



gembloux
faculté universitaire
des sciences agronomiques

Etude chromatographique des substances volatiles : cas des **sémiochimiques**

Stéphanie Heuskin

UNITE de CHIMIE ANALYTIQUE

Prof. Georges C. LOGNAY

Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux

Sommaire

- **Introduction**
- **Les sémiochimiques**
- **Diffuseurs de sémiochimiques**
- **Etude du relargage**
- **Analyse chromatographique**
- **Conclusions**

Introduction

Introduction

- 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 »
 - ➔ systèmes de diffusion de sémiouchimiques

Les sémiochimiques

Sémiochimiques

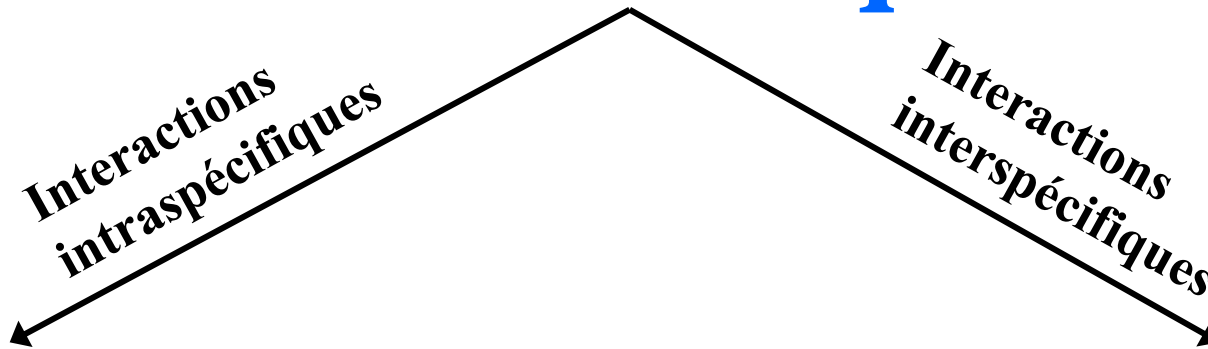
Définition : molécules naturelles produites par des organismes vivants et intervenant comme moyen de communication intra- ou interspécifique

(du grec *simeon* = **signal**)

→ molécules très diverses, **volatiles** ou non

→ stimuli émis par plantes et insectes

Sémiochimiques



Phéromones

- d'alarme
- sexuelles
- d'agrégation, ...

Substances allélochimiques

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



Une même substance peut intervenir à la fois dans des interactions intra- et interspécifiques

