



Universitatea "Babeș-Bolyai" Cluj Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Université de Perpignan, Via Domitia
Laboratoire IMAGES, EA 4218

THESE en cotutelle
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PERPIGNAN
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CLUJ NAPOCA

Présentée le 24 Juin 2011 par
Mlle Vasilica Adriana LATES

Systemes bioanalytiques pour la détermination de la
capacité antioxydante et l'ochratoxine A dans les
denrées alimentaires

-résumé-

Table de matières

| | |
|--|----|
| Partie 1. Systèmes bioanalytiques pour la détermination de la capacité antioxydante dans les denrées alimentaires | 4 |
| 1 Etude bibliographique..... | 5 |
| 2 But du travail..... | 7 |
| 3 Résultats originaux..... | 8 |
| 3.1 Partie expérimentale..... | 8 |
| 3.1.1 Matériels et méthodes..... | 8 |
| 3.1.1.1 Mesures électrochimiques et spectrophotométriques..... | 8 |
| 3.1.1.2 L'élaboration d'un biocapteur à base de la peroxydase du raifort (G/HRP-Os)..... | 9 |
| 3.1.1.3 L'élaboration d'un bioréacteur à base de la xanthine oxydase (XOD) | 9 |
| 3.1.2 Méthodes de référence pour la détermination de la capacité antioxydante (CAO)..... | 11 |
| 3.1.2.1 La méthode du radical DPPH | 11 |
| 3.1.2.2 La méthode Folin-Ciocalteu | 11 |
| 3.2 Résultats et discussions..... | 13 |
| 3.2.1 Caractérisation du biocapteur à base de la peroxydase du raifort (G/HRP-Os)..... | 13 |
| 3.2.1.1 Caractérisation en régime statique | 13 |
| 3.2.1.2 Caractérisation en flux..... | 14 |
| 3.2.2 La détermination de la CAO avec le couplage bioréacteur-biocapteur..... | 16 |
| 3.2.2.1 Le mode "stationnaire"..... | 17 |
| 3.2.2.2 Le mode "transitoire" | 18 |
| 4 Conclusions | 20 |
| Partie 2. Systèmes bioanalytiques pour la détection de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires | 21 |
| 1 Etude bibliographique..... | 22 |
| 1.1 Les moisissures toxiques et les denrées alimentaires contaminées..... | 22 |
| 1.2 La toxicologie de l'OTA | 23 |
| 1.3 Les règlements et les méthodes de référence pour la détection de l'OTA..... | 23 |
| 1.3.1 L'extraction et la purification | 23 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.3.2 | Séparation et détection | 24 |
| 1.4 | Les immunoessais pour le dépistage de l'OTA | 25 |
| 2 | But du travail | 27 |
| 3 | Résultats originaux | 28 |
| 3.1 | Partie expérimentale | 28 |
| 3.1.1 | Matériels et méthodes | 28 |
| 3.1.2 | Le développement du matériel bio-sensible à base de l'ochratoxine B | 28 |
| 3.1.2.1 | La modification des billes en verre avec la dimension des pores contrôlée (CPG) | 28 |
| 3.1.2.2 | L'immobilisation de l'OTB sur CPG | 29 |
| 3.1.2.3 | L'accrochage de l'anticorps et son marquage avec le deuxième anticorps | 29 |
| 3.1.3 | Détection de l'OTA avec l'essai de déplacement sur le matériel bio-sensible | 30 |
| 3.1.3.1 | Détection spectrophotométrique | 30 |
| 3.1.3.2 | Détection ampérométrique avec l'analyse par injection en flux continu | 31 |
| 3.1.4 | Procédés de prétraitement des vins et leurs validation par HPLC-FD | 31 |
| 3.1.4.1 | La méthode standard pour l'extraction de l'OTA des échantillons de vins | 31 |
| 3.1.4.2 | L'extraction sur phase solide pour la purification des échantillons de vins | 31 |
| 3.2 | Résultats et discussion | 31 |
| 3.2.1 | Caractérisation et optimisation du matériel bio-sensible | 31 |
| 3.2.1.1 | L'immobilisation de l'ochratoxine B | 31 |
| 3.2.1.2 | L'optimisation de l'immunoessai de type déplacement | 34 |
| 3.2.2 | Procédures de prétraitement des échantillons de vins | 37 |
| 3.2.3 | Détection <i>in situ</i> de l'OTA dans des échantillons de vins | 38 |
| 3.2.4 | Possibilités d'utilisation du matériel bio-sensible | 40 |
| 4 | Conclusions | 42 |
| | References | 42 |

Mots clefs

capacité antioxydante, xanthine oxydase, peroxydase du raifort, biocapteur, bioréacteur, détection ampérométrique en flux, ochratoxine A, immunoessais, ochratoxine B, anticorps, microbille en verre, matériel bio-sensible, échantillons réels de vin et de jus des fruits.

*Partie 1. Systèmes
bioanalytiques pour la
détermination de la capacité
antioxydante dans les denrées
alimentaires*

1 Etude bibliographique

Le métabolisme oxydatif est essentiel pour la vie cellulaire. Cependant l'un de ses effets secondaires est la production de radicaux libres très réactifs. Parmi ces radicaux on retrouve le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), l'hydroxyle (HO^{\bullet}), le peroxy (ROO^{\bullet}), l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) ainsi que leurs dérivés comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et peroxynitrite ($ONOO^-$) [1]. Toutes ces espèces chimiques sont nommées composés réactifs de l'oxygène (en anglais : reactive oxygen species (ROS)). L'impact majeur de ces composés sur les organismes est la détérioration de certaines voies biochimiques qui entraînent, à terme, le vieillissement prématuré des tissus.

Le stress oxydatif est décrit comme le déséquilibre entre la quantité des radicaux libres et le pouvoir défensif du système antioxydant composé d'enzymes protectrices comme la catalase, la peroxydase et la superoxyde dismutase [2]. L'apport journalier en antioxydants (composés chimiques naturellement présents dans certains aliments) contribue à la restauration de cet équilibre. Dans ce contexte, l'évaluation de la capacité antioxydante des systèmes biologiques et du pouvoir antioxydant des aliments contribue à la prévention des maladies dégénératives et du vieillissement.

Une méthode rapide de la quantification du pouvoir antioxydant des nutriments pourrait alors servir de critère qualitatif des aliments. Elle pourrait ainsi être utilisée comme un critère de sélection des variétés, des espèces, du degré de maturation et des conditions des cultures afin d'obtenir des aliments ayant une teneur en antioxydants élevée.

La grande variété des méthodologies utilisées pour l'évaluation de la capacité antioxydante (CAO) est justifiée par la diversité des substrats et leurs compositions. Parmi ces méthodes, on en distingue deux types en fonction de l'approche analytique qui est utilisée. La première comprend les méthodes basées sur le degré d'inhibition de l'oxydation d'un lipide ou d'une lipoprotéine par l'antioxydant lui-même. La seconde comprend alors les méthodes basées sur la capacité des antioxydants à capter les radicaux libres.

Dans le deuxième type, les méthodes varient selon la nature des radicaux libres qui peuvent être produits naturellement (les ROS) dans le métabolisme ou bien synthétisés (comme le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, DPPH ou le 2,2-azinobis(3-éthylbenzothiazoline), ABTS) ainsi que selon les moyens analytiques utilisés pour surveiller les réactions impliquées.

Dans la dernière décade, les chercheurs manifestent un intérêt croissant pour l'utilisation des biocapteurs comme des nouveaux outils pour l'évaluation de la capacité antioxydante. Parmi ceux-ci, nombreux sont les biocapteurs basés sur l'habilité des antioxydants à capter le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

(SO). Celui-ci est produit *in situ* via des réactions chimiques [3] ou biochimique comme l'oxydation de la xanthine (XA) en acide urique (AU) catalysée par la xanthine oxydase (XOD) [4]. Ces biocapteurs sont soit à la base du cytochrome C (Cyt C) [5-7] soit de la superoxyde dismutase (SOD) [3, 8]. Les deux enzymes acceptent comme substrat le SO, permettant soit la quantification directe [3, 5-8] du radical soit la quantification indirecte à travers du H₂O₂ produit dans cette réaction [9, 10]. Ces biocapteurs exploitent inefficacement le système XA/XOD car la XOD n'est pas immobilisée mais utilisée libre dans le tampon de la mesure électrochimique.

Récemment, des biocapteurs ont été développés par co-immobilisation covalente du Cyt C et de la XOD sur la surface des électrodes sérigraphiées en graphite [11, 12]. Ces biocapteurs ont été utilisés pour la détermination de la CAO de l'ail et des jus d'orange, mais seulement par rapport au radical SO, car la catalase a été ajoutée dans la solution pour éliminer les interférences dues au H₂O₂.

D'autres essais d'immobilisation de la XOD ont été décrits comme l'inclusion de l'enzyme dans des bioréacteurs [13-17]. Cependant, aucun n'a été utilisé pour l'estimation de la CAO dans des échantillons réels. Le bioréacteur développé par l'immobilisation de la XOD dans un gel de Sepharose activée avec du bromure de cyanogène a été utilisé pour l'évaluation de la CAO de la SOD (figure 1A) [17]. Celle-ci est basée sur la compétition entre l'enzyme et un antioxydant synthétique, le sel de tetrazolium. La formation du produit est alors suivie par voie optique à 438 nm.

Dans un autre bioréacteur, la XOD a été immobilisée sur un support de billes en verre avec la dimension des pores contrôlée (CPG) et le réacteur a été inclus dans un système en flux avec deux voies (figure 1B) [15]. Ce système a servi pour la détermination individuelle de la CAO de la SOD, de l'acide ascorbique vers le radical SO et de la catalase vers le H₂O₂. La détection du SO et du H₂O₂ est réalisée avec deux biocapteurs à base du Cyt C.

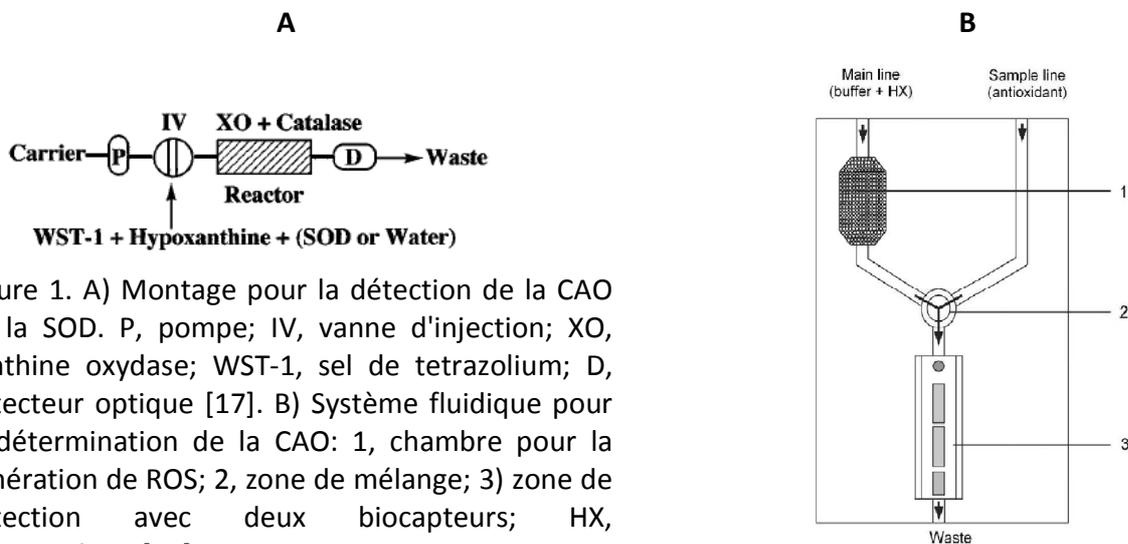


Figure 1. A) Montage pour la détection de la CAO de la SOD. P, pompe; IV, vanne d'injection; XO, xanthine oxydase; WST-1, sel de tetrazolium; D, détecteur optique [17]. B) Système fluide pour la détermination de la CAO: 1, chambre pour la génération de ROS; 2, zone de mélange; 3) zone de détection avec deux biocapteurs; HX, hypoxanthine [15].

Il n'y a cependant pas des travaux publiés sur un biocapteur où un bioréacteur qui pourrait mesurer une CAO bivalente du même échantillon réel vers deux espèces différentes, comme par exemple le radical SO et le H₂O₂ qui sont intimement liés à la réaction spontanée de dismutation.

2 But du travail

Dans la perspective de l'étude bibliographique, nous avons envisagé un système capable de mesurer la CAO bivalente des échantillons vers le SO et le H₂O₂. Dans ce but, nous avons développé un système bioanalytique basé sur le couplage en flux d'un bioréacteur, rempli avec la XOD immobilisée sur CPG, et d'un biocapteur ampérométrique à base de la peroxydase du raifort (HRP) (figure 2).

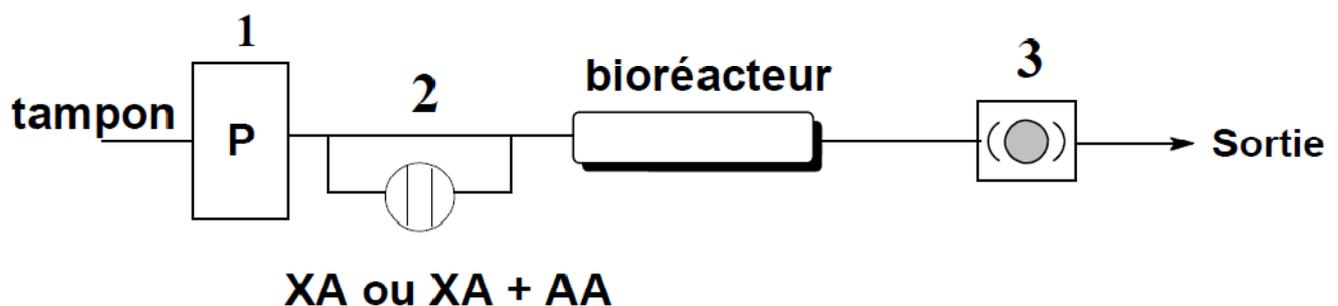


Figure 2. Diagramme du système en flux à ligne unique utilisé pour l'évaluation de la CAO: (1) pompe péristaltique, (2) vanne d'injection à 6 canaux, bioréacteur (à base de la XOD), (3) cellule électrochimique contenant le biocapteur à base de la HRP.

Le principe de fonctionnement de ce système est le suivant:

1. Lors du passage de la XA dans le bioréacteur, la réaction enzymatique décrite dans le schéma 1 est responsable de la production du radical SO et du H₂O₂. Les radicaux SO dismutent rapidement ce qui implique qu'à la sortie du bioréacteur, le tampon contient du H₂O₂. La détection de celui-ci est réalisée avec le biocapteur à base de la HRP par l'enregistrement d'un courant de réduction.

2. Lors du passage d'un mélange de XA et d'antioxydant (AOX), ce dernier réagit avec le radical SO et avec le H₂O₂ ce qui implique qu'à la sortie du bioréacteur la quantité de H₂O₂ est moins importante par rapport au cas précédent. Ensuite, le courant de réduction est diminué aussi. Finalement, la CAO de l'échantillon d'AOX testé est directement proportionnelle à la différence entre les deux courants de réduction enregistrés.

Pour l'utilisation de ce système nous avons envisagé deux modes de travail:

1. Le mode "stationnaire" dans lequel les antioxydants sont injectés dans un flux de XA;
2. Le mode "transitoire" dans lequel un mélange de XA et des antioxydants est injecté dans un flux de tampon.

