

L'étude des sémiochimiques

Applications en écologie chimique

Dr. Stéphanie Heuskin

1^{er} assistante

Laboratoire de Chimie Analytique, GxABT-ULg

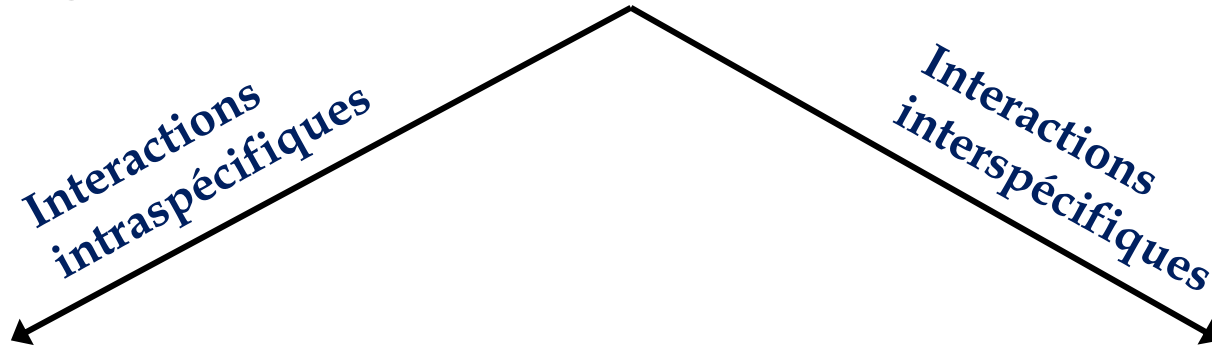
Définition et exemples

Les sémiochimiques : définition

Molécules naturelles produites par des organismes vivants et intervenant comme moyen de communication intra- ou interspécifique

Sémiochimiques

Signaux de communication plantes-insectes-insectes



Phéromones

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

Substances allélochimiques

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

Une même molécule peut à la fois être une phéromone et une substance allélochimique

L'utilisation des sémiochimiques en lutte intégrée

Integrated Pest Management (IPM)

Définitions de la lutte intégrée :

FAO : « conception de la protection des cultures dont l'application fait intervenir un ensemble de méthodes satisfaisant les exigences à la fois écologiques, économiques et toxicologiques en réservant la priorité à la mise en œuvre délibérée des éléments naturels de limitation et en respectant les seuils de tolérance »

Directive communautaire 91/414/CEE : « L'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturelles ou intéressant la sélection des végétaux dans laquelle l'emploi de produits chimiques phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous de seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables. »

Les stratégies de contrôle des nuisibles en IPM

1. Monitoring :

- détecter la présence d'insectes nuisibles invasifs
- déterminer la densité d'une population de nuisibles dans un site spécifique

➔ Permet de prendre des mesures de contrôles
(ex: application localisée d'insecticide)

Les stratégies de contrôle des nuisibles en IPM

2. Trapping:

- piéger un grand nombre de nuisibles dans une zone déterminée (après monitoring)
- attraction avec sémiochimiques spécifiques
- « lure and kill » : piège associée à une substance pesticide (contact de l'insecte, pas de contact avec la culture)

Les stratégies de contrôle des nuisibles en IPM

3. Mating disruption :

- principalement pour Lépidoptères (moths)
- confusion sexuelle en dispersant dans l'atmosphère des quantités importantes de phéromones sexuelles spécifiques à l'espèce ciblée.
- perturbation du comportement des mâles →
incapables de localiser une femelle pour se reproduire

(voir Miller et al., 2006 et Stelinski, 2007 pour une revue des mécanismes biologiques impliqués)

Les stratégies de contrôle des nuisibles en IPM

4. Push-Pull :

- combinaison de stimuli (sémiochimiques) répulsifs et attractifs
- insectes nuisibles d'abord repoussés de la culture (PUSH)
- puis attirés avec d'autres molécules (PULL) loin de la culture pour y être piégés et/ou tués de façon contrôlée

Les stratégies de contrôle des nuisibles en IPM

5. Contrôle biologique :

- « *The use of living organisms (insects or pathogens) to suppress pest populations, making them less damaging than they would otherwise be* » (Stoner, 2004).

- attraction (sémiochimiques) ou introduction d'insectes bénéfiques, prédateurs ou parasitoïdes des nuisibles

Attention : introduction d'insectes « exotiques »

(cas de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis*)

Les diffuseurs à sémiochimiques

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

1. Origine de la matrice et des composés volatils ?

- * Naturelle

- * De synthèse

➔ Prendre en compte :

- coûts

- faisabilité

- impact écologique

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

2. Type de diffuseur?

* Solide : - à disperser (billes de polymère)

Diffuseur solide à disperser



*Billes d'alginate
contenant
E- β -farnésène*

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

2. Type de diffuseur?

- * Solide : - à disperser (billes de polymère)
- à suspendre

Diffuseurs solides à suspendre



« Rubber septum »



Piège collant (trapping)



No Mate[®] (mating
disruption)



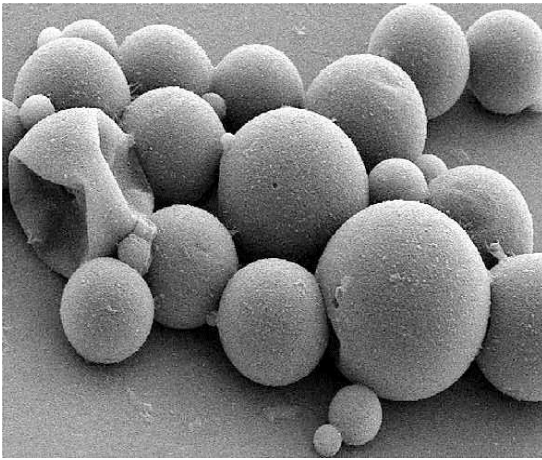
Isomate[®] (mating
disruption)

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

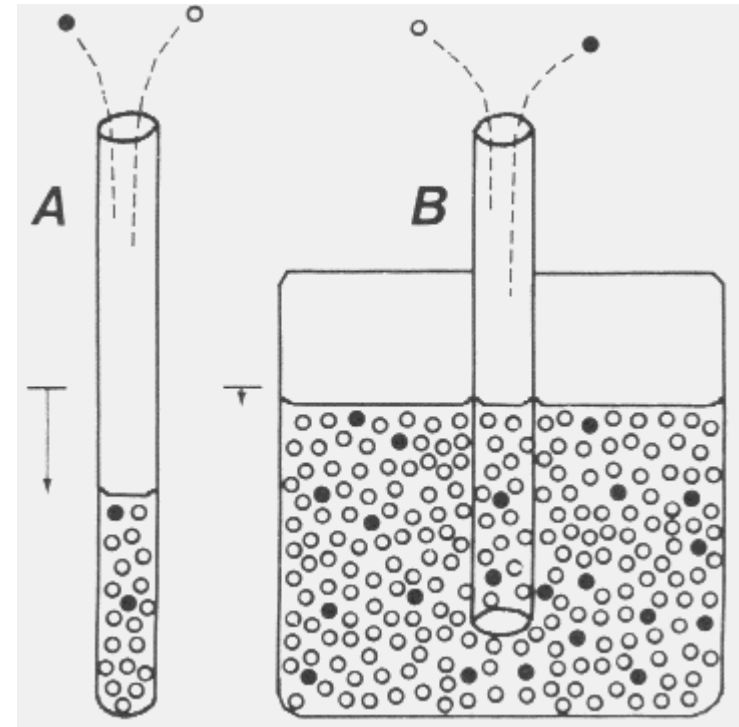
2. Type de diffuseur?

- * Liquide : - pulvérisation
(matrice « environmentally-safe »)
 - réservoir
(diffusion ou « puff automatique)

