

---

## LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

### 1. Contexte

Les contaminants alimentaires chimiques sont des substances qui peuvent se retrouver, de façon non intentionnelle, sauf en cas de fraude, dans les denrées alimentaires ou dans les aliments pour animaux. Ces substances peuvent être présentes dans les aliments à différents stades de la production, de la transformation ou du transport. Ces substances peuvent aussi résulter d'une contamination de l'environnement. De nombreux produits chimiques d'origines anthropiques (*eg.* polluants organiques (*e.g.* dioxine), produits pharmaceutiques humains et vétérinaires, pesticides, biocides) et naturelles (métaux lourds (*e.g.* plomb, cadmium, mercure, uranium), métalloïdes (*e.g.* arsenic), toxines naturelles produites par les bactéries, protozoaires, algues, champignons et plantes) peuvent entrer dans l'alimentation animale, l'alimentation humaine et l'eau [4]. La présence de ces contaminants peuvent présenter un risque pour la santé animale et humaine. Les produits administrés de façon intentionnelle, font donc l'objet d'une évaluation du risque avant leur mise sur le marché.

Dans le cas des résidus de médicaments vétérinaires, ils se trouvent présents dans les denrées d'origine animale, suite aux traitements préventif ou curatif des animaux par ces médicaments. L'exposition aux résidus de médicaments vétérinaires dans les produits animaux doit tenir compte de la consommation des médicaments dans les productions animales. Les principaux résidus de médicaments vétérinaires dans l'Union Européenne sont les antibiotiques et les antiparasitaires. Deux types de résidus de médicaments vétérinaires susceptibles d'être présents sont : les résidus de principes actifs autorisés pour le traitement de maladies infectieuses chez les animaux de rente et les résidus de principes actifs interdits, en raison de problèmes de toxicité. De plus, les traitements réalisés sur les produits alimentaires, type stérilisation ou pasteurisation du lait, ne détruisent pas forcément les principes actifs. Ces traitements peuvent même engendrer des produits de dégradation qui, comme les molécules mères ou les métabolites, peuvent présenter des risques pour la santé des consommateurs [5].

Les risques liés à la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans les produits alimentaires d'origine animale sont les suivants :

- Les risques technologiques : la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait a pour effet de bloquer ou ralentir les fermentations microbiennes (bactéries lactiques) et donc la transformation (coagulation du lait) est perturbée, voire impossible.
- Les risques pour le consommateur :
  - o Les allergies : la présence de résidus d'antibiotiques dans l'alimentation humaine peut engendrer des réactions allergiques chez des personnes sensibles [6],
  - o Les risques toxicologiques aigus, à court terme et à long terme (*eg.* effets sur la reproduction, sur le développement foetal, effets mutagènes, effets cancérigènes, immunotoxicité, etc),
  - o Les risques de contamination environnementale,
  - o La survenue de bactéries résistantes aux antibiotiques : les graves problèmes causés par l'émergence et la propagation de la résistance aux antimicrobiens ont abouti à l'interdiction dans

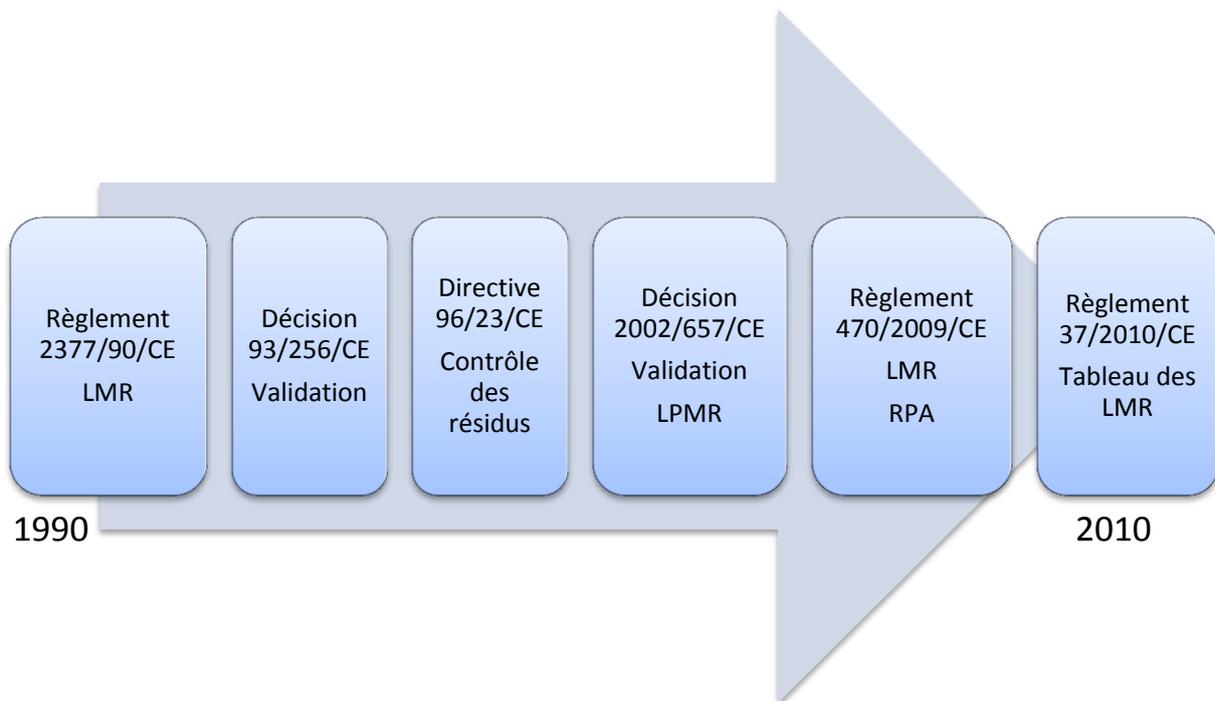
l'Union Européenne (EU) de l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance dans l'alimentation animale [7, 8]. Le nombre d'articles publiés sur le thème de la résistance aux antimicrobiens est en constante augmentation (moins de 1000 articles par an avant les années 2000). Cette résistance aux antibiotiques peut se propager à d'autres populations bactériennes et des vecteurs de maladies infectieuses devenus résistants aux traitements antimicrobiens peuvent présenter une menace pour la santé humaine et animale [9, 10].

## 2. Législation européenne et internationale

En raison de ces préoccupations, de nombreux pays ont interdit ou restreint l'utilisation de composés antimicrobiens chez les animaux producteurs d'aliments. Une législation spécifique protège les consommateurs contre l'exposition aux résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides et de contaminants environnementaux potentiellement dangereux dans les aliments d'origine animale. Depuis le début des années 1990, la commission européenne a mis en place progressivement des textes afin de protéger la santé du consommateur (**Figure 4**). Les différentes législations ont été publiées en fonction du type de contaminants alimentaires (par exemple la directive 96/23/CE pour les médicaments vétérinaires, les pesticides et les contaminants environnementaux [2]).

Des limites maximales de résidus (LMR) ont été définies pour les résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides et de contaminants environnementaux, en premier lieu dans le règlement 2377/90/CE [11] (**Tableau 1**). Des LMR définitives ou provisoires étaient fixées pour les substances autorisées. Ce règlement a été abrogé par les règlements 470/2009/CE [1] et 37/2010/CE [12], qui déterminent la liste des substances autorisées et des substances interdites. La définition des LMR n'a pas été modifiée. Il s'agit de « la concentration maximale d'un résidu d'une substance pharmacologiquement active qui peut être autorisée dans les aliments d'origine animale ». Une évaluation scientifique des risques est menée pour fixer les LMR. Cette évaluation porte sur la pharmacocinétique de la substance pharmacologiquement active (absorption, distribution, métabolisme et déplétion (ADME)), le type de résidu et la Dose Journalière Admissible (DJA). La DJA est la quantité de résidus qui peut être ingérée chaque jour par des êtres humains, sans présenter de risque pour la santé du consommateur. Les risques toxicologiques, pharmacologiques ou microbiologiques chez les êtres humains sont donc pris en compte de la fixation de cette LMR [1].

**Figure 4. Chronologie des principales réglementations concernant les résidus de médicaments vétérinaires.**



**Tableau 1. Limites réglementaires européennes.**

Limites réglementaires		Références
<b>Substance autorisée</b>	Limite maximale de Résidu (LMR)	Règlement 2377/90/CE (abrogé) Règlements 470/2009/CE [1] et 37/2010/CE [12]
	Limite de performance minimale requise (LPMR)	Décision européenne 2002/657/CE [13]
<b>Substance interdite</b>	Valeur de référence ou « Reference Point for Action » (RPA)	Règlement 470/2009/CE [1]
	Niveau d'Action Différentiel (NAD)	Groupe Consultatif sur les résidus de médicaments vétérinaires (Advisory Group for Veterinary Residues (AGVR)) pour le Veterinary Medicine Directorate (VMD), Royaume-Uni

Les LMR constituent des valeurs de référence pour la détermination du temps d'attente dans les autorisations de mise sur le marché (AMM) de médicaments vétérinaires destinés aux animaux producteurs de denrées alimentaires. Les LMR servent en outre de référence pour le contrôle des résidus dans les aliments d'origine animale au sein des États membres et aux postes d'inspection frontaliers (PIF).

Avec le règlement 2377/90/CE, les substances pour lesquelles aucune LMR ne pouvait être fixée, car elles constituaient un risque pour la santé du consommateur, étaient classées en annexe IV. Elles devaient être détectées à un niveau le plus faible possible. Ensuite, la décision européenne 2002/657/CE a défini pour ces mêmes substances, la Limite de Performance Minimale Requise (LPMR) comme « la teneur minimale en analyte dans un échantillon qui doit être au moins détectée et confirmée » [13]. La LPMR est une limite qui a pour objectif d'harmoniser les performances analytiques des méthodes applicables aux substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée. Elle est basée sur des critères analytiques, pas sur des dangers toxicologiques comme la LMR. La LPMR est donc un objectif de performance à atteindre, mais ne constitue pas un seuil au-dessus duquel on doit déclarer la non-conformité d'un échantillon. Un résultat doit être déclaré non conforme si la limite de décision ( $CC\alpha$ ) de la méthode de confirmation est dépassée [13].

Depuis, le règlement 470/2009/CE a établi des procédures pour fixer des valeurs de référence (« reference point for action ») (RPA) [1]. Ces RPA vont remplacer à terme les LPMR. Une RPA est le niveau de résidus d'une substance pharmacologiquement active, fixé dans l'objectif de contrôler certaines substances pour lesquelles aucune LMR n'a été fixée. Les RPA sont fixées en fonction de « la concentration en résidus la plus faible pouvant être quantifiée grâce à une méthode d'analyse validée conformément aux exigences communautaires ». Le laboratoire de référence de l'Union Européenne (LRUE) compétent peut renseigner la commission européenne sur les performances des méthodes d'analyse. Contrairement à la LPMR, la RPA est un seuil de déclaration de non-conformité d'un résultat. L'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (European Food Safety Agency (EFSA)) a délivré des avis scientifiques sur les méthodes et les procédures à suivre pour établir des RPA [14]. A la demande de la commission européenne, l'EFSA a publié des avis scientifiques sur les risques pour la santé humaine et animale, liés à la présence de certains résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Des RPA ont été fixées pour le chloramphénicol [15], les nitrofuranes [16] et le vert de malachite. Ces valeurs de référence sont applicables aux productions dans les pays tiers [17], mais aussi applicables aux productions dans l'Union Européenne [1].

Enfin, pour les médicaments vétérinaires qui n'ont pas de LMR (eg. nicarbazine), certains états membres ont pu fixer leurs propres seuils de décision, au-dessus desquels une action est intentée. Dans le cas de la nicarbazine par exemple, le Royaume-Uni a fixé un Niveau d'Action Différentiel (NAD) de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 1998. Un échantillon contenant de la nicarbazine au-dessus de cette limite est déclaré positif.

Aux États-Unis, le terme «niveau d'action» se réfère aux niveaux recommandés par l'Agence de protection environnementale (Environmental Protection Agency (EPA)) pour application par la FDA (Food and Drug Administration) et le ministère américain de l'Agriculture (USDA) (par exemple,

lorsque les résidus de pesticides se retrouvent dans l'alimentation humaine ou animale, pour des raisons autres que l'application directe du pesticide). Par opposition aux « tolérances » qui sont établies pour les résidus survenant comme une conséquence directe de l'utilisation appropriée, les seuils d'intervention sont fixés pour les résidus résultant d'une autorisation d'utilisation juridique antérieure ou de contamination accidentelle. Au Canada, les limites maximales sont établies par Santé Canada et sont exécutoires par l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). Certaines teneurs maximales apparaissent dans le Règlement sur les aliments et drogues, où ils sont considérés comme des «tolérances». Il y a aussi un certain nombre de limites maximales qui n'apparaissent pas dans le Règlement; ceux-ci sont considérés comme des «normes».

## II. L'ÉVOLUTION DES MÉTHODES (BIOLOGIQUES) DE DÉPISTAGE

### 1. **Historique des méthodes analytiques**

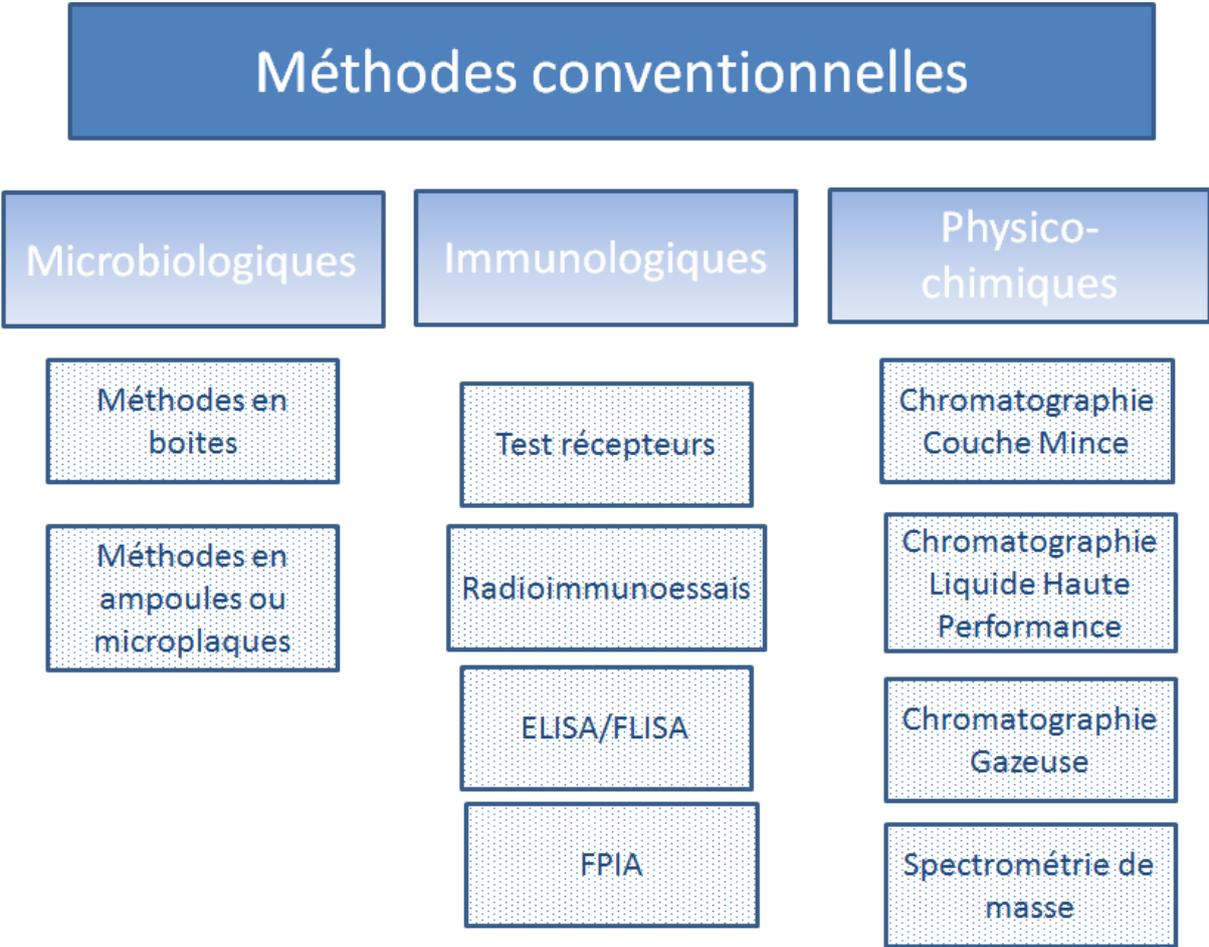
Les premières méthodes biologiques qui ont été développées pour la détection des résidus de médicaments vétérinaires ont été des méthodes microbiologiques [18-20]. Ces méthodes sont basées sur des tests de diffusion en gélose ou sur l'inhibition de la production d'acide par des bactéries (« méthode d'acidification »). Le principe est basé sur la sensibilité des bactéries à l'action des antibiotiques. Ces méthodes sont simples et peu coûteuses. Ensuite, des méthodes immunologiques ont été développées sur la base de la reconnaissance anticorps - antigène. Ces méthodes sont plus spécifiques en raison du principe de l'interaction anticorps - antigène. Ainsi, ces méthodes sont plus ciblées. Dans le même temps, des techniques ont été mises au point utilisant les propriétés physico-chimiques des antibiotiques (chromatographie en couche mince (CCM), chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)).

### 2. **Méthodes conventionnelles**

Nous allons différencier les méthodes dites conventionnelles (c'est-à-dire classiquement utilisées, car plus anciennes), des méthodes innovantes (nouvelles technologies, nouveaux outils de reconnaissance et/ou de détection). Trois grands types de méthodes conventionnelles utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont présentés dans la **Figure 5**.

Des méthodes physico-chimiques peuvent parfois être utilisées pour le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. Ce type de méthode de dépistage ne rentre pas dans le sujet de cette thèse et ne sera donc pas développé. Les méthodes conventionnelles pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale s'appuient essentiellement sur des méthodes microbiologiques et biochimiques. Les principes et caractéristiques des méthodes biologiques conventionnelles vont être développés ci-après.

Figure 5. Les différents types de méthodes appelées conventionnelles.



## 2.1. Méthodes microbiologiques

Les méthodes microbiologiques sont principalement utilisées pour la détection de deux types de contaminants alimentaires; les organismes pathogènes alimentaires et les résidus d'antibiotiques. Pour la détection des pathogènes alimentaires, les méthodes sont généralement constituées d'une étape d'enrichissement (la mise en culture sur des boîtes de gélose sélectives afin d'isoler l'organisme pathogène), suivie par une analyse phénotypique. Pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, les méthodes microbiologiques sont basées sur la sensibilité des souches bactériennes à l'action des antibiotiques et sur la spécificité d'action des antibiotiques. Généralement un milieu gélosé est inoculé avec une bactérie sensible et les résidus d'antimicrobiens vont diffuser dans la gélose, à partir de l'échantillon. L'inhibition de la croissance bactérienne indique la présence de composés antimicrobiens. Les méthodes microbiologiques sont capables de détecter une large gamme de résidus d'antibiotiques et les principales classes d'antibiotiques. Ces méthodes de dépistage possèdent un large spectre de détection.