L'optimisation de ce système a inclus:

- Les paramètres du bioréacteur: la procédure et le support de l'immobilisation de la XOD, les dimensions, la concentration et le pH de la solution de XA, le débit du flux.
- Les paramètres du biocapteur comme la méthode d'immobilisation de la HRP. Ainsi, deux biocapteurs ont été développés: un biocapteur de troisième génération par l'immobilisation covalente de la HRP sur les électrodes modifiées avec une couche de 4-carboxyphényle et un biocapteur de seconde génération par l'adsorption d'une HRP incorporée dans un polymère redox à base d'osmium. Ce médiateur permet la détection du H_2O_2 à un potentiel réduit. Comme les performances en terme de sensibilité et limite de détection du deuxième biocapteur ont été supérieures au premier, les résultats présentés ne concernent que celui-ci.

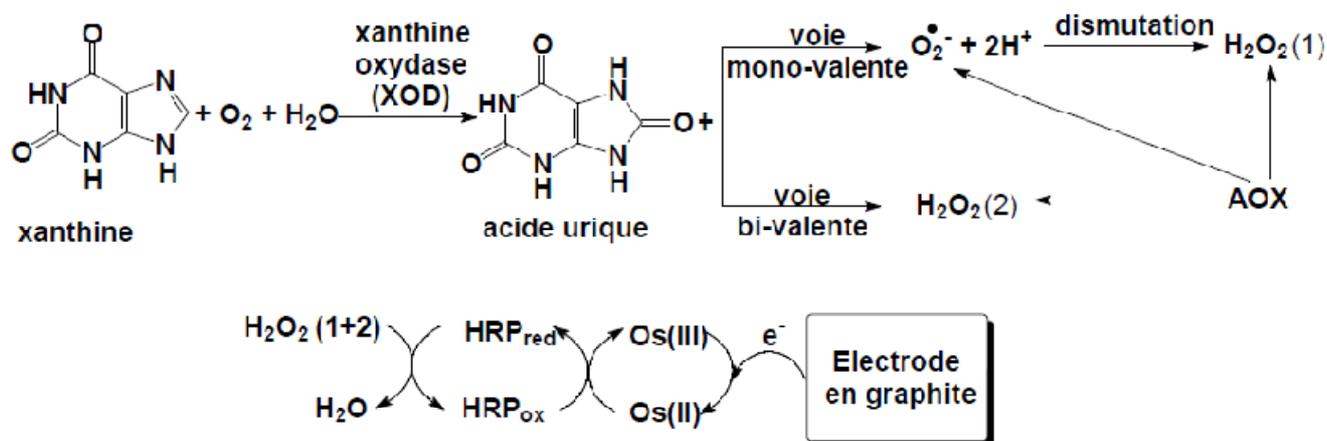


Schéma 1. Principe de fonctionnement du couplage bioréacteur - biocapteur : la production de ROS avec le système XA-XOD, les interactions des AOX avec les ROS et la détection de H_2O_2 par le biocapteur.

3 Résultats originaux

3.1 Partie expérimentale

3.1.1 Matériels et méthodes

3.1.1.1 Mesures électrochimiques et spectrophotométriques

Les mesures électrochimiques ont été menées à la température ambiante avec un potentiostat SP-150; Biologic Science Instruments, Grenoble, France contrôlé par le logiciel EC-Lab V9.46 et avec un potentiostat Autolab-PGSTAT10, Eco Chemie, Utrecht, Hollande contrôlé par le logiciel GPES V 4.9.007. La cellule est composée d'une électrode de travail en graphite sérigraphiée (DROSENS DRP-110, Spain;

le diamètre de la surface de l'électrode de travail est de 4 mm), d'une électrode de référence en Ag/AgCl, KCl_{sat} (BAS, West Lafayette, USA) et d'un fil de platine comme électrode auxiliaire.

Pour les mesures électrochimiques en flux, nous avons utilisé une cellule de type "wall-jet" (DRP-FLWCL, DROPSSENS) adaptée aux électrodes sérigraphiées (DROPSSENS DRP-110, Spain; l'électrode de travail et la contre-électrode en graphite et l'électrode de référence en Ag, considérée comme une pseudo-référence). Le flux a été assuré par une pompe péristaltique (FIALab-2500 system, FIALab®, WA, US) et les injections par une valve à 6 canaux.

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées avec un spectrophotomètre UV-Vis (V-530 Jasco International Co., Tokyo, Japan; UV-1800 Shimadzu Co., Japan; 8452A HP) et les spectres IR avec un FT/IR spectrophotomètre (FT/IR-600; Jasco International Co., Tokyo, Japan) avec la technique de la pastille en KBr.

3.1.1.2 L'élaboration d'un biocapteur à base de la peroxydase du raifort (G/HRP-Os)

Les électrodes sérigraphiées en graphite ont été prétraitées par la voltammétrie cyclique dans une solution de 0,5 M H₂SO₄ par balayage du potentiel entre -0,4 et 1,5 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat} avec une vitesse de balayage de 0,1 V/s (3 cycles). Après le lavage des électrodes, 10 µL de la solution de la peroxydase du raifort (HRP) ont été déposés à la surface de l'électrode de travail. Après 2 h à la température ambiante, l'enzyme est immobilisée par l'évaporation du solvant qui entraîne son absorption. Ainsi, le biocapteur à base de la HRP (G/HRP-Os) est obtenu. Il est stocké à 4°C sous une atmosphère de tampon phosphate (PBS).

3.1.1.3 L'élaboration d'un bioréacteur à base de la xanthine oxydase (XOD)

La construction d'un bioréacteur pour la détermination de la capacité antioxydante (CAO) a inclus deux étapes. Premièrement, le matériel du bioréacteur (billes en verre avec la dimension des pores contrôlée, CPG) a été fonctionnalisé avec des groupements NH₂ par un protocole adapté d'après le travail publié par Richter et al. [16]. Ainsi, 0,3 g de CPG ont été ajoutées à une solution de 1 M NaOH (35 mL) et agitées dans un flacon en plastique pendant 1 h à 90°C. Ensuite, les billes ont été lavées avec 25 mL de 50 mM tampon borate (pH 9). Durant 2 jours, la silanisation a été réalisée par agitation douce des billes avec 5 mL de 10 % (v/v) de 3-aminopropyl triéthoxysilane (APTES) dans le même tampon borate. Finalement, les billes sont lavées 3 fois avec le tampon borate et séchées pour 3 jours dans une étuve à 60°C. Le succès de la silanisation a été évalué par la différence entre les spectres IR enregistrés sur la silice non-modifiée (figure 3A) et sur le NH₂-CPG (figure 3C). Pour ce dernier, il a été enregistré le même déplacement des bandes d'adsorption en IR comme celui déjà rapporté par d'autres auteurs pour

la silanization des billes de silices avec un autre agent de silanization (3-(chloropropyl)triéthoxysilane) [18]. Deuxièmement, la xanthine oxydase (XOD) a été immobilisée sur les billes de NH₂-CPG par réticulation avec la glutaraldehyde (Glu). Les billes ont été activées avec une solution de Glu (2,5 % dans le tampon PBS, pH 7,4) pendant 30 min à la température ambiante, lavées et agitées doucement avec la solution de XOD (0,25 U/mL). Pour vérifier le succès de l'immobilisation, l'activité enzymatique de la solution avant et après l'immobilisation a été mesurée avec le protocole spectrophotométrique recommandé par le fournisseur de l'enzyme [19]. Ainsi, il a été observé que la solution, après l'immobilisation, ne contient pas de XOD montrant une immobilisation complète sur le support.

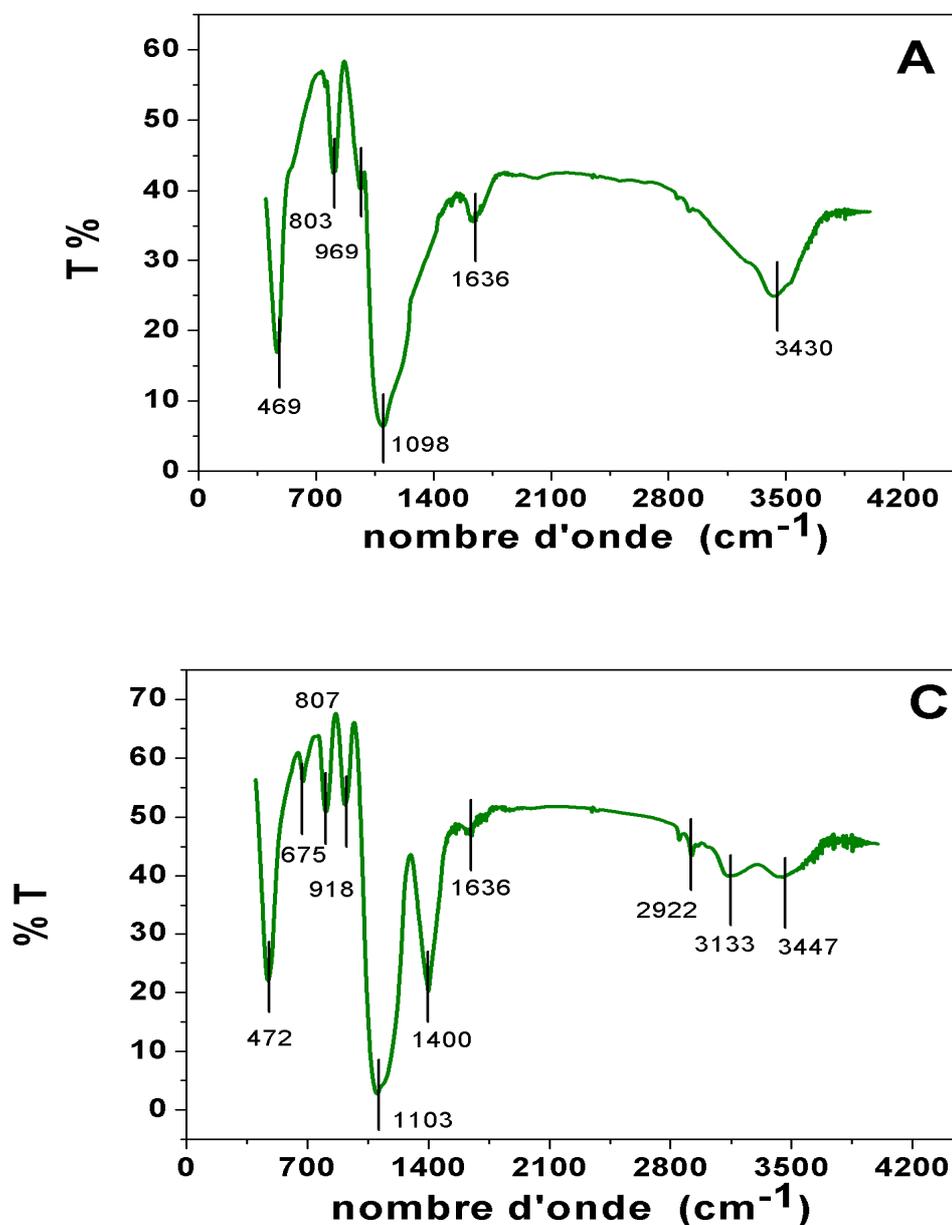


Figure 3. Les spectres IR pour la silice non-modifiée (A) et pour les billes CPG modifiées avec APTES (C).

3.1.2 Méthodes de référence pour la détermination de la capacité antioxydante (CAO)

3.1.2.1 La méthode du radical DPPH

Une gamme de concentration de solutions de DPPH entre $5 \cdot 10^{-6}$ et $1 \cdot 10^{-3}$ M a été préparée dans un mélange 2:3 (v/v) eau:éthanol et une courbe de calibration a été tracée par l'enregistrement de la densité optique (D.O.) du radical DPPH à 540 nm. Les tests préliminaires ont été réalisés pour optimiser les dilutions des antioxydants testés et le temps de la réaction entre ceux-ci et le radical. Finalement, 100 μ L de l'échantillon d'antioxydant ont été mélangés avec 1,9 mL de $4 \cdot 10^{-4}$ M DPPH et laissés agir 1 h à la température ambiante. La capacité antioxydante (CAO) a été calculée avec la formule suivante:

$$CAO (\%) = \frac{A(DPPH)_{AOX=0} - A(DPPH)_{AOX \neq 0}}{A(DPPH)_{AOX=0}} \times 100$$

3.1.2.2 La méthode Folin-Ciocalteu

500 μ L du réactif Folin-Ciocalteu (FC) (dilué 1:9 (v/v) avec de l'eau) ont été mélangés avec 100 μ L de l'échantillon d'antioxydant et avec 400 μ L de Na_2CO_3 (75 g/L). La réaction dure 5 minutes à la température ambiante. La formation d'un composé coloré est enregistrée à 735 nm. Cette longueur d'onde a été choisie après avoir tracé le spectre UV-Vis pour une solution contenant le réactif FC et 15 mg/mL d'acide gallique (AG) et après avoir vérifié que les échantillons colorés testés n'absorbent pas à cette longueur d'onde.

Une courbe de calibration a été tracée avec une gamme de concentration d'AG entre 1 et 100 mg/mL (figure 4). Les échantillons réels (des vins, des jus et des thés) ont été dilués au 1:3 avec le tampon PBS, sauf le vin rouge, qui a été dilué au 1:6. La dilution a été nécessaire pour garder les valeurs de D.O. dans le domaine linéaire de la courbe de calibration. Le temps de réaction a été de 5 minutes, après avoir vérifié que dans cet intervalle les valeurs de D.O. atteignent 80 % du plateau observé après 30 minutes (figure 5). Le temps court de la réaction est préférable afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus avec notre système en flux où le temps de réaction est d'environ une minute.

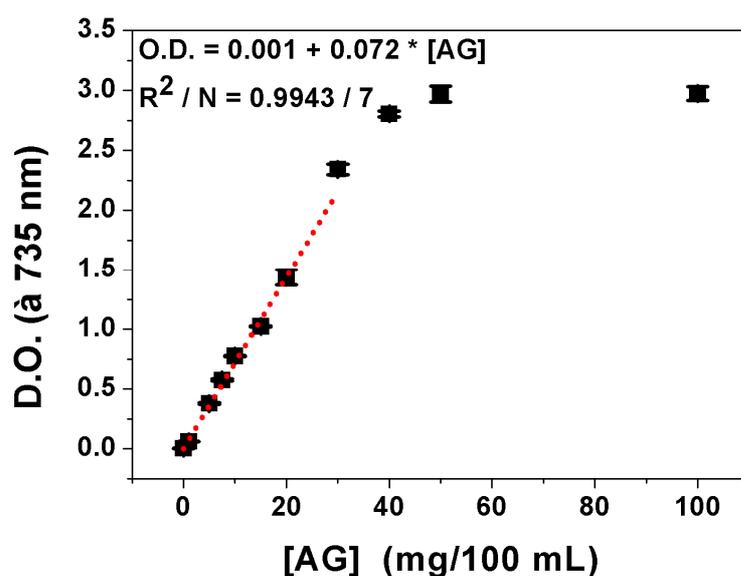


Figure 4. Courbe de calibration pour la variation de la D.O. du produit formé dans la réaction du réactif FC avec différentes concentrations d'acide gallique.

