

Développements analytiques appliqués à une thématique d'écologie chimique

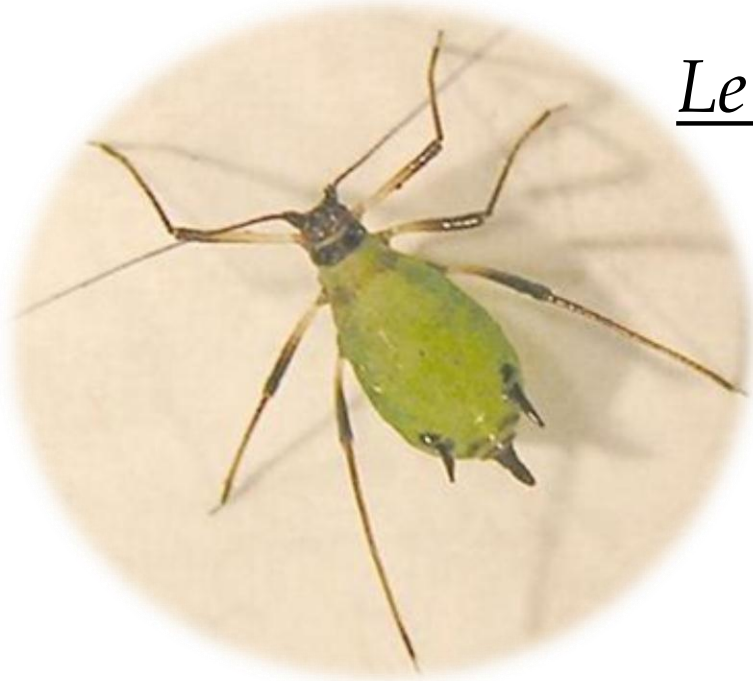
Dr. Stéphanie Heuskin

Laboratoire de Chimie Analytique, GxABT-Ulg

Earth and Life Institute - Biodiversity, UCL

Projet SOLAPHID (WALEO 2)

Développement de formulations de contrôle
biologique contre les pucerons



Le problème des pucerons

Domages aux cultures : transmetteurs de virus et maladies



Problèmes agro-économiques

Contrôle par pesticides limité car :

- résistance des insectes nuisibles
- non spécifique à une seule espèce
- dangereux pour l'environnement et la santé humaine

Contrôle biologique



Contrôle biologique en lutte intégrée

« L'utilisation d'organismes vivants (insectes ou pathogènes) pour supprimer les populations de nuisibles ou les rendre moins dommageables qu'ils ne l'auraient été »

(Stoner, 2004)



Ennemies naturels des pucerons

Systeme tritrophique des pucerons

1^{er} niveau

Plante



2^{ème} niveau

Pucerons



3^{ème} niveau

Prédateurs



Parasitoïdes



→ Communication chimique : sémiochimiques

Sémiochimiques

Signaux de communication chimique plantes – insectes – insectes
avec modification du comportement

*Interactions
intraspécifiques*

*Interactions
interspécifiques*

Phéromones

Substances allélochimiques

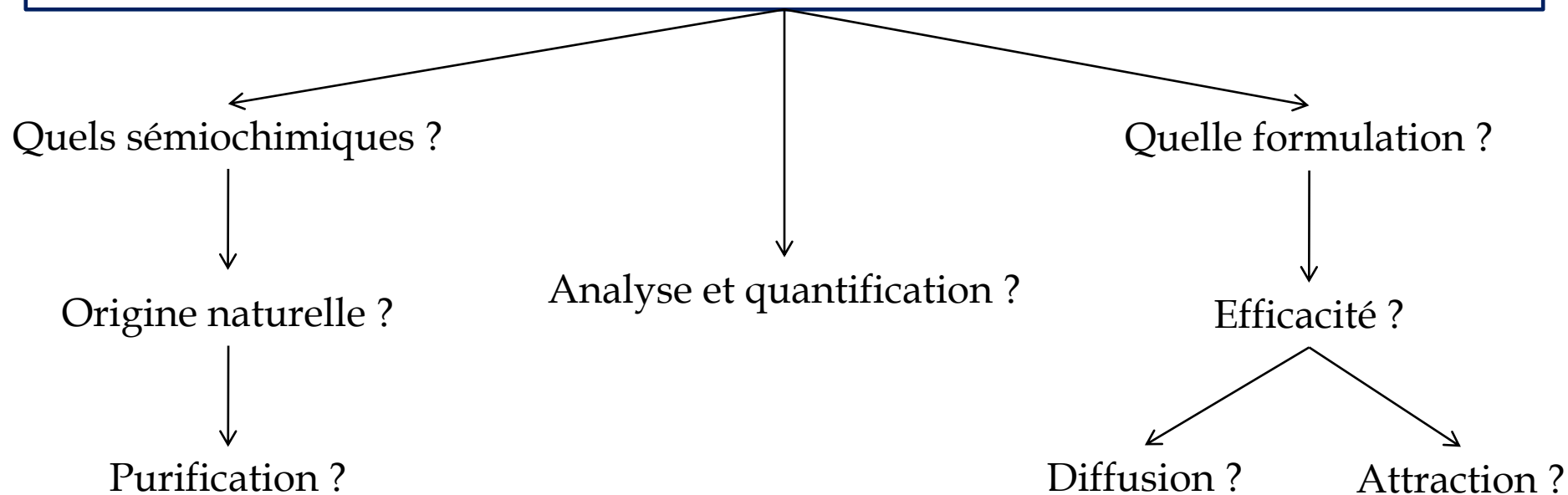
- d'alarme
- sexuelles
- d'agrégation
- de piste
- de marquage d'un hôte
- ...

- allomones: + espèce émettrice
- kairomones: + espèce réceptrice
- synomones: + émetteur, + récepteur

*Une même molécule peut avoir à la fois une fonction
de phéromone et de substance allélochimique*

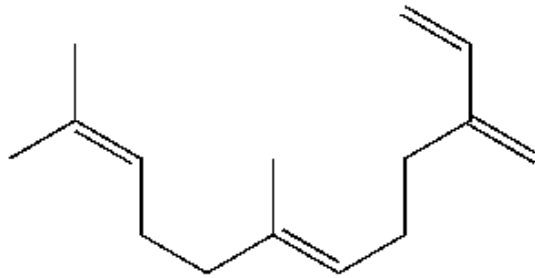
Objectif global

Développer une formulation, à libération progressive de sémiochimiques d'origine naturelle, en tant qu'outil de contrôle biologique pour attirer les ennemis naturels des pucerons



Choix et origines des sémiochimiques

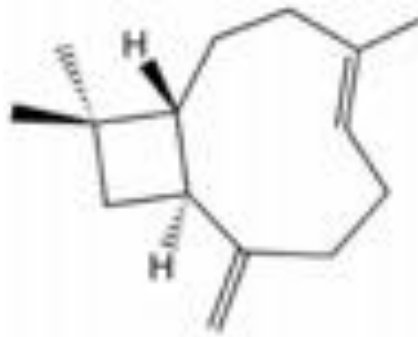
E-β-farnésène



Sesquiterpène
(C₁₅H₂₄)

- Pheromone d'alarme des pucerons
- Kairomone: attraction de prédateurs (*Episyrphus balteatus* De Geer) et de parasitoïdes (*Aphidius ervi* Haliday) de pucerons

E-β-caryophyllène



Sesquiterpène
(C₁₅H₂₄)

- Réduit la capacité de reproduction des pucerons
- Attractif envers les parasitoïdes de pucerons (*A. ervi* Haliday)

Origine naturelle des sémiochimiques

→ Huiles essentielles

Raisons écologiques et coût >< synthèse chimique des molécules

- *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae): *E*- β -farnésène
- *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae): *E*- β -caryophyllène



Caractérisation analytique des HE

Caractérisation des huiles essentielles

- Analyse GC-MS :

→ identification certaine des composés (indices de rétention)

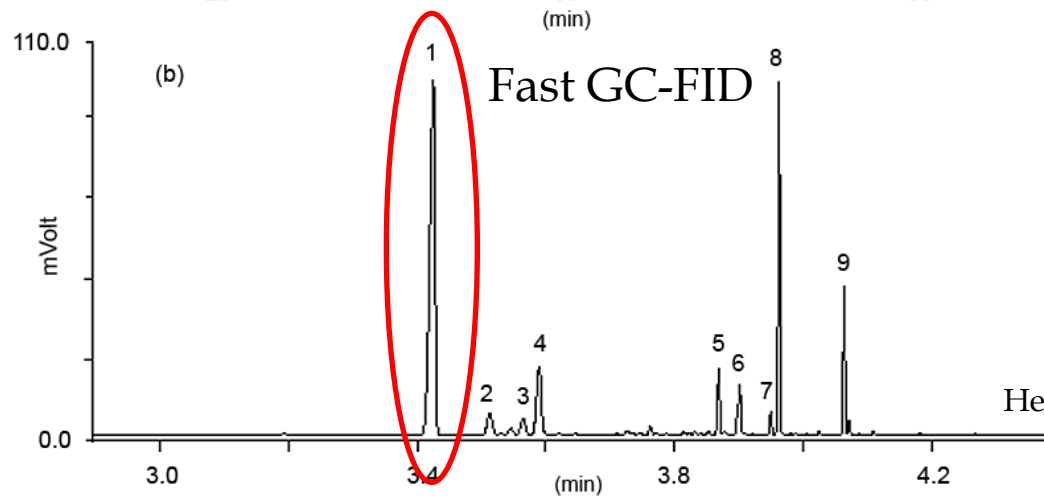
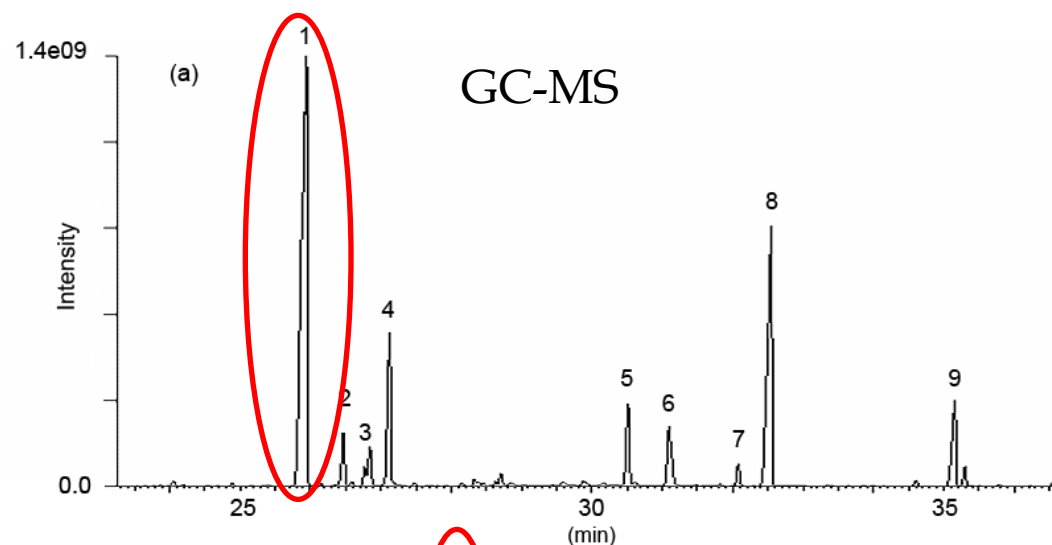
- Analyse GC-FID Ultra Fast :

→ comparaison au profil GC-MS

→ détermination du % des sémiochimiques

Caractérisation des huiles essentielles

Matricaria chamomilla L. (originaire du Népal)

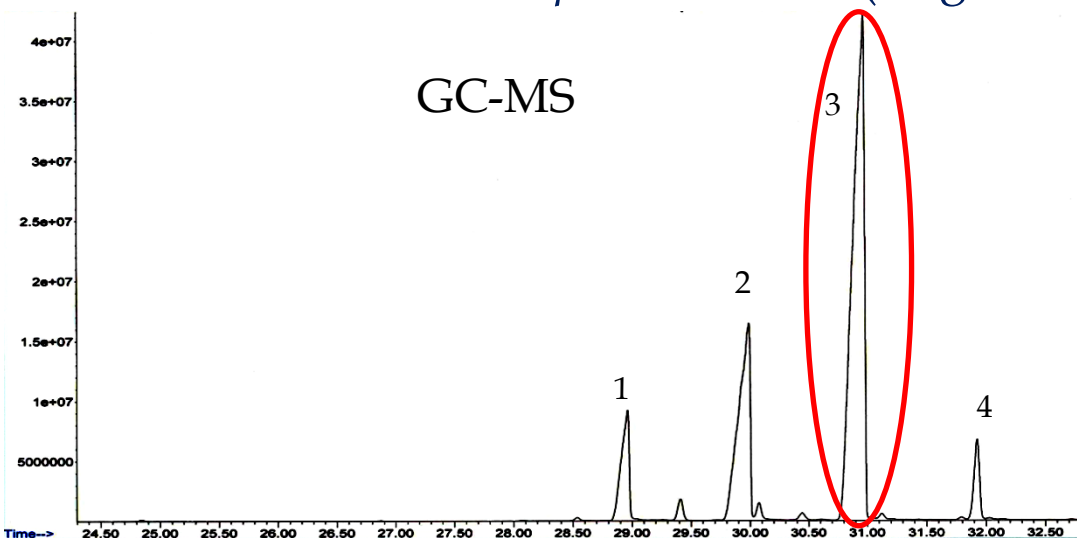


N°	Major compounds	Retention index	%
1	E-β-farnesene	1456	42,6
2	Germacrene D	1478	2,9
3	bicyclogermacrene	1494	1,9
4	(E,E)-α-farnesene	1506	8,3
5	α-bisabolol oxide B	1649	4,4
6	α-bisabolone oxide A	1673	4,5
7	Chamazulene	1715	1,1
8	α-bisabolol oxide A	1735	21,1
9	Cis-ene-yne-dicycloether	1802	5,9

Caractérisation des huiles essentielles

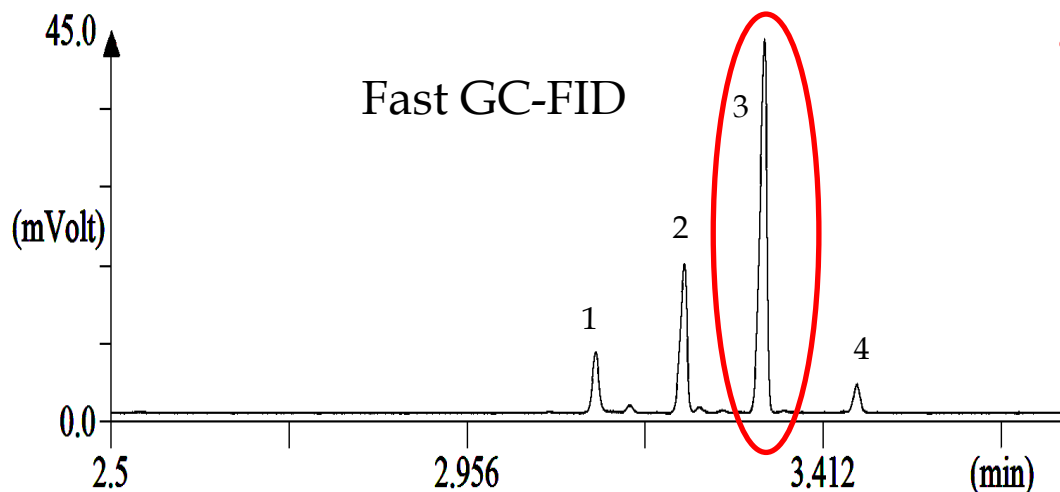
Nepeta cataria L. (originaire du Canada)

GC-MS



N°	Major compounds	Retention index	%
1	(Z,E)-nepetalactone	1353	8.4 %
2	(E,Z)-nepetalactone	1377	22.5 %
3	E-β-caryophyllene	1415	58.9 %
4	α-humulene	1465	3.9 %

