par 25 μM de peroxyde d'hydrogène. Les cercles blancs et noirs correspondent respectivement aux essais en absence ou présence de peroxyde d'hydrogène. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes de 3 mesures indépendantes.

2.2.3. Mélanges d'herbicides

Le but de ce système bio-enzymatique est la détection du glyphosate dans des matrices environnementales d'eaux de surface. Par conséquent, d'autres herbicides ou insecticides de la même famille pourraient être présents et interférer avec la mesure.

L'essai a donc été réalisé à l'aide de deux mélanges d'herbicides standard indépendants dont la composition est indiquée dans les Tableau 11 et Tableau 12 fournis dans de l'acétone (mélange 1) ou dans de l'acétonitrile (mélange 2). Faisant principalement partie des groupes HRAC 4 ou 5, ils appartiennent tous à d'autres groupes d'herbicides que le glyphosate (HRAC 9).

Les pesticides interférents ont été testés en utilisant $57 \mu\text{g.L}^{-1}$ (57 ppb) de chaque herbicide, soit plus de 100 fois la concentration maximale admissible (CMA) européenne définie à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour les mélanges de pesticides. Aucun signal notable dû à la présence des mélanges de pesticides 1 et 2 en l'absence de glyphosate n'a été mesuré. De plus, le signal a été récupéré en présence de glyphosate, ce qui confirme que ces mélanges n'ont pas eu d'effet sur le système hétérogène développé.

2.3. Matrices environnementales

Après avoir démontré que le coton-tige modifié par la co-immobilisation de la GlyphOx-CBM et de la 6E10-CBM permet la détection du glyphosate sans interférence avec des espèces analogues au glyphosate (dans les concentrations réelles retrouvées dans la littérature) hormis la cystéine (et potentiellement d'autres espèces redox), la dernière étape

de caractérisation du système consiste à mesurer la concentration de glyphosate dans de vrais échantillons dopés avec des concentrations connues de glyphosate (RoundUp®).

Des eaux de surface ont été prélevées pour étudier l'interférence éventuelle d'éléments solubles et de particules solides contenus dans les eaux naturelles. Le Rhône et la Saône ont été sélectionnés comme étant les deux cours d'eau traversant Lyon. Afin d'évaluer l'impact d'une filtration des échantillons, une partie des échantillons est filtrée afin d'éliminer les particules macroscopiques ($\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$).

Le pH étant important pour la détection, 1 mL de tampon véronal (50 mM, pH 8,5) contenant les substrats de la peroxydase (2,5 mM 4-AAP et 9 mM HDCBS) a été lyophilisé dans un microtube avant l'expérience. L'ajout de 1 mL d'échantillon d'eau de rivière dans le microtube permet de récupérer un pH de 8,5, adapté à l'essai. Les échantillons ont ensuite été dopés avec du RoundUp® pour atteindre une concentration de glyphosate de 250 μM , comme décrit précédemment et la mesure de la concentration en glyphosate est effectuée de la même façon que précédemment.

Les taux de recouvrement des signaux sont compris entre 111 et 130 % (Tableau 16), ce qui est satisfaisant au regard des écarts-types. Aucun effet significatif de la filtration n'a été observé, ce qui signifie que le test peut être réalisé sans aucune préparation sur des échantillons réels contaminés par le glyphosate, permettant une première inspection visuelle des cotons-tiges, après seulement quelques minutes, ainsi qu'une quantification à l'aide d'un simple appareil photo de smartphone et d'une analyse d'image.

Tableau 16 - Influence sur la détection du glyphosate des matrices environnementales supplémentées par 250 μM de Roundup® par colorimétrie

	Saône		Rhône	
Filtration (0,2 μm)	-	+	-	+
Colorimétrie	118 \pm 17%	120 \pm 27 %	111 \pm 20%	131 \pm 4%

2.4. Problématique

À ce stade de l'étude, un test colorimétrique pour la détection du glyphosate dans un échantillon aqueux est proposé. Il peut être utilisé comme test OUI/NON, une analyse quantitative pouvant être réalisée après acquisition (avec un téléphone) et analyse d'image des cotons-tiges. Néanmoins, la plus faible concentration mesurée avec certitude reste élevée

(> 250 μM pour les surnageants, >120 μM pour les cotons-tiges) dans la configuration actuelle. L'acquisition d'images est un problème majeur et nécessiterait de pouvoir maîtriser l'éclairage ambiant lors de l'acquisition de l'image. L'utilisation d'un dispositif portable avec contrôle de la lumière comme une boîte noire avec un éclairage contrôlé pour l'acquisition d'images pourrait pallier ce problème (Zhao et al., 2023). Des solutions portables pour le dosage du surnageant peuvent également être utilisées (Hach, 2023; Tekaya et al., 2013).

3. Chimiluminescence

La chimiluminescence (CL) du luminol est une méthode de détection alternative dont la plus grande sensibilité (LOD plus faible) par rapport à des techniques colorimétriques est communément admise. La réaction de chimiluminescence, catalysée par une peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène, se déroule généralement à un pH alcalin compatible avec l'activité de la GlyphOx-CBM (Tsafack et al., 2000).

De plus, plusieurs dispositifs portables pour la détection de la luminescence sur site sont proposés dans la littérature (Agranat et al., 2021; Belkin and Cheng, 2023; Calabretta et al., 2021; Matsuura et al., 2019; Roda et al., 2011).

En ce qui concerne la configuration expérimentale, le 4-AAP et le HDCBS ont simplement été remplacés par du luminol (150 μM). Afin de concentrer le signal de luminescence sur la tête des cotons-tiges et d'éviter la diffusion du luminol ou du peroxyde d'hydrogène, 125 μL de milieu réactionnel sont directement déposés sur la tête des cotons-tiges au lieu de tremper ces derniers dans 1 mL de tampon réactionnel. Les cotons-tiges sont alors immédiatement placés sous la caméra CCD et l'émission de lumière est mesurée en chambre noire pendant 10 minutes. Tous les cotons-tiges d'une même expérience sont mesurés simultanément afin de pouvoir utiliser les mêmes références de signaux. Le bruit de fond (noir) étant proche d'un signal nul, les zones de capture pour la quantification du signal sont cette fois rectangulaires, pour tenir compte de l'ensemble de la tête du coton-tige. Les signaux sont ainsi exprimés sous la forme d'une somme d'intensités de luminescence et non d'une intensité moyenne comme pour la colorimétrie.

Le fait de déposer le milieu réactionnel sur la tête du coton-tige au lieu d'incuber le coton-tige implique que la réaction se déroule à température ambiante, sans contrôle de la température (environ 22°C au lieu de 30°C pour l'étude colorimétrique présentée ci-dessus). L'activité de la GlyphOx-CBM à cette température est estimée comme étant 3,5 fois plus faible qu'à 30°C (cf. 1.3.2). Par conséquent, dans cette configuration, le signal CL obtenu n'est pas optimisé.

3.1. Détection du glyphosate

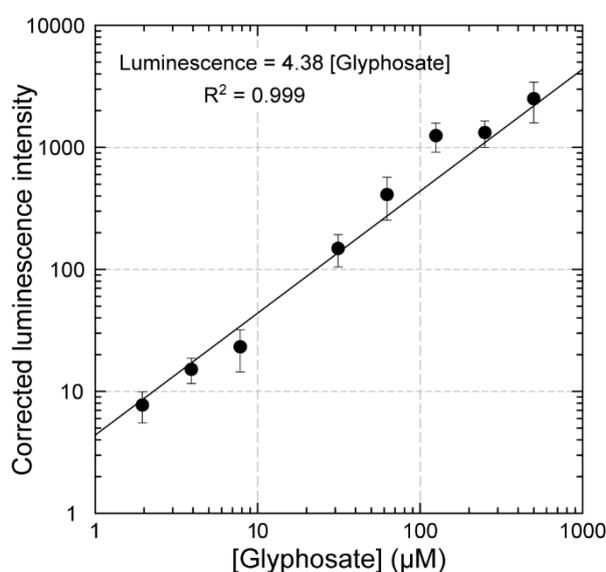


Figure 113 - Luminescence générée sur les têtes de cotons-tiges mesurée en présence de 2 à 500 µM de glyphosate (n=3) à partir d'une seule expérience. La luminescence est corrigée par le signal obtenu en absence de glyphosate.

L'utilisation de la chimiluminescence du luminol catalysée par la 6E10-CBM permet d'obtenir une LOD de 0,45 µM (103 µg.L⁻¹), la plus faible concentration expérimentalement mesurée étant de 2 µM (338 µg.L⁻¹). Il est intéressant de noter que le glyphosate peut être mesuré et quantifié sur une gamme linéaire dynamique de trois décades (2 à 500 µM) avec une sensibilité de 4,38 µM⁻¹ après seulement 10 minutes de réaction et sans intervention supplémentaire de l'utilisateur (Figure 113).

Le test par chimiluminescence présente une concentration mesurée 125 fois inférieure à celle de la colorimétrie avec une gamme dynamique plus large (trois décades au lieu d'une seule). Dans la littérature, il n'existe a priori que deux systèmes de détection à signal « on » impliquant l'oxydation du glyphosate (Johnson et al., 2022; Qin et al., 2020).

Qin *et al.* (2020) ont décrit un essai biologique basé sur la chimiluminescence du luminol catalysée par des spores impliquant une glyphosate oxydase avec une LOD similaire (0,5 µM). Cependant, les auteurs décrivent un système décomposé en deux étapes, impliquant

l'intervention de l'utilisateur. En effet, une première étape d'incubation d'une heure est effectuée mettant en présence glyphosate et glyphosate oxydase. A la fin de cette incubation, les réactifs de chimiluminescence sont ajoutés et l'émission de lumière mesurée (Qin et al., 2020). Ce travail de thèse, par rapport au système décrit par Qin et al., permet une détection du glyphosate avec une sensibilité similaire mais avec un temps largement plus court.

Johnson *et al.* (2022) ont rapporté un système de détection du glyphosate plus rapide basé sur une électrode de graphène décorée au platine et modifiée par la glycine oxydase de *Bacillus subtilis* réticulée par le glutaraldéhyde. Cette enzyme manque de spécificité en ce qui concerne la glycine, le glyphosate et l'AMPA (Pedotti et al., 2009b). Les essais, réalisés dans une chambre de 10 mL, montrent respectivement une gamme linéaire de 10-260 μM et une LOD de 3 μM contre 2-500 μM et 0,45 μM avec notre système.

Ici, montrant de meilleures performances, la stratégie du coton-tige enzymatique est plus facile à réaliser, en une seule étape, évitant le recours à des produits chimiques dangereux ou à des métaux précieux.