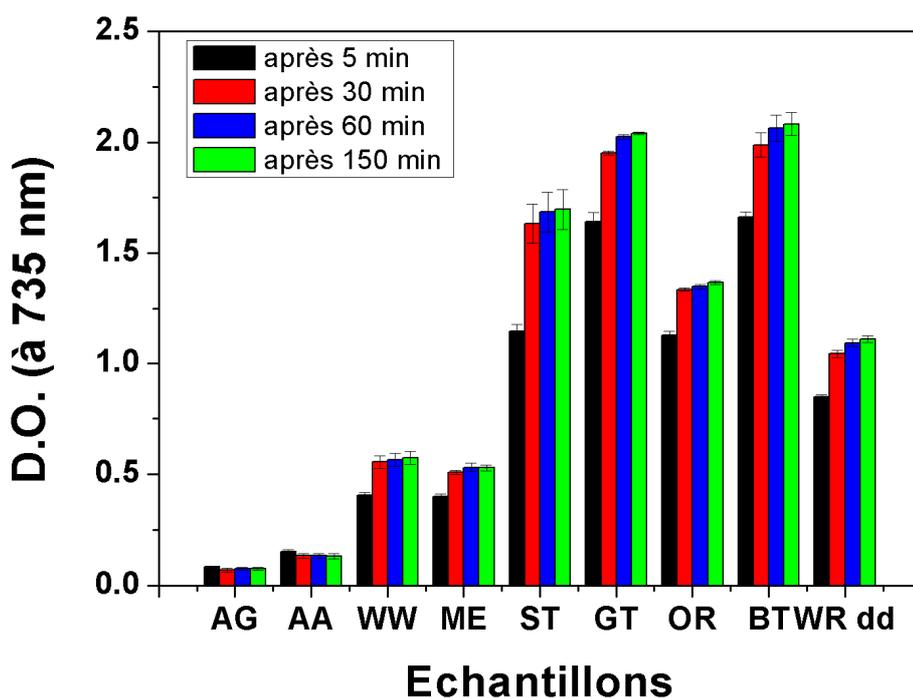


Figure 5. L'influence sur la D.O. du temps de réaction des antioxydants et des échantillons réels avec le réactif FC. Les abréviations sont: AG, acide gallique; AA, acide ascorbique; WW, vin blanc; ME; jus de pommes; ST, jus de raisins; GT, thé vert; OR, jus d'orange; BT, thé noir; WRdd, vin rouge dilué 2x.

3.2 Résultats et discussions

3.2.1 Caractérisation du biocapteur à base de la peroxydase du raifort (G/HRP-Os)

3.2.1.1 Caractérisation en régime statique

Les paramètres bioanalytiques ont été obtenus pour des additions standard de H₂O₂ dans une cellule à trois électrodes contenant le biocapteur G/HRP-Os. Ils ont montré que celui-ci est assez performant pour être utilisé dans les mesures de la détermination de la CAO.

- Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique ont été obtenus avec le modèle de Michaelis-Menten (M-M): $I_{\max} = 4,20 \pm 0,08 \mu\text{A}$, $K_M = 16,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ($R^2 / N = 0,994 / 16$, N étant le nombre des points de la courbe de calibration).
- La sensibilité (définie comme I_{\max} / K_M): $0,26 \mu\text{A}/\mu\text{M}$;
- La limite de la mesure (LOM) (définie comme 10 fois la déviation standard du courant de réduction en l'absence de H₂O₂ divisée par la sensibilité): $0,46 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ qui correspond aussi à la plus faible concentration mesurée expérimentalement;
- La limite de détection (LOD) (définie comme 3 fois la déviation standard du courant de réduction en l'absence de H₂O₂ divisée par la sensibilité): $0,13 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$;
- Le domaine de linéarité: $0,5$ à $12 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$;
- Le temps de réponse t_{95} (défini comme le temps nécessaire pour obtenir 95 % du courant de réduction à l'addition de n'importe quelle concentration de H₂O₂): $5,2 \text{ s}$;
- La répétabilité (définie comme la déviation standard de la moyenne du courant de réduction enregistré à l'addition de $6 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ pour 4 mesures individuelles avec le même biocapteur): $1,9 \%$;
- La reproductibilité (définie comme la déviation standard de la moyenne du courant de réduction enregistré à l'addition de $6 \mu\text{M}$ avec 3 bioréacteurs): $13,2 \%$.

Avant de poursuivre les expériences, les éventuelles interférences électrochimiques des espèces impliquées dans le fonctionnement du système ont été vérifiées. Ainsi, nous avons comparé les voltampérogrammes cycliques du biocapteur G/HRP enregistrés en absence et en présence de la XA, de l'AU, de l'acide ascorbique (AA) et de l'acide gallique (AG) (figure 6 A,B,C,D). Au potentiel de travail ($-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$) ces espèces ne sont pas actives du point de vue électrochimique. De plus, les courbes de calibration pour le H₂O₂ ont été tracées avec le G/HRP-Os en absence et en présence de ces espèces (figure 6 E,F,G,H). Les paramètres electro-cinétiques de ces courbes sont présentés dans le tableau 1. Nous avons observé la non interférence de la XA et de l'AU dans la détection de H₂O₂. De plus,

il y a une diminution de ces paramètres en présence de l'AA et d'AG montrant que ces deux composés manifestent leurs capacités antioxydantes envers le H₂O₂.

Tableau 1. Paramètres du modèle M-M pour le biocapteur G/HRP-Os et la détection de H₂O₂ en absence et en présence des différentes espèces.

| Paramètres du modèle M-M pour le biocapteur G/HRP-Os | | K _M (μM) | I _{max} (μA) | R ² / 15 |
|--|------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Figure 6 E | H ₂ O ₂ | 25 ± 2 | 5,5 ± 0,1 | 0,98688 |
| | H ₂ O ₂ + XA | 28 ± 3 | 6,0 ± 0,2 | 0,98421 |
| Figure 6 F | H ₂ O ₂ | 24 ± 1 | 2,5 ± 0,1 | 0,99749 |
| | H ₂ O ₂ + AU | 29 ± 1 | 2,5 ± 0,1 | 0,99914 |
| Figure 6 G | H ₂ O ₂ | 23 ± 1 | 4,9 ± 0,1 | 0,99531 |
| | H ₂ O ₂ + AA | 13 ± 1 | 0,6 ± 0,1 | 0,99444 |
| Figure 6 H | H ₂ O ₂ | 17 ± 3 | 1,4 ± 0,1 | 0,99814 |
| | H ₂ O ₂ + AG | 11 ± 2 | 0,9 ± 0,1 | 0,99653 |

3.2.1.2 Caractérisation en flux

Pour l'utilisation du biocapteur G/HRP-Os dans un système de flux, le coefficient de dispersion d'un échantillon dans ce système a été évalué. Pour cela, nous avons calculé le rapport entre le courant de réduction enregistré par le biocapteur pour quelques injections de 10 μL 0,5 mM H₂O₂ et un flux continu de même nature. Pour des caractéristiques du flux bien définies (la vitesse du flux, la longueur du circuit, les diamètres des tubes), nous avons trouvé un coefficient de dispersion de 1,8 ce qui montre la bonne hydrodynamique du système conçu.

Avec cette valeur, nous avons ajusté les paramètres électro-cinétiques obtenus pour le fonctionnement en flux du biocapteur: LOD 2,2 μM H₂O₂; LOM 7,5 μM H₂O₂; sensibilité 5 mA/M; domaine de linéarité: 7,5 ÷ 50 μM . La stabilité opérationnelle pour une courte durée (la répétabilité en flux) a été testée en réalisant 30 injections consécutives de 50 μM durant 1700 secondes. La déviation standard de la moyenne du courant de réduction de ces injections a été de 1,2 % ce qui montre l'excellente stabilité de ce biocapteur pour le fonctionnement en flux.

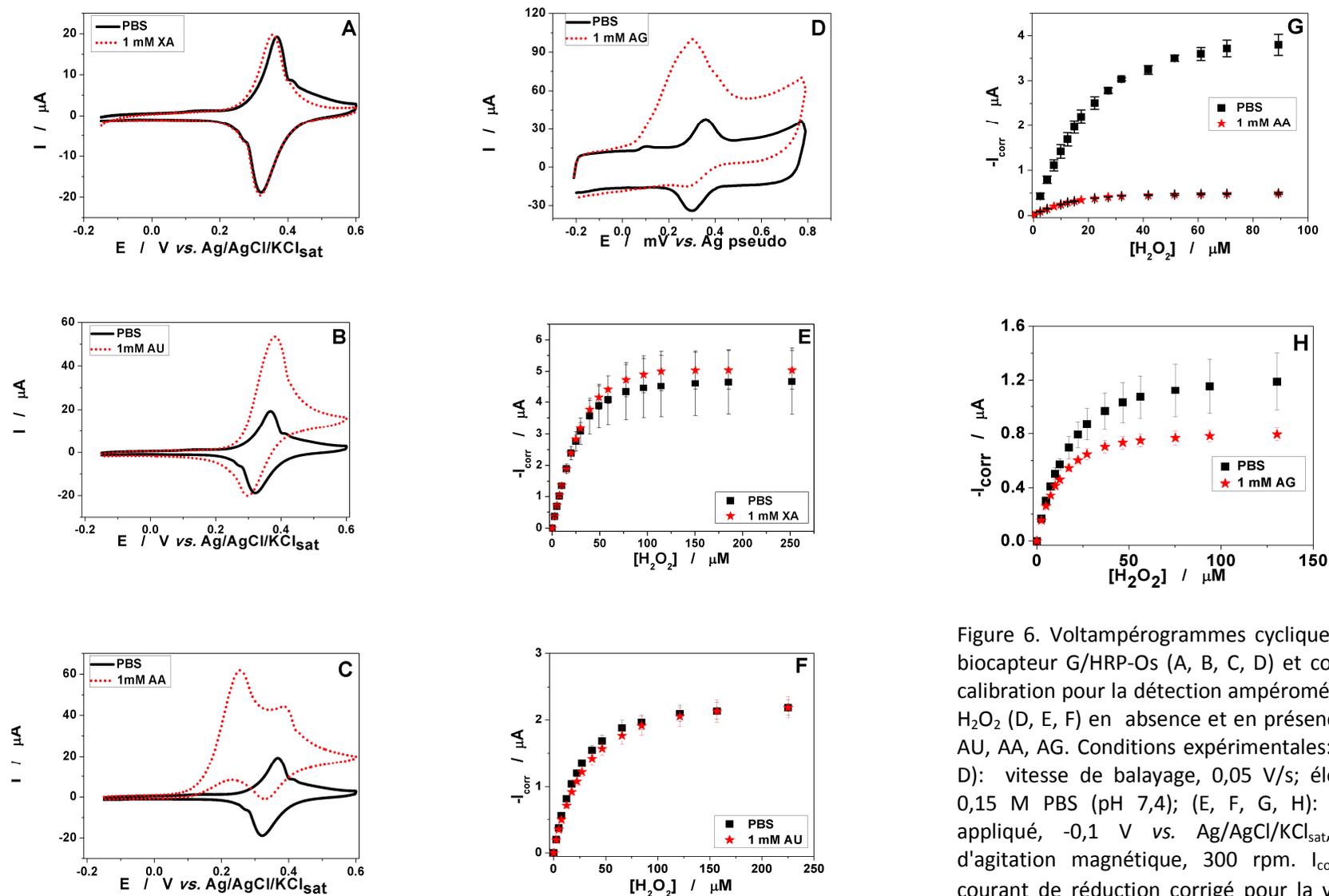


Figure 6. Voltampérommes cycliques avec le biocapteur G/HRP-Os (A, B, C, D) et courbes de calibration pour la détection ampérométrique de H_2O_2 (D, E, F) en absence et en présence de XA, AU, AA, AG. Conditions expérimentales: (A, B, C, D): vitesse de balayage, 0,05 V/s; électrolyte, 0,15 M PBS (pH 7,4); (E, F, G, H): potentiel appliqué, -0,1 V vs. $Ag/AgCl/KCl_{sat}$, vitesse d'agitation magnétique, 300 rpm. I_{corr} est le courant de réduction corrigé pour la valeur de courant de la ligne de base.

3.2.2 La détermination de la CAO avec le couplage bioréacteur-biocapteur

Le nouveau système bioanalytique pour la détermination de la CAO consiste dans le couplage entre le biocapteur G/HRP-Os et le bioréacteur NH₂-CPG à base de la XOD. Ceux-ci sont introduits dans le flux comme indiqué dans la figure 2.

L'optimisation de ce système concerne les paramètres opérationnels d'un système en flux (le volume d'injection, le débit du tampon), les paramètres fonctionnels du biocapteur G/HRP-Os (la stabilité) et les paramètres du bioréacteur (la concentration utilisée de XA et la quantité de la XOD immobilisée). Tous ces paramètres sont reliés: le débit du tampon contenant du XA influence le temps de la réaction enzymatique dans le bioréacteur et ainsi de la concentration de H₂O₂ produit. Celle-ci dépend aussi de la concentration utilisée de XA et doit rester dans le domaine linéaire de la réponse du biocapteur. Finalement, le débit établit le temps d'un essai et par conséquent, la vitesse d'analyse.

L'optimisation a été réalisée avec un plan expérimental factoriel dans lequel les deux variables indépendantes, la concentration de XA et le débit, sont juxtaposées dans le but d'étudier leurs effets propres et interactifs sur le courant de réduction. Pour chaque variable, nous avons utilisé 5 niveaux de variation et pour chaque niveau d'une variable nous avons associé tous les niveaux de l'autre variable, ce qui a impliqué la réalisation de 5² mesures expérimentales. Les résultats sont présentés sous la forme d'un graph 3D (figure 7) d'où on observe que:

- La réponse du biocapteur varie linéairement avec la concentration de XA, pour toutes les valeurs du débit;
- L'augmentation du débit implique la diminution de la réponse, pour toutes les valeurs de concentration de XA;

Ainsi, nous avons choisi la plus petite concentration de XA (0,5 mM) qui donne une réponse du biocapteur assez élevée et un débit de 1,5 mL/min qui assure un temps de contact assez important pour conserver l'efficacité du bioréacteur. Dans ces conditions, le temps nécessaire pour un seul essai a été de 60 secondes ce qui entraîne une vitesse d'analyse assez élevée (20 échantillons en triplicata par heure). Dans ces conditions, la stabilité opérationnelle du système en flux a été évaluée par 50 injections successives et, en plus de la stabilité du signal de base, une très faible déviation standard (0,96 %) de la moyenne du courant de réduction a été obtenu. La stabilité sur long terme (stockage du bioréacteur à 4°C pour 14 jours) a montré une diminution de 35 % dans l'activité enzymatique de la XOD.

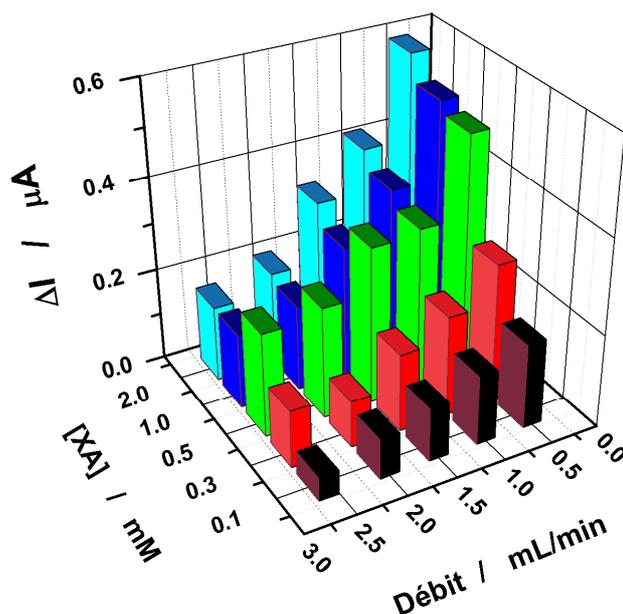


Figure 7. L'influence de la concentration de XA et du débit sur la détection ampérométrique de H₂O₂ avec le biocapteur G/HRP-Os. Conditions expérimentales: électrolyte, 0,15 M PBS (pH 7,4); potentiel appliqué, -0,1 V vs. Ag pseudo électrode (DROPSSENS-110); volume injecté, 10 μL.

3.2.2.1 Le mode "stationnaire"

Le couplage bioréacteur - biocapteur a été utilisé dans le mode "stationnaire" pour l'évaluation de la CAO de l'acide ascorbique, ce dernier étant considéré comme un antioxydant de référence. Ainsi, la réponse du biocapteur a été enregistrée pour une gamme de concentrations de AA injectée dans un flux continu de XA. La déviation standard pour 4 injections successives de la même concentration de AA ne dépasse pas 3,2 %.