Fast GC-FID

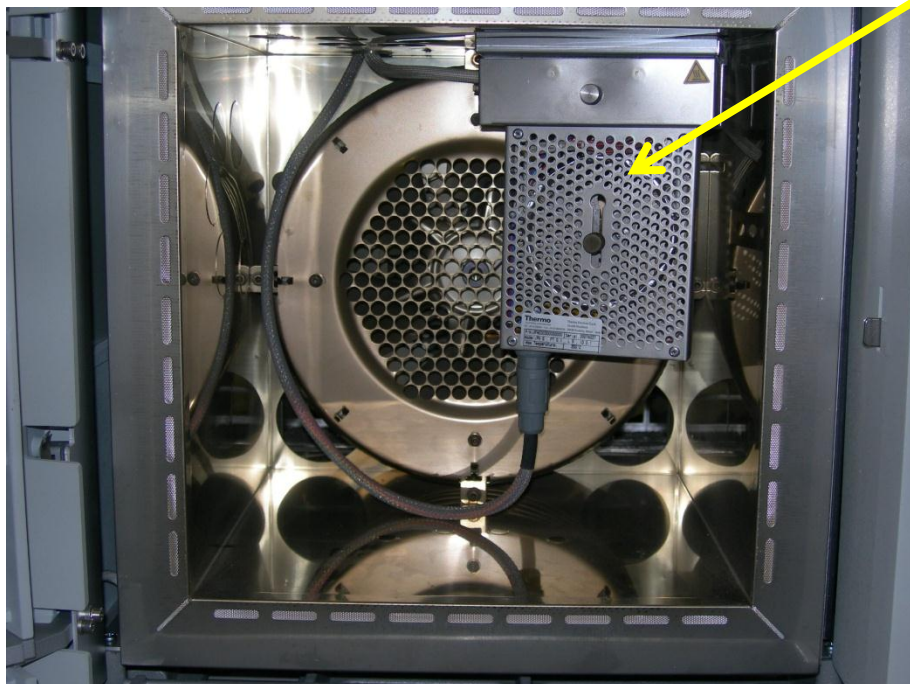


Ultra Fast GC >< GC classique

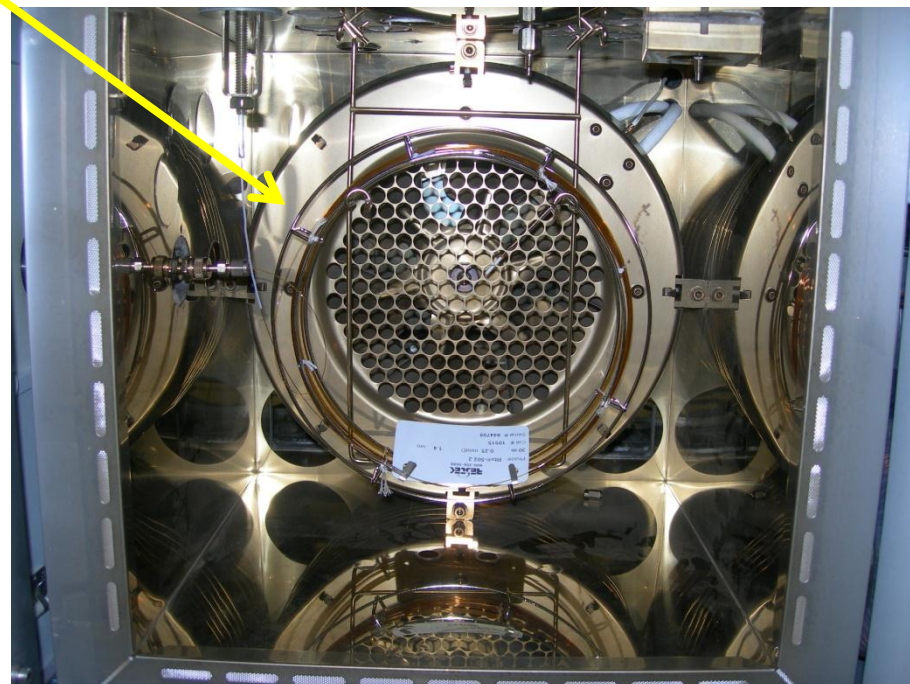
- Par rapport à l'analyse GC classique :
 - ➔ réduction du temps d'analyse (➔ 30x)
 - ➔ sensibilité accrue
- Amélioration de la recherche :
 - ➔ plus grand nombre de répétitions
 - ➔ résultats obtenus plus rapidement
 - ➔ validation plus rapide de méthodes

Ultra Fast GC >< GC classique

colonne



Ultra Fast GC



GC classique

Ultra Fast GC >< GC classique

- Montée en T° : 100 – 1200° C/min
 - Colonne : 2 – 5 m, 0.1 mm ID
 - Système pneumatique à haute pression
 - Détecteur rapide (Fast FID) : 300 Hz
(réponse à haute fréquence)
 - Injecteur automatique
- Temps d'analyse < 5 min**

Ultra Fast GC

- Montée en T : en général 10-30° C/min
 - Colonne : 10 – 30 m, 0.32 mm ID
- Temps d'analyse > 35 min**

GC classique

Colonne = Ultra Fast Module (UFM)



- Élément chauffant et capteur T° directement autour de la colonne
- Colonne installée dans une « cage »
- Facilité d'installation dans injecteur et détecteur
- Le four du GC ne chauffe plus
- Refroidissement de 350° C à 50° C en ± 1 min
- Durée de vie prolongée (10000 cycles, 3x >)

Validation analytique

Avant de valider

* Molécules de référence de haute pureté :

- analytes purifiés ou achetés

* Standard (étalon) interne (SI) :

- même famille chimique que analytes

→ facteur de réponse proche de 1

$$F = (S_A \cdot C_{SI} / S_{SI} \cdot C_A)$$

- temps de rétention proche du Tr des analytes sans recoupement de pics

Avant de valider

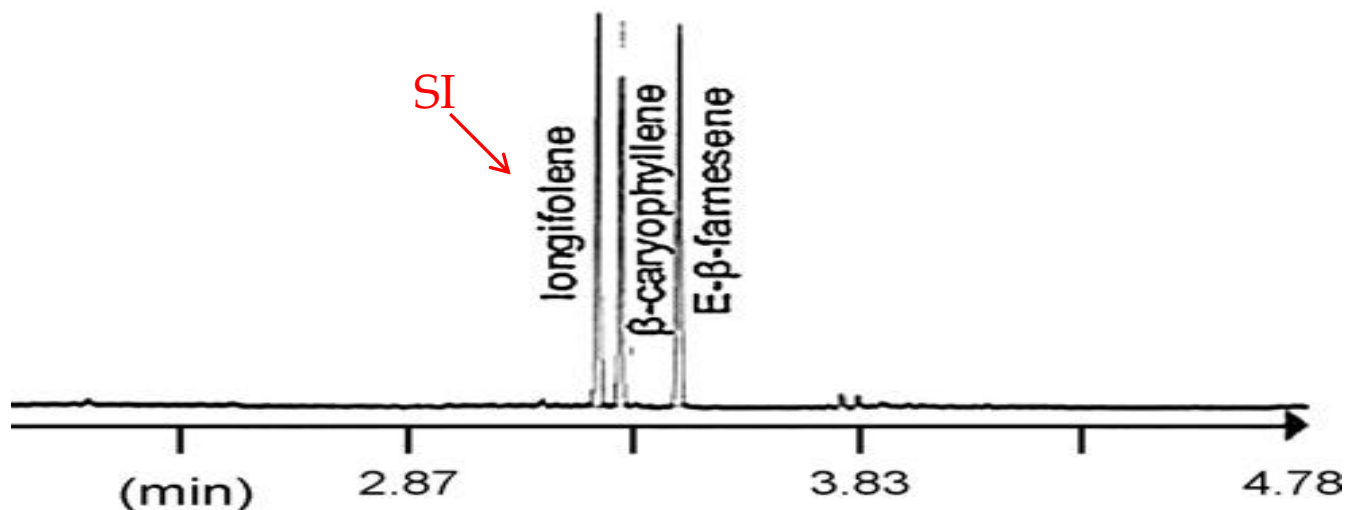
* Vérification pureté analytes et SI par GC :

- importance dans calculs de validation
- 3-10 répétitions

Compound	Mean purity (%)	SD	RSD (%)
E- β -farnesene	98.17	0.0009	0.10
β -caryophyllene	94.67	0.0071	0.75
Longifolene	98.01	0.0003	0.03

Optimisation de la méthode d'analyse des sémiochimiques au GC

Ultra Fast



→ Bonne résolution des pics en moins de 5 min.

$$R_s = 2(t_{R \text{ E-}\beta\text{-caryophyllène}} - t_{R \text{ longifolène}}) / (W_{\text{longifolène}} - W_{\text{E-}\beta\text{-caryophyllène}})$$

$$R_s = 1,65 > 1,5 \rightarrow \text{OK}$$

Optimisation de la méthode d'analyse des sémiochimiques au GC

Ultra Fast

* Type de colonne :

- Ultra Fast Module (UFM) 5% phényl
- 5 m x 0.10 mm I.D., 0.10 μm épaisseur de phase (film thickness)

* Programme de T° :

Ramp (°C/min)	T° (°C)	Hold (min)
	40	0.1
30	95	-
35	155	-
200	280	0.5

Objectif d'une méthode d'analyse

Doser le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à analyser en routine

$$X_i \leftrightarrow \mu_T$$

Résultat

Valeur vraie

Objectif d'une validation analytique

Donner des **garanties** au laboratoire et aux autorités que les valeurs mesurées par la méthode d'analyse sont suffisamment proches de la valeur vraie (fiabilité)

$$|x_i - \mu_T| < \lambda$$

Avec λ = limite d'acceptation

→ *Besoin d'un outil de décision permettant d'évaluer la capacité de la procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation.*

Deux approches pour valider

- Validation classique :

- Basée sur les normes ISO 5725 et procédures analytiques du laboratoire
- Validation des critères 1 par 1

- Validation par profils d'exactitude :

- Approche harmonisée mais plus sévère vis-à-vis des critères de validation
- Concept de l'erreur total : validation globalisée

Validation classique

Validation des critères 1 par 1

Heuskin et al. (2009), J. of Chromatography A, 1216: 2768-2775 :

« *Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae)* »

Limites de détection et de quantification

Notions arbitraires → se référer à une norme ou référence de labo.

- Limite de détection :

= plus petite quantité d'analyte détectable

→ Concrètement : $LOD = 3 * s_0$, où s_0 : écart-type de
répétabilité d'un blanco obtenu après 8 répétitions

- Limite de quantification :

= $2 * LOD$ (Chauveheid, 2007)

Etalonnage

Gamme d'étalonnage :

- 5 concentrations croissantes en analytes + blanco
- SI à la même concentration quelle que soit la concentration en analyte
- 3 répétitions de préparation

Étalonnage

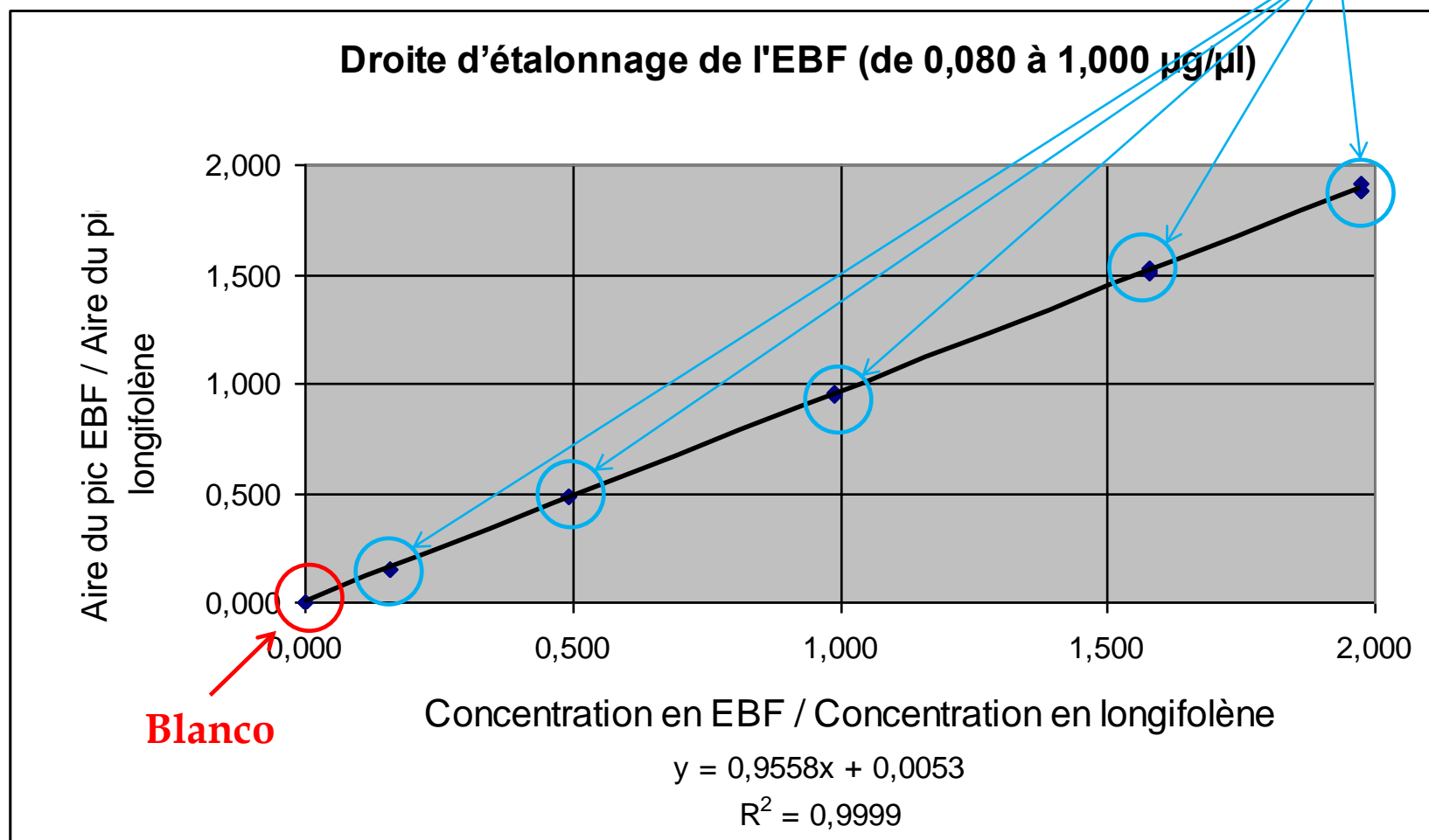
Construction des courbes d'étalonnage :

- Généralement par régression linéaire au sens des moindres carrés
- Rapport des aires de pics (analyte/SI) en fonction du rapport des concentrations (analyte/SI)