Diffuseurs liquides

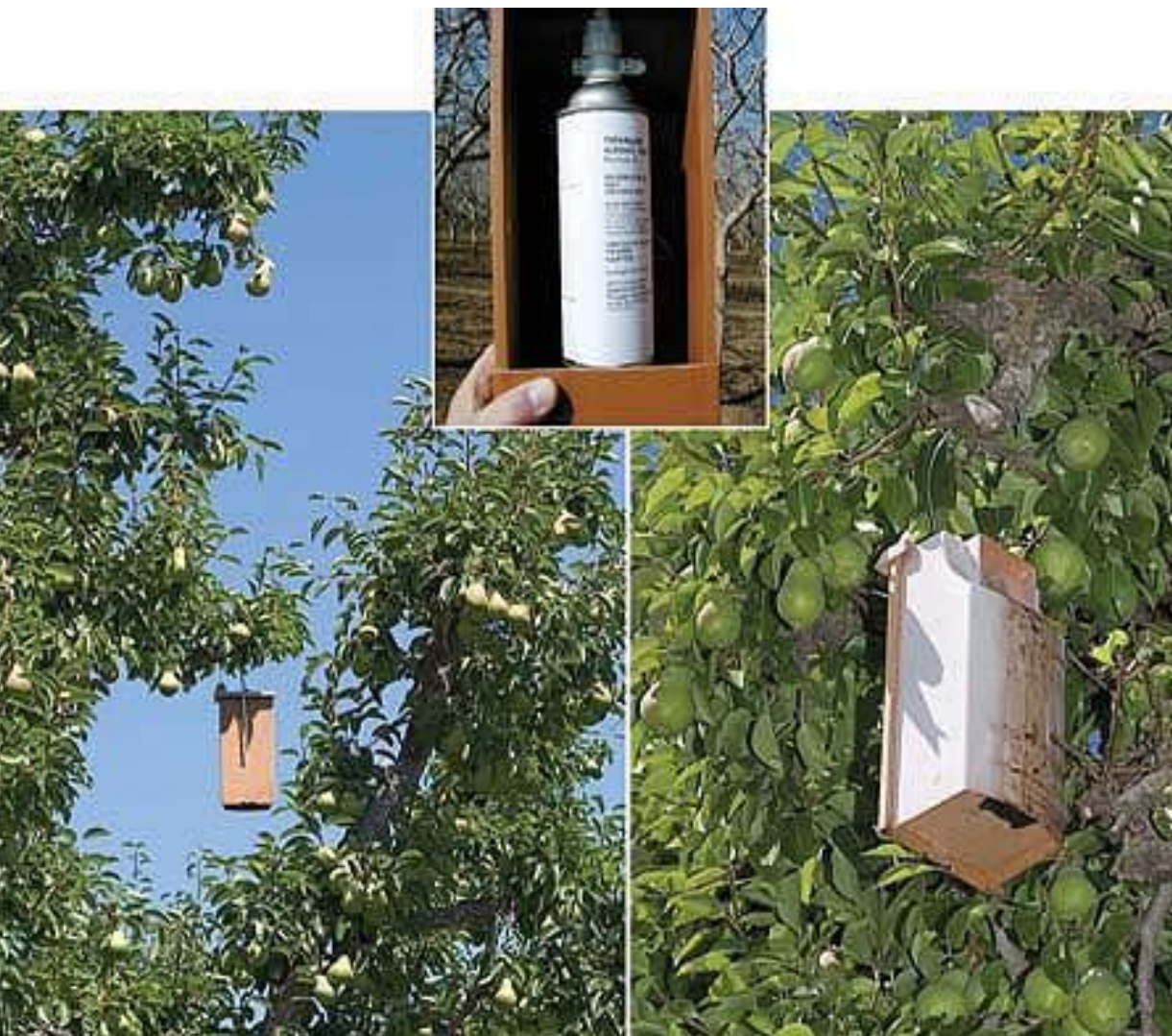


Formulation à pulvériser
(microcapsule à phéromone)



Réservoir : diffusion
(Byers J., 1988)

Diffuseurs liquides



Aérosol
(Suttera ® puffer)

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

2. Type de diffuseur?

Choix fonction :

- du type de culture
- de la surface à couvrir
- de la nature du sémiochimique

➔ Protection vis-à-vis dégradation UV et O₂ : ajout d'antioxydants, stabilisateurs UV

Comment aboutir à la réalisation d'un diffuseur?

3. Concentration en sémiochimique dans le diffuseur ?

- taux de diffusion contrôlé au sein de la formulation
- taux suffisant pour être perçu par insectes
- diffusion efficace durant toute la période de présence des nuisibles

➔ Etude de la cinétique de diffusion

(idéalement ordre 0 = taux constant MAIS difficile à atteindre

Généralement diminution du taux au cours du temps)

La chimie au service de l'écologie

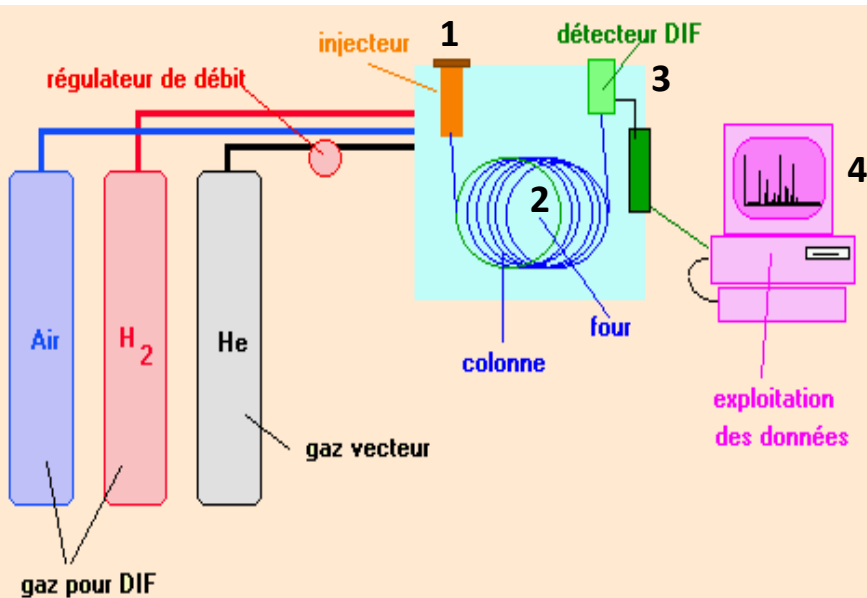
Nécessité d'une approche CHIMIQUE

Pour:

- **identifier** les molécules sémiochimiques et comprendre les comportements biologiques
- **quantifier** les composés émis ou diffusés
- **formuler** les sémiochimiques dans les diffuseurs
- **vérifier** les taux de diffusion