Afin de calculer la CAO, une courbe de calibration a été tracée avec le courant de pic relatif $\Delta I_{p,AA}/I_{XA}$ ($\Delta I_{p,AA}$ est le courant de pic et I_{XA} est courant de la ligne de base dans le flux de XA). La concentration d'AA responsable pour une diminution de 50 % du courant de la ligne de base est notée IC_{50} . La valeur trouvée (188,6 μM) est significativement plus élevée que celle rapportée avec un autre système en flux (2 μM). Cette différence est justifiée par le temps du contact dans le bioréacteur qui est plus court dans notre système. Cependant, cette façon d'exprimer la CAO en termes de la valeur de IC_{50} implique le traçage d'une courbe de calibration ce qui nécessite un temps de mesure relativement long (1 heure). Pour le réduire, nous avons proposé l'utilisation du couplage en mode "transitoire".

3.2.2.2 Le mode "transitoire"

Le mode "transitoire" consiste dans l'injection d'un mélange de XA et d'AOX dans un flux de tampon. On a appelé ce mode "transitoire" par analogie au mode "stationnaire", les deux termes visant la composition du flux, constant en XA pour le mode "stationnaire" et fluctuant en XA pour le mode "transitoire". La nouvelle façon d'exprimer la CAO est donc basée sur la diminution relative de courant de pic en présence d'AOX par rapport au courant de pic en absence d'antioxydant (équation 1).

Equation 1: L'évaluation de la CAO dans le mode "transitoire".

$$CAO (\%) = \frac{I_{p,XA} - I_{p,XA+AOX}}{I_{p,XA}} \times 100$$

où: $I_{p,XA}$: courant de réduction de pic pour une solution de XA et

$I_{p,XA+AOX}$: courant de réduction de pic pour une solution de XA+AOX

Dans cette manière, la CAO de l'AA est de 45 %. En remplaçant la solution de XA avec une solution de H₂O₂ qui donne la même réponse du biocapteur dans les mêmes conditions d'utilisation du couplage, une CAO de 28 % pour l'AA a été trouvée. Ce résultat justifie le choix de construire le système en flux avec une ligne unique, en faisant ainsi passer l'AOX par le réacteur et augmenter sa possibilité de réagir avec les radicaux SO.

Le couplage en mode "transitoire" avec la nouvelle équation pour estimer la CAO a été utilisé pour une série des boissons commerciales afin de les caractériser du point de vue de leurs CAO. Les réponses obtenues aux injections contenant que la XA et ceux contenant la XA et les échantillons réels ont été caractérisés par une bonne déviation standard (4 %) (figure 8). Les échantillons ont été choisis car ils contiennent de l'AA comme un constituant naturel des jus où comme un additif alimentaire des thés. Malheureusement, la quantité exacte d'AA n'a pas été spécifiée par le vendeur et ensuite une relation linéaire avec la CAO mesurée n'a pas pu être établie. Toutefois, le jus à base d'orange et de mandarine, des fruits connus pour leurs contenus élevés en acide ascorbique, a montré la CAO la plus élevée de la série. De plus, le thé numéro 1 a été choisi pour la mise en évidence par le vendeur de sa capacité antioxydante élevée et, en effet, il a été le deuxième dans notre hiérarchie.

Le coefficient de corrélation entre la CAO obtenue avec notre système et avec la méthode du radical DPPH a été de 0,238 pour 8 échantillons. Cette faible corrélation est expliquée par la différence de réactivité entre les deux radicaux impliqués: le DPPH et le SO. Le premier est un radical organique stable et le mécanisme de sa réaction avec les AOX est basé sur un transfert d'électrons [20] tandis que

le deuxième est un radical plus réactif et son mécanisme de réaction avec les AOX est basé sur un transfert mixte d'électrons et d'hydrogène [21]. Cette différence de réactivité a été mise en évidence aussi par le temps de fin de réaction, 1 h pour le DPPH et 8 secondes pour le SO. La même faible corrélation a été trouvée entre la méthode du radical DPPH et un autre système en flux pour lequel la réaction entre les AOX et le H₂O₂ a été suivie par des mesures de bioluminescence.

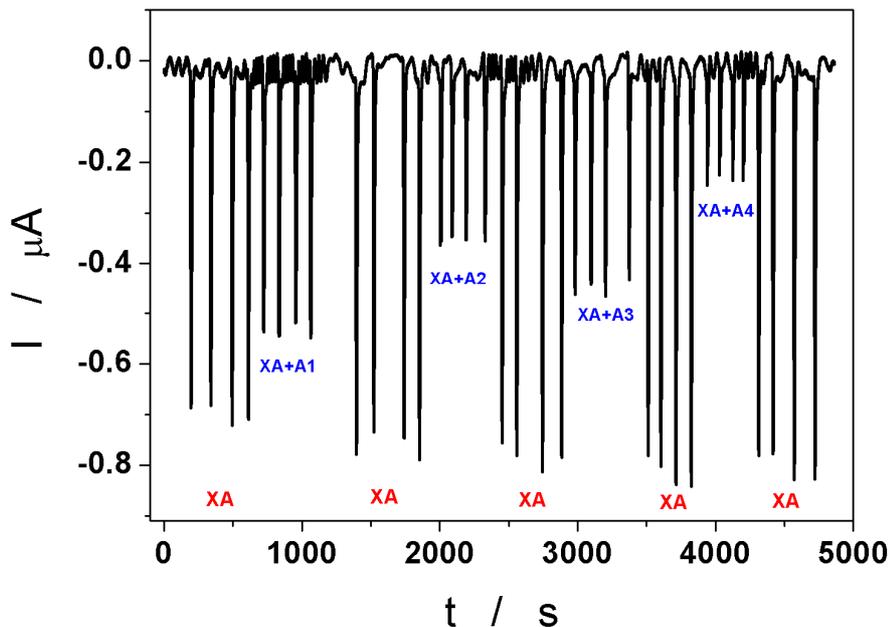


Figure 8. La détermination de la CAO pour différents échantillons réels dans le mode transitoire. Conditions expérimentales: électrolyte, 0,15 M PBS (pH 7,4); potentiel appliqué, -0,1 V vs. Ag pseudo électrode (DROPSSENS-110); volume injecté, 10 μ L; débit, 1,5 mL/min; solution injectée 0,5 mM XA ou 0,5 mM XA contenant les échantillons réels (A1 = jus de pêche et biscuits, A2 = jus d' orange, A3 = jus de citron jaune et citron vert, A4 = jus de citron jaune).

Afin de mieux caractériser notre système, une autre série d'échantillons plus variés a été testée. La série comporte des échantillons de vins et de jus avec un contenu réduit en AA (vins rouges et blancs, jus de pomme, jus de raisin) et des échantillons avec un contenu élevé en AA (jus d'orange et une solution standard de AA à 20 mg/100 mL). Le coefficient de corrélation entre la CAO obtenue avec notre système et la méthode du Folin-Ciocalteu a été de 0,972 pour les 6 échantillons. Cela montre que, à part l'AA, d'autres constituant de ces échantillons (les polyphénols), sont responsable des valeurs de la CAO obtenues et que les deux méthodes utilisées prennent en considération cette contribution.

4 Conclusions

Dans cette première partie, la mise au point d'un nouveau système en flux pour l'évaluation de la capacité antioxydante est décrite. Le système est constitué par le couplage d'un bioréacteur à base de la XOD, responsable pour la production des espèces réactives d'oxygène (H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$), avec un biocapteur à base de la HRP électrique pour la détection de H_2O_2 .

Les avantages amenés par ce système, par comparaison à d'autres systèmes [15, 17] pour l'évaluation de la CAO sont les suivants:

- i. L'injection de l'antioxydant, mélangé avec une solution de XA, dans le bioréacteur, facilite un contact plus intime entre celui-ci et les espèces réactives d'oxygène. Sachant que la réaction de dismutation de SO est très rapide, ce mode de travail augmente la probabilité de réaction entre l'AOX et ce radical.
- ii. Une seule mesure avec le biocapteur G/HRP-Os exprime la capacité antioxydante vers le SO et aussi vers le H_2O_2 .
- iii. La sélectivité des deux réactions enzymatiques (l'oxydation de XA et la réduction de H_2O_2) assure l'absence d'interférences.

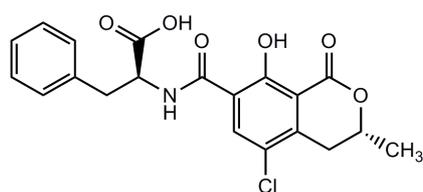
Finalement, les paramètres bioelectroanalytiques ainsi que la simplicité et la vitesse d'analyse du système ont permis son utilisation pour l'évaluation de la CAO des échantillons réels des vins, des jus et des thés, avec une bonne corrélation avec la méthode de Folin-Ciocalteu.

***Partie 2. Systèmes
bioanalytiques pour la détection
de l'ochratoxine A dans les
denrées alimentaires***

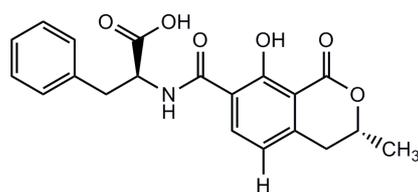
1 Etude bibliographique

1.1 Les moisissures toxiques et les denrées alimentaires contaminées

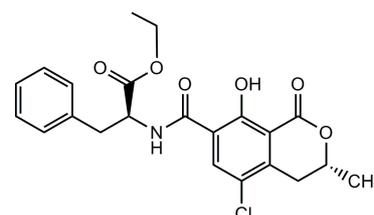
L'ochratoxine A (OTA) est décrite pour la première fois en 1965 par van der Merwe comme métabolite d' *Aspergillus ochraceus* Wilhi [22]. Retrouvé à la surface de plusieurs légumes en Afrique du Sud, l'OTA est la N-[5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1oxo-1H-2-benzopyran-7-yl]carbonyl]-L-phénylalanine. Différents dérivés ont été identifiés, notamment les ochratoxines B et C qui sont respectivement l'analogue déchloré et l'ester éthylique de l'OTA. En 1969, l'OTA est identifiée comme contaminant du maïs aux Etats-Unis, produite par *Penicillium viridicatum* wrestling. Depuis, l'OTA a été retrouvée dans l'ensemble du monde: dans les régions avec climat froid et tempéré, elle est produite par *P. verrucosum* et par *A. carbonarius* et les régions chaudes et tropicales par *A. ochraceus*. *P. verrucosum* est spécifiquement associé aux céréales stockées, *A. ochraceus* est le champignon le plus commun dans le café vert, les épices, les graines de cacao, le soja, les cacahuètes, le riz et le maïs et *A. carbonarius* est susceptible entre autre de contaminer le raisin et ensuite le vin.



Ochratoxine A



Ochratoxine B



Ochratoxine C

Bien que les infections fongiques puissent avoir lieu avant et après la récolte, la synthèse de l'OTA se produit surtout lors du stockage. Le mécanisme de la biosynthèse de l'OTA par les différentes moisissures n'est pas élucidé et l'organisation des gènes codant pour cette mycotoxine est inconnue. La formation d'OTA dépend du pouvoir toxigène de la souche mais aussi des pratiques utilisées lors de la production technologique des denrées alimentaires. Par exemple, les solutions pour éviter la présence de l'OTA dans les céréales passent par le contrôle du niveau d'humidité lors du remplissage du silo et au cours du stockage, sachant que la croissance de *P. verrucosum* est favorisée par une activité hydrique supérieure à 0.8 (A_w). Dans les vignes, seules les lésions faites aux fruits par les machines ou les insectes sont la cause de contamination et de développement ultérieur des souches d'*Aspergillus* qui ne sont pas pathogènes pour la vigne.

1.2 La toxicologie de l'OTA

Après son absorption, réalisée au niveau de l'estomac et l'intestin grêle, favorisée par ses propriétés acides, l'OTA forme une liaison de forte affinité aux protéines plasmatiques ce qui contribue à sa longue rétention dans l'organisme (le temps de demi-vie chez les hommes est de 840 heures dans le cas d'une ingestion orale). En ce qui concerne la biotransformation de l'OTA, elle est hydrolysée en OT α et au niveau hépatique, en deux formes isomères 4R et 4S-hydroxy-ochratoxine A et en 10-hydroxyochratoxine A, des métabolites avec une toxicité réduite. Chez les animaux, la toxicologie générale implique la génotoxicité, la tératogénicité et le pouvoir cancérigène tandis que la toxicologie d'organes vise la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et l'immunotoxicité. Chez l'homme, une corrélation positive entre l'exposition à l'OTA et la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) a été trouvée en 1987 dans les pays de l'Europe de l'Est (Roumanie, Bulgarie). L'OTA a été classifiée comme agent potentiellement cancérigène (groupe 2B) par le Centre International de Recherche sur le Cancer.

1.3 Les règlements et les méthodes de référence pour la détection de l'OTA

Les méthodes analytiques pour le dosage quantitatif de l'OTA suivent les même étapes que celles pour la quantification des mycotoxines: l'échantillonnage, l'extraction, la purification, la séparation et la détection.

1.3.1 L'extraction et la purification

L'extraction est réalisée à partir d'un mélange de solvants aqueux et organiques dont la composition dépend fortement du type de l'échantillon. Par exemple, pour le dosage de l'OTA dans le vin, une méthode ancienne (1990) de "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC) propose l'utilisation du chloroforme. Mais, pour des raisons de protection de l'environnement, les solvants chlorés sont progressivement remplacés. La nouvelle norme du Comité européen de normalisation du 2009 (CEN EN 14133:2009), basée sur la méthode AOAC N° 2001.01 "Determination of ochratoxin A in wine by IAC clean-up and LC", prévoit la dilution de l'échantillon de vin avec un volume égal d'une solution contenant 5 % NaHCO₃ et 1 % PEG (polyéthylène glycol) à pH 8.5. Au pH acide du vin, l'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu dans l'eau. Cela justifie l'utilisation d'un pH alcalin auquel l'OTA devient soluble dans une solution aqueuse de carbonate monosodique. L'utilisation du PEG est essentielle pour améliorer le taux de récupération et pour réduire l'effet de la matrice dans l'étape de séparation et de détection. Ces paramètres ont été optimisés par Visconti et al. [23] et validés par une étude inter-laboratoires publié dans le "Journal of AOAC international" [24].

L'état de l'art dans la purification d'échantillons est représenté par les colonnes d'immunoaffinité. Celles-ci utilisent les anticorps de l'OTA afin de réaliser une purification très spécifique. Après l'étape d'extraction, les échantillons de vin et de bière peuvent être appliqués directement sur la colonne, tandis que pour les échantillons plus complexes comme le café, une colonne de silice greffé par des différents groupements (aminés [25], phényle) doit être prévu en amont pour éliminer la caféine. La capacité d'adsorption de la silice modifiée est justifiée par le moindre caractère anionique des groupements NH_2 augmenté par le caractère ionique de la solution de carbonate monosodique. Les taux de récupération de l'OTA dans les colonnes d'extraction sur phase solide varient en fonction de la concentration de l'OTA avec laquelle l'échantillon a été dopé, mais aussi en fonction de la fonctionnalisation de la phase solide et des solvants utilisés pour le décrochage.

Pour la purification des échantillons de vin, Rusanova et al. [26] ont utilisé des colonnes de silice modifiée avec l'aminopropyle (Si-NH_2) ou avec le triméthyl aminopropyle (SAX) qui ont permis d'obtenir des échantillons presque incolores mais pour lesquels le taux de récupération de l'OTA n'a pas été mesuré. Les deux pKa de l'OTA, correspondant aux groupements carboxyle et hydroxyle, sont 4,4 et 7,1, ce qui fait qu'au pH de la solution d'extraction (pH 8 après avoir mélangé avec le vin), la toxine est négativement chargée. A ce pH, la phase solide est positivement chargée et les interactions électrostatiques sont responsables pour l'accrochage de l'OTA sur le support. Mais en même temps, les interactions électrostatiques sont aussi responsables pour l'accrochage des composés colorés de la matrice.