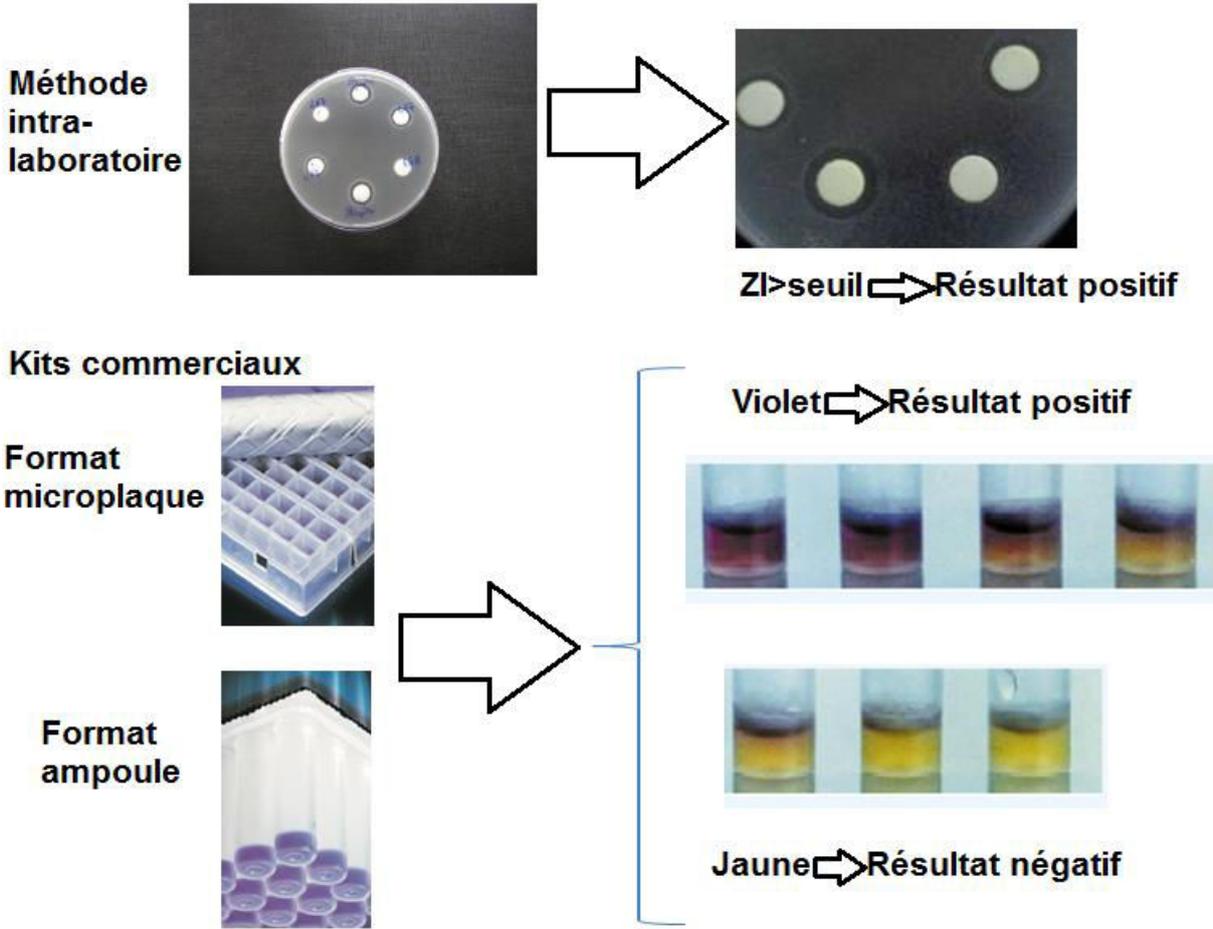
Les méthodes microbiologiques peuvent être classées en deux catégories (**Figure 6**):

- Les méthodes intra-laboratoire sont le plus souvent des méthodes en boîtes, à l'exception d'un test intra-laboratoire en tubes pour le contrôle officiel des antibiotiques dans le lait en France (test d'acidification [21]), qui n'est plus utilisé.
- Les kits commerciaux sont le plus souvent des tests en ampoules et/ou en microplaques, commercialisés prêts à l'emploi. Un seul germe est ensemencé dans le milieu, le plus souvent *Bacillus stearothermophilus* (**Tableau 2**).

Le temps d'incubation est généralement compris entre 2h15 et 3 heures pour les tests commerciaux, contre 12 à 24 heures pour les méthodes en boîtes. Les tests microbiologiques au format microplaque sont des méthodes de criblage à haut débit parce l'automatisation des analyses et des lectures est simple et très fréquente, ce qui n'est pas le cas des méthodes microbiologiques au format boîtes. Seulement 20 à 60 échantillons peuvent être analysés par des méthodes boîtes en fonction de la matrice et du nombre de boîtes. De même, un maximum de 40 à 60 échantillons peut être analysé par des tests en tubes (eg. Premi®Test). Par contre, dans le domaine du paiement à la qualité du lait, plusieurs centaines d'échantillons peuvent être analysés en une journée sur des tests microbiologiques au format microplaque.

L'avantage des méthodes en boîtes se situe dans la capacité à orienter vers l'identité de la famille d'antibiotiques présente dans l'échantillon. En effet, le choix d'une bactérie particulière et d'un milieu adapté permet d'orienter la détection plus spécifiquement vers une famille d'antibiotiques. La composition du milieu et son pH vont être favorables à la culture de la bactérie en question, mais aussi favoriser l'action d'une famille d'antibiotiques en particulier. Les tests commerciaux étant basés sur l'utilisation d'un seul germe, la famille de la substance donnant un résultat positif ne peut être identifiée.

Figure 6. Les différents types de méthodes microbiologiques et l'interprétation des résultats.



ZI = zone d'inhibition

La préparation de l'échantillon varie en fonction du format de la méthode et de la matrice. Pour les méthodes en boîte, le plus souvent le lait est déposé sur des disques de papier filtre, eux-mêmes déposés sur la gélose. Les matrices solides comme le muscle sont « carottées » dans un échantillon de muscle congelé. Puis des rondelles de 2 mm environ d'épaisseur sont préparées et déposées directement sur les boîtes. Pour les œufs, il est possible de faire des trous dans le milieu gélosé, puis d'y déposer la coule d'œuf (c.-à-d. mélange blanc et jaune). La préparation de l'échantillon est donc nulle ou très réduite. Pour les méthodes au format ampoules ou microplaques, le lait est aussi déposé sans préparation. Pour le muscle par exemple, l'échantillon peut être pressé ou passé au four à micro-ondes, pour en extraire le jus, qui sera ensuite déposé sur le milieu gélosé.

De nombreuses méthodes microbiologiques ont été rapportées pour l'analyse des résidus d'antibiotiques, que ce soient des tests commerciaux [22-28] ou des méthodes « maison » [28-34]. Ces méthodes peuvent s'appliquer à différentes matrices alimentaires : viande, lait, œufs, miel, etc. Les **Tableaux 2 et 3** présentent des exemples de méthodes microbiologiques utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale.

**Tableau 2. Exemples de tests commerciaux en ampoule et/ou en microplaques.**

Nom du test	Fournisseur	Souche bactérienne	Matrice	Durée d'analyse (heures (h))	Références
<b>Delvotest® P, SP, MCS, T, Accelerator</b>	DSM, Delft, Pays-Bas	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Lait	2,5-3	[23]
<b>CMT® (COPAN Lait Test)</b>			Lait	2,5-3	/
<b>Eclipse® 3G</b>	Zeu		Lait	2,5-3	/
<b>Eclipse® 100</b>	Inmunotech, Sarragose, Espagne		Lait de brebis	2,5-3	[22]
<b>Blue Yellow Test®</b>	Charm Sciences, Etats-Unis		Lait	2,5-3	/
<b>Charm AIM® 96</b>			Lait	2,5-3	/
<b>BRT-AIM®</b>	AIM, Allemagne		Lait	2,5-3	/
<b>Premi® test</b>	DSM, Delft, Pays-Bas		Viande, œufs	2,5-3	[25]
<b>Explorer® test</b>	Zeu Inmunotech, Sarragose, Espagne))		Viande, œufs	3-4	[24] [26]
<b>Kidney inhibition swab (KIS®) test,</b>	Charm Sciences, Etats-Unis		Jus de rein de bovin et serum	3-4	[27]
<b>Equinox®</b>	Zeu Inmunotech, Sarragose, Espagne	<i>Escherichia coli</i>	Lait, viande, œufs	18	[35]

**Tableau 3. Exemples de méthodes boîtes intra-laboratoire.**

Nom de la méthode	Souche bactérienne	Matrice	Durée d'analyse (h)	Références
<b>Méthode une boîte</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Muscle	18	[28]
<b>Méthode une boîte</b>	<i>Bacillus megaterium</i>	Muscle	6	[36]
<b>FAST test</b>	<i>Bacillus megaterium</i>	Rein	7	[27]
<b>Méthode des 4 Boîtes (FPT)</b>	<i>Bacillus subtilis</i> (3 boîtes), <i>Micrococcus luteus</i> (1 boîte) dans 4 milieux différents	Muscle	18-24	[19] [37]
<b>Méthode STAR</b>	5 souches bactériennes dans 4 milieux différents	Lait, muscle	18-24	[29] [30]
<b>NAT screening 5 boîtes</b>	5 souches bactériennes dans 5 milieux différents	Muscle et rein	16-18	[38] [34]
<b>Méthode 6 boîtes</b>	6 souches bactériennes dans 4 milieux différents	Muscle	18-24	[33]
<b>Méthode 7 boîtes</b>	<b>7 souches bactériennes dans 7 milieux différents</b>	<b>Muscle</b>	<b>18-24</b>	[31]

Screening Test for Antibiotic Residues (STAR); Nows antibiotic test (NAT) screening); Fast Antimicrobial Screening Test (FAST).

Une revue assez complète des méthodes microbiologiques utilisées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les tissus animaux a été publiée en 2009 [39]. En raison de leur faible coût et de leur large spectre, les méthodes d'inhibition microbiennes sont privilégiées pour mettre en place les programmes de surveillance à grande échelle des résidus de médicaments vétérinaires, tels que les plans de surveillance et plans de contrôle (PSPC) des Etats Membres de l'Union Européenne. Toutefois, ces méthodes de dépistage microbiologiques présentent le plus souvent des limites de détection trop élevées par rapport aux LMR pour certaines familles d'antibiotiques. Généralement, la famille des bêta-lactamines est correctement détectée, mais d'autres familles comme les sulfamides sont mal détectées. En outre, les temps d'incubation des méthodes en boîtes sont généralement longs (de 12 à 24 heures), avant d'obtenir le résultat. Pour cette raison, des méthodes de dépistage multi-résidus par CL-SM/SM (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) sont en cours d'élaboration [40-42]. Même si le coût des analyses est beaucoup plus élevé, les méthodes de dépistage par CL-SM/SM ont déjà remplacé les méthodes microbiologiques en routine, dans certains états membres Européens.

## ***2.2. Méthodes immunologiques***

Les méthodes immunologiques sont largement utilisées dans le domaine du dépistage des résidus de médicaments vétérinaires. Le principe commun à tous les tests immunologiques est la détection de l'interaction entre un anticorps et un antigène. Les composés de faible poids moléculaire, appelés haptènes en immunologie, ne sont pas immunogènes. Les médicaments vétérinaires en général et les antibiotiques en particulier sont de faible poids moléculaires. La préparation d'anticorps dirigés contre des haptènes nécessite la liaison covalente de l'haptène à une protéine support et l'immunisation des animaux par les immunogènes ainsi synthétisés. Le mode de liaison chimique de l'haptène à une protéine détermine la spécificité de l'anticorps [43]. Les anticorps peuvent être polyclonaux, monoclonaux ou recombinants, en fonction de leurs propriétés sélectives et la façon dont ils sont synthétisés. Les anticorps polyclonaux sont produits en utilisant des procédures de vaccination traditionnelles, à savoir chez les lapins, les chèvres, les moutons et les porcs. Les anticorps polyclonaux présentent deux inconvénients : un problème de reproductibilité (il n'est pas possible de produire des anticorps de spécificité identique, même chez deux animaux de la même espèce), et la quantité d'anticorps produite est limitée. D'autre part, le développement d'anticorps monoclonaux est limité, d'une part par le coût plus élevé de production et d'autre part parce que la technologie des hybridomes est plus complexe et risquée. C'est pourquoi les anticorps polyclonaux sont les réactifs les plus largement utilisés dans les analyses immunochimiques à ce jour. Cependant l'ingénierie des anticorps et la production d'anticorps recombinants est un domaine de développement très prometteur pour le développement de nouvelles méthodes d'immunoanalyse.

En raison de la petite taille des molécules d'antibiotiques, le principe d'immunoessai sandwich n'est pas applicable. En conséquence, toutes les méthodes développées pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires sont basées sur un immunoessai compétitif, c'est-à-dire

que le signal est inversement proportionnel à la concentration en antibiotiques dans l'échantillon (**Figure 7**). Les molécules d'analytes non marqués dans l'échantillon entrent en compétition avec l'analyte marqué (ou conjugué) pour un nombre limité de sites de liaison des anticorps (ou des récepteurs). Si l'analyte est présent dans l'échantillon, il y aura moins d'analyte marqué qui se liera à l'anticorps, de sorte que le signal va diminuer. Au contraire, s'il n'y a pas d'analyte dans l'échantillon, rien ne viendra empêcher l'analyte marqué de se lier avec l'anticorps et alors le signal sera maximum. Ainsi, le signal est inversement proportionnel à la concentration en antibiotique dans un l'échantillon.

Les méthodes immunologiques conventionnelles peuvent être divisées en 4 groupes principaux, dans le domaine du dépistage des résidus.

### 2.2.1. Test récepteurs

Les tests récepteurs utilisent une bandelette réactive sur laquelle un ligand récepteur est fixé sur une bande de membrane. L'échantillon à analyser est appliqué sur la bandelette et laissé en contact pour interagir avec le récepteur. La **Figure 8** présente l'interprétation des résultats de ce type de test. La ligne contrôle (CTRL) doit apparaître dans tous les cas pour que l'essai soit valide. Comme il s'agit d'un immunoessai compétitif, le signal (intensité de la ligne TEST) diminue quand la concentration en résidus dans l'échantillon augmente. Un échantillon négatif présente une ligne TEST d'intensité égale ou supérieure à la ligne CTRL. Un échantillon est déclaré positif quand l'intensité de la ligne TEST est plus faible que celle de la ligne CTRL. Les résultats peuvent être interprétés par observation visuelle directe des lignes de test et de contrôle, mais les fabricants proposent parfois un lecteur optique dédié, ce qui élimine la subjectivité de l'utilisateur. La couleur développée peut également être quantifiée soit par rapport à une échelle de couleurs standard ou en mesurant par spectrophotométrie [44-46].

Figure 7. Principe d'un immuno-essai compétitif : diminution du signal avec l'augmentation de la concentration en résidus.

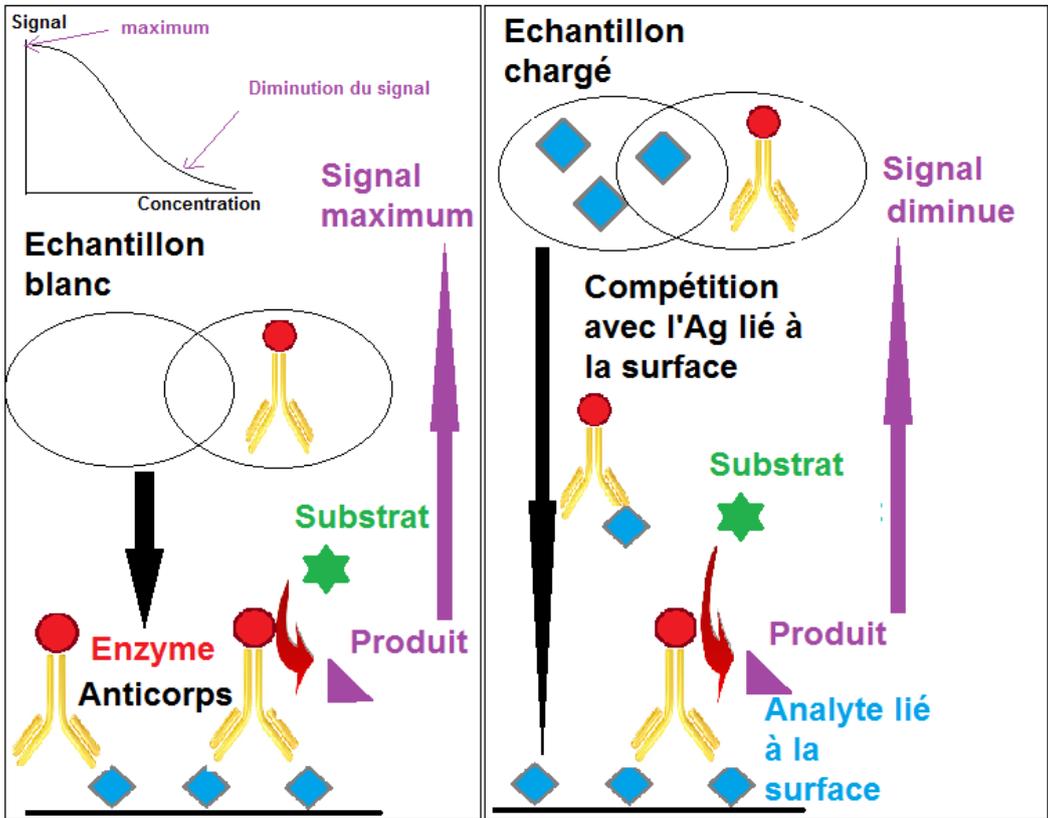
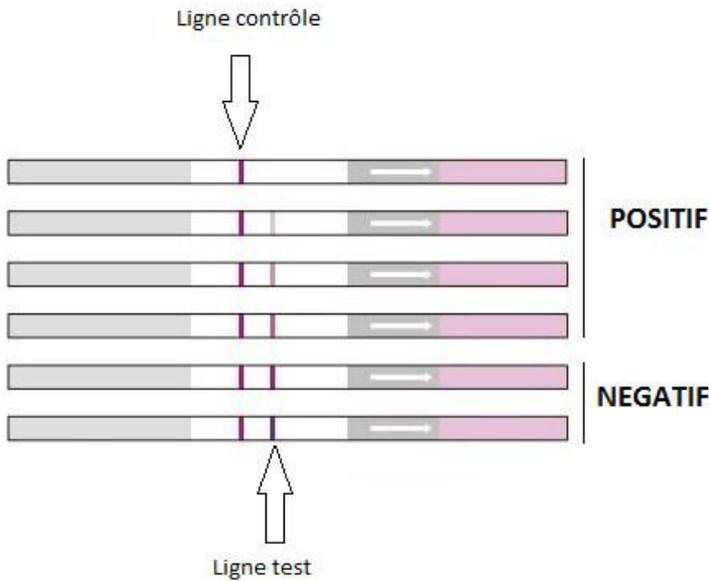


Figure 8. Illustration des résultats des tests récepteurs.



