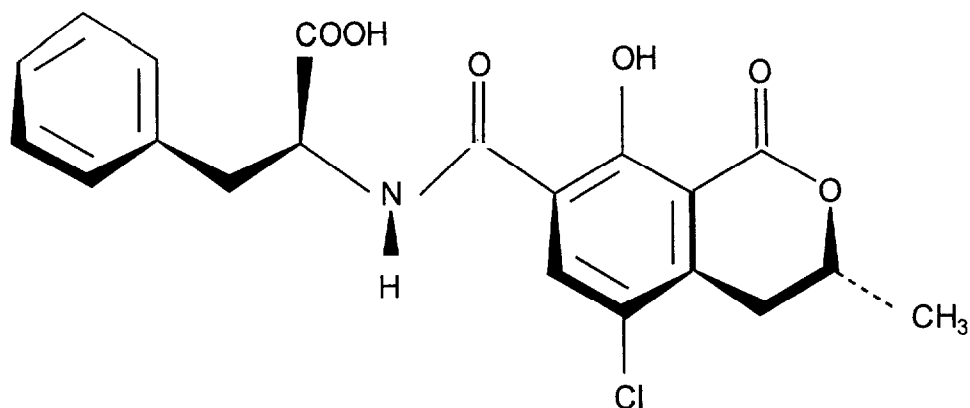
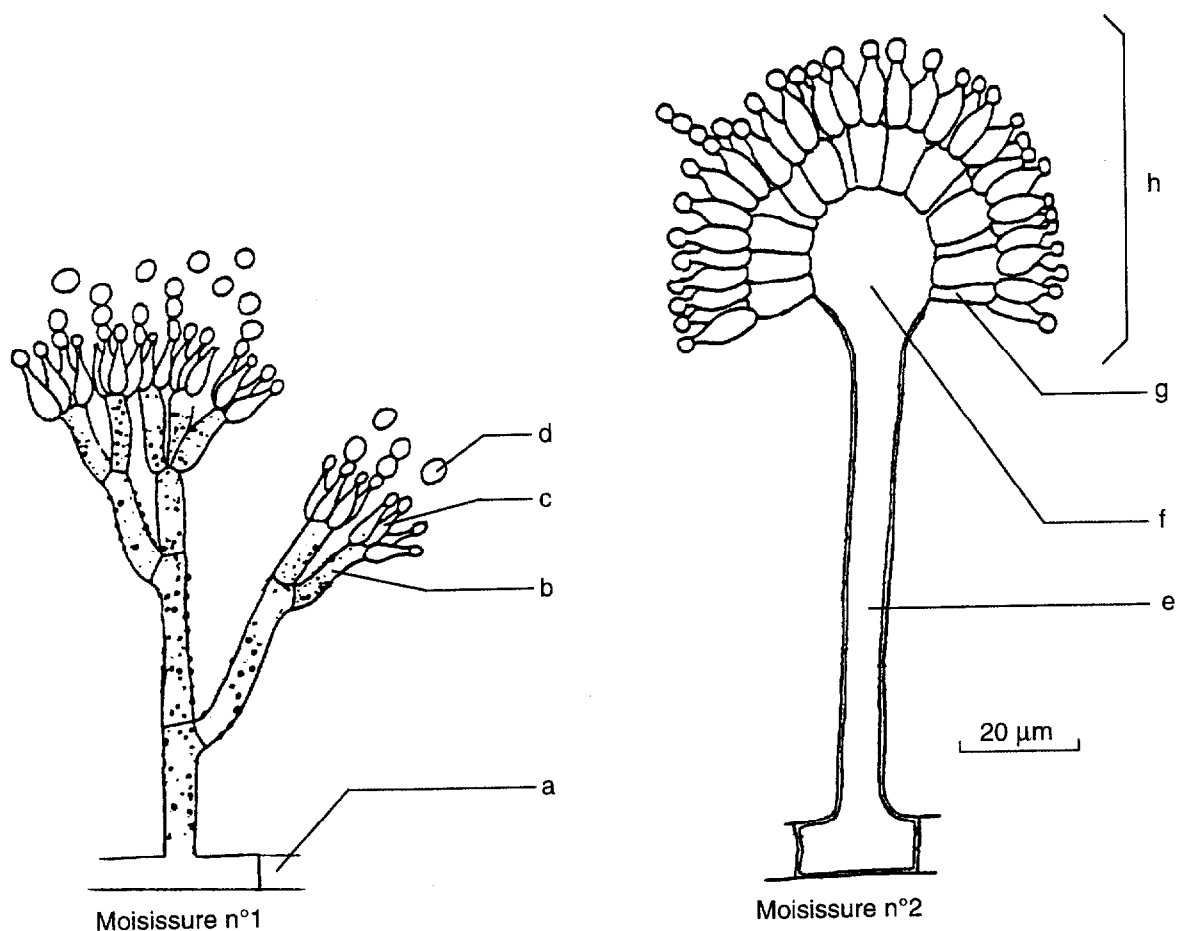


