

# Etude chromatographique de substances volatiles : cas des sémiochimiques

Stéphanie Heuskin

UNITE de CHIMIE ANALYTIQUE  
Prof. Georges C. LOGNAY



# Sommaire

- ✓ **Introduction**
- ✓ **Les sémiochimiques**
- ✓ **Diffuseurs de sémiochimiques**
- ✓ **Etude du relargage**
- ✓ **Analyse chromatographique**
- ✓ **Un cas concret : SOLAPHID**
- ✓ **La validation analytique**
- ✓ **Conclusions**

# Introduction

# Introduction

- Pour palier à l'utilisation de pesticides contre les insectes ravageurs des cultures car :
  - néfastes pour l'environnement
  - apparition de résistances des ravageurs
  
- ➔ Développer des méthodes d'action naturelles :
  - ✓ **Lutte biologique**
  - ✓ **Lutte par confusion des mâles (mating disruption)**

# Introduction

- **Lutte biologique** : utilisation d'ennemis naturels des insectes nuisibles pour prévenir ou réduire les dégâts causés par ceux-ci
  - ➔ prédateurs, parasitoïdes
- **Lutte par confusion des mâles** : diffusion dans l'air de grandes quantités de phéromones dans le but de semer la confusion chez les mâles ➔ désorientation et moins de chance de localiser une femelle « appelante » (papillons)
  - ➔ **systèmes de diffusion de sémiochimiques**

# Les sémiochimiques

# Sémiochimiques

**Définition** : molécules naturelles produites par des organismes vivants et intervenant comme moyen de communication intra- ou interspécifique

(du grec *simeon* = signal)

→ molécules très diverses, volatiles ou non

→ Ici : étude des stimuli volatils émis par plantes et insectes

# Sémiochimiques



## Phéromones

- d'alarme
- sexuelles
- d'agrégation
- de piste

## Substances allélochimiques

- Allomones : + émetteur
- Kairomones : + récepteur
- Synomones : + émetteur, + récepteur



Une même substance peut intervenir à la fois dans des interactions intra- et interspécifiques (ex: E- $\beta$ -farnésène)



# Systeme tritrophique

## Cas du puceron

Plante



*Vicia fabae*

Insecte phytophage



*Megoura viciae*

Prédateur

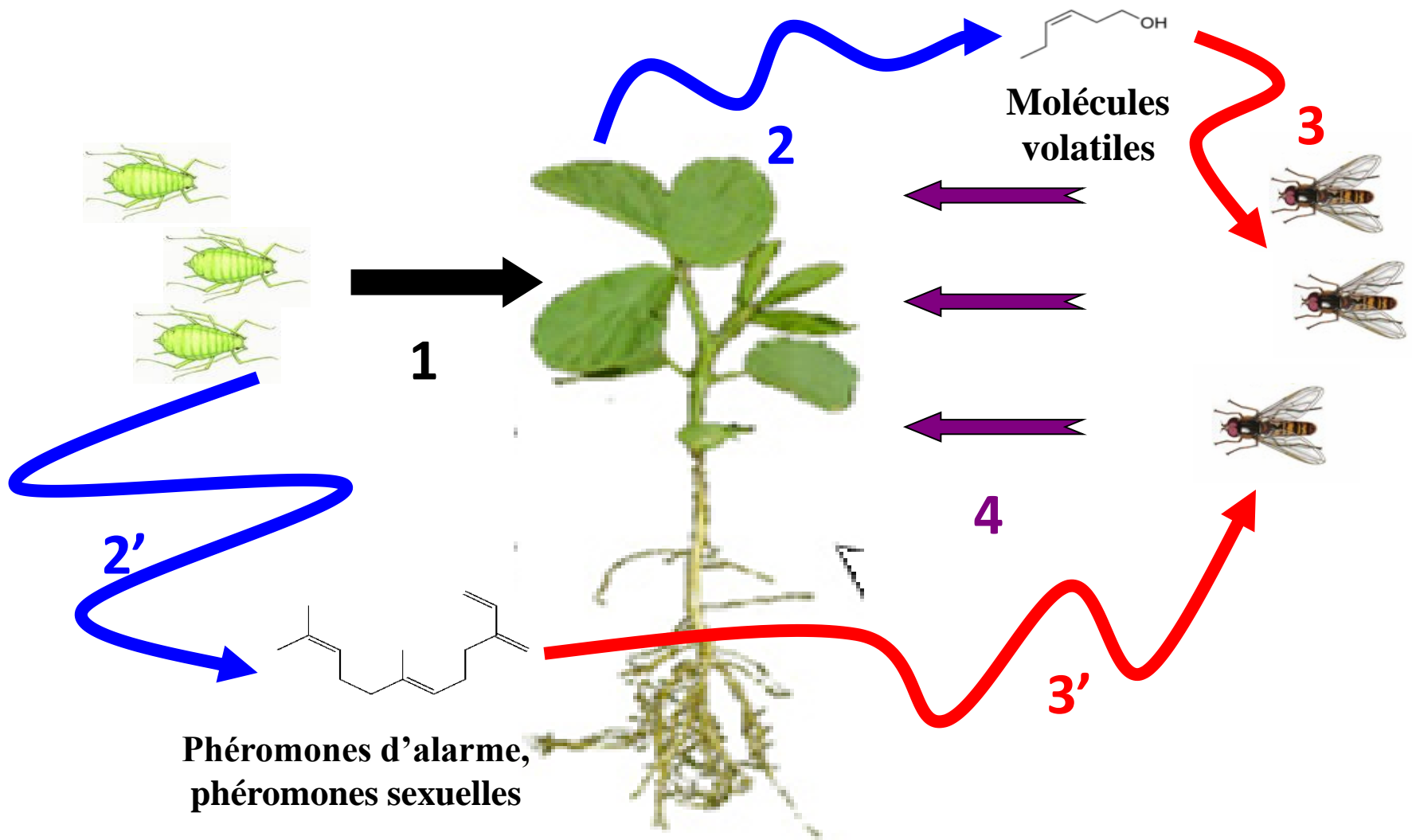
Parasitoïde



Larve d'*Episyrphus balteatus*



*Aphidius ervi*



# Sémiochimiques

## Les végétaux : réponses aux agressions

- **Défenses directes** : toxines, réducteurs de digestibilité...
- **Défenses indirectes** : composés organiques volatils
  - ➔ attraction des prédateurs et parasitoïdes des insectes herbivores

# COV végétaux

## ➤ **Terpènes et composés aromatiques :**

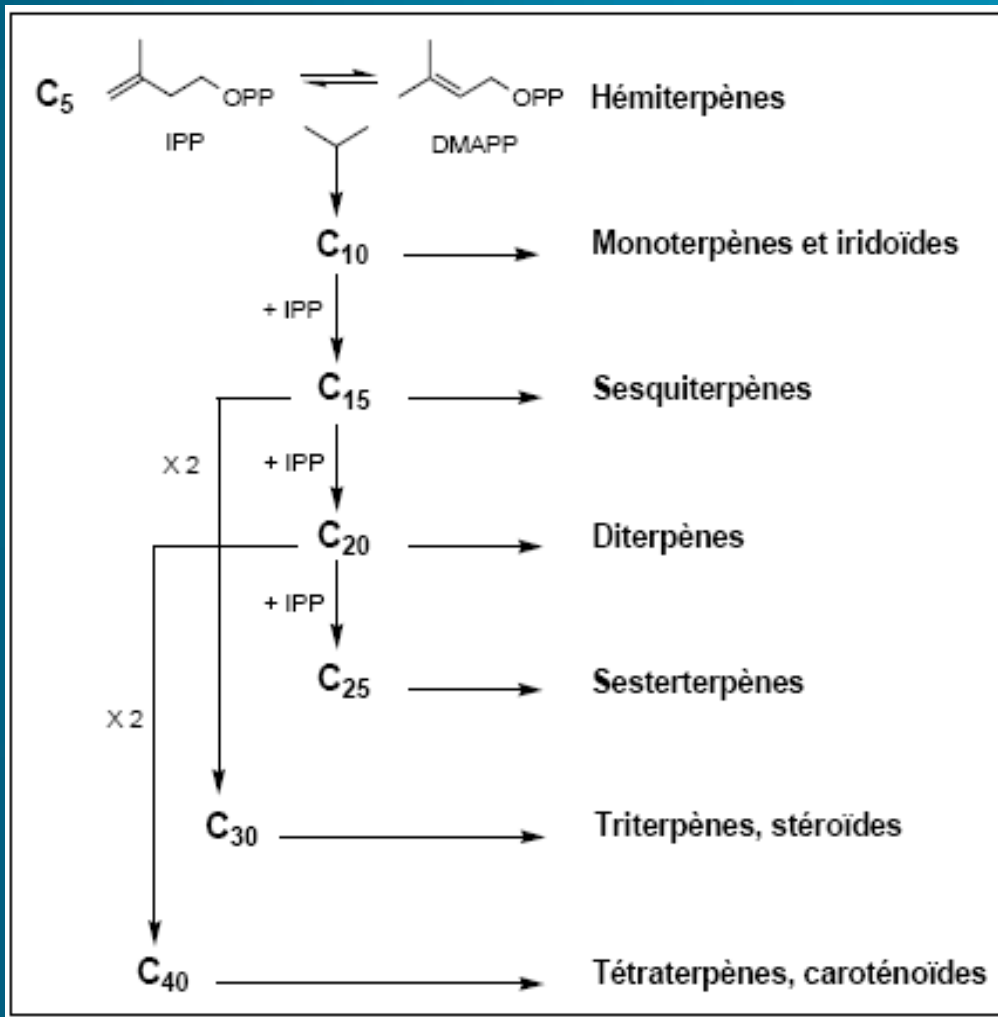
monoterpènes ( $\beta$ -ocimène), sesquiterpènes (E- $\beta$ -farnésène),  
molécules aromatiques (indole)

## ➤ **Molécules à « notes vertes » : green leaf volatiles**

alcools, aldéhydes et esters saturés et insaturés en C6 (cis-3-hexénol, trans-2-hexénal, acétate d'hexényle,...)

## ➤ **Jasmonate**

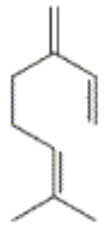
# Terpènes



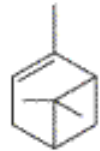
Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène et ont pour formule de base des multiples de celle-ci ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub>

IPP = Isopentenyl pyrophosphate

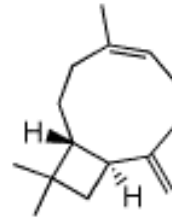
DMAPP = dimethylallyl pyrophosphate



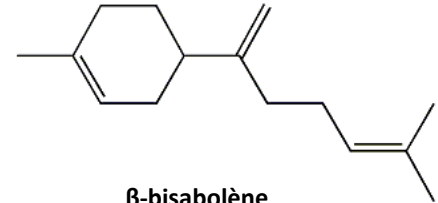
Myrcene



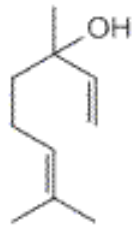
$\alpha$ -Pinene



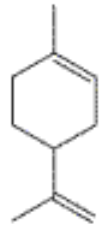
$\beta$ -caryophyllène



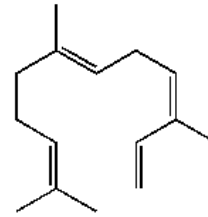
$\beta$ -bisabolène



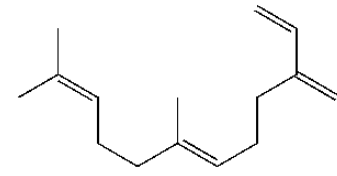
Linalool



Limonene



Z,E- $\alpha$ -farnésène



E- $\beta$ -farnésène

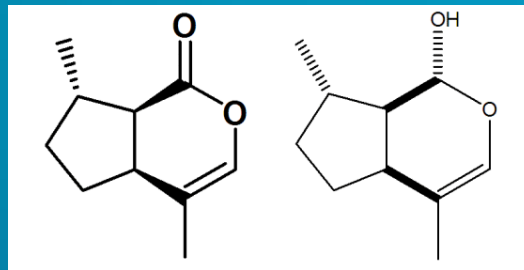
Monoterpènes

Sesquiterpènes

# Phéromones d'insectes ravageurs

## ➤ Phéromones sexuelles :

- **Pucerons** : népétalactone - népétalactol



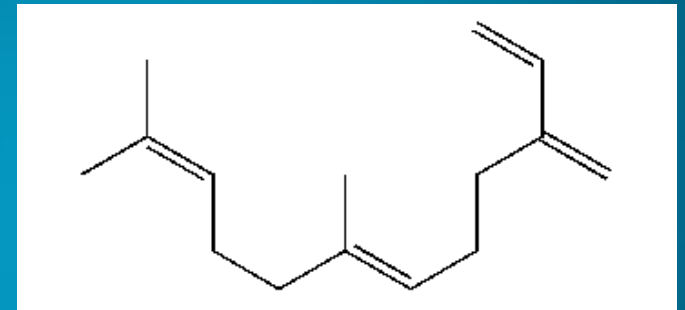
- **Papillons** : bouquet phéromonal spécifique à chaque espèce

Ex: { (E,E)-8,10-dodecadienol, Z-7-hexadecenal, Z-13-octadecenyl acetate, codlémone... }

# Phéromones d'insectes ravageurs

## ➤ Phéromone d'alarme :

### - Pucerons : E-β-farnésène



➔ (E)-7,11-Dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene

➔ C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>

➔ sesquiterpène

➔ libéré par les pucerons en réponse à un élément perturbateur;  
déclenche la dispersion des autres pucerons



# Phéromones d'insectes ravageurs

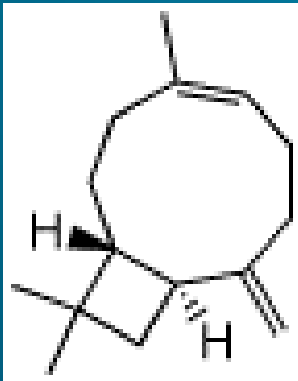
## ➤ Phéromone d'agrégation :

- Coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* :

$\beta$ -caryophyllène

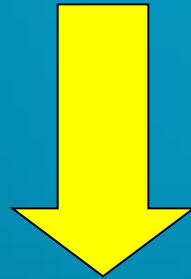
→  $C_{15}H_{24}$

→ sesquiterpène



# Sémiochimiques

Utilisation des connaissances « naturelles »



Leures, diffuseurs à phéromones, pièges

# Les diffuseurs de sémiochimiques

# Diffuseurs de sémiochimiques



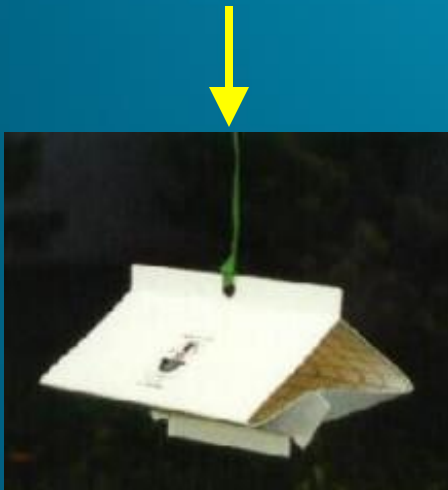
« Rubber septum »



« NoMate » mating disruptant



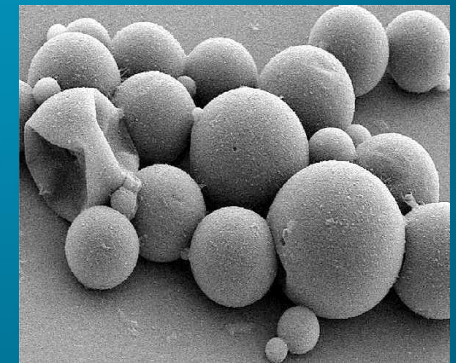
Evaporateur PHEROBANK



Piège collant



« Isomate-C »



Formulation à pulvériser :  
microcapsules à phéromone

# Diffuseurs de sémiochimiques

Caractéristiques d'un diffuseur idéal :

- ✓ **Taux de relargage :**
  - **suffisant** pour être perçu par les insectes
  - **constant** → cinétique de relargage d'« ordre zéro »
  - **de longue durée** : plusieurs semaines pour couvrir la période de présence des insectes
- ✓ **Sémiochimiques protégés de la dégradation par les UV et l'oxygène (antioxydant : vitamine E =  $\alpha$ -tocophérol)**

# Les formulations

Quelques exemples de formulations :

➤ **Phéromone micro-encapsulée**

- polymère biodégradable : cellulose, polysaccharides, gommes, chitosan, alginate...