La particularité des tests récepteurs pour la détection des résidus d'antibiotiques est que de nombreux tests sont disponibles dans le commerce, en particulier pour le dépistage des bêta-lactamines dans le lait (**Tableau 4**). Ces tests sont généralement conformes aux LMR de la plupart des antibiotiques cibles dans les matrices concernées. Les résultats sont généralement disponibles entre 2 et 8 minutes après le début de l'analyse, à l'exception d'un temps plus long nécessaire pour l'analyse du miel (environ 30 minutes) [47, 48].

Les nouveaux développements de tests récepteurs pour les résidus antibiotiques sont axés sur le multiplexage, qui permet la détection de plusieurs familles d'antibiotiques simultanément, sur la même bandelette, avec plusieurs lignes (eg. Twinsensor BT®, Unisensor (Angleur, Belgique) pour les bêta-lactamines et les tétracyclines ; Quadrisensor®, Unisensor (Angleur, Belgique) pour les bêta-lactamines, les tétracyclines, la dihydrostreptomycine, la streptomycine et le chloramphénicol ; Charm Rosa® Charm Sciences, Lawrence, MA, Etats-Unis pour les bêta-lactamines et les tétracyclines).

### 2.2.2. Radioimmunoessais (RIA)

Les radioimmunoessais (RIA) utilisant des marqueurs radioactifs étaient la méthode d'analyse la plus répandue en termes d'immunoessais pendant des décennies. Les RIA ont été appliqués à de nombreux domaines, y compris la chimie clinique, la pharmacologie, et la surveillance de l'environnement. Cette technique nécessite un marquage préalable de l'analyte avec une molécule radioactive.

Dans le domaine de la détection des résidus d'antibiotiques dans les aliments, le test Charm II® (Charm Sciences, USA) est reconnu et encore utilisé pour le dépistage des antibiotiques. Le test Charm II® est un compteur à scintillation liquide qui permet de tester un large éventail de résidus d'antibiotiques dans les tissus, les produits laitiers, les produits d'aquaculture, les œufs, le miel, etc. Le test Charm II® en fonction des kits permet soit le dépistage spécifique d'un seul résidu, soit un dépistage multi-résidus (**Tableau 4**).

### 2.2.3. Méthode immunoenzymatique (ELISA) et méthode immunoenzymatique par fluorescence (FLISA)

Les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (méthode immunoenzymatique) sont aussi basés sur l'interaction d'un anticorps avec un analyte. La technique ELISA nécessite la production préalable d'un conjugué qui consiste en une enzyme couplée à un analyte. Ensuite, la détection se fait en ajoutant un substrat, qui va être transformé en un produit coloré sous l'action de l'enzyme. Les tests ELISA peuvent être développés «maison» (intra-laboratoire) ou il s'agit de kits commerciaux. Parmi les méthodes immunologiques, l'ELISA au format microplaque (96 puits) est fréquemment utilisé pour le dépistage rapide d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. De nombreux kits ELISA sont disponibles dans le commerce. La préparation de l'échantillon peut varier d'une simple dilution à une extraction liquide/liquide ou même en phase solide, en fonction des matrices et des tests.

**Tableau 4. Exemples de méthodes immunologiques, commerciales ou intra-laboratoire.**

Nom du test, Fournisseur		Analyte/Matrices	Références
Tests récepteurs	Beta-star®, Neogen Corporation, Etats-Unis)	Béta-lactamines/Lait	[49]
	SNAP® test, Iddex, Etats-Unis		[50]
	ROSA BL-TET®, Charm Sciences, Etats-Unis		/
	Charm MRL-3, Charm Sciences, Etats-Unis		[51]
	Delvotest BLF®, DSM, Pays-Bas		AFNOR (2012)
	Tetrasensor®, Unisensor, Belgique	Tétracyclines/Lait, miel, tissus	[48]
	Sulfasensor®, Unisensor, Belgique	Sulfamides/Lait, miel, tissus	[47]
Radio immunoessais	Charm II, Charm Sciences, Etats-Unis	Béta-lactamines/Lait	[52]
		Tétracyclines/Lait /Miel	[53] [54]
		Macrolides/Viande	[55]
		Aminosides, sulfamides/Miel	[56]
		Chloramphénicol/Miel	[57]
		Béta-lactamines, macrolides, sulfamides, aminosides, et tétracyclines/Œufs /Crevettes	[58] [59]
ELISA	Europroxima, Pays-Bas	Chloramphénicol/Muscle, œufs, lait, miel	[60]
	TECNA, Italie	Tylosine, tilmicosine/Miel	[61]
	RIDASCREEN®, r-Biopharm, Allemagne	Aminosides/Lait	[62]
	Intra-laboratoire	Métabolites de nitrofuranes/Muscle, œufs, miel, lait Muscle, chair de poissons	[63] [64]
		Sulfamides/Foie de poulet /Lait	[65] [66]
		Quinolones/Rein, produits de la mer, œufs, muscle	[67]
		Béta-lactamines/Lait	[68]
		Tétracyclines/Poissons	[69]
FPIA	Intra-laboratoire	Sulfanilamide/Lait	[70]
		Sulfaméthoxy-pyridazine et Sulfachloropyridazine/Lait	[71]
		Chloramphénicol/Lait	[72]
		Fluoroquinolones/lait	[73]

Les matrices ciblées sont nombreuses, y compris le lait, le muscle, le foie, le miel et les produits de l'aquaculture (**Tableau 4**).

Dans la majorité des cas, les tests ELISA sont ciblés sur la détection d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques. Toutefois, Adrian et al. ont développé une méthode ELISA multi-analytes pour la détection simultanée de 3 familles d'antibiotiques (sulfamides, fluoroquinolones et bêta-lactamines) dans le lait [74]. Pour cela, la microplaque a été divisée en trois sections. Dans chaque section, les puits sont greffés avec l'antibiotique spécifique (couplé à une protéine). Ensuite, le mélange des trois biorécepteurs est déposé sur toute la microplaque, avec les échantillons. Comme chaque section de la microplaque est spécifique d'une famille, le test permet d'identifier la famille d'antibiotiques présente dans l'échantillon.

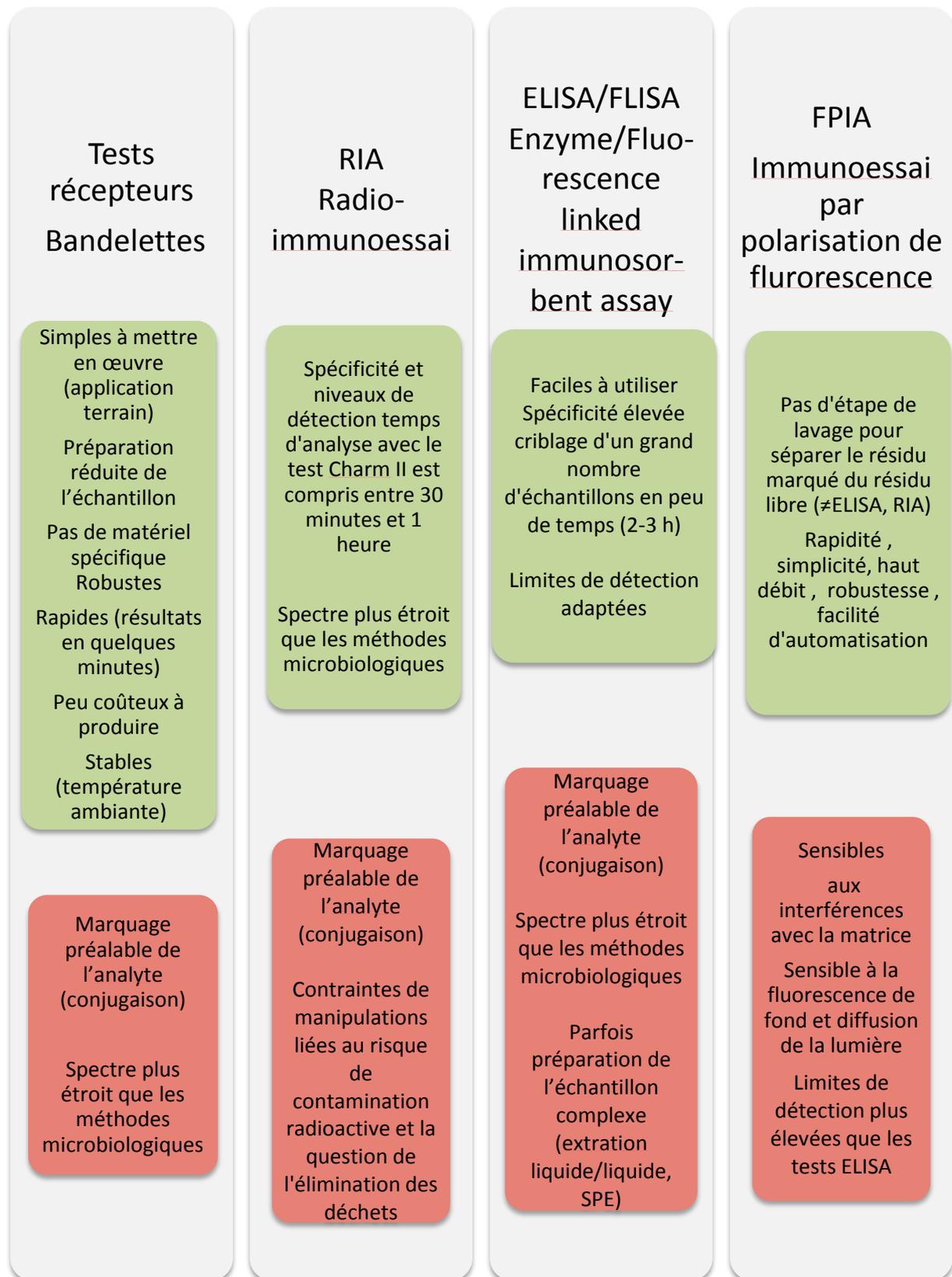
Les tests FLISA sont des dérivés de la technique ELISA. Un nouveau type d'immunoessai a été développé en utilisant deux types de capteurs (une enzyme et des boîtes quantiques (Quantum Dots (QD)) pour détecter 6 sulfamides et 11 quinolones dans le lait [75]. Les boîtes quantiques sont des nanocristaux inorganiques qui sont utilisés comme fluorophores. Elles ont été utilisées récemment comme marqueurs fluorescents dans des dosages immunologiques [76]. Les limites de détection de ces méthodes semblent satisfaisantes et l'utilisation des QD a permis de simplifier le prétraitement de l'échantillon.

#### 2.2.4. Méthode immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA)

Le principe de détection de la FPIA est basé sur les différences de polarisation de la fluorescence de l'analyte marqué dans les fractions libres et ou les fractions liées (liaison anticorps/analyte). La première étape est le marquage de l'analyte avec un marqueur fluorescent (fluorescéine). Le résidu et le résidu marqué entrent en compétition dans le mélange réactionnel. Le degré de polarisation de la lumière fluorescente est mesuré et peut être corrélé à la quantité de résidu dans l'échantillon inconnu. Cependant, les méthodes de fluorescence peuvent être sensibles aux interférences avec la matrice. Dans ce cas, une préparation des échantillons doit normalement être réalisée, suivie d'une séparation avant la détection du fluorophore. Le premier article concernant l'application de FPIA à la détection de résidus d'antibiotiques [77].

En conclusion, les méthodes immunologiques conventionnelles de dépistage sont applicables à de nombreuses matrices, mais pour une variété d'analytes réduite. De plus, leur simplicité et leur rapidité est contrebalancée par le marquage nécessaire de l'analyte avec une enzyme ou un fluorophore (conjugaison) et souvent une trop grande spécificité (**Figure 9**).

Figure 9. Les avantages et les inconvénients des différents formats de méthodes immunologiques.



En effet, la spécificité des méthodes immunologiques par rapport aux méthodes microbiologiques, en raison de l'interaction antigène / anticorps est un avantage dans le cas de substances interdites, mais peut être un inconvénient dans le cas de substances à LMR pour laquelle un grand nombre de molécules doivent être détectées. Par exemple, concernant le dépistage des 4 métabolites de nitrofuranes (AOZ, AMOZ, SEM et AHD), 4 kits ELISA différents doivent être mis en œuvre en parallèle (un kit par métabolite), tandis qu'une méthode CL-SM/SM peut détecter les 4 résidus simultanément [78]. Le contrôle officiel est principalement réalisé par des méthodes CL-SM/SM.

En ce qui concerne le contrôle officiel des substances autorisées (substances LMR), une méthode de dépistage doit détecter une large gamme d'antibiotiques, à faible coût, et pouvoir analyser un nombre élevé d'échantillons. Par conséquent, une méthode microbiologique est finalement plus rapide et moins coûteuse que la mise en œuvre d'une série de kits ELISA pour détecter toutes les substances autorisées.

### 3. Méthodes innovantes :

#### 3.1. Les biocapteurs

La technologie d'analyse basée sur des capteurs possède un champ d'application extrêmement large, dans les grands secteurs industriels, y compris les produits pharmaceutiques, les produits de santé, l'alimentation, l'agriculture, l'environnement et l'eau. En lien avec les inconvénients des méthodes conventionnelles, il y a un besoin croissant de développer des biocapteurs hautement sélectifs et efficaces pour le contrôle rapide, simple et économique d'une large gamme de molécules dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire, le diagnostic médical et la recherche. Les biocapteurs peuvent permettre de répondre à certaines de ces attentes : rapidité, fiabilité, faible coût, bon rapport qualité - prix, et simples à mettre en œuvre par du personnel peu qualifié.

Les biocapteurs sont en plein développement depuis de nombreuses années. Le champ d'application des biocapteurs d'affinité a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Le nombre de publications concernant les biocapteurs augmente chaque année. L'utilisation de biocapteurs dans le domaine du contrôle des aliments a commencé à apparaître dans la littérature vers 1980 [79-82]. Dans le domaine de la détection des résidus d'antibiotiques dans l'alimentation, les premières publications datent des années 1980 à 1990 [83-85]. Les progrès dans la conception et la fabrication de biocapteurs pour la détection des contaminants alimentaires sont présentés ici.

Les biocapteurs se composent de deux éléments principaux: un élément biorécepteur ou de biorecognition (par exemple, des anticorps), qui reconnaît l'analyte cible, et un élément de transduction de signal (par exemple, un transducteur optique) pour convertir une réponse biologique en un signal électrique [86] (**Figure 10**).

Chacun des éléments du biocapteur et chacune des étapes de la méthode a une influence sur la performance du biocapteur. Les biocapteurs peuvent être classés soit selon le type de biorécepteur, soit selon le type de transducteur (**Figure 11**).

Figure 10. Principe d'un biocapteur.

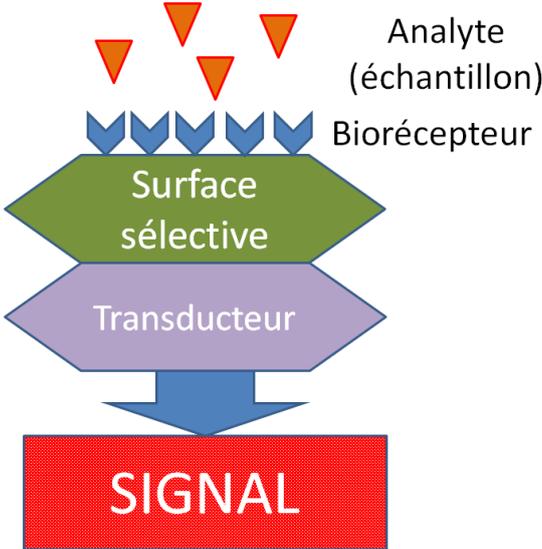
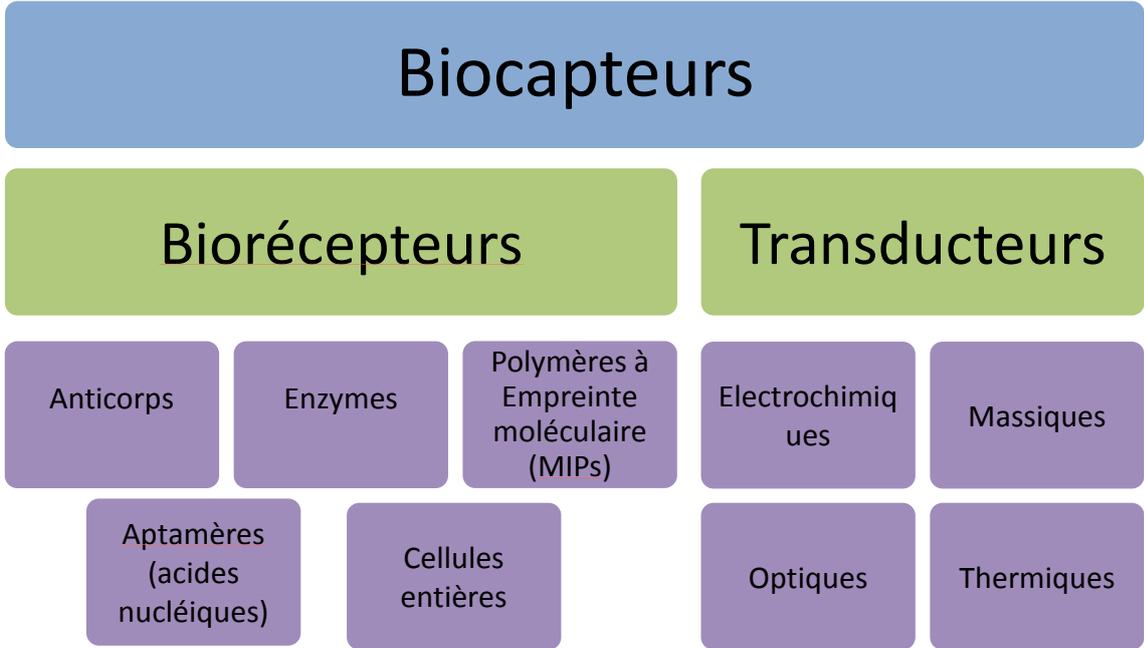


Figure 11. Les différents types de biocapteurs.



#### 3.1.1.1. Biorécepteurs

Un biorécepteur est une espèce moléculaire biologique (par exemple un anticorps, un enzyme, une protéine, ou un acide nucléique) ou un système biologique vivant (par exemple, des cellules, des tissus ou des organismes entiers) qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique [87] (**Figure 12**). Dans la base de données Scopus, le mot-clé « biosensor » a été combiné avec chaque type de biorécepteur afin d'obtenir le nombre de publications, qui est représenté dans la **Figure 13**.

##### 3.1.1.1.1. *Anticorps*

Les anticorps sont des biorécepteurs couramment utilisés dans le développement des biocapteurs. Un anticorps spécifique correspond à son antigène unique, d'une manière hautement spécifique. Dans les biocapteurs, ils sont généralement immobilisés sur un substrat, qui agit comme la surface du détecteur. Les immunocapteurs basés sur des anticorps sont souvent décrits en combinaison avec des éléments de transduction piézo-électrique, électrochimique, ou optique. Les anticorps restent pour le moment les biorécepteurs les plus couramment utilisés pour le développement de biocapteurs, dans de nombreux domaines d'analyse, et particulièrement pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. Différents anticorps contre les antibiotiques et autres médicaments vétérinaires sont aujourd'hui disponibles commercialement. Cependant, il n'y a aucune garantie que ces anticorps commerciaux, même les anticorps monoclonaux, seront toujours disponibles sur une longue période, avec la même qualité et en quantité suffisante. Ainsi, les méthodes développées avec ces anticorps pourraient devenir obsolètes.