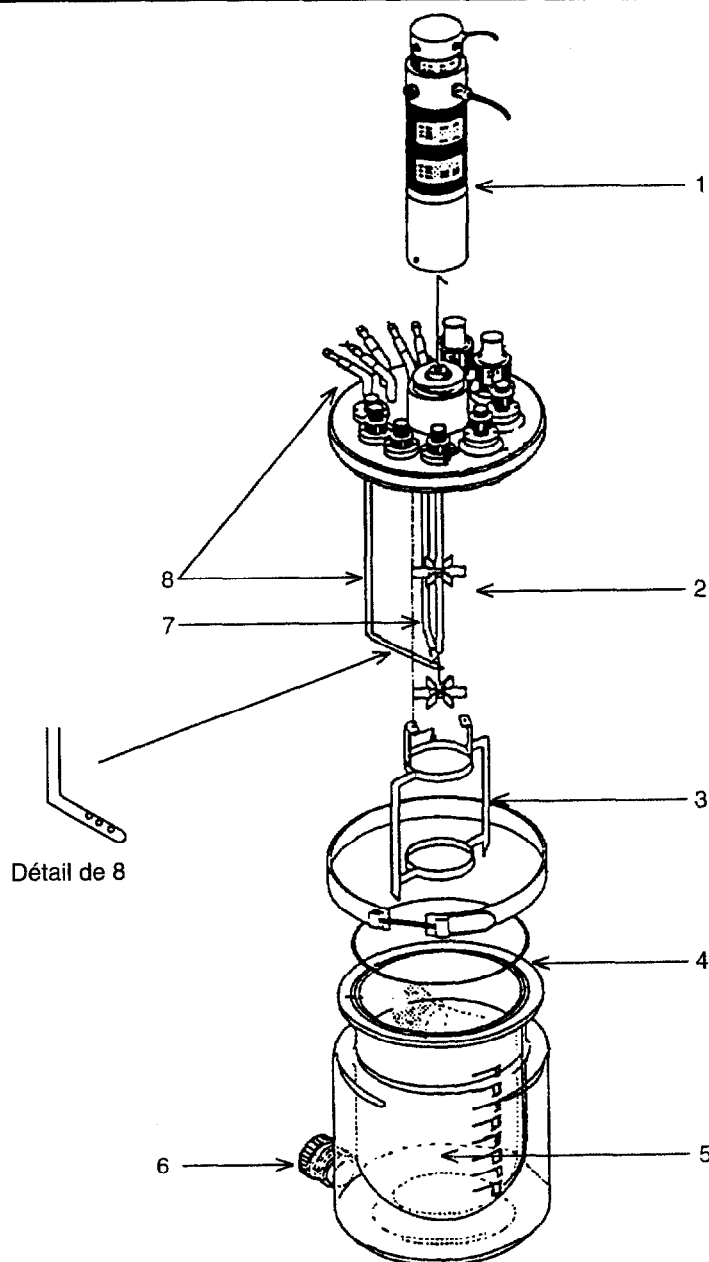
**DOCUMENT N° 1 : L'OCHRATOXINE A****DOCUMENT N° 2 : SCHEMA D'ORGANISATION MICROSCOPIQUE DE L'APPAREIL SPORIFERE DE DEUX MOISSURES****DOCUMENT N° 3 : GELOSE MALT-AGAR**