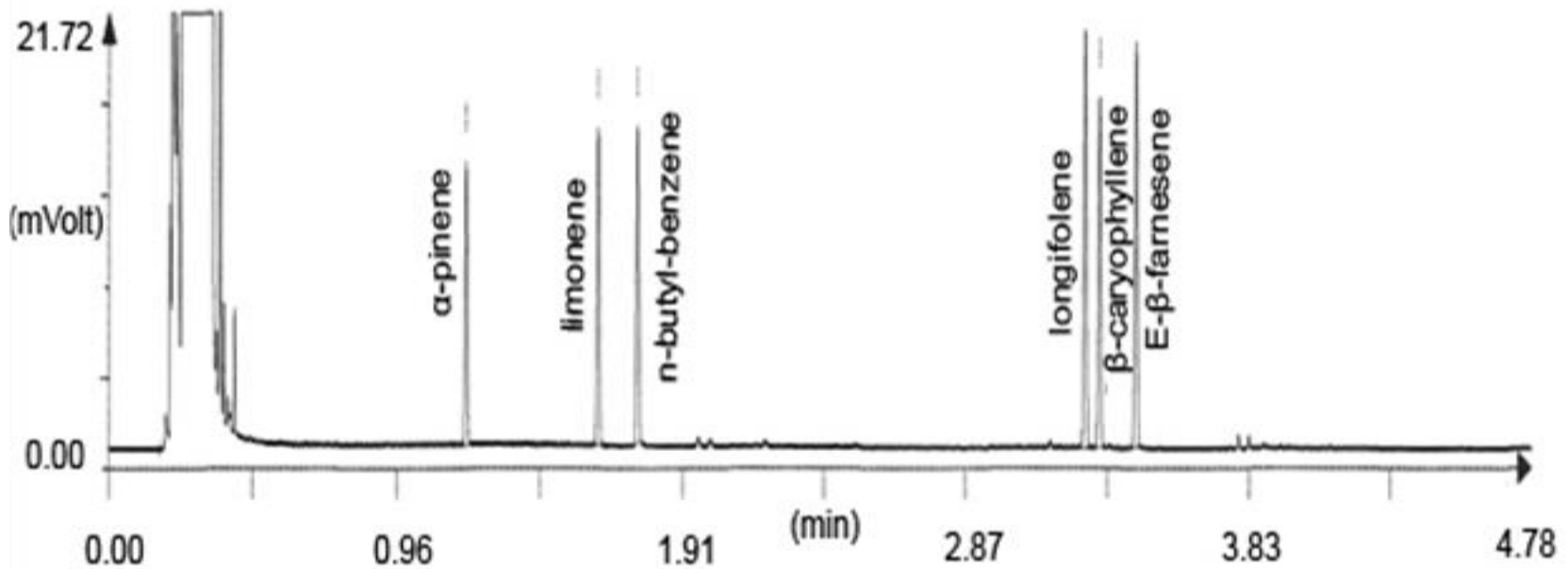
La chromatographie en phase gazeuse

Principe de fonctionnement



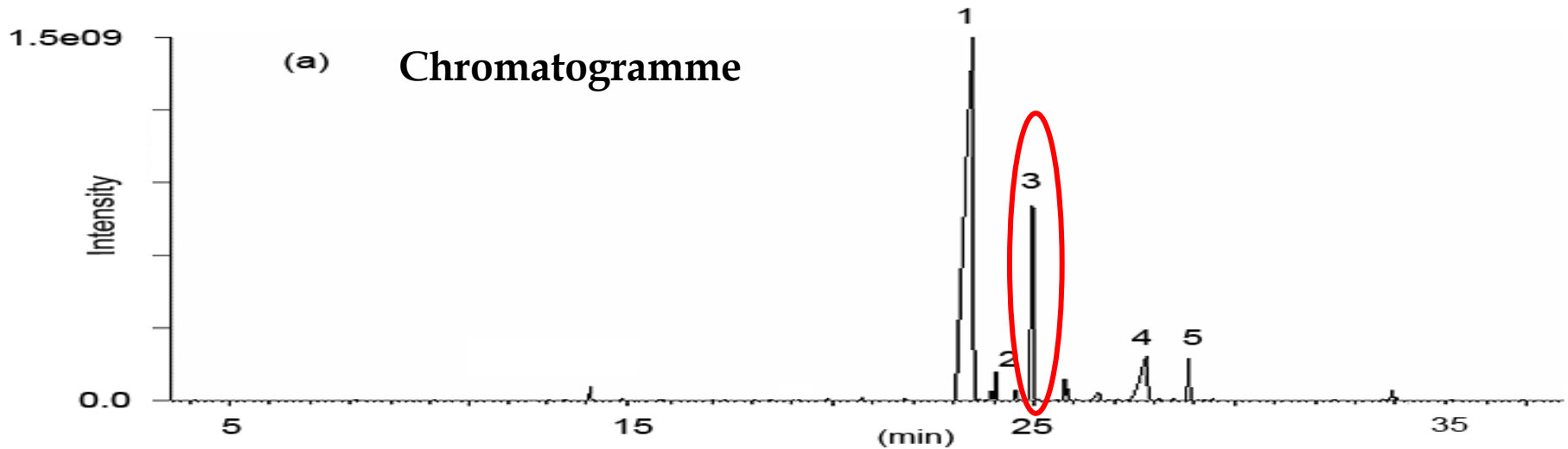
1. Injection du mélange à analyser en amont de la colonne via l'injecteur.
2. Séparation des composés volatils dans la colonne grâce à leurs affinités respectives pour la phase stationnaire. Les composés sont poussés par le flux de la phase mobile (gaz vecteur).
3. A la sortie de la colonne, les composés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

La chromatographie en phase gazeuse (CPG)



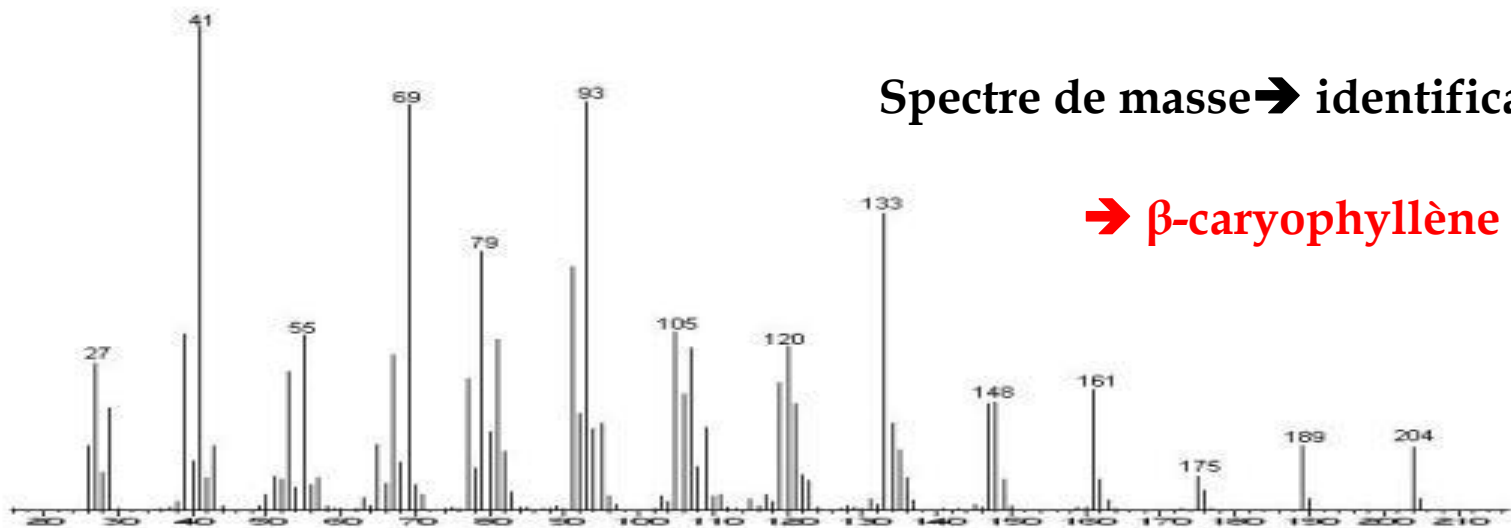
Chaque pic correspond à un composé du mélange analysé

La CPG couplée au spectromètre de masse



Spectre de masse → identification

→ β-caryophyllène



Un exemple d'application

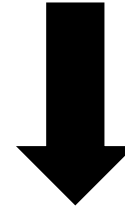
Projet SOLAPHID (Waleo 2)