Systeme tritrophique

Cas du puceron

Plante – Insecte phytophage

– Prédateur
– Parasitoïde



Vicia fabae



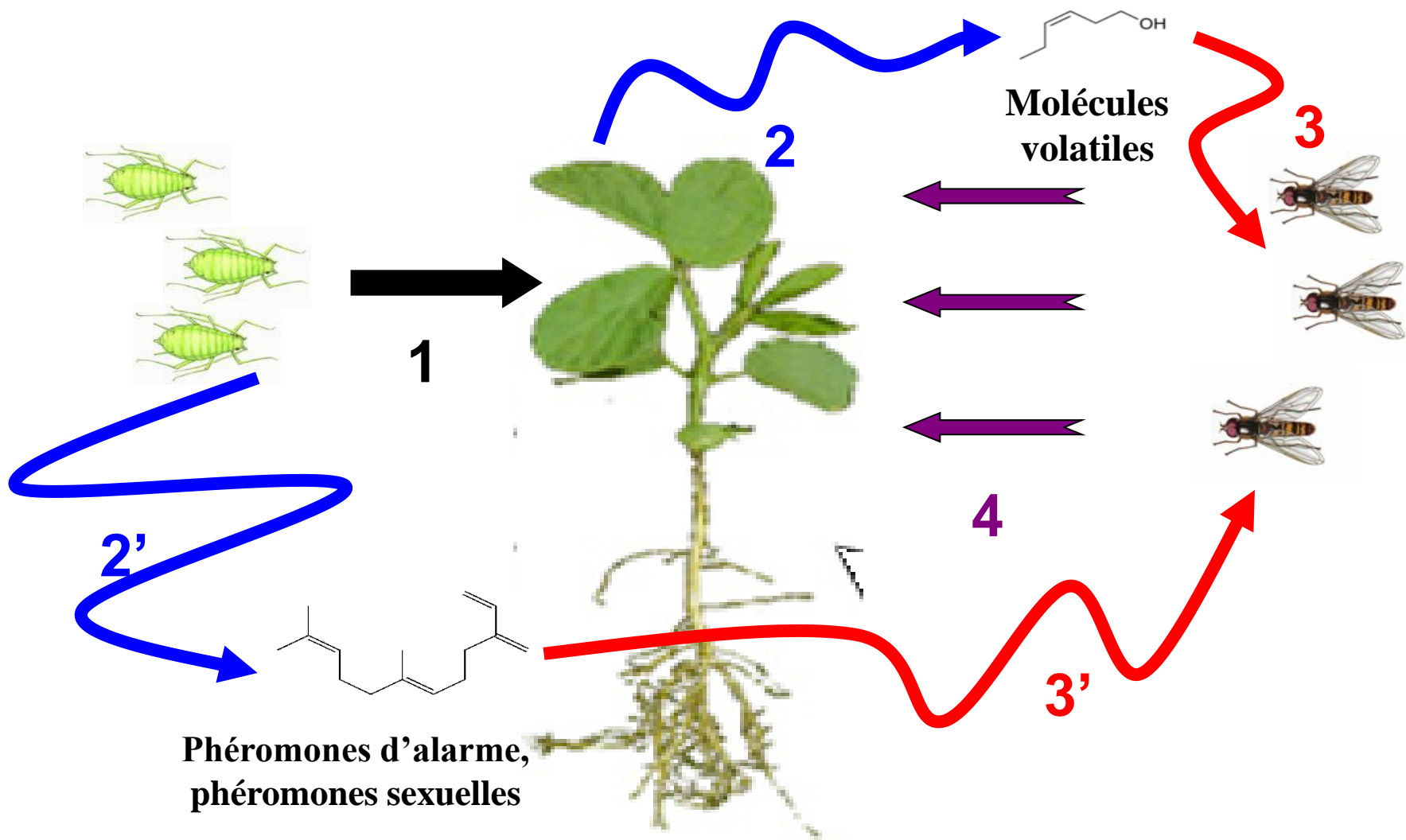
Megoura viciae



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 :**

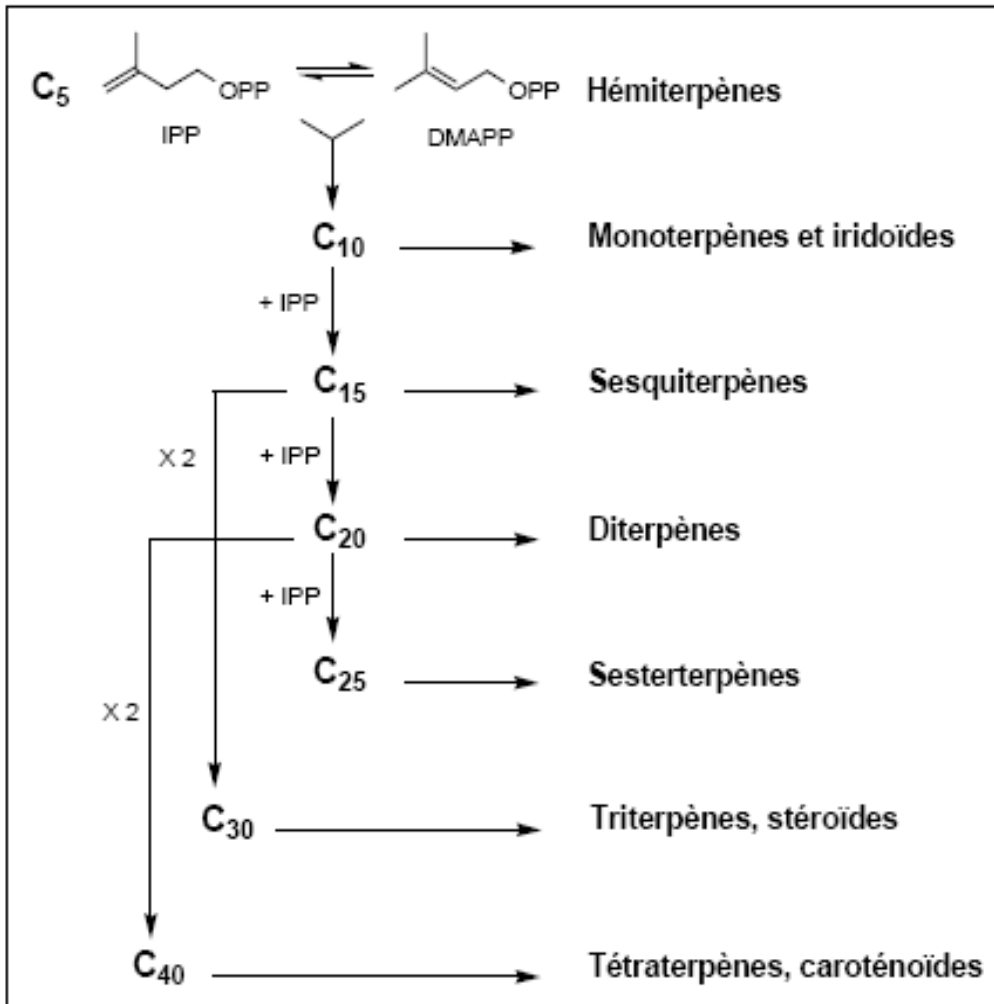
monoterpènes (β -ocimène), sesquiterpènes (E- β -farnésène),
molécules aromatiques (indole)