Extrait de malt ..... 30 g  
 Agar ..... 15 g  
 Eau distillée ..... q.s.p. 1 dm<sup>3</sup>  
 Le milieu est à pH 4,5

**DOCUMENT N° 4**

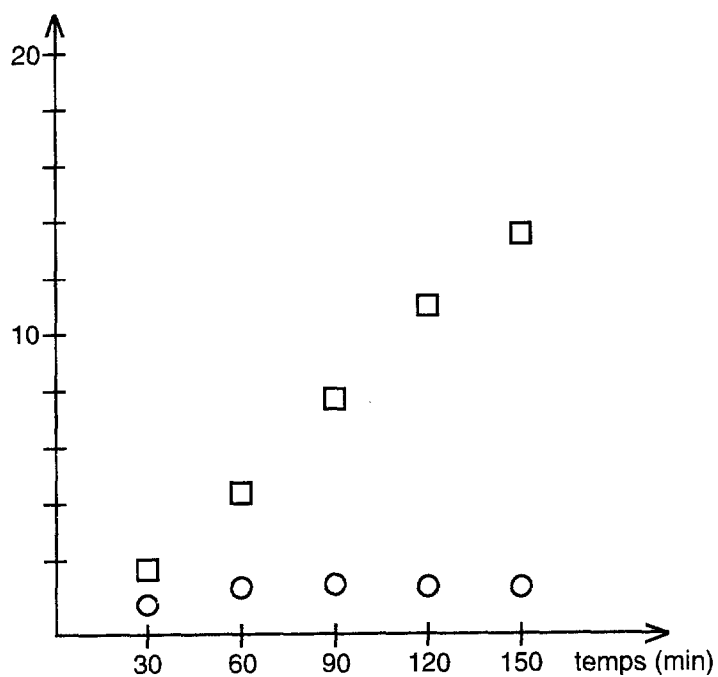
Concentration en ochratoxine A dans le milieu de culture ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )	Nombre de cellules. $\text{cm}^{-3}$ - mesure par opacimétrie après un temps t d'incubation -	Viabilité (%)
0	$8,4 \cdot 10^6$	99
5	$3,7 \cdot 10^6$	94
10	$3,1 \cdot 10^6$	82
20	$2,6 \cdot 10^6$	70

Inoculum :  $10^6$  cellules par  $\text{cm}^3$  de milieu de culture.

**DOCUMENT N° 5 : SCHEMA D'UN BIOREACTEUR**

**DOCUMENT N° 6 : ACTION DE L'OCHRATOXINE A**  
**SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE**

$\rho$  éthanol g. dm<sup>-3</sup>  
dans le milieu de culture



Résultats obtenus pour

□ culture sans ochratoxine A

○ culture avec 20 μg.cm<sup>-3</sup> d'ochratoxine A

**DOCUMENT N° 7**  
**EXTRACTION - PURIFICATION DE L'OCHRATOXINE A**

**Matériel**

- colonne d'immunoaffinité contenant un gel de Sepharose sur lequel des anticorps monoclonaux spécifiques de l'ochratoxine A sont liés de façon covalente
- hauteur de la colonne : 15 cm
- diamètre de la colonne : 2,2 cm
- capacité maximum de la colonne : approximativement 200 ng d'ochratoxine A

**Réactifs**

- méthanol
- acétonitrile ( $\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$ )
- tampon phosphate salin (PBS) à  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  et pH 7,8
- heptane

**Extraction**

Le protocole d'extraction indiqué prévoit le passage d'un volume équivalent à 1 g d'échantillon (pour les céréales) à travers la colonne d'affinité.

**Pour les céréales :**

- Peser avec exactitude environ 10 g d'échantillon moulu et ajouter  $20 \text{ cm}^3$  de mélange acétonitrile/eau 60v/40v.
- Agiter pendant 20 minutes.
- Filtrer sur papier filtre.
- Reprendre  $5 \text{ cm}^3$  de filtrat et ajouter  $5 \text{ cm}^3$  d'heptane.
- Agiter pendant 10 minutes.
- Centrifuger 5 min à 3000 g à température ambiante.
- Eliminer la totalité de la phase supérieure heptane.
- Prélever un volume  $V_F$  de filtrat dégraissé équivalent à 1 g d'échantillon et le compléter à  $15 \text{ cm}^3$  avec le tampon PBS : cette solution est appelée **solution échantillon**.