Etalonnage

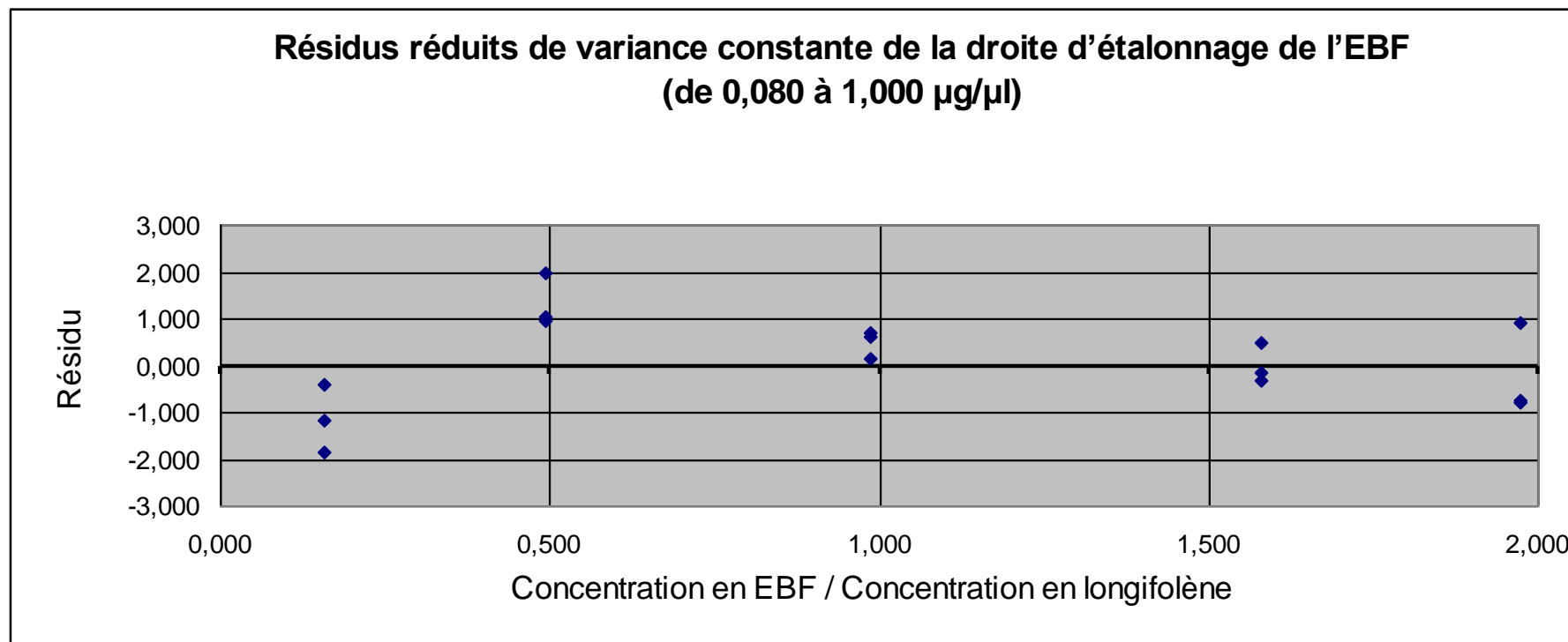
5 concentrations
* 3 répétitions

Courbes d'étalonnage :



Étalonnage

Linéarité du modèle des courbes d'étalonnage :



Etalonnage

Justesse (*English : Trueness*) de la courbe d'étalonnage :

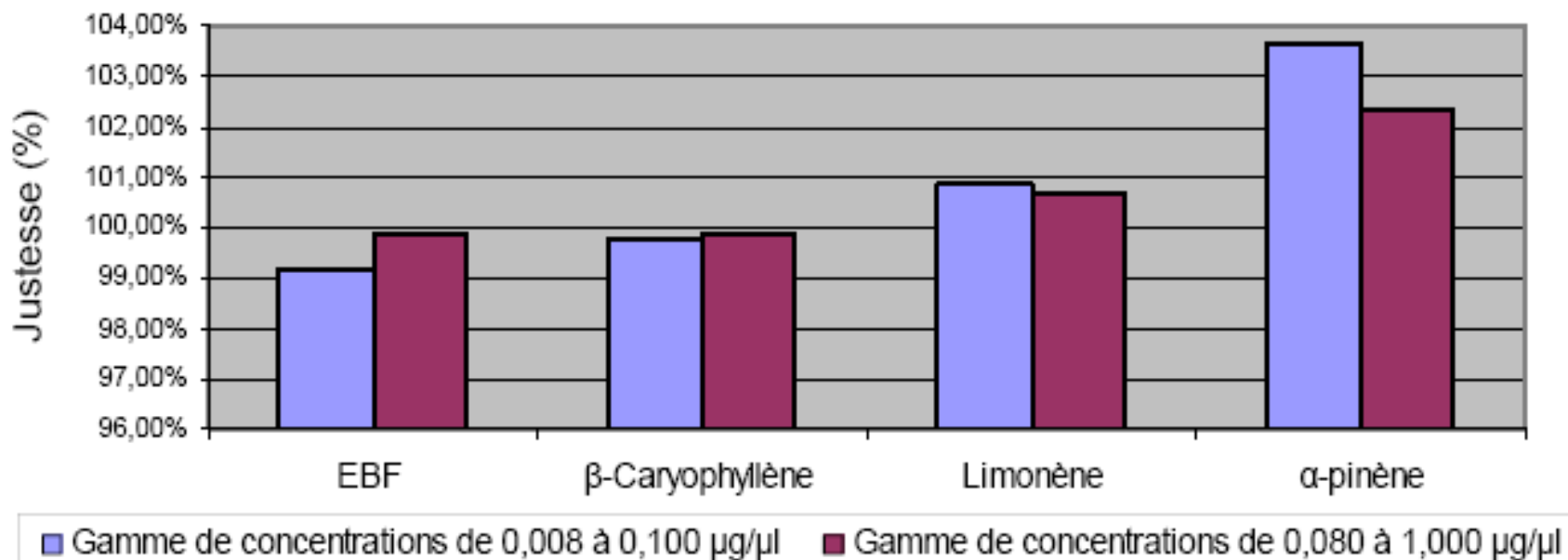
- Exprime la linéarité de la méthode *vs* linéarité du modèle de régression de la droite d'étalonnage (cf. profil d'exactitude)
- Biais (%) entre la pente de la droite d'étalonnage théorique et la pente d'une droite construite ultérieurement en injectant les aires de pics mesurée dans le modèle de régression théorique

Etalonnage

Justesse (*English : Trueness*) de la courbe d'étalonnage :

- Biais compris entre 90% et 110 % (réf. Procédures BPL)

Justesse des pentes des droites d'étalonnage en fonction des composés et de la gamme de concentrations



Fidélité de la méthode (English : Precision)

Fidélité = Répétabilité + Reproductibilité



Pour chaque analyte :
10 répétitions d'analyse d'une
concentration, le même jour, par
une même personne
(n=10)

Pour chaque analyte :
10 répétitions d'analyse d'une
concentration, pendant 5 jours,
par une ou plusieurs personnes
(n=50)

Exprimées par les coefficients de variation (RSD%) de répétabilité et reproductibilité

Fidélité de la méthode (English : Precision)

Les valeurs limites acceptables des CV de répétabilité et reproductibilité dépendent des concentrations des solutions :

EXEMPLE

Selon la norme AOAC (2006) :

- 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: $CV_{\text{répétabilité}} \text{ lim} : 8\%$; $CV_{\text{reproductibilité}} \text{ lim} : 16\%$
- 0,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: $CV_{\text{répétabilité}} \text{ lim} : 6\%$; $CV_{\text{reproductibilité}} \text{ lim} : 12\%$

Valeurs caclulées :

	E- β -farnesene		β -caryophyllene	
Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.050	0.500	0.050	0.500
Repeatability (RSD, %)	1.16	0.70	0.43	0.12
Reproducibility (RSD, %)	3.00	2.82	0.89	0.81

Résumé de la validation classique pour le dosage du E-β-farnésène et du E-β-caryophyllène

	E-β-Farnesene		β-Caryophyllene		
Range (µg/µl)	0.008–0.100	0.080–1.000	0.008–0.100	0.080–1.000	
Equation of the calibration curve	$y = 0.9592x - 0.0028$	$y = 0.9558x + 0.0053$	$y = 0.8381x + 0.0030$	$y = 0.8408x + 0.0056$	
r^2	0.9998	0.9999	0.9998	0.9999	> 0.996
Reduced residual (Grubb's test)	2.668	1.866	2.147	1.880	< 2.75
Accuracy of calibration curves (%) ^a	99.19	99.86	99.77	99.90	90 < x < 110
Internal standard	Longifolene	Longifolene	Longifolene	Longifolene	
LOD (pg)	2.38	2.40	1.79	0.74	
LOQ (pg)	4.76	4.80	3.58	1.48	

Linearity

Trueness

^a Bias (%) between the measured value and the theoretical value.

Résumé de la validation classique pour le dosage du E- β -farnésène et du E- β -caryophyllène

Precision of the method

	E- β -Farnesene		β -Caryophyllene	
Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.050	0.500	0.050	0.500
Repeatability (RSD, %)	1.16	0.70	0.43	0.12
Reproducibility (RSD, %)	3.00	2.82	0.89	0.81

RSD % < 8%

RSD % < 6%

RSD % < 16%

RSD % < 12%

Conclusions

- Critères de validation traités 1 par 1 → pas de vision globale
- Quelle décision prendre si 1 ou plusieurs critères ne sont pas validés?

→ Besoin d'une démarche harmonisée et prise de décision globale

Validation par profil d'exactitude

Concept d'erreur totale

Heuskin et al. (2010), J. Pharmaceutical Biomedical Analysis, 53: 962-972:

« *Validation of a fast gas chromatographic method for the study of semiochemical slow release formulations* »

Illustration : archers - cibles

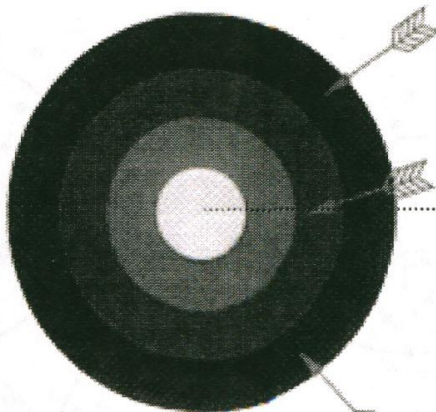
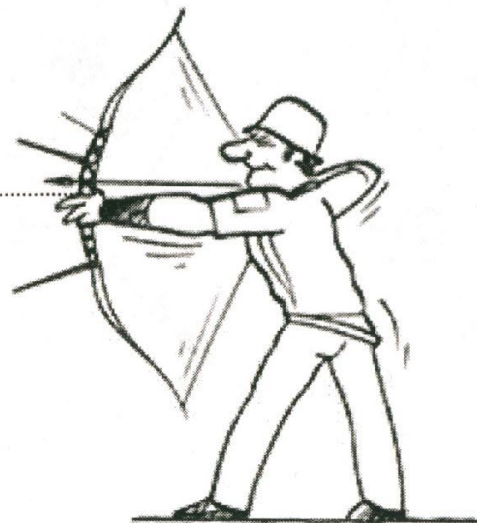
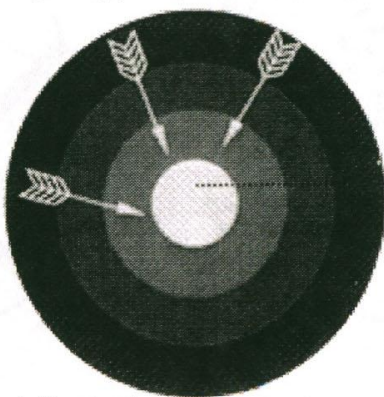


Illustration : archers - cibles

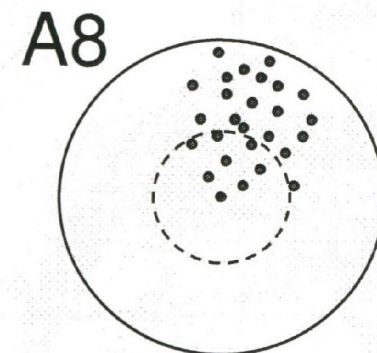
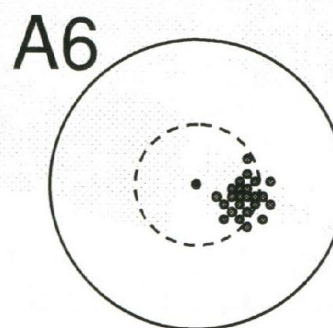
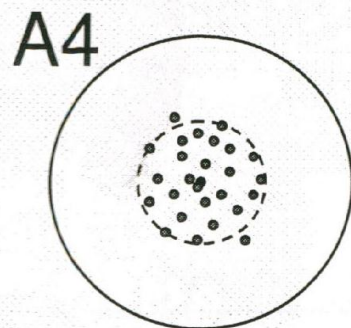
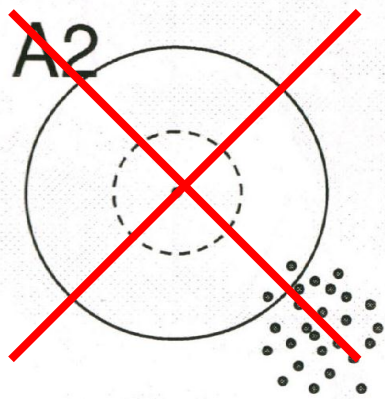
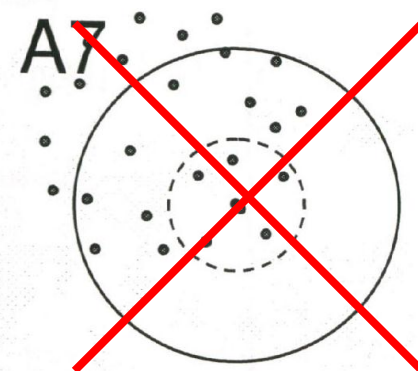
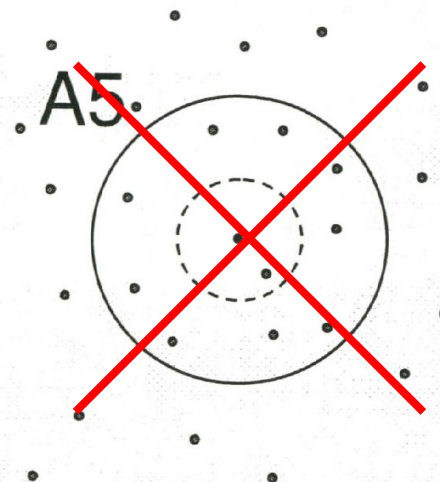
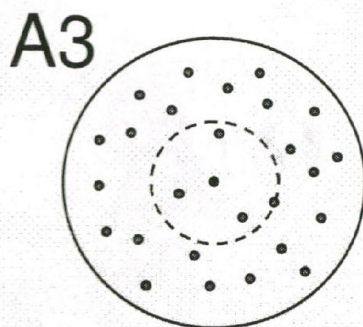
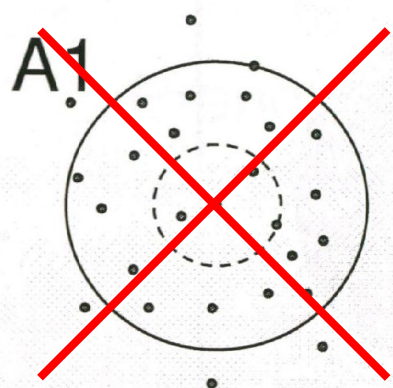
Objectifs pour gagner :

- avoir le plus de tirs dans la cible
- avoir une moyenne de tirs la plus proche du centre de la cible

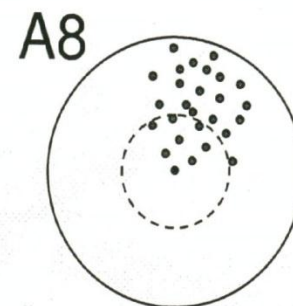
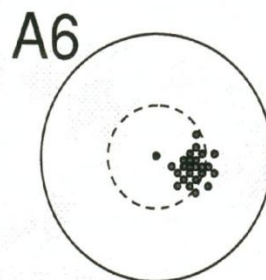
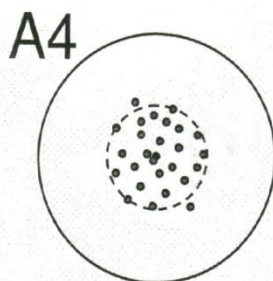
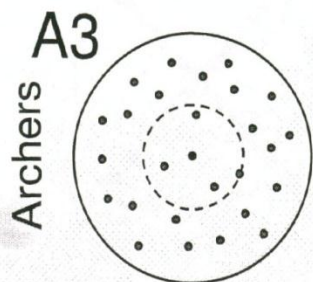
ET ...

- NE BLESSER PERSONNE

Quelle décision prendre?

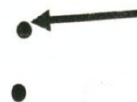


Quels risques?