➤ **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**

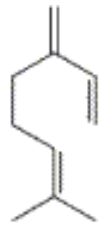
Terpènes



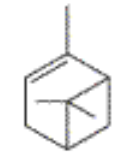
Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène et ont pour formule de base des multiples de celle-ci $(C_5H_8)_n$

IPP = Isopentenyl pyrophosphate

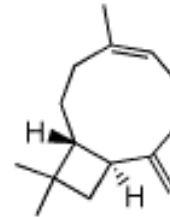
DMAPP = dimethylallyl pyrophosphate



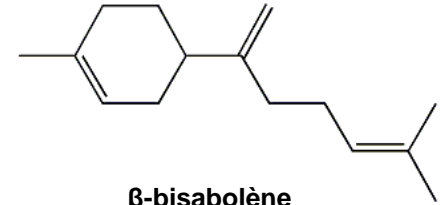
Myrcene



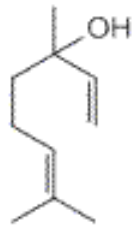
α -Pinene



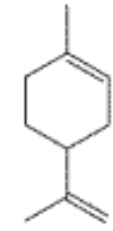
β -caryophyllène



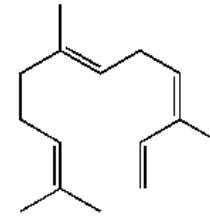
β -bisabolène



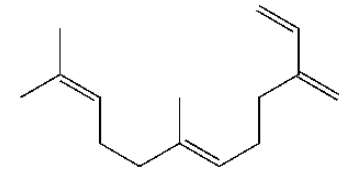
Linalool



Limonene



Z,E- α -farnésène



E- β -farnésène

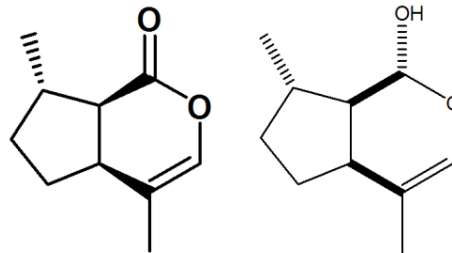
Monoterpènes

Sesquiterpènes

Phéromones d'insectes phytophages

➤ Phéromones sexuelles :

- **Pucerons** : népétalactone - népétalactol



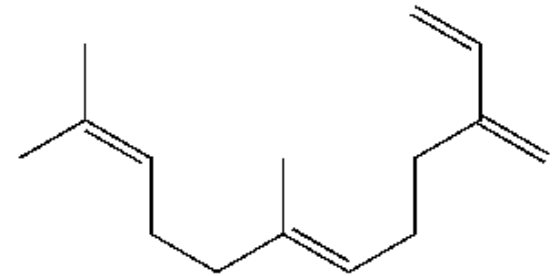
- **Papillons** : bouquet phéromonal spécifique à chaque espèce

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

Phéromones d'insectes phytophages

➤ Phéromone d'alarme :