1.3.2 Séparation et détection

La chromatographie sur couche mince a été la première technique analytique proposée pour la détection de l'OTA en 1975. La séparation est réalisée en phase normale sur une phase stationnaire de type silice et avec la phase mobile composée des solvants organiques chlorés et du méthanol. Sous irradiation UV, l'OTA est bleu-verte et devient violette par traitement avec une solution alcaline. Un résultat positif implique la réextraction, ensuite la conversion dans son dérivé d'ester méthylique par traitement avec $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ou $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$ et finalement, la détection par la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (HPLC-FD). Ce procédé a été la méthode officielle pour la détection de l'OTA dans le maïs [27].

La HPLC-FD est la technique la plus souvent utilisée pour la détection de l'OTA car la toxine présente une fluorescence naturelle. La phase stationnaire est de type C_{18} et la phase mobile est un mélange d'acetonitrile ou de méthanol avec de l'acide acétique ou de l'acide phosphorique. Cette

acidification est nécessaire pour éviter toute traînée de pic et une rétention aspécifique, car OTA est un acide faible. Les limites de détection atteintes sont assez basses pour le dépistage de l'OTA dans l'orge, le blé et le seigle (10 µg/kg). Des études inter-laboratoires ont validé cette technique pour la détection de l'OTA dans le vin, car les valeurs pour les taux de récupération ont été retrouvées entre 93 et 84 % pour des valeurs d'enrichissement comprises entre 0,2 et 3 ng/mL [28].

La chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse avec une interface électrospray (LC-ESI-MS/MS) a démontré son efficacité vis-à-vis de l'HPLC-FD pour la détection de l'OTA. L'utilisation des standards internes avec une structure moléculaire identique, marqués au ^2H ou ^{13}C a contribué à l'amélioration des performances quantitatives. Les principaux avantages de cette technique sont la simplification de la préparation, l'automatisation de la mesure et du traitement du signal et le haut débit d'analyse.

1.4 Les immunoessais pour le dépistage de l'OTA

Les immunoessais sont des techniques biochimiques qui utilisent l'interaction entre l'anticorps (Ac) et l'antigène (AG) qui a stimulé sa production. Etant donné cette interaction spécifique, les immunoessais sont censés être sensibles et capables de dépister l'antigène ou l'anticorps dans une matrice complexe. L'étape d'extraction et de purification des échantillons devrait alors devenir plus simple, voir même éliminée. Cela signifie une forte réduction du temps total d'analyse. Un minimum de prétraitement des échantillons est tout de même nécessaire lorsqu'il s'agit d'une méthode colorimétrique de détection.

Les immunocapteurs sont un cas particulier des immunoessais car la biomolécule (l'anticorps ou bien l'antigène) est immobilisée à la surface d'une électrode. Pour le dépistage de l'OTA, plusieurs formats d'immunoessais et d'immunocapteurs ont été développés mais ceux-ci restent encadrés dans les formats généraux des ces techniques.

Les immunoessais compétitifs directs impliquent la compétition entre l'antigène et l'antigène marqué avec une enzyme ajouté à l'échantillon, pour les sites de l'anticorps immobilisé. Ce type d'essai est connu sur le nom d'ELISA direct (venant de l'anglais "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"). Le signal analytique est obtenu à l'aide de l'enzyme et il est proportionnel à la concentration de l'antigène. Dans le cas de l'OTA, l'antigène marqué utilisé couramment est le conjugué OTA-HRP, dont la synthèse a été rapportée publiée par Radoi et al. [29]. Cette technique a été utilisée pour la détection de l'OTA dans des échantillons de vins et les résultats ont été validés par l'HPLC-FD. Le conjugué OTA-alkaline phosphatase (ALP) a été utilisé aussi dans un test ELISA direct et transféré sur des électrodes

sérigraphiées afin d'obtenir des immunocapteurs [30]. Un cas particulier du test ELISA direct est celui publié par Rusanova et al. [26] où la compétition est réalisée en deux étapes: les anticorps immobilisés sont incubés avec l'échantillon contenant de l'OTA, lavés et incubés ensuite avec l'OTA-HRP (figure 9).

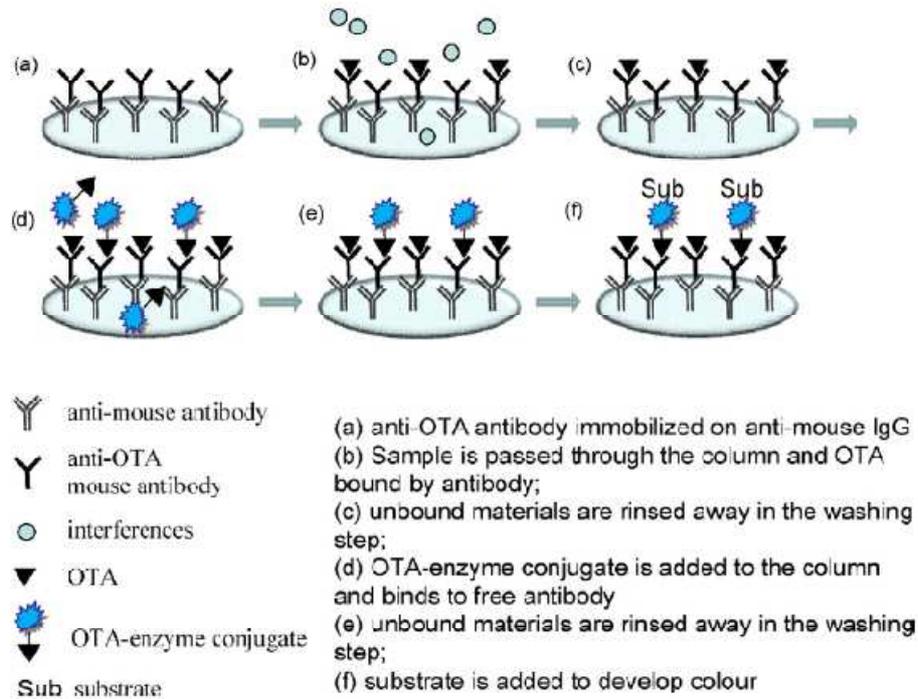


Figure 9. Test ELISA direct avec la réaction de compétition réalisée en deux étapes [26].

Les immunoessais compétitifs indirects (ou ELISA indirect) impliquent la compétition entre un antigène conjugué avec une protéine immobilisée sur un support, l'antigène et l'anticorps libres dans la solution d'étude. Des conjugués de l'OTA avec l'albumine de sérum (BSA) ou avec biotine ont été immobilisés par adsorption ou par liaison d'affinité sur un support non-modifié et respectivement modifié à l'avidine [31, 32]. Le signal analytique est obtenu à travers l'anticorps modifié au préalable avec une enzyme ou un composant fluorescent. Pour les anticorps de l'OTA, une telle modification n'a pas été encore publiée à notre connaissance. Par contre, l'utilisation des deuxièmes anticorps anti-IgG marqués à la HRP ou ALP est l'approche utilisée pour la détection de l'OTA sur un format d'ELISA et sur des immunocapteurs [31].

Les conjugués de l'OTA avec différentes protéines ne sont pas disponibles, sauf dans les kits ELISA commerciaux. Ils doivent être synthétisés lors d'un nouveau travail expérimental. Cela implique l'exposition des chercheurs aux dangers potentiels causés par la toxicité de cette molécule. Un possible

substituant de ces conjugués est un antigène peptidique qui mime l'épitope de l'OTA et qui est obtenu par exposition à un phage [33].

2 But du travail

Afin de détecter l'Ochratoxin A, notre approche se base sur l'utilisation de l'Ochratoxin B (OTB), l'analogue moins toxique de l'OTA, produit par les mêmes souches dans un rapport 1:5 [34]. La toxicité réduite de l'OTB est justifiée par l'absence de l'atome de chlore dans sa structure [35]. Dans la structure de l'OTA, l'atome de chlore contribue à la stabilisation du radical phénolique, produit dans les réactions de bioactivation de la toxine, et à l'augmentation de la capacité de chélation des ions ferriques (Fe^{3+}). Le radical phénolique peut réagir avec la glutathion (GSH) en formant le radical superoxyde. Le complexe OTA- Fe^{3+} peut servir comme substrat pour le système cytochrome P450 - NADH avec la formation du OTA- Fe^{2+} qui ensuite produit le radical hydroxyle ($HO\bullet$). Les ROS ainsi générées sont responsables de la peroxydation lipidique et de la détérioration de l'ADN ce qui justifie, en partie, la toxicité de l'OTA. Les ROS ainsi générées sont responsables de la peroxydation lipidique et de la détérioration de l'ADN ce qui justifie, en partie, la toxicité de l'OTA [35].

Pour introduire l'OTB dans un immunoessai, nous avons choisi le format de déplacement qui n'a pas été publié pour la détection de l'OTA. Ce format prend en considération la réaction croisée de l'anticorps vers un antigène avec une structure similaire à l'antigène du départ. Pour différencier entre les deux antigènes, celui qui représente la molécule cible est l'antigène pour lequel l'anticorps présente une forte affinité (AG) et celui responsable de la réactivité croisée est nommé l'antigène avec l'affinité réduite (AG*). Ce type de technique implique en plus des réactions d'association entre l'antigène et l'anticorps rencontrés dans les immunoessais compétitifs directs et indirects, des réactions de dissociation du même complexe et de réassociation de l'anticorps dans un autre complexe. Cette approche a été tentée sans succès par Prieto-Simon et al. [31] car l'antigène OTA-BSA, supposé avoir une affinité réduite, a montré une plus forte affinité vers l'anticorps que l'antigène cible, l'OTA.

Pour la mise au point de cet essai, nous avons choisi d'immobiliser l'OTB sur des billes en verre avec la dimension des pores contrôlée (CPG), on obtenant ainsi un matériel bio-sensible. Les paragraphes suivants montrent l'optimisation de cette technique et les possibilités d'utilisation de ce matériel bio-sensible pour la détection l'OTA dans des échantillons des vins.

3 Résultats originaux

3.1 Partie expérimentale

3.1.1 Matériels et méthodes

Les mesures spectrophotométriques ont été menées à la température ambiante avec un lecteur de microplaque multiscan Ex, Thermo Life Sciences, France. Les mesures électrochimiques ont été menées à température ambiante avec un potentiostat PalmSens (Hollande) contrôlé par le logiciel PalmSens Lite V 1.6.1.0. Pour les mesures d'analyse par injection en flux continu, une cellule électrochimique de type "wall-jet" (DRP-FLWCL, DROPSENS) adaptée aux électrodes sérigraphiées (DROPSENS DRP-110, Spain; l'électrode de travail et la contre-électrode en graphite et l'électrode de référence en Ag, considérée comme une pseudo-référence) a été utilisée. Le flux est assuré par une pompe péristaltique prévue avec une vanne d'injection à 6 canaux.

Pour les mesures d'HPLC-FD, un détecteur de fluorescence LaChrom, Hitachi L-2485 (VWR, France) a été utilisé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont 330 et 460 nm respectivement. Le flux à 1 mL/min est assuré par une pompe LaChrom, Hitachi, L-7110 (Merck, Germany). La séparation est réalisée dans une colonne à phase inverse remplie avec C₁₈ (Kinetex, 2,6 µm, 100 Å, 100 x 4,6 mm, Phenomenex, USA). La phase mobile est un mélange acétonitrile : eau : acide acétique (51:47:2 v/v/v) et le volume d'injection est de 20 µL.

3.1.2 Le développement du matériel bio-sensible à base de l'ochratoxine B

3.1.2.1 La modification des billes en verre avec la dimension des pores contrôlée (CPG)

L'introduction des groupements aminés (NH₂) à la surface des billes en verre avec la dimension des pores contrôlée (CPG) a été réalisée d'après le protocole présenté dans la première partie de cette thèse, paragraphe 3.1.1.3. Le test Kaiser a été utilisé pour mesurer le taux de couvrement de CPG avec les groupes NH₂. Ce test est basé sur la formation d'un complexe bleu entre la ninhydrine et les groupes NH₂ avec un pic d'absorbance vers 570 nm. Une courbe de calibration a été tracée avec des solutions d'APTES (3-aminopropyle triéthoxysilane) aux concentrations connues, mélangées avec le même volume (150 µL) des solutions du kit (ninhydrine, cyanure de potassium, phénol) (figure 10). Pour le CPG modifié, un taux de couvrement en NH₂ de 0,66 mmol/g a été obtenu. Cette valeur est dans la gamme des valeurs publiées pour ce type de modification (0,3 ÷ 2 mmol/g) [36].

3.1.2.2 L'immobilisation de l'OTB sur CPG

Les billes de CPG-NH₂ (200 mg) ont été introduites dans une fiole en verre et 400 µL d'une solution contenant 80 mM EDC et 100 mM NHS dans le tampon phosphate de potassium (KPB, 10 mM, pH 7,4) et 400 µL d'une solution 35,2 µM d'OTB ont été ajoutés. Après 30 minutes de réaction à la température ambiante, sous agitation magnétique de 150 rpm, la solution surnageante a été prélevée après centrifugation à 6000 rpm pendant 30 secondes. Ce protocole a été utilisé pour la séparation des billes des solutions pendant toutes les étapes du développement du matériel bio-sensible. Les billes ainsi modifiées (OTB-CPG) ont été lavées 1 fois avec du tampon 0,05 % Tween 20 - KPB et 2 fois avec du tampon KPB.

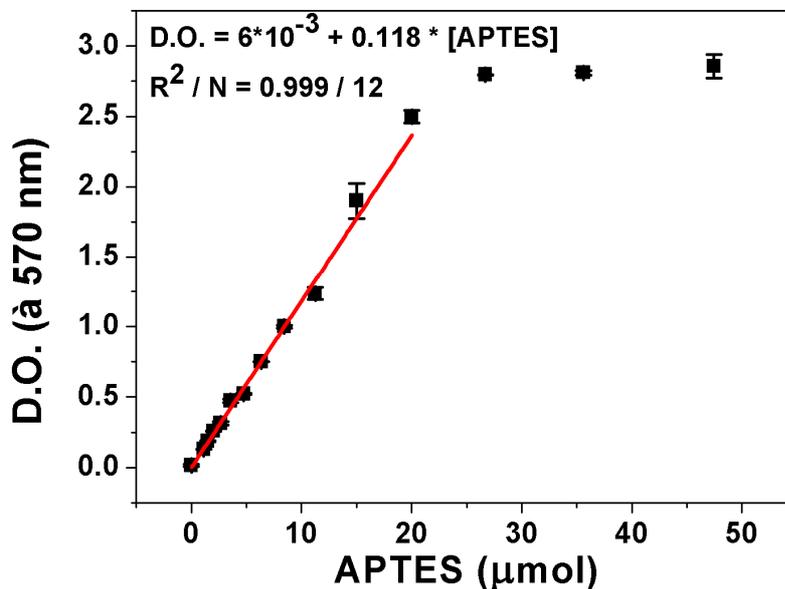


Figure 10. La courbe de calibration pour les solutions standards d'APTES. L'apparition de la couleur est obtenue avec le test Kaiser.

3.1.2.3 L'accrochage de l'anticorps et son marquage avec le deuxième anticorps

Pour éviter une adsorption aspécifique, les billes OTB-CPG ont été trempées dans une solution de caséine grade Hammerstein (0,5 % en KPB, nommé ensuite tampon de blocage) pendant 30 minutes. Ensuite, l'anticorps anti-OTA est ajouté à cette solution à une concentration finale de 10 µg/mL et la réaction se poursuit 30 minutes à température ambiante, sous agitation magnétique à 150 rpm. Après séparation et lavage, le marquage de l'anticorps accroché est réalisé avec une solution d'anticorps anti-IgG marqué avec l'enzyme HRP (dilution finale 1/50000 dans le tampon de blocage) pendant 30 minutes.

à température ambiante, sous une agitation magnétique de 150 rpm. Les billes sont séparées et lavées et le matériel bio-sensible est ainsi obtenu (figure 11).

