

PLATEFORME POUR LA DÉTECTION RAPIDE D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Ana C. Tavares¹, M.A. Gauthier¹, J. Perreault², N. Doucet²

NUMÉRO : 811075

Durée : 04/2012 – 12/2013

FAITS SAILLANTS

L'utilisation généralisée des antimicrobiens pour l'élevage intensif d'animaux est la cause principale de l'apparition alarmante chez l'homme de bactéries résistantes à ces substances. Le but du projet était de développer une plateforme de détection portable, hautement sensible, à faible coût, pour la détection et la quantification rapides des antibiotiques dans le lait.

Les travaux réalisés se sont concentrés autour de la mise au point de la plateforme électrochimique de détection et nous avons identifié deux familles de sondes moléculaires : les aptamères et une nouvelle protéine (mitoNEET). Les aptamères sont des molécules synthétiques d'ADN ou d'ARN avec un seul brin et une séquence unique, capables « d'entourer » les petites molécules dans leur structure unique avec une grande affinité et sélectivité. La mitoNEET est une métalloprotéine qui peut se lier spécifiquement à certaines molécules.

Une fois effectuée l'identification de la sonde spécifique à chaque antibiotique (sulfaméthoxazole, sulfisomidine, sulfadiazine, sulfacetamide), un réseau d'électrodes fonctionnalisées avec les sondes peut être fabriqué pour la détection simultanée des analytes. La transduction de l'évènement de détection en signal électrique (tension, courant ou résistance) par voie électrochimique permettra la détection et la quantification rapides des analytes.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Les objectifs spécifiques à court terme du projet comprenaient : 1) l'identification de récepteurs spécifiques pour la détection des antibiotiques, et 2) la mise en forme d'électrodes fonctionnalisées pour la détection des antibiotiques.

La méthodologie de criblage de banques d'aptamères « SELEX » / « SR-PAGE » en développement par le Pr. Perreault a été choisie pour la sélection en parallèle des séquences aptamère – analyte. La protéine mitoNEET a été synthétisée dans la forme réduite suivie par la formation des complexes oxydes de fer. Des électrodes ont été fonctionnalisées avec des molécules sondes, leur comportement électrochimique et l'évènement de détection ont été suivis par voltampérométrie cyclique.

RETOMBÉES SIGNIFICATIVES POUR L'INDUSTRIE

La figure 1 illustre la procédure utilisée pour la fabrication d'un capteur électrochimique à base d'aptamères. Dans une première étape, la surface de l'électrode d'Au est recouverte par l'aptamère et dans une deuxième étape le restant de la surface libre est recouverte par

1. INRS - Énergie, Matériaux et Télécommunication

2. INRS - Institut Armand Frappier

un thiol afin d'éviter l'adsorption non spécifique de possibles interférences. Une fois assemblé, le capteur est mis en contact avec une solution contenant l'antibiotique. L'assemblage de l'électrode et la détection de l'antibiotique peuvent être suivis par voltampérométrie cyclique, par voltampérométrie d'onde carrée ou éventuellement par spectroscopie d'impédance. Le signal électrochimique du couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/3^-$ est sensible au pourcentage de surface d'Or libre et à la charge (négative vs positive) de la couche assemblée, à la quantité d'aptamère liée à la surface de l'électrode et à la concentration d'antibiotique. Le signal électrochimique est aussi influencé par un éventuel changement de la configuration de l'aptamère après sa liaison avec la molécule cible.

