

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **12 janvier 2024**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur DELPRAT Nicolas**

Titre de la thèse : « *Conception de dispositifs enzymatiques sur supports cellulosiques pour la détection du glyphosate* »



Résumé

L'utilisation de pesticides, en particulier d'herbicides, dans l'agriculture moderne s'est généralisée. Cependant, ces substances peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement, la biodiversité et la santé humaine. Le glyphosate, en particulier, est l'herbicide le plus utilisé au monde et fait l'objet actuellement de discussions sociétales et politiques concernant son éventuelle prolongation d'utilisation en Europe en décembre 2023. Il est donc important de développer des méthodes de détection du glyphosate pour suivre sa concentration dans les champs, les eaux de surface et les produits alimentaires afin de prévenir les risques pour les utilisateurs et les consommateurs. Les biocapteurs et les essais biologiques, contrairement aux méthodes analytiques classiques, permettent une détection simple, peu coûteuse, sans altération de l'échantillon et sur le terrain. Ce travail de thèse propose un essai biologique hétérogène enzymatique permettant la détection du glyphosate dans les eaux de surface. Il s'appuie sur une enzyme spécifique du glyphosate (glyphosate oxydase obtenue par ingénierie moléculaire à partir de la glycine oxydase de *Bacillus subtilis*) exprimée sous forme de protéine de fusion avec un module de liaison aux glucides (*Carbohydrate Binding Module, CBM*) permettant son immobilisation sur un support cellulosique (papier ou coton) directement à partir d'un lysat bactérien. Cette enzyme catalyse de manière spécifique l'oxydation du glyphosate en milieu alcalin en produisant du peroxyde d'hydrogène. Trois techniques de détection du peroxyde d'hydrogène ont été mises au point et sont décrites dans ce manuscrit : (1) détection électrochimique à l'aide d'électrodes sérigraphiées sur du papier et modifiées par la synthèse *in situ* de particules de bleu de Prusse ; (2) détection colorimétrique sur du papier après immobilisation d'une peroxydase (HRP ou SviDyP-CBM) et d'un substrat chromogène ; (3) détection par colorimétrie et par chimiluminescence du luminol après immobilisation d'une peroxydase bactérienne (6E10-CBM) sur un coton-tige. Cette dernière méthode a permis la conception d'un essai biologique hétérogène par co-immobilisation de la GlyphOx-CBM et de la 6E10-CBM sur un coton-tige. La spécificité d'un tel dispositif analytique, caractérisé par une limite

de détection de 120 μM (colorimétrie) ou de 0,45 μM (chimiluminescence), a été validée en présence d'analogues structuraux du glyphosate (AMPA, glyoxylate et glycine) ou d'autres herbicides. La robustesse du dispositif a été validée dans des matrices environnementales (eaux du Rhône et de la Saône). En conclusion, outre la conception d'un essai biologique hétérogène, ce travail de thèse présente la co-immobilisation sur un support cellulosique d'une oxydase et d'une peroxydase, toutes deux exprimées sous forme de protéine de fusion avec un CBM. Cette stratégie permet l'assemblage d'un biocapteur en un minimum d'étapes et une détection rapide et spécifique du glyphosate sans manipulation importantes de la part de l'utilisateur.