Développement de formulations de contrôle
biologique contre les pucerons

Le problème des pucerons

Dommmages 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



Cas du puceron – système tritrophique

1^{er} niveau

Plante



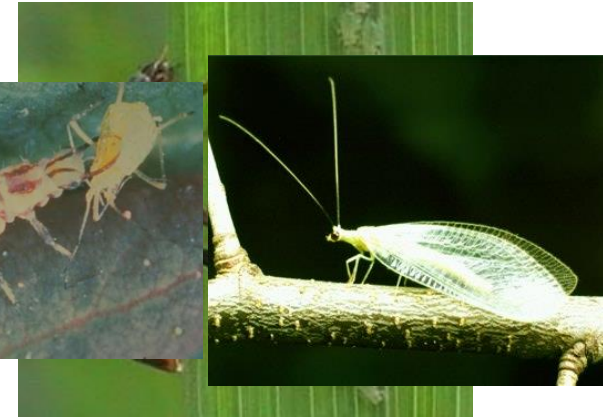
2^{ème} niveau

Pucerons



3^{ème} niveau

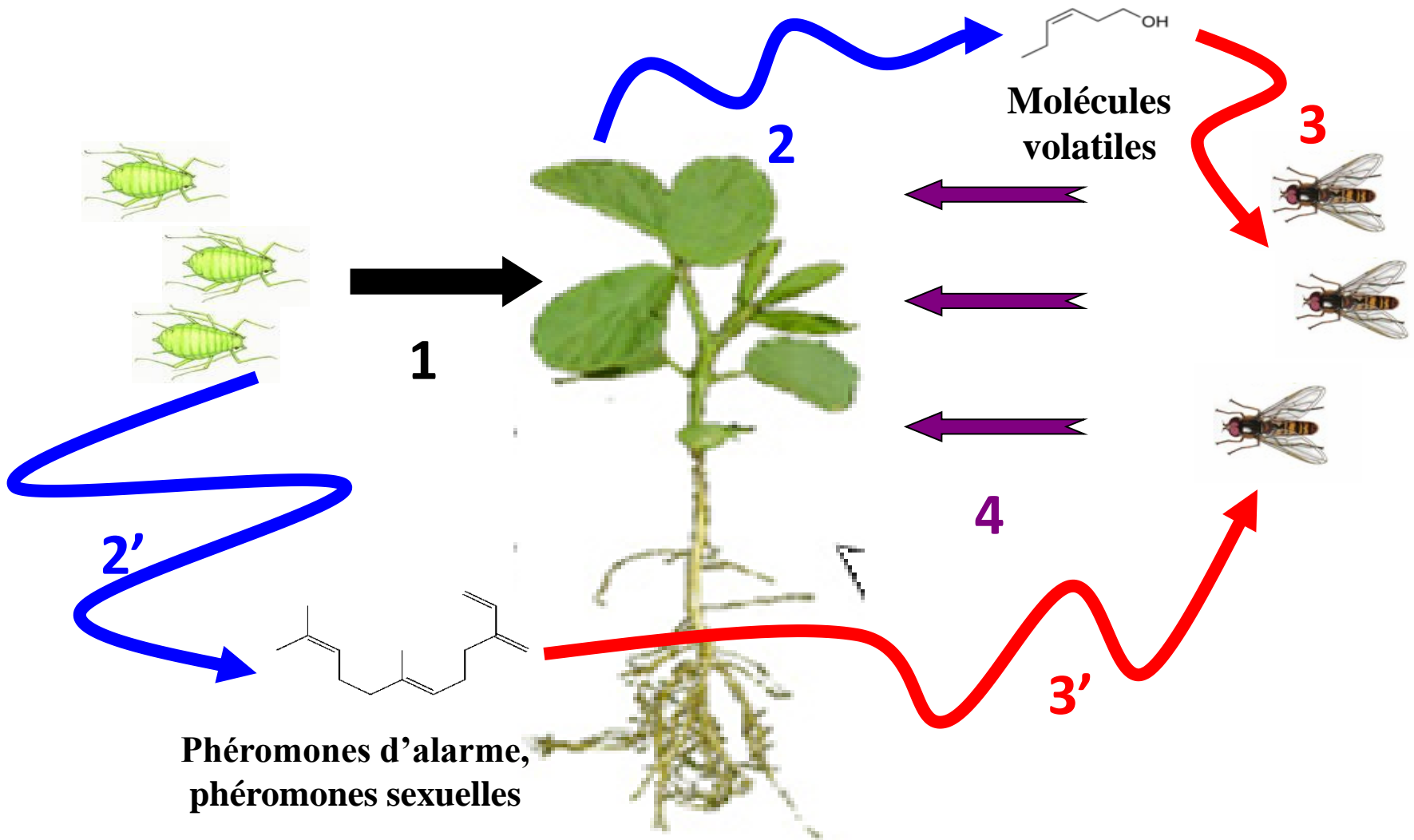
Prédateurs



Parasitoïdes

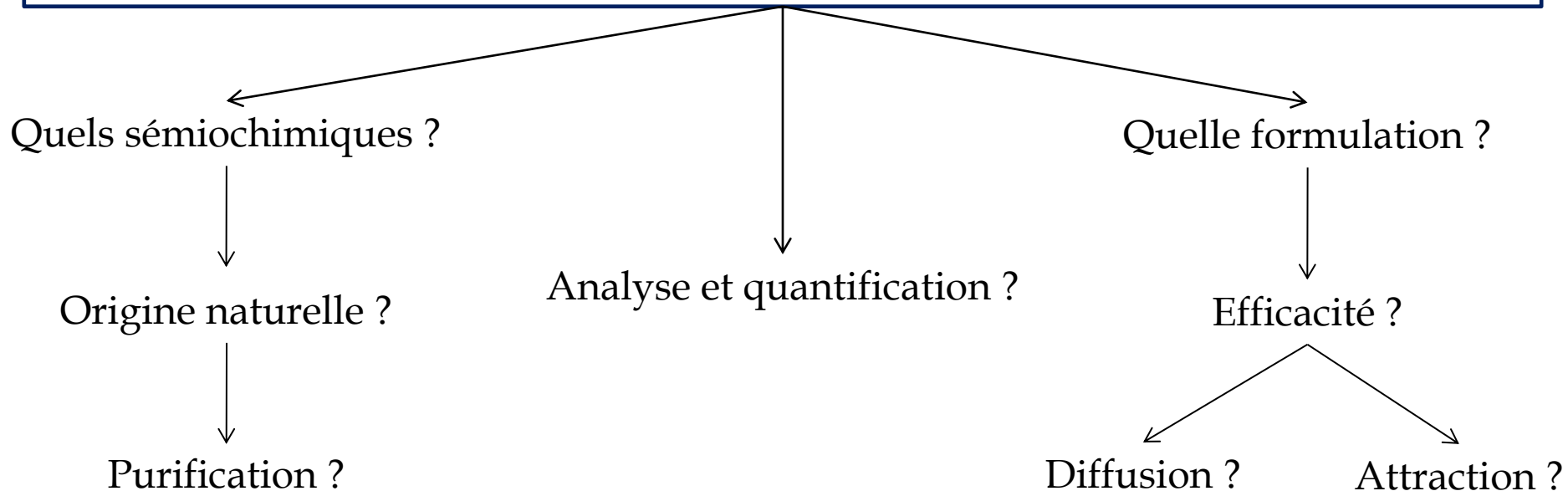


→ Communication chimique : sémiochimiques



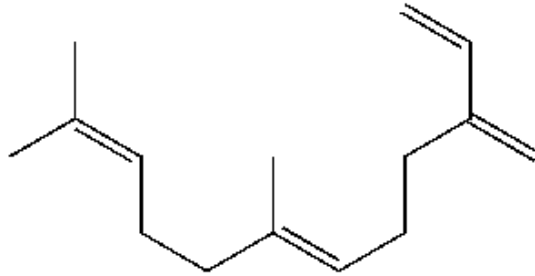
Objectif global

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 origine des sémiochimiques

E-β-farnésène

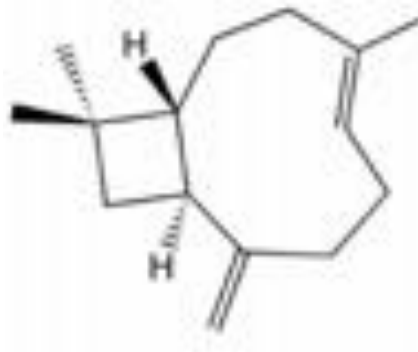


Sesquiterpène
(C₁₅H₂₄)



- Phéromone 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

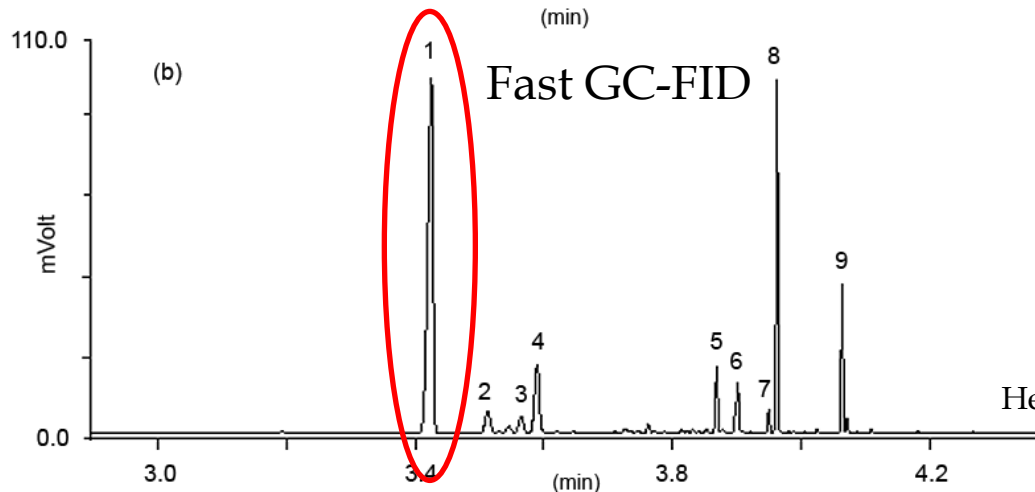
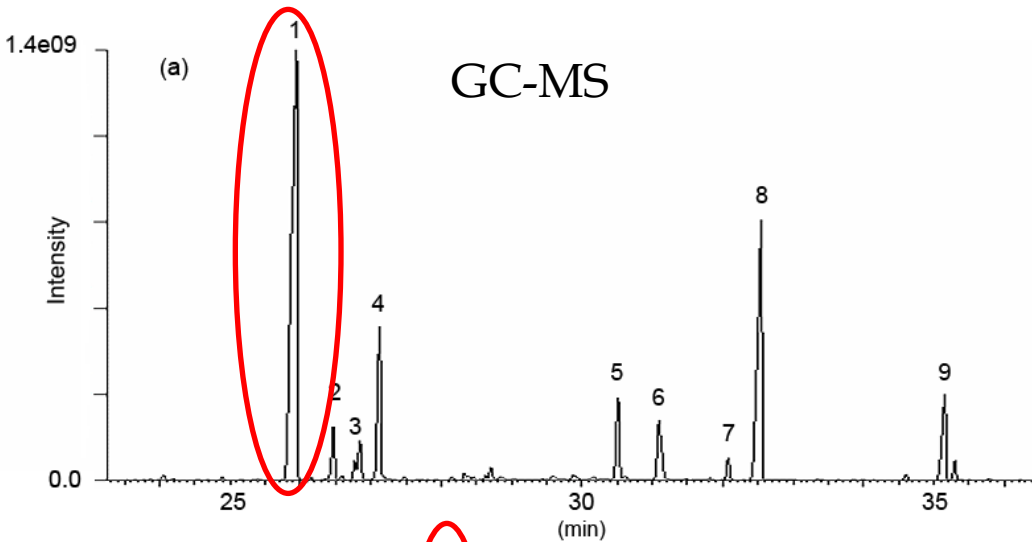
- *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae): *E*- β -farnésène
- *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae): *E*- β -caryophyllène



Caractérisation chimique des HE

Caractérisation des huiles essentielles

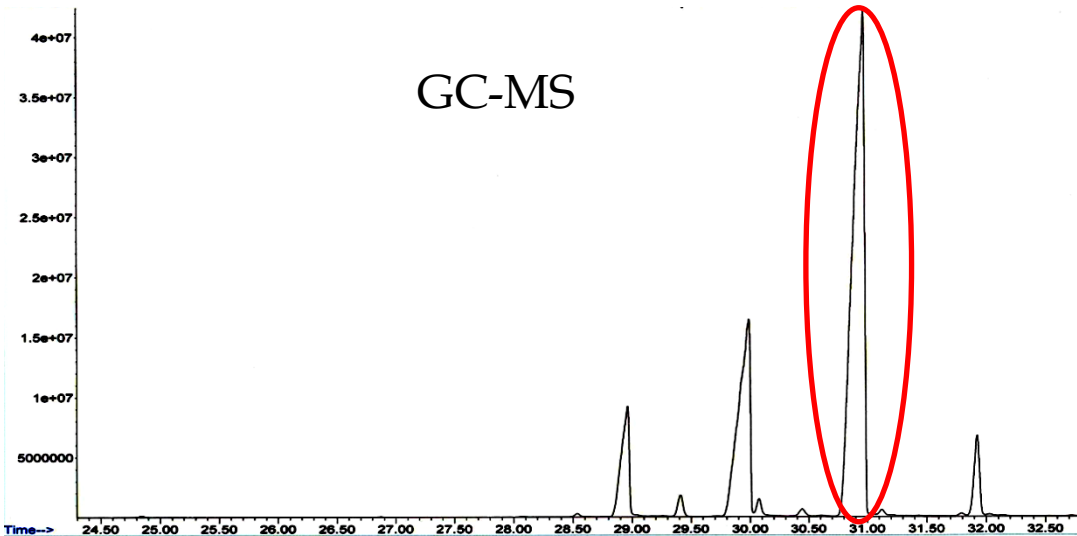
Matricaria chamomilla L. (originaire du Népal)