- Pucerons : **E-β-farnésène**



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

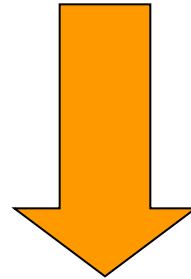
➔ $C_{15}H_{24}$

➔ sesquiterpène

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

Sémiochimiques

Utilisation des connaissances « naturelles »



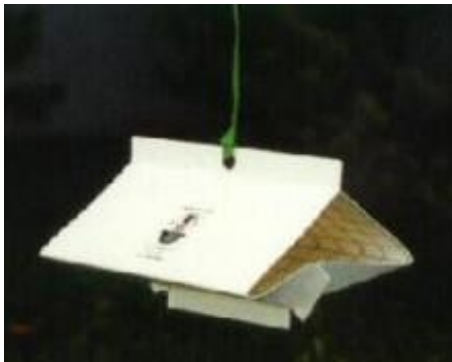
Leures, diffuseurs à phéromones

Les diffuseurs de sémiochimiques

Diffuseurs de sémiochimiques



« Rubber septum »



Piège collant



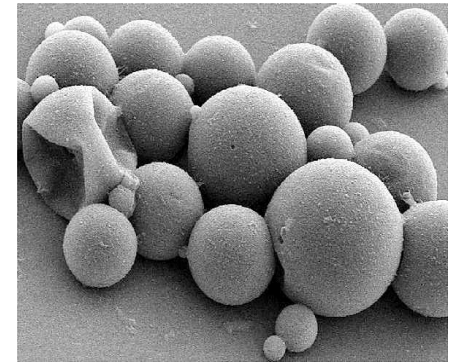
« NoMate » mating disruptant



« Isomate-C »



Evaporateur PHEROBANK



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

Les formulations

Quelques exemples de formulations :

- Phéromone **micro-encapsulée** : à pulvériser
 - 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*)

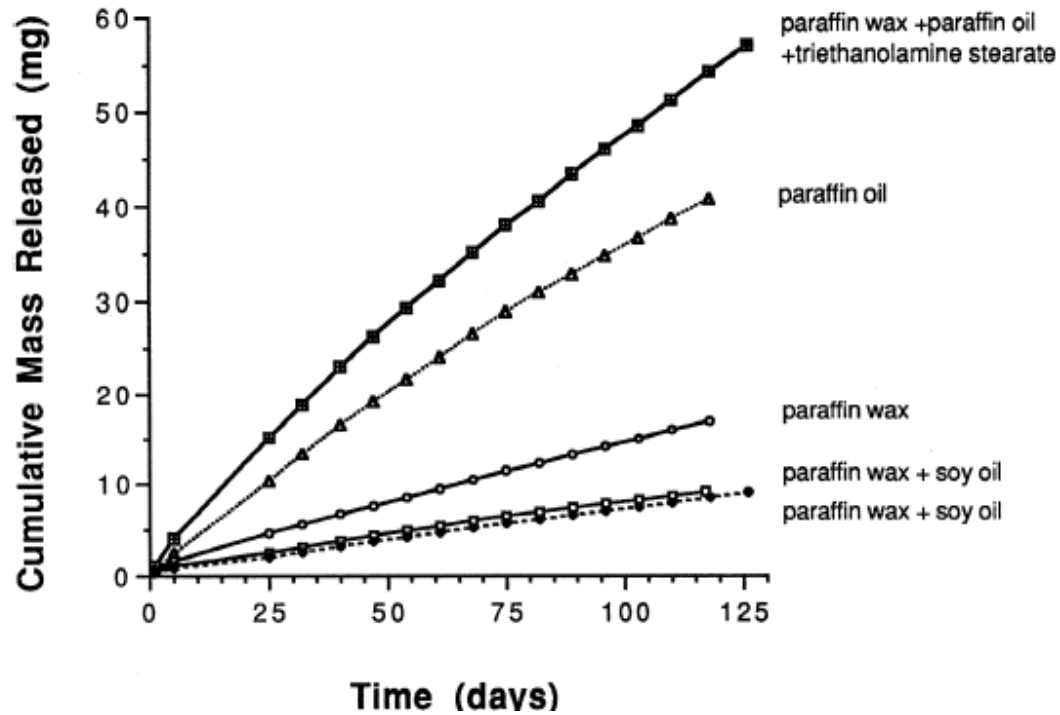


Fig. 1. The effect of formulation on OFM pheromone release from paraffin (200 mg pheromone, 5 g paraffin mixture, 0.5 l/min air flow, 27°C, 53.5 cm² surface area)