➤ **Phéromone dans paraffine :**

- Huile de paraffine : solution à pulvériser
- Cire de paraffine : solide

➔ modèles mathématiques de diffusion (*Atterholt et al., 1999*)

# Les formulations

*C.A. Atterholt et al. / Journal of Controlled Release 57 (1999) 233–247*

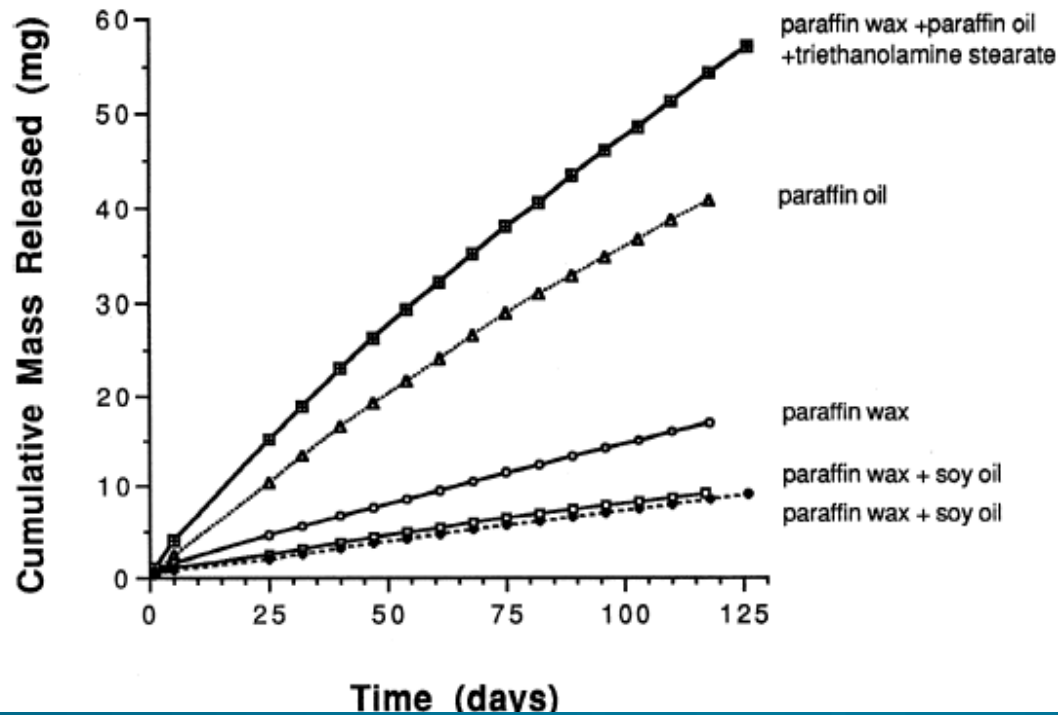


Fig. 1. The effect of formulation on OFM pheromone release from paraffin (200 mg pheromone, 5 g paraffin mixture, 0.5 l/min air flow, 27°C, 53.5 cm<sup>2</sup> surface area)

# Les formulations

Généralement : formulations contiennent **molécules de synthèse**

## → **Inconvénients :**

- Coût important si molécules stéréospécifiques
- Produits non naturels
- Nombreuses étapes de production → rendements limités
- Utilisation de réactifs toxiques

→ Voie de développement de **molécules naturelles** purifiées au départ de sources végétales (huiles essentielles) ou d'insectes



# Etude du relargage

# Etude du relargage

But : détermination de cinétiques de relargage

→ Choix d'une formulation adaptée au champ

# Etude du relargage

Techniques de mesure du taux de relargage au départ de diffuseurs à phéromones

→ amélioration constante des techniques

➤ **Méthode gravimétrique**

➤ **Méthode de piégeage des volatils sur adsorbant**

# I. Méthode gravimétrique

## ➤ Mode opératoire :

Peser chaque semaine les diffuseurs mis au champ pour déterminer la perte de poids moyenne

## ➤ Inconvénients :

- ✓ Résultats très variables entre diffuseurs, manque de précision
- ✓ Parfois augmentation du poids car humidité, poussières,...

➔ **Pas une mesure fiable** du taux de relargage

# I. Méthode gravimétrique

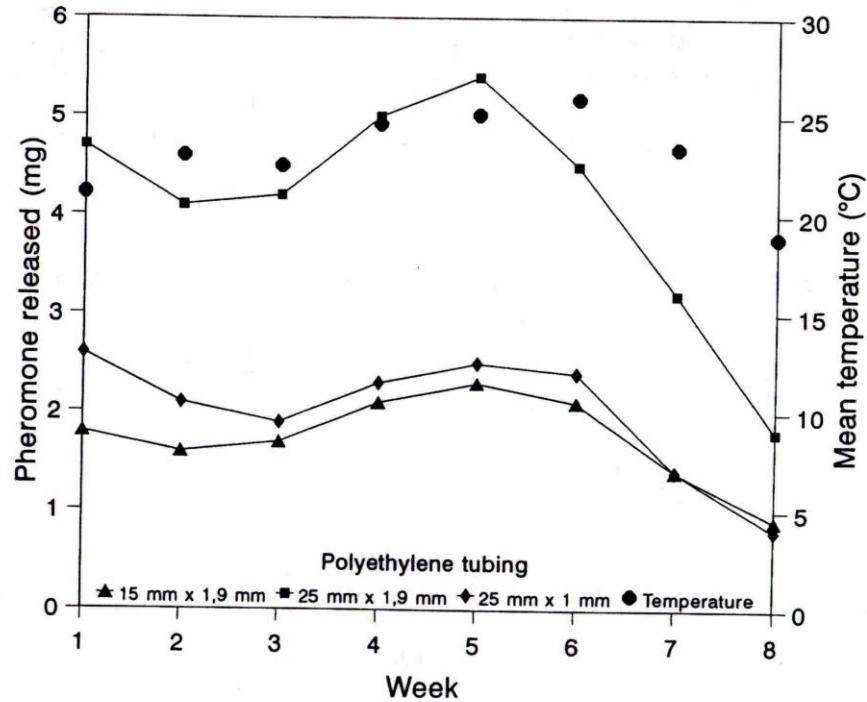


FIG. 2. The influence of polyethylene tubing of different lengths and diameter on the release rate of the controlled-release pheromone dispenser.

*(Hofmeyr et al, 1994)*

## II. Méthode de piégeage des volatils

A intervalles réguliers (tous les jours, tous les 5 jours,...), analyser la quantité de phéromone libérée par unité de temps par les diffuseurs mis en champ → estimation du **taux de relargage** pour chaque diffuseur au cours du temps

### ➤ **Conditions expérimentales contrôlées :**

- prélèvement à débit d'air constant (ex: 0,5 L/min) pendant un temps déterminé
- mesure de la T°
- mesure de l'humidité relative

# II. Méthode de piégeage des volatils

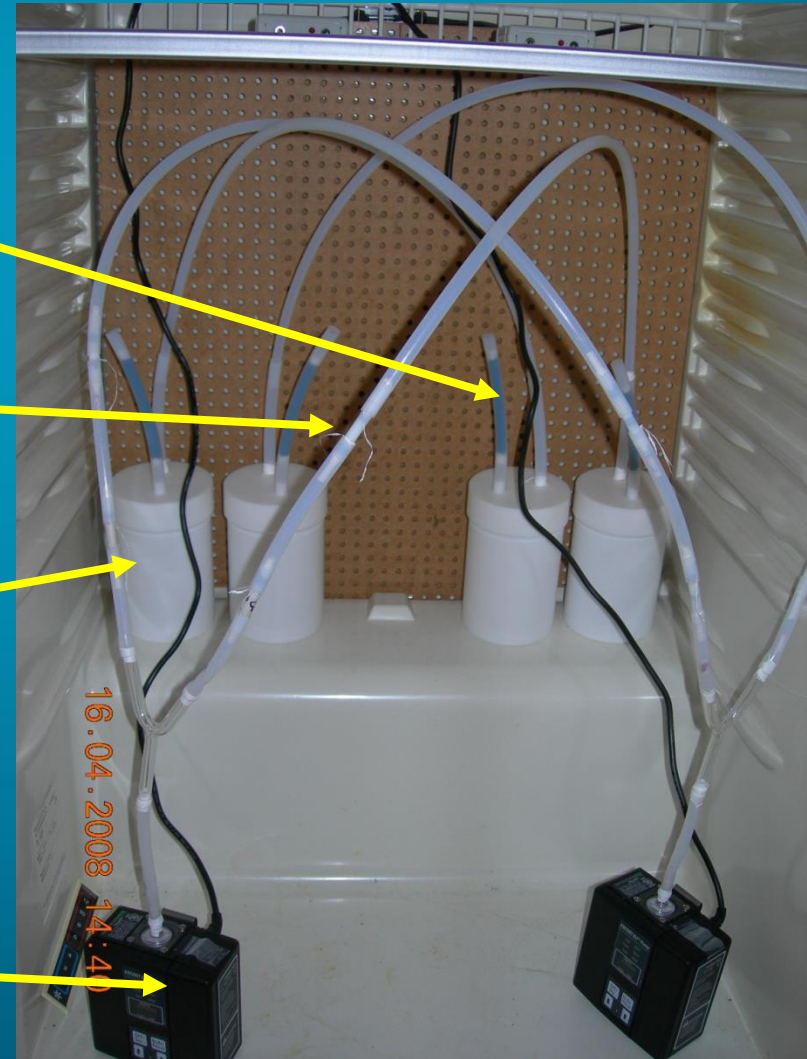
## ➤ Dispositif de l'unité de CA

Filtre en charbon actif

Cartouche d'adsorbant

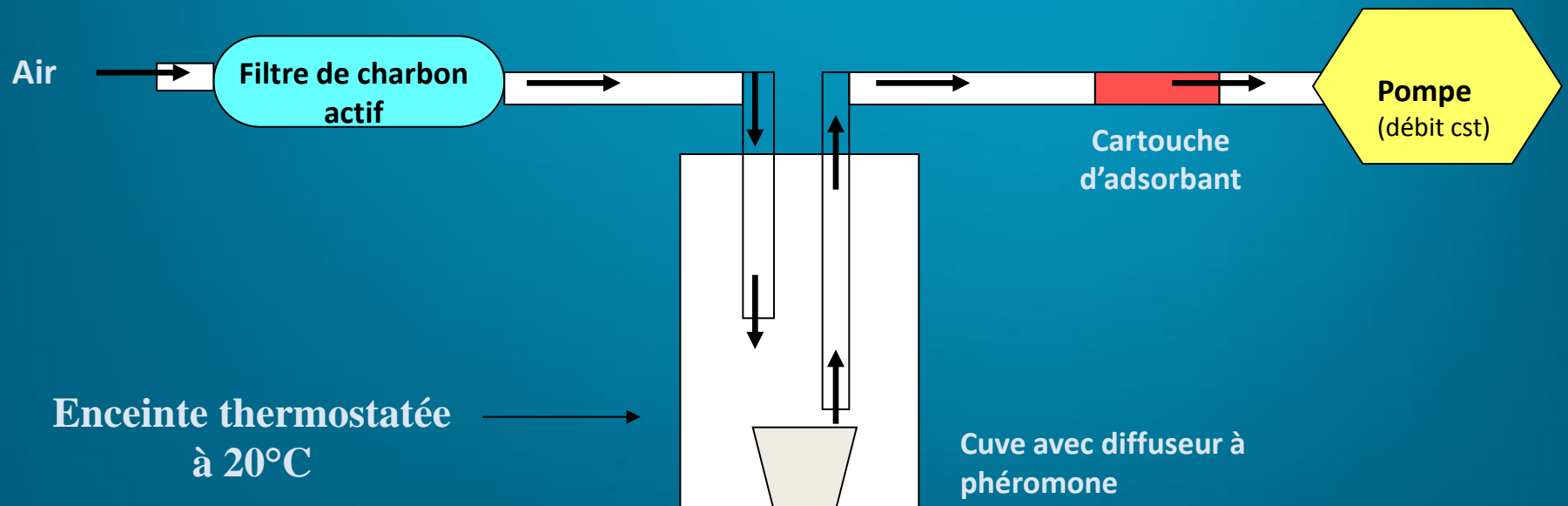
Cuve en Téflon avec diffuseur de sémiochimique

Pompe



## II. Méthode de piégeage des volatils

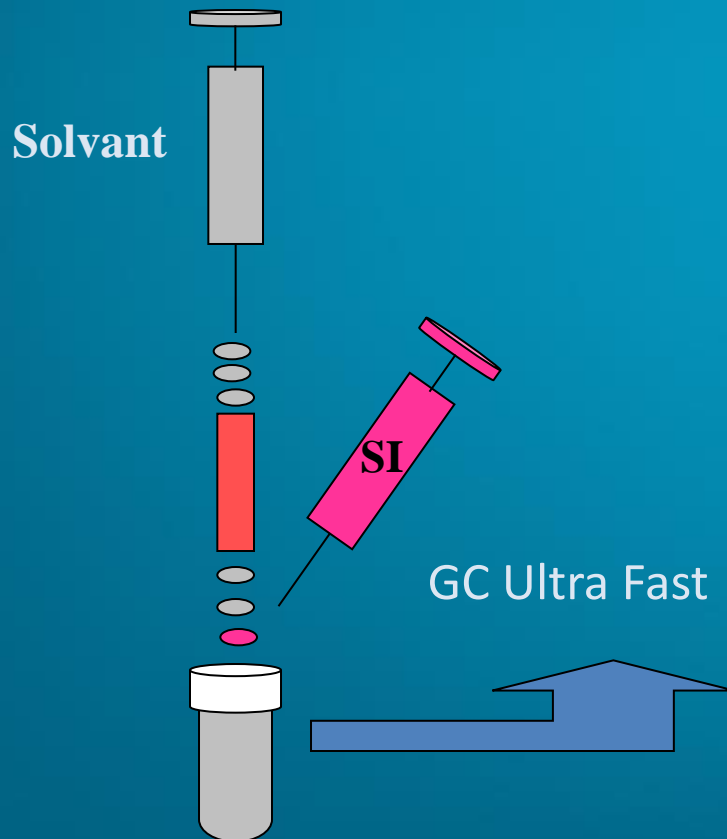
➤ **Mode opératoire** : étape 1, piégeage des volatils sur adsorbant (Super Q)





## II. Méthode de piégeage des volatils

### ➤ Mode opératoire : étape 2



Elution (désorption) de la cartouche d'adsorbant avec un solvant pour décrocher les molécules volatiles retenues. Ajout d'un standard interne. Analyse de l'éluat et quantification au GC Ultra Fast.

# Etude du relargage

Importance des **paramètres physico-chimiques** sur le taux de relargage :

- Température
- Humidité relative
- Vent, débit d'air
- Coefficients de diffusion des composés

➔ développement de modèles mathématiques complexes

# Quelques exemples

(Mottus et al., 2001)

(Teal et al., 1985)

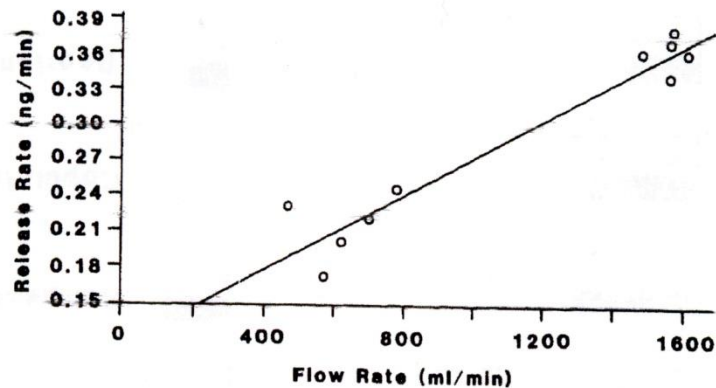


FIG. 4. Amount of the six-component aldehyde blend released from septa loaded with  $500 \mu\text{g}$  at various flow rates.  $R^2 = 0.96$  for equation,  $y = 1.822 \times 10^{-4}x + 7.682 \times 10^{-2}$ .

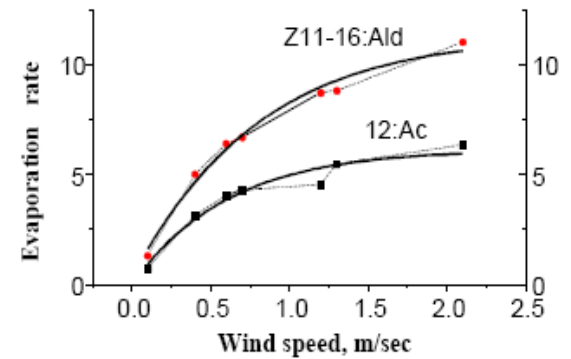


Figure 5. Influence of wind speed on rate constants of 12:Ac and Z11-16:Ald. Feroflor dispenser at  $25^\circ\text{C}$

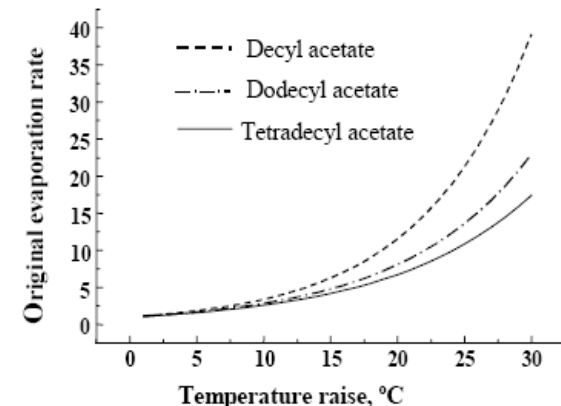


Figure 6 Dependence of evaporation rates of some alkanols from temperature.