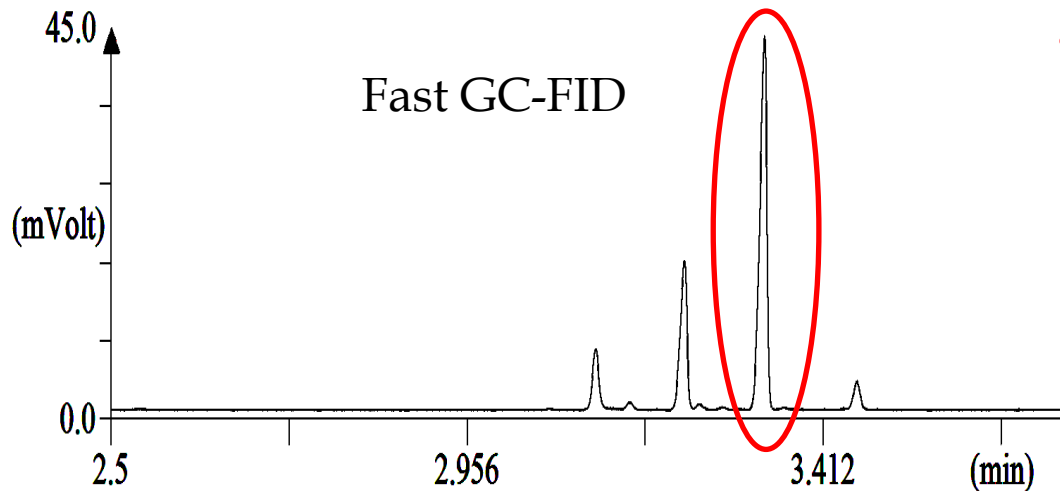
N°	Major compounds	Retention index	%
1	E-β-farnesene	1456	42,6
2	Germacrene D	1478	2,9
3	bicyclogermacrene	1494	1,9
4	(E,E)-α-farnesene	1506	8,3
5	α-bisabolol oxide B	1649	4,4
6	α-bisabolone oxide A	1673	4,5
7	Chamazulene	1715	1,1
8	α-bisabolol oxide A	1735	21,1
9	Cis-ene-yne-dicycloether	1802	5,9

Caractérisation des huiles essentielles

Nepeta cataria L. (originaire du Canada)



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 %



Validation analytique

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

Validation analytique

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.*

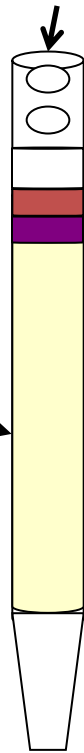
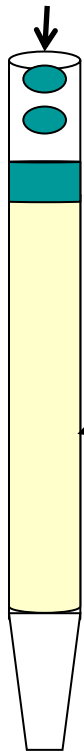
Purification des sémiochimiques

Fractionnement des huiles essentielles

Chromatographie sur colonne de silice

Essential oil

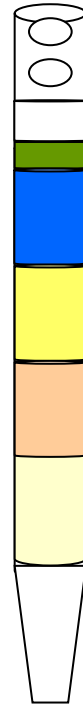
Solvent of elution



Silica gel

1. Essential oil in the head of the column

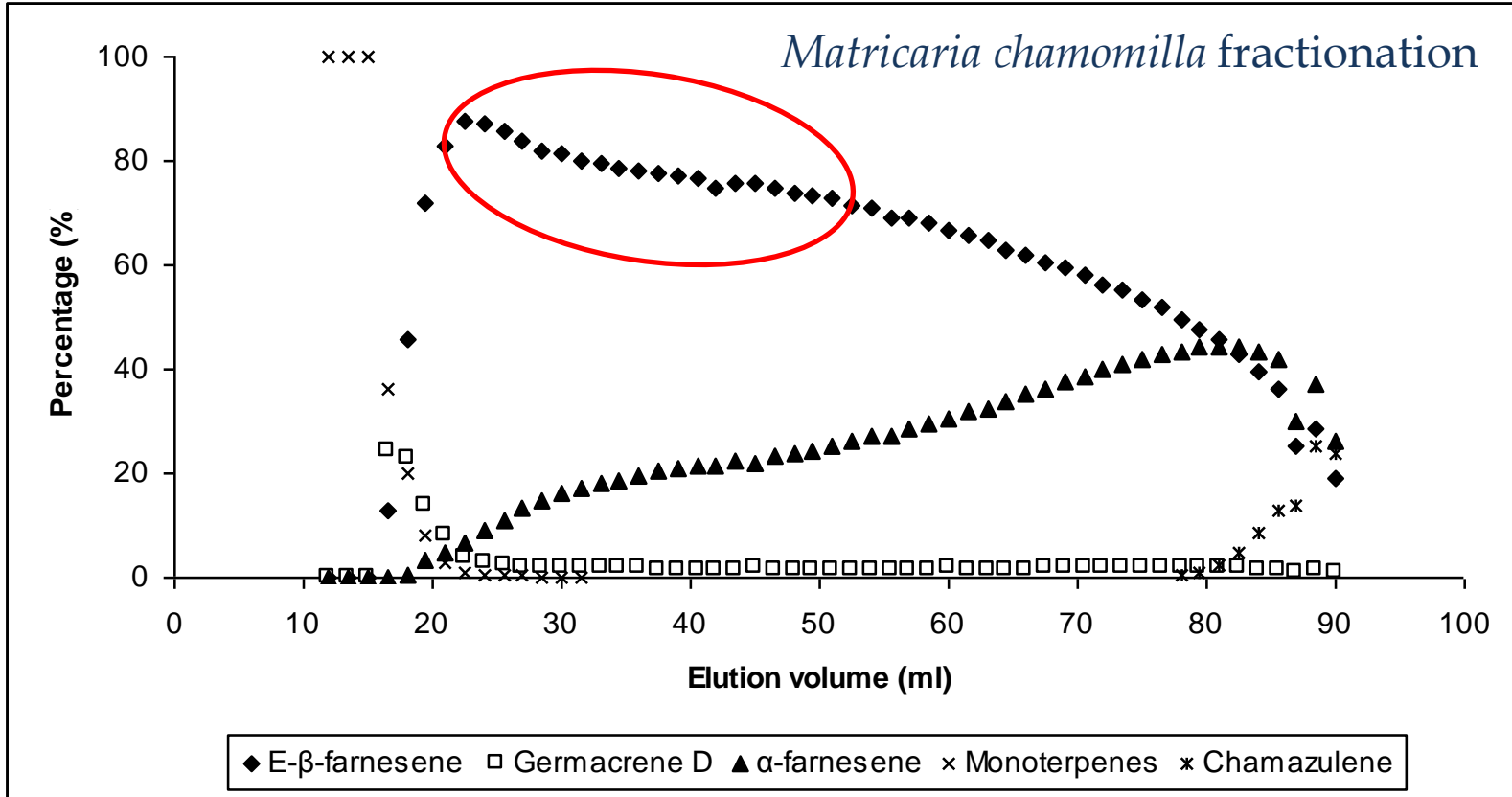
2. Beginning of the elution with solvent



Semochemical of interest

3. Elution process

4. Collection of the semiochemical of interest



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

Chromatographie Flash : plus grande échelle



10 ml huile essentielle déposés sur 110 g de silice déshydratée



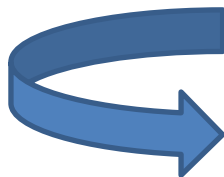
Elution au n-pentane sous pression ($N_2 = 0.5$ bar)