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**

➤ **Méthode d'analyse résiduelle**

I. Méthode gravimétrique

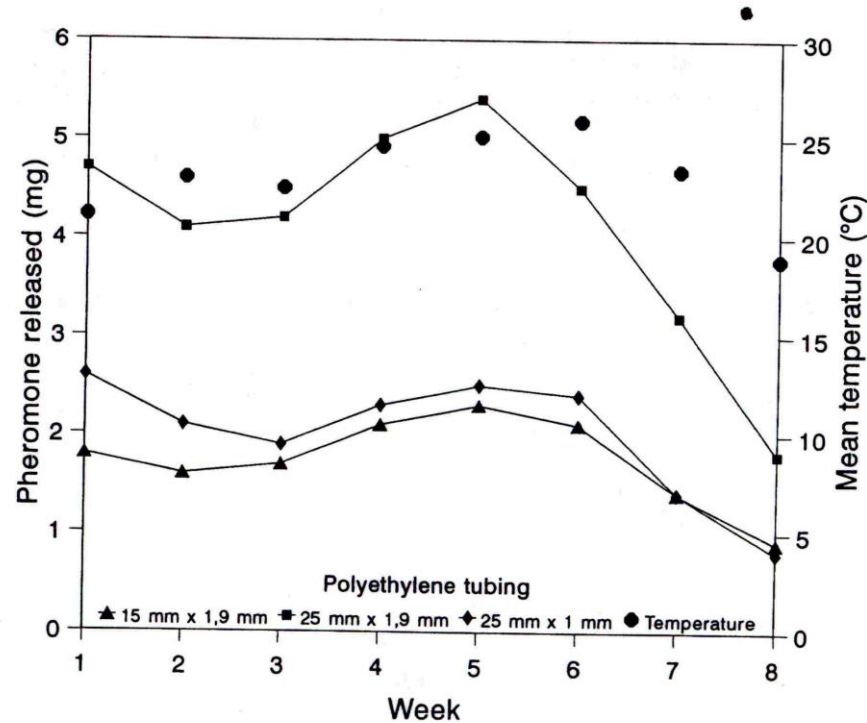
➤ **Mode opératoire :**

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



(Hofmeyr et al, 1994)

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

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

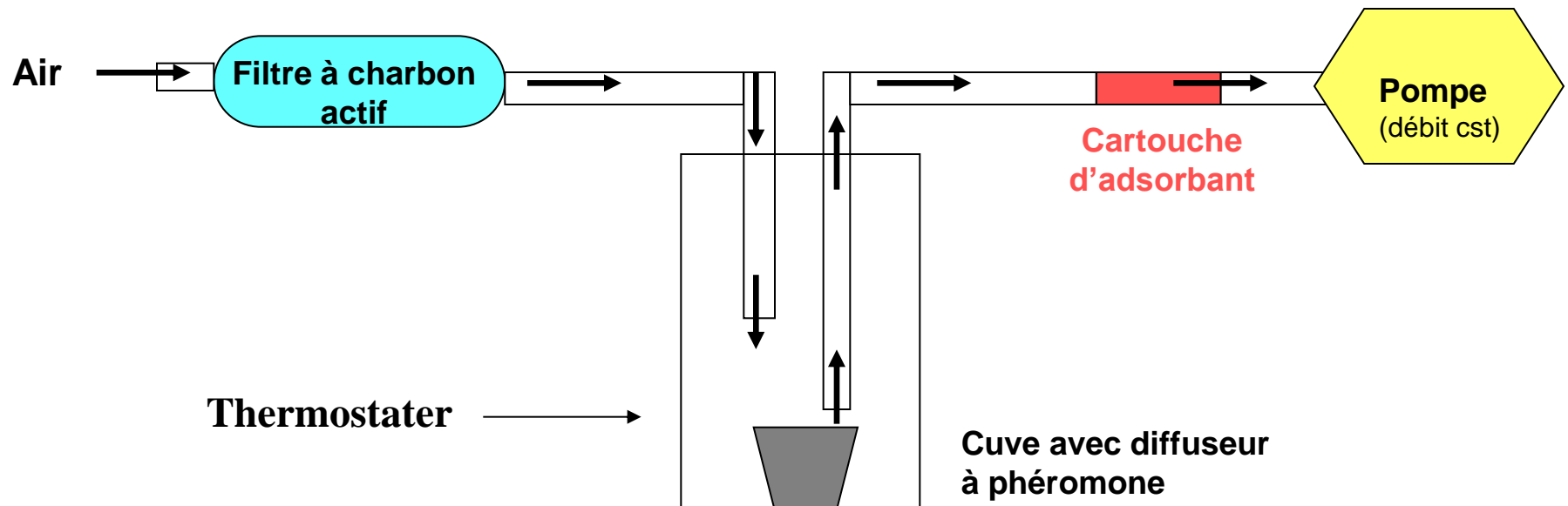
➤ **Conditions expérimentales contrôlées :**