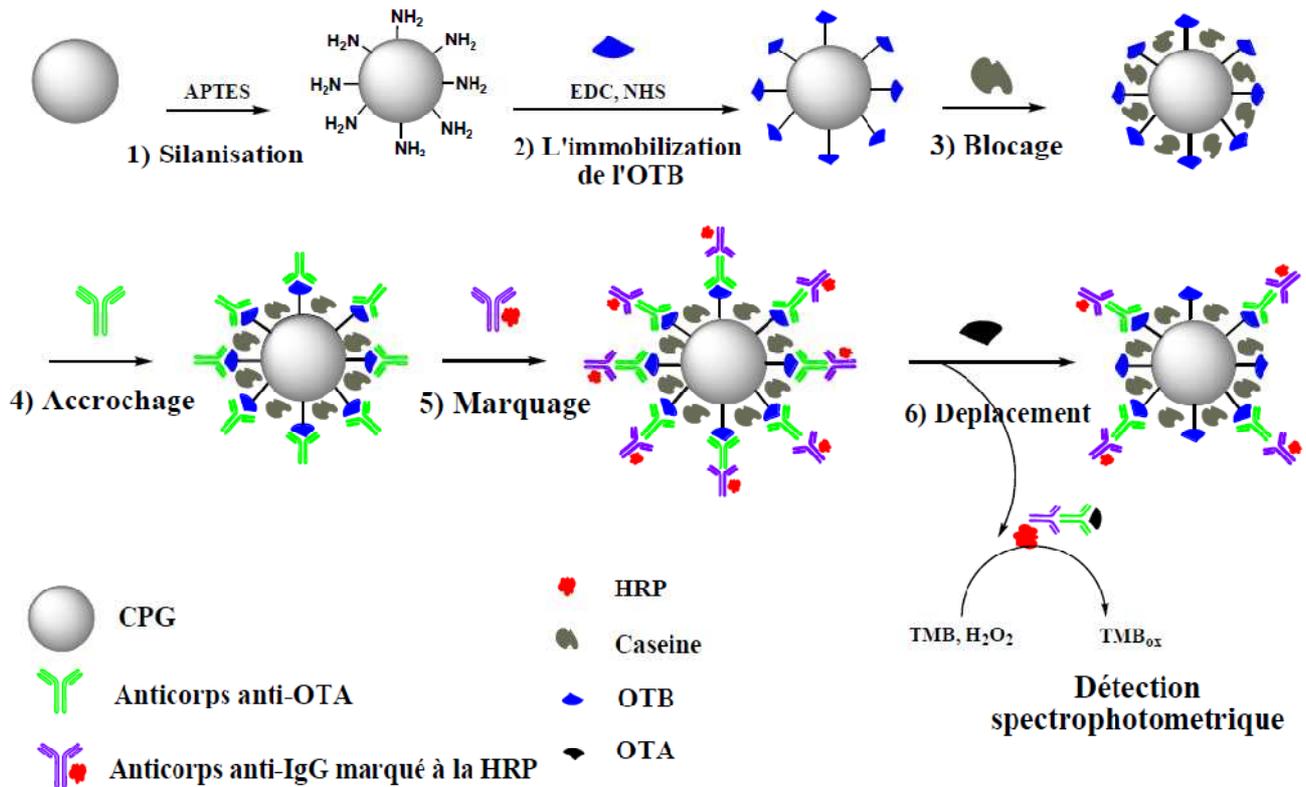


Figure 11. Les étapes de l'élaboration du matériel bio-sensible à base de l'OTB (1 - 5) et la réaction de déplacement à l'addition de l'OTA.

3.1.3 Détection de l'OTA avec l'essai de déplacement sur le matériel bio-sensible

Le matériel bio-sensible est dispersé dans une solution de KPB (1:8 m/v) et, sous une agitation constante, 5, 25 et 50 µL de cette solution sont prélevés et incubés avec 150 µL des solutions d'OTA (entre 0,4 et 100 ng/mL) pour 10 minutes à température ambiante sous une agitation orbitale à 300 rpm. Les solutions sont récupérées à l'aide du protocole de séparation et l'activité enzymatique de la HRP est mesurée.

3.1.3.1 Détection spectrophotométrique

100 µL de chaque solution récupérée sont mélangés avec 50 µL de substrat colorimétrique (TMB et H₂O₂) et la variation de l'absorbance est enregistrée à 620 nm pendant 20 minutes avec le lecteur de plaque ELISA. La réaction est arrêtée avec 50 µL 0,5 M H₂SO₄ et l'absorbance est lue à 450 nm.

3.1.3.2 Détection ampérométrique avec l'analyse par injection en flux continu

Le produit de la réaction enzymatique est dilué 1:4 v/v avec 0,5 M H₂SO₄ et 50 µL sont injectés (en utilisant une vanne d'injection) dans flux de 0,5 M H₂SO₄ (1 mL/min) assuré par une pompe péristaltique. Le flux est connecté à une cellule électrochimique de type "wall-jet" (DRP-FLWCL, DROPSENS) adaptée aux électrodes sérigraphiées (DROPSENS DRP-110, Spain; l'électrode de travail et la contre-électrode en graphite et l'électrode de référence en Ag, considérée comme une pseudo-référence). Le courant de réduction du TMB_{ox} est enregistré à 0,1 V vs. Ag pseudo.

3.1.4 Procédés de prétraitement des vins et leurs validation par HPLC-FD

3.1.4.1 La méthode standard pour l'extraction de l'OTA des échantillons de vins

L'extraction de l'OTA des échantillons de vins a été réalisée d'après la norme du Comité européen de normalisation du 2009 (CEN EN 14133:2009). Ainsi, 10 mL de vin additionnés de 5 ng/mL d'OTA ont été mélangés avec 10 mL d'une solution de 5 % NaHCO₃ et 1 % PEG (8000) à pH 8,5. Cet échantillon a été filtré avec une membrane d'acétate de cellulose (diamètre des pores 0,2 µm) et 10 mL ont été filtrés sur une colonne Ochraprep®. La colonne est lavée avec 5 mL d'une solution contenant 2,5 % NaCl et 0,5 % NaHCO₃ et avec 5 mL de l'eau. L'OTA est éluée avec 2 mL de méthanol qui est ensuite éliminé par l'introduction de l'air dans la fiole jusqu'à l'évaporation complète. L'OTA est reconstituée dans le tampon KPB et la concentration est mesurée par injection dans l'HPLC-FD.

3.1.4.2 L'extraction sur phase solide pour la purification des échantillons de vins

Une colonne pour l'extraction sur phase solide des certains constituants colorés de vin a été développée par le remplissage d'une seringue en plastique (volume total 2,5 mL) avec 500 mg de silice fonctionnalisé avec le 3-aminopropyle. La colonne est conditionnée avec 2 mL de tampon KPB, sans permettre son séchage. Ensuite, 2 mL de vin sont filtrés et des fractions à 0,5 mL sont collectées. La présence de l'OTA dans ces fractions et le taux de récupération sont vérifiés par injection dans l'HPLC-FD.

3.2 Résultats et discussion

3.2.1 Caractérisation et optimisation du matériel bio-sensible

3.2.1.1 L'immobilisation de l'ochratoxine B

Le choix d'immobiliser l'OTB sur les billes en verre CPG est justifié par le rapport élevé entre la surface spécifique (17 m² / g) et le volume (3,2 cm³ / g) de ce matériel, ce qui permet de réduire les

volumes de travail. Ce support a été déjà utilisé pour le remplissage des canaux des micropuces [15, 37] ou des colonnes en Téflon [38] dans lesquels, étant donné la porosité élevée du matériel, les débits peuvent atteindre 2,5 mL/min. Ainsi, la vitesse d'analyse est fortement augmentée. Sur ce matériel, l'immobilisation des enzymes, des anticorps [39] et des bactéries [38] a été publiée. Cependant, il y a peu d'exemple sur l'utilisation de ce matériel pour des immunoessais de type déplacement.

Le succès de l'immobilisation de l'OTB sur les billes CPG a été évalué par des mesures de fluorescence pour la solution d'OTB utilisée avant et après le procédé d'immobilisation. Les valeurs de fluorescence sont corrélées à la concentration de l'OTB à travers une courbe de calibration (figure 12).

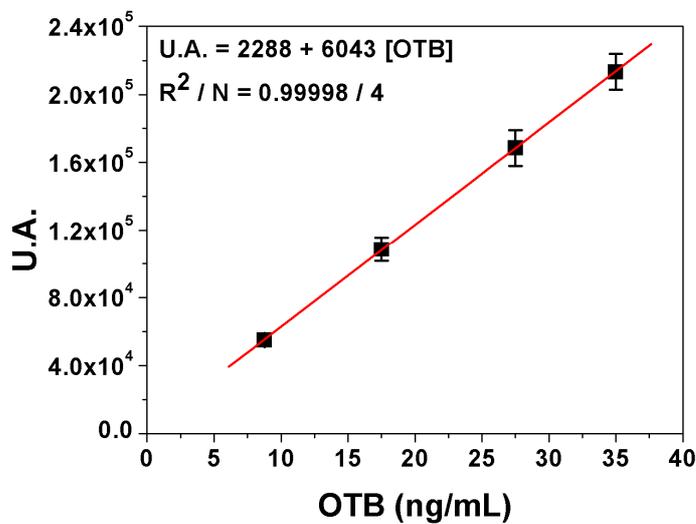


Figure 12. La courbe de calibration pour l'OTB avec des mesures de HPLC-FD. U.A. signifie des unités arbitraires de fluorescence.

Nous avons exprimé la quantité de l'OTB de la solution d'immobilisation par rapport à la quantité des billes utilisées ($\mu\text{mol/g}$). Nous avons observé que la quantité d'OTB immobilisée dépend de la quantité d'OTB de départ et que le rendement d'immobilisation varie entre 5 et 26 % (tableau 2). Etant donné que le taux de recouvrement des billes avec les groupements amines est de 0,66 mmol/g, nous avons estimé qu'au maximum 4 % de ces groupes sont utilisés dans la liaison covalente avec l'OTB. Ce rendement apparemment faible est un avantage pour la sensibilité de l'immunoessai car un fort recouvrement des billes en OTB impliquerait l'accrochage d'une grande quantité d'anticorps et ensuite une diminution de la sensibilité.

L'accrochage spécifique de l'anticorps anti-OTA sur les billes CPG-OTB est vérifié par des expériences de contrôle dans lesquelles une des étapes nécessaires dans l'élaboration du matériel bio-sensible est absente. De cette manière, pour les différents matériaux bio-sensibles obtenus, l'étape

finale d'addition de l'anticorps anti-IgG-HRP et du substrat colorimétrique est la même afin que la différence observée pour la densité optique (D.O.) soit comparable (tableau 3, colonne 8).

Tableau 2. La dépendance de l'OTB immobilisée de la quantité d'OTB en solution, calculée avec des mesures de fluorescence.

| | OTB ($\mu\text{mol/g}$) | | | |
|------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Avant l'immobilisation | 0.212 ± 0.008 | 0.733 ± 0.001 | 1.17 ± 0.02 | 6.22 ± 0.11 |
| Immobilisé | 0.055 ± 0.008 | 0.19 ± 0.02 | 0.22 ± 0.02 | 0.25 ± 0.02 |

Nous notons une faible adsorption de l'anti-IgG-HRP et de l'anti-OTA sur les billes CPG sans OTB, cela étant attribué aux propriétés de blocage de la caséine Hammerstein. Deux autres agents de blocage, lait entier en poudre et caséine, ont été testés mais ceux-ci ne se sont pas absorbés à la surface des billes. La valeur la plus élevée de la D.O. est obtenue pour le matériel bio-sensible complet, avec l'immobilisation de l'OTB, l'anticorps anti-OTA et l'anticorps anti-IgG-HRP. L'immobilisation de l'OTA a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de l'OTB et pour ce matériel bio-sensible et nous avons mesuré une D.O. plus importante que dans le cas du matériel à base d'OTB. Ce résultat est celui attendu car l'anticorps est spécifique pour l'OTA.

Tableau 3. Expériences de contrôle avec des mesures spectrophotométriques effectuées par l'addition du substrat colorimétrique sur plusieurs matériaux bio-sensibles, afin de montrer la liaison spécifique de l'anticorps anti-OTA avec l'OTB immobilisée.

| NH₂ ($\mu\text{mol/g}$) | OTB ($\mu\text{mol/g}$) | OTA ($\mu\text{mol/g}$) | EDC/NHS (mM/mM) | Blocage Casein H. (oui/non) | Anticorps anti-OTA ($\mu\text{g/mL}$) | anti-IgG- HRP (oui/non) | D. O. à 450 nm |
|--|---|---|----------------------------------|--|---|--|---------------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | non | 0 | non | 0.043 ± 0.005 |
| 660 | 0 | 0 | 40/50 | oui | 0 | oui | 0.059 ± 0.006 |
| | 0 | 0 | 40/50 | oui | 10 | oui | 0.068 ± 0.007 |
| | 0.18 | 0 | 40/50 | oui | 0 | oui | 0.069 ± 0.005 |
| | 0.18 | 0 | 40/50 | oui | 10 | oui | 0.093 ± 0.008 |
| | 0 | 0.18 | 40/50 | oui | 0 | oui | 0.065 ± 0.004 |
| | 0 | 0.18 | 40/50 | oui | 10 | oui | 0.128 ± 0.003 |

La courbe d'affinité de l'anticorps anti-OTA a été tracée pour une série de matériaux bio-sensibles modifiés avec différentes quantités de l'OTB. La courbe obtenue est celle attendue pour une

réaction d'immunoaffinité, caractérisée par un model de régression non-linéaire à quatre paramètres (équation 2).

Equation 2. Régression non-linéaire à 4 paramètres

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + y_{\min}$$

où: y_{\max} et y_{\min} correspondent à la partie supérieure et respectivement inférieure de la sigmoïde; p correspond à la pente de la courbe dans le point x_0 ; x_0 correspond au point d'inflexion de la sigmoïde.

La quantité d'anticorps augmente avec celle d'OTB immobilisée jusqu'à ce que un plateau de saturation soit obtenu, correspondant à un encombrement entre les anticorps déjà immobilisés (figure 13).

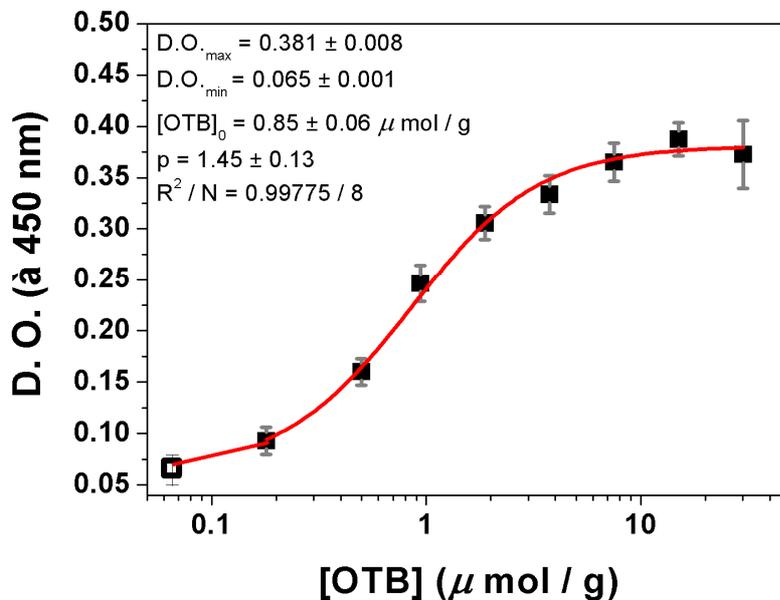


Figure 13. Courbe d'affinité de l'anticorps anti-OTA vers l'OTB immobilisé sur CPG. Le symbole du carré vide correspond à concentration zéro de l'OTB immobilisé.