3.2. Interférences

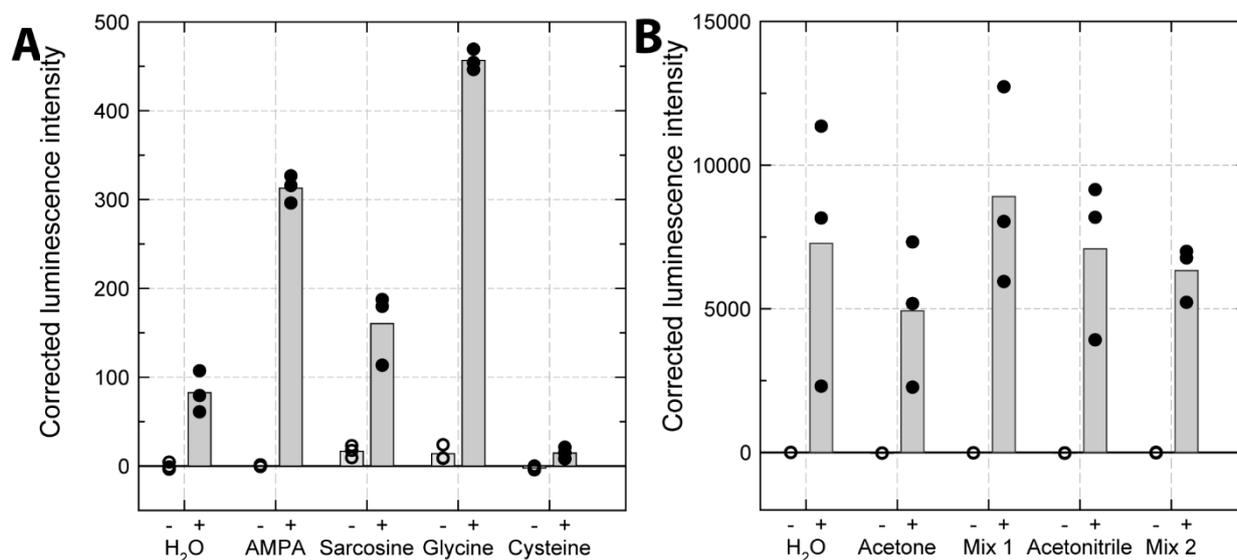


Figure 114 - Effet des analogues du glyphosate (A) et des mélanges d'herbicides 1 & 2 (B) sur le signal de chimiluminescence des cotons-tiges fonctionnalisés. Les essais sans glyphosate (-) sont représentés par des cercles blancs et les essais avec 250 μM de glyphosate (+) sont représentés par des cercles noirs. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes.

Comme pour les analyses par colorimétrie (cf. 2.2.1 et 2.2.3), les cotons-tiges enzymatiques sont exposés, en absence ou présence de 250 μM glyphosate (Roundup®), aux potentielles espèces interférentes (*i.e.* glycine (100 μM), sarcosine (100 μM), AMPA (100 μM), cystéine

(100µM) et mélanges d'herbicides 1 et 2 (10 µg.L⁻¹ de chaque espèce) pendant la réaction de chimiluminescence (Figure 114 A et B).

De manière similaire à l'essai colorimétrique, aucun signal de CL n'a été détecté en l'absence de glyphosate : aucune de ces espèces n'est un substrat de la GlyphOx-CBM ou de la 6E10-CBM, à des concentrations pouvant être retrouvées dans l'environnement pour les analogues et aux limites de contamination pour les mélanges d'herbicides. Le signal de chimiluminescence a été récupéré en présence de glyphosate (250 µM), sauf pour la cystéine, précédemment démontrée comme étant un inhibiteur de la 6E10-CBM. Aucun des autres herbicides des mélanges 1 et 2 n'a affecté l'essai, ce qui confirme sa grande sélectivité pour le glyphosate, malgré une plus grande dispersion du signal CL. Dans ce dernier cas en revanche, on note une forte dispersion des points expérimentaux qui sera discutée ci-après (3.4)

Dans un essai plus avancé (sur site), la caméra CCD pourrait être remplacée par des dispositifs plus compacts, plus faciles à manipuler (Agranat et al., 2021; Belkin and Cheng, 2023; Calabretta et al., 2021; Matsuura et al., 2019; Roda et al., 2011).

3.3. Matrices environnementales

Pour confronter notre dispositif à des matrices environnementales, des échantillons d'eau réels provenant du Rhône et de la Saône, filtrés ou non, enrichis par 250 µM de glyphosate (RoundUp®) ont été analysés avec le dispositif par chimiluminescence.

Les taux de recouvrement des signaux étaient plus faibles que prévu, probablement en raison de la présence d'espèces ou de particules absorbant la lumière (Tableau 17, deuxième ligne). L'eau de la Saône contenant des particules visibles à l'œil nu, une augmentation d'environ 20 % du taux de recouvrement est observée en filtrant l'échantillon. En revanche, l'eau du Rhône n'apparaît pas aussi trouble et la filtration n'augmente pas significativement le pourcentage de recouvrement.

Tableau 17 - Comparaison de la récupération des signaux du glyphosate ajouté à des échantillons d'eau de rivière (Saône et Rhône, filtrés ou non).

Filtration (0.2 µm)	Saône		Rhône	
	-	+	-	+
Colorimétrie	118 ± 17%	120 ± 27 %	111 ± 20%	131 ± 4%
Chimiluminescence	65 ± 18%	88 ± 21 %	64 ± 21%	71 ± 22%

3.4. Limitations

Comme évoqué précédemment, les expériences de chimiluminescence peuvent s'accompagner d'une forte variabilité des signaux expérimentaux. Pour cette technique, nous avons choisi de mesurer la totalité de la luminescence émise par le coton-tige afin de maximiser la sensibilité, le bruit de fond étant proche d'un signal nul (contrairement à la colorimétrie). Le coton étant opaque, la lumière mesurée résulte de la réaction entre le luminol et le peroxyde d'hydrogène produit à la surface du coton-tige : la somme des signaux est donc dépendante de la surface globale du coton-tige.

Si les cotons-tiges commerciaux ont une surface a priori relativement uniforme, les processus d'incubation dans des lysats bactériens, rinçage pour congélation rapide dans l'azote liquide peuvent avoir des effets sur la taille du coton-tige : un relâchement de la maille du coton a pu être observé pour certains cotons-tiges, d'où une taille plus importante et donc un signal lumineux recouvrant une zone plus importante. La mesure du signal lumineux sous forme de moyenne ne donne néanmoins pas de meilleurs résultats, et une baisse de sensibilité peut être observée. L'utilisation de coton-tige de meilleure qualité peut être une solution, afin de garantir une surface constante lors de la mesure.

4. Conclusion

Ce travail, publié dans *Biosensors et Bioelectronics* (Delprat et al., 2023), décrit un nouveau biocapteur hétérogène enzymatique pour la détection du glyphosate caractérisé par une réponse positive (*signal « on »*), contrairement à la plupart des biocapteurs (homogènes comme hétérogènes) et essais biologiques publiés, qui sont principalement basés sur l'inhibition (*signal « off »*).

Grâce à la fusion du CBM avec la glyphosate oxydase et avec la peroxydase 6E10, le dispositif a pu être facilement assemblé en une seule étape, directement à partir du lysat

cellulaire sur des cotons-tiges (cellulose), ce qui réduit considérablement les coûts de fabrication. L'amélioration de l'expression de l'enzyme est une piste à envisager afin d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme et de favoriser son immobilisation par rapport à d'autres interactions non spécifiques entre le coton et d'autres protéines. Plusieurs pistes peuvent être envisagées, comme optimiser le protocole d'expression ou se servir de la GlyphOx-CBM comme base pour l'obtention d'une nouvelle enzyme par évolution dirigée, caractérisée par une meilleure expression.

Le dispositif proposé dans ce travail permet la détection du glyphosate par deux méthodes :

- Par dilution des substrats colorimétriques de la peroxydase dans des échantillons d'eau contenant du glyphosate, une coloration rose de la solution et du coton-tige apparaît. Ce test OUI/NON pourrait être quantitatif en mesurant l'absorbance de la solution ou en photographiant le coton-tige et en effectuant une analyse d'image. Cette approche pourrait être appliquée *in situ*, une fois que la procédure d'analyse d'image sera transférée à une application pour smartphone, éventuellement avec un dispositif de boîte noire. La sensibilité de ce test est encore faible ($> 40 \mu\text{M}$), mais elle est suffisante pour identifier les eaux de surface fortement contaminées.
- Par ajout d'un petit volume ($150 \mu\text{L}$) d'un échantillon d'eau contaminée préalablement tamponné et complété par du luminol, une réaction de chimiluminescence est initiée. La détection de l'intensité lumineuse permet de détecter des concentrations de $2 \mu\text{M}$ avec une plage dynamique linéaire de près de trois décades. Pour augmenter la portabilité, ce biocapteur pourrait être associé à un dispositif de chimiluminescence portable. Le couplage de ce dispositif portable avec un moyen de permettrait de réaliser la réaction enzymatique à 30°C et ainsi améliorer facilement de la sensibilité. L'ajout du luminol dans les produits lyophilisés (*id est* avec le tampon véronal 50 mM $\text{pH } 8,5$) permettrait aussi de limiter la manipulation.

La faible expression de la GlyphOx-CBM dans la fraction soluble constitue une première limitation pour le développement du biocapteur. L'ingénierie moléculaire de l'enzyme devrait être réalisée pour retrouver des niveaux d'expression et une stabilité similaire à ceux du GlyphOx-CBM de type sauvage, ce qui faciliterait les étapes d'immobilisation et permettrait la production en masse de cotons-tiges. La deuxième limitation est l'absence de moyen permettant l'acquisition et le traitement des données automatiquement sur le terrain, au

travers par exemple de logiciels ou d'applications de téléphones mobiles. Néanmoins, quelques pistes pour pallier cette limitation peuvent être trouvées dans la littérature (Colorimeter, affimetrix).

Le changement du support d'immobilisation enzymatique pourrait également être envisagé, en s'appuyant sur des disques de papier délimités par de la cire. Ce système a l'avantage d'uniformiser les zones de dépôt et donc la zone d'analyse, notamment pour la chimiluminescence. Le format papier est également particulièrement adapté au chauffage et à la numérisation, permettant une illumination uniforme de la zone d'acquisition. Néanmoins, il est possible que ces avantages soient contrebalancés par la diminution du volume d'échantillon d'une part et par la rapidité d'évaporation d'autre part, surtout lors du chauffage de la plaque de papier.

Cela étant dit, il est intéressant de noter que les interférences sont quasi-inexistantes pour les deux essais, à l'exception de la cystéine (et probablement d'autres composés thiols) qui inhibe complètement l'activité peroxydase et de la présence de particules dans l'eau de la rivière qui réduit le signal de chimiluminescence de 20%.

Enfin, ce travail constitue la mise au point et la validation d'un dispositif conforme aux directives ASSURED permettant de détecter du glyphosate dans les eaux de surface. La poursuite du projet consiste à améliorer la sensibilité du test colorimétrique et à intégrer le test CL dans un dispositif miniaturisé portable et peu coûteux, tous deux destinés à la détection rapide du glyphosate sur site.

Conclusions et perspectives

L'utilisation de pesticides, en particulier d'herbicides, est devenu un incontournable de l'agriculture moderne. Même si ces substances sont choisies pour être spécifiques des organismes qu'elles ciblent, elles peuvent avoir des effets pathologiques sur l'environnement, sur la biodiversité et sur l'Homme.