- prélèvement à débit d'air constant (+/- 0,5 L/min) pendant 2 à 5 h
- mesure de la T°
- mesure de l'humidité relative

II. Méthode de piégeage des volatils

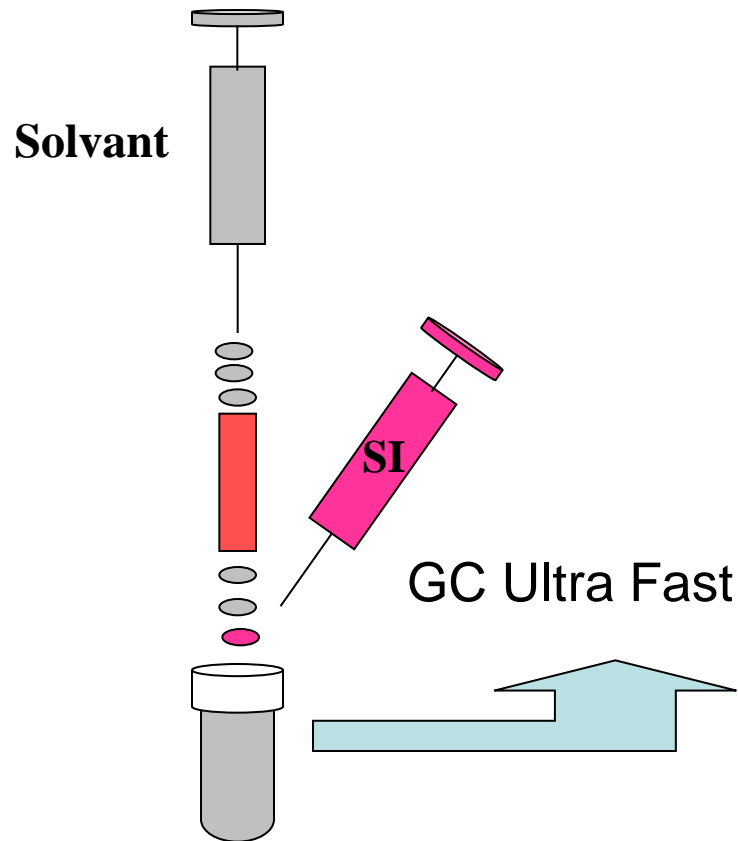
➤ Dispositif de l'unité de CA

➤ 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.

Validation 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

Validation 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
 - ➔ **seconde cartouche mise à la suite de la première, élution et analyse de l'éluat**

III. Méthode d'analyse résiduelle

- **Méthode récente** : (*Hebert et al., 2005; Washington State University*)

Détermination de la **quantité** de phéromone restant dans les diffuseurs commerciaux à différents âges

➔ Méthode **rapide** pour déterminer le comportement de relargage d'un diffuseur car nécessité pour les agriculteurs d'agir rapidement contre les ravageurs