##### 3.1.1.1.2. *Enzymes*

Bien que les enzymes soient l'un des éléments de bioreconnaissance, ils sont principalement utilisés pour fonctionner comme des marqueurs plutôt que comme l'élément de bioreconnaissance en tant que tel. Les biocapteurs basés sur des enzymes reposent principalement sur deux mécanismes pour la détection. Le premier mécanisme implique la transformation catalytique d'un analyte par l'enzyme (généralement d'une forme non détectable à une forme détectable). Le second mécanisme implique la détection d'analytes qui inhibent ou modèrent l'activité de l'enzyme. Les biocapteurs enzymatiques utilisent des enzymes spécifiques pour la capture et la production catalytique du produit, qui est alors directement déterminé en utilisant un transducteur (*eg.* électrochimique, optique). Le biocapteur enzymatique le plus répandu aujourd'hui est le biocapteur pour la détection du glucose dans le sang. Son application pour les patients diabétiques a été l'élément déclencheur et moteur pour la recherche sur ce type de capteur.

Dans l'analyse des contaminants, les biocapteurs enzymatiques pour l'analyse des herbicides sont les plus courants, avec moins d'applications signalées pour les antibiotiques. Un biocapteur enzymatique a été développé pour détecter la pénicilline [88]. La pénicillinase est produite par des bactéries transformées (*Escherichia coli* JM109), qui ont été immobilisées sur une l'électrode d'un pH-mètre. Ce biocapteur répondait à des concentrations de pénicilline faibles ( $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  M) en solution. Ce biocapteur n'a pas été appliqué à des matrices alimentaires, plus complexes.

Figure 12. Les différents types de biorécepteurs immobilisés sur les surfaces des biocapteurs.

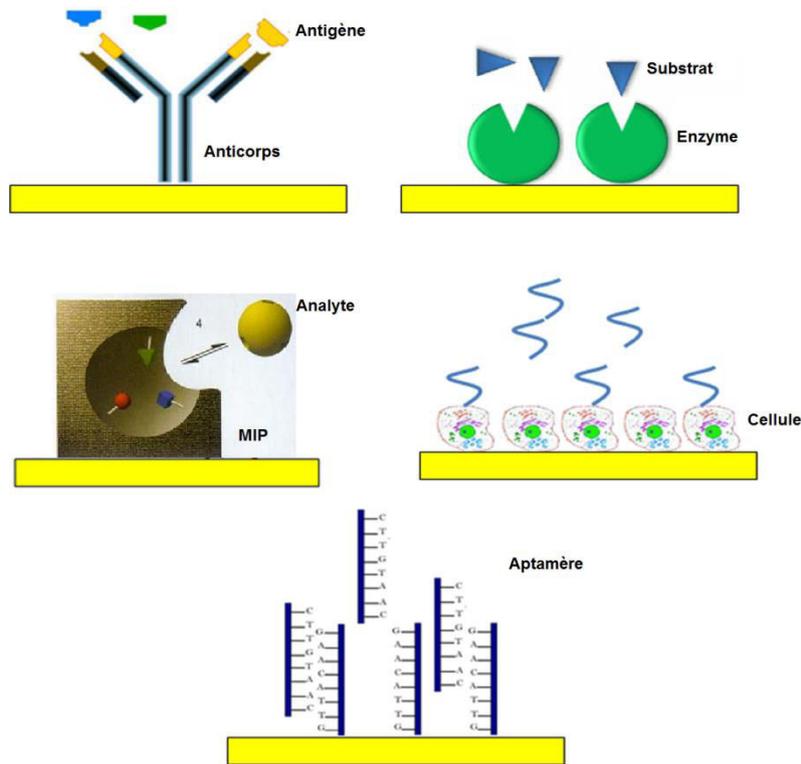
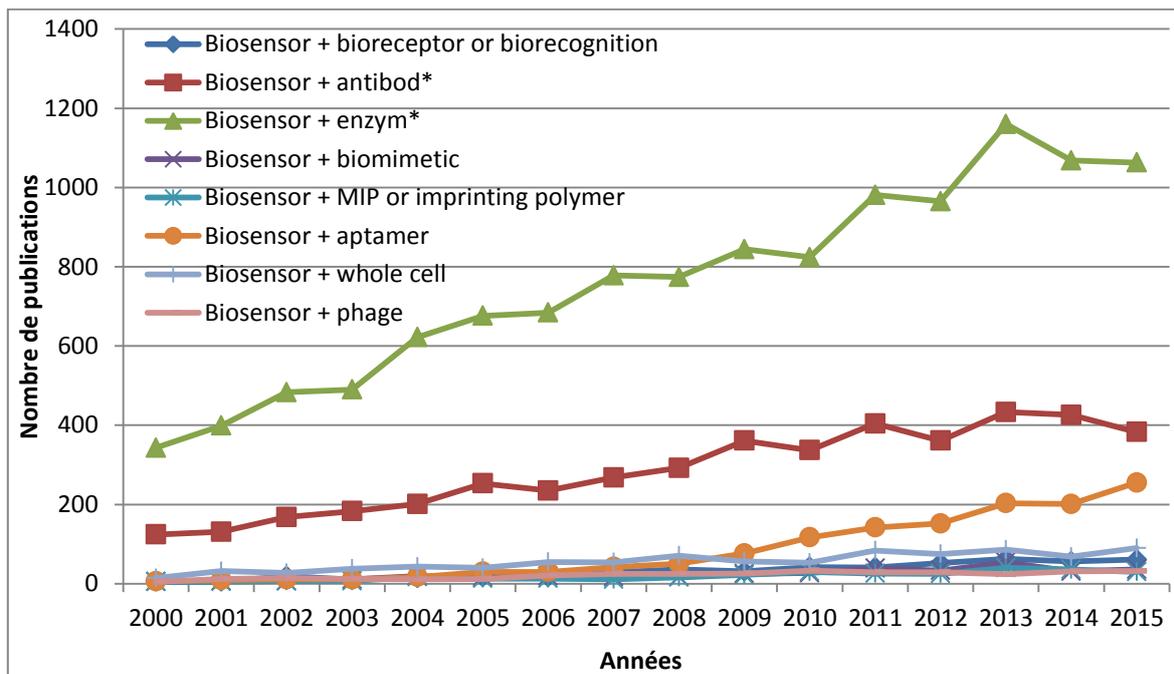


Figure dérivée de [https://radium.net.espci.fr/esp/CONF/2006/C06\\_01/conf01\\_2006.htm](https://radium.net.espci.fr/esp/CONF/2006/C06_01/conf01_2006.htm) et de Perumal & Haschim [89].

Figure 13. Evolution du nombre d'articles (Scopus) concernant les biorécepteurs de 2000 à 2015.



### 3.1.1.1.3. Récepteurs biomimétiques

Un récepteur qui est conçu pour imiter un récepteur biologique naturel est appelé un récepteur biomimétique. Les récepteurs biomimétiques artificiels, tels que les aptamères et les polymères à empreinte moléculaire, montrent des propriétés proches de celles des anticorps telles qu'une affinité élevée et la sélectivité.

Les récepteurs biomimétiques sont une classe prometteuse de récepteurs synthétiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques en particulier. Dans la bibliographie, ils font l'objet d'un nombre croissant d'articles depuis les années 2000 dans plusieurs domaines, tels que la recherche de bactéries pathogènes, de contaminants environnementaux ou dans le diagnostic clinique (**Figure 13**).

#### **Polymères à empreinte moléculaire (Molecular Imprinting Polymer ou MIP)**

Une molécule empreinte (« template ») est la molécule qu'on introduit dans le mélange de prépolymérisation pour la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire (MIP) [90] (**Figure 14**). Elle correspond à la molécule cible du biorécepteur. Le site de reconnaissance pour la molécule cible, formé dans la cavité du MIP, est libéré par l'élimination de la molécule empreinte. Les MIP sont principalement utilisés pour la détection de petites molécules, telles que les antibiotiques. Depuis une dizaine d'années, les MIP sont développés pour différents contaminants alimentaires et en particulier les antibiotiques [91-93].

#### **Aptamères (acides nucléiques)**

Les aptamères sont des ligands d'ARN ou d'ADN simple brin qui sont sélectionnés pour reconnaître différentes cibles à partir d'une immense bibliothèque de molécules contenant des séquences créées au hasard. La production d'aptamères a été décrite pour la première fois au début des années 1990. La technologie de sélection des aptamères appelée SELEX (Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel ; Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) est une technologie intégrée basée sur la chimie combinatoire, la technique de PCR (réaction en chaîne par polymérase ; Polymerase Chain Reaction), et le séquençage de gènes [94] (**Figure 15**). Des cycles répétés sont effectués de sorte que les séquences spécifiques augmentent de façon exponentielle et que les séquences ayant une faible affinité sont éliminées. Les aptamères sont adaptés pour la reconnaissance de petites molécules, mais aussi de composés de poids moléculaire élevé et même de cellules entières. Les aptamères sont stables, réutilisables, facilement modifiables pour l'immobilisation sur une surface, avec une bonne affinité. De plus, ils sont très spécifiques de l'analyte cible et sont produits *in vitro*.

Les biocapteurs utilisant un aptamère comme élément de reconnaissance sont appelés « aptasensors ». Les applications en matière de sécurité alimentaire sont très diverses. Certains « aptasensors » ont été développés pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale (*eg.* aminosides [95], chloramphénicol [96], oxytétracycline [97]), ampicilline [98], sulfadiméthoxine [99], colorants organiques (vert de malachite) [100]).

Figure 14. Processus de fabrication d'un MIP (extrait de <http://www.icoa.fr/fr/>).

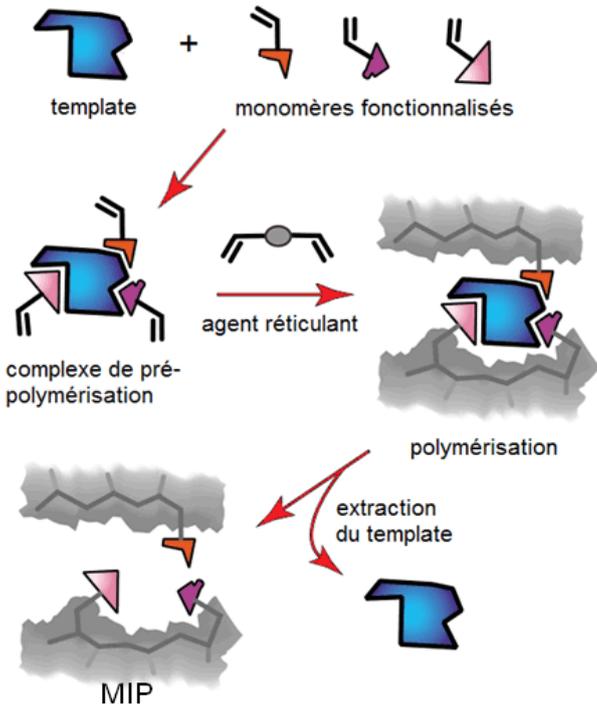
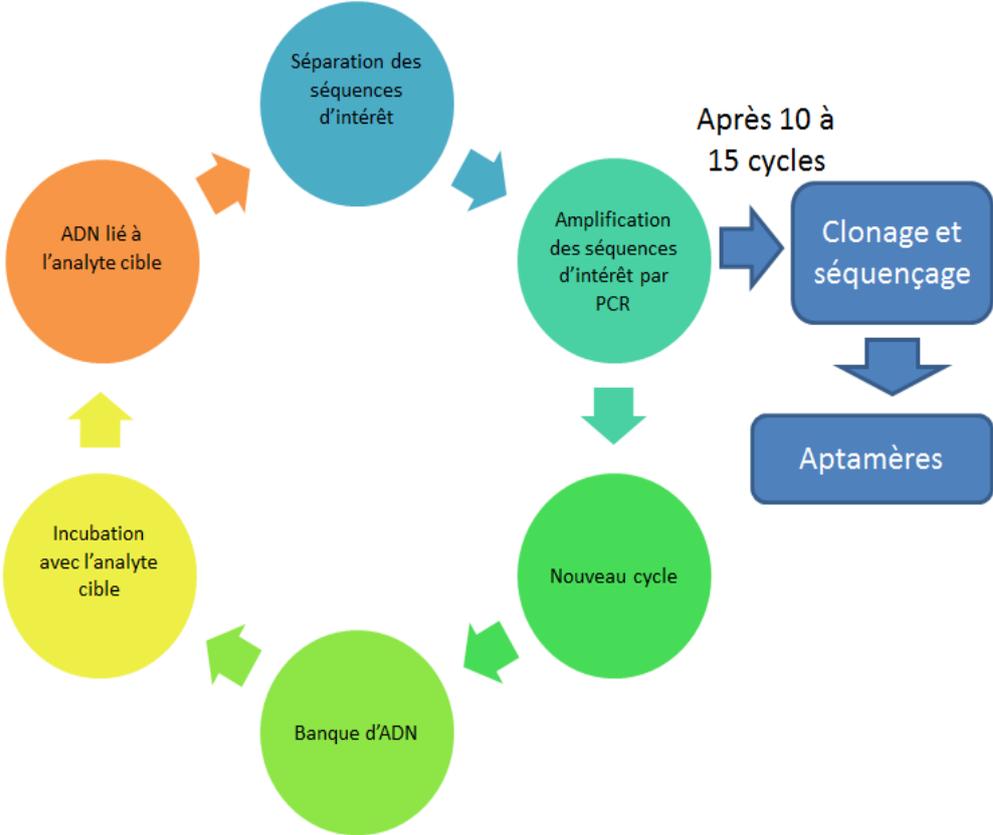


Figure 15. Processus de fabrication d'un aptamère.



Les biorécepteurs alternatifs, de type MIP et aptamères, présentent l'avantage de pouvoir être préparés *in vitro*, évitant ainsi de travailler sur des animaux, et permettant de produire des outils de reconnaissance pour des molécules non immunogènes et toxiques. Les aptamères et les MIP sont plus stables que les anticorps dans des conditions environnementales parfois drastiques, ce qui est important si on veut faire du contrôle *in situ*. De plus, le coût de l'analyse est réduit du fait de la durée de vie longue du biocapteur.

La marge de progression la plus visible parmi les récepteurs biomimétiques est celle du développement des aptamères, sans doute grâce à leurs nombreux avantages. L'inconvénient majeur des MIP et des aptamères est que le développement commercial de ces biorécepteurs en est encore à ses débuts [101-103]. Des colonnes de préparation des échantillons, pour extraction en phase solide SPE (Solid Phase Extraction) sont commercialisées, pré-greffées avec des MIP pour la détection de résidus d'antibiotiques (*eg.* Sigma-Aldrich (France) pour le chloramphénicol, les quinolones), mais les MIP seuls ne sont pas disponibles commercialement.

#### *3.1.1.1.4. Le type cellulaire*

Un biocapteur microbien est constitué d'un transducteur en liaison avec des cellules microbiennes immobilisées, viables ou non viables. Les biocapteurs cellulaires utilisent la réponse de cellules entières pour la détection d'agents biologiquement actifs. Une revue de l'utilisation de cellules microbiennes comme éléments de détection biologique dans les biocapteurs a été publiée en 2001 [104]. Les biocapteurs microbiens sont un domaine de recherche en plein essor. Actuellement, différentes espèces microbiennes contenant des gènes appelées rapporteur (« reporter ») et qui sont spécifiquement induits par des promoteurs sélectionnés sont utilisées dans le développement de biocapteurs cellulaires. En présence de l'analyte cible, le gène inductible est activé et active ou réprime l'expression d'un gène rapporteur qui est responsable de la production d'un signal optique qui est donc mesurable. Par conséquent, les biocapteurs cellulaires microbiens basés sur une détection optique sont particulièrement intéressants dans le criblage à haut débit, car ils peuvent être utilisés pour contrôler simultanément plusieurs analytes.

La sélection d'une culture bactérienne appropriée est essentielle, comme dans les méthodes microbiologiques conventionnelles, puisque les bactéries spécifiques utilisées dans des biocapteurs ont des spectres caractéristiques qui peuvent ou peuvent ne pas correspondre avec le spectre de composés qu'on souhaite détecter.

Une revue a été publiée sur les progrès récents dans la fabrication et l'application des biocapteurs microbiens basés sur différents types de transducteurs pour la détection d'une large gamme d'analytes dont le glucose, les herbicides, et les antibiotiques [105]. Des biocapteurs cellulaires ont été développés pour la détection des résidus d'antibiotiques (tétracyclines [106, 107], bêta-lactamines [107-111], quinolones [110], chloramphénicol et quinolones [111]). La plupart des biocapteurs cellulaires présentés récemment la détection des résidus d'antibiotiques permettent la détection simultanée de plusieurs analytes en 30 minutes à 3 heures. Les avantages et les inconvénients de ces différents types de biorécepteurs sont présentés dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5. Avantages et inconvénients des différents types de biorécepteurs.**

		<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Anticorps</b>	<b>Monoclonaux</b>	Spécificité large Quantité illimitée et reproductibilité Fortes affinités	Coût élevé Fortes affinités
	<b>Polyclonaux</b>	Coût faible	Spécificité trop forte Quantité limitée et manque de reproductibilité
<b>Enzymes</b>		Généralement plus précis Réponses plus rapides (courts trajets de diffusion) que les capteurs utilisant des cellules comme biorécepteur	Instabilité intrinsèque Coût de production > anticorps Performance variable (eg. pH, température, épaisseur de la couche d'enzyme sur le capteur)
<b>B I O R E C E P T E U R S</b>	<b>MIP</b>	Affinités et spécificités équivalentes ou ↑ /aux anticorps, thermostabilité Sensibilité↑ Réutilisable Production : coût ↓/anticorps, simple, rapide, reproductible	Risque de relargage de la molécule empreinte Insolubilité Peu de cavités imprimées du MIP correspondent vraiment à la molécule empreinte Pas commercialisés
	<b>Aptamères</b>	Fortes affinités Spécificité ↑, sensibilité↑ Stabilité (molécule, surfaces immobilisées (> anticorps > enzymes)) Réutilisable Production : coût ↓/anticorps, simple, reproductible, automatisable	Fortes affinités Très peu commercialisés
<b>Cellules</b>		Plusieurs analytes simultanément Sélectivité ↑ Capacité à métaboliser une large gamme de composés chimiques Capacité d'adaptation (conditions défavorables) Modifications génétiques (eg. mutation), Source économique d'enzymes intracellulaires Limites de détection faibles Potentiel haut débit d'analyses	Sélection, culture et entretien complexe Parfois problème de sélectivité (réponse cellulaire non spécifique (eg. réactions secondaires, catalysées par d'autres enzymes)) Spécificité ↓ / enzymes pures Temps de réponse lents / biocapteurs enzymatiques (Diffusion du substrat et des produits à travers la paroi cellulaire)

#### 3.1.1.1.5. Immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces d'interaction

De cette immobilisation et de la préparation de la surface du transducteur dépendent la spécificité, les limites de détection atteintes par le biocapteur ainsi fabriqué et sa stabilité. En effet, le biorécepteur doit être accessible pour l'interaction et actif biologiquement (non dénaturé). Tous ces biorécepteurs sont immobilisés sur le transducteur de différentes manières (**Tableau 6**).