Le glyphosate en particulier est l'herbicide le plus utilisé au monde et se trouve actuellement au cœur d'un débat sociétal et politique dans le cadre de l'éventuel prolongement de son utilisation en décembre 2023 en Europe.

La conception de méthodes analytiques pour la détection du glyphosate est un enjeu fort afin d'en suivre les concentrations dans les champs, eaux de surface et souterraines ainsi que dans les produits alimentaires afin de suivre les contaminations et prévenir les risques pour les utilisateurs et consommateurs.

Les biocapteurs, contrairement aux méthodes analytiques classiques, permettent une détection simple, peu coûteuse, sans modification de l'échantillon et *in situ*. Classés comme outils analytiques, leur faible coût en fait un moyen d'alerte de choix.

Ce travail de thèse propose un biocapteur, ou essai biologique hétérogène, permettant la détection du glyphosate dans les eaux. Outre ce biocapteur, nous proposons une méthode de conception de biocapteur novatrice et des outils permettant de simplifier la conception de biocapteur.

En mettant à profit les travaux de Pedotti et al. (2009), nous avons pu exprimer à partir de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis* par triple mutation et ingénierie moléculaire une glyphosate oxydase exprimée sous forme de protéine de fusion avec un module de liaison aux glucides (CBM), permettant son immobilisation et le maintien de son activité sur du papier ou du coton. Cette enzyme catalyse, à pH basique, l'oxydation du glyphosate en AMPA et glyoxylate en produisant par ailleurs du peroxyde d'hydrogène. L'utilisation d'un CBM permet d'immobiliser une protéine exprimée sous forme de protéine de fusion sur un support cellulosique, que ce soit du coton ou du papier. Nous avons appliqué avec succès cette stratégie sur la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*, démontrant son immobilisation et le maintien de son activité enzymatique après immobilisation.

L'expression de cette protéine de fusion est toutefois laborieuse, caractérisée par de faibles activités spécifiques et une faible solubilité. Un travail d'optimisation de l'expression pouvant

passer par de l'évolution dirigée permettrait de résoudre certains problèmes et faciliter l'assemblage du biocapteur.

Une grande partie de la thèse s'est portée sur la détection du peroxyde d'hydrogène. Dans un premier temps, nous avons montré qu'il était possible, en conditions acides, de détecter du peroxyde d'hydrogène grâce à des électrodes sérigraphiées sur papier modifiées par la synthèse de particules de bleu de Prusse, un médiateur électrochimique, directement sur le papier. Néanmoins, cette voie a été abandonnée du fait de l'incompatibilité de pH entre ce système rapporteur et la glyphosate oxydase, les particules de bleu de Prusse étant détruites à pH neutre et alcalin.

Un système de détection colorimétrique sur papier a ensuite été construit en immobilisant des substrats de la HRP (TMB, ABTS et 4-AAP/HDCBS) sur une plaque 96 disques de papier, chaque disque étant rendu indépendant grâce à l'impression d'un motif de cire. Des sensibilités de l'ordre de la dizaine de μM ont pu être obtenues pour la détection du peroxyde d'hydrogène grâce à l'immobilisation de HRP. En revanche, l'ajout de la glycine oxydase - CBM n'a pas permis de détecter la présence de glycine avec une totale certitude. De plus, l'adsorption de la HRP sur le papier est à l'origine de la création d'une couche hydrophobe nuisant à la pénétration de l'échantillon dans le papier. Enfin, même si le faible volume d'échantillon est un avantage, un problème d'évaporation a été identifié, le dispositif devant être chauffé à 30°C afin d'optimiser l'activité enzymatique.

Afin de pallier ce problème d'adsorption de la HRP, nous avons exprimé sous forme de protéine de fusion la DyP de *Saccharomonospora viridis*, caractérisée par Liu et al. en 2014 comme fonctionnant à pH basique. Néanmoins, il s'est avéré que même si l'enzyme permettait la détection du peroxyde d'hydrogène en conditions acides grâce au TMB (présentant en outre l'avantage d'interagir fortement avec le papier), la détection du peroxyde d'hydrogène en conditions neutres (pH 7,0) était insuffisante

L'utilisation d'un mutant de la DyP de *Pseudomonas putida* décrit par Brissos et al. (2017) a permis de lever des problématiques de pH. Cette enzyme fonctionnant à pH basique (pH 8,5, même pH optimal que la GlyphOx-CBM) s'est révélée facile à exprimer sous forme de protéine de fusion avec un CBM et à immobiliser sur une tête de coton de coton-tige. Cette dernière permet également de répondre aux problématiques d'évaporation du papier et son utilisation a considérablement simplifié la fabrication du dispositif de détection. En effet,

l'immobilisation sur le coton-tige des enzymes se fait par mise en présence du coton-tige et d'un mélange bi-enzymatique GlyphOx-CBM / 6E10-CBM supplémenté en lactose. Les protéines n'interagissant pas de manière spécifique sont éluées par incubation dans du tampon à faible concentration. La lyophilisation du coton-tige fonctionnalisé après congélation dans l'azote liquide permet de stabiliser les enzymes et de les conserver à -80°C pendant au moins un mois.

Deux techniques de détection peuvent être utilisées : une première méthode colorimétrique et une deuxième méthode par chimiluminescence du luminol. Dans les deux cas, la préparation de l'échantillon est la même. Afin de tamponner l'échantillon, ce dernier est ajouté dans un microtube dans lequel du tampon a été lyophilisé en amont.

Pour la détection colorimétrique, du 4-AAP et de l'HDCBS ont été ajoutés au tampon lors de la lyophilisation : l'ajout de l'échantillon permet ainsi de redissoudre le tampon véronal 50 mM pH 8,5 et les deux substrats de la peroxydase sans manipulation supplémentaire. Le coton-tige est ensuite incubé directement dans le microtube pendant 10 minutes à 30°C, une coloration rose apparaissant en présence de glyphosate. Cette coloration peut être quantifiée à l'œil nu (test qualitatif) ou par analyse d'image après photographie ou numérisation (test quantitatif) avec une limite de détection de 120 µM et un domaine linéaire de 250 µM à 2500 µM. Il est aussi possible de doser l'absorbance à 510 nm du surnageant. Une perspective d'évolution de ce système pourrait être de tremper seulement la tête du coton-tige dans l'échantillon, permettant de concentrer le pigment au niveau de celle-ci et ainsi augmenter la sensibilité du système.

Ces cotons-tiges fonctionnalisés peuvent aussi être utilisés pour une détection du glyphosate par chimiluminescence du luminol. Dans ce cas, l'échantillon est tamponné comme précédemment et du luminol est ajouté en dernière minute. Après homogénéisation, l'échantillon est déposé sur le coton-tige qui est placé sous une caméra CCD, afin de capter les photons émis. Cette technique, nécessitant un outillage complémentaire, est caractérisée par une meilleure sensibilité : la LOD est de 0,45 µM pour un domaine linéaire de 2 à 500 µM. De plus, l'adjonction à la caméra CCD d'un système de thermorégulation pour chauffer le coton-tige (à 30°C) permettrait d'augmenter la catalyse et d'améliorer les capacités catalytiques d'un tel système. L'existence de système CCD portable autorise l'utilisation de ces cotons-tiges sur site.

Ces deux techniques de détection ont été démontrées comme étant robustes vis-à-vis de l'utilisation de matrices environnementales, d'interférents analogues structuraux (glycine, AMPA, sarcosine) et d'autres herbicides, à des concentrations pouvant être retrouvées dans l'environnement. Il est à noter l'inhibition de la peroxydase par la cystéine.

Néanmoins, la forme tridimensionnelle des cotons-tiges reste un frein. En effet, que ce soit en colorimétrie ou en chimiluminescence, cette structure en 3D est à l'origine d'une forte variation du signal, du fait de la déformation de la tête du coton-tige en cours de fonctionnalisation et de la création de zones d'ombre. Afin de réduire cette variabilité, il pourrait être envisagé de transposer cette méthode aux dispositifs papier décrits dans ce travail de thèse, en augmentant la quantité d'échantillon déposée. De plus, la normalisation de la taille des disques permet une uniformisation des zones de capture.

Enfin, un travail sur la prise d'image est à réaliser lors de la poursuite du projet, sur les moyens utilisés pour cette prise d'image (afin d'avoir une luminosité constante sur l'ensemble de la zone d'analyse) mais aussi au niveau du traitement d'image. L'utilisation d'ImageJ et la relative simplicité du traitement d'image laisse supposer une automatisation, en couplant le système colorimétrique avec un dispositif adaptable sur smartphone.

En conclusion, ce travail de thèse a permis la conception d'un essai biologique hétérogène pour la détection du glyphosate. Outre ce dispositif analytique, la stratégie de co-immobilisation d'enzymes exprimées sous forme de protéines de fusion avec un CBM permet l'assemblage du biocapteur en un minimum d'étapes directement à partir des lysats bactériens sans purification préalable. Une telle stratégie peut être étendue à d'autres oxydases associées à la SviDyp-CBM (pour les pH acides, en association avec le TMB) ou 6E10-CBM (pour les pH basiques en association avec le couple 4AAP-HDCBS).

Références bibliographiques

- Aalbers, F.S., Fraaije, M.W., 2019. Enzyme Fusions in Biocatalysis: Coupling Reactions by Pairing Enzymes, ChemBioChem. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800394>
- Abas, L., Kolb, M., Stadlmann, J., Janacek, D.P., Lukic, K., Schwechheimer, C., Sazanov, L.A., Mach, L., Friml, J., Hammes, U.Z., 2020. Naphthylphthalamic acid associates with and inhibits PIN auxin transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 118, 1–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020857118>
- Agranat, A.J., Kabessa, Y., Shemer, B., Shpigel, E., Schwartzglass, O., Atamneh, L., Uziel, Y., Ejzenberg, M., Mizrahi, Y., Garcia, Y., Perepelitsa, G., Belkin, S., 2021. An autonomous bioluminescent bacterial biosensor module for outdoor sensor networks, and its application for the detection of buried explosives. Biosens. Bioelectron. 185, 113253. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113253>
- Ahmad, M., Roberts, J.N., Hardiman, E.M., Singh, R., Eltis, L.D., Bugg, T.D.H., 2011. Identification of DypB from rhodococcus jostii RHA1 as a lignin peroxidase. Biochemistry 50, 5096–5107. <https://doi.org/10.1021/bi101892z>
- Albayrak, N., Yang, S.T., 2002. Immobilization of Aspergillus oryzae β -galactosidase on tosylated cotton cloth. Enzyme Microb. Technol. 31, 371–383. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00115-1)
- Alicea, I., Marvin, J.S., Miklos, A.E., Ellington, A.D., Looger, L.L., Schreiter, E.R., 2011. Structure of the Escherichia coli Phosphonate Binding Protein PhnD and Rationally Optimized Phosphonate Biosensors. J. Mol. Biol. 414, 356–369. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.047>
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for. J. AOAC Int. 86, 412–31.
- Aymard, C., 2018. Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d’inhibiteurs de transcétolases. Université de Lyon.
- Aymard, C., Bonaventura, C., Henkens, R., Mousty, C., Hecquet, L., Charmantray, F., Blum, L.J., Doumèche, B., 2017. High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases: Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry. ChemElectroChem 4, 957–966. <https://doi.org/10.1002/celec.201600647>
- Azevedo, A.M., Martins, V.C., Prazeres, D.M.F., Vojinović, V., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P., 2003. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev. 9, 199–247. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(03\)09003-3](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(03)09003-3)
- Bagherbaigi, S., Córcoles, E.P., Wicaksono, D.H.B., 2014. Cotton fabric as an immobilization matrix for low-cost and quick colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Anal. Methods 6, 7175–7180. <https://doi.org/10.1039/c4ay01071j>
- Barry, G.F., Kishore, G.M., Padgette, S.R., Stallings, W.C., 1997. Glyphosate-tolerant 5-EPSPS. United States Pat. US005633435A.
- Battaglino, B., Grinzato, A., Pagliano, C., 2021. Binding Properties of Photosynthetic Herbicides with the QB Site of the D1 Protein in Plant Photosystem II: A Combined Functional and Molecular Docking Study. Plants 10, 1501. <https://doi.org/10.3390/plants10081501>