Collecte de fractions concentrées + évaporation du solvant



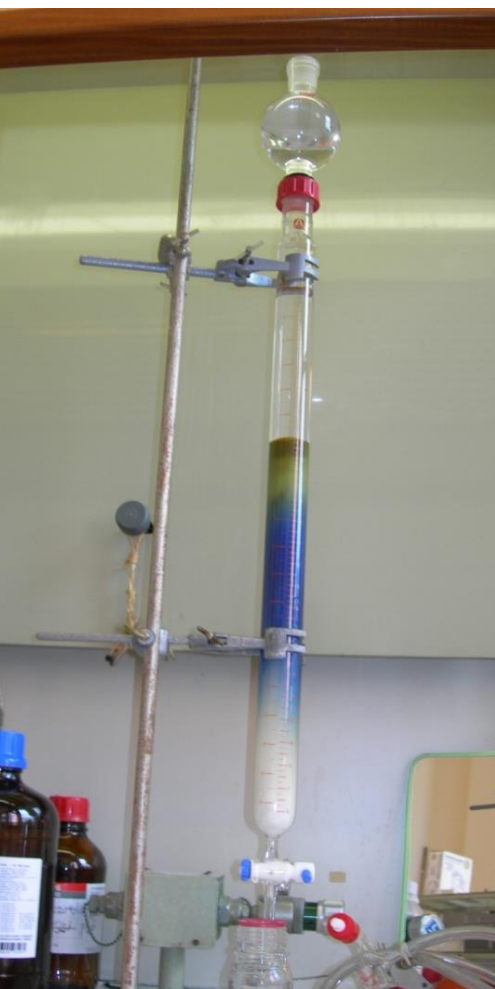
Analyses au GC Fast



Sémiochimiques purifiés sans solvant

Fractionnement des huiles essentielles

Chromatographie Flash : plus grande échelle



Matricaria chamomilla

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

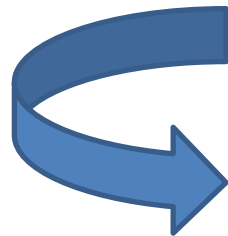
Nepeta cataria

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

Formulation des sémiochimiques

Critères de la formulation

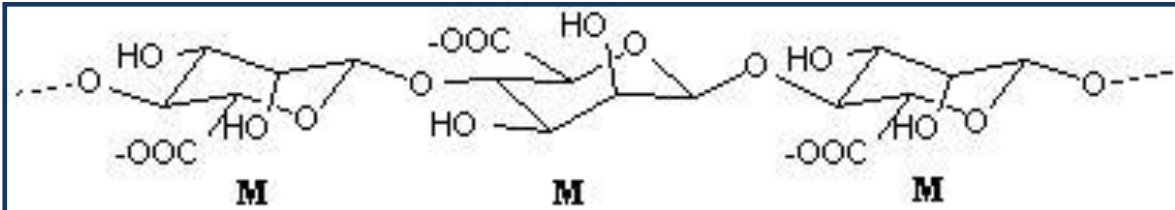
- Matrice naturelle et biodégradable
- Protection des sémiochimiques au cours du temps \gg oxydation
- Taux de diffusion des sémiochimiques suffisant
- Attractive envers les prédateurs et parasitoïdes de pucerons



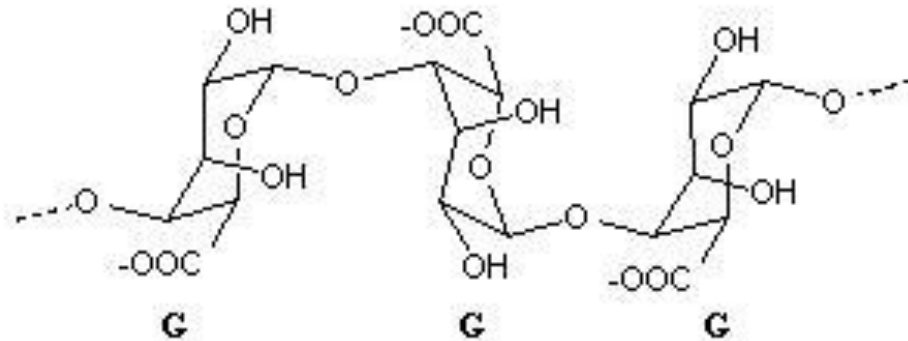
Billes d'alginate

Alginate

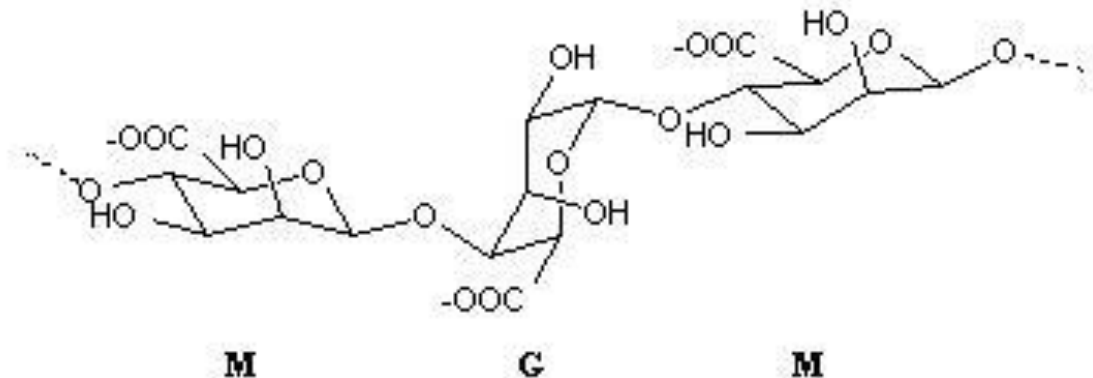
β -D-mannuronate (M)
 (Poly M segment)



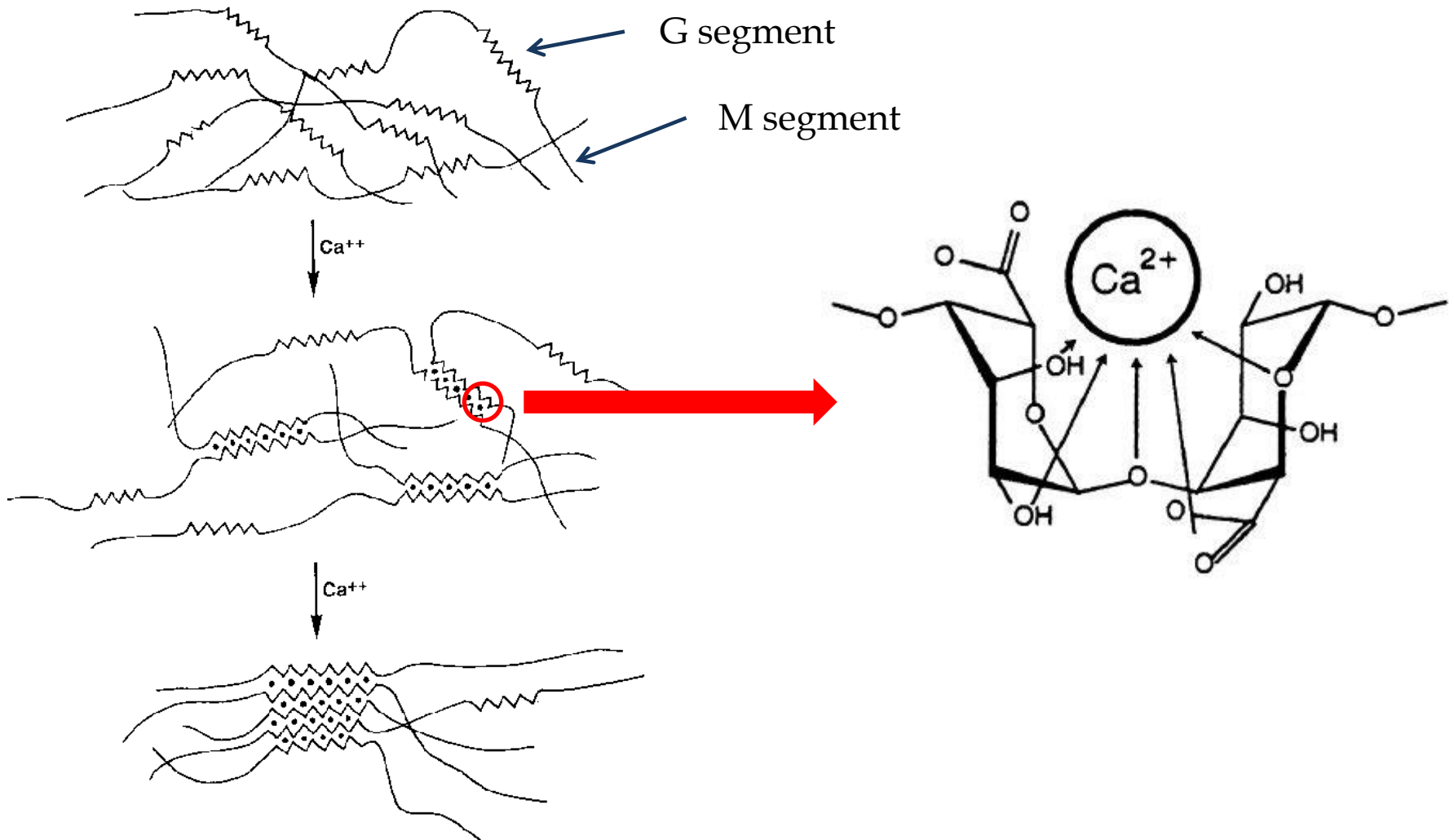
α -L-guluronate (G)
 (Poly G segment)