#### 3.1.1.1.6. Les nouveaux biorécepteurs

Les éléments de reconnaissance peuvent constituer le facteur limitant dans les développements de nouveaux biocapteurs. C'est pourquoi de nombreuses recherches sont ciblées sur le développement de nouveaux éléments de biorecognition, qui doivent être spécifiques ou sélectifs, très stables, peu coûteux à fabriquer, et reproductibles. Les tendances futures sont le développement de nouveaux biorécepteurs ou l'amélioration de biorécepteurs existants. Des exemples de nouveaux biorécepteurs récemment mis au point sont donnés ci-dessous :

- Les afficorps (ou « affibodies ») sont des protéines de liaison synthétiques qui présentent des caractéristiques intéressantes (*eg.* petite taille, robustesse, stabilité, forte spécificité), par rapport aux anticorps classiques [112]. A ce jour, les afficorps sont utilisés principalement dans le domaine de l'imagerie et du diagnostic médical (*eg.* cancer) et pour des applications thérapeutiques, et très récemment pour le développement de biocapteurs [113].
- Des liposomes couplés à une surface de polydiacétylène (PDA) ont été conçus pour le dépistage des aminosides. Le mécanisme de détection imite les interactions membranaires cellulaires entre la néomycine et les phospholipides [114].
- Un aptamère développé pour la reconnaissance de résidus d'aminosides a été modifié grâce à différentes approches [115]. L'objectif était de travailler sur la structure des aptamères afin que la reconnaissance aptamère-analyte conduise à des changements de conformation plus importants et donc plus faciles à détecter. Les biocapteurs ainsi développés, en combinant l'amélioration de la partie transduction électrochimique et celle de l'aptamère ainsi modifié, ont permis de diminuer les limites de détection par 100.
- Selon un principe similaire, un MIP permettant la détection du métronidazole a été modifié afin d'être à la fois l'outil de reconnaissance de l'analyte, mais aussi l'enzyme pour la détection du signal électrochimique [116].
- Les nanozymes [117] combinent le développement de nouveaux biorécepteurs et les nanotechnologies [117-119]. Les nanozymes qui miment l'activité de l'enzyme, sont plus robustes, plus stables et moins coûteuses à produire que les enzymes naturelles. A ce jour, les nanozymes ont été développées principalement pour des applications biomédicales (*eg.* glucose) et environnementales (*eg.* pesticides [120]).

**Tableau 6. Les différentes techniques d'immobilisation des biorécepteurs sur les surfaces.**

	Principe	Avantages	Inconvénients
<b>Adsorption</b>	Forces de Van der Waals	Simplicité, non dénaturation du biorécepteur	Instabilité (pH, force ionique, température, solvant)
<b>Inclusion</b>	Immobilisation physique au sein d'une matrice polymère (eg. polyacrylamide)	Activité enzymatique préservée (pas de liens chimiques)	Risque d'altération des biorécepteurs Risque de gêner l'accessibilité du site actif du biorécepteur
<b>Confinement</b>	En solution derrière une membrane sélective (eg. membrane à dialyse)	Biodégradation ou contaminations limitées	Complexe à mettre en œuvre Risque de gêner l'accessibilité du site actif du biorécepteur
<b>Immobilisation covalente</b>	Couplage covalent (support préalablement activé)	Grande stabilité Contraintes diffusionnelles réduites	Risque d'altération des biorécepteurs Technique laborieuse
<b>Immobilisation par réticulation</b>	Fabrication de membranes insolubles dans l'eau et qui s'adsorbent sur une surface solide	Stabilité (relargage du ligand difficile)	Risque de perturber la cinétique enzymatique (problèmes de diffusion dans la membrane) Risque d'altération des biorécepteurs
<b>Immobilisation par affinité</b>	Affinité entre deux molécules (eg. streptavidine/biotine ( $k_d \sim 10^{-15}M$ ), presque autant qu'une liaison covalente)	Stabilité Conditions de régénération plus drastiques (à partir du moment où le biorécepteur ne perd pas son activité) Même orientation pour tous les biorécepteurs	Interférence potentielle entre le biorécepteur modifié (eg. biotinylé) et des composants naturels (eg. Biotine naturellement présente dans certains tissus (eg. lait, foie, œufs, ...)) Interférence potentielle entre la molécule de liaison (eg. avidine ou streptavidine) et des composants naturels (eg. œufs)

Constante de dissociation :  $k_d$ .

Figure 16. L'évolution du nombre annuel de publications sur les biocapteurs dans la base de données Scopus de 2000 à 2015.

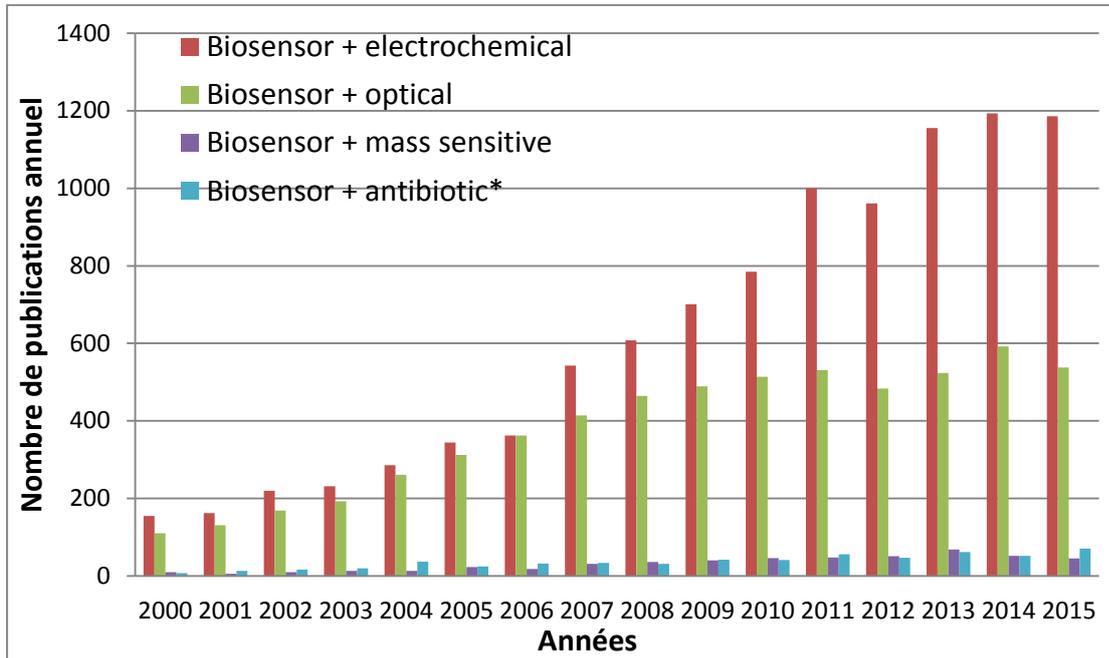
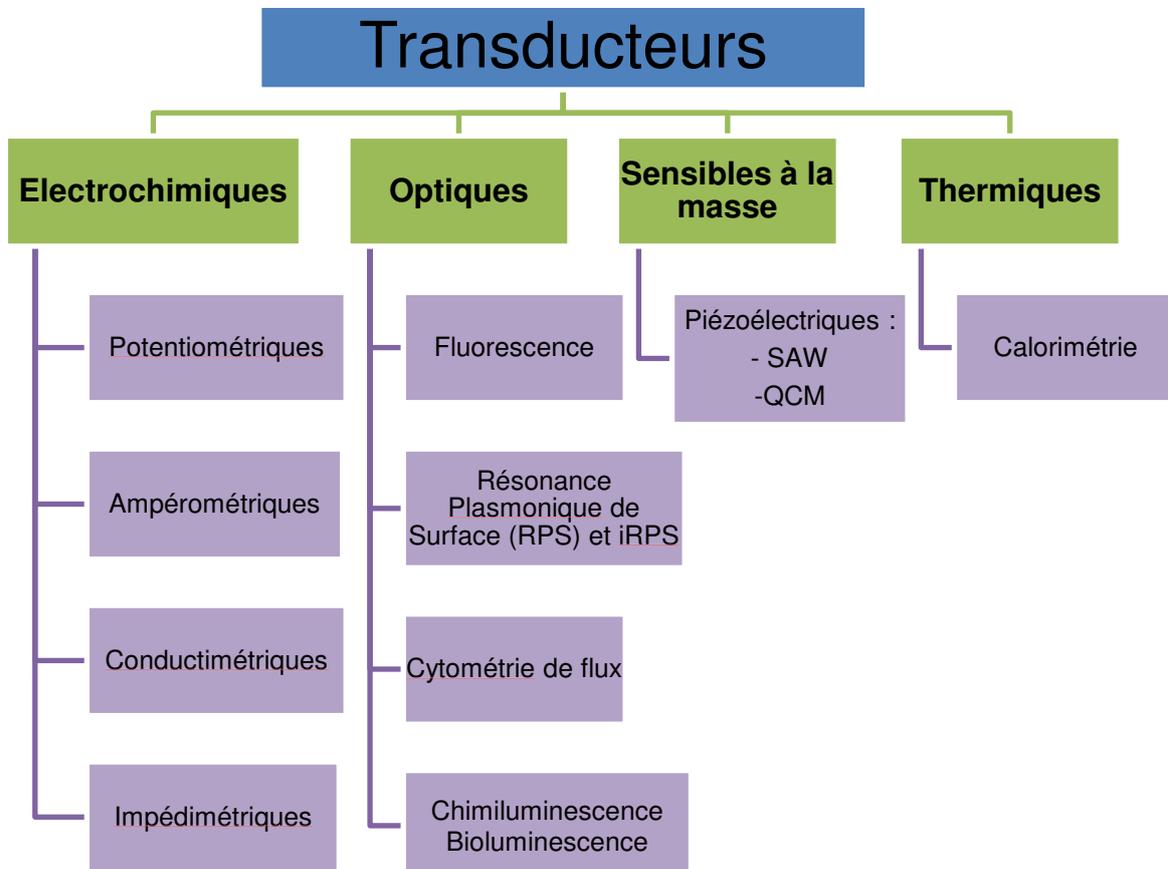


Figure 17. Différentes classes et sous-classes de biocapteurs, en fonction du type de transducteur.



### 3.1.1.2. Transducteurs

Dans cette section, la classification est basée sur le type de transducteur. De nombreux modes de transduction ont été développés dans la dernière décennie. Bien qu'il existe des développements constants de nouveaux types de transducteurs, les transducteurs optiques, électrochimiques et ceux basés sur le changement de masse sont présentés ici car ce sont les méthodes les plus populaires et fréquemment citées dans le domaine du dépistage des contaminants alimentaires et plus particulièrement des résidus d'antibiotiques (**Figure 16**). Chacune de ces trois classes principales contient de nombreuses sous-classes différentes (**Figure 17**).

Les différents types de transducteurs présentent chacun des avantages et des inconvénients qui vont être discutés ci-dessous.

#### 3.1.1.2.1. *Transducteurs électrochimiques*

Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur l'immobilisation de biorécepteurs sur une électrode. Des réactions chimiques entre les biorécepteurs immobilisés au contact direct d'un élément de transduction électrochimique et des analytes cibles produisent ou consomment des ions ou des électrons. Les propriétés électriques de la solution sont affectées et un signal est mesuré, par exemple un courant électrique (ampérométrie) ou un potentiel (potentiométrie) [121, 122]. Ce type de biocapteur est un système capable de fournir une détection spécifique quantitative [122]. L'élément de reconnaissance biologique, est très souvent une enzyme (parfois immobilisée sur l'électrode, mais pas nécessairement), ou parfois une membrane ou une surface sensible à une espèce électrochimique donnée.

Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques pour convertir l'information chimique en un signal électrique mesurable [121, 122] (**Tableau 7**).

La technique de détection électrochimique a commencé son développement au début des années 1950. Aujourd'hui, cela reste le procédé le plus populaire pour détecter l'oxygène et les gaz toxiques tel que le monoxyde de carbone. Les dispositifs potentiométriques les plus courants sont les électrodes de pH. Le premier article concernant le développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection de résidus d'antibiotiques (l'amphotéricine B et la nystatine) a été publié en 1979 [84]. Depuis, de nombreux articles ont été publiés concernant la production de biocapteurs électrochimiques, parmi les différents types présentés. Des exemples fournis dans le **Tableau 8** illustrent quelques applications de ces biocapteurs pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.

**Tableau 7. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs électrochimiques.**

	Principe	Avantages	Inconvénients
<b>Ampérométrie</b>	Electrodes (Au, C, Pt) aux enzymes Oxydation ou réduction électrochimique d'une espèce électro-active => Mesure du courant résultant	Simplicité Automatisation Miniaturisation Très sensibles Coût ↓ Plus adaptés à la production de masse que les transducteurs potentiométriques	Marquage de l'analyte pour augmenter la réaction électrochimique à l'électrode de travail
<b>Potentiométrie</b>	Electrodes redox ou sélectives aux ions (ISE) ou Transistors à effet de champ (FET) Détection d'un ion produit par une réaction enzymatique => Mesure d'une différence de potentiel entre 2 électrodes	Sans marquage Simplicité Automatisation facile Miniaturisation de l'instrumentation Coût ↓	Manque de spécificité (eg. autres ions en solution) Effet de la force ionique à des concentrations élevées Dérive possible du signal Moins sensible et plus lent qu'ampérométrie
<b>Conductimétrie</b>	Electrodes de Pt ou Au Réactions biochimiques produisant ou consommant spécifiquement des ions => Mesure la conductivité électrique d'une solution à tension constante	Simplicité Coût ↓ Biocompatibilité avec échantillons biologiques Pas d'électrode de référence Miniaturisation possible	Manque de spécificité (Interférence potentielle d'autres ions en solution) Moins sensible / potentiométrie et ampérométrie
<b>Impédancemétrie ou impédimétrie</b>	Mesure la variation de la résistance et/ou de la capacité interfaciale entre la surface de l'électrode et une solution	Sans marquage Très sensibles Simple, rapide Coût ↓	Mauvaise reproductibilité => pas d'analyse quantitative de routine

Or : Au ; Carbone : C ; Platine : Pt.

Les biocapteurs conductimétriques et capacitifs sont en général peu utilisés et encore moins pour le dépistage des antibiotiques [123]. L'un des inconvénients majeurs des biocapteurs impédimétriques est une mauvaise reproductibilité, ce qui empêche leur application dans l'analyse quantitative de routine. Par contre, ils pourraient potentiellement être utilisés pour des analyses qualitatives [124].

La technologie de multiplexage permet de multiplier le nombre de paramètres mesurés pour un seul échantillon et en utilisant un seul outil analytique. Plusieurs analytes peuvent être détectés simultanément dans un même échantillon. Le multiplexage peut s'appliquer aux biocapteurs électrochimiques. Par exemple, Conzuelo et *al.* ont développé une méthode de détection simultanée et rapide de trois familles d'antibiotiques dans le lait [125]. Le multiplexage vient de l'utilisation de plusieurs billes magnétiques greffées avec trois biorécepteurs différents pour la détection des 3 familles d'analytes.

Parmi les diverses méthodes de transduction, les techniques électrochimiques sont étudiées en raison de leurs **avantages potentiels tels que le faible coût, la simplicité, la rapidité, la miniaturisation de l'instrumentation et la portabilité**. Parmi eux, les biocapteurs ampérométriques représentent une alternative prometteuse dans le développement de dispositifs pour l'analyse sur le terrain.

**Tableau 8. Exemples de biocapteurs électrochimiques pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.**

	Analyte	Matrice	Biorécepteur	Surface d'interaction	Enzyme ou composition de la membrane	Durée de l'essai (min)	Référence
<b>Ampérométrie</b>	SULF	Lait	Anticorps	SPCE	HRP	30	[126]
	TCYC	/	Induction d'un gène par un promoteur	Electrode de platine	Expression d'une enzyme (eg. $\beta$ -galactosidase)	/	[127]
	BL	Lait	PBP	SPCE	HRP	30	[128]
	CEPH, SULF, TCYC	Lait	Anticorps + PBP	Billes magnétiques	HRP	5	[125]
<b>Potentio-métrie</b>	QNL, TTC	Lait	Cellules entières <i>E. coli</i>	Pile galvanique	/	120	[129]
	Erythromycine	Lait, miel	MIP	Electrodes Au + NP Au	/	/	[130]
	Pénicilline G	Lait	Pénicillinase	Electrode Platine	Film de polytyramine	1-2	[131]
<b>Impédance-métrie et conducti-métrie</b>	Pénicilline G	Lait	Anticorps	Electrode en or	SAM	20-25	[132]
	CAP	Crevettes	Anticorps	Nanoparticules d'or	SATUM	30	[133]
	Néomycine	Lait	Anticorps	SWNT	Papier filtre	10	[134]
	Ampicilline, kanamycine A	Lait	Aptamère	Electrode	PEDOT	2-3	[135]

*Béta-lactamines (BL); Céphalosporines (CEPH); Sulfamides (SULF); Tétracyclines (TCYC); Quinolones (QNL); Chloramphénicol (CAP); Protéine de liaison à la pénicilline (PBP); Péroxydase de Raifort (HRP); Escherichia coli (E. coli); Electrodes de carbone imprimées (Screen Printed Carbon Electrodes ou SPCE); Polymère à Empreinte Moléculaire (Molecularly Imprinted Polymer ou MIP); Nanoparticules d'or (NP Au); Monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer ou SAM); Monocouche auto-assemblée de thiourée (Self-assembled thiourea monolayer ou SATUM); Nanotube de carbone simple paroi (Single-wall carbon nanotube ou SWNT); Polymère de 3,4-ethylenedioxythiophene (PEDOT).*

### 3.1.1.2.2. *Transducteurs sensibles à la masse ou massiques*

Les biocapteurs massiques sont aussi appelés biocapteurs gravimétriques. Un biocapteur sensible à la masse répond à la variation de la masse sur une surface par un changement de propriété du matériau support, par unité de temps. Les méthodes de transduction mécanique sont principalement basées sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques (**Figure 18**).

- Les transducteurs à onde acoustique sont classifiés selon le mode de propagation de l'onde au travers ou en surface du matériau piézoélectrique. Le mode de propagation affecte de manière drastique les performances du transducteur et influe sur sa fabrication. La piézoélectricité correspond à la charge électrique qui s'accumule dans certains matériaux solides (notamment des cristaux, des céramiques et certaines matières biologiques tels que l'os, l'ADN et diverses protéines) en réponse à des pressions (changement de masse à la surface).