**Chromatographie d'affinité**

- Equilibrer la colonne par rinçage avec  $2 \text{ cm}^3$  de solution PBS dans le mélange eau/méthanol 90v/10v.
- Faire passer dans la colonne la totalité de la solution échantillon à un débit approximatif de 1 goutte toutes les 2 secondes.
- Rejeter l'effluent.
- Rincer la colonne avec  $10 \text{ cm}^3$  de solution PBS dans le mélange eau/méthanol 90v/10v et rejeter l'effluent.
- Eluer avec  $2 \text{ cm}^3$  de méthanol pur en pratiquant toujours un débit de 1 goutte toutes les 2 secondes : l'éluat recueilli quantitativement est ajusté à un volume final de  $5 \text{ cm}^3$ . C'est cette **solution d'élution** qui sera ensuite utilisée pour la quantification.

**DOCUMENT N° 8 :**  
**PROTOCOLE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE DE L'OCHRATOXINE A**

**I) REACTIFS FOURNIS**

- **plaque de microtitration** : 48 puits (6 barrettes de 8 puits sécables) sensibilisés par des anticorps de chèvre anti-IgA de souris.
- **5 solutions étalons d'ochratoxine A** dans le mélange solvant méthanol-eau. La solution étalon 1 a une concentration nulle en ochratoxine A.
- **conjugué ochratoxine A couplé à la peroxydase** : 3 cm<sup>3</sup> ; prêt à l'emploi ; bouchon rouge.
- **anticorps** monoclonal de souris **anti-ochratoxine A** : 3 cm<sup>3</sup> ; prêt à l'emploi ; bouchon noir.
- **Substrat-chromogène** <sup>(1)</sup> (peroxyde-tétraméthylbenzidine = TMB) : 6 cm<sup>3</sup> ; flacon compte-goutte blanc.
- **Solution-stop** : 6 cm<sup>3</sup> ; contient de l'acide sulfurique à 1 mol.dm<sup>-3</sup> ; flacon compte-goutte jaune.

(1) toute coloration de la solution chromogène est la preuve de sa détérioration ; le réactif doit alors être jeté.

**II) PREPARATION DES SOLUTIONS ECHANTILLONS**

Voir paragraphe extraction du document 7.

**III) TEST IMMUNOENZYMATIQUE**

- 1) Installer sur le cadre un nombre suffisant de puits pour traiter tous les étalons et les échantillons. Prévoir un puits pour le témoin.
- 2) Ajouter 50 mm<sup>3</sup> de chaque solution étalon ou solution échantillon dans chaque puits sauf dans le puits témoin où l'on met 50 mm<sup>3</sup> d'eau distillée.
- 3) Ajouter 50 mm<sup>3</sup> de conjugué ochratoxine A-enzyme dans chaque puits et 50 mm<sup>3</sup> d'eau distillée dans le puits témoin.
- 4) Ajouter 50 mm<sup>3</sup> d'anticorps anti-ochratoxine A dans chaque puits et 50 mm<sup>3</sup> d'eau distillée dans le puits témoin. Agiter soigneusement et incubé 10 (+/-1) minutes à température ambiante.
- 5) Vider les puits en renversant la plaque de microtitration, puis la taper vigoureusement (trois fois) contre du papier absorbant propre pour retirer tout le liquide des puits. A l'aide d'une pissette, remplir les puits d'eau distillée et vider à nouveau la plaque. Répéter l'opération deux fois.
- 6) Distribuer 100 mm<sup>3</sup> de substrat-chromogène dans tous les puits. Mélanger doucement et incubé 5 (+/- 0,5) minutes à température ambiante, à l'obscurité.
- 7) Ajouter 100 mm<sup>3</sup> de solution stop à chaque puits. Bien mélanger.

Mesurer l'absorbance à 450 nm du témoin contre l'air. Vérifier qu'elle est inférieure à 0,200.