Isomate Ctt

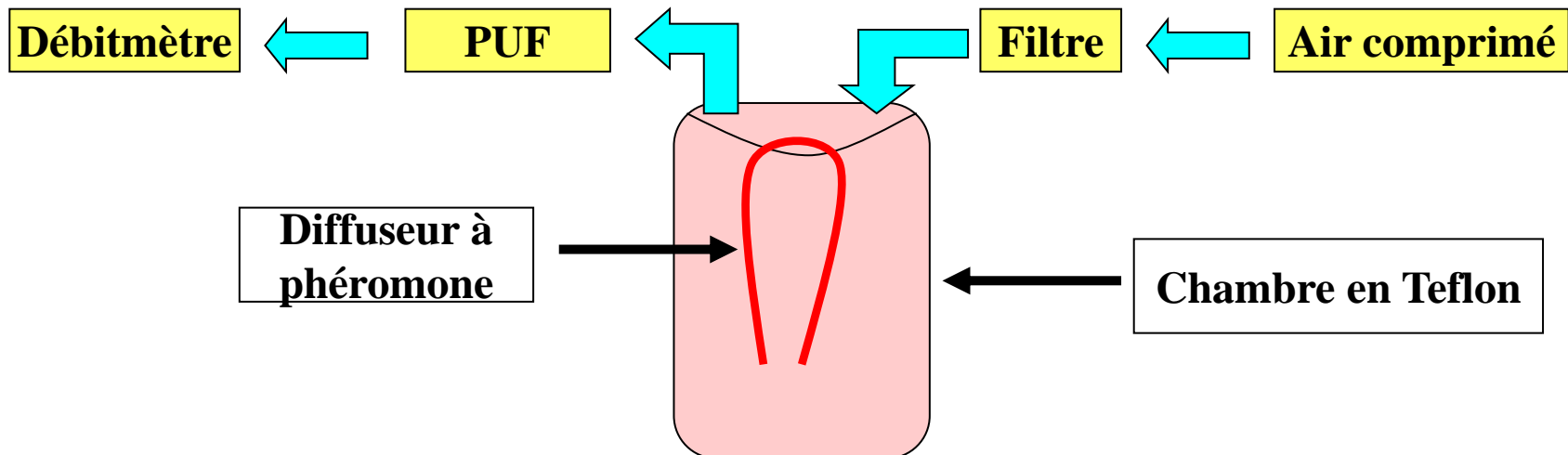
Nomate

Isomate C+

Checkmate

III. Méthode d'analyse résiduelle

- Flux d'air comprimé constant et important : **10L/min!!!** → extraire la totalité de la phéromone présente dans le diffuseur
- Cartouche d'adsorbant : mousse de polyuréthane (PUF) : grande capacité d'adsorption et supporte flux d'air importants sans « breakthrough »



III. Méthode d'analyse résiduelle

- **Téflon** : minimiser adsorption des volatils sur les parois des enceintes et tubulures.
- 2h de prélèvement à T° ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- Extraction cartouches PUF avec solvant, analyse et quantification au GCMS



Etude du relargage

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

- T°
- HR
- vent, flux d'air
- coefficients de diffusion des composés

Quelques exemples

(Mottus et al., 2001)

(Teal et al., 1985)

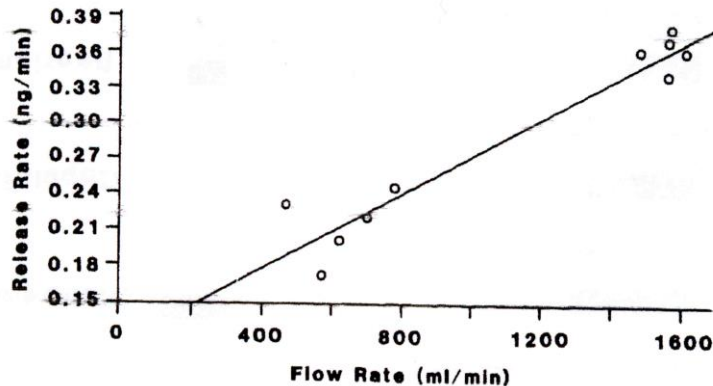


FIG. 4. Amount of the six-component aldehyde blend released from septa loaded with 500 μg at various flow rates. $R^2 = 0.96$ for equation, $y = 1.822 \times 10^{-4}x + 7.682 \times 10^{-2}$.

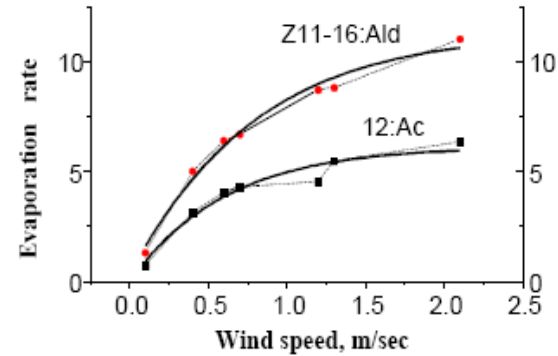


Figure 5. Influence of wind speed on rate constants of 12:Ac and Z11-16:Ald. Feroflor dispenser at 25 °C