- Belkin, S., Cheng, J.Y., 2023. Miniaturized bioluminescent whole-cell sensor systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 82, 102952. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102952>
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benito, M., Román, R., Ortiz, G., Casablancas, A., Álvaro, G., Caminal, G., González, G., Guillén, M., 2022. Cloning, expression, and one-step purification/immobilization of two carbohydrate-binding module-tagged alcohol dehydrogenases. *J. Biol. Eng.* 16, 16. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00295-8>
- Bettazzi, F., Natale, A.R., Torres, E., Palchetti, I., 2018. Glyphosate determination by coupling an immuno-magnetic assay with electrochemical sensors. *Sensors* 18. <https://doi.org/10.3390/s18092965>
- Bhullar, B.S., 1999. WO2000014538A1.pdf.
- Blackwell, J.R., Horgan, R., 1991. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295, 10–12. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81372-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81372-F)
- Blanco-Ayala, T., Andérica-Romero, A.C., Pedraza-Chaverri, J., 2014. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic. Res.* 48, 623–640. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.899694>
- Böger, P., 1996. Mode of action of herbicides affecting carotenogenesis. *J. Pestic. Sci.* 21, 473–478. <https://doi.org/10.1584/jpestics.21.473>
- Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K., 2002. *Herbicide Classes in Development*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59416-8>
- Bolam, D.N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M.P., Rixon, J.E., Boraston, A., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J., 1998. Pseudomonas cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem. J.* 331, 775–781. <https://doi.org/10.1042/bj3310775>
- Bonneh-Barkay, D., Reaney, S.H., Langston, W.J., Di Monte, D.A., 2005. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Mol. Brain Res.* 134, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.005>
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Borges, P.T., Silva, D., Silva, T.F.D., Brissos, V., Cañellas, M., Lucas, M.F., Masgrau, L., Melo, E.P., Machuqueiro, M., Frazão, C., Martins, L.O., 2022. Unveiling molecular details behind improved activity at neutral to alkaline pH of an engineered DyP-type peroxidase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 20, 3899–3910. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.07.032>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brausemann, A., Gemmecker, S., Koschmieder, J., Ghisla, S., Beyer, P., Einsle, O., 2017. Structure of Phytoene Desaturase Provides Insights into Herbicide Binding and Reaction

- Mechanisms Involved in Carotene Desaturation. *Structure* 25, 1222-1232.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.002>
- Brissos, V., Tavares, D., Sousa, A.C., Robalo, M.P., Martins, L.O., 2017. Engineering a Bacterial DyP-Type Peroxidase for Enhanced Oxidation of Lignin-Related Phenolics at Alkaline pH. *ACS Catal.* 7, 3454–3465. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03331>
- Brunharo, C.A.C.G., Takano, H.K., Mallory-Smith, C.A., Dayan, F.E., Hanson, B.D., 2019. Role of Glutamine Synthetase Isogenes and Herbicide Metabolism in the Mechanism of Resistance to Glufosinate in *Lolium perenne* L. spp. multiflorum Biotypes from Oregon. *J. Agric. Food Chem.* 67, 8431–8440. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01392>
- Bucur, B., Munteanu, F.D., Marty, J.L., Vasilescu, A., 2018. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. *Biosensors.* <https://doi.org/10.3390/bios8020027>
- Buonasera, K., Pezzotti, G., Scognamiglio, V., Tibuzzi, A., Giardi, M.T., 2010. New platform of biosensors for prescreening of pesticide residues to support laboratory analyses. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5982–5990. <https://doi.org/10.1021/jf9027602>
- Burleson, J.L., Peyton, G.R., Glaze, W.H., 1980. Gas-Chromatographic/Mass-Spectrometric Analysis of Derivatized Amino Acids in Municipal Wastewater Products. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1354–1359. <https://doi.org/10.1021/es60171a010>
- Butmee, P., Tumcharern, G., Songsiriritthigul, C., Durand, M.J., Thouand, G., Kerr, M., Kalcher, K., Samphao, A., 2021. Enzymatic electrochemical biosensor for glyphosate detection based on acid phosphatase inhibition. *Anal. Bioanal. Chem.* 413, 5859–5869. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03567-2>
- Cahuantzi-Muñoz, S.L., González-Fuentes, M.A., Ortiz-Frade, L.A., Torres, E., Țălu, Ș., Trejo, G., Méndez-Albores, A., 2019. Electrochemical Biosensor for Sensitive Quantification of Glyphosate in Maize Kernels. *Electroanalysis* 31, 927–935. <https://doi.org/10.1002/elan.201800759>
- Calabretta, M.M., Montali, L., Lopreside, A., Fragapane, F., Iacoangeli, F., Roda, A., Bocci, V., D’Elia, M., Michelini, E., 2021. Ultrasensitive On-Field Luminescence Detection Using a Low-Cost Silicon Photomultiplier Device. *Anal. Chem.* 93, 7388–7393. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00899>
- Caldinelli, L., Pedotti, M., Motteran, L., Molla, G., Pollegioni, L., 2009. FAD binding in glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* 91, 1499–1508. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.09.003>
- Campe, R., Hollenbach, E., Kämmerer, L., Hendriks, J., Höffken, H.W., Kraus, H., Lerchl, J., Mietzner, T., Tresch, S., Witschel, M., Hutzler, J., 2018. A new herbicidal site of action: Cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid biosynthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 148, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.006>
- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofmann, J., Koblitz, J., Schomburg, I., Neumann-Schaal, M., Jahn, D., Schomburg, D., 2021. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: New developments and updates. *Nucleic Acids Res.* 49, D498–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>
- Chatterjee, A., Kundu, S., 2015. Revisiting the chlorophyll biosynthesis pathway using genome scale metabolic model of *Oryza sativa japonica*. *Sci. Rep.* 5, 1–15.

- <https://doi.org/10.1038/srep14975>
- Chaufan, G., Coalova, I., Del Carmen Ríos De Molina, M., 2014. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: Differences with its active ingredient. *Int. J. Toxicol.* 33, 29–38. <https://doi.org/10.1177/1091581813517906>
- Chauhan, S., Kang, T.J., 2018. Soluble expression of horseradish peroxidase in *Escherichia coli* and its facile activation. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.04.004>
- Chen, J., Yu, Q., Patterson, E., Sayer, C., Powles, S., 2021. Dinitroaniline Herbicide Resistance and Mechanisms in Weeds. *Front. Plant Sci.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634018>
- Chen, Y., Zhang, Shudi, Zhai, Z., Zhang, Shuo, Ma, J., Liang, X., Li, Q., 2023. Construction of Fusion Protein with Carbohydrate-Binding Module and Leaf-Branch Compost Cutinase to Enhance the Degradation Efficiency of Polyethylene Terephthalate. *Int. J. Mol. Sci.* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24032780>
- Cinti, S., Cusenza, R., Moscone, D., Arduini, F., 2018. Paper-based synthesis of Prussian Blue Nanoparticles for the development of whole blood glucose electrochemical biosensor. *Talanta* 187, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.015>
- Clark, L.C., Lyons, C., 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Clegg, B.S., Stephenson, G.R., Hall, J.C., 1999. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* 47, 5031–5037. <https://doi.org/10.1021/jf990064x>
- Colpa, D.I., Fraaije, M.W., Van Bloois, E., 2014. DyP-type peroxidases: A promising and versatile class of enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1371-6>
- Colpa, D.I., Lončar, N., Schmidt, M., Fraaije, M.W., 2017. Creating Oxidase-Peroxidase Fusion Enzymes as a Toolbox for Cascade Reactions. *ChemBioChem* 18, 2226–2230. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700478>
- Comai, L., Sen, L.C., Stalker, D.M., 1983. An Altered *aroA* Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *Science* (80-.). 221, 370–371. <https://doi.org/10.1126/science.221.4608.370>
- Credou, J., Berthelot, T., 2014. Cellulose: From biocompatible to bioactive material. *J. Mater. Chem. B* 2, 4767–4788. <https://doi.org/10.1039/c4tb00431k>
- Darwish, I.A., Alzoman, N.Z., Khalil, N.N., 2023. A Novel Highly Sensitive Chemiluminescence Enzyme Immunoassay with Signal Enhancement Using Horseradish Peroxidase-Luminol-Hydrogen Peroxide Reaction for the Quantitation of Monoclonal Antibodies Used for Cancer Immunotherapy. *Chemosensors* 11. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11040245>
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205->