Puis faire le zéro du spectrophotomètre sur ce témoin et lire alors l'absorbance des puits étalons et échantillons. Lire dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

**IV) EXPLOITATION DES RESULTATS**

Les valeurs d'absorbance obtenues pour les étalons et les échantillons sont divisées par la valeur d'absorbance du premier étalon (étalon 1) et multipliées par 100 pour obtenir un pourcentage noté P :

$$P = 100 \times A \text{ étalon (ou échantillon)} / A \text{ étalon 1}$$

**DOCUMENT N° 9****Préparation d'une solution étalon mère d'ochratoxine A**

- Dissoudre environ 1 mg d'ochratoxine A en cristaux dans 50 cm<sup>3</sup> de mélange toluène/acide éthanoïque concentré 99 v/1v.
- Afin de connaître la concentration exacte de cette solution mère, mesurer l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'ochratoxine A, soit 333 nm.

**Données :**

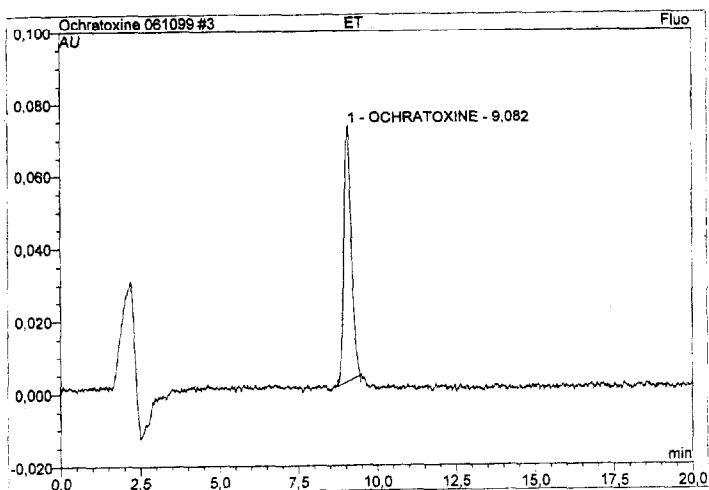
- masse molaire de l'ochratoxine A = 403 g.mol<sup>-1</sup>
- absorbance linéique molaire de l'ochratoxine A à 333 nm dans le mélange de solvants utilisé =  $5,44.10^3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Préparation des solutions étalons filles d'ochratoxine A**

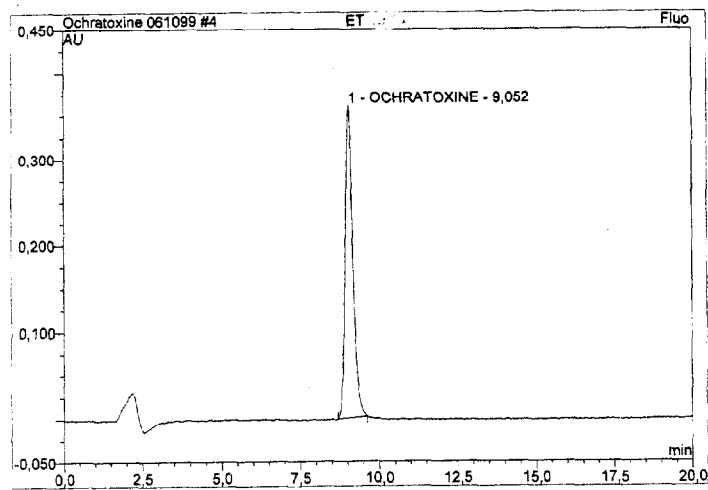
- Diluer la solution étalon mère dans le même mélange de solvants afin d'obtenir une solution étalon fille à 0,4 µg.cm<sup>-3</sup>.
- Dans des petits flacons, verser 5 mm<sup>3</sup>, 25 mm<sup>3</sup> et 50 mm<sup>3</sup> de la solution à 0,4 µg.cm<sup>-3</sup>, puis évaporer à sec sous courant de diazote. Reprendre chaque résidu sec par 1 cm<sup>3</sup> de phase mobile. On obtient ainsi **les 3 solutions étalons qui seront chromatographiées et appelées solutions étalons X, Y et Z.**