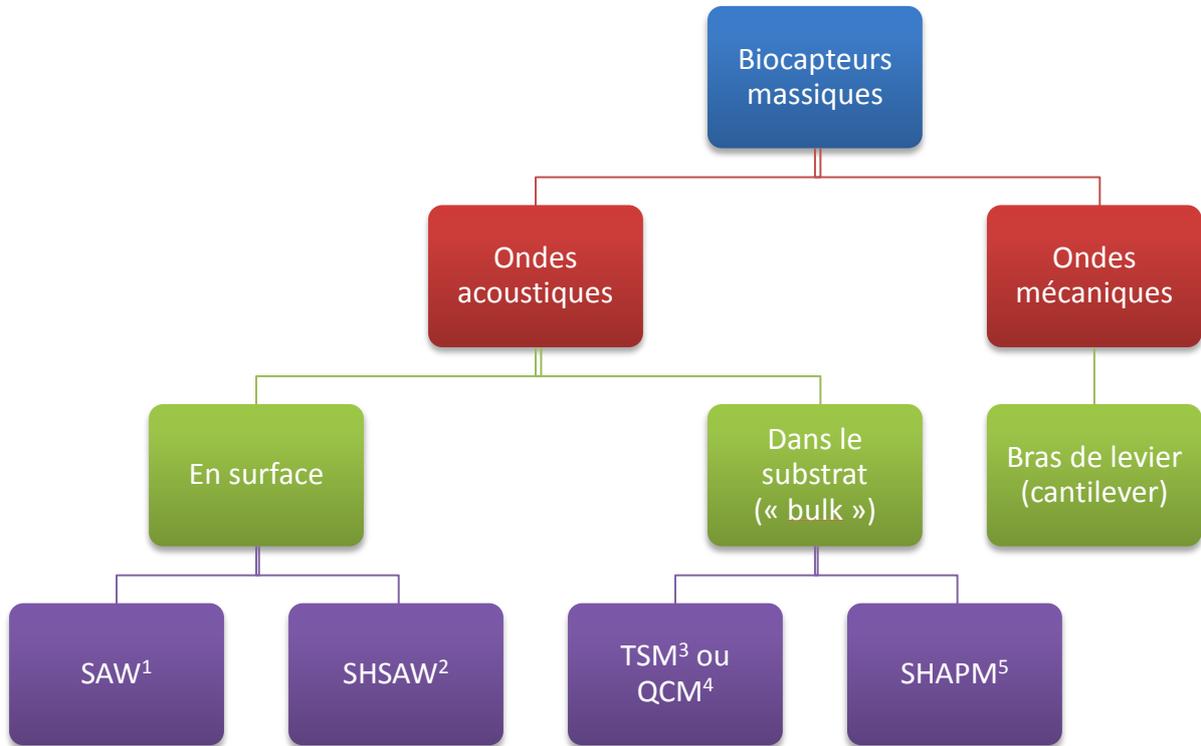
Parmi les quatre catégories de transducteurs à ondes acoustiques définies, les résonateurs TSM sont de loin les plus populaires dans les biocapteurs, et sont mieux connus sous le nom de microbalance à cristal de quartz (QCM ou Quartz Crystal Microbalance) [87]. -Le succès de la transduction par TSM, en fait, un outil de référence pour la détection sans marquage de biomolécules. Les biocapteurs massiques peuvent aussi utiliser des dispositifs à ondes acoustiques de surface (SAW ou Surface Acoustic Wave).

- Les transducteurs à onde mécanique sont appelés à bras de levier (ou cantilever).

Les biocapteurs à bras de levier sont des capteurs électromécaniques ultra sensibles utilisés pour la détection sans marquage d'un grand nombre d'entités biologiques. Un cantilever est une poutre ancrée à une seule extrémité. Le changement de masse à l'extrémité de la poutre est détecté par un phénomène optique (amplitude d'oscillation) (**Figure 19**). Les cantilevers en mode dynamique répondent aux interactions biochimiques se produisant à la surface par des changements de fréquence de résonance. Au cours des quinze dernières années, grâce aux progrès de la miniaturisation, les biocapteurs à base de microcantilever (MCL) sont en train de devenir un outil sensible pour la détection chimique et biologique.

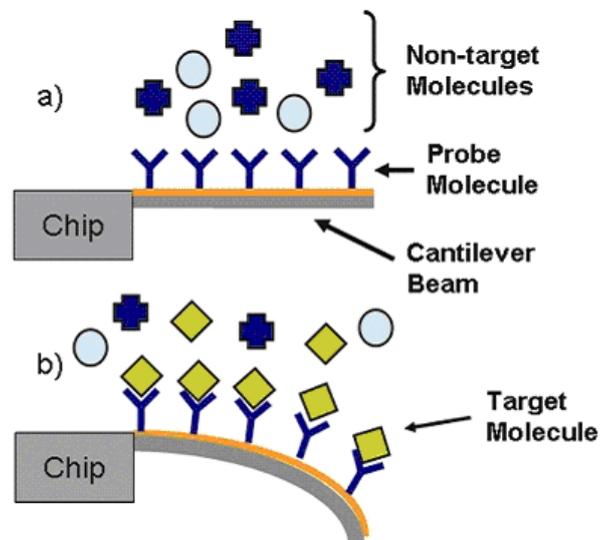
Les trois principaux types de transducteurs sensibles à la masse, les plus fréquemment utilisés pour le dépistage des résidus d'antibiotiques, sont présentés dans le **Tableau 9**.

Figure 18. Classification des biocapteurs massiques.



<sup>1</sup> Ondes acoustiques de surface (SAW) ; <sup>2</sup>Ondes acoustiques de surface à cisaillement horizontal (SHSAW) ;  
<sup>3</sup> Résonateurs «thickness shear mode» ou à cisaillement d'épaisseur (TSM) ; <sup>4</sup> Microbalance à cristal de quartz (=QCM) ; <sup>5</sup>Transducteurs « shear-horizontal acoustic plate mode » (SHAPM) ou à mode de plaque acoustique à cisaillement horizontal.

Figure 19. Représentation schématique d'un immunoessai basé sur l'utilisation d'un biocapteur de type cantilever (Lin *et al.* 2006) [136].



**Tableau 9. Principes, avantages et inconvénients des différents types de transducteurs sensibles à la masse.**

	Principe	Avantages	Inconvénients
<b>Piézoélectriques Microbalance à cristal de quartz (QCM)</b>	Perturbation de la propagation d'une onde acoustique	Sans marquage [137] Matériaux stables, chimiquement inertes, caractéristiques mécaniques et de vieillissement Détection de petits changements de masse (petites molécules) Films de surface sélectifs	
<b>Piézoélectriques Onde acoustique de surface (SAW)</b>		Rapide (mesures en temps réel) et simple Fabrication simple, peu coûteuse Multi-analytes simultanés (micropuces)	Manque de sensibilité et de spécificité Sensibilité aux perturbations extérieures
<b>Bras de levier (Cantilever)</b>	Transforme un signal chimique en un mouvement mécanique	Sans marquage Simple Rapide Limites de détection basses Fabrication simple, peu coûteuse Multi-analytes simultanés (micropuces) Préparation de l'échantillon simple	

Une revue des différents types d'analytes mesurables par les biocapteurs de type QCM a été publiée [138]. Les biocapteurs piézoélectriques permettent la détermination rapide et simple de petites molécules telles que les médicaments, les hormones et les pesticides. Cependant, il y a très peu de publications dans la littérature concernant l'utilisation de biocapteurs piézoélectriques pour détecter les résidus d'antibiotiques ou d'autres contaminants alimentaires. Un biocapteur QCM a été développé pour le dépistage du chloramphénicol, mais seulement en solution, pas dans une matrice [139]. Cette technique est rapide, à faible coût et ne nécessite pas de marquage. Une autre équipe a aussi travaillé sur un biocapteur QCM pour le dépistage des résidus de chloramphénicol dans plusieurs matrices (lait, viande, œufs, miel) [140]. Les niveaux de détection annoncés à 5 et 10 µg/kg sont très supérieurs à la LPMR du CAP (0,3 µg/kg). En outre, un autre équipe a développé un biocapteur QCM, basé sur un MIP comme élément de biorecognition, pour le dépistage du CAP dans le muscle de porc, le lait, le miel et les crevettes [141]. Le biocapteur a été capable de détecter le CAP dans le miel et dans les crevettes à des concentrations inférieures à la LPMR du CAP.

Le principe d'un immunoessai développé sur un biocapteur SAW est schématisé dans la **Figure 20**. Des biocapteurs SAW sont disponibles sur le marché (eg. samX®, NanoTemper Technologies GmbH (Allemagne)). Les biocapteurs à ondes acoustiques de surface (SAW) peuvent être utilisés pour détecter des analytes de faible poids moléculaire, tels que les résidus d'antibiotiques. Des méthodes de dépistage pour des résidus d'antibiotiques, basées sur des biocapteurs SAW, ont été développées par exemple pour la pénicilline dans le lait [142] et pour la fluméquine dans l'eau [143].

Des biocapteurs de type cantilever ont aussi été développés pour le dépistage de résidus d'antibiotiques tels que l'oxytétracycline en solution [144] ou la kanamycine en solution [145].

Malgré leurs potentialités, les biocapteurs massiques en général restent peu utilisés à ce jour pour le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires. Toutefois, le développement des micropuces (ou « microarrays ») pourrait amplifier leur utilisation dans le domaine de la bioanalyse particulièrement. Les micropuces ont été développées afin de combiner des dizaines, voire des centaines de micro-points (ou spots) sur une seule surface ou puce, permettant ainsi de faire plusieurs immunoessais en parallèle. En général, une puce est constituée d'un réseau de plusieurs biocapteurs, qui peuvent être contrôlés individuellement. Plusieurs biocapteurs massiques de même type peuvent ainsi être combinés sous forme de micropuces, grâce aux progrès de la miniaturisation. Nous parlerons alors de technologie de multiplexage, ce qui permet la détection simultanée de plusieurs analytes, en une seule analyse. Cette technologie permet aussi d'augmenter considérablement le débit d'échantillons, de réduire la durée d'analyse et les coûts. En outre, les méthodes multiplex permettent d'obtenir une large sélectivité. Le plus souvent, les biocapteurs multiplex nécessitant une faible préparation de l'échantillon. Il faut toutefois prêter attention aux interactions non spécifiques entre les différents analytes cibles et d'autres analytes ou composants de la matrice.

Les biocapteurs cantilever sont de plus en plus utilisés pour le screening haut débit de nouveaux principes actifs [146]. Quelques applications récentes pour le dépistage de résidus d'antibiotiques ont été trouvées dans la littérature (oxytétracycline en solution [144], kanamycine en solution [145], vancomycine dans du sérum [147]).

Figure 20. Représentation schématique d'un immunoessai développé sur un biocapteur SAW (Sang *et al.* 2013) [148].

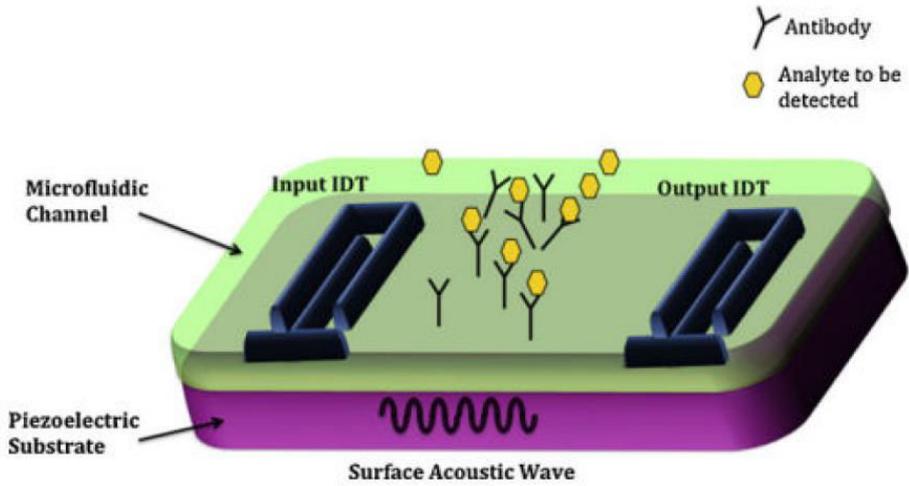


Figure 5. SAW delay line biosensor integrated in a microfluidic channel[45]

### 3.1.1.2.3. *Transducteurs optiques*

Dans les transducteurs optiques, le signal qui est mesuré est la lumière. La détection optique se décompose en un grand nombre de sous-classes telles que l'absorption, la réflexion, la réfraction, la dispersion, l'infrarouge, la technologie Raman, la chimiluminescence, la fluorescence, et la phosphorescence. La **Figure 21** présente les principaux types de transducteurs optiques et les grands principes de la détection.

#### La fluorescence classique et la TR-FIA

Différentes méthodes ont été développées en utilisant la fluorescence pour détecter des résidus d'antibiotiques depuis 1990 (aminosides dans le lait [149], lait et l'eau du robinet [73], sulfadiméthoxine dans le lait [99]. Des méthodes de dépistage de résidus de médicaments vétérinaires (antibiotiques, anticoccidiens) ont été développées grâce à la technologie appelée Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) entre 2006 et 2015 [69, 150-156]. Ces méthodes permettent l'analyse d'un seul antibiotique (eg. chloramphénicol) ou d'une famille d'antibiotiques (eg. fluoroquinolones). Toutefois, les biocapteurs basés sur la fluorescence sont compatibles avec la technologie de multiplexage. Un biocapteur multiplex basé sur la fluorescence a été développé par Chen et al. pour le dépistage de 8 antibiotiques dans les muscles et foies de poulet et de porc [157]. Un microréseau de différents spots a été imprimé sur une puce en verre modifiée. Sur ces différents spots, sont greffés différents conjugués protéine-antibiotique. L'essai dure 3 heures pour détecter et quantifier les 8 antibiotiques dans 6 échantillons, ce qui correspond à un débit d'échantillons un peu faible, par rapport aux techniques conventionnelles type ELISA.

#### La cytométrie de flux

Les premiers articles concernant l'utilisation de la cytométrie de flux pour détecter des interactions entre anticorps et antigène datent des années 1980. Cette technologie utilise de petites microsphères fluorescentes. Chaque ensemble de billes peut être couplé à un biorécepteur différent. Grâce à cette technique, il est possible de mesurer simultanément plusieurs interactions biomoléculaires différentes dans un seul puits de microplaque. La cryométrie de flux se classe dans la catégorie des technologies multiplexées en suspension (ou « Suspension array technology ») puisque l'interaction entre les billes greffées avec des anticorps, par exemple, et les analytes se passe en suspension et non sur une surface.

Des applications d'immunoessais couplés à la détection par cytométrie de flux (FCIA) ont été publiées utilisant des cytomètres de flux commerciaux.

Dans le cadre d'un projet de recherche, le Laboratoire National de Référence belge a développé une méthode de dépistage de 64 antibiotiques de 10 familles différentes dans le muscle de porc et dans le lait, basée sur la cytométrie de flux [158]. Depuis 2015, la commercialisation des kits prêts à l'emploi appelés BeadyPlex®, issus de ce projet de recherche, est réalisée par la société Unisensor (Belgique), en partenariat avec un fabricant de cytomètres de flux.

Figure 21. Les principes de mesure des différents types de transducteurs optiques.

<b>Fluorescence</b>	• Mesure de l'émission de lumière par une substance qui a absorbé la lumière ou un autre rayonnement électromagnétique
<b>TR-FIA<sup>1</sup></b>	• Mesure de l'émission de lumière par des chélates de lanthanides intrinsèquement fluorescents
<b>FCIA<sup>2</sup></b>	• Mesure de la dispersion de la lumière et du signal fluorescent généré quand la particule ou la cellule passe à travers le faisceau de lumière (eg. Laser)
<b>SPR<sup>3</sup></b>	• Mesure des changements d'indice de réfraction, en surface
<b>iSPR<sup>4</sup></b>	• Mesure des changements d'indice de réfraction sur une surface, dans l'espace
<b>DOT<sup>5</sup></b>	• Mesure les changements de diffraction de la lumière
<b>Chimiluminescence</b>	• Mesure de la chemiluminescence, issue d'une réaction chimique catalysée par une enzyme
<b>Bioluminescence</b>	• Mesure de la variation de luminescence émise par des micro-organismes vivants

<sup>1</sup>TR-FIA : Time-resolved fluoroimmunoassay ; <sup>2</sup>FCIA : Immunoessai par cytométrie de flux ; <sup>3</sup>SPR : résonance plasmonique de surface; <sup>4</sup>iSPR : résonance plasmonique de surface par imagerie; <sup>5</sup>DOT : diffractive optics technology.

La seconde application concerne le système Multi Analyte Profiling (xMAP®) (Luminex, Texas, Etats-Unis). Ce système ouvert permet le développement de méthodes. Plusieurs applications de la cytométrie de flux utilisant ce système pour le dépistage de résidus d'antibiotiques ont été trouvées dans la littérature. La première application pour le dépistage de sulfamides dans le lait a été publiée en 2008 [159]. La seconde application a concerné, dans un premier temps, le dépistage de trois médicaments vétérinaires, dont le chloramphénicol, puis l'extension de la méthode au dépistage de 5 antibiotiques dans le lait, et enfin le dépistage simultané de sept pesticides et médicaments vétérinaires dans l'eau et dans le lait [160]. Cette dernière méthode est rapide (essai de moins de 2 heures) et la limite de détection annoncée pour le chloramphénicol (0,05 µg/L) est inférieure à la LPMR (0,3 µg/L).

### La Résonance Plasmonique de Surface (Surface Plasmon Resonance (SPR))

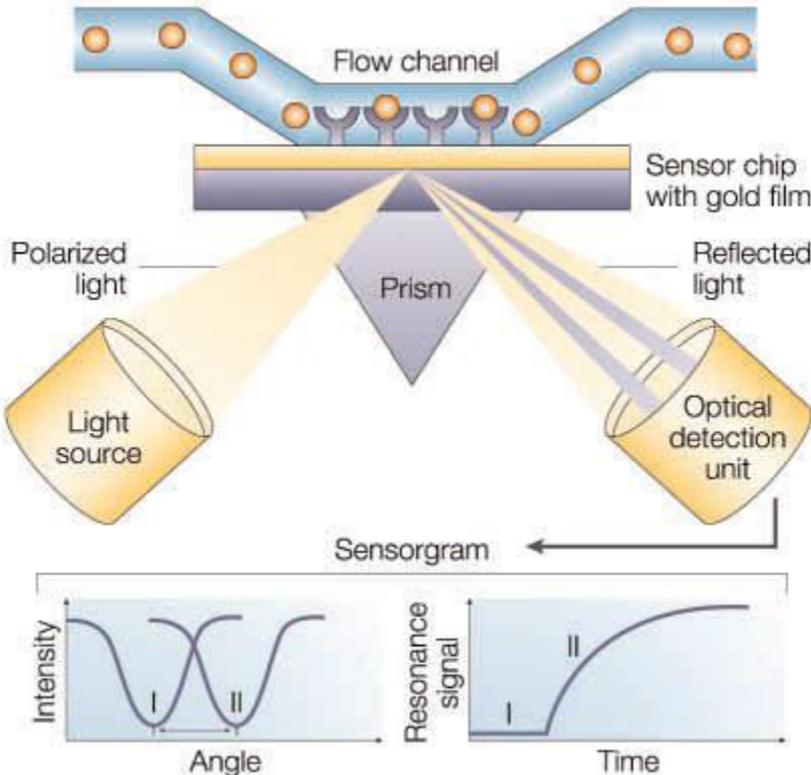
Les biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface (SPR) sont des capteurs optiques utilisant des ondes électromagnétiques particulières pour détecter les interactions qui se produisent à la surface. Les changements de masse à la surface de la puce (« sensor chip ») qui interviennent lors de l'association ou de la dissociation de complexes biomoléculaires (BIA pour Biomolecular Interaction Analysis) provoquent un décalage de la position de l'angle de résonance (**Figure 22**). La variation de cet angle permet de suivre en temps réel. Le sensorgramme permet de visualiser en temps réel les variations de l'angle de résonance sous l'effet de la fixation des molécules sur la puce. Cette technique a été introduite dans les années 1990.