012-0071-7

- Delprat, N., Martins, L.O., Blum, L.J., Aymard, C.M.G., Leca-Bouvier, B., Octobre, G., Doumèche, B., 2023. Biosensors and Bioelectronics User-friendly one-step disposable signal-on bioassay for glyphosate detection in water samples. *Biosens. Bioelectron.* 241, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115689>
- Desmet, C., Marquette, C.A., Blum, L.J., Doumèche, B., 2016. Paper electrodes for bioelectrochemistry: Biosensors and biofuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 76, 145–163. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.052>
- Dhamu, V.N., Poudyal, D.C., Muthukumar, S., Prasad, S., 2021. A Highly Sensitive Electrochemical Sensor System to Detect and Distinguish Between Glyphosate and Glufosinate. *J. Electrochem. Soc.* 168, 057531. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac00f7>
- Dhamu, V.N., Prasad, S., 2020. ElectrochemSENSE: A platform towards field deployable direct on-produce glyphosate detection. *Biosens. Bioelectron.* 170, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112609>
- Diamant, S., Eliahu, N., Rosenthal, D., Goloubinoff, P., 2001. Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. *J. Biol. Chem.* 276, 39586–39591. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103081200>
- Dietrich, H., Laber, B., 2011. Inhibitors of Cellulose Biosynthesis, in: *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, pp. 339–369. <https://doi.org/10.1002/9783527644179.ch7>
- Ding, X., Yang, K.L., 2013. Development of an oligopeptide functionalized surface plasmon resonance biosensor for online detection of glyphosate. *Anal. Chem.* 85, 5727–5733. <https://doi.org/10.1021/ac400273g>
- Döring, J., Rettke, D., Rödel, G., Pompe, T., Ostermann, K., 2019. Surface functionalization by hydrophobin-EPSPS fusion protein allows for the fast and simple detection of glyphosate. *Biosensors* 9. <https://doi.org/10.3390/bios9030104>
- Dounce, A.L., 1983. A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. *J. Theor. Biol.* 105, 553–567. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(83\)90219-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(83)90219-9)
- Durrieu, C., Guedri, H., Fremion, F., Volatier, L., 2011. Unicellular algae used as biosensors for chemical detection in Mediterranean lagoon and coastal waters. *Res. Microbiol.* 162, 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.07.002>
- Earley, F., 2019. Fungicides Acting on Oxidative Phosphorylation, in: Krämer, W., Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, pp. 609–747. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch15>
- Edwards, K.A., 2021. Periplasmic-binding protein-based biosensors and bioanalytical assay platforms : Advances , considerations , and strategies for optimal utility. *Talanta Open* 3, 100038. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100038>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Elter, A., Bock, T., Spiehl, D., Russo, G., Hinz, S.C., Bitsch, S., Baum, E., Langhans, M., Meckel, T., Dörsam, E., Kolmar, H., Schwall, G., 2021. Carbohydrate binding module-fused

- antibodies improve the performance of cellulose-based lateral flow immunoassays. *Sci. Rep.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87072-7>
- Eschenburg, S., Kabsch, W., Healy, M.L., Schonbrunn, E., 2003. A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states. *J. Biol. Chem.* 278, 49215–49222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309741200>
- Eurofins, 2023. Glyphosate ELISA, Microtiter Plate.
- European Commission, 2023. What is a pesticides? [WWW Document]. URL https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en#what-is-a-pesticide (accessed 8.23.23).
- European Food Safety Authority (EFSA), 2015a. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4302>
- European Food Safety Authority (EFSA), 2015b. L'évaluation des risques expliquée par l'EFSA, EU Publica. ed. <https://doi.org/10.2805/703052>
- European Food Safety Authority (EFSA), Alvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Binaglia, M., Castoldi, A.F., Chiusolo, A., Crivellente, F., Egsmose, M., Fait, G., Ferilli, F., Gouliarmou, V., Nogareda, L.H., Ippolito, A., Istace, F., Jarrah, S., Kardassi, D., Kienzler, A., Lanzoni, A., Lava, R., Linguadoca, A., Lythgo, C., Mangas, I., Padovani, L., Panzarea, M., Manuel, J., Morte, P., Rizzuto, S., Romac, A., Sera, R., Sharp, R., Szentes, C., Terron, A., Theobald, A., Tiramani, M., Vianello, G., Villamar-bouza, L., 2023. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4302>
- Franz, J.E., Mao, M.K., Sikorski, J. ., 1997. Glyphosate, a unique global herbicide. *ACS Monograph*.
- Free, A.H., Adams, E.C., Kercher, M. Lou, Free, H.M., Cook, M.H., 1957. Simple Specific Test for Urine Glucose. *Clin. Chem.* 3, 163–168. <https://doi.org/10.1093/clinchem/3.3.163>
- Fujii, T., Yokoyama, E. ichi, Inoue, K., Sakurai, H., 1990. The sites of electron donation of Photosystem I to methyl viologen. *BBA - Bioenerg.* 1015, 41–48. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90213-N](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90213-N)
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M., Schönbrunn, E., 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., Schönbrunn, E., 2009. Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 9854–9860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809771200>
- Furszyfer Del Rio, D.D., Sovacool, B.K., Griffiths, S., Bazilian, M., Kim, J., Foley, A.M., Rooney, D., 2022. Decarbonizing the pulp and paper industry: A critical and systematic review of sociotechnical developments and policy options. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 167, 112706. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112706>
- Garcia de la Rosa, L.A., Alatorre Ordaz, A., De Leon Rodriguez, L.M., Gutierrez Granados, S.,

2006. Amperometric Sensor for Applications in Hydrodynamic Regimen. *ECS Trans.* 3, 51–57. <https://doi.org/10.1149/1.2357245>
- Garcia, M.D., Nouwens, A., Lonhienne, T.G., Guddat, L.W., 2017. Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E1091–E1100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616142114>
- Gervais, C., Languille, M.A., Réguer, S., Gillet, M., Pelletier, S., Garnier, C., Vicenzi, E.P., Bertrand, L., 2013. Why does Prussian blue fade? Understanding the role(s) of the substrate. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1600–1609. <https://doi.org/10.1039/c3ja50025j>
- Gold, V. (Ed.), 2019. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- Gomes, M.P., Le Manac’h, S.G., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lucotte, M., Juneau, P., 2017. Glyphosate-dependent inhibition of photosynthesis in willow. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00207>
- González-Martínez, M.Á., Brun, E.M., Puchades, R., Maquieira, Á., Ramsey, K., Rubio, F., 2005. Glyphosate immunosensor. Application for water and soil analysis. *Anal. Chem.* 77, 4219–4227. <https://doi.org/10.1021/ac048431d>
- Grossmann, K., 2010. Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag. Sci.* 66, 113–120. <https://doi.org/10.1002/ps.1860>
- Grossmann, K., 2007. Auxin Herbicide Action. *Plant Signal. Behav.* 2, 421–423. <https://doi.org/10.4161/psb.2.5.4417>
- Grünewald, F.S., 2014. Periplasmic Binding Proteins in Biosensing Applications 205–235. <https://doi.org/10.1007/11663>
- Guedri, H., Durrieu, C., 2008. A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. *Microchim. Acta* 163, 179–184. <https://doi.org/10.1007/s00604-008-0017-2>
- Guerrero-Esteban, T., Gutiérrez-Sánchez, C., Martínez-Periñán, E., Revenga-Parra, M., Pariente, F., Lorenzo, E., 2021. Sensitive glyphosate electrochemiluminescence immunosensor based on electrografted carbon nanodots. *Sensors Actuators, B Chem.* 330, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129389>
- Gutteridge, S., Thompson, M.E., 2019. Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors (AHAS/ALS), in: Krämer, W., Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, pp. 33–171. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch2>
- Hach, 2023. DR1900 Portable Spectrophotometer [WWW Document]. URL <https://uk.hach.com/spectrophotometers/dr1900-portable-spectrophotometer/family?productCategoryId=25114239786> (accessed 7.14.23).
- Healy-Fried, M.L., Funke, T., Priestman, M.A., Han, H., Schönbrunn, E., 2007. Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 282, 32949–32955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705624200>
- Hoffmann, F., Rinas, U., 2000. Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation

- during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16, 1000–1007. <https://doi.org/10.1021/bp0000959>
- Hoyerova, K., Hosek, P., Quareshy, M., Li, J., Klima, P., Kubes, M., Yemm, A.A., Neve, P., Tripathi, A., Bennett, M.J., Napier, R.M., 2018. Auxin molecular field maps define AUX1 selectivity: many auxin herbicides are not substrates. *New Phytol.* 217, 1625–1639. <https://doi.org/10.1111/nph.14950>
- HRAC, 2022. HRAC Mode of Action classification. *Herbic. Resist. Action Comm.* 2020.
- HRAC, 2010. Important Changes To Herbicide Mode Of Action Labeling.
- Huang, M.H., Li, Y.M., Gu, G.W., 2010. Chemical composition of organic matters in domestic wastewater. *Desalination* 262, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.037>
- Hubbe, M.A., 2021. Energy Efficiency Challenges in Pulp and Paper Manufacturing: A Tutorial Review. *BioResources.* <https://doi.org/10.15376/biores.16.4.hubbe>
- Huhn, C., 2018. More and enhanced glyphosate analysis is needed. *Anal. Bioanal. Chem.* 410, 3041–3045. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1000-3>
- Humer, D., Ebner, J., Spadiut, O., 2020. Scalable high-performance production of recombinant horseradish peroxidase from *E. Coli* inclusion bodies. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21134625>
- Husu, I., Rodio, G., Touloupakis, E., Lambreva, M.D., Buonasera, K., Litescu, S.C., Giardi, M.T., Rea, G., 2013. Insights into photo-electrochemical sensing of herbicides driven by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Sensors Actuators, B Chem.* 185, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.013>
- IARC, 2016. Q&A on Glyphosate 33, 1–3.
- IARC, 2015. Some organophosphate insecticides and herbicides: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC Monographs.
- Ibarra Bouzada, L.M.E., Hernández, S.R., Kergaravat, S. V., 2021. Glyphosate detection from commercial formulations: comparison of screening analytic methods based on enzymatic inhibition. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 101, 1821–1835. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1691176>
- Jacobs, J.M., Jacobs, N.J., Sherman, T.D., Duke, S.O., 1991. Effect of Diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. *Plant Physiol.* 97, 197–203. <https://doi.org/10.1104/pp.97.1.197>
- Janz, D.M., 2014. Dinitrophenols. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* 2, 177–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00135-4>
- Jaworski, E.G., 1972. Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 20, 1195–1198. <https://doi.org/10.1021/jf60184a057>
- Jiang, M., Chen, C., He, J., Zhang, H., Xu, Z., 2020. Fluorescence assay for three organophosphorus pesticides in agricultural products based on Magnetic-Assisted fluorescence labeling aptamer probe. *Food Chem.* 307, 125534.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125534>
- Job, V., Marcone, G.L., Pilone, M.S., Pollegioni, L., 2002a. Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 277, 6985–6993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111095200>
- Job, V., Molla, G., Pilone, M.S., Pollegioni, L., 2002b. Overexpression of a recombinant wild-type and His-tagged *Bacillus subtilis* glycine oxidase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 269, 1456–1463. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02790.x>
- Johnen, P., Zimmermann, S., Betz, M., Hendriks, J., Zimmermann, A., Marnet, M., De, I., Zimmermann, G., Kibat, C., Cornaciu, I., Mariaule, V., Pica, A., Clavel, D., Márquez, J.A., Witschel, M., 2022. Inhibition of acyl-ACP thioesterase as site of action of the commercial herbicides cumyluron, oxaziclomefone, bromobutide, methylodymron and tebutam. *Pest Manag. Sci.* 78, 3620–3629. <https://doi.org/10.1002/ps.7004>
- Johnson, Z.T., Jared, N., Peterson, J.K., Li, J., Smith, E.A., Walper, S.A., Hooe, S.L., Breger, J.C., Medintz, I.L., Gomes, C., Claussen, J.C., 2022. Enzymatic Laser-Induced Graphene Biosensor for Electrochemical Sensing of the Herbicide Glyphosate. *Glob. Challenges* 6, 2200057. <https://doi.org/10.1002/gch2.202200057>
- Journal Officiel de la République Française (JORF), 2021. Vocabulaire de la chimie et des matériaux (liste de termes, expressions et définitions adoptés) [WWW Document]. 19/03/2021. URL https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/article_jo/JORFARTI000043267242 (accessed 7.21.23).
- Kalinger, R.S., Pulsifer, I.P., Hepworth, S.R., Rowland, O., 2020. Fatty Acyl Synthetases and Thioesterases in Plant Lipid Metabolism: Diverse Functions and Biotechnological Applications. *Lipids* 55, 435–455. <https://doi.org/10.1002/lipd.12226>
- Karyakin, A.A., 2001. Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications. *Electroanalysis*. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200106\)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200106)13:10<813::AID-ELAN813>3.0.CO;2-Z)
- Karyakin, A.A., Karyakina, E.E., Gorton, L., 1999. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochem. commun.* 1, 78–82. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(99)00010-7)
- Kergaravat, S. V., Fabiano, S.N., Soutullo, A.R., Hernández, S.R., 2021. Comparison of the performance analytical of two glyphosate electrochemical screening methods based on peroxidase enzyme inhibition. *Microchem. J.* 160. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105654>
- Kim, H.S., Pyun, J.C., 2009. Hyper Sensitive Strip Test with Chemi-luminescence Signal Band. *Procedia Chem.* 1, 1043–1046. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.07.260>
- Kim, S.J., Ishikawa, K., Hirai, M., Shoda, M., 1995. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 601–607. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94755-G](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94755-G)
- Kim, S.J., Shoda, M., 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1029–1035. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1029-1035.1999>

- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., Ulrich Hartl, F., 2013. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis, *Annual Review of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Ko, H., Kang, M., Kim, M.J., Yi, J., Kang, J., Bae, J.H., Sohn, J.H., Sung, B.H., 2021. A novel protein fusion partner, carbohydrate-binding module family 66, to enhance heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 20, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01725-w>
- Kong, F., Hu, Y.F., 2012. Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 7–13. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5821-1>
- Kou, X., Zhao, X., Wu, B., Wang, C., Wu, C., Yang, S., Zhou, J., Xue, Z., 2022. Auxin Response Factors Are Ubiquitous in Plant Growth and Development, and Involved in Crosstalk between Plant Hormones: A Review. *Appl. Sci.* 12. <https://doi.org/10.3390/app12031360>
- Koudelka-Hep, M., de Rooij, N.F., Strike, D.J., 1997. Immobilization of Enzymes on Microelectrodes Using Chemical Crosslinking, *Methods in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-386-4:83>
- Krähmer, H., Dücker, R., Beffa, R., Babczinski, P., 2019. Herbicides Disturbing the Synthesis of Very-long-chain Fatty Acids, in: Krämer, W., Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, pp. 351–385. <https://doi.org/10.1002/9783527699261.ch6>
- Krainer, F.W., Glieder, A., 2015. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
- Krämer, W., Schirmer, U., 2019. *Modern Crop Protection Compounds*, *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527699261>
- Krifa, M., 2013. Cotton fiber length distribution modality alteration in ginning and mill processing. *J. Text. Inst.* 104, 731–744. <https://doi.org/10.1080/00405000.2012.754117>
- Kukkar, P., Kukkar, D., Younis, S.A., Singh, G., Singh, P., Basu, S., Kim, K.H., 2021. Colorimetric biosensing of organophosphate pesticides using enzymatic nanoreactor built on zeolitic imidazolate-8. *Microchem. J.* 166, 106242. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106242>
- Kummari, S., Panicker, L.R., Rao Bommi, J., Karingula, S., Sunil Kumar, V., Mahato, K., Goud, K.Y., 2023. Trends in Paper-Based Sensing Devices for Clinical and Environmental Monitoring. *Biosensors* 13. <https://doi.org/10.3390/bios13040420>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.-K., Codani, J.-J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hénaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.-F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A.,

- Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A., 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249–256.
- Land, K.J., Boeras, D.I., Chen, X.S., Ramsay, A.R., Peeling, R.W., 2019. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat. Microbiol.* 4, 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>
- Lazanas, A.C., Prodromidis, M.I., 2022. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. *ACS Meas. Sci. Au.* <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00070>
- Le Gall, J., 2020. Transistor organique à effet de champ à grille électrolytique pour le suivi d'organismes photosynthétiques. Université de Paris.
- Le Gall, J., Vasilijević, S., Battaglini, N., Mattana, G., Noël, V., Brayner, R., Piro, B., 2021. Algae-functionalized hydrogel-gated organic field-effect transistor. Application to the detection of herbicides. *Electrochim. Acta* 372. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137881>
- Lee, E.A., Zimmerman, L.R., Bhullar, B.S., Thurman, E.M., 2002. Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. *Anal. Chem.* 74, 4937–4943. <https://doi.org/10.1021/ac020208y>
- Lee, H.U., Jung, D.U., Lee, J.H., Song, Y.S., Park, C., Kim, S.W., 2013. Detection of glyphosate by quantitative analysis of fluorescence and single DNA using DNA-labeled fluorescent magnetic core-shell nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem.* 177, 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.075>
- Li, H., Chen, H., Li, M., Lu, Q., Zhang, Y., Yao, S., 2019. Template protection of gold nanoclusters for the detection of organophosphorus pesticides. *New J. Chem.* 43, 5423–5428. <https://doi.org/10.1039/C9NJ01007F>
- Liu, H., Chen, P., Liu, Z., Liu, J., Yi, J., Xia, F., Zhou, C., 2020. Electrochemical luminescence sensor based on double suppression for highly sensitive detection of glyphosate. *Sensors Actuators, B Chem.* 304, 127364. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127364>
- Lučić, M., Wilson, M.T., Svistunenko, D.A., Owen, R.L., Hough, M.A., Worrall, J.A.R., 2021. Aspartate or arginine? Validated redox state X-ray structures elucidate mechanistic subtleties of FeIV = O formation in bacterial dye-decolorizing peroxidases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 26, 743–761. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01896-2>
- Luque de Castro, M.D., Herrera, M.C., 2003. Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: Questionable analytical devices. *Biosens. Bioelectron.* 18, 279–294. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00175-6)

- Maghraby, Y.R., El-Shabasy, R.M., Ibrahim, A.H., Azzazy, H.M.E.S., 2023. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega* 8, 5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Martinez, A.W., Phillips, S.T., Butte, M.J., Whitesides, G.M., 2007. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46, 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>
- Matsuura, H., Ujiie, K., Duyen, T.T.M., Izutsu, K., Fujiyama, K., Maeda, S., Harada, K., Hirata, K., 2019. Development of a Paper-Based Luminescence Bioassay for Therapeutic Monitoring of Aminoglycosides: a Proof-of-Concept Study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 189, 798–809. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03048-4>
- Mazuryk, J., Klepacka, K., Kutner, W., Sharma, P.S., 2023. Glyphosate Separating and Sensing for Precision Agriculture and Environmental Protection in the Era of Smart Materials. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c01269>
- McFarlane, H.E., 2023. Open questions in plant cell wall synthesis. *J. Exp. Bot.* 74, 3425–3448. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad110>
- Mehrotra, P., 2016. Biosensors and their applications - A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Mendes, S., Brissos, V., Gabriel, A., Catarino, T., Turner, D.L., Todorovic, S., Martins, L.O., 2015. An integrated view of redox and catalytic properties of B-type PpDyP from *Pseudomonas putida* MET94 and its distal variants. *Arch. Biochem. Biophys.* 574, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.009>
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G. V., Dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2012. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6–9. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>
- Mesnage, R., Bernay, B., Séralini, G.-E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.* 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Mitsch, M., White, B., 2020. A Simple, Quantitative Peroxidase Assay Demonstrating Enzyme Inhibition with L-cysteine. *Adv. Biol. Lab. Educ.* 41, 1–10. <https://doi.org/10.37590/able.v41.art44>
- Moran, G.R., 2005. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.08.015>
- Mörrtl, M., Diederichs, K., Welte, W., Molla, G., Motteran, L., Andriolo, G., Piloni, M.S., Pollegioni, L., 2004. Structure-function correlation in glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 279, 29718–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401224200>
- Muenchen, D.K., Martinazzo, J., Brezolin, A.N., de Cezaro, A.M., Rigo, A.A., Mezarroba, M.N., Manzoli, A., de Lima Leite, F., Steffens, J., Steffens, C., 2018. Cantilever Functionalization Using Peroxidase Extract of Low Cost for Glyphosate Detection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 186, 1061–1073. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2799-y>

- N'Guetta, P.E.Y., Fink, M.M., Rizk, S.S., 2020. Engineering a fluorescence biosensor for the herbicide glyphosate. *Protein Eng. Des. Sel.* 33, 1–6. <https://doi.org/10.1093/protein/gzaa021>
- Nishiya, Y., Imanaka, T., 1998. Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 438, 263–266. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01313-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01313-1)
- Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S.H., Kim, R., 2007. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr. Purif.* 52, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.09.015>
- Oliveira, G.C., Moccelini, S.K., Castilho, M., Terezo, A.J., Possavatz, J., Magalhães, M.R.L., Dores, E.F.G.C., 2012. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta* 98, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.059>
- Park, H.J., Hilsenbeck, J.L., Kim, H.J., Shuttleworth, W.A., Park, Y.H., Evans, J.N., Kang, C.H., 2004. Structural studies of *Streptococcus pneumoniae* EPSP synthase in unliganded state, tetrahedral intermediate-bound state and S3P-GLP-bound state. *Mol. Microbiol.* 51, 963–971. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03885.x>
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., Bileschi, M.L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D.H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H., Bateman, A., 2023. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51, D418–D427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac993>
- Paz-y-Miño, C., Muñoz, M.J., Maldonado, A., Valladares, C., Cumbal, N., Herrera, C., Robles, P., Sánchez, M.E., López-Cortés, A., 2011. Baseline determination in social, health, and genetic areas in communities affected by glyphosate aerial spraying on the northeastern Ecuadorian border. *Rev. Environ. Health* 26, 45–51. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2011.007>
- Paz-y-Miño, C., Sánchez, M.E., Arévalo, M., Muñoz, M.J., Witte, T., De-la-Carrera, G.O., Leone, P.E., 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet. Mol. Biol.* 30, 456–460. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026>
- Pedotti, M., Ghisla, S., Motteran, L., Molla, G., Pollegioni, L., 2009a. Catalytic and redox properties of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* 91, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.007>
- Pedotti, M., Rosini, E., Molla, G., Moschetti, T., Savino, C., Vallone, B., Pollegioni, L., 2009b. Glyphosate Resistance by Engineering the Flavoenzyme Glycine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 284, 36415–36423. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.051631>
- Pérez, S., Samain, D., 2010. Structure and Engineering of Celluloses, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(10\)64003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)64003-6)
- Pfanzagl, V., Nys, K., Bellei, M., Michlits, H., Mlynek, G., Battistuzzi, G., Djinic-Carugo, K., Van Doorslaer, S., Furtmüller, P.G., Hofbauer, S., Obinger, C., 2018. Roles of distal aspartate and arginine of B-class dye-decolorizing peroxidase in heterolytic hydrogen peroxide cleavage. *J. Biol. Chem.* 293, 14823–14838. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004773>