# Quelques exemples

*(Mayer et al., 1998)*

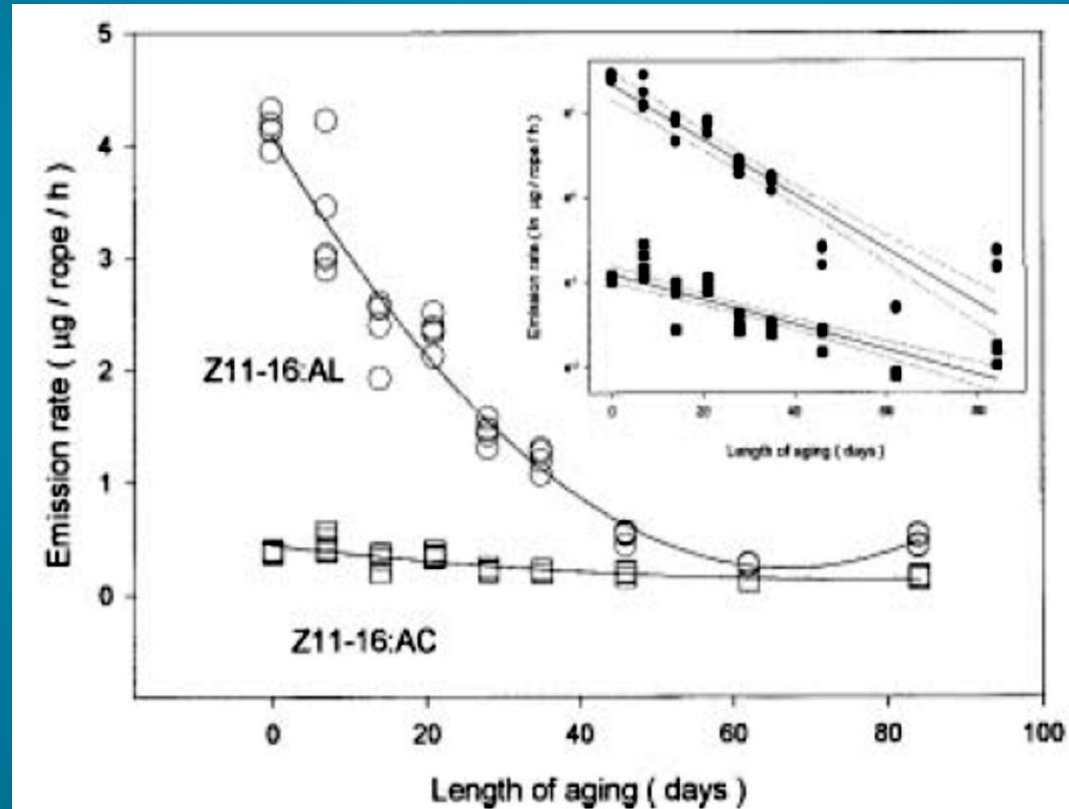
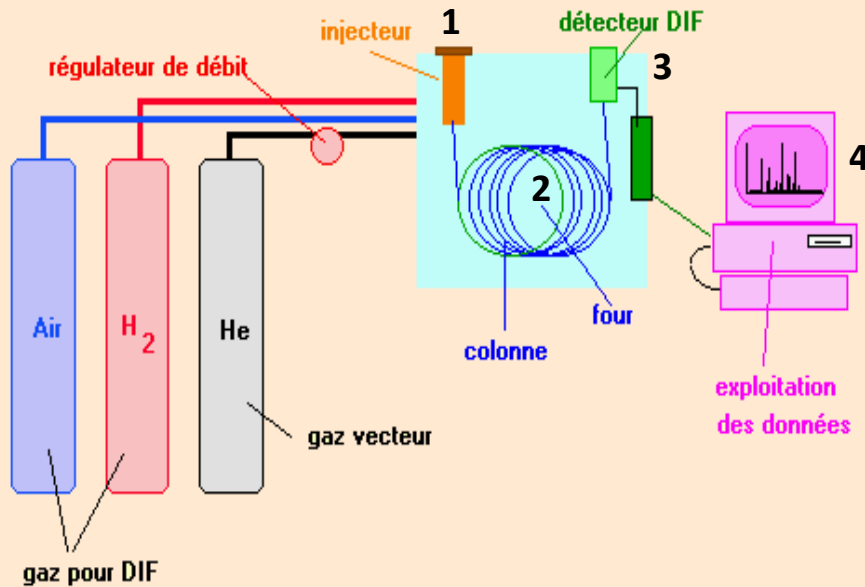


Fig. 1. Emission of Z11-16:Al and Z11-16:Ac from Shin-Etsu plastic rope samples (Lot 80101). Inset is a semilogarithmic plot of the natural logarithm of the same data to illustrate the linearity of the regression and the fiducial limits.

Analyse  
chromatographique

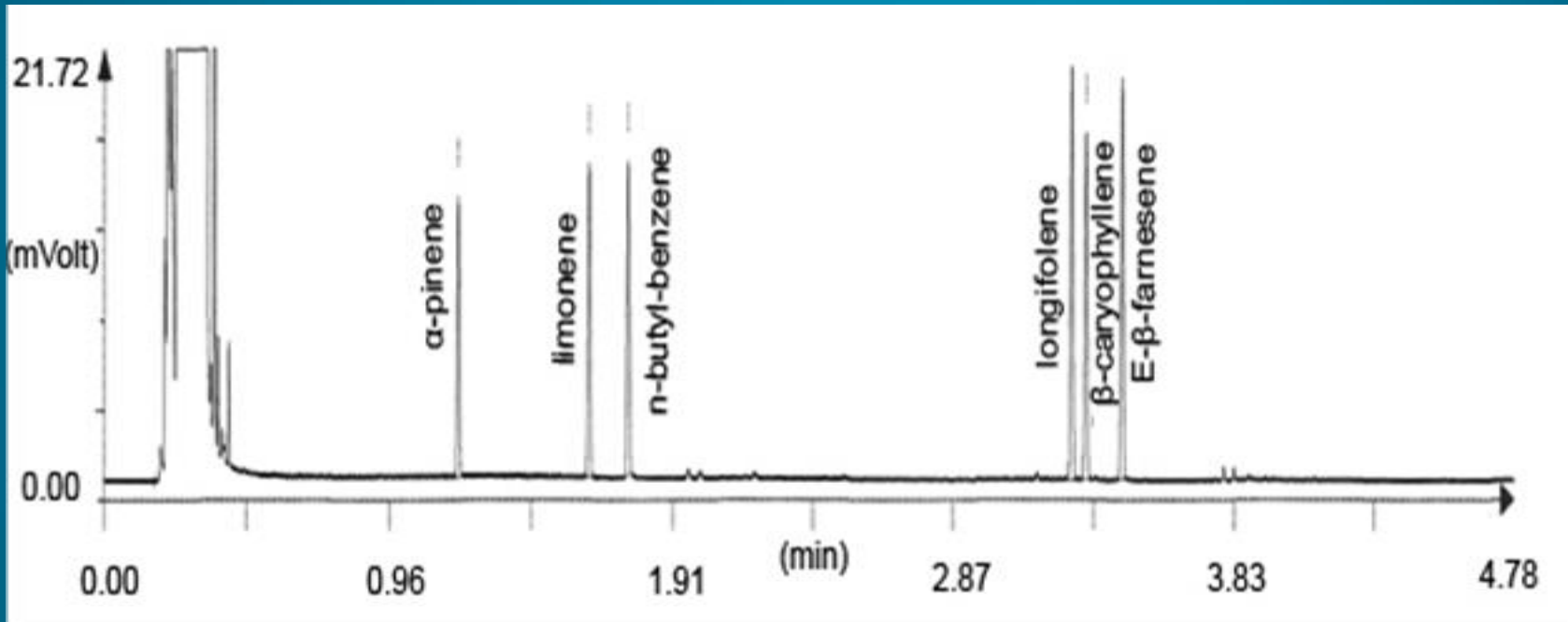
# Chromatographie en phase gazeuse (GLC)

Rappel : principe de fonctionnement



1. Injection du mélange à analyser en amont de la colonne via l'injecteur.
2. Séparation des composants volatils dans la colonne grâce à leurs affinités respectives pour la phase stationnaire. Les composants sont poussés par le flux de la phase mobile (gaz vecteur).
3. A la sortie de la colonne, les composants sont détectés par un détecteur (FID, NPD).
4. Le signal perçu au détecteur est transmis à un système d'enregistrement et de traitement des données →  
**chromatogramme**

# Chromatogramme



Chaque pic correspond à un composé volatil du mélange à analyser.

A chaque composé correspond un temps de rétention ( $R_t$ ) défini par le type de colonne (phase stationnaire), le programme de  $T^\circ$  et le composé lui-même.

# Chromatographie en phase gazeuse (GLC)

## Utilités

- Permet l'analyse de quantités minimales ( $\mu\text{g}$ ,  $\text{ng}$ ,  $\text{pg}$ )
- Séparation de mélanges complexes
- Analyse qualitative et quantitative aisée
- Nombreux domaines d'application de dosage de composés volatils

## Limites

- Ne convient pas pour les produits :
- qui se décomposent à chaud (thermolabiles)
  - qui sont peu volatils
  - ionisés



# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

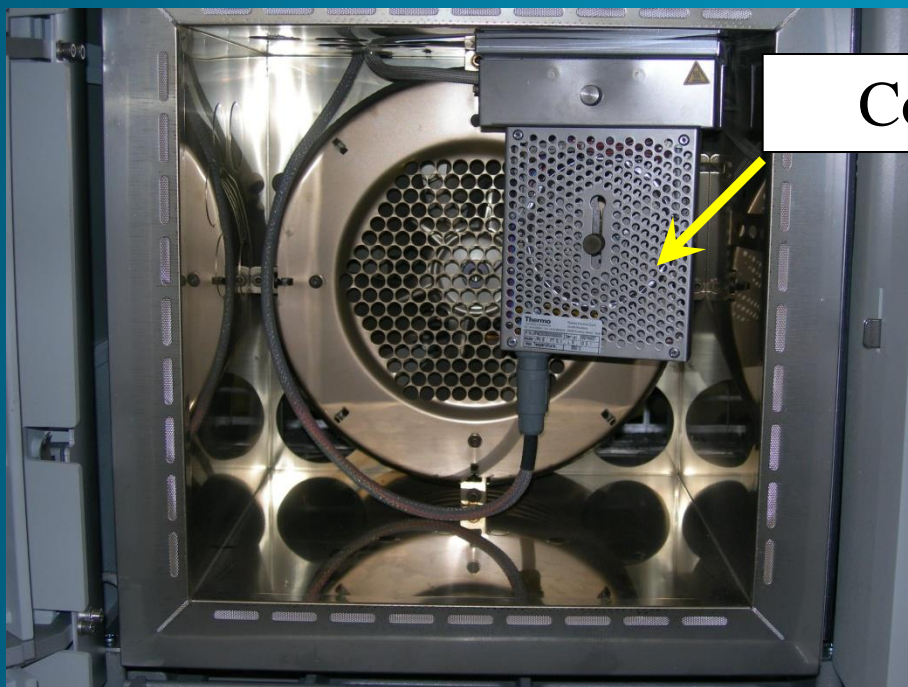
## Par rapport à l'analyse GC classique :

- Réduction du temps d'analyse (→ 30x)
- Sensibilité accrue

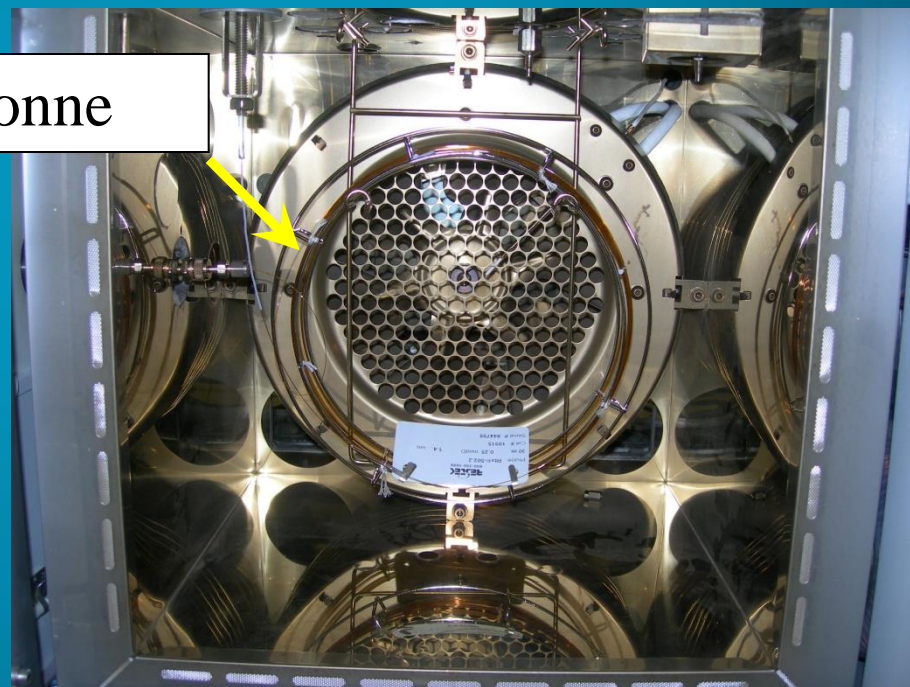
## → Amélioration de la recherche :

- plus grand nombre de répétitions
- résultats obtenus plus rapidement
- validation plus rapide de méthodes

# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC



Colonne



Ultra Fast GC

GC classique

# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

## Ultra Fast GC

- 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 < 3 min

## GC classique

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

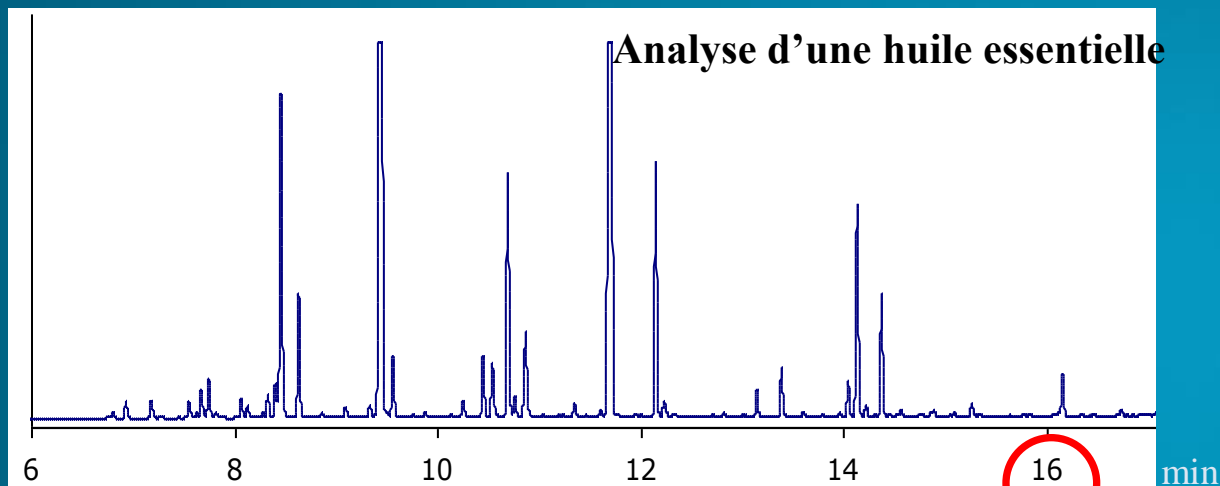
# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC



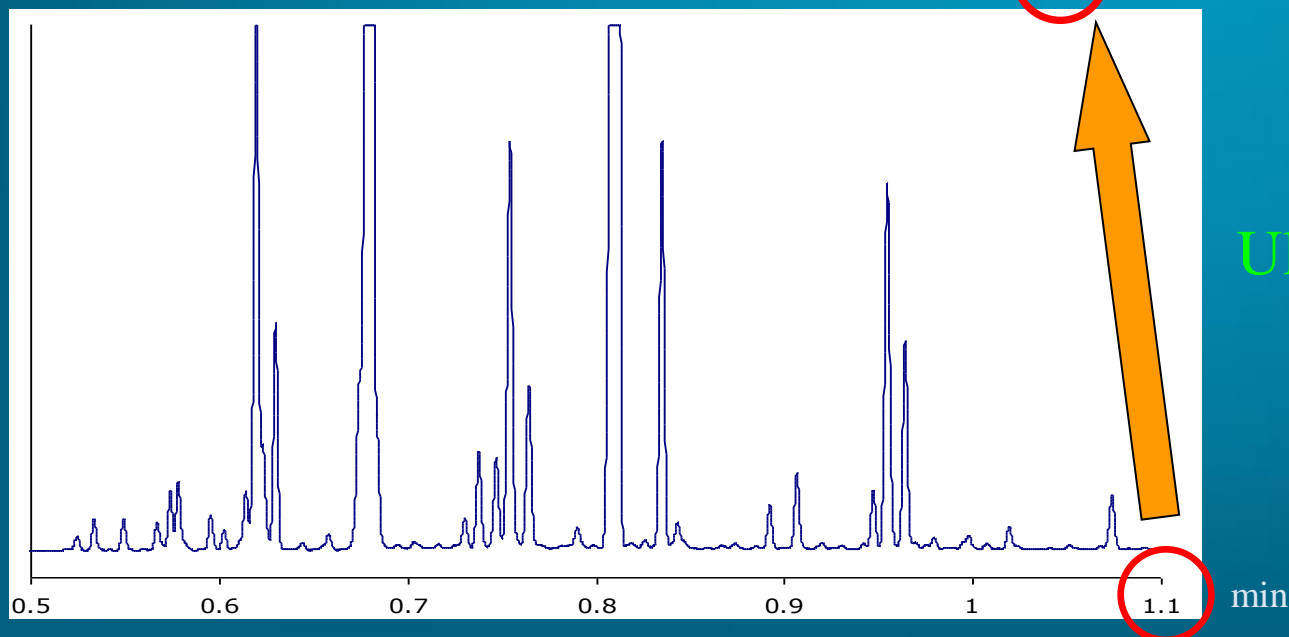
## Colonne Ultra Fast GC :

- 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  $\pm 1$  min
- Durée de vie prolongée (10000 cycles, 3x >)

# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC



GC classique



Ultra Fast GC

(± 1 min)

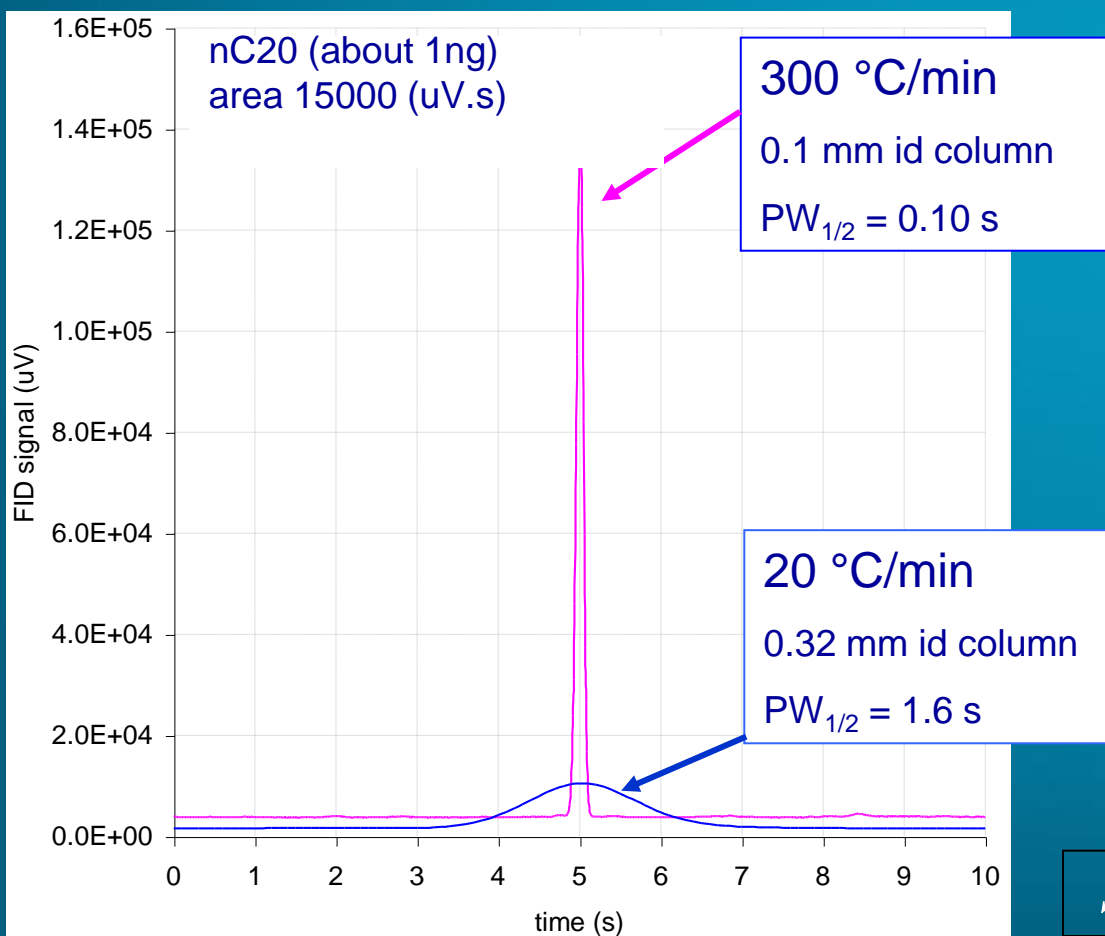
# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

## Avantages de l'UFGC :

- Rapidité
- Durée de vie de la colonne
- Répétabilité des temps de rétention
- Sensibilité
- Applications : possibilité d'injections de nanovolumes

# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

Meilleure sensibilité : effet de compression de pic



*Source : Interscience*

# Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

## Applications de l'UFGC :

- Produits pétroliers
- VOCs
- Arômes
- Huiles essentielles
- FAME (Fatty acid methyl esters)
- ...