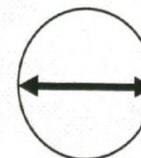
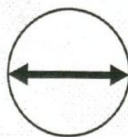
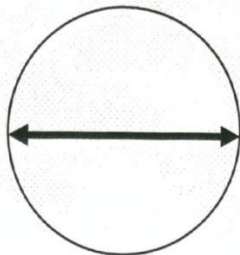
Justesse

Moyenne



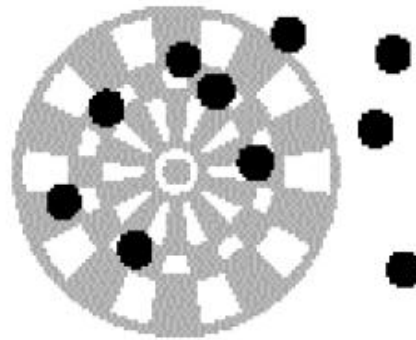
Fidélité

Variabilité

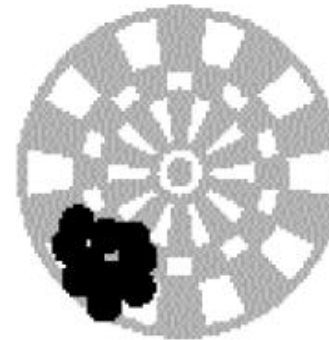


En résumé

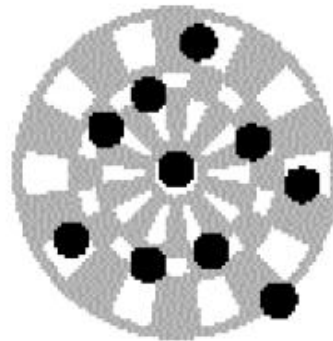
Non fidèle
non juste



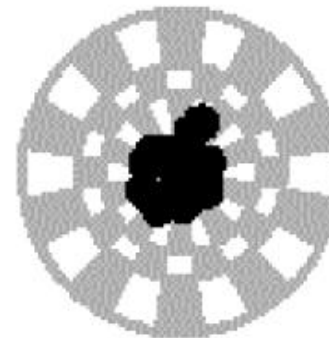
Fidèle
non juste



Non Fidèle
Peut être juste?



Fidèle
juste



Cible

Validation par profil d'exactitude

Guide de la Société Française des Sciences et Techniques
Pharmaceutiques (SFSTP)

«Accuracy profile » validation = total error concept

Exactitude = Justesse + Fidélité

Justesse (English : Trueness)

- Mesurée par le biais entre la valeur supposée « vraie » et la moyenne des résultats.
- La méthode est JUSTE si la moyenne des résultats est proche de la valeur « vraie ».
- Représente l'erreur systématique.

Justesse (English : Trueness)

Biais = Moyenne des résultats (M) - Valeur « vraie » (μ)

Biais relatif (%) = $((M-\mu)/\mu)*100$ = Recovery (%) -100

Recovery (%) = $(M/\mu)*100$

Fidélité (English : Precision)

- Mesure la dispersion des résultats par rapport à la moyenne.
- Est exprimée par le CV (RSD%) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essai indépendants) dans des conditions prescrites
- Représente **l'erreur aléatoire**.

Fidélité (English : Precision)

- La méthode est FIDELE si le coefficient de variation est proche de 0 %

- 3 niveaux :
 - * Répétabilité
 - * Fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)
 - * Reproductibilité (inter-laboratoire)

Répétabilité (English : Repeatability)

Résultats obtenus :

- au départ de prises d'essai indépendantes
- même méthode d'analyse
- même laboratoire
- même opérateur
- intervalle de temps court

Fidélité intermédiaire (English : Intermediate precision)

Résultats obtenus :

- au départ de prises d'essai indépendantes
- même méthode d'analyse
- même laboratoire
- différents opérateurs
- intervalle de temps donné (plusieurs jours non consécutifs)

Reproductibilité (English : Reproducibility)

Résultats obtenus :

- au départ de prises d'essai indépendantes
- même méthode d'analyse
- différents laboratoires
- différents opérateurs
- intervalle de temps donné (plusieurs jours non consécutifs)
- différents équipements

Exactitude (English : Accuracy)

- Mesure l'écart des résultats par rapport à la valeur « vraie »
- Combinaison de la Justesse et de la Fidélité
- Représente **l'erreur totale**

Erreur totale = Biais + Ecart-type

Erreur totale = Erreur systématique + Erreur aléatoire

Exactitude = Justesse + Fidélité

Exactitude (English : Accuracy)

Remarques :

- *Ce n'est pas parce qu'on a une méthode fidèle et juste qu'elle est d'office exacte. Il faut donc vérifier l'exactitude au final.*
- *Dans de nombreuses normes, il existe une confusion entre exactitude et justesse.*

Exactitude (English : Accuracy)

Limites d'acceptation (λ) :

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur de référence et la valeur trouvée

$$x_i = \mu_T + \text{Justesse} + \text{Fidélité}$$

$$x_i - \mu_T = \text{Justesse} + \text{Fidélité}$$

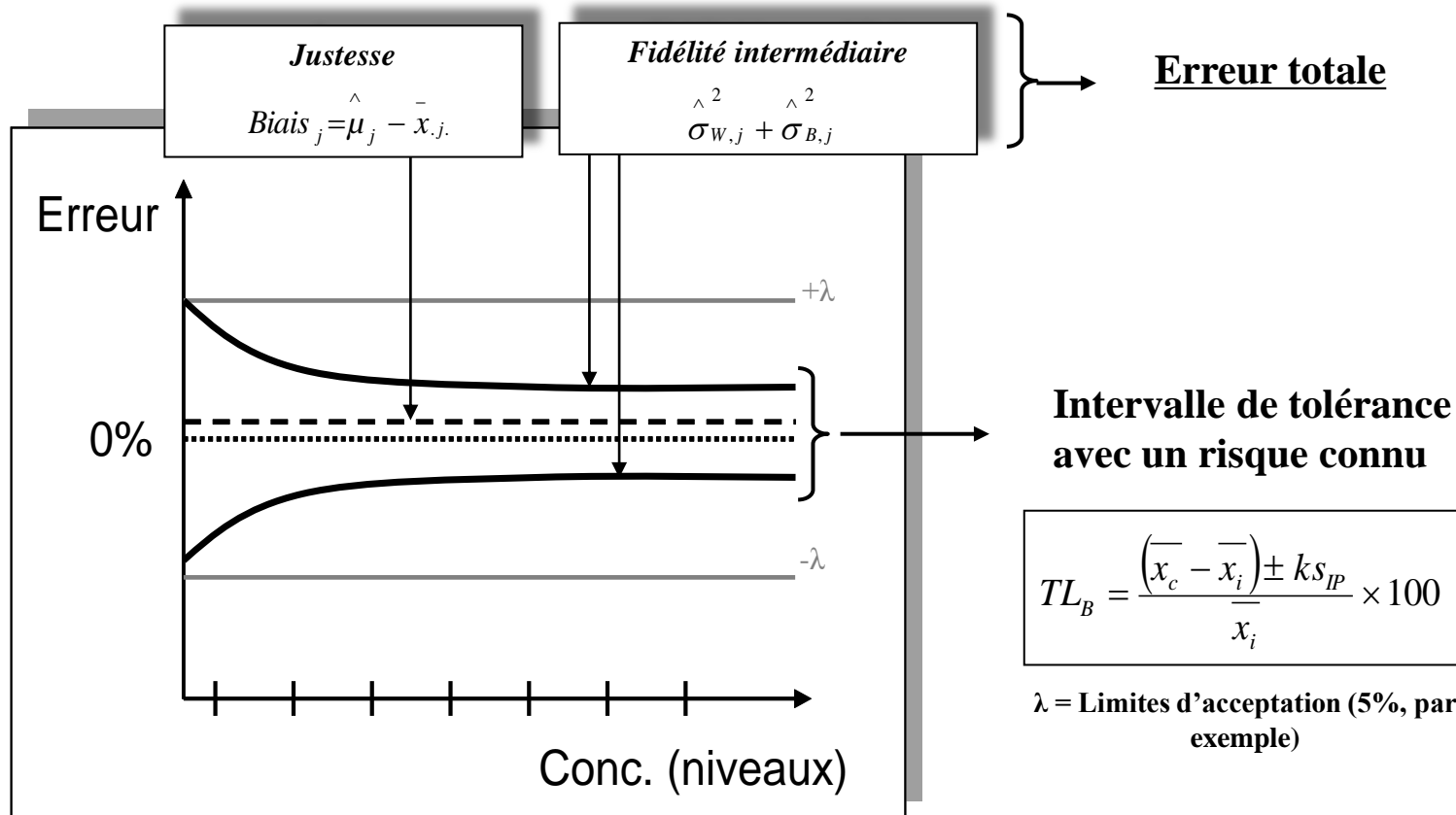
$$x_i - \mu_T = \text{Exactitude (ISO)}$$

$$x_i - \mu_T = \text{Erreur totale}$$

$$| x_i - \mu_T | < \lambda \leftrightarrow \text{Erreur totale} < \lambda$$

λ = limite d'acceptation (ex : $\pm 5\%$)

Profil d'exactitude



En pratique

1. Calibration : établissement d'une fonction de réponse avec des standards de calibration

- 3 concentrations
- 3 répétitions de préparation
- X 3 séries (série = jours différents et/ou opérateurs différents)

Table 2

Levels of calibration standards for E- β -farnesene and β -caryophyllene.

Level	Concentration of E- β -farnesene (ng μ l ⁻¹)	Concentration of β -caryophyllene (ng μ l ⁻¹)	Concentration of I.S. (ng μ l ⁻¹)
1	25.5	24.9	102.6
2	509.8	499.6	102.6
3	1019.7	999.2	102.6
Total	9 samples/series (day)/compound		

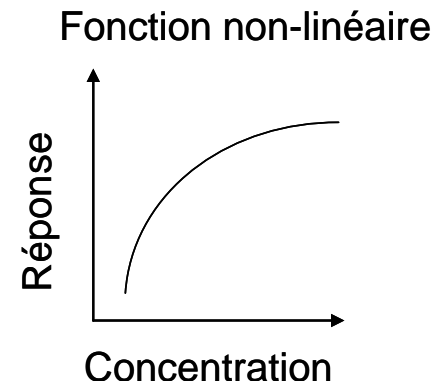
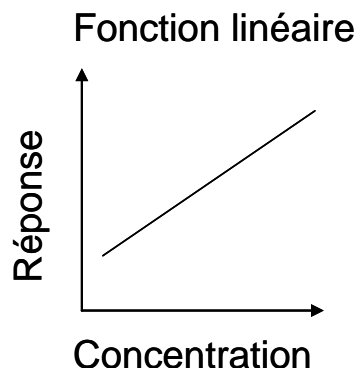
En pratique

La fonction de réponse = courbe de calibration = courbe (droite) d'étalonnage

(English : calibration curve)

« Traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal du détecteur, aire de pics, ratio d'aire si SI...) et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon. »

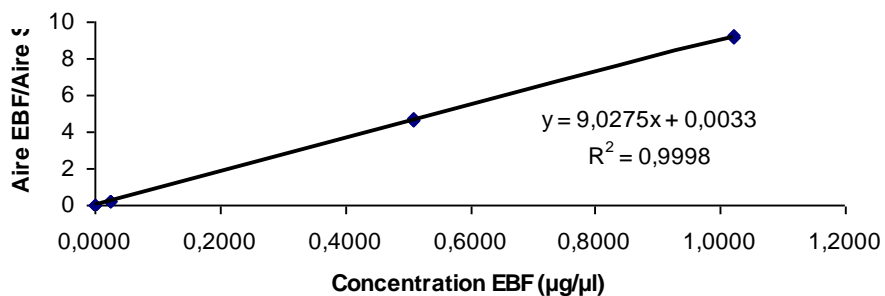
N'EST PAS OBLIGATOIREMENT UNE DROITE!!!



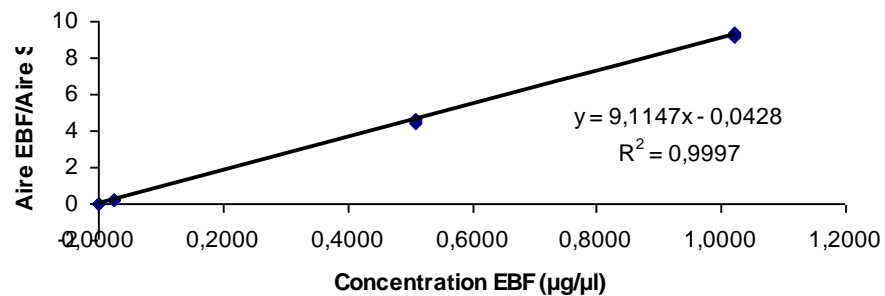
En pratique

1. Calibration

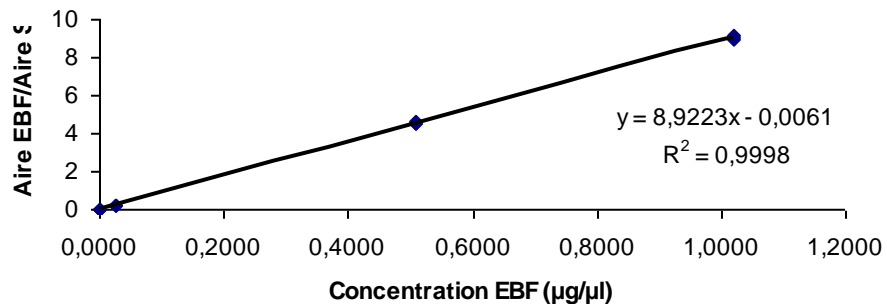
Courbe calibration série 1



Courbe calibration série 2



Courbe calibration série 3



En pratique

2. Validation : préparation de standards de validation , traités comme des échantillons inconnus

- 5 concentrations
- 3 répétitions de préparation
- X 3 séries (série = jours différents et/ou opérateurs différents)

➔ *Estimation de la fidélité et de la justesse à partir des valeurs retrouvées pour les standards de validation*

En pratique

2. Validation

Table 3
Levels of validation standards for E- β -farnesene and β -caryophyllene.

Level	Concentration of E- β -farnesene (ng μ l ⁻¹)	Concentration of β -caryophyllene (ng μ l ⁻¹)	Concentration of I.S. (ng μ l ⁻¹)
1	81.6	80.5	102.6
2	163.2	160.9	102.6
3	367.1	362.1	102.6
4	734.2	724.2	102.6
5	1019.7	1005.8	102.6
Total	15 samples/series (day)/compound		

En pratique

2. Validation : analyse des standards de validation au GC Ultra Fast

Q EBF théorique (µg/µl)	AEBF/ASI 1	AEBF/ASI 2	AEBF/ASI 3
0,081575208	0,7185	0,6856	0,7776
0,081575208	0,8784	0,6768	0,6960
0,081575208	0,6980	0,7413	0,7248
0,163150416	1,5370	1,6171	1,5093
0,163150416	1,5180	1,4206	1,4822
0,163150416	1,5139	1,5323	1,4739
0,367088436	3,3403	3,3511	3,0834
0,367088436	3,2756	3,5538	3,3261
0,367088436	3,3105	3,3992	3,1653
0,734176872	6,5019	6,9465	6,5449
0,734176872	6,4680	6,8665	6,4993
0,734176872	6,5774	6,9014	6,4145
1,0196901	8,9955	9,2343	9,0155
1,0196901	8,9636	9,2293	9,0648
1,0196901	9,0526	9,4987	8,9936

En pratique

2. Validation :

« Backcalculation » →

recalculer les concentrations
des standards de validation
via les équations des courbes
d'étalonnage, pour chaque
série.