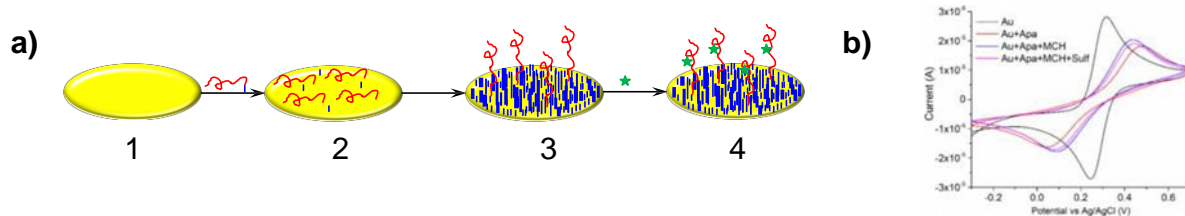


Figure 1. a) Principe de fabrication et de fonctionnement d'un capteur aptamérique pour la détection de la sulfadiméthoxine : 1) électrode d'Or; 2) recouvrement de la surface de l'électrode par 5'-disulfure de S; 3) recouvrement de la surface libre de l'électrode d'Or par 6-mercaptopropyl-1-hexanol (MCH); 4) interaction entre la sulfadiméthoxine et l'aptamère (« binding event »). (B) Voltampérogrammes cycliques enregistrés à 200 mV/s en présence de 2.5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/3^-$ en PBS (pH 7.4) et l'électrode d'Or (noir), Au/aptamère (rouge), Au/aptamère/MCH (bleu), et après l'interaction avec 1 mg/mL sulfadiméthoxine (mauve)

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET SUIVI À DONNER

Les techniques de détection actuelles des antibiotiques dans les matrices laitières sont lentes et laborieuses, en raison de l'utilisation obligatoire d'instruments sophistiqués (tests d'inhibition de croissance, chromatographie en phase liquide à haute performance, chromatographie en phase gazeuse, techniques immunochimiques), qui ne sont présents que dans des laboratoires centralisés. Ces essais sont soumis à la fragilité et à la réactivité croisée des anticorps, ce qui ne satisfait pas les besoins actuels, en plus d'avoir un coût élevé.

Les capteurs aptamériques électrochimiques sont une excellente plateforme vers le développement de technologies rapides, sensibles, fiables et à faible coût pour la détection des antibiotiques dans les matrices laitières avec des dispositifs portatifs. Le coût des aptamères est nettement inférieur par rapport aux anticorps et ils sont très faciles à synthétiser. Néanmoins, la composition et la mise en forme des électrodes reste à optimiser vis-à-vis le couple aptamère – cible, et l'effet de la matrice ainsi que des interférences doivent être soigneusement étudiés. Les capteurs aptamériques électrochimiques peuvent également être utilisés dans la détection d'une très vaste gamme d'analytes : ions métalliques, sucres, acides aminés, peptides, protéines, acides nucléiques, antibiotiques, virus, toxines, composés naturels et synthétiques.

Des études préliminaires sur la mitoNEET suggèrent que cette protéine peut être oxydée et réduite de façon réversible par voie électrochimique, une propriété à exploiter davantage dans le futur vis-à-vis la détection électrochimique de petites molécules.

POINT DE CONTACT

Ana C. Tavares
Institut nationale de la recherche scientifique (INRS)
Tél. : (514) 228-6947
Télécopieur : (450) 929 8147
Courriel : tavares@emt.inrs.ca

AUTRES TRAVAUX DE L'AUTEUR OU RÉFÉRENCES SUR LE MÊME SUJET

K.-M. Song, E. Jeong, W. Jeon, H. Jo, C. Ban, A coordination polymer nanobelt (CPNB)-based aptasensor for sulfadimethoxine, *Biosensors and Bioelectronics*, 33 2012, 113-119.

S. Eissa, Ng, M. Sij, A. C. Tavares, M. Zourob, Selection and Identification of DNA Aptamers against Okadaic Acid for Biosensing Application, *Anal. Chem.*, 85, 2013, 11794–11801.

D. W. Bak, J. A. Zuris, M. L. Paddock, P. A. Jennings, S. J. Elliott, Redox characterization of the FeS protein MitoNEET and impact of thiazolidinedione drug binding, *Biochemistry*, 48, 2009, 10193-10195.

PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre *Cultivons l'avenir* conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.