3.2.1.2 L'optimisation de l'immunoessai de type déplacement

L'immunoessai de type déplacement (DIA) est basé sur la dissociation de la liaison entre l'anticorps et l'antigène avec affinité réduite (AG*) provoquée par la présence de l'antigène à haute affinité (AG) (réaction 1). L'anticorps ainsi devenu libre forme un nouveau complexe avec l'antigène à haute affinité. En même temps, la dissociation peut être aussi spontanée, car l'équilibre de l'association anticorps-AG* se déplace vers la droite en présence du tampon (réaction 2). Cette réaction pourrait être considérée comme parasite, mais c'est un phénomène qui ne peut pas être évité, car il est contrôlé par

un transfert de masse à base de diffusion. D'ailleurs, une telle dissociation spontanée peut être rencontrée aussi dans les immunoessais classiques de compétition dans lesquels la reproductibilité d'étapes de lavages au tampon est essentielle pour la reproductibilité de l'essai en lui-même [40].



Des modèles informatiques ont été développés afin d'étudier l'influence de la densité des anticorps immobilisés sur des supports (billes, tubes capillaires, membranes) ayant des surface réactives différentes par rapport à la sensibilité de DIA [41]. Comme dans cette étude, nous avons supposé qu'une grande surface réactive devrait augmenter la sensibilité car l'antigène AG (l'OTA) devrait avoir plus de chances de rencontrer le complexe Ac-AG* (Ac étant l'anticorps anti-OTA et AG* étant l'OTB). Pour le vérifier, nous avons contrôlé cette surface en utilisant différentes quantités de matériel bio-sensible prélevées et mises en contact au même volume d'OTA.

Le matériel bio-sensible étant dispersé dans une solution de tampon dans un rapport précis (1:8 m/v), trois volumes différents (5, 25 et 50 μ L) ont été incubés avec 150 μ L de l'OTA dans une gamme de concentration entre 0,4 et 100 ng/mL, pour 10 minutes avec une agitation orbitale de 500 rpm. Après la réaction immunologique, le surnageant est collecté, le substrat colorimétrique est ajouté et l'activité de la HRP* (la HRP liée à l'anticorps anti-IgG du complexe OTA-Ac-IgG-HRP, déplacé pendant la réaction) est suivie pendant 20 minutes à 620 nm. Ensuite, la réaction est bloquée et la D.O. correspondante au produit enzymatique TMB_{ox} est enregistré à 450 nm. La figure 14 montre la courbe de calibration obtenue avec le pourcentage de la réaction de déplacement par rapport à la réaction de dissociation (équation 3). Nous notons le partage de cette courbe entre 2 domaines, un pour des faibles concentrations d'OTA et un pour des hautes concentrations d'OTA. Cette courbe est décrite par une équation à 3 paramètres (équation 4), dont le paramètre A est le pourcentage de déplacement le plus élevé pour la gamme des faibles concentrations d'OTA, le paramètre B est la concentration d'OTA pour laquelle la moitié de la valeur du paramètre A est obtenue et, finalement, le paramètre C qui est une constante caractérisant la gamme des hautes concentrations d'OTA. Dans le tableau 4 sont présentés les paramètres de cette courbe pour les trois volumes de matériel bio-sensible qui ont été utilisés. Aussi, la limite de détection, définie comme la concentration d'OTA qui donne un déplacement de 20 %, est contenue dans ce tableau.

$$\% \text{ déplacement} = \frac{D \cdot O_{OTA \neq 0} - D \cdot O_{OTA=0}}{D \cdot O_{OTA=0}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ déplacement} = \frac{A \times [OTA]}{B + [OTA]} + C \times [OTA] \quad (4)$$

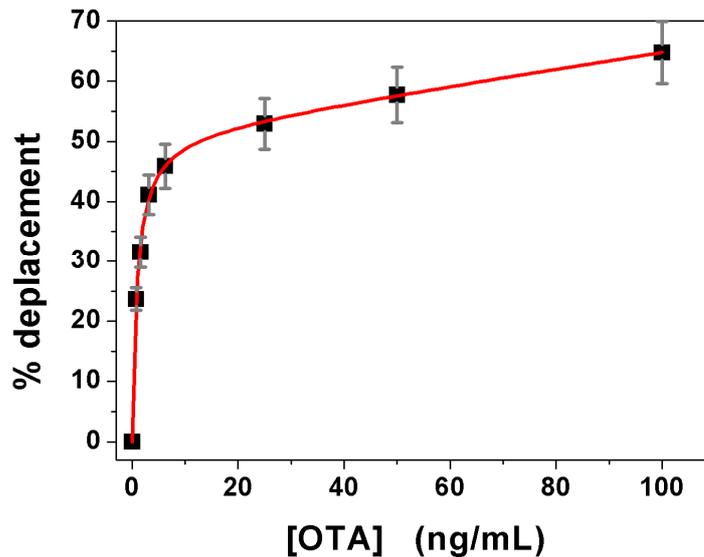


Figure 14. La courbe de calibration avec DIA pour la dépistage de l'OTA avec détection colorimétrique. Conditions expérimentales: 25 μ L du matériel bio-sensible modifiés avec 65 nmol/g de l'OTB.

Tableau 4. Influence du volume du matériel bio-sensible sur la limite de détection et sur les paramètres de la courbe de calibration pour l'immunoessai de type déplacement.

| Volume du matériel bio-sensible (μ L) | LOD (ng/mL) | Paramètres de la courbe de calibration | | | R^2 / N |
|--|-------------|--|---------------|-----------------|-------------|
| | | A (%) | B (ng/mL) | C (% / (ng/mL)) | |
| 5 | 6.5 | 18 ± 2 | 3.1 ± 0.7 | 0.35 ± 0.02 | 0.99691 / 8 |
| 25 | 0.8 | 52 ± 1 | 0.9 ± 0.1 | 0.13 ± 0.01 | 0.99602 / 8 |
| 50 | 100 | 4.8 ± 0.2 | 0.4 ± 0.1 | 0.15 ± 0.01 | 0.99532 / 6 |

La LOD obtenue pour 5 μ L du matériel bio-sensible est inférieure à celle obtenue pour 25 μ L, ce qui confirme l'hypothèse conformément à laquelle une densité plus élevée des anticorps immobilisés augmente les chances de la réaction de déplacement. Toutefois, pour 50 μ L du matériel bio-sensible il y a une densité trop élevée des anticorps immobilisés équivalente à une densité trop élevée des sites libres de ces anticorps. Ceci augmente les chances pour l'OTA de se lier à ces sites au lieu de remplacer l'OTB et ensuite, la LOD est augmentée. Ces résultats expérimentaux confirment la conclusion de l'étude mathématique dans laquelle une relation inverse entre la sensibilité de DIA et la densité des anticorps a

été trouvée. En conclusion, cet essai est assez sensible pour dépister l'OTA dans les échantillons des vins pour lesquels une limite maximale de 2 ng/mL est admise.

3.2.2 Procédures de prétraitement des échantillons de vins

L'immunoessai de type déplacement est conçu de manière à ce que durant l'incubation avec une solution de l'antigène, le nouveau complexe Ac-IgG-HRP soit libéré et que la détection via la HRP* puisse être réalisée *in situ*. Ce type d'immunoessai a été réalisé pour des analytes comme les protéines de liaison des acides gras (en anglais: fatty-acid binding protein, FABP) [42, 43] et le cortisol [44], pour lesquels l'activité de la HRP a été mesurée dans des tampons de perfusion de plasma et sérum.

La présence de l'OTA dans différentes denrées alimentaires implique son extraction dans des solvants organiques différents. Dans le DIA, la détection via la HRP* devrait être réalisée dans ces extraits. Ainsi, la méthode d'extraction joue un rôle important sur la composition de l'extrait et ensuite sur les performances de la détection. Par exemple, un défi pour les échantillons des vins est la recherche d'une méthode d'extraction qui élimine les constituants colorés afin de pouvoir réaliser une détection colorimétrique mais qui, en même temps, conserve la quantité de l'OTA dans l'échantillon initial.

Par conséquent, deux méthodes d'extraction de l'OTA à partir des échantillons de vin ont été testées en suivant le protocole décrit dans la partie expérimentale. La première méthode, qui permet d'obtenir le plus haut taux de récupération, est basée sur une colonne d'immunoaffinité. Comme le DIA est déjà basé sur une réaction immunologique, un tel couplage n'est pas justifiable. La deuxième méthode est basée sur le principe de l'extraction sur phase solide qui devrait retenir les constituants colorés des vins et ne pas retenir l'OTA. Les performances en termes de taux de récupération et des couleurs sont coprésentées dans le tableau 5 pour chacune des fractions collectées.

Tableau 5. Caractéristiques des fractions collectées à la sortie d'une colonne remplie avec Si-NH₂.

| No. de fraction | Couleur de la fraction | Couleur de la fraction après l'ajustement de pH | OTA récupéré (ng/mL) | Composition de la fraction |
|-----------------|------------------------|---|----------------------|---------------------------------------|
| Frac. 1 | Pas de couleur | Pas d'ajustement de pH, Pas de couleur | 0 | Le tampon de conditionnement (KPB) |
| Frac. 2 | Vert léger | rosé | 0,4 | vin et KPB |
| Frac. 3 | Vert léger | rosé | 1,2 | vin et KPB |
| Frac. 4 | Vert léger | rosé | 1,6 | vin et KPB |
| Frac. 5 | Vert léger | rosé | 2,0 | vin et KPB |
| Frac. 6 | Vert léger | rosé | 2,1 | MeOH:KPB 1:1 passé dans la colonne |
| Frac. 7 | Pas de couleur | Pas de couleur | 0,3 | KPB passé dans la colonne |

La phase solide est une silice modifiée avec des groupements NH_2 , qui à pH 7,4 sont chargés positivement. Le pH des échantillons de vin est ajusté à 7,4 par le traitement avec la solution de NaHCO_3 . A ce pH, l'OTA est sous forme de dianion ce qui expliquerait sa rétention sur la colonne. Mais, cette rétention n'est pas totale car des taux de récupération de l'ordre de 50 % ont été obtenus. Cela se justifie par la présence dans le vin d'acides avec des pKa d'environ 3 qui rentrent en compétition avec l'OTA pour les interactions électrostatiques avec la phase solide. De plus, les autres constituants, les polyphénols, malgré leurs pKa 10, sont retenus sur la colonne par adsorption. Les différentes fractions des vins obtenues avec cette colonne ont été utilisées pour la détection de l'OTA.

3.2.3 Détection *in situ* de l'OTA dans des échantillons de vins

Les échantillons des vins avec une teneur connue en l'OTA ont été incubés avec le matériel bio-sensible à base de l'OTB. L'activité enzymatique d'HRP* a été enregistrée pendant 30 minutes après l'addition du substrat colorimétrique (figure 15). La bonne corrélation entre cette activité (estimée comme la pente de la variation de D.O. en temps) avec la concentration de l'OTA montre que l'immunoessai de type déplacement peut être utilisé pour la détection de l'OTA dans des échantillons de vin (figure 16).

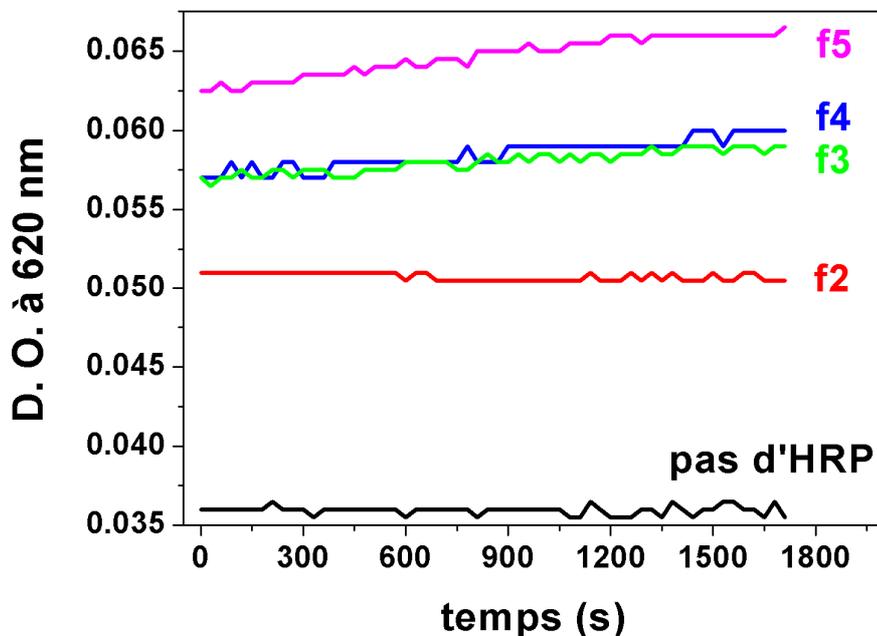


Figure 15. Mesures spectrophotométriques de l'activité de HRP* dans les fractions de vin obtenues comme indiquées dans le tableau 5. HRP* signifie l'enzyme du complexe OTA-Ac-IgG-HRP déplacé de la surface des billes

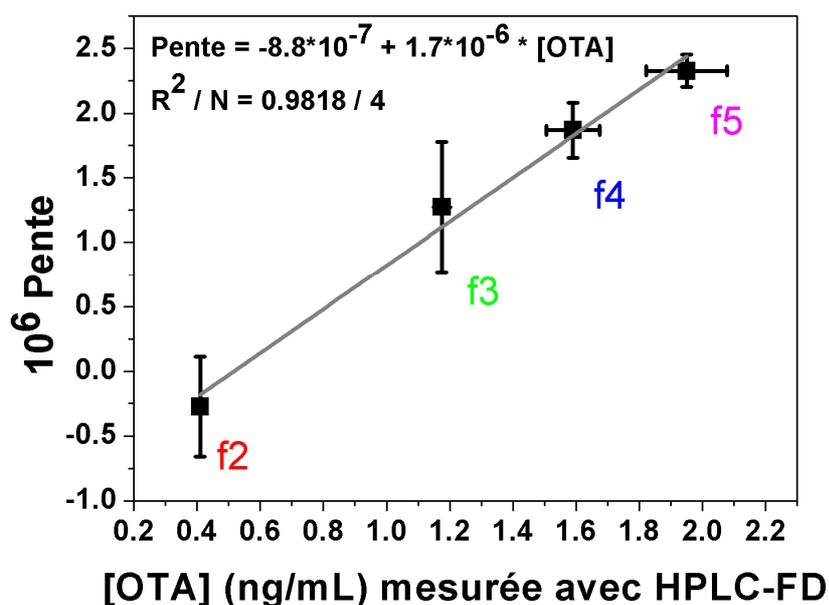


Figure 16. La corrélation entre la concentration d'OTA dans les fractions de vin (mesurée avec HPLC-FD) et la pente de HRP* obtenue avec les mesures spectrophotométriques, présentées à la figure 15.

Les immunoessais de type compétitif directs et indirects ont été utilisés pour la détection de l'OTA dans les échantillons de vin, mais la matrice du vin est présente dans l'étape de réaction immunologique entre l'OTA et son anticorps, tandis que l'étape de détection, toujours à base de HRP, se réalise dans un tampon phosphate. Les temps des réactions des différentes étapes ainsi que les limites de détection sont comparés dans le tableau 6 pour notre essai et ceux publiés.