!!! Choix de la colonne en fonction du type de composé à analyser

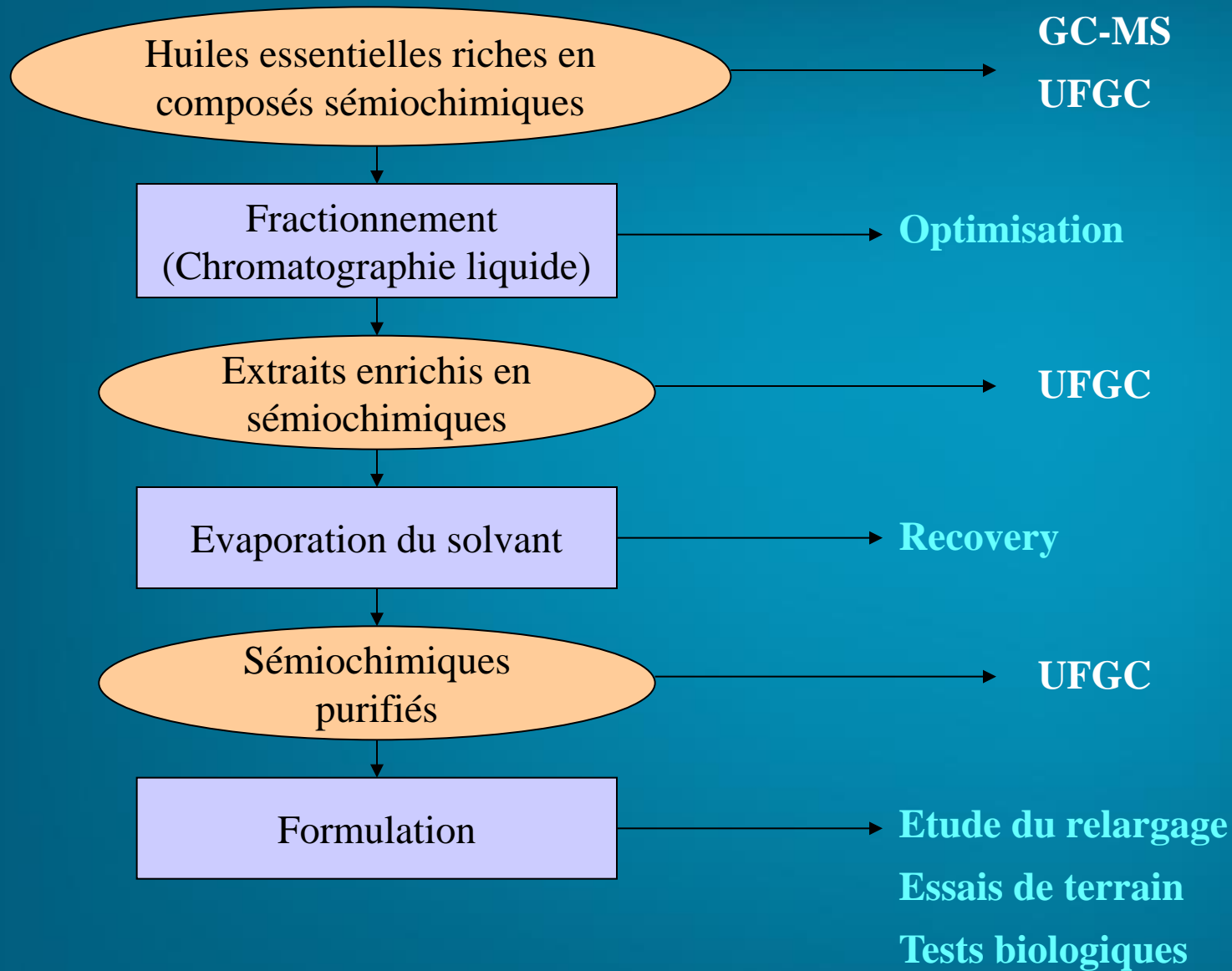


**Un cas concret : projet**  
**SOLAPHID (subvention RW)**

# SOLAPHID

## Objectif

Développer des formulations à base de sémiochimiques (E- $\beta$ -farnésène,  $\beta$ -caryophyllène, népétalactone) d'origine naturelle afin d'attirer des prédateurs et/ou des parasitoïdes de pucerons sur cultures infestées



**+ Validation de la méthode analytique**

# Huiles essentielles

- **E-β-farnésène** : Huile essentielle de *Matricaria chamomilla* (camomille allemande)



- **Népétalactone** : Huile essentielle de *Nepeta cataria* (catnip)

- **β-caryophyllène** : Huile essentielle de *Nepeta cataria*



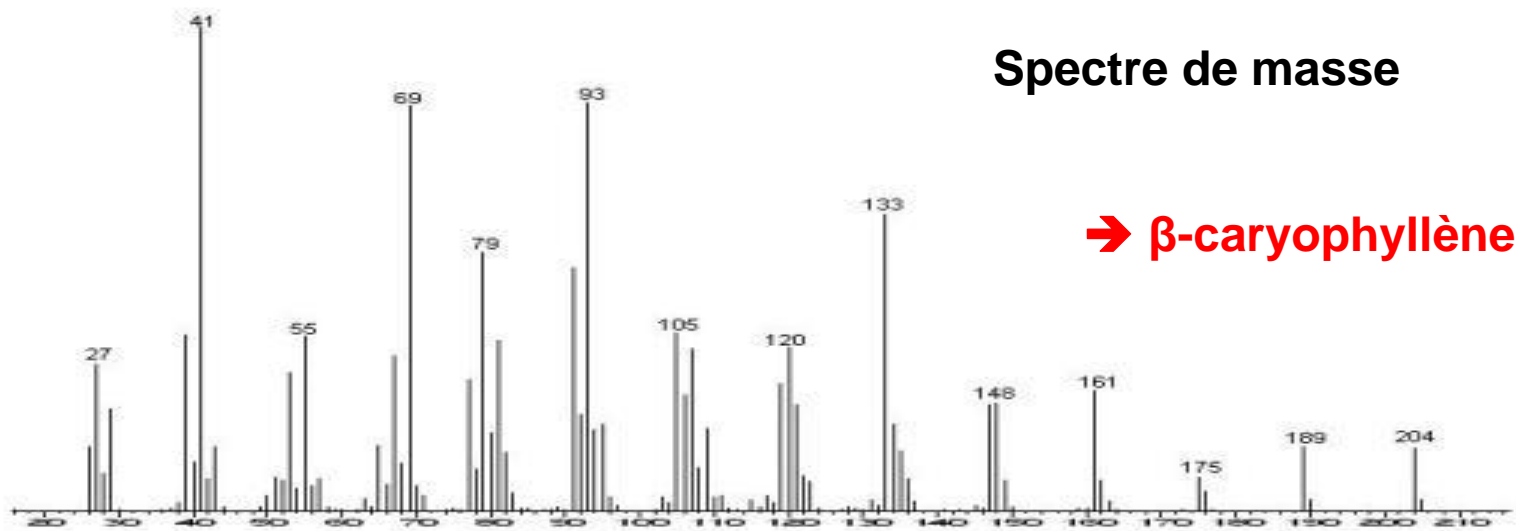
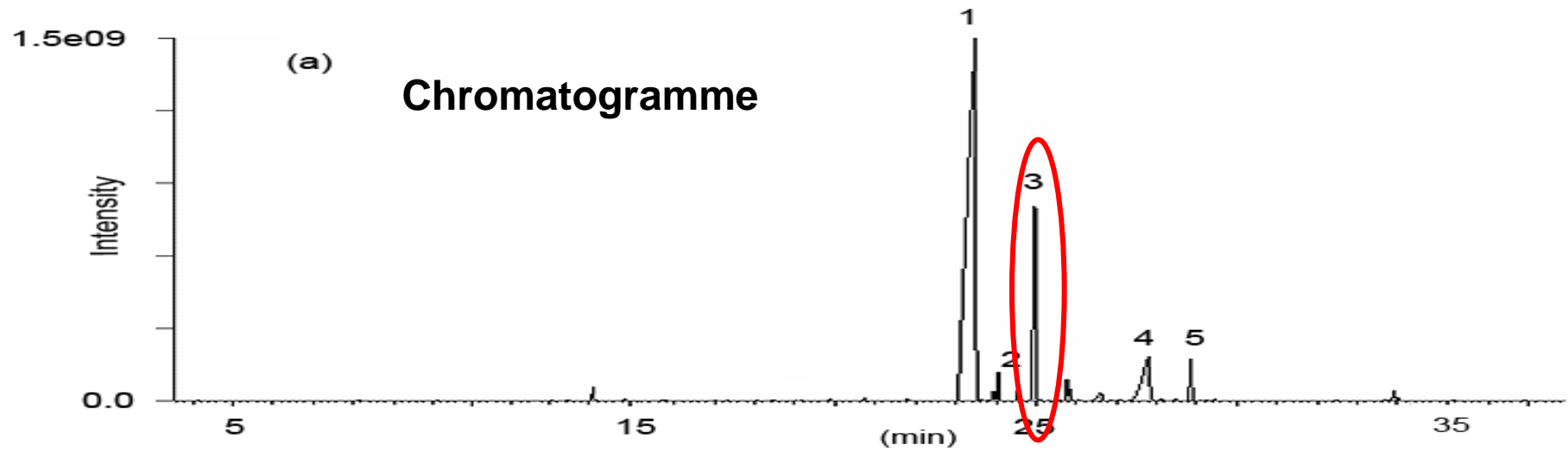
# Huiles essentielles

## ➤ Analyse GC-MS :

Détecteur = spectromètre de masse

→ identification certaine des composés en fonction de leur spectre de masse

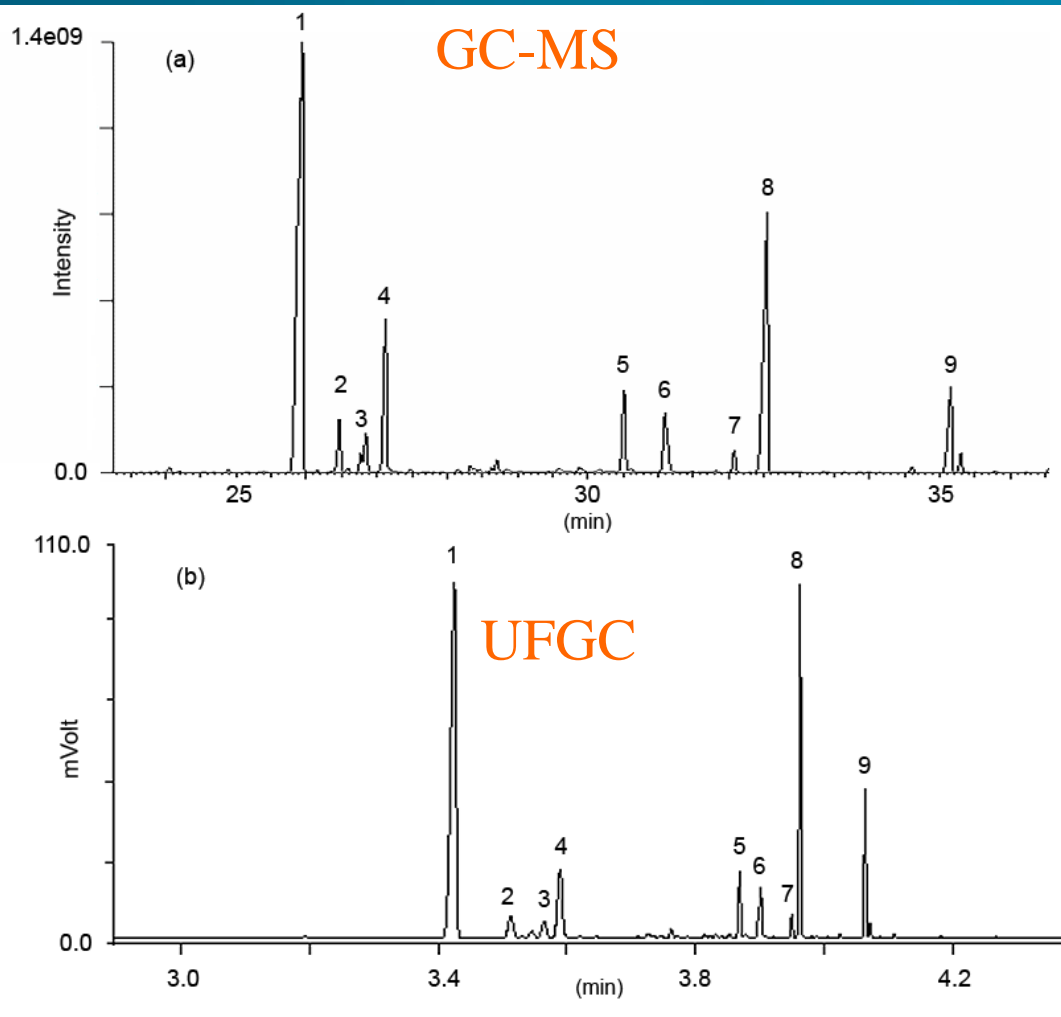
# GC-MS



# Huiles essentielles

- **Analyse GC Ultra Fast** : détecteur FID
  - ➔ comparaison au profil GC-MS
  - ➔ détermination du % des sémiochimiques et quantification

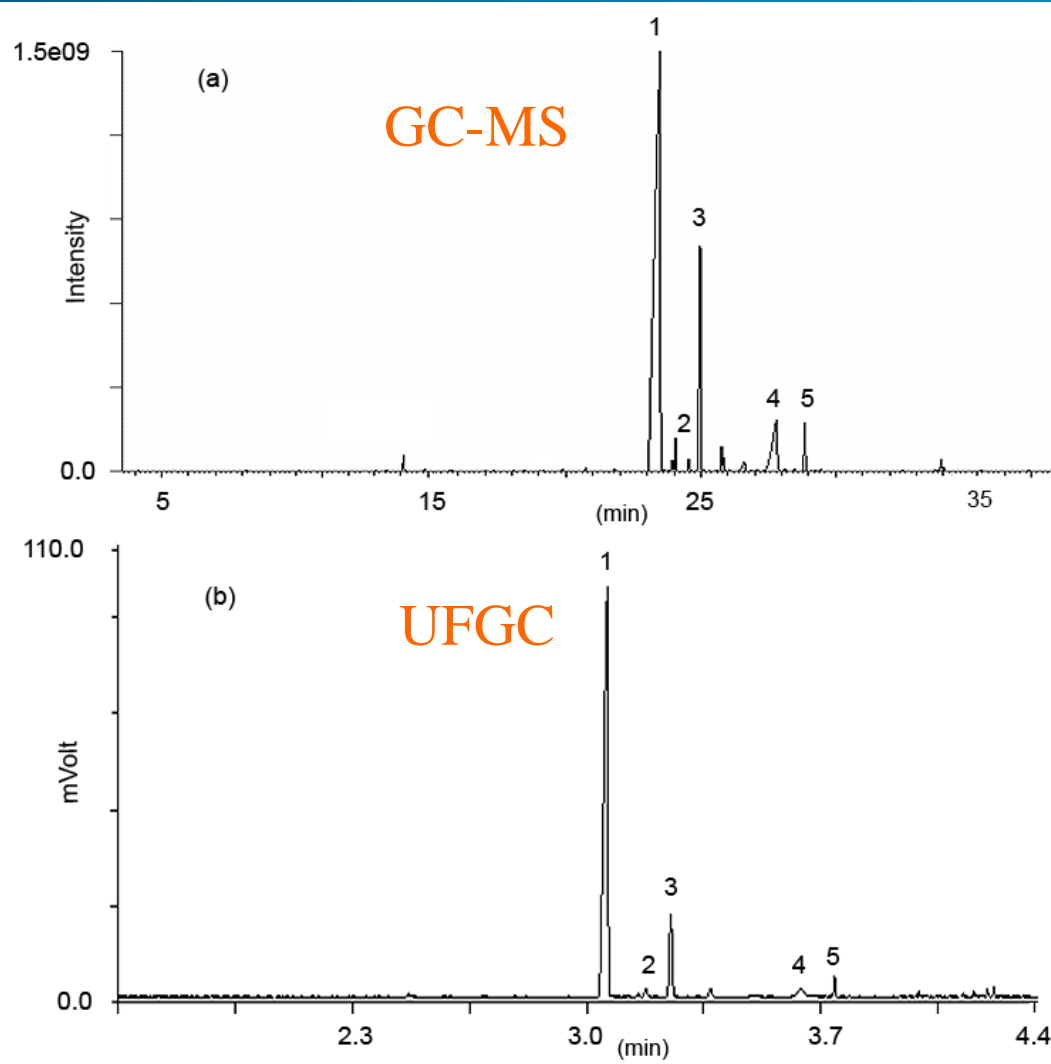
# Matricaria chamomilla



N°	Composés	I rétention	%
1	E- $\beta$ -farnésène	1456	42,59
2	Germacrène D	1478	2,93
3	bicyclogermacrène	1494	1,99
4	(E,E)- $\alpha$ -farnésène	1506	8,32
5	$\alpha$ -bisabolol oxide B	1649	4,43
6	$\alpha$ -bisabolone oxide A	1673	4,53
7	Chamazulène	1715	1,18
8	$\alpha$ -bisabolol oxide A	1735	21,16
9	Cis-ene-yne-dicycloether	1802	5,94