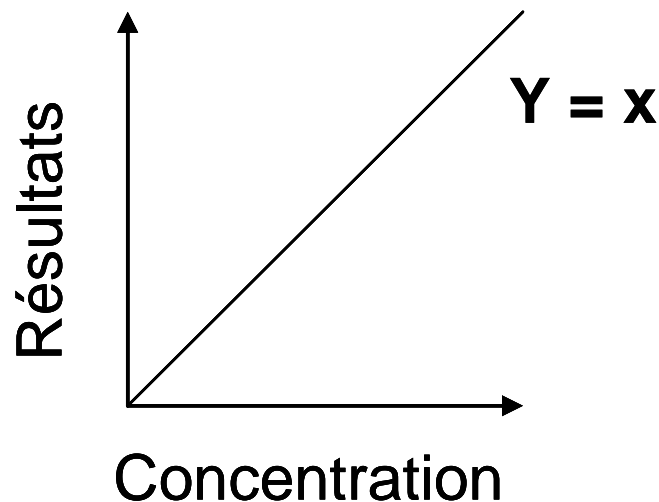
Q EBF théorique ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	QEBF calculée 1 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	QEBF calculée 2 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Q EBF calculée 3 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
0,081575208	0,079217375	0,079913937	0,08784563
0,081575208	0,096929208	0,078946303	0,07869855
0,081575208	0,076946295	0,086021966	0,081929589
0,163150416	0,169885925	0,182105256	0,169854507
0,163150416	0,167777673	0,160550249	0,166817778
0,163150416	0,167331114	0,172805144	0,165885696
0,367088436	0,369643141	0,372351622	0,346274619
0,367088436	0,362477927	0,394591246	0,373479615
0,367088436	0,366344965	0,377631546	0,355456307
0,734176872	0,719863363	0,76682007	0,734234543
0,734176872	0,716110926	0,758040239	0,729120291
0,734176872	0,728224501	0,761874217	0,719623208
1,0196901	0,996093472	1,017819101	1,011140212
1,0196901	0,992557298	1,017271141	1,016660269
1,0196901	1,00241335	1,046828807	1,008686

→ Linéarité

En pratique

3. La linéarité de la méthode d'analyse : (>< linéarité du modèle de régression de la courbe de calibration)

« Capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance présente dans l'échantillon. »



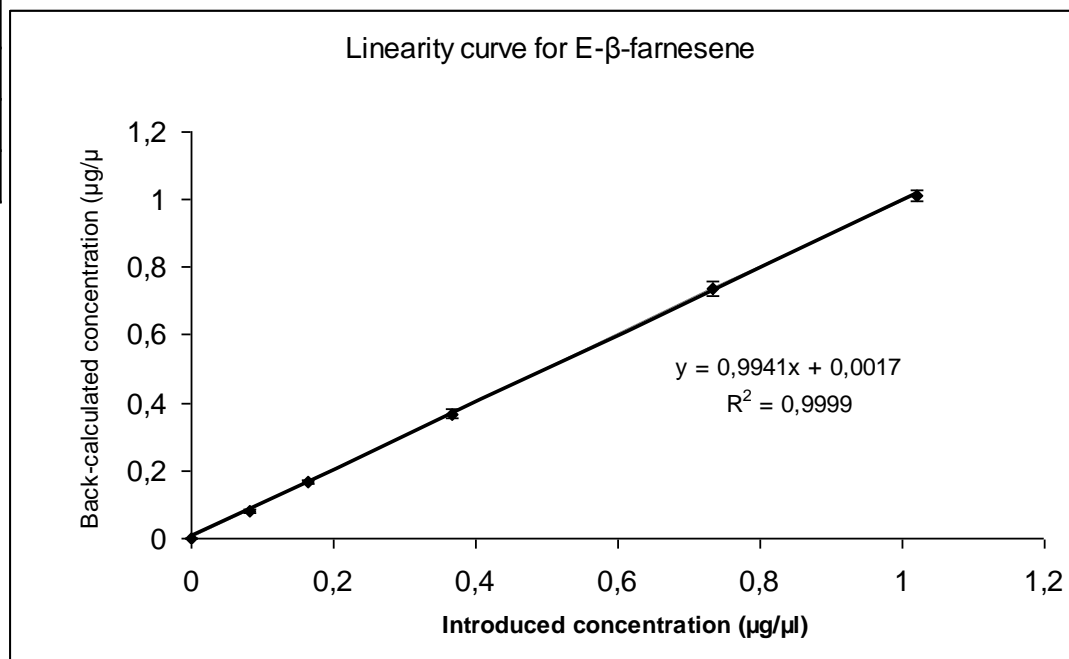
Concentration = quantité introduite (quantité pesée) dans la solution de référence : « theoretical concentration »

Résultats = quantité mesurée par la courbe de calibration (fonction de réponse) : « back-calculated concentration »

En pratique

3. La linéarité de la méthode d'analyse :

Q EBF théorique (µg/µl)	Moyenne générale QEBF caclulée (µg/µl)	SD (µg/µl)
0,00101969	-0,000281125	0,002313014
0,081575208	0,081177996	0,006355722
0,163150416	0,167652643	0,005888867
0,367088436	0,367546049	0,013737498
0,734176872	0,736789066	0,019777766
1,0196901	1,012514105	0,015932799



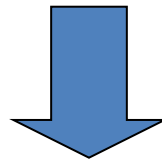
En pratique

4. **Justesse** : sur base des valeurs des concentrations re-calculées

→ Calcul du biais absolu ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et du biais relatif (%)

Biais absolu = Moyenne Q « backcalculated » - Q théorique

Biais relatif = (Biais absolu / Q théorique)*100



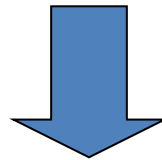
Erreur systématique

En pratique

5. **Fidélité** : sur base des valeurs des concentrations re-calculées

→ Calcul des CV (%) de répétabilité et de fidélité intermédiaire

- déterminer la variance des résultats par série et entre séries
- déterminer les écarts-types
- déterminer les CV (%)



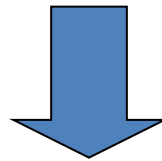
Erreur aléatoire

En pratique

6. **Exactitude** : sur base des valeurs des concentrations re-calculées

- Tient compte du biais relatif (%) (erreur systématique – justesse) et des CV (%) (erreur aléatoire – fidélité)
- Fait intervenir la notion de risque d'erreur (risque β 5%)

➔ Calcul de limites de tolérance



Profil d'exactitude

Justesse

Biais relatif (%)

Erreur systématique

Fidélité

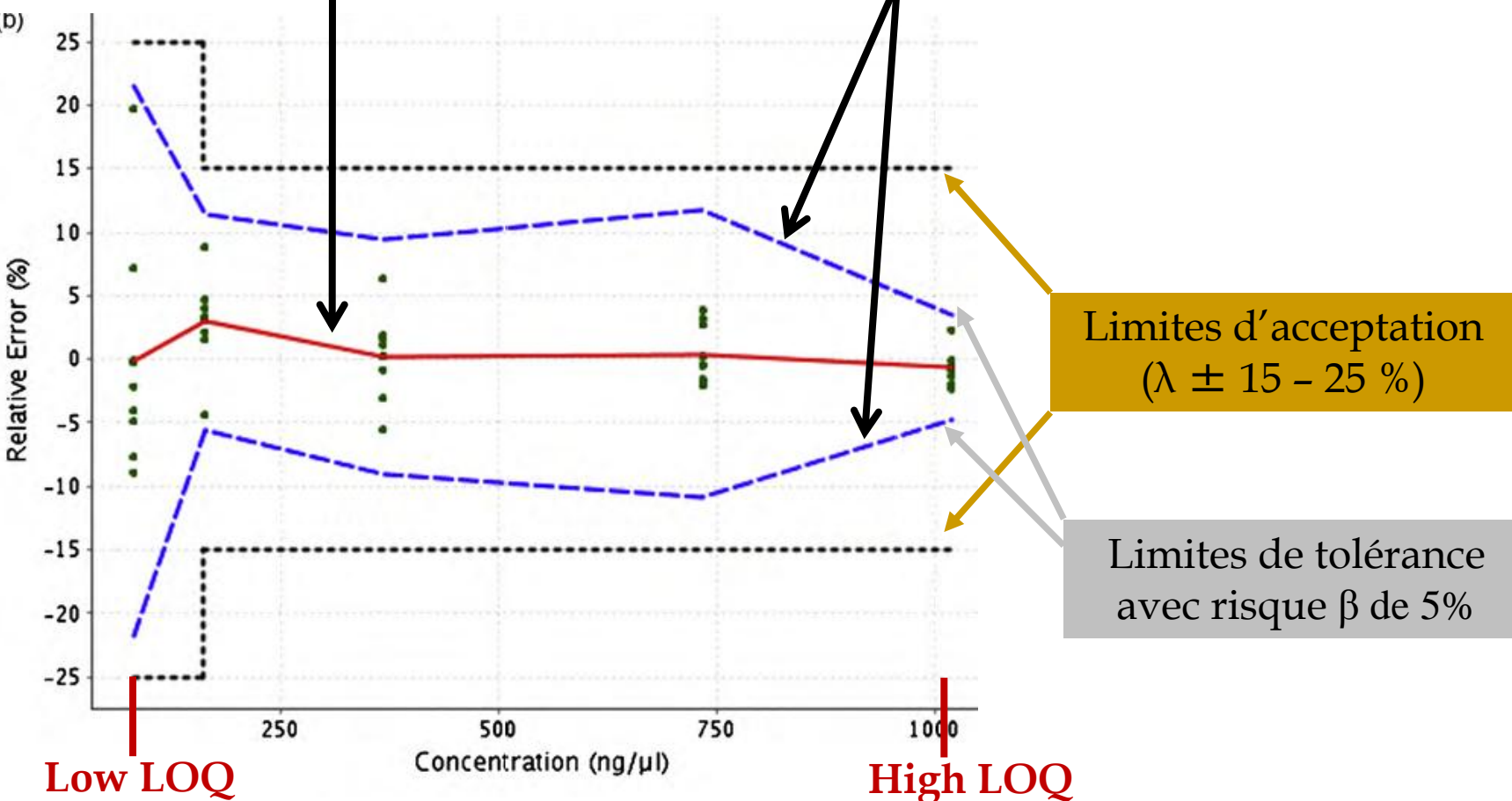
CV (%)

Erreur aléatoire

Exactitude

Erreur totale

D)



En pratique

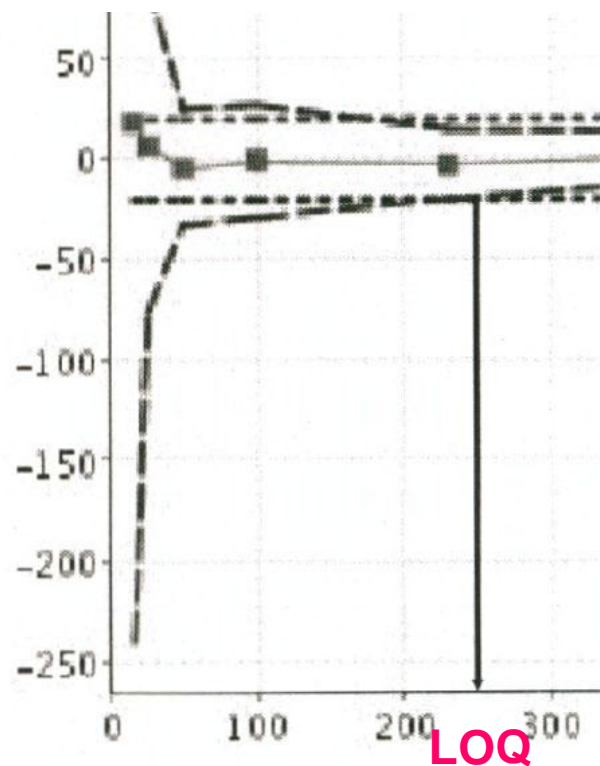
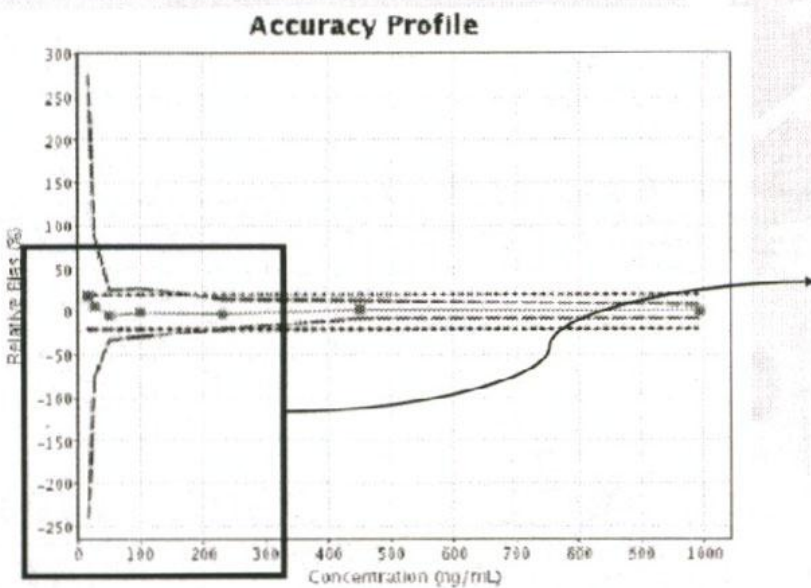
7. Limite de quantification :

plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude (justesse + fidélité) définie. La limite de quantification n'a de sens que si son exactitude a été démontrée.

En pratique

7. Limite de quantification :

Intersection des limites d'acceptation et des limites de tolérance



En pratique

Intervalle de dosage :

région entre les niveaux supérieurs et inférieurs (ces valeurs incluses) pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à sa fidélité, sa justesse, son exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

Purification des sémiochimiques

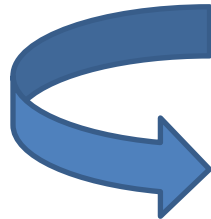
Fractionnement des huiles essentielles

Par chromatographie liquide sur colonne de silice

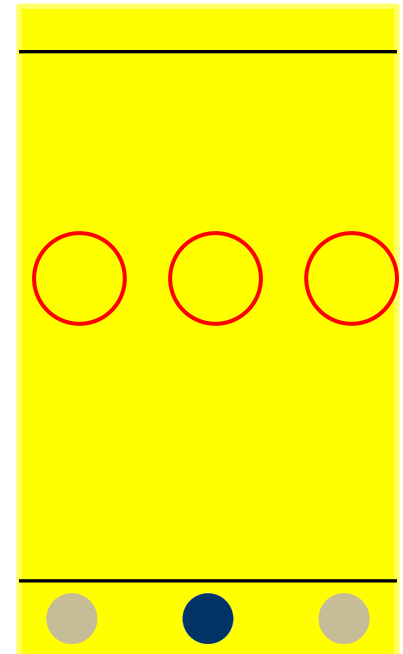
Tests préliminaires

Choix du solvant d'éluion

- sur CCM: meilleure séparation des composés
- Importance de la T° d'évaporation du solvant



N-pentane



Fractionnement des huiles essentielles

Par chromatographie liquide sur colonne de silice

Tests préliminaires

Chromatographie liquide sur colonne à petite échelle

1 ml huile essentielle déposé sur 11 g de silice déshydratée



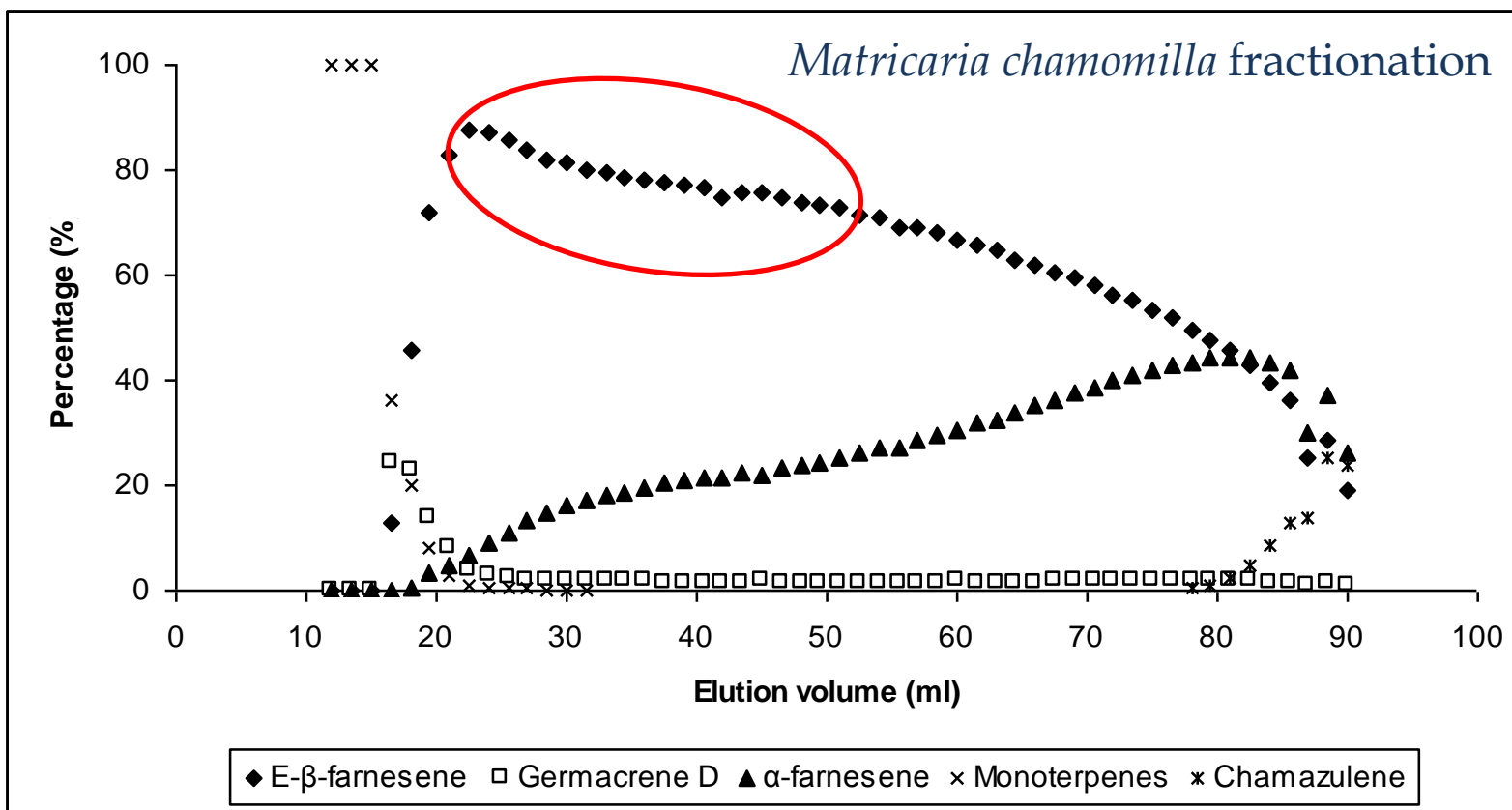
Elution au n-pentane



Collecte de fractions (1.5 ml)