Tableau 6. Comparaison entre les performances des essais compétitifs directs et indirects avec l'essai DIA.

| Paramètres | Compétitif direct [29] | Compétitif indirect [31] | DIA |
|---|--------------------------------|--------------------------|---|
| Durée totale de l'immobilisation de l'antigène, du blocage et du marquage (h) | 24h 30 | 26 h | 2 h |
| La durée de la réaction immunologique (min) | 60 | 60 | 10 |
| La durée de la réaction enzymatique (min) | 10 | 15 | 20 |
| La limite de détection (ng/mL) | 0,36 | 0,7 | 0,8 |
| Le prétraitement des échantillons de vin | Colonne d'immunoaffinité (IAC) | Adsorption sur PVP | Extraction sur phase solide (Si-NH ₂) |
| La détection est réalisée en | Tampon | tampon | Possible dans le vin |

3.2.4 Possibilités d'utilisation du matériel bio-sensible

Deux formes pratiques sont envisagées pour l'utilisation du matériel bio-sensible. La première prévoit l'utilisation de billes bio-sensibles qui sont trempées dans les échantillons de vins, pour lesquels la couleur a été réduite en préalable. Ces billes ont un temps de réaction bref et le surnageant est récupéré. Après l'addition du substrat colorimétrique, la couleur de l'échantillon vire au bleu, avec une intensité proportionnelle à la concentration de l'OTA (figure 17). Ce mode d'usage implique un essai de contrôle réalisé en parallèle sur un échantillon non contaminé. Pour un bon fonctionnement, le matériel bio-sensible doit être stable au stockage jusqu'au moment de son utilisation. Ceci a été vérifié pour un stockage d'un jour à la température ambiante. De plus, basé sur notre expérience, pour une bonne reproductibilité du prélèvement du matériel bio-sensible, il est recommandé l'utilisation d'une pipette à tip épouté et l'utilisation d'un volume minimum 10 μ L.

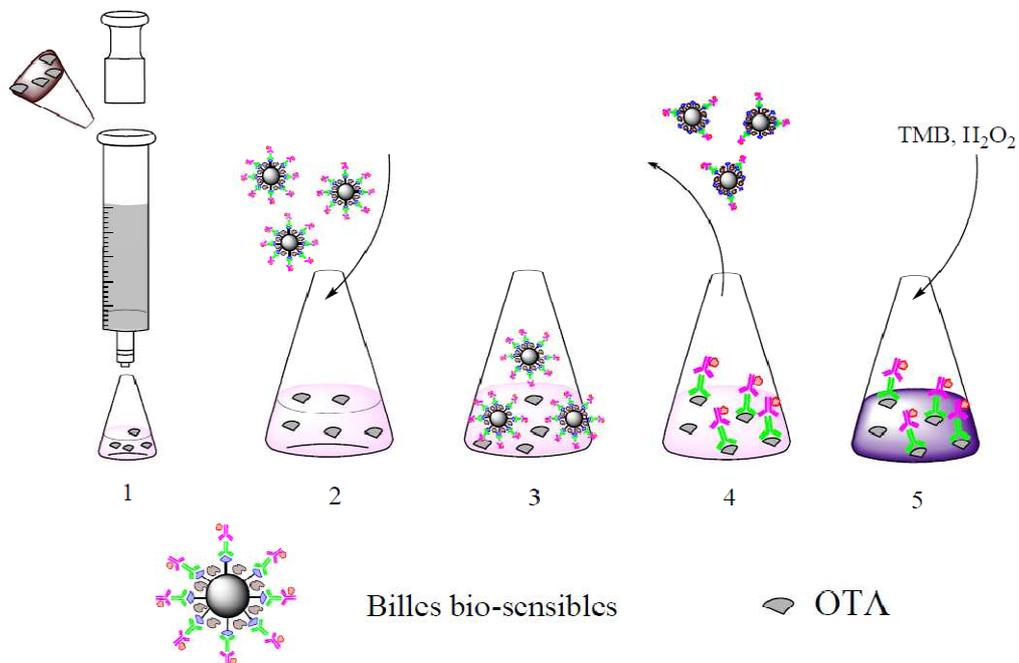


Figure 17. Mode d'emploi des billes bio-sensibles envisagé pour le dépistage de l'OTA dans le vin. Etapes: 1) réduire la couleur du vin avec une colonne à base de Si-NH₂; 2) immerger les billes bio-sensibles dans le vin; 3) laisser réagir 10 min; 4) récupérer le surnageant; 5) ajouter le substrat colorimétrique; l'apparition de la couleur bleue signifie un test positif pour la contamination en OTA de l'échantillon.

Deuxièmement, nous envisageons le remplissage d'un bioréacteur avec le matériel bio-sensible et son inclusion dans un système en flux, permettant ainsi une haute vitesse d'analyse des échantillons de vin. La faisabilité de ce projet a été testée par deux expériences. Tout d'abord la possibilité de réaliser des immunoessai DIA multiples a été vérifiée par l'incubation, dans une fiole, du même matériel bio-

sensible avec une gamme de concentration d'OTA. Après la réaction de déplacement, le surnageant est récupéré, le substrat colorimétrique est ajouté, la réaction enzymatique est stoppée après 20 min et la D.O. est enregistrée (figure 18). La limite de détection obtenue est de 6,25 ng/mL, une valeur assez élevée qui s'explique par l'utilisation d'une trop grande quantité du matériel bio-sensible. Cette quantité a été choisie pour le remplissage d'un bioréacteur à un volume de 0,15 cm³. Néanmoins, ces résultats pourraient être améliorés par l'optimisation du volume du matériel bio-sensible, le temps de la réaction immunologique ainsi que la vitesse d'agitation.

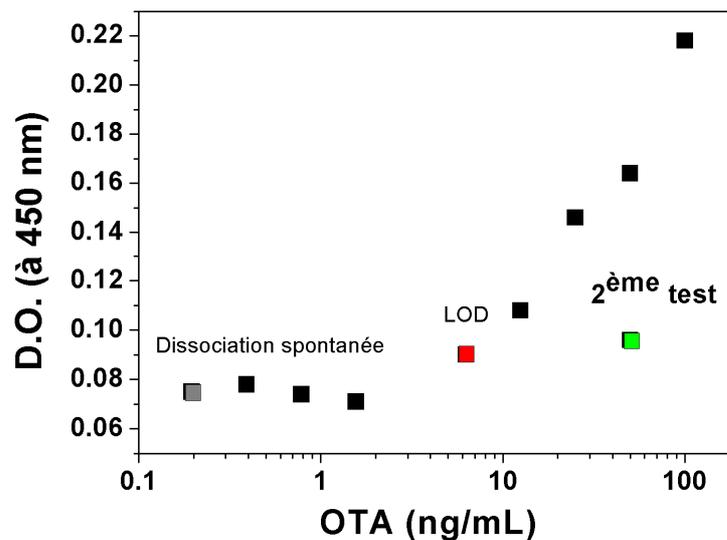


Figure 18. Des essais DIA multiples sur le même matériel bio-sensible avec différentes concentrations de l'OTA. Conditions expérimentales: 30 mg de matériel bio-sensible modifié avec 3,2 μ mol/g d'OTB; durée de la réaction de déplacement, 2 min; agitation magnétique, 180 rpm; durée de la réaction enzymatique, 20 min.

L'intégration d'un système en flux implique une détection adaptée. Ainsi, l'analyse d'injection en flux avec détection ampérométrique a été testée comme solution possible. Le produit enzymatique obtenu avec la HRP* déplacée d'une série de matériaux bio-sensible, incubés avec une gamme de concentration de l'OTA, est injecté dans un système en flux à ligne unique. Celui-ci est prévu avec une pompe péristaltique, une vanne d'injection et une cellule électrochimique aux électrodes en graphite sérigraphiées. La détection du TMB_{ox} est réalisée par l'enregistrement du courant de pic de réduction à 0,1 V vs. Ag pseudo. Une régression modélisée avec une équation à 4 paramètres est obtenue pour la variation de ce courant avec la concentration de l'OTA. La sensibilité de cette méthode de détection est de 1,2 nA / (ng/mL), une valeur assez faible qui pourrait être améliorée par l'optimisation des

paramètres liés à la réaction de déplacement et aussi aux caractéristiques du flux (le volume injecté, le débit).

4 Conclusions

En conclusion, l'immunoessai de type déplacement a été utilisé pour la détection de l'OTA dans un format original, un matériel bio-sensible, à base d'OTB, un analogue moins toxique. L'affinité réduite de l'anticorps anti-OTA vers l'OTB est le principe de fonctionnement de cet essai. Le support de l'essai est un stock de billes en verre à dimension des pores contrôlée, étant donné leur grande surface réactive, le faible volume d'échantillon nécessaire, leur robustesse et coût réduit. Le plus grand avantage du matériel bio-sensible est la possibilité de détecter OTA *in situ* dans le vin, à condition que la couleur de celui-ci ait été effacée. Cela a été réalisé par une colonne en silice, qui malgré son taux de récupération de l'OTA moins élevé que celui d'une colonne d'immunoaffinité, représente une alternative plus rapide et moins chère que cette colonne d'IAC.

Les paramètres de l'immunoessai ont été optimisés afin d'obtenir une limite de détection de l'OTA qui satisfait la législation qui fixe une valeur maximale de 2 ng/mL pour le vin, mais plusieurs paramètres pourraient être modifiés afin d'améliorer la sensibilité de la technique.

Deux possibilités d'utilisation du matériel bio-sensible ont été essayées. Les résultats préliminaires montre que ce matériel pourrait servir à développer un bioréacteur intégré dans un système en flux ou il pourrait être utilisé comme "des billes bio-sensibles à tremper" afin de réaliser une détection *in situ* de l'OTA.

References

1. A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai, Z. Tulassay, G. Nagy, Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, **2007**, *28*, R41.
2. M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, **2002**, *127*, 183.
3. Y. Tian, T. Okajima, F. Kitamura, T. Ohsaka, A SOD-based amperometric biosensor for superoxide ion, *J. Korean Electrochem. Soc.*, **2002**, *5*, 212.
4. I. Fridovich, Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 4053.
5. F. Lisdat, B. Ge, R. Rezek, E. Kozniowska, An electrochemical method for quantification of the radical scavenging activity of SOD, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1999**, *365*, 494.
6. S. Ignatov, D. Shishniashvili, B. Ge, F.W. Scheller, F. Lisdat, Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants, *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, *17*, 191.

7. M. Beissenhirtz, F. Scheller, F. Lisdat, Immobilized Cytochrome c Sensor in Organic/Aqueous Media for the Characterization of Hydrophilic and Hydrophobic Antioxidants, *Electroanalysis*, **2003**, *15*, 1425.
8. E. Emregul, Development of a new biosensor for superoxide radicals, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *383*, 947.
9. L. Campanella, A. Bonnani, D. Bellantoni, G. Favero, M. Tomassetti, Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2004**, *36*, 91.
10. S. Mesaros, Z. Vankova, A. Mesarosova, P. Tomcik, S. Grunfeld, Electrochemical determination of superoxide and nitric oxide generated from biological samples, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1998**, *46*, 33.
11. M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples, *Talanta*, **2009**, *79*, 289.
12. M. Cortina-Puig, X. Munoz-Berbel, R. Rouillon, C. Calas-Blanchard, J.L. Marty, Development of a cytochrome c-based screen-printed biosensor for the determination of the antioxidant capacity of orange juices, *Bioelectrochem.*, **2009**, *76*, 76.
13. S. Banu, G.M. Greenway, T. McCreedy, R. Shaddick, Microfabricated bioreactor chips for immobilised enzyme assays, *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *486*, 149.
14. S. Banu, G.M. Greenway, R.A. Wheatley, Luminol chemiluminescence induced by immobilised xanthine oxidase, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *541*, 91.
15. A.V. Krylov, H. Adamzig, A.D. Walter, B. Lochel, E. Kurth, O. Pulz, J. Szeponik, F. Wegerich, F. Lisdat, Parallel generation and detection of superoxide and hydrogen peroxide in a fluidic chip, *Sens. Actuators, B*, **2006**, *119*, 118.
16. T. Richter, L.-L. Schultz-Lockyear, R.D. Oleschuk, U. Bilitewski, D.J. Harrison, Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic device. Determination of xanthine., *Sens. Actuat. B*, **2002**, *81*, 369.
17. H. Ukeda, A.K. Sarker, D. Kawana, M. Sawamura, Flow-injection assay of superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium, *Anal. Sci.*, **1999**, *15*, 353.
18. F. Adam, H. Osman, K.M. Hello, The immobilization of 3-(chloropropyl)triethoxysilane onto silica by a simple one-pot synthesis, *J. Colloid Interface Sci.*, **2009**, *331*, 143.
19. Sigma. *Ezymatic assay of peroxidase*. 2009; Available from: http://origin-www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/p6140enz.Par.0001.File.tmp/p6140enz.pdf.
20. D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, *53*, 1841.
21. Z. Dhaouadi, M. Nsangou, N. Garrab, E.H. Anouar, K. Marakchi, S. Lahmar, DFT study of the reaction of quercetin with $O_2^{\cdot -}$ and $\cdot OH$ radicals, *J. Molec. Struct.: THEOCHEM*, **2009**, *904*, 35.
22. K.J. Van Der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, D.B. Scott, J.J. Theron, Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh., *Nature*, **1965**, *205*, 1112.
23. A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography *J. Chromat. A*, **1999**, *864*, 89.
24. A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Analysis with Fluorometric Detection: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **2001**, *84*, 1818.
25. L. Sibanda, S. Saeger, C. Peterghem, Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee, *J. Chromat. A*, **2002**, *959*, 327.

26. T.Y. Rusanova, N.V. Beloglazova, I.Y. Goryacheva, M. Lobeau, C. Peterghem, S. Saeger, Non-instrumental immunochemical test for rapid ochratoxin A detection in red wine, *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 653, 97.
27. *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*, dans le rapport final de Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009
28. *Foodstuffs - Determination of ochratoxin A in wine and beer - HPLC method with immunoaffinity column clean-up*, European Committee of Normalization (CEN), 14133:2003
29. A. Radoi, L. Dumitru, L. Barthelmebs, J.L. Marty, Ochratoxin A in some french wine: application of a direct competitive ELISA based on an OTA-HRP conjugate, *Anal. Lett.*, **2009**, 42, 1187.
30. S.H. Alarcon, G. Palleschi, D. Compagnone, M. Pascale, A. Visconti, I. Barna-Vetró, Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat, *Talanta*, **2006**, 69, 1031.
31. B. Prieto-Simon, M. Campas, J.L. Marty, T. Noguer, Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23, 995.
32. J.C. Vidal, P. Duato, L. Bonel, J.R. Castillo, Use of polyclonal antibodies to ochratoxin A with a quartz-crystal microbalance for developing real-time mycotoxin piezoelectric immunosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 394, 575.
33. R. Liu, Z. Yu, Q. He, Y. Xu, An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin, *Food Control*, **2007**, 18, 872.
34. J.P. Harris, P.G. Mantle, Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*, *Phytochem.*, **2001**, 58, 709.
35. D. Ringot, A. Chango, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, 159, 18.
36. M.V. Kahraman, G. Bayramoglu, N. Kayaman-Apohan, A. Güngör, alpha-Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment, *Food Chem.*, **2007**, 104, 1385.
37. H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, M. Suda, S. Uchiyama, A Compactly Integrated Flow Cell with a Chemiluminescent FIA System for Determining Lactate Concentration in Serum, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 373.
38. L. Molina, G. Messina, P. Stege, E. Salinas, J. Raba, Immuno-column for on-line quantification of human serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* in human serum samples, *Talanta*, **2008**, 76, 1077.
39. M.A. Gonzalez-Martinez, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, A. Abad, A. Montoya, Development of an automated controlled-pore glass flow-through immunosensor for carbaryl, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 347, 199.
40. Y. Fintschenko, G. Wilson, Flow injection immunoassays: a Review, *Mikrochim. Acta*, **1998**, 129, 7.
41. D.B. Holt, A.W. Kusterbeck, F.S. Ligler, Continuous Flow Displacement Immunosensors: A Computational Study, *Anal. Biochem.*, **2000**, 287, 234.
42. D. Voort, M. Pelsers, J. Korf, W.T. Hermens, J.F.C. Glatz, Development of a displacement immunoassay for human heart-type fatty acid-binding protein in plasma: the basic conditions., *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 19, 465.
43. W.A. Kaptein, J. Korf, S. Cheng, M. Yang, J.F.C. Glatz, R. Renneberg, On-line flow displacement immunoassay for fatty acid-binding protein, *J. Immunol. Methods*, **1998**, 217, 103.
44. W.A. Kaptein, J.J. Zwaagstra, K. Venema, M. Ruiters, J. Korf, Analysis of cortisol with a flow displacement immunoassay, *Sens. Act. B*, **1997**, 45, 63.