Le coût important de l'investissement dans les biocapteurs SPR de type Biacore (GE Healthcare, Suède) a été un frein pour une plus large application dans les laboratoires de contrôle des aliments. Un autre biocapteur basé sur la SPR moins coûteux a été commercialisé (Spreeta™, Texas Instruments, Etats-Unis). Toutefois, ce système s'est avéré moins robuste et possédait un seul canal disponible pour mesurer les interactions, au lieu de 2 à 8 selon les différents systèmes Biacore. Puis un biocapteur portable SPReeta® Kit SPR3, disposant de 3 canaux pour 3 interactions en parallèle, a été développé et évalué pour l'analyse du lait [161]. Des échantillons de lait ont pu être analysés après une préparation d'échantillon simple (centrifugation et dilution du lait).

De nombreuses méthodes ont été développées pour le dépistage de résidus d'antibiotiques entre 1995 et 2008 en utilisant le système BIACORE [83, 162-169]. Le système BIACORE avec 8 canaux permettait la détection simultanée de 8 analytes ou familles d'analytes différents.

Parfois des systèmes SPR développés intra-laboratoire et non commerciaux ont fait l'objet d'application au dépistage des résidus d'antibiotiques. Par exemple, une méthode de dépistage multi-antibiotiques (fluoroquinolones, sulfamides et phénicolés) dans le lait a été développée. L'interaction entre les antibiotiques et des anticorps polyclonaux greffés sur 6 canaux est détectée par un capteur optique SPR non commercial [170].

Figure 22. Le principe schématique de la SPR (Cooper 2002) [171].



### L'imagerie de résonance Plasmonique de Surface (Imaging Surface Plasmon Resonance (iSPR))

Le système Flexchip de Biacore (GE Healthcare, Uppsala, Suède) a été la première plateforme disponible dans le commerce. Concernant le dépistage des résidus d'antibiotiques, le système IBIS iSPR (IBIS Technologies, Pays-Bas) est le système le plus fréquemment cité dans la littérature [172, 173]. Cette plateforme IBIS iSPR peut permettre d'analyser un maximum de 56 essais multiplexés.

Le principal avantage en combinant la iSPR et les microréseaux est que chaque site du microréseau est une zone de détection individuelle. Krishnawoorthy *et al.* ont présenté une application de la iSPR au format micropuces pour la détection de 5 molécules différentes et l'analyse cinétique, de l'interaction antigène/anticorps [174]. Parmi ces 5 molécules, cette équipe a testé deux antibiotiques, la néomycine et la gentamicine. En conclusion, cette méthode pourrait être utilisée pour le dépistage de ces antibiotiques ou d'autres antibiotiques.

### La technologie d'optique diffractive

Une photodiode mesure l'intensité de l'ordre de diffraction, qui est corrélée à la concentration en analyte. La technologie optique de diffraction combine des formats de dosage immunologique multiplex avec des mesures en temps réel des interactions entre protéines [175].

Le système dotLab® mX (Axela Biosensors, Canada) basé sur cette technologie est un système commercial flexible qui permet le développement de méthodes pour la recherche de biomarqueurs de protéines et de nouveaux tests diagnostiques [176]. Ce système doit pouvoir être adapté au dépistage de composés de faible poids moléculaire tels que les antibiotiques, en appliquant le même principe que pour le développement de la SPR au cours des dernières années. Toutefois, aucun article n'a été trouvé concernant le dépistage des résidus d'antibiotiques avec ce système.

### Chimiluminescence (CLIA ou Chemiluminescence ImmunoAssay)

Le biorécepteur (ou l'analyte) est marqué de manière covalente directement avec un composé chimiluminescent (*eg.* luminol). En déclenchant le marqueur luminescent, la réaction d'émission de la lumière produit un signal, avec une intensité donnée (photons/seconde) pour détecter l'analyte.

La plupart des tests sont hétérogènes et nécessitent une séparation du marqueur non lié. Ces tests sont plus simples à développer, mais un peu plus compliqué à réaliser. Un dosage homogène, par contre, nécessite que la réaction d'émission de la lumière soit affectée d'une manière quelconque par l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur. La mesure de l'intensité lumineuse est relativement simple, nécessitant seulement un photomultiplicateur ou une photodiode, ainsi que l'électronique associée pour convertir et enregistrer les signaux.

Une revue des applications de la chimiluminescence et de la bioluminescence dans différents domaines liés aux contaminants a été publiée (*eg.* contamination bactérienne ou polluants environnementaux inorganiques (métaux lourds) [177].

Nous avons identifié deux types de biocapteurs chimiluminescents :

- Biocapteurs chimiluminescents intra-laboratoire :

La CLIA offre plusieurs avantages potentiels et a des applications en chimie clinique, en analyse de l'environnement, et en analyse des aliments. Les avancées réalisées dans le domaine des biocapteurs basés sur la détection par chimiluminescence couplés à des immunoessais sont présentés et discutés dans une revue bibliographique [178]. Ces progrès ont été réalisés par exemple dans le domaine du développement de nouveaux marqueurs luminescents ou de l'amélioration du signal des marqueurs existants par des activateurs, mais aussi dans le secteur des surfaces d'interaction. Des exemples de développement intra-laboratoire d'immunoessais basés sur la chimiluminescence pour les contaminants alimentaires ont été trouvés dans la littérature [179-182] (**Figure 23**).

- Biocapteurs chimiluminescents commerciaux

Seuls deux biocapteurs de chimiluminescence commerciaux ont été identifiés pour le dépistage de résidus d'antibiotiques.

- Le système Microarray Chip Reader 3 (MCR 3), développé à l'Université de Munich en Allemagne, est commercialisé par r-Biopharm AG (Darmstadt, Allemagne) et utilisé pour l'analyse du lait [183] et du miel [184].
- Le système Evidence Investigator® (Randox, Royaume-Uni) est un système semi-automatisé, basé sur des biopuces, conçu pour des applications médico-légales et à vétérinaires [185]. Des évaluations de plusieurs kits pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans le miel ont été publiées [186-188].

### Bactéries luminescentes

La bioluminescence est une forme de luminescence, ou émission de «lumière froide». La variation de la luminescence peut être causée par l'enzyme appelée luciférase, codée par le gène lux, en réponse à la présence de l'analyte cible et dans une relation dose - dépendante. L'expression du gène lux dans des micro-organismes peut être contrôlée soit de manière constitutive soit inductible. Des souches bactériennes sont construites en utilisant des gènes de bioluminescence (lux) comme reporteurs de réponses transcriptionnelles. La production de lumière augmente en présence de produits chimiques spécifiques. A l'inverse, il existe des bactéries naturellement bioluminescentes type *Vibrio fischeri*. Dans ce cas, la production de lumière diminue en présence d'un contaminant qui inhibe la croissance bactérienne. Des exemples de biocapteurs basés sur l'utilisation de bactéries luminescentes et développés pour le dépistage de différents antibiotiques ont été trouvés dans la littérature [107, 189].

Figure 23. Principe d'un immunoessai basé sur la chimiluminescence pour le dépistage du chloramphénicol (Yu *et al.* 2014) [182].

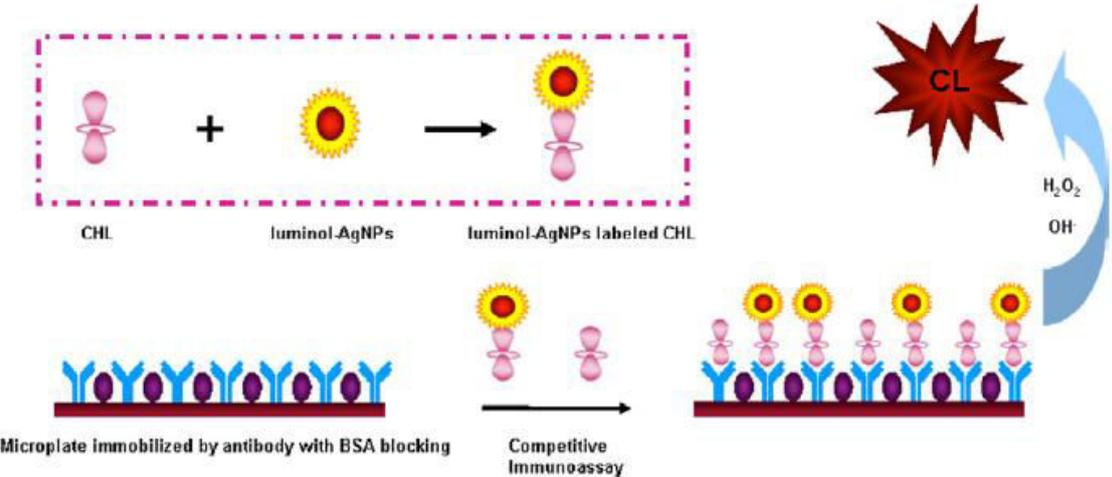
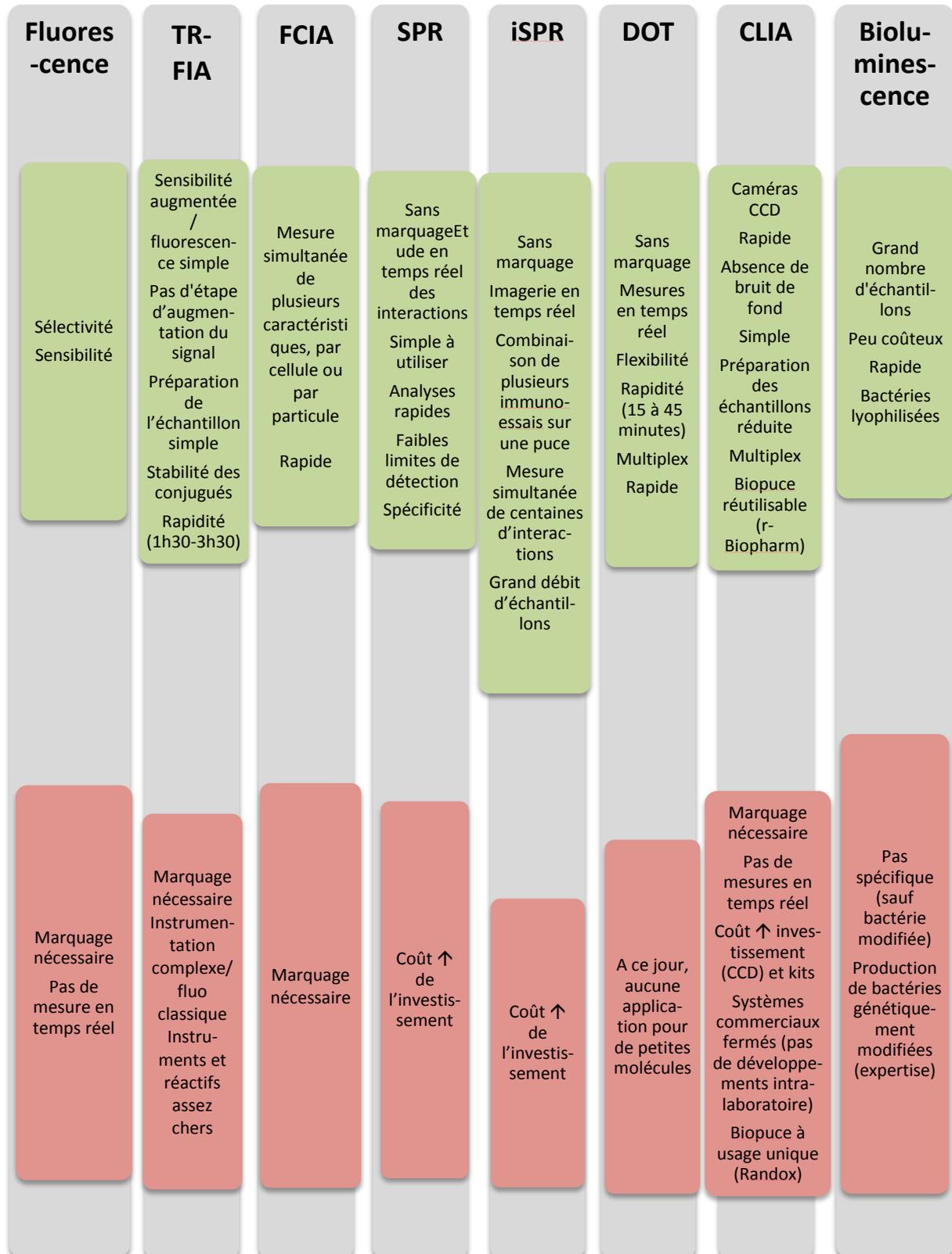


Figure 24. Avantages et inconvénients des différents types de transducteurs optiques.



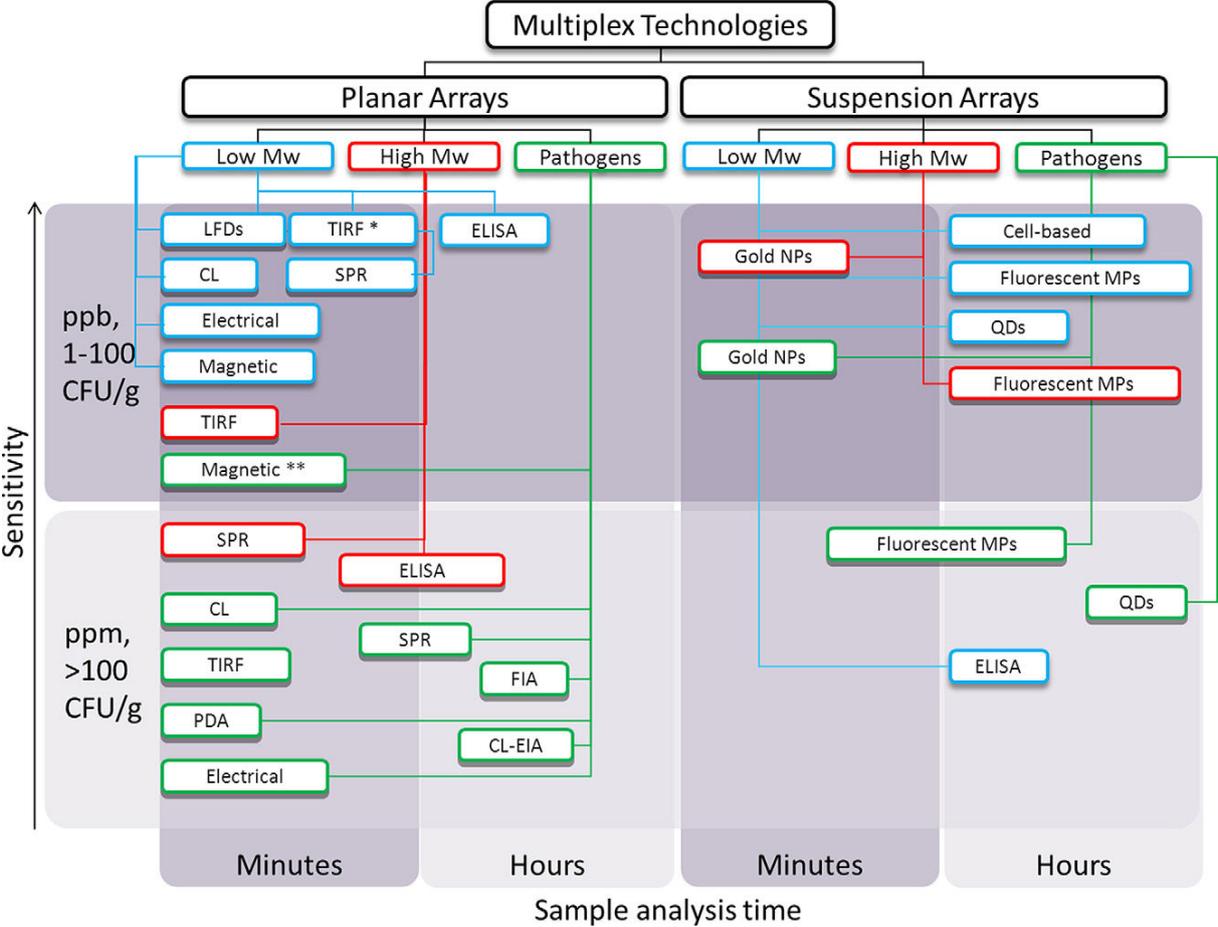
*Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) ; Immunoessai par cytométrie de flux (FCIA) ; Résonance Plasmonique de Surface (SPR) ; imageire SPR (iSPR) ; Technologie d'optique diffractive (DOT) ; Immunoessai par chimiluminescence (CLIA) ; Dispositif à couplage de charge ou CCD (charge coupled devices).*

En conclusion, les différents types de transducteurs optiques présentent des avantages et des inconvénients, en termes de praticabilité, mais aussi en termes de performance (**Figure 24**).

Pour certaines de ces techniques, le marquage de l'analyte ou du biorécepteur est nécessaire. Cette étape supplémentaire de conjugaison est complexe et demande une expérience particulière. De plus, la conjugaison, risque d'altérer le site de reconnaissance entre l'analyte et le biorécepteur. Les techniques sans marquage devraient donc être préférentiellement utilisées, à condition que les autres caractéristiques de la méthode (*eg.* coût, performance, etc) répondent aussi à nos attentes.

En outre, la technologie de multiplexage s'applique à nombre de ces biocapteurs optiques, ce qui est un avantage primordial pour détecter simultanément plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques dans les aliments. Le gain de temps sur les analyses et la réduction de la charge de travail sont deux grands avantages, par rapport à des tests individuels. Une revue a été publiée concernant les développements récents de technologies multiplexées, conventionnelles (*eg.* bandelettes) et innovantes, fondées sur différents principes de détection optique (*eg.* cytométrie de flux, chimiluminescence) [190]. Cette revue intègre un schéma synthétique des différentes technologies (sur puces et en suspension) et un bilan de leurs performances en termes de limites de détection et de durée d'analyse, en fonction du poids moléculaire des analytes (**Figure 25**). Les limites de détection et les temps d'analyse sont corrélés avec la technologie (planaire ou en suspension) et le type d'application (bactéries pathogènes, petites ou grosses molécules). Les antibiotiques étant des analytes de faible poids moléculaire (méthodes signalées en bleues sur la figure), le bilan montre que les limites de détection obtenues avec les techniques multiplex sont globalement de l'ordre du ppb (ng/g), donc conformes avec les limites réglementaires. De plus, les méthodes basées sur la SPR et la chimiluminescence peuvent être rapides (quelques minutes). Ces observations confirment nos conclusions quant au fort potentiel des biocapteurs optiques multiplexés. L'inconvénient majeur du multiplexage est que le risque d'observer des interférences dans la détection des différents analytes augmente avec le nombre d'essais multiplexés. L'optimisation de ce type de méthodes est donc primordiale pour limiter les interférences et demande beaucoup de travail. C'est pourquoi ce type de système doit être automatisé pour alléger la charge de travail lors des phases de développement et d'optimisation [191].