Analyses au GC Fast



Elution volume (ml)	% EBF	% Germacrene D	% E,E-α-farnesene	% monoterpenes	% chamazulene
0 - 10,5 (F0)	0	0	0	0	0
10,5 - 16,5 (F1)	0	0	0	100	0
16,5 - 22,5 (F2)	0 - 82	7,8 - 26	3 - 5	47 - 2	0
22,5 - 51 (F3)	86,3 - 76	4 - 1,4	5,7 - 22	0	0
51 - 72 (F4)	72 - 56	1,4 - 1,6	22 - 33	0	0
72 - 90 (F5)	55 - 33	1,6	33 - 41	0	0,5 - 16

Fractionnement des huiles essentielles

Par chromatographie liquide sur colonne de silice

Tests préliminaires

Evaporation du solvant à 40°C: « recoveries » en *E*- β -farnesene

	Water bath	Büchi evaporator at atmospheric pressure	Büchi evaporator under vacuum
Mean	98.73 %	96.30 %	92.47 %
SD	0.35 %	0.94 %	3.43 %
RSD (%)	0.36 %	0.98 %	3.71 %

Compromis entre le recovery en composé et le temps d'évaporation du solvant

Fractionnement des huiles essentielles

Flash Chromatography

10 ml huile essentielle déposés sur 110 g de silice déshydratée



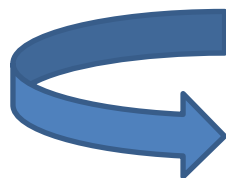
Elution au n-pentane sous pression ($N_2 = 0.5$ bar)



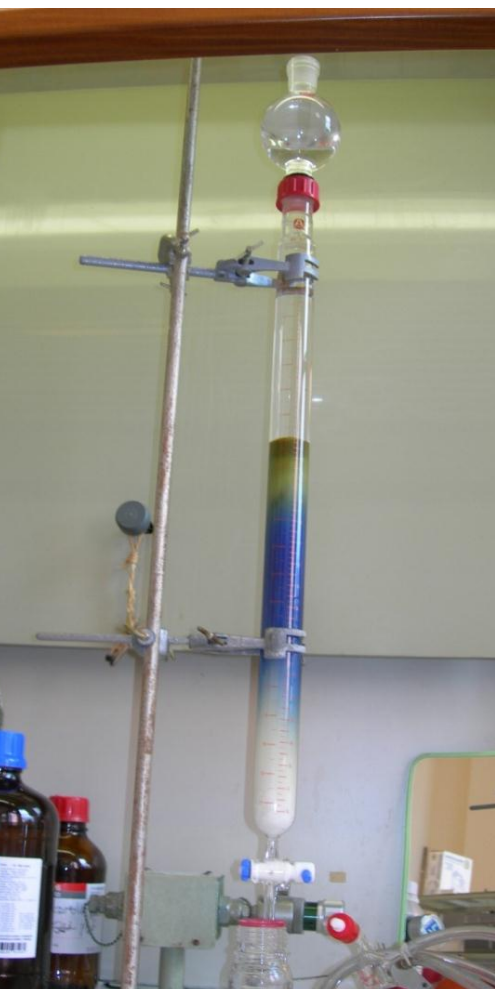
Collecte de fractions concentrées + évaporation du solvant



Analyses au GC Fast

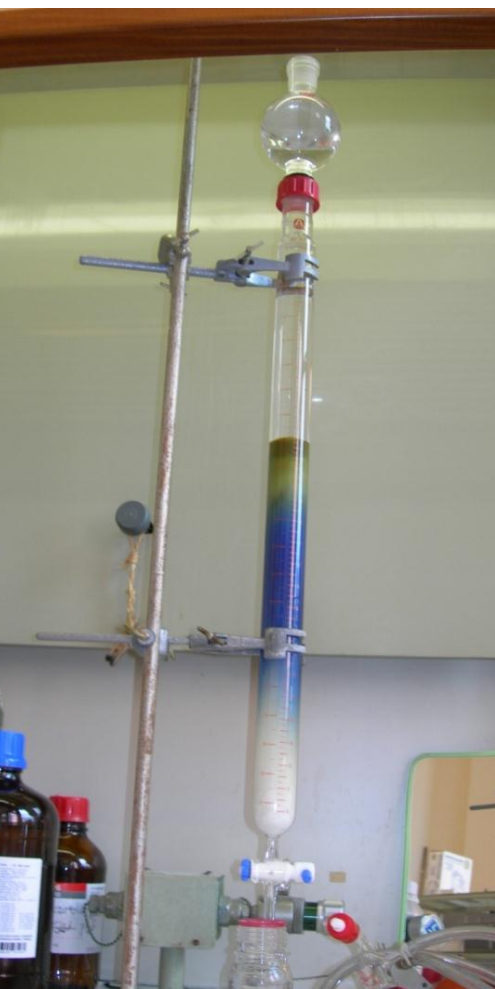


Sémiochimiques purifiés sans solvant



Fractionnement des huiles essentielles

Flash Chromatography



Matricaria chamomilla

Compounds	Purity
Sum of monoterpenes	1.3 %
E-β-farnesene	84.0 %
Germacrene D	1.4 %
Bicyclgermacrene	1.4 %
(E,E)- α -farnesene	11.9 %

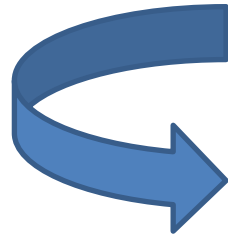
Nepeta cataria

Compounds	Purity
Sum of monoterpenes	1.5 %
β-caryophyllene	97.4 %
α -humulene	1.1 %

Formulation des sémiochimiques

Critères de la formulation

- Matrice naturelle et biodégradable
- Protection des sémiochimiques au cours du temps $><$ oxydation
- Taux de diffusion des sémiochimiques suffisant
- Attractive envers les prédateurs et parasitoïdes de pucerons



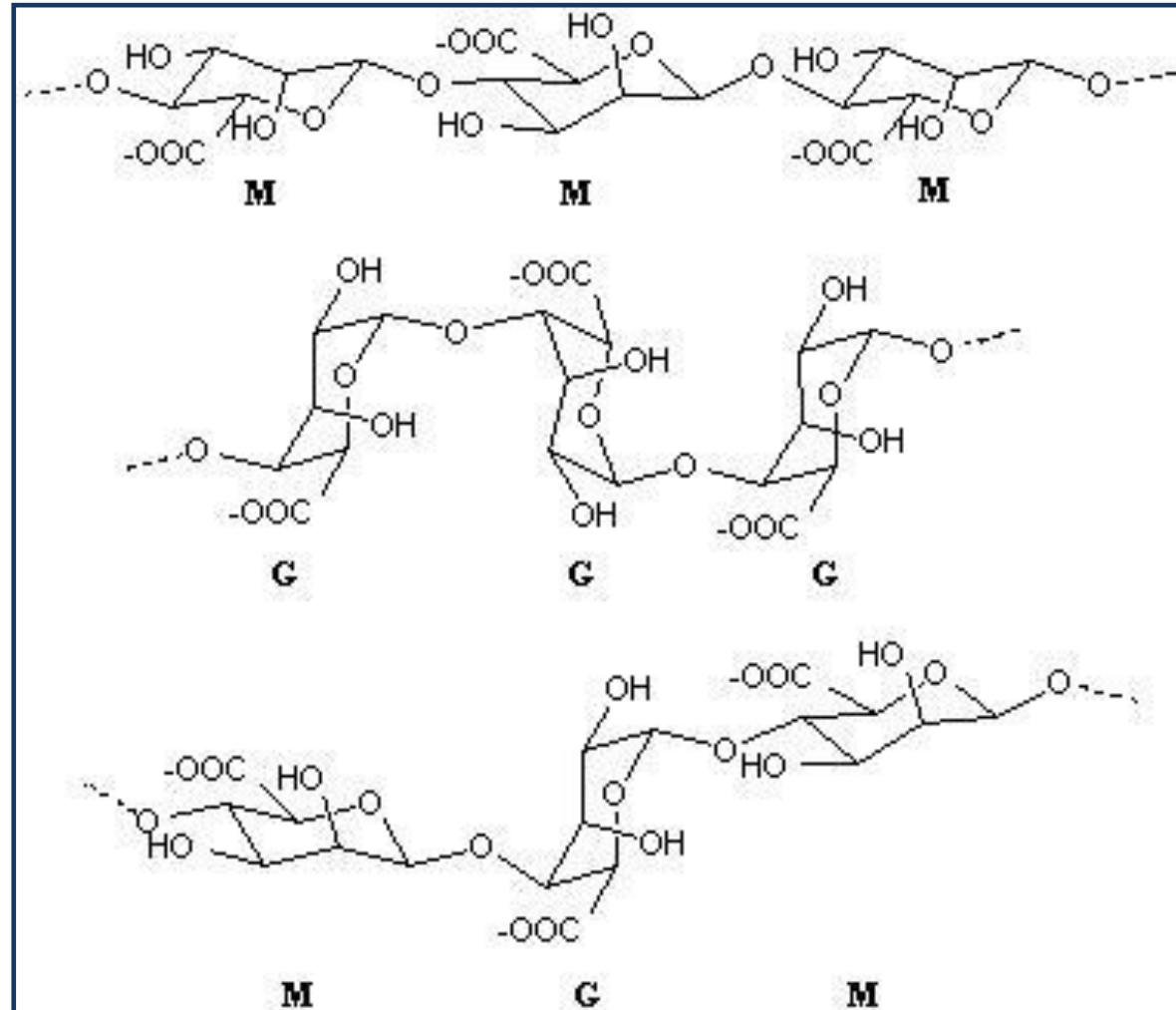
Billes d'alginate

Alginate

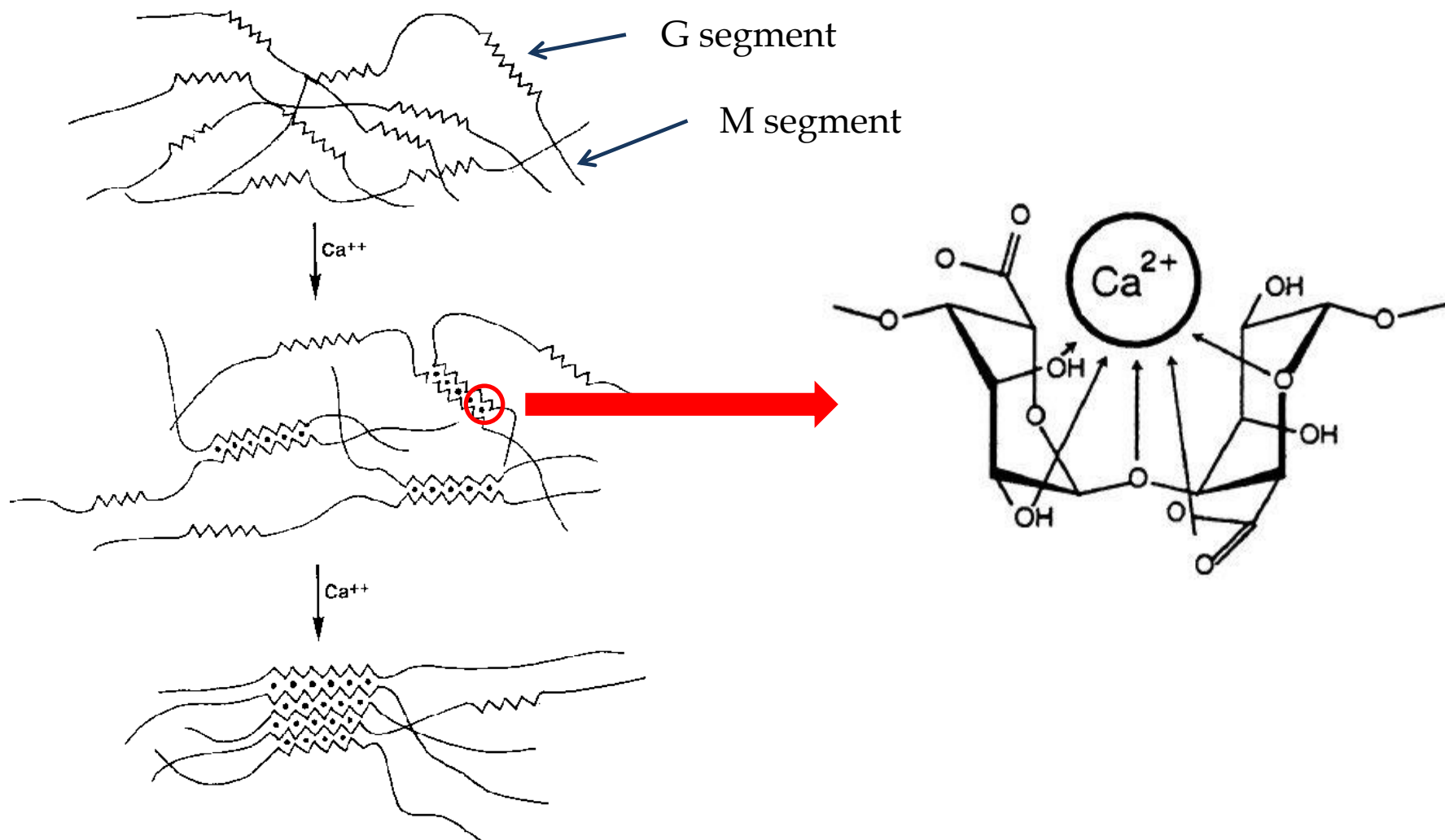
β -D-mannuronate (M)
 (Poly M segment)

α -L-guluronate (G)
 (Poly G segment)