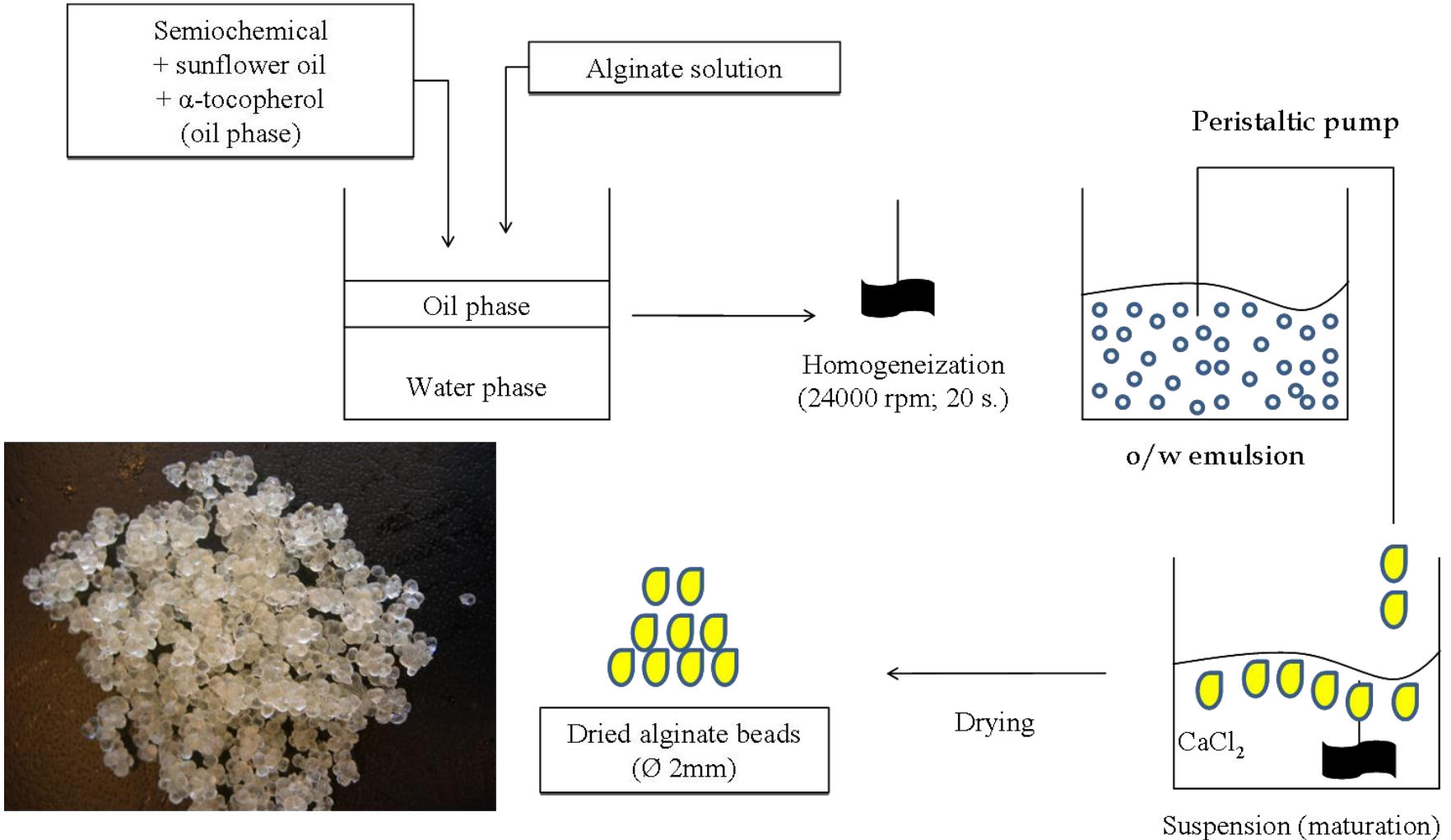
Poly MG segment



Processus de gélification de l'alginate



Formulation des billes d'alginate



Efficacité des formulations...

... en termes de diffusion des sémiochimiques

Volatile Collection System

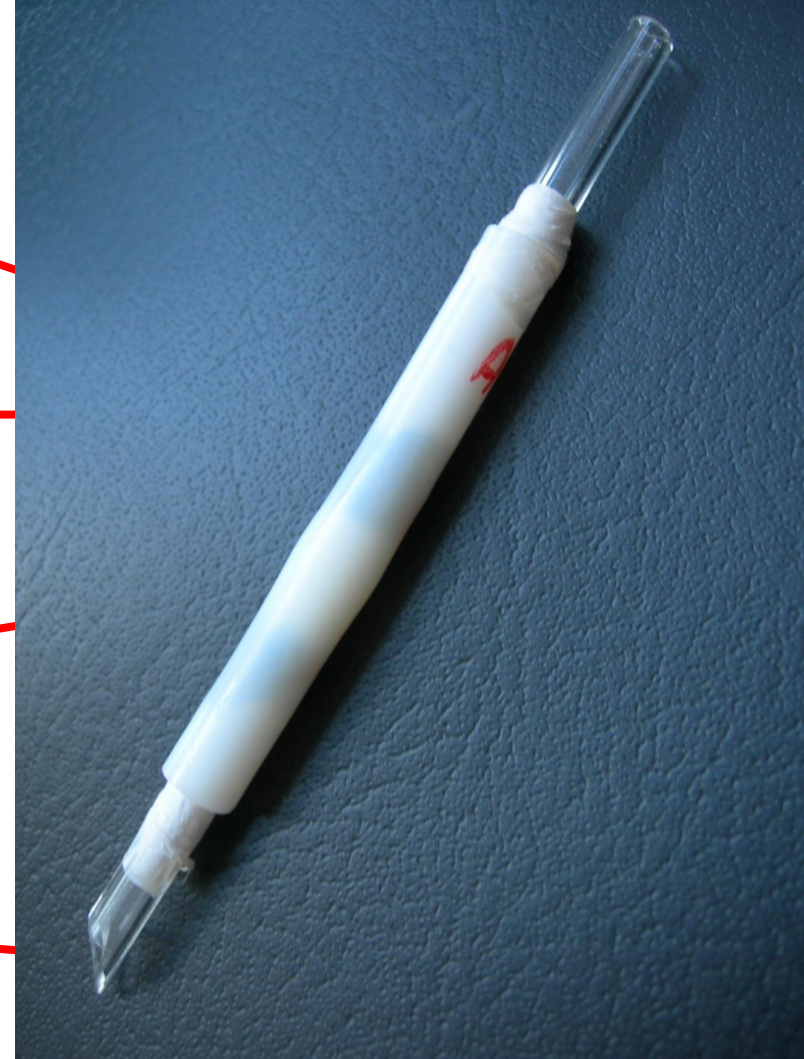
Filtre charbon actif

Cartouche d'adsorbent (HayeSep Q)

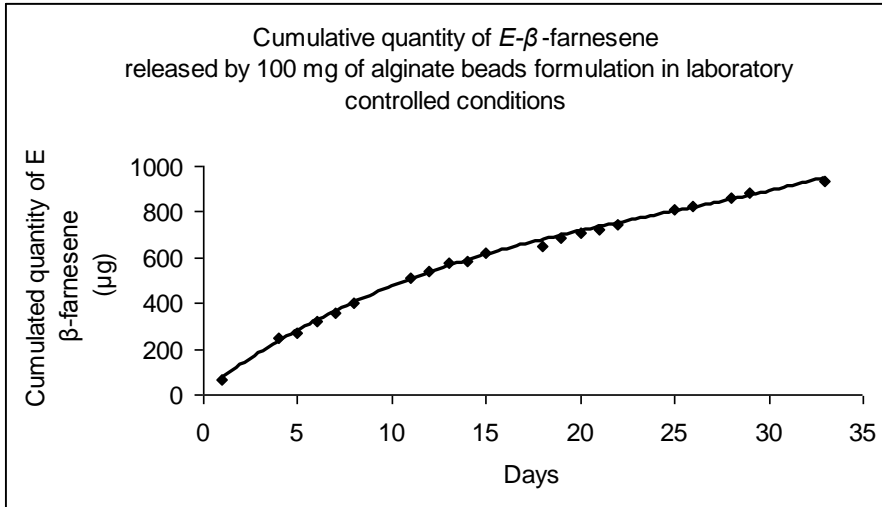
Elution au solvant + quantification par SI
(Fast GC)

Cuve en Téflon contenant les billes
d'alginate avec sémiochimiques

Pompe

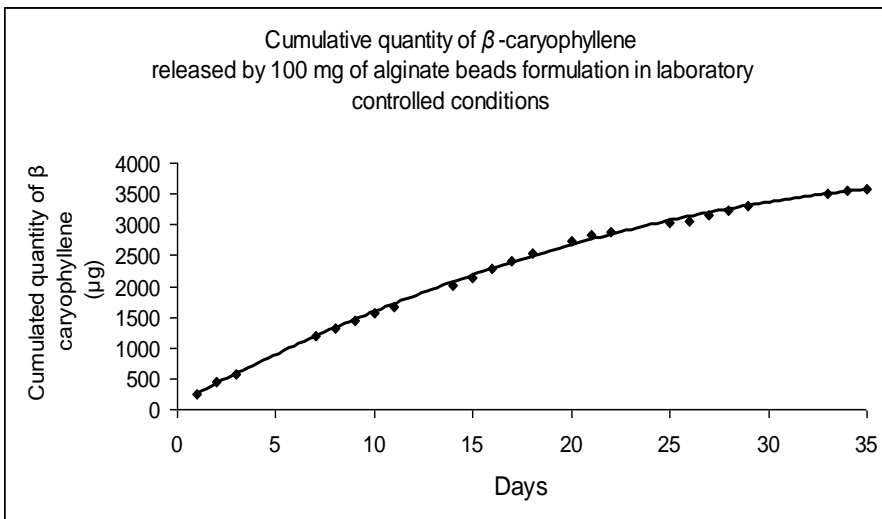


Taux de diffusion des sémiochimiques



Conditions contrôlées :