**Caractéristiques de la chaîne chromatographique et paramètres expérimentaux**

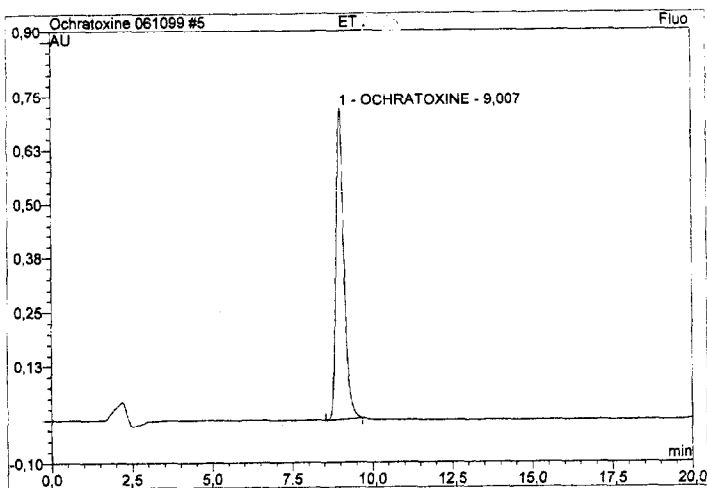
- Colonne analytique à phase inversée :
  - longueur : 250 mm
  - diamètre intérieur : 4,6 mm
  - support : particules sphériques de 5 µm de silice greffée en C18
- Phase mobile : acétonitrile/eau/acide éthanoïque concentré 99v/99v/2v
- Débit 1 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>
- Vanne d'injection à boucle de 200 µl
- Détecteur fluorimétrique à monochromateur :
  - longueur d'onde d'excitation : **à indiquer**
  - longueur d'onde d'émission : 460 nm

**DOCUMENT N° 10****Solution étalon X**

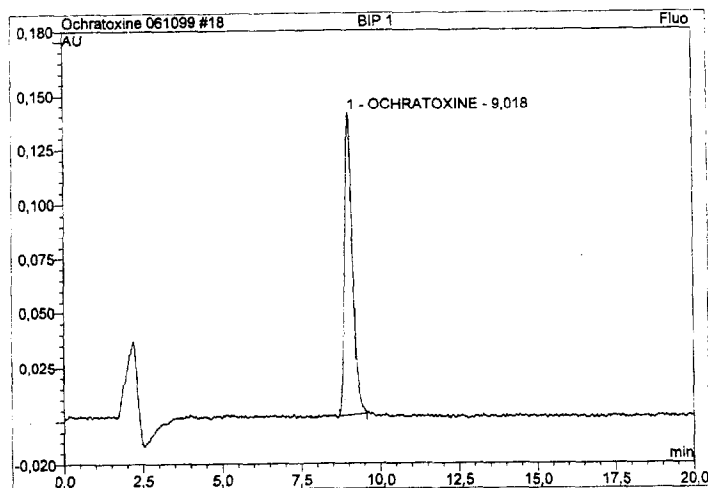
No.	Ret.Time min	Peak Name Pic	Height AU	Area AU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	9.08	OCHRATOXINE	0.0705	0.01940	100.00	n.a.	BMB
Total:			0.0705	0.01940	100.00	0.000	

**Solution étalon Y**

No.	Ret.Time min	Peak Name Pic	Height AU	Area AU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	9.05	OCHRATOXINE	0.3595	0.10241	100.00	n.a.	BMB
Total:			0.3595	0.10241	100.00	0.000	

**Solution étalon Z**

No.	Ret.Time min	Peak Name Pic	Height AU	Area AU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	9.01	OCHRATOXINE	0.7196	0.20618	100.00	n.a.	BMB
Total:			0.7196	0.20618	100.00	0.000	

**Solution d'élution**

No.	Ret.Time min	Peak Name Pic	Height AU	Area AU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	9.02	OCHRATOXINE	0.1392	0.03928	100.00	n.a.	BMB
Total:			0.1392	0.03928	100.00	0.000	