Poly MG segment



Processus de gélification de l'alginate

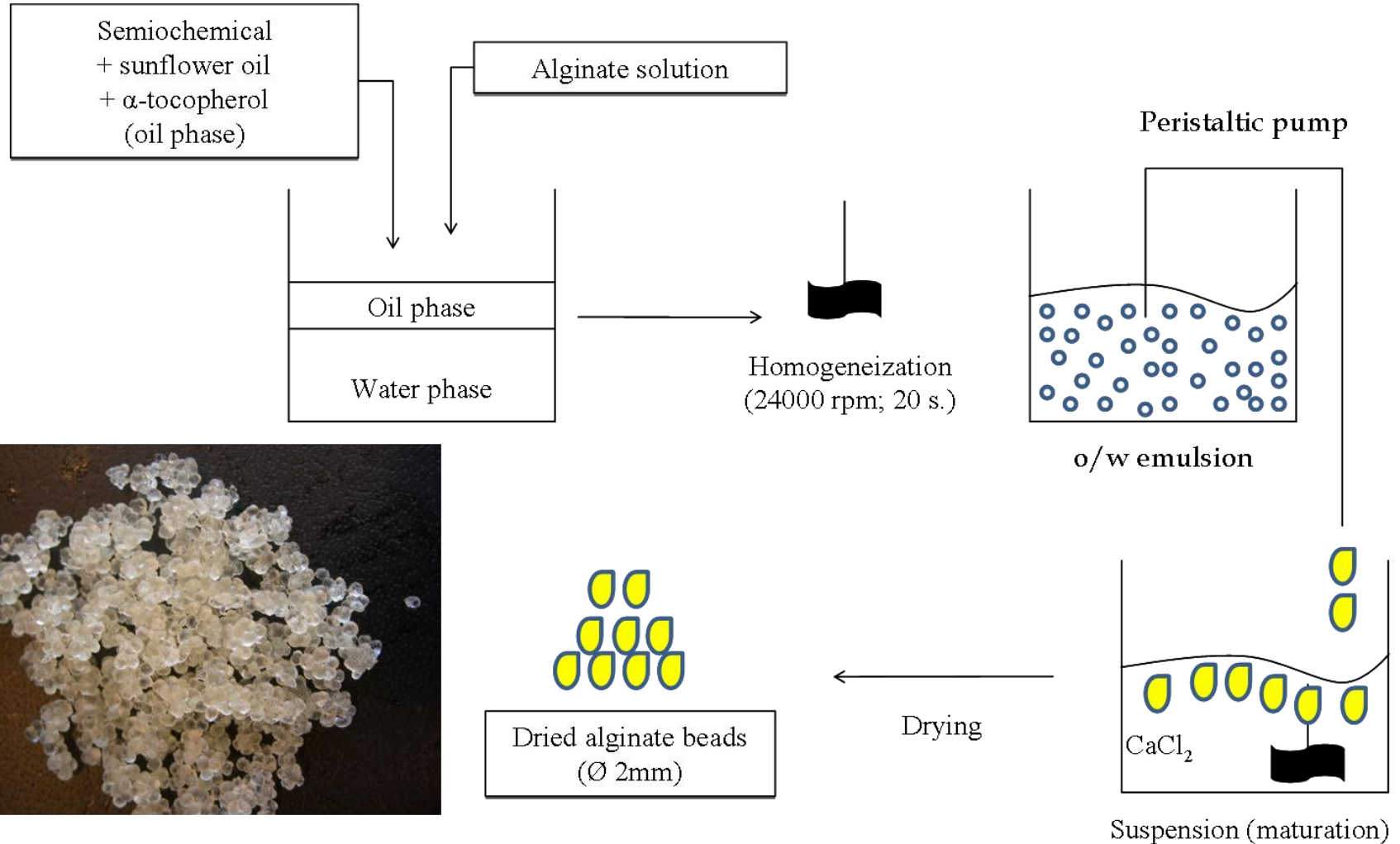


Formulation des billes d'alginate

Optimisation de la formulation en termes de capacité d'encapsulation des sémiochimiques et de texturométrie, en tenant compte :

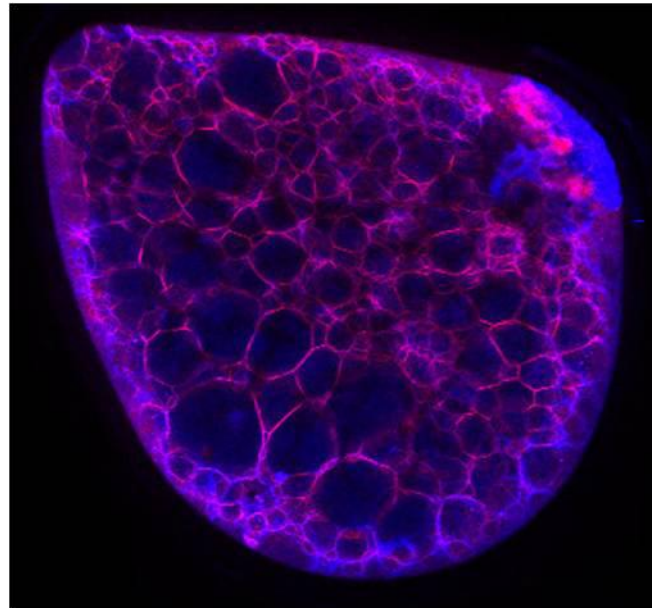
- du type d'alginate: M/G – masse molaire
- de la concentration en alginate : de 1% à 3% w/v dans eau
- du type d'ion de liaison : Ca^{2+} - Cu^{2+}
- de la concentration en ion de liaison : 0.05 M to 0.50 M
- du temps de maturation : 20 min – 48 h.

Formulation des billes d'alginate



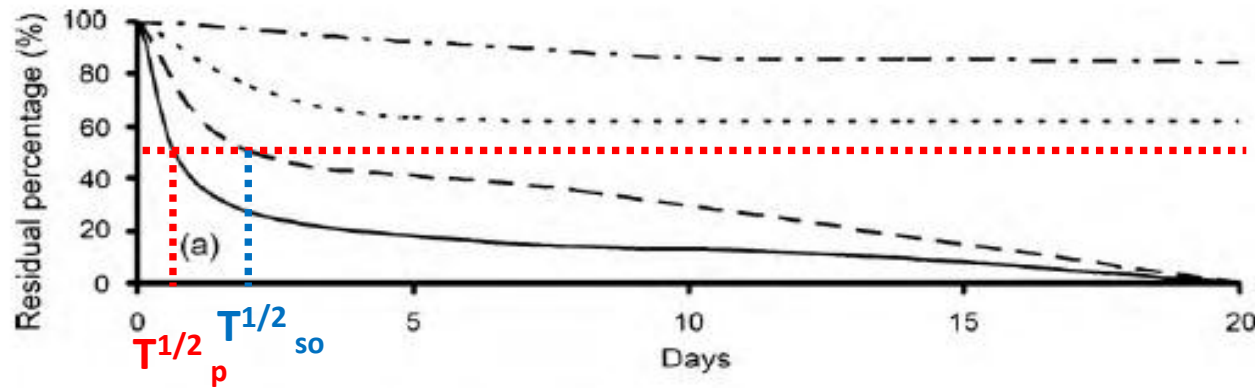
Caractérisation des billes d'alginate

Dispersion de la phase « sémiochimiques-huile » dans le réseau d'alginate

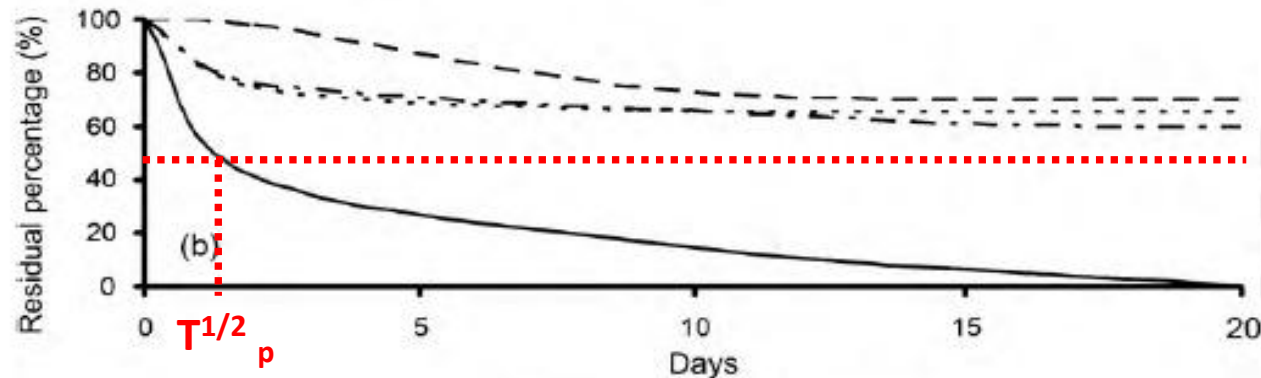


CLSM imaging of a dried ($A_w=0.42$) *E*- β -farnesene alginate bead

Effet protecteur des billes d'alginate envers les sesquiterpènes



E-β-farnésène



E-β-caryophyllène

- Alginate gel beads without alpha-tocopherol
- Alginate gel beads with alpha-tocopherol
- Sunflower oil formulation
- Purified compounds non formulated

Efficacité des formulations...

*... en termes de diffusion des
sémiochimiques*

Volatile Collection System

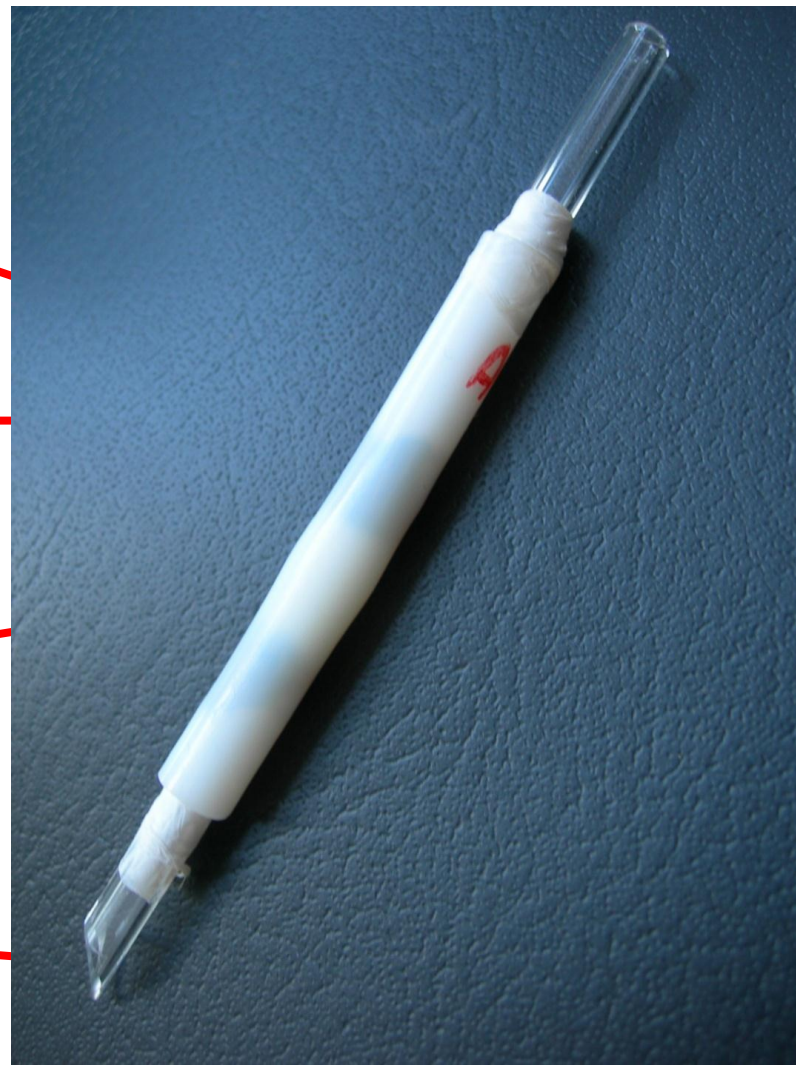
Filtre charbon actif

Cartouche d'adsorbent (HayeSep Q)

Elution au solvant + quantification par SI
(Fast GC)

Cuve en Téflon contenant les billes
d'alginate avec sémiochimiques

Pompe

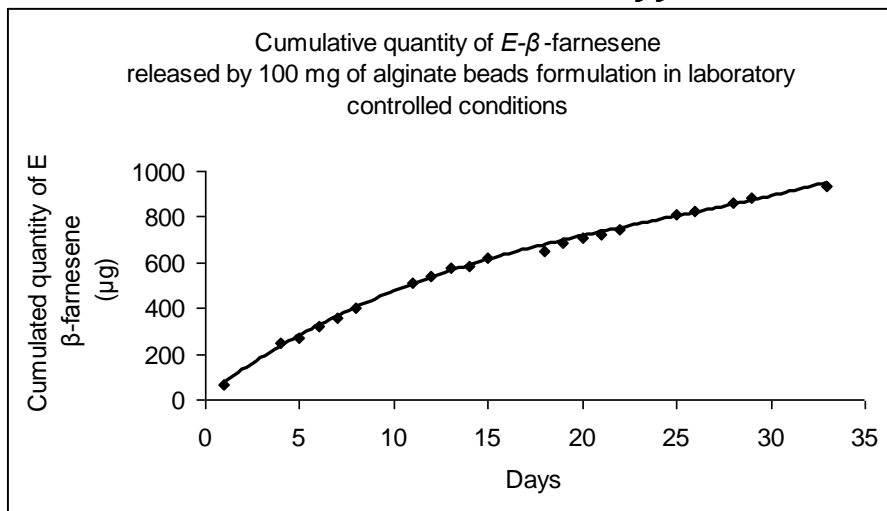


Volatile Collection System

Spécifications et performances optimisées

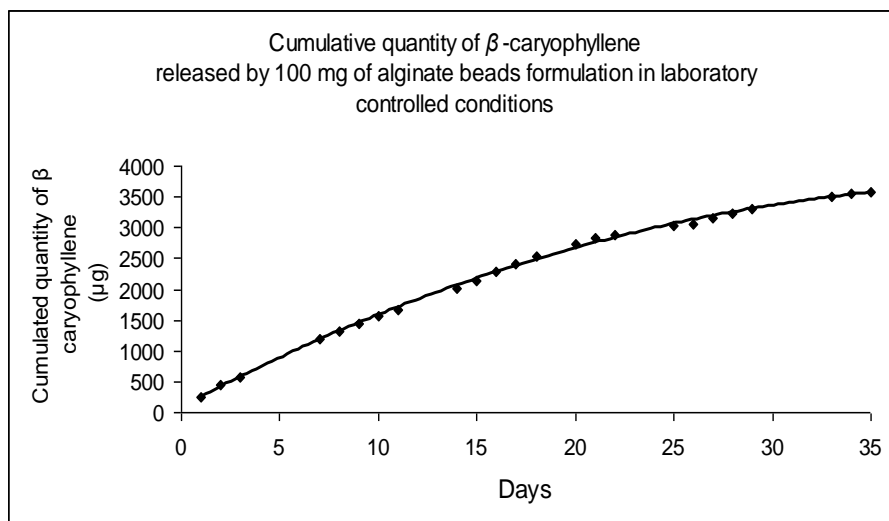
- Cuves et tuyaux en Teflon >< adsorption des sémiochimiques sur parois
- Filtres en charbon actif : purification de l'air entrant
- Cartouche de piégeage + cartouche de sécurité → « breakthrough » (percée)
- Volume total de solvant d'éluion : 4 x 250 µL n-hexane/cartouche
- Recovery moyen en sémiochimique lors de l'éluion : 94.5 % ± 4.2 %

Taux de diffusion des sémiochimiques



Conditions contrôlées :