# *Nepeta cataria*

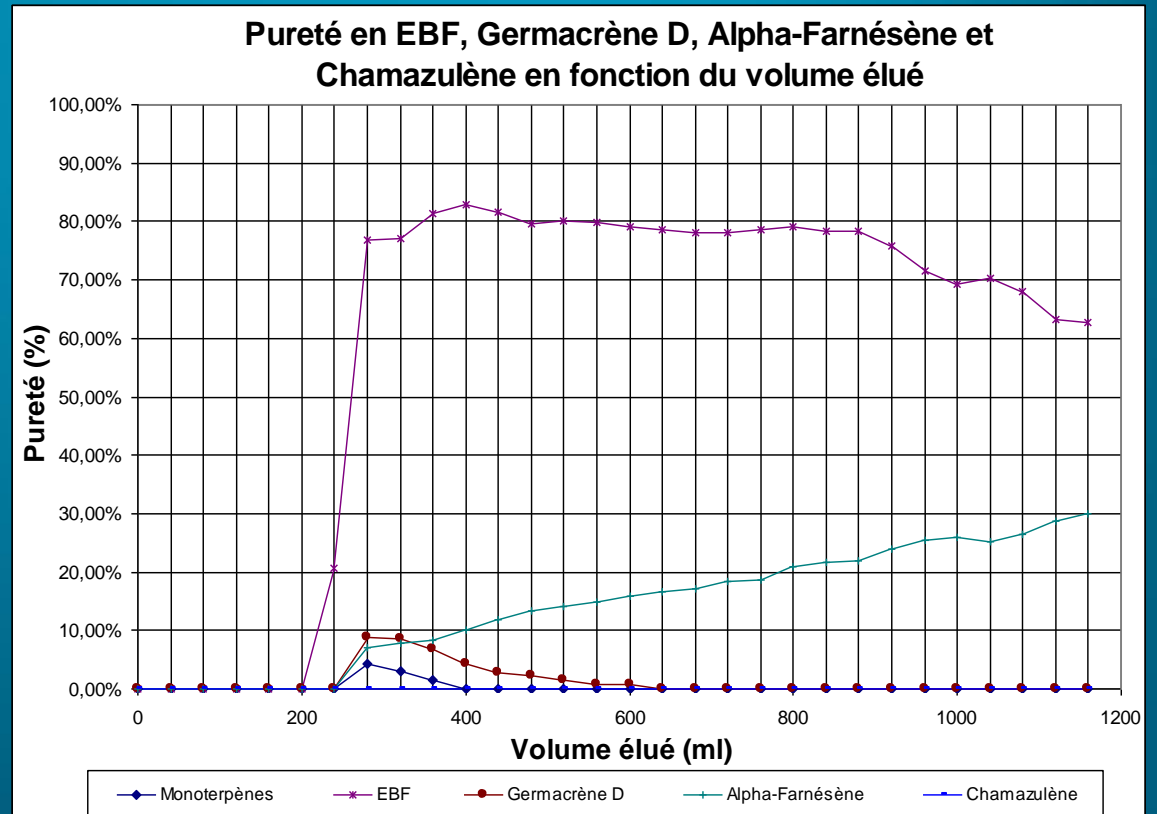


N°	Composés	I rétention	%
1	(Z,E)-népétalactone	1353	73,27
2	(E,Z)-népétalactone	1377	1,10
3	$\beta$ -caryophyllène	1411	9,72
4	Non identifié		7,82
5	$\beta$ -caryophyllène oxide	1579	1,81

# Fractionnement

## Chromatographie Flash

- mise sous pression 0,3 bar
- SiO<sub>2</sub> à 0% H<sub>2</sub>O
- 10 ml d'huile essentielle en tête de colonne
- élution au n-pentane



# Evaporation du solvant

## ➤ Evaporation du pentane à 40°C au rotavapor sans vide :

➔ compromis entre vitesse d'évaporation et limitation des pertes

➔ détermination du pourcentage de récupération (recovery %) après évaporation du solvant

➔ pureté des composés après évaporation :

EBF : 83,8 % ± 0,3 %

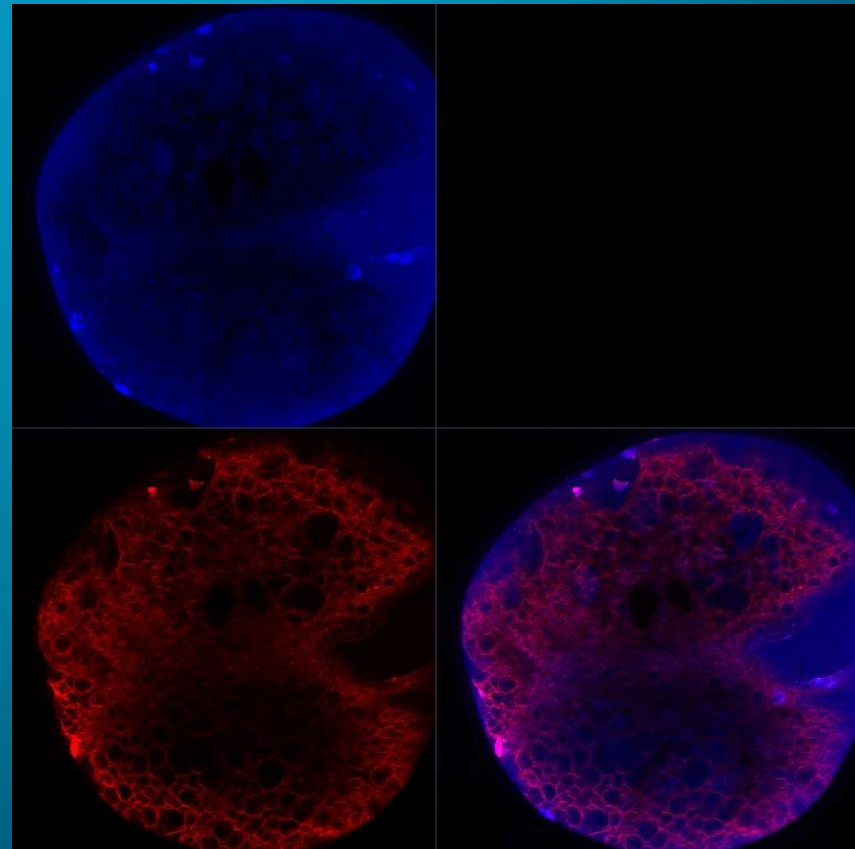
β-caryophyllène : 97,7 % ± 0,5 %

# Formulation

- Incorporation des sémiocochimiques purifiés dans un polymère biodégradable :

→ réseau « spaghetti »

(microscope confocal)



# Vérification de l'efficacité

- **Tests biologiques** : observation du comportement des prédateurs et parasitoïdes en présence des formulations (attraction, oviposition, répulsion...) : olfactomètre, observation NOLDUS, tunnel de vol...
- **Essais de terrain** : dépôt des formulations sur cultures et dénombrement des prédateurs et parasitoïdes piégés (tests statistiques : comparaison des formulations à un témoin)

# Vérification de l'efficacité



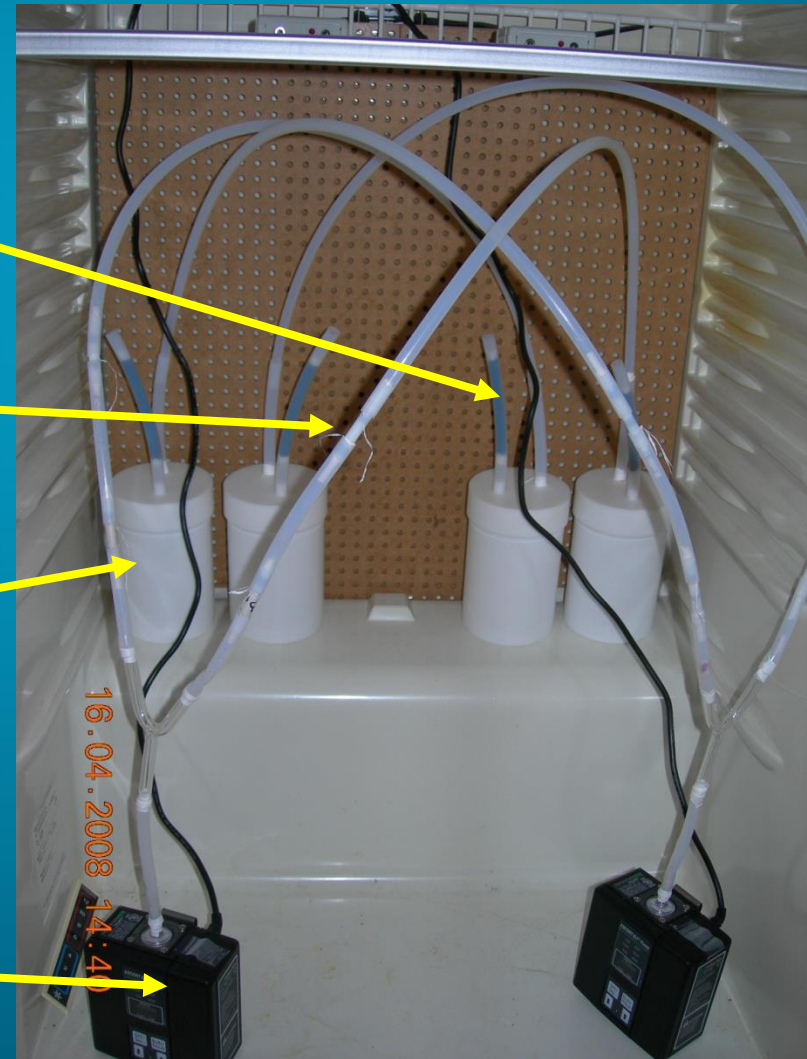
# Relargage des formulations

Filtre en charbon actif

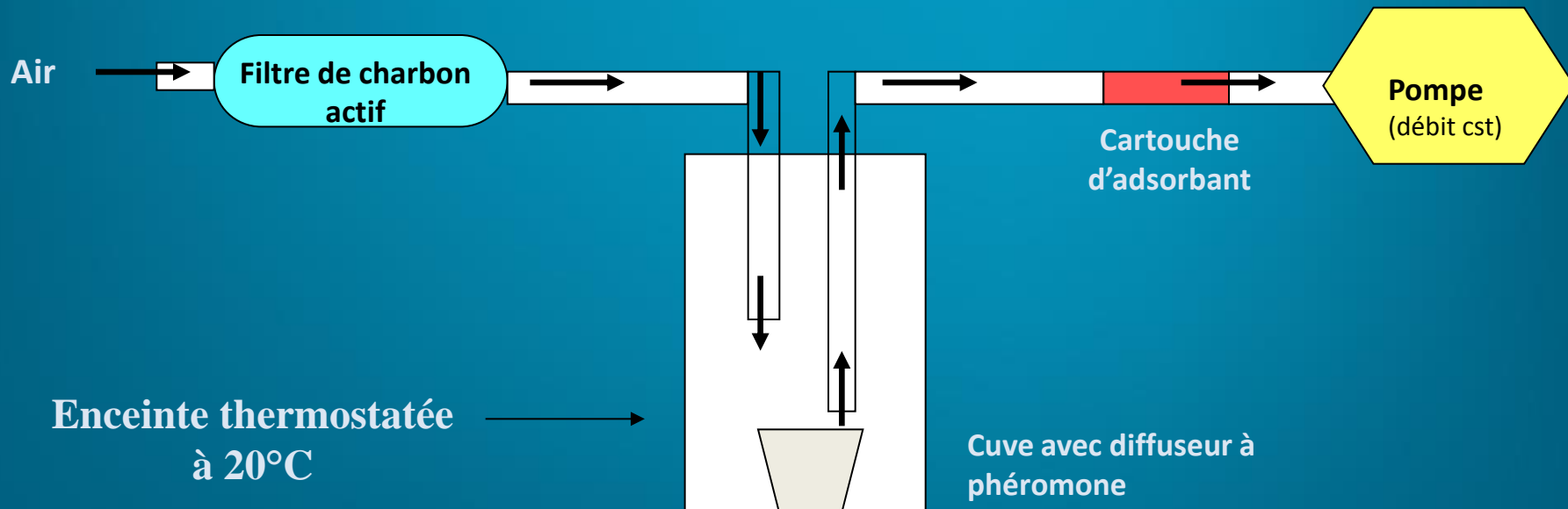
Cartouche d'adsorbant

Cuve en Téflon avec diffuseur de sémiocchimique

Pompe

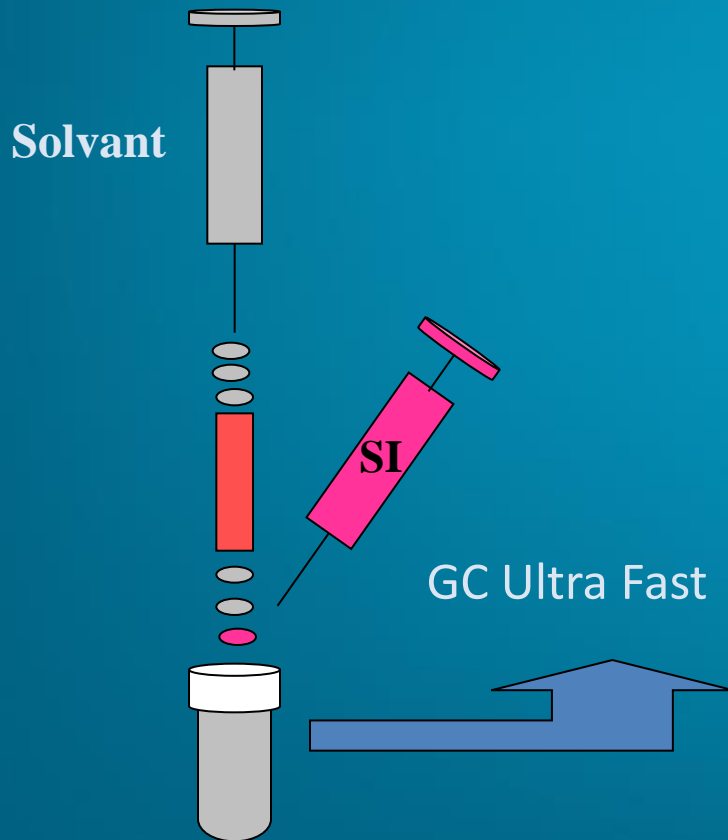


# Relargage des formulations





# Relargage des formulations



Elution (désorption) de la cartouche d'adsorbant avec un solvant pour décrocher les molécules volatiles retenues. Ajout d'un standard interne. Analyse de l'éluat et quantification au GC Ultra Fast.