Figure 25. Limites de détection et temps d'analyse, en fonction des technologies multiplex utilisées, dans les domaines des analyses de l'alimentation et de l'environnement [190].



#### 3.1.1.2.4. *Transducteurs thermiques*

Les biocapteurs thermiques permettent de déterminer la concentration d'un substrat grâce à la variation d'énergie (production ou absorption), associée à une réaction biochimique (*eg.* enzymatique). L'énergie libérée ou absorbée est proportionnelle au nombre de molécules produites par la réaction biochimique. Le changement de température, est mesuré par un microcalorimètre. Dans ces biocapteurs, les transducteurs sont des thermocouples, des thermorésistances ou des thermopiles (association en série de plusieurs thermocouples). Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont enzymatiques. Ce type de biocapteurs peut être développé pour une détection simultanée de multiples analytes (multiplex). En effet, une colonne peut être divisée en plusieurs régions distinctes et chaque région est immobilisée avec une enzyme spécifique, pour la détection d'un analyte spécifique. Un biocapteur thermique combiné à un immunoessai est appelé un « Thermometric ELISA » (TELISA).

Les applications des biocapteurs thermiques sont variées, depuis les analyses cliniques (*eg.* glucose, cholestérol) jusqu'à la surveillance de processus industriels (*eg.* production de pénicilline V par fermentation [192]), en passant par les analyses environnementales (*eg.* métaux lourds, pesticides) [193].

Un biocapteur thermique appelé HEATSENS® (NitBiosensing (Nanoimmunotech), Espagne) est commercialisé pour différentes applications, dont la détection d'analytes en temps réel, dans des matrices complexes. Ce biocapteur portable est utilisé dans le cadre d'un projet pour le dépistage des résidus d'antibiotiques non invasif chez les animaux vivants (projet espagnol appelé INNOSABOR).

Le **Tableau 10** présente les avantages et les inconvénients des biocapteurs thermiques.

Quel que soit le type de transducteur utilisé, les nanotechnologies sont de plus en plus utilisées afin d'améliorer la performance des biocapteurs. Nous allons voir les nanotechnologies utilisées et leur impact sur les biocapteurs.

**Tableau 10. Les biocapteurs thermiques.**

Transducteur	Avantages	Inconvénients
<b>Microcalorimétrie de titration isotherme</b>	Pas de marquage	
	Stabilité	
	Multiplex	
	Miniaturisation simple =< sensibilité ↑	
	Pas d'immobilisation des composés	Elaboration de la cellule du capteur difficile
	Rapides	Difficile à mettre en œuvre
	Reproductibles	Coût élevé
	Automatisation possible	Encrassement possible
	Mesures en continu	Pré-traitement de certains échantillons
	Pas sensibles à la lumière	
	En solution	
	Pas de limitation de poids moléculaire	
	Pas d'interférences optiques (eg. solutions colorées, turbides) ou électrochimiques	
	Compatible avec des solvants organiques	

### 3.1.1.3. Nanotechnologies

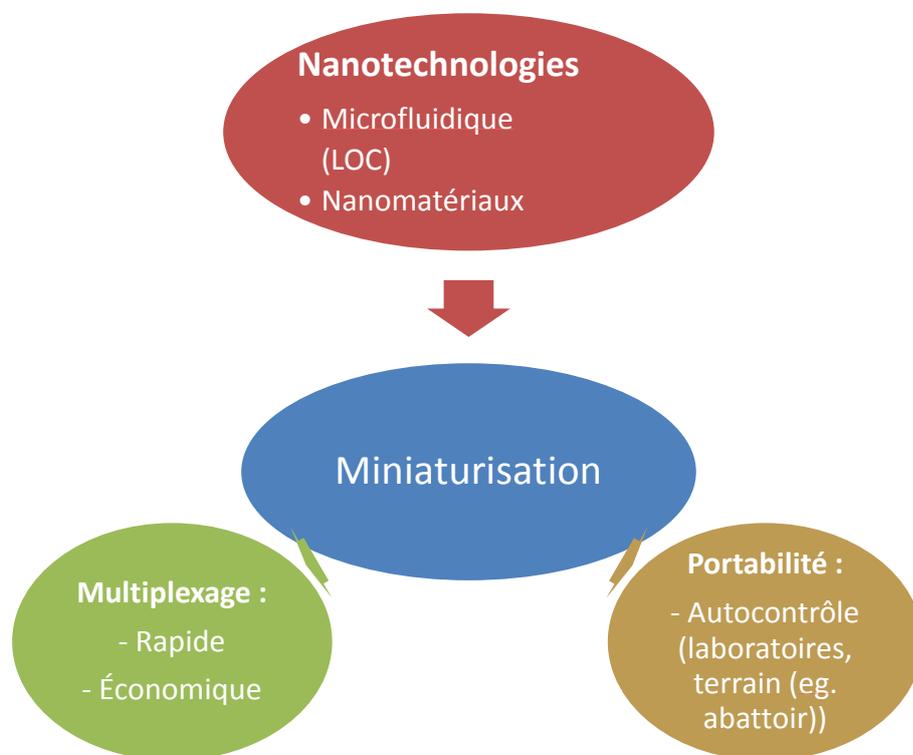
Les nanotechnologies sont un domaine qui progresse très rapidement et qui attire de nombreuses équipes multidisciplinaires. Dans d'autres domaines tel que la détection des toxines par exemple, les nanotechnologies qui offrent des perspectives de développement sont les nanomatériaux, les billes magnétiques et la microfluidique [194]. Il apparaît que pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les aliments, les mêmes pistes peuvent être suivies pour le développement de nouveaux biocapteurs encore plus performants. Le développement des nanotechnologies, indépendamment des contaminants à rechercher, sera dans les années à venir à la base de la miniaturisation des biocapteurs. Cette miniaturisation permettra de développer le multiplexage et la portabilité des biocapteurs [195] (**Figure 26**).

Concernant les progrès de la microfluidique et de la nanofluidique, les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques pourront, comme par le passé, profiter des avancées réalisées dans le domaine biomédical qui est toujours à la pointe des nouvelles technologies. Nous pouvons signaler parmi les perspectives de développement prometteuses, des applications dans le domaine biomédical :

- Une revue de Derkus et al. de 2016 a fait la synthèse des différents dispositifs qui permettent la miniaturisation des systèmes de biocapteurs : micro et nanoprofilage (patternings), microfluidique, et MEMS [196]. La technologie Bio-MEMS correspond au développement de systèmes micro électromécaniques biomédicaux (ou biologiques), c'est-à-dire des techniques de microfabrication, essentiellement des parties mécaniques (microélectrodes, microaiguilles). Les nombreux développements récents de la technologie MEMS vont contribuer à améliorer la miniaturisation et donc la portabilité des biocapteurs tous domaines d'application confondus. Par exemple, un biocapteur optique, associé à la technologie MEMS a été développé pour la détection d'une petite molécule (un principe actif de médicament) et une grosse molécule (anticorps). Ce système est potentiellement applicable à des mesures de contaminants dans l'environnement ou au diagnostic médical à domicile [197]. Cette technologie est aussi applicable aux autres types de biocapteurs (électrochimique, massique [198] ou thermique).

- Les technologies Laboratoire sur Puce (LOC ou Lab on a chip), Laboratoire en Tube (LIT ou Lab in a tube) et les systèmes de microanalyse total ( $\mu$ TAS ou micro total analysis systems). Le système de microanalyse totale ( $\mu$ TAS) décrit un dispositif qui permet d'automatiser et d'inclure toutes les mesures nécessaires pour l'analyse chimique d'un échantillon (eg. échantillonnage, transport des échantillons, réactions chimiques, détection). Ces trois systèmes permettent de travailler à l'échelle d'une puce, de réduire les coûts et les durées d'analyse. Par exemple, une méthode basée sur la technologie LIT a été développée sur le système COBAS Liat® (Roche Molecular Diagnostics) pour la détection du virus de l'Influenza dans des sérums de patients [199]. Kovarick *et al.* ont présenté une revue bibliographique qui montre des exemples de biocapteurs développés avec la technologie  $\mu$ TAS [200]. Les méthodes développées sont rapides, automatisées, et avec des limites de détection basses.

Figure 26. Les nanotechnologies et leurs impacts sur les développements de biocapteurs.



**Tableau 11. Les différents types de nanomatériaux, principes et intérêts, à travers leurs applications récentes pour le dépistage des résidus d'antibiotiques.**

	<b>Constituants</b>	<b>Principe/avantages</b>	<b>Analytes</b>	<b>Références</b>
<b>Nanoparticules</b>	Métaux ( <i>eg.</i> Au, Ag, Pt), oxydes de métaux ( <i>eg.</i> Fer), silice, acides gras	Augmente la surface d'interaction Facilite les transferts de charge => zone active de l'électrode ↑	CAP, fluoroquinolones, enrofloxacin, streptomycine, sulfamérazine, tétracyclines	[201-206]
<b>Nanotiges (nanorods) ou nanofils (nanowires)</b>	Métaux ( <i>eg.</i> Au, ZnO, CuO) ou matériaux semi-conducteurs ( <i>eg.</i> silicone)	Absorption de la lumière ↑ Excellentes propriétés de diffusion	Gentamicine, pénicilline, ofloxacin	[207-210]
<b>Boites quantiques (QD)</b>	Matériaux semi-conducteurs ( <i>eg.</i> sulfure de zinc, tellure de cadmium)	Nanostructure de semi-conducteurs Propriétés optiques ( <i>eg.</i> rendement quantique ↑, spectre de fluorescence) QD commercialisées	CAP, vert de malachite, multi-antibiotiques, nitrofuranes, sulfamides et quinolones	[211-218]
<b>Nanomatériaux de carbone</b>	Nanotubes de carbone (paroi simple ou multiple)	Surface ↑ → quantité biorécepteurs ↑ Signaux électrochimiques ↑	Kanamycine, sulfamides, tétracyclines, ofloxacin, QCA	[219-225]
	Graphène, oxyde de graphène (GO)	Conductivité électrique ↑ Inhibiteur de fluorescence (quencher)	Aminosides, kanamycine, pénicilline	[226-229]
<b>NP magnétiques</b>	Noyau magnétique inorganique ( <i>eg.</i> Au, multi-métaux)	Séparation de molécules cibles d'autres molécules grâce au champ magnétique Conductivité électrique ↑	CAP, streptomycine	[230-232]

*Nanoparticules d'or (NP Au) ; Argent (Ag) ; Platine (Pt) ; Oxyde de zinc (ZnO) ; Oxyde de cuivre (CuO) ; Chloramphénicol (CAP) ; limite de détection (LOD) ; quinoxaline-2- carboxylic acid (QCA).*

Le **Tableau 11** résume les tendances actuelles et futures, dans le domaine des nanomatériaux, pour le développement de nouveaux biocapteurs plus performants, en particulier pour le dépistage des résidus d'antibiotiques. Les différents types de nanomatériaux permettent globalement d'améliorer le signal, donc d'abaisser les limites de détection des biocapteurs.

#### 3.1.1.4. Conclusions sur les biocapteurs

Les quatre classes principales de transducteurs permettent de développer des méthodes avec ou sans marquage. Les méthodes avec marquage nécessitent une étape de conjugaison de l'analyte ou du biorécepteur avec une molécule qui permettra la détection. Au contraire, les méthodes sans marquage sont basées sur la mesure directe d'un phénomène produit par des réactions biochimiques sur une surface de transducteur. Les méthodes sans marquage permettent donc d'éviter la préparation complexe et longue des conjugués analyte-biorécepteur, dans le cas des immunoessais compétitifs présentés dans cette thèse. Les méthodes sans marquage présentent donc un grand avantage par rapport aux autres, surtout quand un laboratoire veut développer une méthode interne et quand les conjugués ne sont pas disponibles commercialement. C'est pourquoi la technologie SPR, par exemple, a été fortement développée dans les années 1990 pour la détection des résidus d'antibiotiques, alors que les techniques électrochimiques moins coûteuses pourtant avaient été un peu oubliées jusqu'ici. Cette conclusion va aussi en faveur du développement des biocapteurs massiques pour le développement de méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques.

Le biocapteur « idéal » pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale doit être peu coûteux, rapide, simple d'utilisation, spécifique, avec des limites de détection en rapport avec les limites réglementaires, et présentant un haut débit d'échantillon (faible préparation). Le **Tableau 12** présente les caractéristiques et les performances des différents types de transducteurs pour tenter d'y répondre. Etant donné ces informations, les biocapteurs représentent l'avenir des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

**Tableau 12. Les attentes par rapport à une méthode de dépistage efficace et comment y répondent chaque type de transducteur.**

	Econ omique	Rapi de	LOD basses	Spécifi cité	Préparati on de l'échantil lon	Multipl ex	Ha ut déb it	Portabili té
<b>Potentiométrique</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Ampérométrique</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Piézoélectrique</b>	++	++	++	+	+	++	++	++
<b>SPR</b>	-	++	++	++	++	+	++	++
<b>Chimiluminescence</b>	+	++	++	++	++	++	++	+
<b>Bioluminescence</b>	++	+	++	+	+	+	++	++
<b>FCIA</b>	+	++	++	++	+	++	++	-
<b>Thermique</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

*Résonance plasmonique de surface (SPR) ; Immunoessai par cytométrie de flux (FCIA) ; Limite de détection (LOD) ; - : ne remplit pas les critères attendus ; + : remplit partiellement les critères attendus ; ++ : remplit complètement les critères attendus.*

## 3.2. Combinaison de méthodes biologiques et physico-chimiques

### 3.2.1 La combinaison BIA/SM

Les biocapteurs basés sur la SPR peuvent être utilisés en combinaison avec la spectrométrie de masse (SM). Cette combinaison d'instrumentation permet la détection et la quantification de molécules d'intérêt par SPR et, en plus, leur caractérisation moléculaire par l'analyse de SM. Le système BIA (Biomolecular Interaction Analysis) est utilisé pour séparer les analytes à partir des échantillons complexes. Puis la spectrométrie de masse est utilisée pour identifier et quantifier l'analyte. Les premiers articles concernant la combinaison de biocapteurs avec la spectrométrie de masse ont été publiés en 1997 [233-235].

La technique de désorption-ionisation laser assistée par matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)) couplée à la spectrométrie de masse (MALDI-SM) est une technique flexible qui peut aussi être utilisée en combinaison avec des méthodes bioanalytiques telles que la SPR. Cette combinaison augmente la spécificité de la méthode, puisque la SM permet la différenciation de molécules qui sont difficiles à distinguer par la simple utilisation d'un anticorps. Cette combinaison de techniques permet de développer des méthodes rapides, automatisées, et robustes. À notre connaissance, aucune application pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans les aliments n'a été publiée à ce jour en utilisant ces technologies combinées. Le principal inconvénient est le coût des différents investissements en matériel.

### 3.2.2. CCM – Bioluminescence

La Chromatographie sur couche mince (CCM) – couplée avec la détection par bioluminescence est une méthode qui combine la capacité de séparation de la CCM avec la biodétection, grâce à l'utilisation d'une bactérie luminescente. Cette biodétection est basée sur la bioluminescence naturelle des bactéries comme *Vibrio fischeri* [236] ou *Photobacterium phosphoreum* ou de bactéries génétiquement modifiées, par l'introduction d'un gène de bioluminescence. Avant analyses, la préparation de *Vibrio fischeri* prend de 24 à 30 heures d'incubation. Les lectures peuvent être effectuées en 1 seconde à 10 minutes. Les analytes détectés comprennent des pesticides, des métaux lourds, des polluants organiques, et des antibiotiques. Des matrices complexes comme des produits alimentaires, des boissons et eaux usées peuvent être analysés. La CCM couplée avec la détection par bioluminescence a été qualifiée comme un outil prometteur en 2011 [237]. Les applications futures dépendront de façon significative de la sélectivité des bactéries.

Deux systèmes commerciaux basés sur la CCM couplée avec la détection par bioluminescence (BioLuminex®, ChromaDex, Etats-Unis ; BioLuminizer®, Camag, Suisse) sont disponibles. Des méthodes ont été développées avec ces systèmes, basés sur l'utilisation de la souche bactérienne *Vibrio fischeri*, naturellement luminescente, par exemple pour la détection de toxines dans les aliments, et de polluants dans les eaux par exemple [237].

### 3.2.3. L'électrophorèse capillaire couplée à un biocapteur

L'électrophorèse capillaire (EC) en tant que méthode de séparation peut être couplée à la détection par un biocapteur. L'électrophorèse capillaire est basée sur des chambres électrophorétiques miniaturisées. Dans cette combinaison de techniques, l'EC sert de support solide pour immobiliser des biorécepteurs. L'électrophorèse capillaire présente de nombreux avantages : un coût réduit, un temps d'analyse court, de petits volumes d'échantillons. La préparation de l'échantillon et le traitement de données peuvent être automatisés.

Une méthode en combinaison de l'EC avec un capteur électrochimique a été développée pour le dépistage de l'atrazine en une heure, qui, comme les antibiotiques, est une petite molécule (LOD de 0,1 ng/ml) [238]. Plus récemment, des méthodes combinant l'électrophorèse capillaire sur des biopuces et une détection par un biocapteur ont été publiées pour le dépistage de résidus d'antibiotiques. Dans ces publications, les transducteurs utilisés étaient de type ampérométrique, pour le dépistage de 5 aminosides dans du lait [239], et de sulfamides dans des tissus animaux [240]. Une revue de méthodes a été publiée concernant le couplage de l'électrophorèse capillaire à un autre mode de détection, l'électrochimiluminescence. Plusieurs exemples d'application à la détection d'antibiotiques, dans le domaine de l'analyse biomédicale (*eg.* sérum, urine) sont présentés dans cette revue [241].

Des approches multi-capillaires ou multi-bandes permettent de développer des méthodes multi-analytes [242]. Toutefois, le circuit microfluidique peut devenir complexe quand le nombre d'analytes à détecter augmente, puisque le nombre de capillaires ou de bandes augmente avec le nombre de biorécepteurs. En outre, les risques d'interférences entre les différents analytes augmentent. Les progrès constants de la microfluidique et de la miniaturisation vont sans doute permettre la multiplication des capillaires ou des bandes en parallèle.

Cette étude bibliographique concernant les méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques a montré la grande variété de méthodes et de techniques analytiques biologiques utilisables. Depuis les premières techniques microbiologiques dans les années 1980 jusqu'aux biocapteurs les plus innovants, en passant par les techniques immunologiques type ELISA, le choix de la méthode la plus adaptée au contrôle des résidus d'antibiotiques dans les aliments devra se faire en fonction des performances de la méthode. La caractérisation des performances et la validation des méthodes de dépistage vont donc constituer la deuxième partie de cette étude bibliographique.