- Température: 20°C
- Humidité relative : 65%
- Débit d'air : 0.5 L/min



Influence des facteurs abiotiques sur la diffusion

Température - Humidité relative - Débit d'air

Essais préliminaires

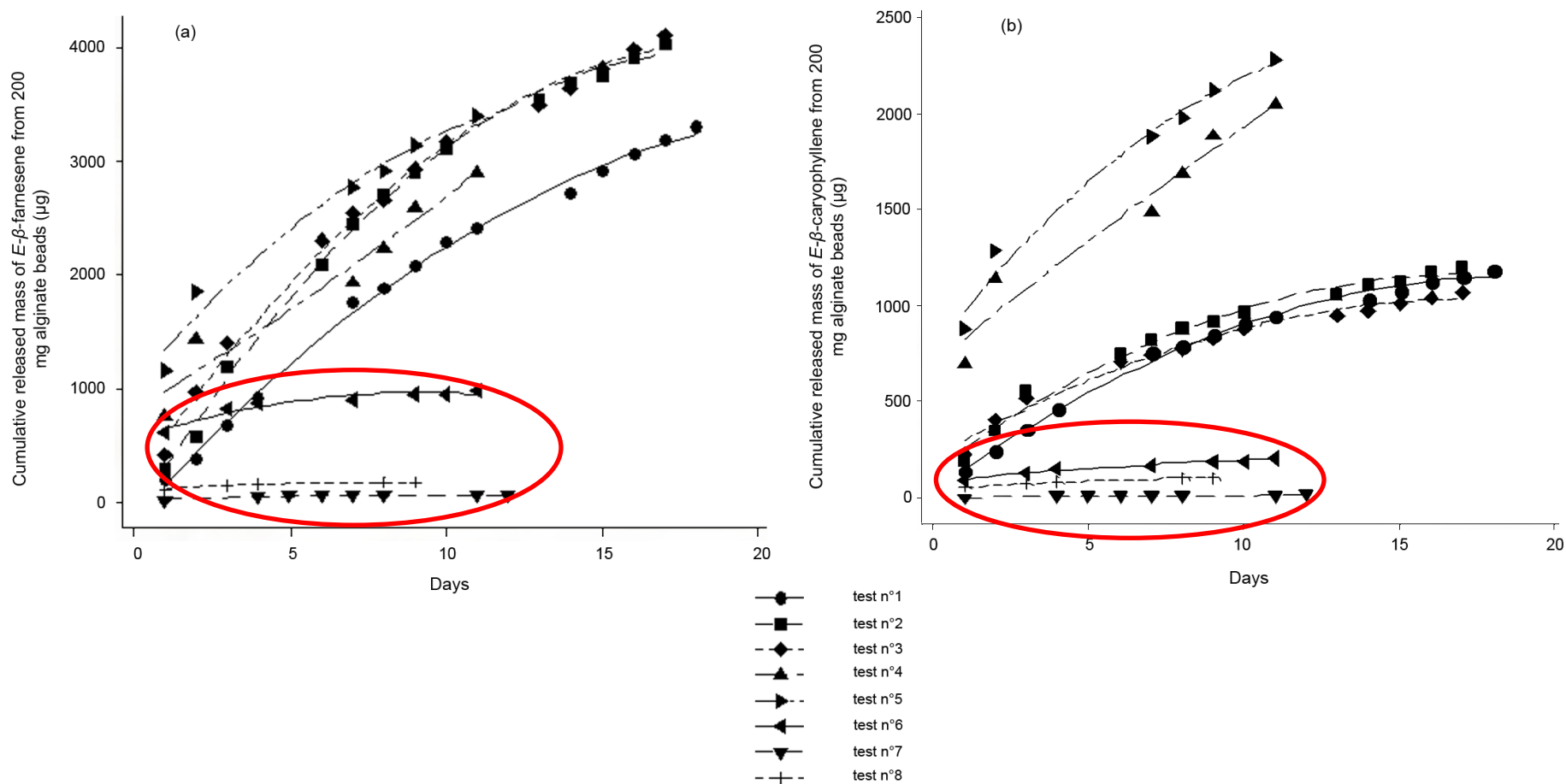
Experimental test	Relative humidity (%)	Airflow (L/min)	Temperature (°C)
N° 1	25	0.05	20
N° 2	25	0.50	20
N° 3	25	1.00	20
N° 4	75	0.50	20
N° 5	75	0.50	40
N° 6	85	0.50	20
N° 7	90	0.50	20
N° 8	100	0.50	20

Estimation du coefficient de diffusion des sémiochimiques

Diffusion in a sphere (Cranck, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-Dn^2\pi^2t / a^2)$$

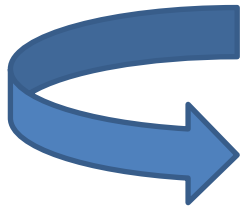
- M_t (μg): cumulative mass of semiochemical released at time t
- M_∞ (μg): cumulative mass of semiochemical released at time ∞ (supposed to be the total quantity of volatile in the bead at time $t=0$)
- a (m): radius of one bead
- t (s): diffusion time
- n : number of terms in the sum
- D (m^2/s): effective diffusion coefficient of semiochemical



Experimental test	Relative humidity (%)	Airflow (L/min)	Temperature (°C)	Diffusion coefficient for <i>E</i> - β -farnesene (m ² /s)	Diffusion coefficient for <i>E</i> - β -caryophyllene (m ² /s)
N° 1	25	0.05	20	$1.98 \cdot 10^{-14}$	$1.35 \cdot 10^{-15}$
N° 2	25	0.50	20	$3.40 \cdot 10^{-14}$	$1.57 \cdot 10^{-15}$
N° 3	25	1.00	20	$3.71 \cdot 10^{-14}$	$1.23 \cdot 10^{-15}$
N° 4	75	0.50	20	$1.23 \cdot 10^{-14}$	$7.39 \cdot 10^{-15}$
N° 5	75	0.50	40	$2.12 \cdot 10^{-14}$	$1.03 \cdot 10^{-14}$
N° 6	85	0.50	20	$1.56 \cdot 10^{-15}$	$1.33 \cdot 10^{-32}$
N° 7	90	0.50	20	$6.15 \cdot 10^{-33}$	$8.26 \cdot 10^{-33}$
N° 8	100	0.50	20	$1.03 \cdot 10^{-32}$	$9.93 \cdot 10^{-31}$

Influence des facteurs abiotiques sur la diffusion

- Facteur le plus limitant : humidité relative $\geq 85\%$
- Influence de la température
- Faible influence du débit d'air



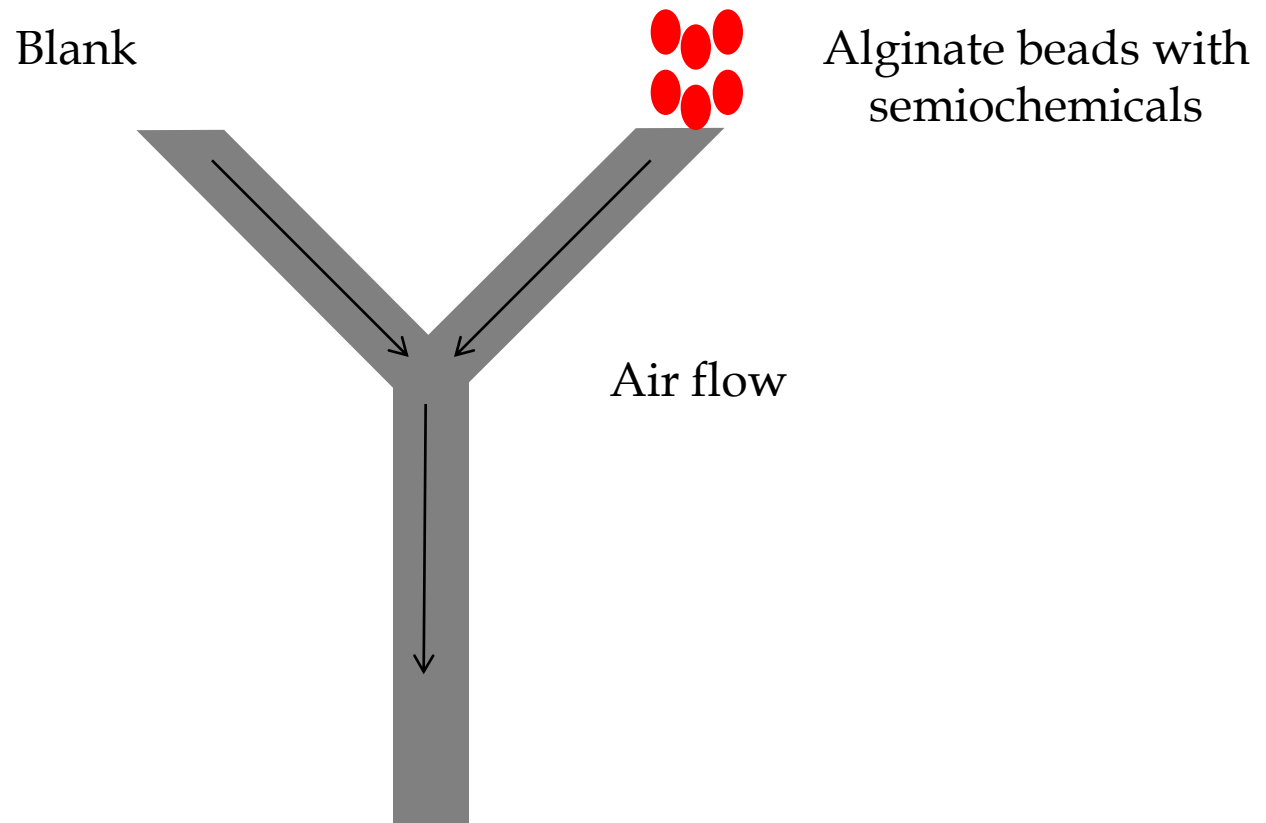
→ *Etude complémentaire : (TFE F. Daems)*

- *plan de Box-Behnken (3 facteurs – 3 niveaux)*
- *isothermes de sorption-désorption*
- *évolution du diamètre des billes avec A_w*

Efficacité des formulations...

*... en termes d'outil de contrôle
biologique*

Sur parasitoïdes (*Aphidius ervi*): olfactomètre à 2 voies

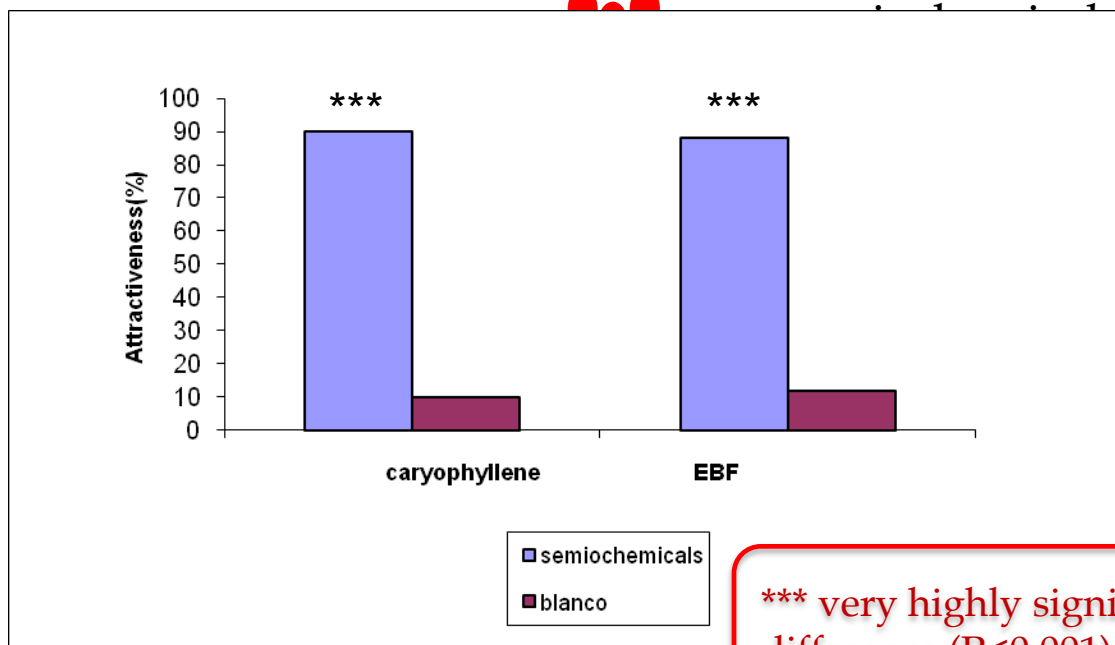


Sur parasitoïdes (*Aphidius ervi*): olfactomètre à 2 voies

Blank



Alginate beads with



*** very highly significant difference (P<0.001)



Sur Syrphidae: essais en champs

- 3 cultures : betteraves, féveroles, blé d'hiver
- E - β -farnésène, E - β -caryophyllène et blanco (billes sans sémiochimique)
- 1 carré latin par culture
- Essais de juin à août 2009

Sur Syrphidae: essais en champs



Test de Dunnett (95%) : comparaison de l'attraction entre billes avec sémiochimiques et blanco

- *E-β-Farnésène*: P-value = 0.0200 (< 0.05) * différence significative
- *E-β-Caryophyllène*: P-value = 0.0064 (< 0.01) ** différence hautement significative

Conclusions

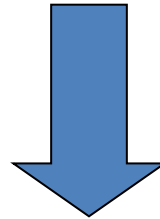
Conclusions

- Obtention de sesquiterpènes de haute pureté au départ d'huiles essentielles
- Méthode d'analyse rapide validée par 2 approches
- Formulation de sémiochimiques dans des billes d'alginate :
 - systèmes de contrôle biologique efficaces
 - protection des sesquiterpènes
 - systèmes à diffusion progressive des sémiochimiques

Conclusions

Optimisation de chaque étape d'un protocole

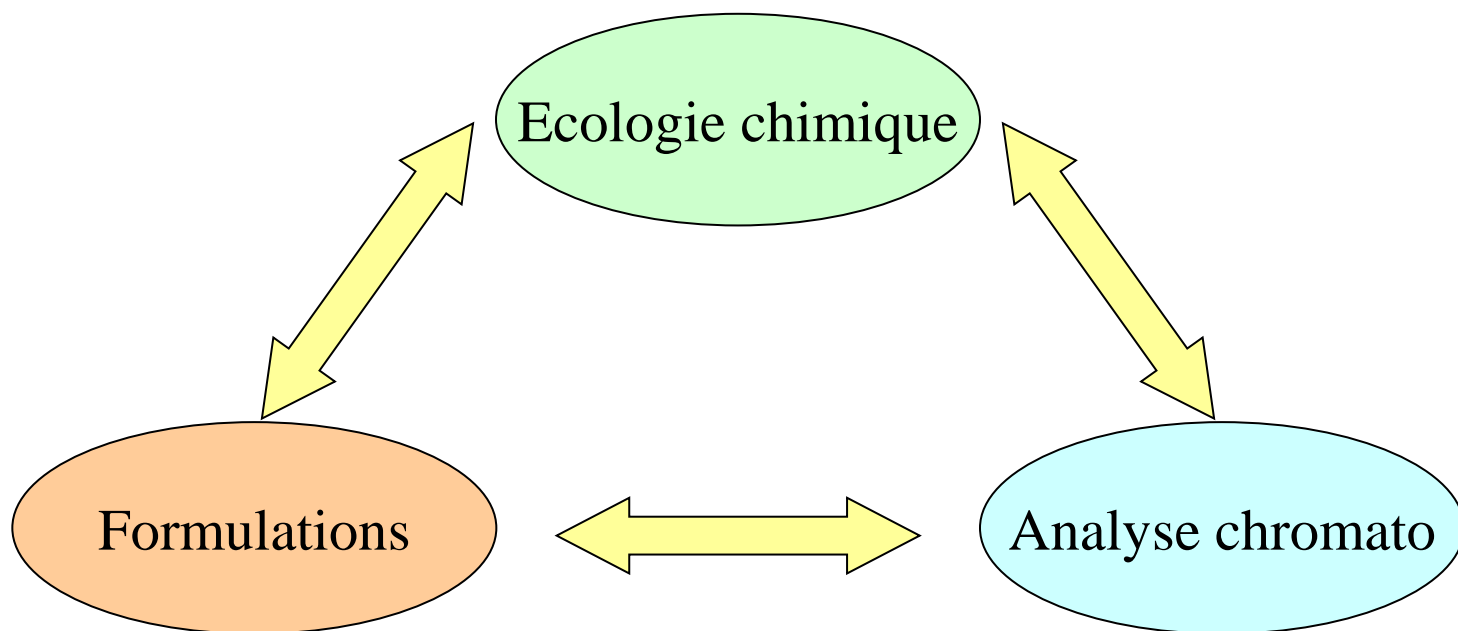
Validation analytique en référence à des normes



Résultats fiables et reproductibles

Conclusions

L'amélioration de la lutte biologique met en jeu plusieurs domaines indissociables en constante évolution



Merci de votre attention

Questions?