# Relargage des formulations

## Optimisation de la méthode

- **Efficacité de l'adsorbant** à retenir les molécules d'intérêt
- **Choix du solvant d'éluion** : en fonction de la polarité des molécules retenues sur la cartouche d'adsorbant
- **Détermination du volume de solvant** nécessaire pour décrocher la totalité des molécules retenues sur la cartouche
- **Choix du standard interne** : même famille chimique que les molécules à analyser,  $R_T$  proche mais pas de chevauchement

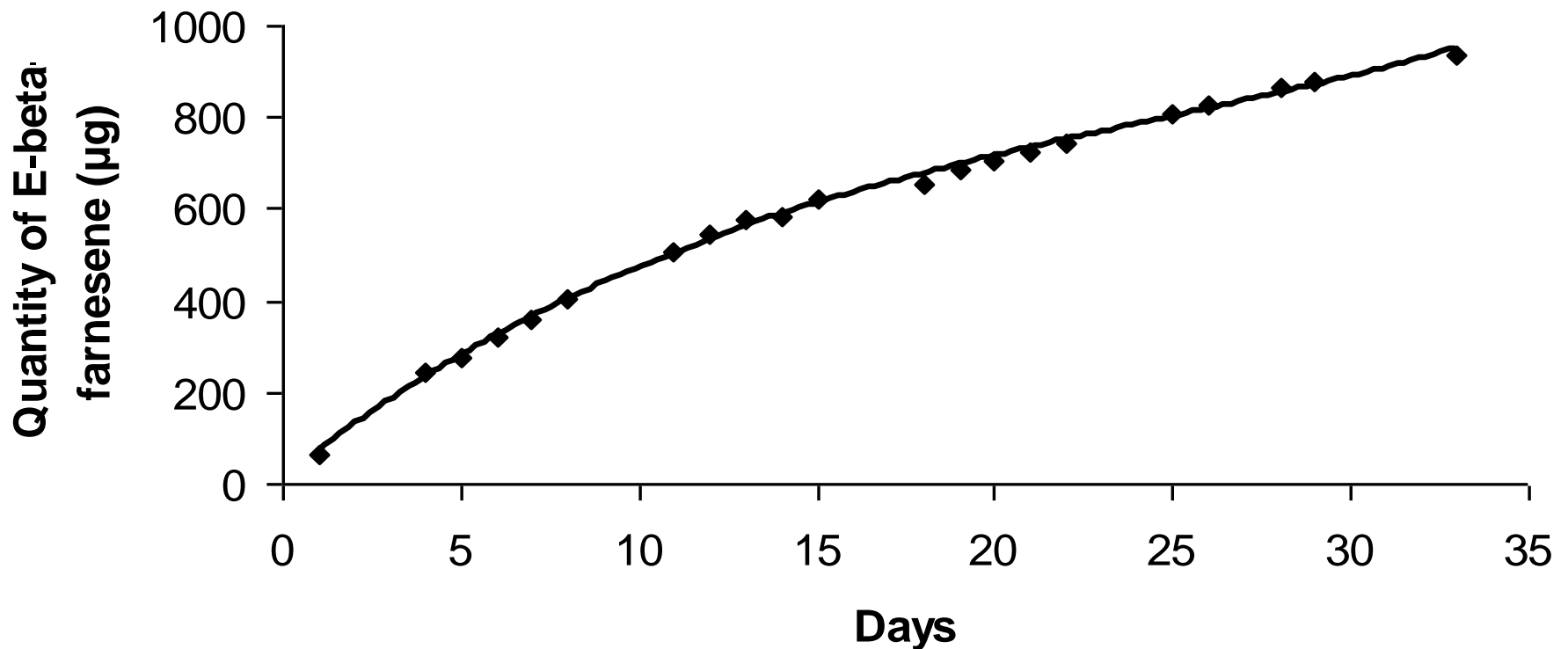
# Relargage des formulations

## Optimisation de la méthode

- **Mesure du « recovery »** : déposer une quantité connue de molécules sur la cartouche, éluer et mesurer le % récupéré dans l'éluat
- **Tester le « breakthrough » (volume de percée)** : vérifier que les volatils ne traversent pas complètement la cartouche d'adsorbant en raison d'un débit d'air trop important
  - ➔ **cartouche de sécurité mise à la suite de la première, élution et analyse de l'éluat**

# Relargage des formulations

Cumulative quantity of semiochemical released by 100 mg of formulation in laboratory controlled conditions



# Validation de méthodes analytiques

# Validation analytique

➤ 2 méthodes de validation :

- **validation classique** (la plus courante jusqu'à l'heure actuelle) :

➔ Basée sur les normes VALIDANA (BPL – Beagx), ISO 5725 et AOAC 2006

- **validation basée sur les profils d'exactitude** :

➔ démarche harmonisée et plus sévère quant aux critères validés

# Matériel expérimental

- **Substances de référence** : produits à doser  
(E-β-farnésène, β-caryophyllène, limonène, α-pinène)
- **Standard (étalon) interne de référence** : attention au choix du SI
  - ➔ de préférence, même famille chimique que molécule à doser, de façon à obtenir un facteur de réponse proche de 1
$$F = (S_A \cdot C_{SI} / S_{SI} \cdot C_A)$$
  - ➔ SI sesquiterpènes : longifolène
  - ➔ SI monoterpènes : n-butyl-benzène

# Pureté

## ➤ Déterminer la pureté des composés de référence

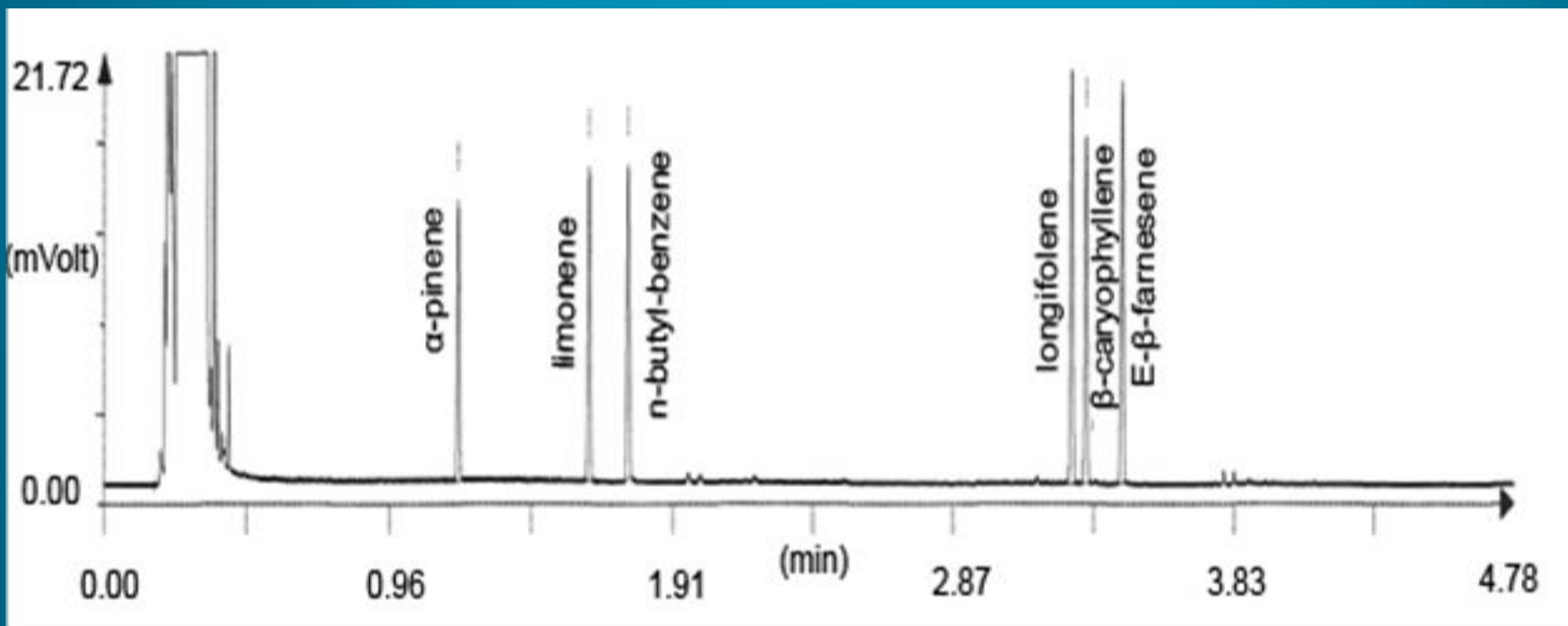
- Analyse des solutions ( $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  dans *n*-hexane) au GC Ultra Fast
- 3-10 répétitions

Compound	Mean purity (%)	SD	RSD (%)
E- $\beta$ -farnesene	98.17	0.0009	0.10
$\beta$ -caryophyllene	94.67	0.0071	0.75
Longifolene	98.01	0.0003	0.03
n-butyl-benzene	100.00	0.0000	0.00
Limonene	100.00	0.0000	0.00
$\alpha$ -pinene	100.00	0.0000	0.00



# Optimisation de la méthode d'analyse chromatographique

➤ Optimiser la séparation et la résolution des pics



# I. Validation classique

**Heuskin et al. (2009), J. of Chromatography A**

*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

➤ **Limite de détection (LOD)** : définie selon le principe qu'une concentration est détectable si elle est plus grande que la dispersion du blanc. (*Chauveheid, 2007*)

$$LOD = f * s_0 ,$$

Avec : -  $f = 3$

-  $s_0$ , l'écart-type de répétabilité du blanc en concentration obtenu après 8 répétitions

➤ **Limite de quantification (LOQ) = 2 \* LOD**

(*Chauveheid, 2007*)

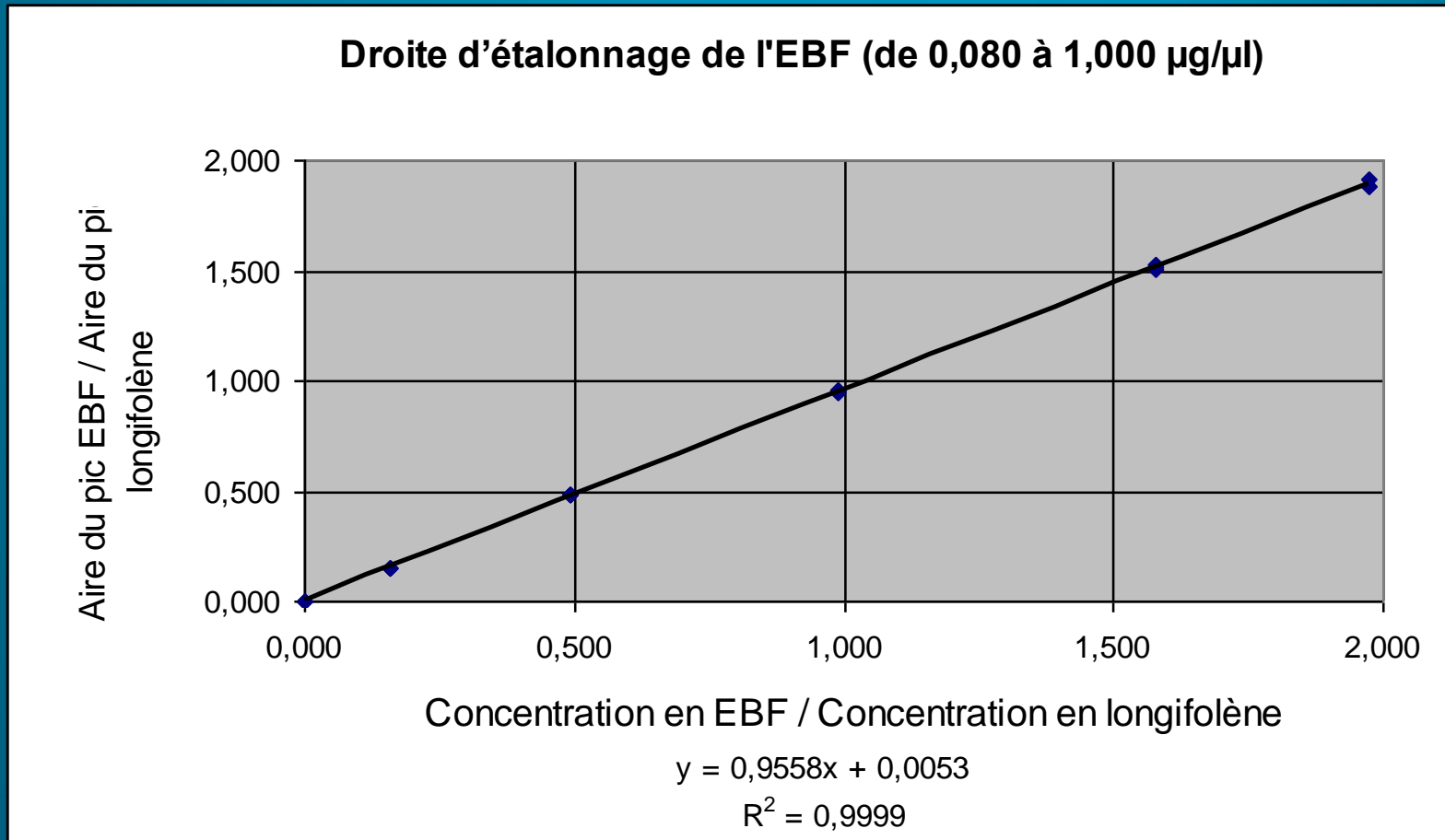
# Droite d'étalonnage

➤ **Pour chacune des substances à doser :**

- \* 5 concentrations + 1 blanco : [SI] la même pour toute [analyte]
- \* 3 répétitions d'analyse

# Droite d'étalonnage

➤ Droites d'étalonnage construites par régression linéaire au sens des moindres carrés



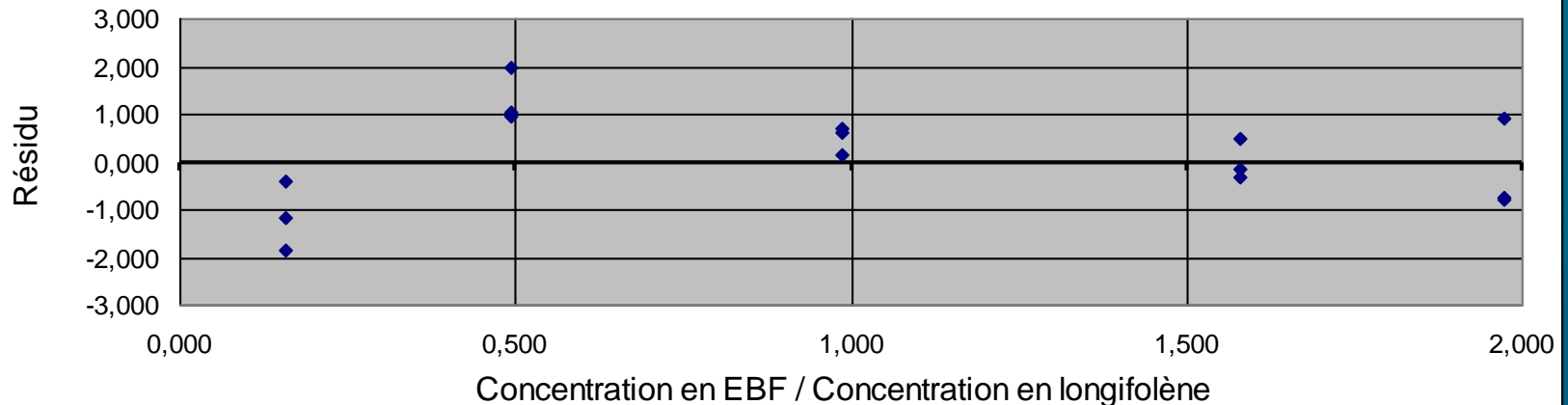
# Droite d'étalonnage

➤ **Linéarité** : satisfaisante si

-  $R^2 > 0.996$  (Roland, 2002)

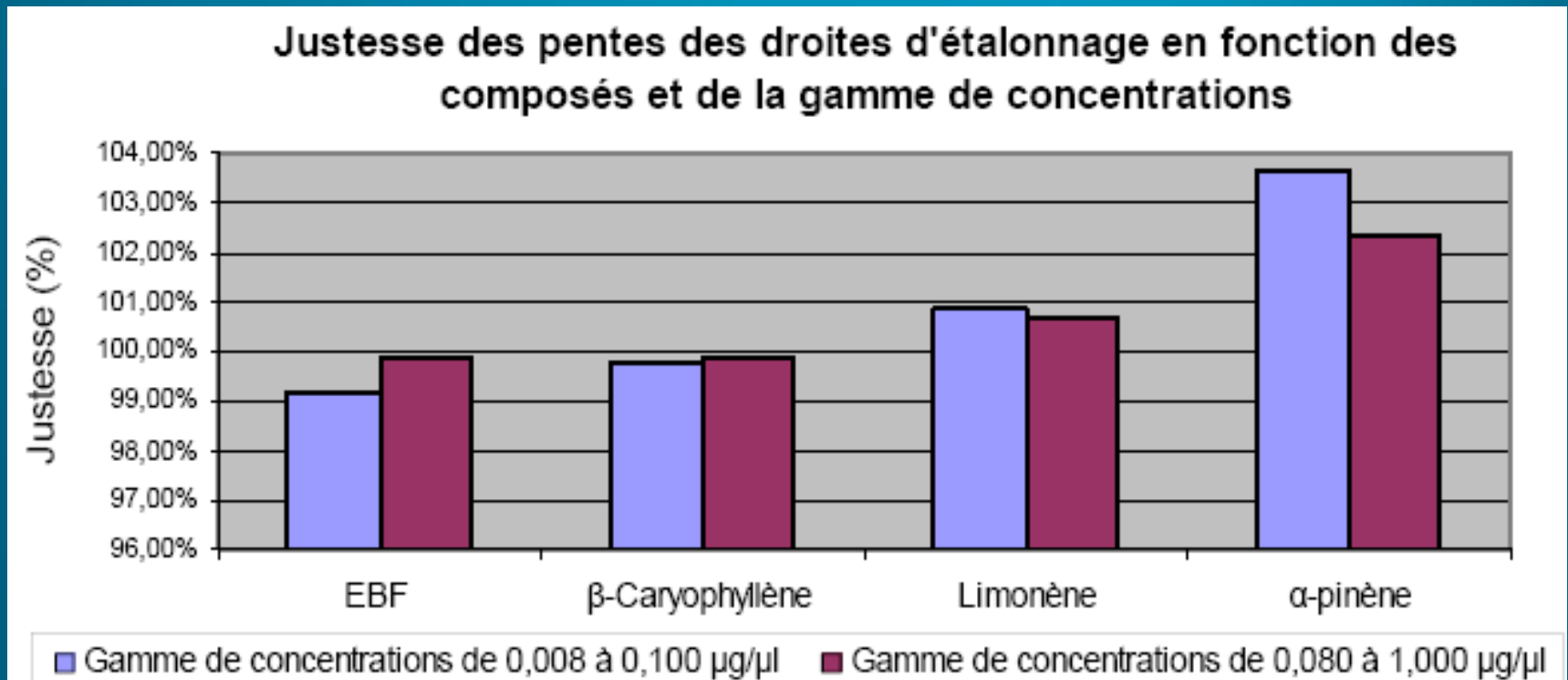
- **Test de Grubb** : résidus réduits de variance constante  $< 2.754$   
en valeur absolue ( $17DL : (3 * 6pt) - 1; \alpha = 0.05$ ) (Dagnelie, 2006)

Résidus réduits de variance constante de la droite d'étalonnage de l'EBF  
(de 0,080 à 1,000 µg/µl)