- Phopin, K., Tantimongcolwat, T., 2020. Pesticide aptasensors—state of the art and perspectives. *Sensors (Switzerland)* 20, 1–40. <https://doi.org/10.3390/s20236809>
- Pline, W.A., Wilcut, J.W., Duke, S.O., Edmisten, K.L., Wells, R., 2002. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 506–512. <https://doi.org/10.1021/jf0110699>
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D., 2011. Molecular basis of glyphosate resistance—different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753–66. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>
- Portier, C.J., Armstrong, B.K., Baguley, B.C., Baur, X., Belyaev, I., Bellé, R., Belpoggi, F., Biggeri, A., Bosland, M.C., Bruzzi, P., Budnik, L.T., Bugge, M.D., Burns, K., Calaf, G.M., Carpenter, D.O., Carpenter, H.M., López-Carrillo, L., Clapp, R., Cocco, P., Consonni, D., Comba, P., Craft, E., Dalvie, M.A., Davis, D., Demers, P.A., De Roos, A.J., DeWitt, J., Forastiere, F., Freedman, J.H., Fritschi, L., Gaus, C., Gohlke, J.M., Goldberg, M., Greiser, E., Hansen, J., Hardell, L., Hauptmann, M., Huang, W., Huff, J., James, M.O., Jameson, C.W., Kortenkamp, A., Kopp-Schneider, A., Kromhout, H., Larramendy, M.L., Landrigan, P.J., Lash, L.H., Leszczynski, D., Lynch, C.F., Magnani, C., Mandrioli, D., Martin, F.L., Merler, E., Michelozzi, P., Miligi, L., Miller, A.B., Mirabelli, D., Mirer, F.E., Naidoo, S., Perry, M.J., Petronio, M.G., Pirastu, R., Portier, R.J., Ramos, K.S., Robertson, L.W., Rodriguez, T., Rössli, M., Ross, M.K., Roy, D., Rusyn, I., Saldiva, P., Sass, J., Savolainen, K., Scheepers, P.T.J., Sergi, C., Silbergeld, E.K., Smith, M.T., Stewart, B.W., Sutton, P., Tateo, F., Terracini, B., Thielmann, H.W., Thomas, D.B., Vainio, H., Vena, J.E., Vineis, P., Weiderpass, E., Weisenburger, D.D., Woodruff, T.J., Yorifuji, T., Yu, I.J., Zambon, P., Zeeb, H., Zhou, S.F., 2016. Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the international agency for research on cancer (IARC) and the european food safety authority (EFSA). *J. Epidemiol. Community Health* 70, 741–745. <https://doi.org/10.1136/jech-2015-207005>
- Poudyal, D.C., Dhamu, V.N., Samson, M., Muthukumar, S., Prasad, S., 2023. Pesticide analytical screening system (PASS): A novel electrochemical system for multiplex screening of glyphosate and chlorpyrifos in high-fat and low-fat food matrices. *Food Chem.* 400, 134075. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134075>
- Poudyal, D.C., Dhamu, V.N., Samson, M., Muthukumar, S., Prasad, S., 2022. Portable Pesticide Electrochem-sensor: A Label-Free Detection of Glyphosate in Human Urine. *Langmuir* 38, 1781–1790. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02877>
- Powell, H.A., Kerby, N.W., Rowell, P., 1991. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytol.* 119, 421–426. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00042.x>
- Pradela-Filho, L.A., Veloso, W.B., Arantes, I.V.S., Gongoni, J.L.M., de Farias, D.M., Araujo, D.A.G., Paixão, T.R.L.C., 2023. Paper-based analytical devices for point-of-need applications. *Mikrochim. Acta* 190, 179. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05764-5>
- Prasad, S., Khadatare, P.B., Roy, I., 2011. Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4603–4609. <https://doi.org/10.1128/AEM.05259-11>
- Prieto-Simon, B., Campas, M., Marty, J.-L., 2008. Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. *Protein Pept. Lett.* 15,

- 757–763. <https://doi.org/10.2174/092986608785203791>
- Prudkin-Silva, C., Lanzarotti, E., Álvarez, L., Vallerga, M.B., Factorovich, M., Morzan, U.N., Gómez, M.P., González, N.P., Acosta, Y.M., Carrizo, F., Carrizo, E., Galeano, S., Lagorio, M.G., Juárez, Á.B., Ithuralde, R.E., Romero, J.M., Urdampilleta, C.M., 2021. A cost-effective algae-based biosensor for water quality analysis: Development and testing in collaboration with peasant communities. *Environ. Technol. Innov.* 22, 101479. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101479>
- Pundir, C.S., Chauhan, N., 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>
- Qin, Y., Wu, G., Guo, Y., Ke, D., Yin, J., Wang, D., Fan, X., Liu, Z., Ruan, L., Hu, Y., 2020. Engineered glyphosate oxidase coupled to spore-based chemiluminescence system for glyphosate detection. *Anal. Chim. Acta* 1133, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.077>
- Qin, Z., Lin, S., Qiu, Y., Chen, Q., Zhang, Y., Zhou, J., Zhao, L., 2019. One-step immobilization-purification of enzymes by carbohydrate-binding module family 56 tag fusion. *Food Chem.* 299, 125037. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125037>
- Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C.G., Valdez-Cruz, N.A., Trujillo-Roldán, M.A., 2019. Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies. *Cell Stress Chaperones* 24, 777–792. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>
- Rettke, D., Döring, J., Martin, S., Venus, T., Estrela-Lopis, I., Schmidt, S., Ostermann, K., Pompe, T., 2020. Picomolar glyphosate sensitivity of an optical particle-based sensor utilizing biomimetic interaction principles. *Biosens. Bioelectron.* 165. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112262>
- Ricci, F., Amine, A., Palleschi, G., Moscone, D., 2003. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosens. Bioelectron.* 18, 165–174. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00169-0)
- Roda, A., Mirasoli, M., Dolci, L.S., Buragina, A., Bonvicini, F., Simoni, P., Guardigli, M., 2011. Portable device based on chemiluminescence lensless imaging for personalized diagnostics through multiplex bioanalysis. *Anal. Chem.* 83, 3178–3185. <https://doi.org/10.1021/ac200360k>
- Roman, R.L., Nagi, L., Silva, L.L., Fernandes, S.C., de Mello, J.M.M., Magro, J.D., Fiori, M.A., 2020. Monocrystalline silicon/polyaniline/horseradish peroxidase enzyme electrode obtained by the electrodeposition method for the electrochemical detection of glyphosate. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 31, 9443–9456. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-03484-7>
- Rosa, A.M.M.M., Louro, A.F., Martins, S.A.M.M., Inácio, J., Azevedo, A.M., Prazeres, D.M.F., 2014. Capture and detection of DNA hybrids on paper via the anchoring of antibodies with fusions of carbohydrate binding modules and ZZ-domains. *Anal. Chem.* 86, 4340–4347. <https://doi.org/10.1021/ac5001288>
- Rubio, F., Veldhuis, L.J., Clegg, B.S., Fleeker, J.R., Hall, J.C., 2003. Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. *J. Agric. Food Chem.* 51,

- 691–696. <https://doi.org/10.1021/jf020761g>
- Sakura, S., 1992. Electrochemiluminescence of hydrogen peroxide-luminol at a carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* 262, 49–57. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80007-T](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80007-T)
- Salvachúa, D., Prieto, A., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2013. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4316–4324. <https://doi.org/10.1128/AEM.00699-13>
- Santos, A., Mendes, S., Brissos, V., Martins, L.O., 2014. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: Towards biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2053–2065. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5041-4>
- Sariri, R., Sajedi, R.H., Jafarian, V., 2006. Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. *J. Mol. Liq.* 123, 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2005.05.004>
- Sasaki, Y., Nagano, Y., 2004. Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1175–1184. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1175>
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D., 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* 30, 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D., 2011. Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3725–3736. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.031>
- Savelli, B., Li, Q., Webber, M., Jemmat, A.M., Robitaille, A., Zamocky, M., Mathé, C., Dunand, C., 2019. RedoxiBase: A database for ROS homeostasis regulated proteins. *Redox Biol.* 26, 0–4. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101247>
- Schenck, F.J., Hobbs, J.E., 2004. Evaluation of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 24–30. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0388-y>
- Schloss, J. V., 1994. Recent Advances in Understanding the Mechanism and Inhibition of Acetolactate Synthase. pp. 3–14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79107-9_2
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J.N.S., Kabsch, W., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1376–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., del Amor, F.M., Núñez-Delgado, E., 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chem.* 107, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.028>
- Settembre, E.C., Dorrestein, P.C., Park, J.H., Augustine, A.M., Begley, T.P., Ealick, S.E., 2003. Structural and mechanistic studies on thiO, a glycine oxidase essential for thiamin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 42, 2971–2981. <https://doi.org/10.1021/bi026916v>

- Shao, Y., Tian, R., Duan, J., Wang, M., Cao, J., Cao, Z., Li, G., Jin, F., Abd El-Aty, A.M., She, Y., 2023. A Novel Fluorescent Sensor Based on Aptamer and qPCR for Determination of Glyphosate in Tap Water. *Sensors* 23. <https://doi.org/10.3390/s23020649>
- Shen, Y., Chapelle, F.H., Strom, E.W., Benner, R., 2015. Origins and bioavailability of dissolved organic matter in groundwater. *Biogeochemistry* 122, 61–78. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-0029-4>
- Shrestha, R., Huang, G., Meekins, D.A., Geisbrecht, B. V., Li, P., 2017. Mechanistic Insights into Dye-Decolorizing Peroxidase Revealed by Solvent Isotope and Viscosity Effects. *ACS Catal.* 7, 6352–6364. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01861>
- Shrestha, R., Jia, K., Khadka, S., Eltis, L.D., Li, P., 2021. Mechanistic insights into DyPB from *rhodococcus jostii* RHA1 via kinetic characterization. *ACS Catal.* 11, 5486–5495. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c00703>
- Sidar, A., Albuquerque, E.D., Voshol, G.P., Ram, A.F.J., Vijgenboom, E., Punt, P.J., 2020. Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00871>
- Siehl, D.L., 1997. Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. *Rev. Toxicol.* 1, 37–67.
- Silva, D., Rodrigues, C.F., Lorena, C., Borges, P.T., Martins, L.O., 2023. Biocatalysis for biorefineries: The case of dye-decolorizing peroxidases. *Biotechnol. Adv.* 65, 108153. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108153>
- Silva, D., Sousa, A.C., Robalo, M.P., Martins, L.O., 2022. A wide array of lignin-related phenolics are oxidized by an evolved bacterial dye-decolourising peroxidase. *N. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.12.003>
- Singh, S., Hinkley, T., Nugen, S.R., Talbert, J.N., 2018. Fusion of carbohydrate binding module to mutant alkaline phosphatase for immobilization on cellulose. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.003>
- Smith, A.G., Marsh, O., Elder, G.H., 1993. Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem. J.* 292, 503–508. <https://doi.org/10.1042/bj2920503>
- Smith, A.T., Santama, N., Dacey, S., Edwards, M., Bray, R.C., Thorneley, R.N.F., Burke, J.F., 1990. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme. *J. Biol. Chem.* 265, 13335–13343. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38303-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38303-6)
- Sok, V., Fragoso, A., 2019. Amperometric biosensor for glyphosate based on the inhibition of tyrosinase conjugated to carbon nano-onions in a chitosan matrix on a screen-printed electrode. *Microchim. Acta* 186. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3672-6>
- Songa, E.A., Arotiba, O.A., Owino, J.H.O.O., Jahed, N., Baker, P.G.L.L., Iwuoha, E.I., 2009a. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry* 75, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.02.007>
- Songa, E.A., Somerset, V.S., Waryo, T., Baker, P.G.L., Iwuoha, E.I., 2009b. Amperometric

- nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. *Pure Appl. Chem.* 81, 123–139. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-08-01-15>
- Songa, E.A., Waryo, T., Jahed, N., Baker, P.G.L.L., Kgarebe, B. V., Iwuoha, E.I., 2009c. Electrochemical nanobiosensor for glyphosate herbicide and its metabolite. *Electroanalysis* 21, 671–674. <https://doi.org/10.1002/elan.200804452>
- Sost, D., Amrhein, N., 1990. Substitution of Gly-96 to Ala in the 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* results in a greatly reduced affinity for the herbicide glyphosate. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 433–436. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90140-T](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90140-T)
- Spadiut, O., Herwig, C., 2013. Production and purification of the multifunctional enzyme horseradish peroxidase. *Pharm. Bioprocess.* 1, 283–295. <https://doi.org/10.4155/pbp.13.23>
- Sprankle, P., Meggitt, W.F., Penner, D., 1975. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Sci.* v. 23, 229–234. <https://doi.org/10.1017/S0043174500052929>
- Stallings, W.C., Abdel-Meguid, S.S., Lim, L.W., Shieh, H.S., Dayringer, H.E., Leimgruber, N.K., Stegeman, R.A., Anderson, K.S., Sikorski, J.A., Padgett, S.R., Kishore, G.M., 1991. Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase: A distinctive protein fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5046–5050. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.5046>
- Stavra, E., Petrou, P.S., Koukouvinos, G., Economou, A., Goustouridis, D., Misiakos, K., Raptis, I., Kakabakos, S.E., 2020. Fast, sensitive and selective determination of herbicide glyphosate in water samples with a White Light Reflectance Spectroscopy immunosensor. *Talanta* 214. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120854>
- Steinrücken, H.C., Amrhein, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1207–1212. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)90547-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90547-1)
- Sugano, Y., Yoshida, T., 2021. Dyp-type peroxidases: Recent advances and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22115556>
- Sun, Z., Liu, Q., Qu, G., Feng, Y., Reetz, M.T., 2019. Utility of B-Factors in Protein Science: Interpreting Rigidity, Flexibility, and Internal Motion and Engineering Thermostability. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00290>
- Suntres, Z.E., 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180, 65–77. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00382-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00382-7)
- Takano, H.K., Beffa, R., Preston, C., Westra, P., Dayan, F.E., 2019. Reactive oxygen species trigger the fast action of glufosinate. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03124-3>
- Takrama, J.F., Taylor, K.E., 1991. A continuous spectrophotometric method for monitoring phospholipase D-catalyzed reactions of physiological substrates. *J. Biochem. Biophys. Methods* 23, 217–226. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(91\)90014-N](https://doi.org/10.1016/0165-022X(91)90014-N)
- Tan, M.J., Hong, Z.Y., Chang, M.H., Liu, C.C., Cheng, H.F., Loh, X.J., Chen, C.H., Liao, C.D., Kong,

- K.V., 2017. Metal carbonyl-gold nanoparticle conjugates for highly sensitive SERS detection of organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 96, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.005>
- Teale, W., Palme, K., 2018. Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *J. Exp. Bot.* 69, 303–312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx323>
- Tekaya, N., Saiapina, O., Ben Ouada, Hatem, Lagarde, F., Ben Ouada, Hafedh, Jaffrezic-Renault, N., 2013. Ultra-sensitive conductometric detection of pesticides based on inhibition of esterase activity in *Arthrospira platensis*. *Environ. Pollut.* 178, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.013>
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., Steitz, T.A., 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *EMBO J.* 15, 5739–51.
- Tripathy, B.C., Pattanayak, G.K., 2012. Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0_3
- Tsafack, V.C., Marquette, C.A., Pizzolato, F., J. Blum, L., 2000. Chemiluminescent choline biosensor using histidine-modified peroxidase immobilised on metal-chelate substituted beads and choline oxidase immobilised on anion-exchanger beads co-entrapped in a photocrosslinkable polymer. *Biosens. Bioelectron.* 15, 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00066-X)
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189–1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- Tsumoto, K., 2010. Non-Denaturing Solubilization of Inclusion Bodies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 999, 1–4. <https://doi.org/10.2174/1389210202107372010>
- Turner, A.P.F., 1989. Current trends in biosensor research and development. *Sensors and Actuators* 17, 433–450. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(89\)80030-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(89)80030-7)
- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., 1987. *Biosensors: Fundamentals and applications, Biosensors: Fundamentals and Applications.* Oxford University Press, Oxford.
- Uematsu, K., 2022. Detection of hydrogen peroxide. *Anal. Sci.* 38, 457–458. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00052-3>
- Vaghela, C., Kulkarni, M., Haram, S., Aiyer, R., Karve, M., 2018. A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.136>
- Valle, A.L., Mello, F.C.C., Alves-Balvedi, R.P., Rodrigues, L.P., Goulart, L.R., 2019. Glyphosate detection: methods, needs and challenges. *Environ. Chem. Lett.* 17, 291–317. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0789-5>
- Vallejo, B., Picazo, C., Orozco, H., Matallana, E., Aranda, A., 2017. Herbicide glufosinate inhibits yeast growth and extends longevity during wine fermentation. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12794-6>
- Van Almsick, A., 2009. New HPPD-inhibitors - A proven mode of action as a new hope to solve current weed problems. *Outlooks Pest Manag.* 20, 27–30.

<https://doi.org/10.1564/20feb09>

- Viirlaid, E., Ilisson, M., Kopanchuk, S., Mäeorg, U., Rinken, A., Rinken, T., 2019. Immunoassay for rapid on-site detection of glyphosate herbicide. *Environ. Monit. Assess.* 191. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7657-z>
- Wagner, M.A., Trickey, P., Che, Z.W., Mathews, F.S., Jorns, M.S., 2000. Monomeric sarcosine oxidase: 1. Flavin reactivity and active site binding determinants. *Biochemistry* 39, 8813–8824. <https://doi.org/10.1021/bi000349z>
- Walsh, T.A., Schmitzer, P.R., Masters, R.A., Lo, W.C., Gast, R.E., Claus, J.S., Finkelstein, B.L., 2011. New Auxin Mimics and Herbicides, in: Krämer, W., Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds*. Wiley, pp. 277–304. <https://doi.org/10.1002/9783527644179.ch5>
- Wei, D., Wang, Y., Zhu, N., Xiao, J., Li, X., Xu, T., Hu, X., Zhang, Z., Yin, D., 2021. A Lab-in-a-Syringe Device Integrated with a Smartphone Platform: Colorimetric and Fluorescent Dual-Mode Signals for On-Site Detection of Organophosphorus Pesticides. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13, 48643–48652. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c13273>
- Wu, B., Nemeth, J.F., Janecki, D.J., Jones, B., Obmolova, G., Malia, T.J., Baker, A., Bethea, D., Elloso, M.M., Naso, M., Taudte, S., 2011. Expression, refolding and purification of a human interleukin-17A variant. *Cytokine* 53, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.07.002>
- Yaniv, O., Halfon, Y., Shimon, L.J.W., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F., 2012. Structure of CBM3b of the major cellulosomal scaffoldin subunit ScaA from *Acetivibrio cellulolyticus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 68, 8–13. <https://doi.org/10.1107/S174430911104807X>
- Yoshida, T., Sugano, Y., 2015. A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Arch. Biochem. Biophys.* 574, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.022>
- Yu, J., Lin, J., Li, J., 2021. A photoelectrochemical sensor based on an acetylcholinesterase-CdS/ZnO-modified extended-gate field-effect transistor for glyphosate detection. *Analyst* 146, 4595–4604. <https://doi.org/10.1039/d1an00797a>
- Yu, L.P.C., Kim, Y.S., Tong, L., 2010. Mechanism for the inhibition of the carboxyl-transferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by pinoxaden. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22072–22077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012039107>
- Yu, W., Liu, W., Huang, H., Zheng, F., Wang, X., Wu, Y., Li, K., Xie, X., Jin, Y., 2014. Application of a novel alkali-tolerant thermostable DyP-type peroxidase from *saccharomonospora viridis* DSM 43017 in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *PLoS One* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110319>
- Zambrano-Intriago, L.A., Amorim, C.G., Araújo, A.N., Gritsok, D., Rodríguez-Díaz, J.M., Montenegro, M.C.B.S.M., 2023. Development of an inexpensive and rapidly preparable enzymatic pencil graphite biosensor for monitoring of glyphosate in waters. *Sci. Total Environ.* 855, 158865. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158865>
- Zhang, H., Tweel, B., Tong, L., 2004. Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5910–5915.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0400891101>

- Zhang, J., Lu, J., Su, E., 2019. Soluble recombinant pyruvate oxidase production in *Escherichia coli* can be enhanced and inclusion bodies minimized by avoiding pH stress. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94, 2661–2670. <https://doi.org/10.1002/jctb.6075>
- Zhang, K., Guo, Y., Yao, P., Lin, Y., Kumar, A., Liu, Z., Wu, G., Zhang, L., 2016. Characterization and directed evolution of BliGO, a novel glycine oxidase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb. Technol.* 85, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.012>
- Zhang, Q., Xu, G., Gong, L., Dai, H., Zhang, S., Li, Y., Lin, Y., 2015. An enzyme-assisted electrochemiluminescent biosensor developed on order mesoporous carbons substrate for ultrasensitive glyphosate sensing. *Electrochim. Acta* 186, 624–630. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.10.081>
- Zhang, Y., Wu, Q., Sun, M., Zhang, J., Mo, S., Wang, J., Wei, X., Bai, J., 2018. Magnetic-assisted aptamer-based fluorescent assay for allergen detection in food matrix. *Sensors Actuators, B Chem.* 263, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.098>
- Zhao, T., Liang, X., Guo, X., Yang, X., Guo, J., Zhou, X., Huang, X., Zhang, W., Wang, Y., Liu, Z., Jiang, Z., Zhou, Hongke, Zhou, Haibo, 2023. Smartphone-based colorimetric sensor array using gold nanoparticles for rapid distinguishment of multiple pesticides in real samples. *Food Chem.* 404, 134768. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134768>