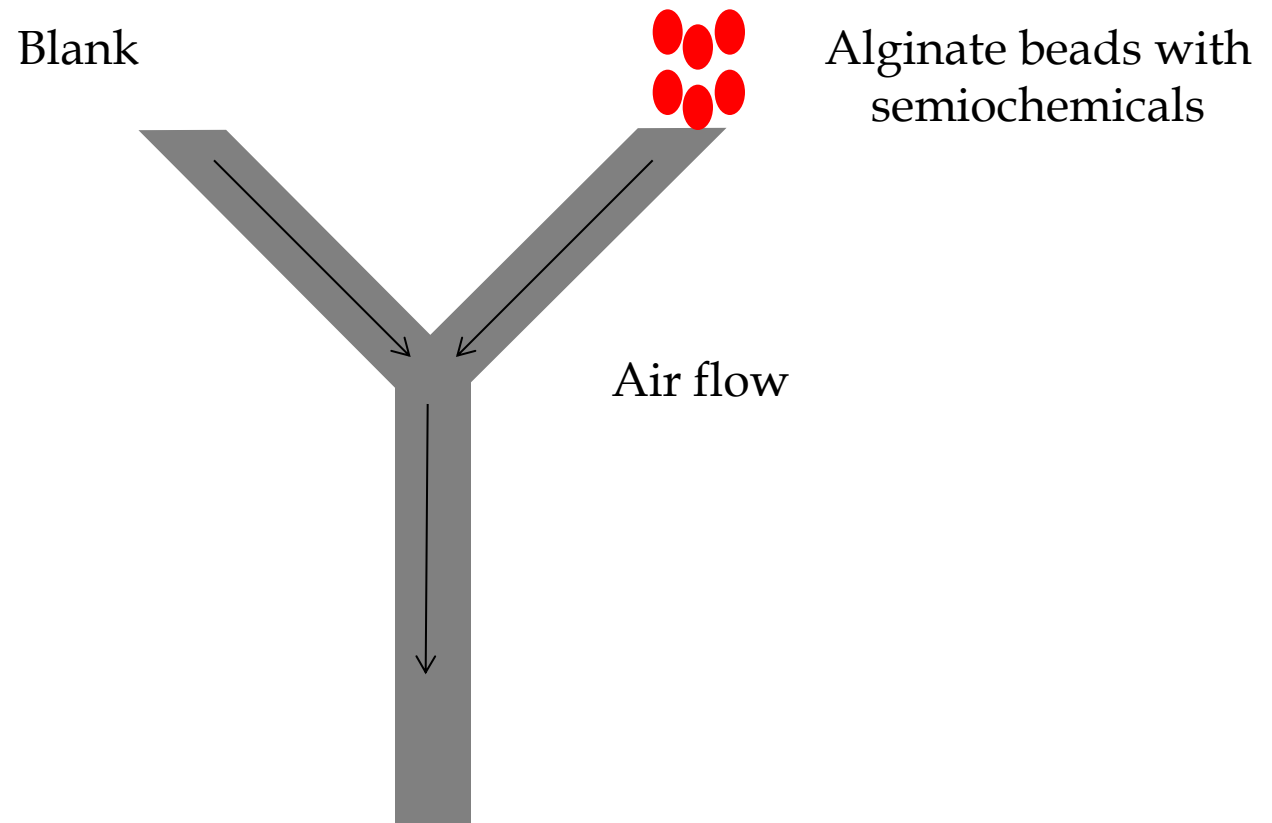
- Température: 20°C
- Humidité relative : 65%
- Débit d'air : 0.5 L/min



Efficacité des formulations...

... en termes d'outil de contrôle biologique

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

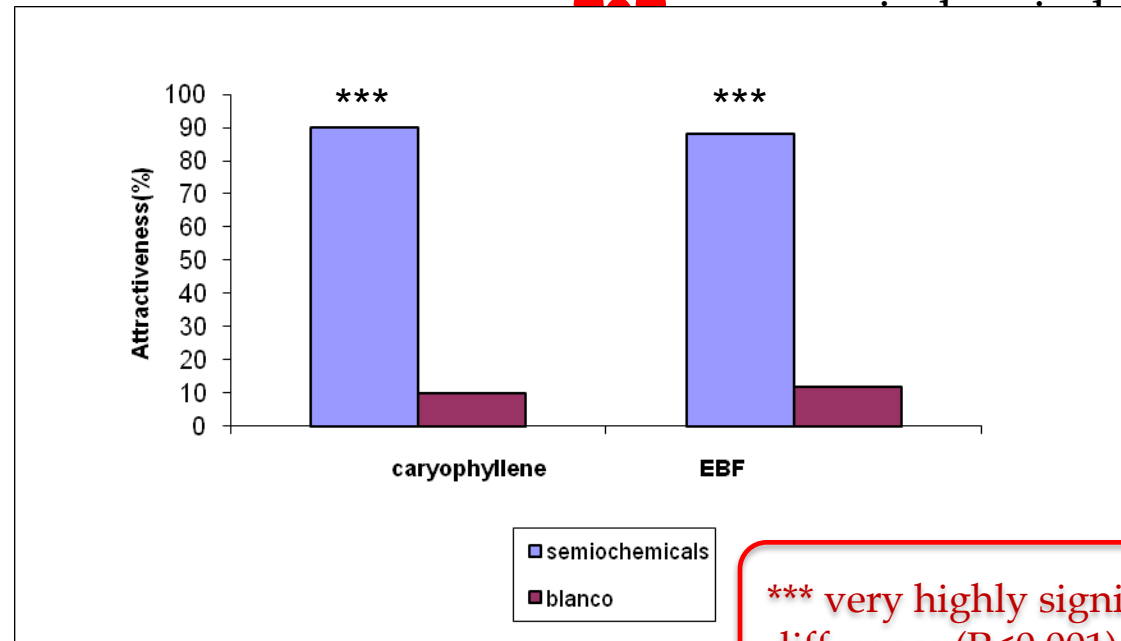


Sur parasitoïdes (*Aphidius ervi*): olfactomètre à 2 voies

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

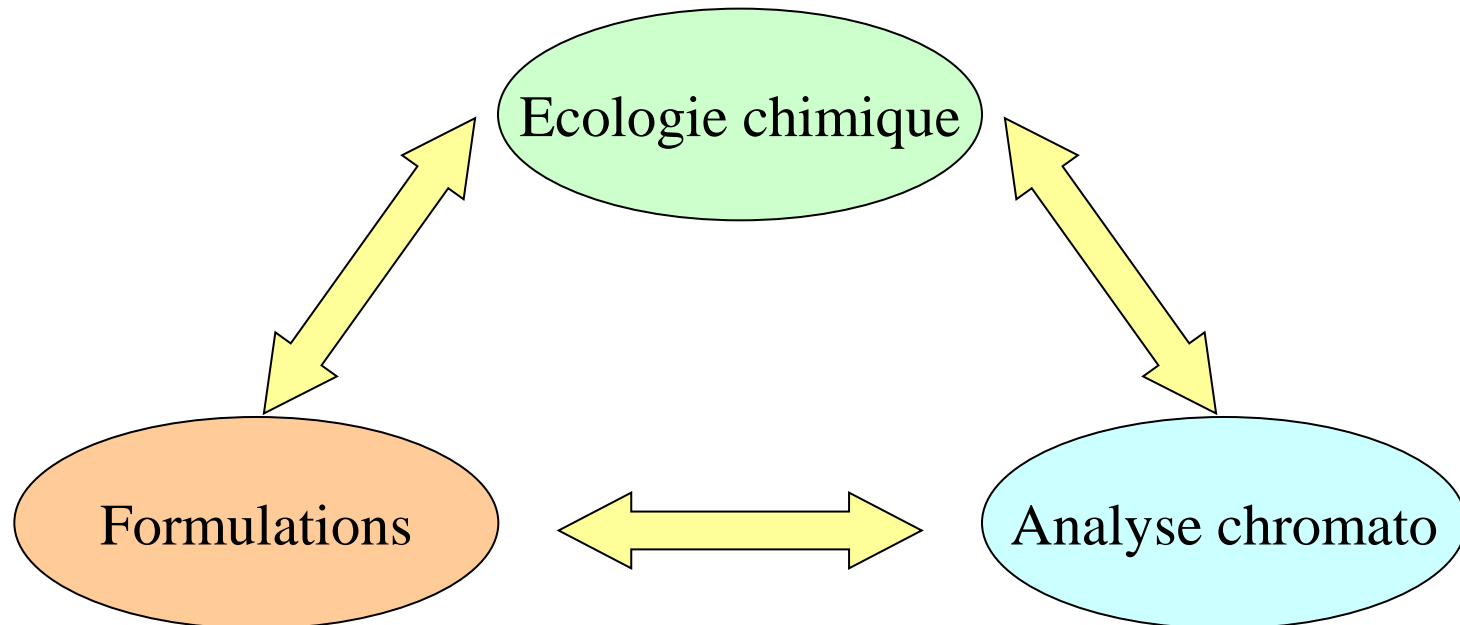


Test de Dunnett (95%) : comparaison de l'attraction entre billes avec sémiochimiques et blanco

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

Conclusions

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



Merci de votre attention

Questions?