# Droite d'étalonnage

➤ **Justesse (accuracy of calibration curve)** : définie comme le biais (%) entre la pente mesurée de la droite (construite ultérieurement) et la pente théorique de la droite validée. Comprise entre 90 % et 110 % (*Roland, 2002*)



# Fidélité

➤ **La fidélité** est définie par la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

➤ **Répétabilité:** pour chaque analyte et chaque gamme de concentration, 10 répétitions d'analyse d'un échantillon de concentration définie, le même jour, par une seule personne (n=10). (Range 1 : 0.05 µg/µl ; Range 2 : 0.50 µg/µl)

➤ **Reproductibilité:** pour chaque analyte et chaque gamme de concentration, 10 répétitions d'analyse d'un échantillon de concentration définie, pendant 5 jours différents, par une seule personne (n=50). (Range 1 : 0.05 µg/µl ; Range 2 : 0.50 µg/µl)



# Fidélité

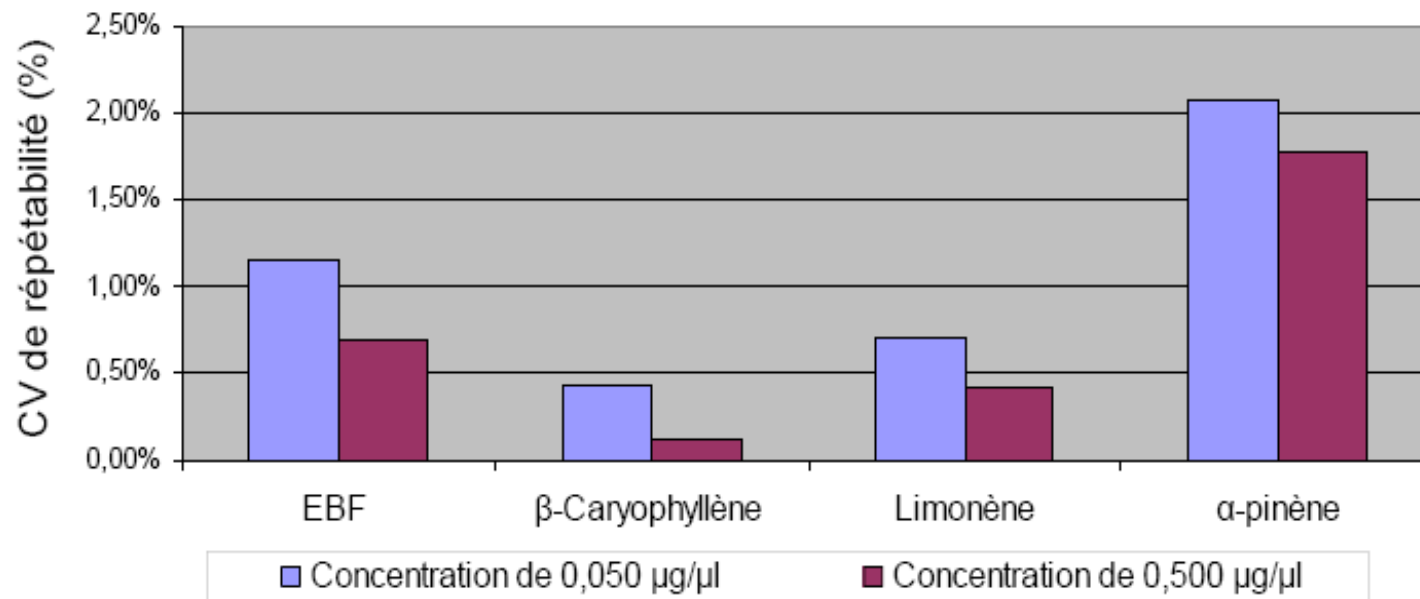
➤ **Les valeurs limites** acceptables des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité dépendent de la concentration des solutions analysées.

Selon la norme AOAC (2006) :

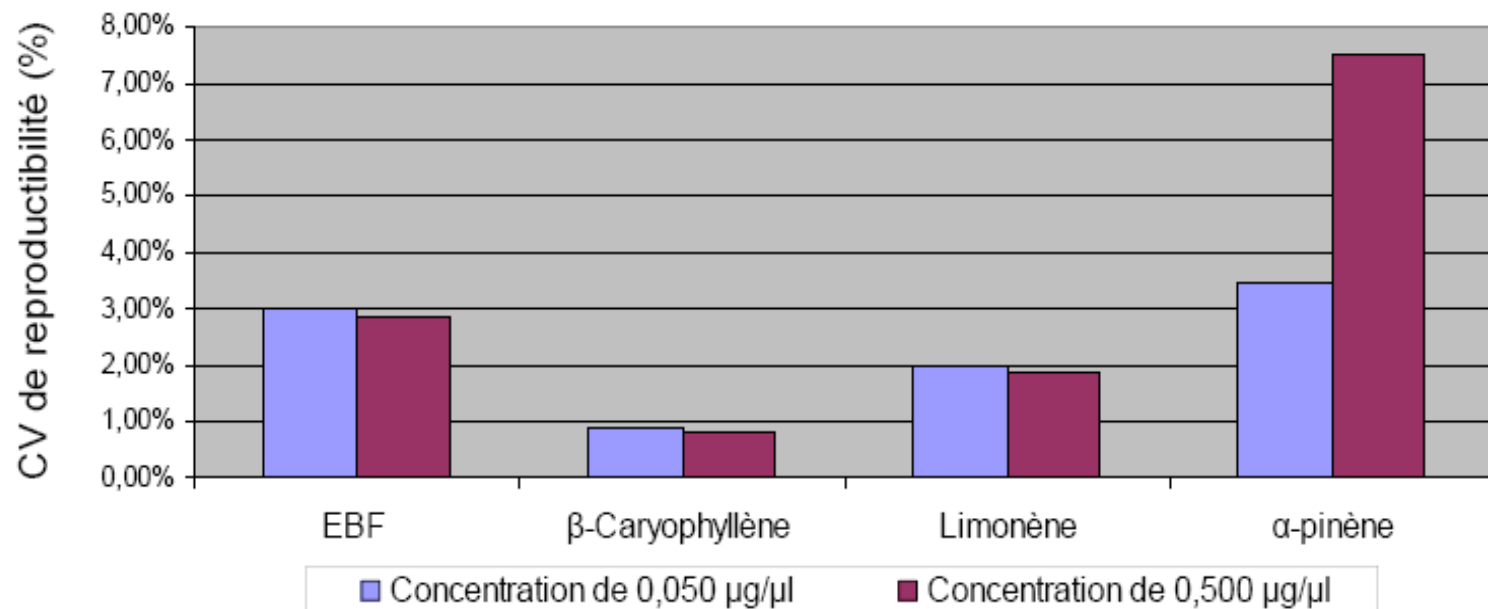
- Range 1 :  $CV_{\text{répétabilité}}$  : 8% ;  $CV_{\text{reproductibilité}}$  : 16%
- Range 2 :  $CV_{\text{répétabilité}}$  : 6% ;  $CV_{\text{reproductibilité}}$  : 12%

	E-β-farnesene		β-caryophyllene		Limonene		α-pinene	
Concentration (μg/μl)	0.050	0.500	0.050	0.500	0.050	0.500	0.050	0.500
Repeatability (RSD, %)	1.16	0.70	0.43	0.12	0.70	0.42	2.07	1.78
Reproducibility (RSD, %)	3.00	2.82	0.89	0.81	1.98	1.89	3.48	7.51

## Répétabilité en fonction des composés et de la concentration



## Reproductibilité en fonction des composés et de la concentration



# Sélectivité

➤ **La sélectivité** de la méthode est définie par le facteur de sélectivité ( $\alpha$ ) entre les pics chromatographiques les plus proches (longifolène et  $\beta$ -caryophyllène)

Pour que la méthode soit sélective,  $\alpha$  doit être supérieur à 1.

$$\alpha = (t'_{R \beta\text{-caryophyllène}} / t'_{R \text{Longifolène}}),$$

où  $t'_{R}$  = temps de rétention réduit

➔ donne une idée de la résolution (séparation) des pics

	Concentration range : 0.008 – 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Concentration range : 0.080 – 1.000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
$\alpha$	1.016	1.016

## II. Validation par profil d'exactitude

# En pratique

- Calibration : établissement d'une fonction de réponse avec des standards de calibration
  - 5 concentrations
  - 3 répétitions de préparation
  - X 3 séries (série = jours différents et/ou opérateurs différents)
- Validation : préparation de standards de validation, traités comme des échantillons inconnus
  - 3 concentrations
  - 3 répétitions
  - X 3 séries
- ➔ *Estimation de la fidélité et de la justesse à partir des valeurs retrouvées pour les standards de validation*

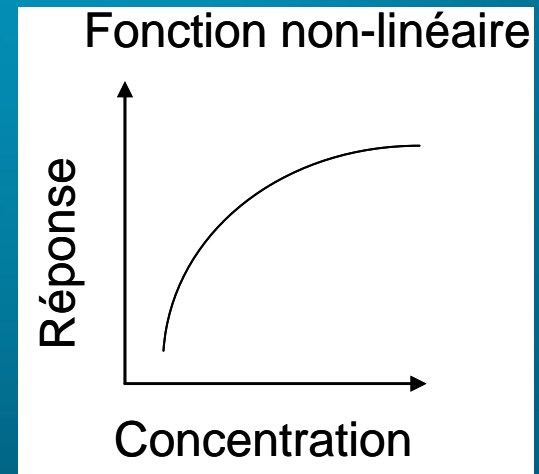
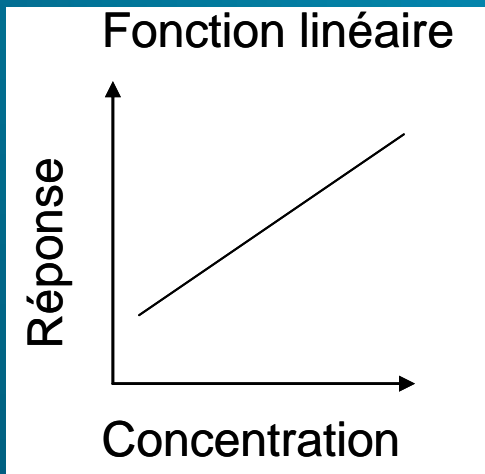
# Traitement des données

Au terme des expériences de validation :

- Pour chaque série, établir les *Fonctions de réponse* ( $Y=f(x)$ ) avec les standards de calibration.
- Tester des **modèles mathématiques** de régression.
- Calculer pour chacune des séries, les **concentrations** sur base des standards de validation et des fonctions de réponse correspondantes + **linéarité** de la méthode
- Calculer pour chaque niveau de concentration, la **justesse** et la **fidélité**.
- Estimer les **limites de tolérance bilatérales de l'exactitude** pour chaque niveau de concentration.
- Tracer les **profils d'exactitude** correspondant aux modèles de régression sélectionnés.

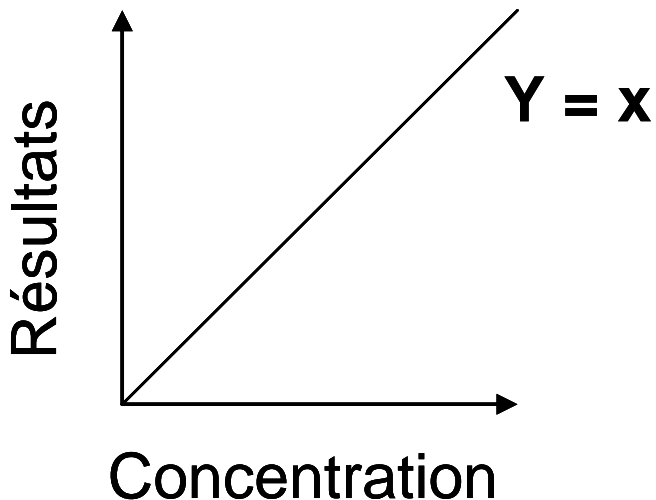
# La fonction de réponse

- Fonction de réponse, courbe de calibration (angl : calibration curve) : La fonction de réponse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal du détecteur, aire de pic, ratio d'aires si SI,...) et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon. Cette courbe de calibration ne doit pas obligatoirement être une droite.



# La linéarité

- Linéarité (angl : linearity) : la linéarité d'une procédure analytique est sa 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 »

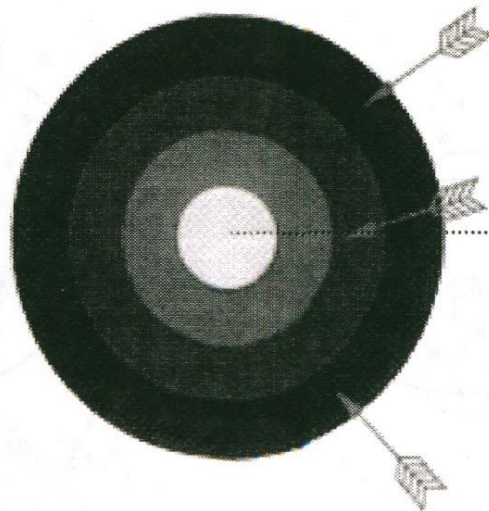
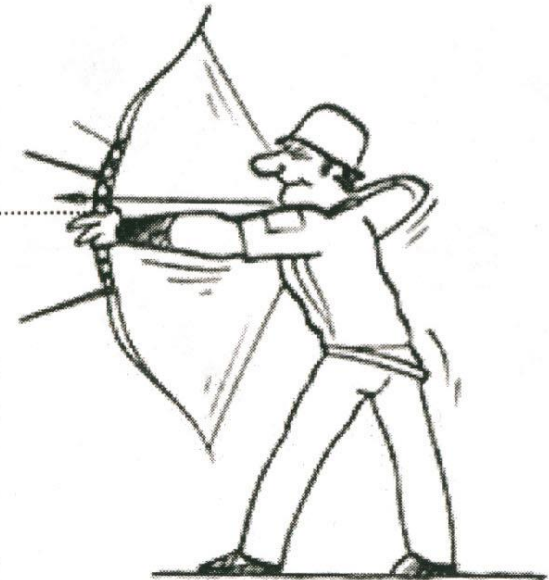
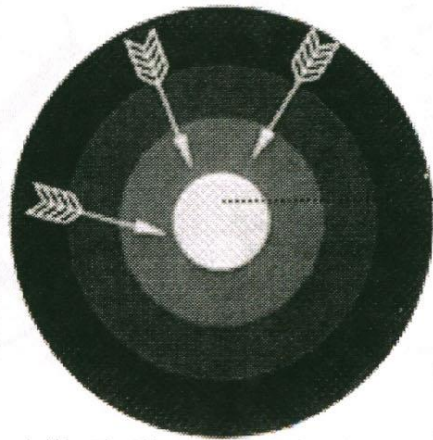
Résultats = quantité mesurée par la courbe de calibration (fonction de réponse) : « back-calculated concentration »



# L'intervalle de dosage

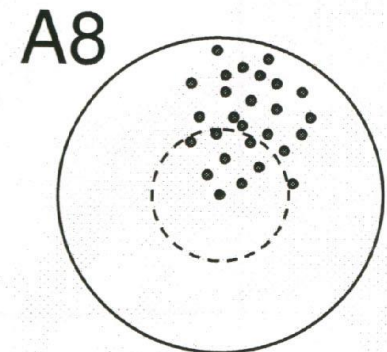
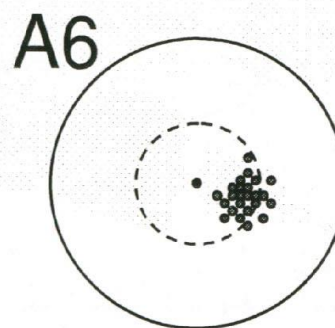
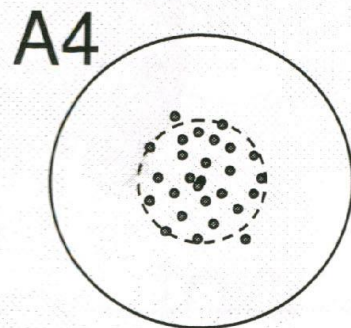
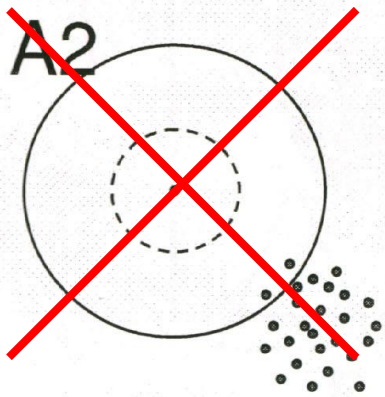
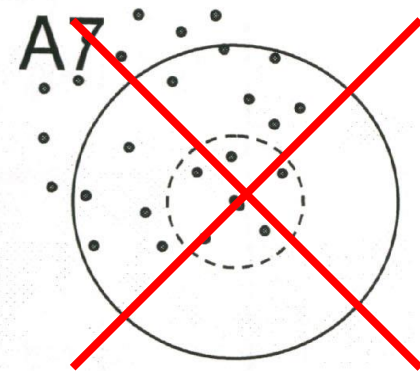
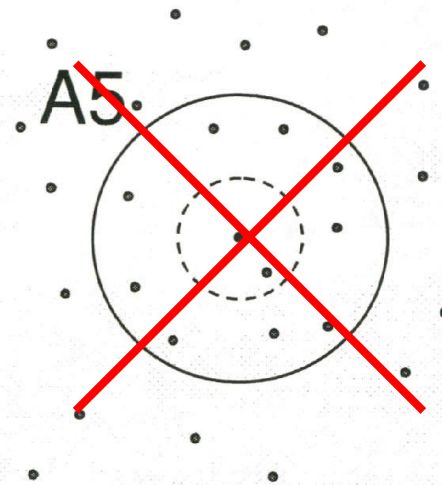
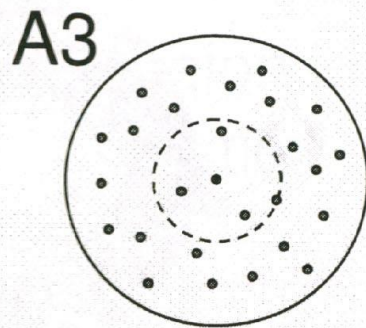
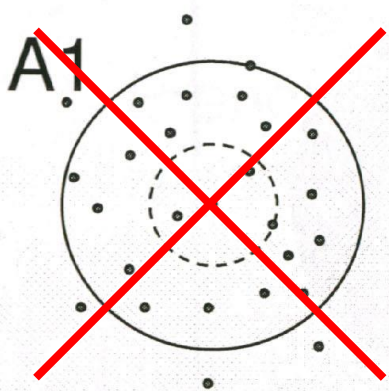
- *Intervalle de dosage (angl : range)* : l'intervalle de dosage d'une procédure d'analyse est la région entre les niveaux supérieurs et inférieurs (ces valeurs incluses) pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à sa fidélité, sa justesse, son exactitude et sa linéarité, en utilisant la méthode décrite.

# Illustration : archers - cibles



# Illustration : archers - cibles

Quelle décision prendre?

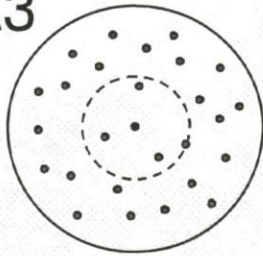


# Illustration : archers - cibles

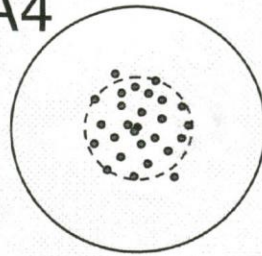
Quels risques?

A3

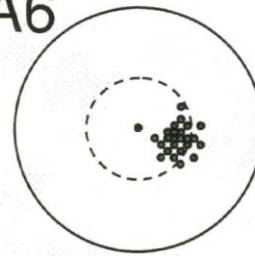
Archers



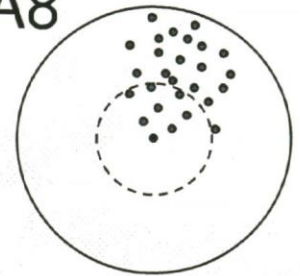
A4



A6



A8



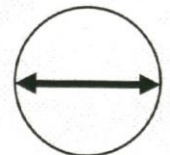
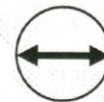
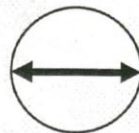
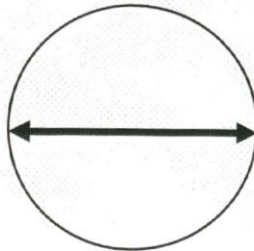
Justesse

Moyenne



Fidélité

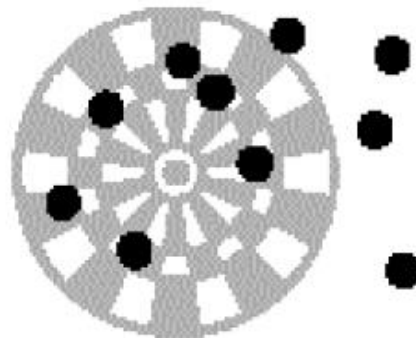
Variabilité



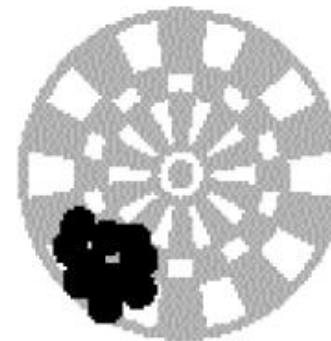
# Illustration : archers - cibles

En résumé

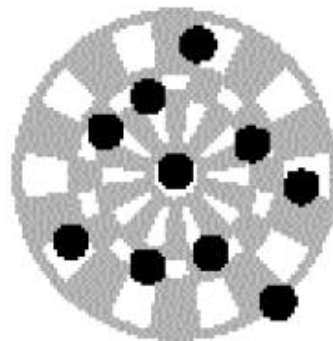
Non fidèle  
non juste



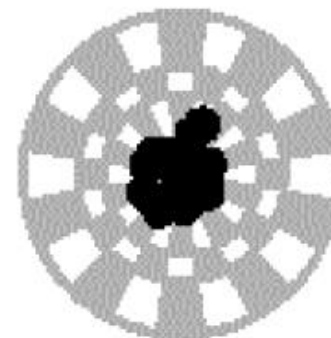
Fidèle  
non juste



Non Fidèle  
Peut être juste?



Fidèle  
juste



*Cible*

# La fidélité

➤ Fidélité (angl : Precision) : mesure la dispersion des résultats, les écarts des résultats par rapport à la moyenne. **Erreur aléatoire.**

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essai indépendants) dans des conditions prescrites.

- ➔ 3 niveaux :
- répétabilité
  - fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)
  - reproductibilité (inter-laboratoire)

# La répétabilité

- Répétabilité (angl : repeatability) : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essai identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

# La fidélité intermédiaire

➤ *Fidélité intermédiaire (angl : intermediate precision) :*

Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essai identiques, dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné (pas obligatoirement des jours consécutifs).



# La reproductibilité

- Reproductibilité (angl : reproducibility) : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essai identiques, dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents.

# La justesse

- Justesse (angl : Trueness) : est mesurée par le biais (ou le taux de recouvrement = recovery) 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 ». **Erreur systématique.**

**Biais = Moyenne des résultats (M) – Valeur « vraie » ( $\mu$ )**

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

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

# L'exactitude

- Exactitude (angl : accuracy) : se mesure par l'écart des résultats par rapport à la valeur « vraie ». Combinaison de la fidélité et de la justesse. **Erreur totale.**

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.

**Erreur totale = Biais + Ecart-type**

**Erreur totale = Erreur systématique + Erreur aléatoire**

**Exactitude = Justesse + Fidélité**

# L'exactitude

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

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

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

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

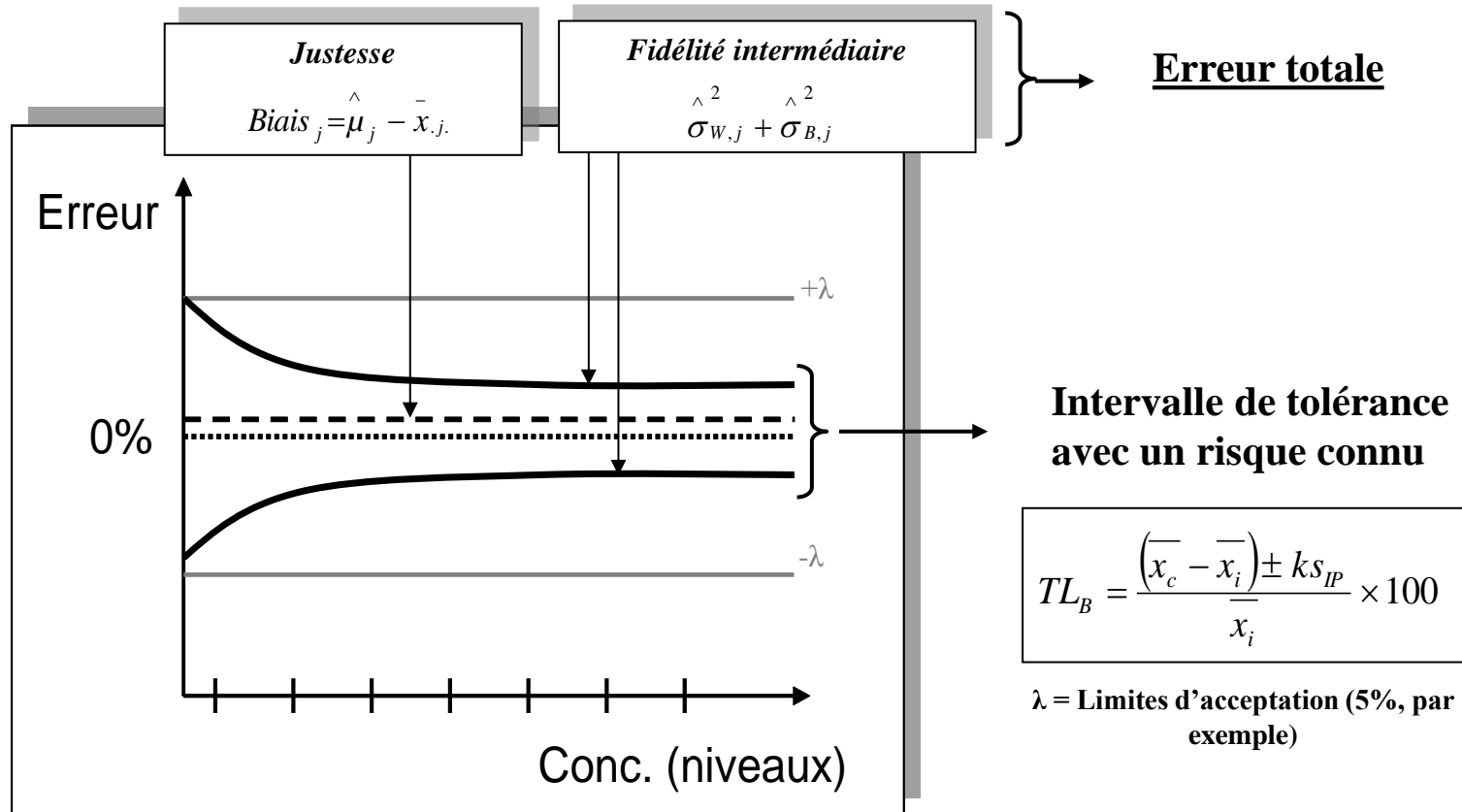
$$x_i - \mu_T = \text{Erreur totale}$$

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

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

# L'exactitude

## Profil d'exactitude



# La limite de détection

- Limite de détection (LOD) : la limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

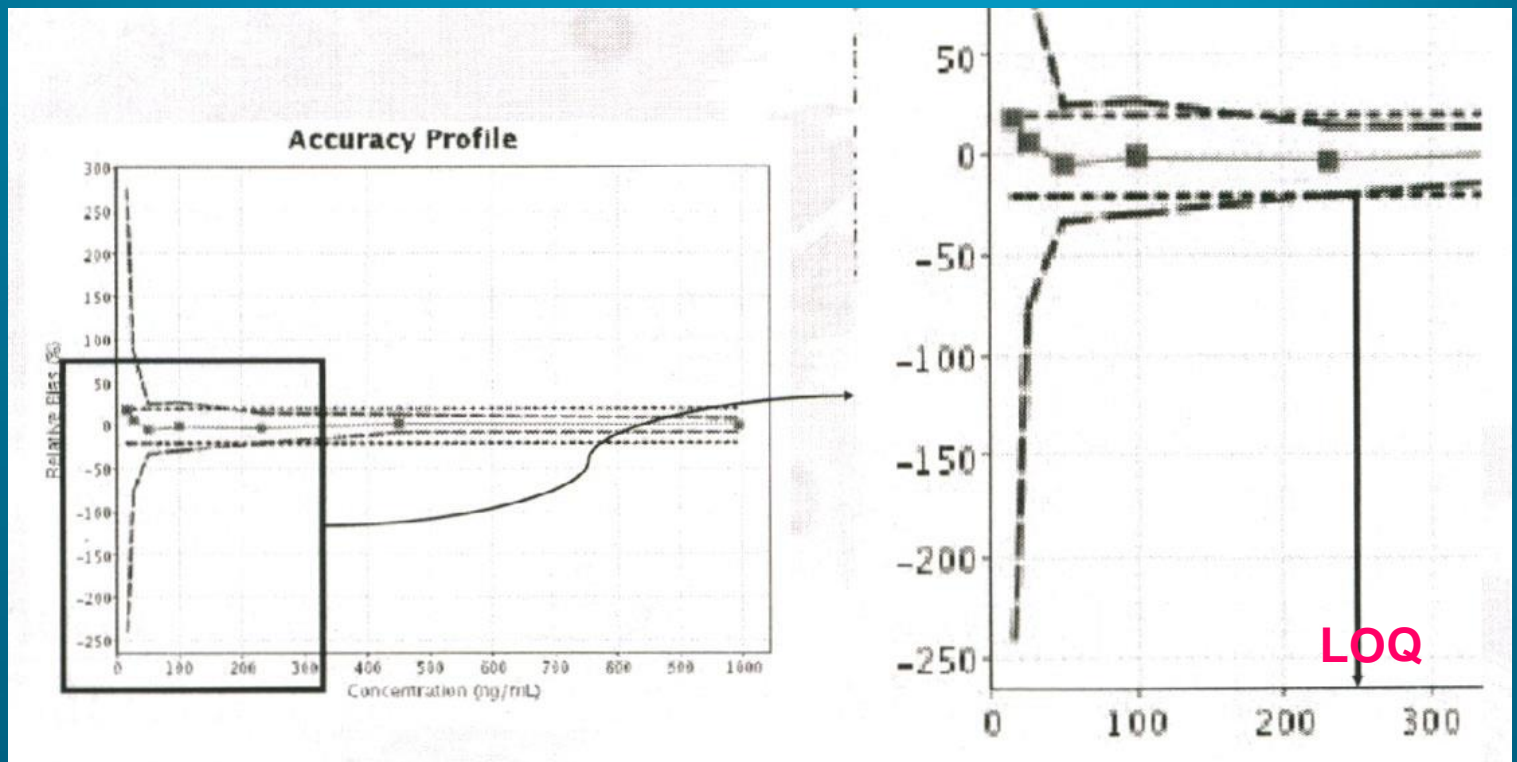
# La limite de quantification

- Limite de quantification (LOQ) : La limite de quantification est la 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
  - ➔ LOQ + estimation de l'exactitude associée.

# La limite de quantification

## Limite de quantification :

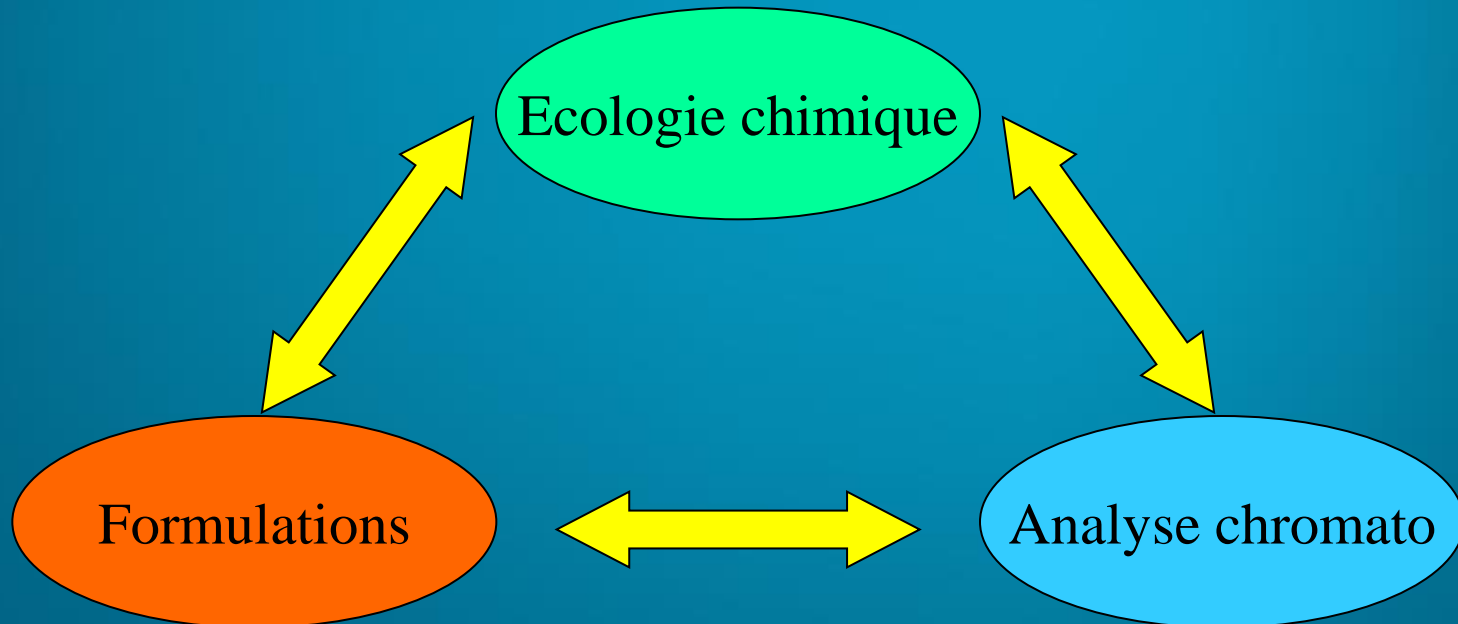
Intersection des limites d'acceptation et des limites de tolérance





# Conclusions

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



→ **En constante évolution**

## Ecologie chimique

Compréhension des comportements des insectes :

- Connaissance des systèmes tritrophiques et des cycles de reproduction
- Analyse des phéromones libérées : GCMS
- Observations et tests en laboratoire avec les sémiochimiques (NOLDUS, EAG, olfacto,...)
- Expérimentations en champs avec les formulations

## Formulations

- Connaître les besoins des agriculteurs
- Choix de la matrice polymérique (biodégradable ou non, liquide, solide) : but recherché ?
- Influence des paramètres physico-chimiques : dépend aussi de la zone géographique visée
- Mise en œuvre en laboratoire : mesure de cinétiques (GC)
- Tests et validation au champ

## Analyse chromatographique

- Intérêt de la spectrométrie de masse : identification de molécules libérées par plantes, insectes,...
- Performances de la Fast GC : rapidité, grand nombre d'échantillons, sensibilité, facilité d'utilisation → Originalité
- Détermination de cinétiques de relargage
- Validation de méthode intégrée dans le cycle de vie d'une procédure d'analyse

**Merci de votre attention**

**Questions???**