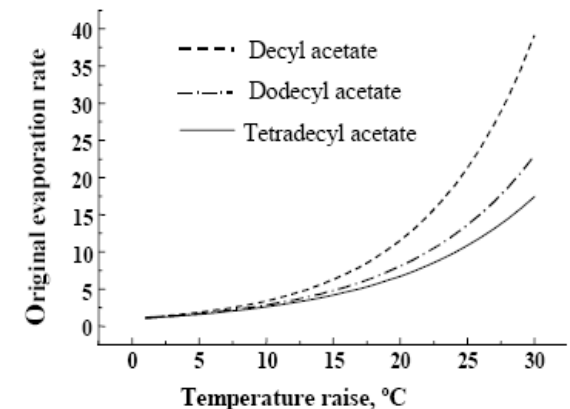


Figure 6 Dependence of evaporation rates of some alkanols from temperature.

Quelques exemples

(Mayer et al., 1998)

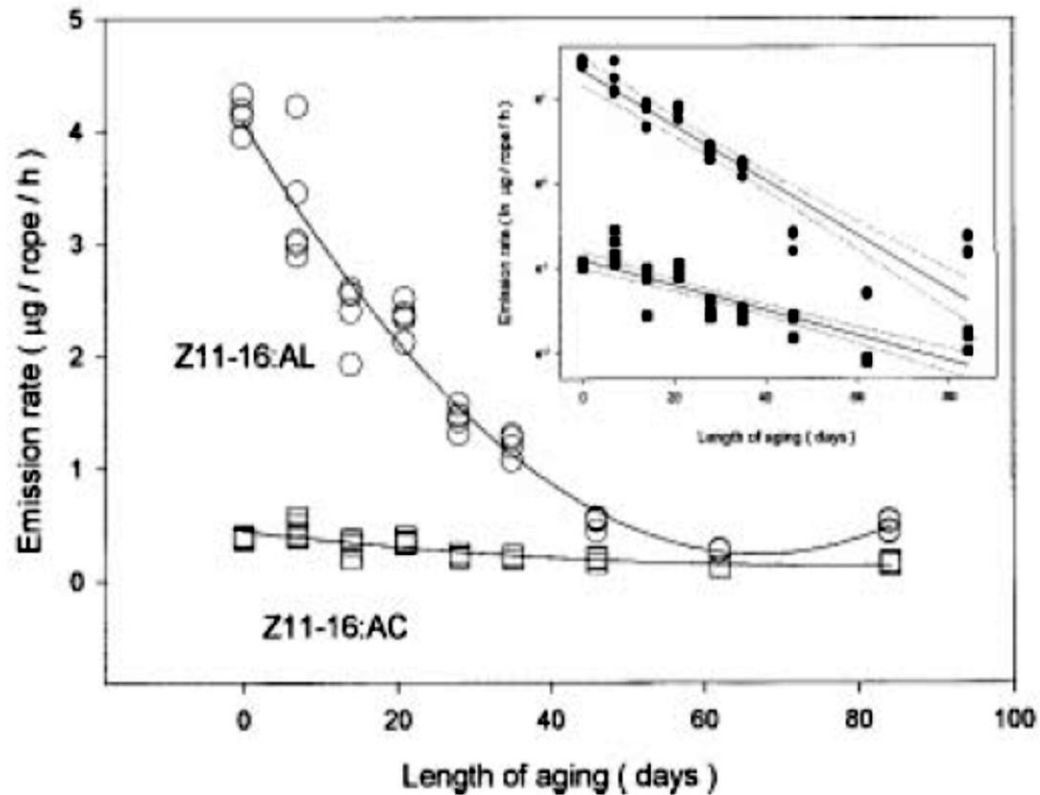


Fig. 1. Emission of Z11-16:Al and Z11-16:Ac from Shin-Etsu plastic rope samples (Lot 80101). Inset is a semilogarithmic plot of the natural logarithm of the same data to illustrate the linearity of the regression and the fiducial limits.

Analyse chromatographique

Chromatographie en Phase Gazeuse (GLC)

➤ Rappels

- 2 phases : **phase mobile** : gaz vecteur (He, H₂, N₂ ou Ar), inerte vis-à-vis des solutés et de la phase stationnaire
phase stationnaire : solide (GSC) ou liquide (GLC), contenue dans la colonne
- La phase mobile traverse la phase stationnaire

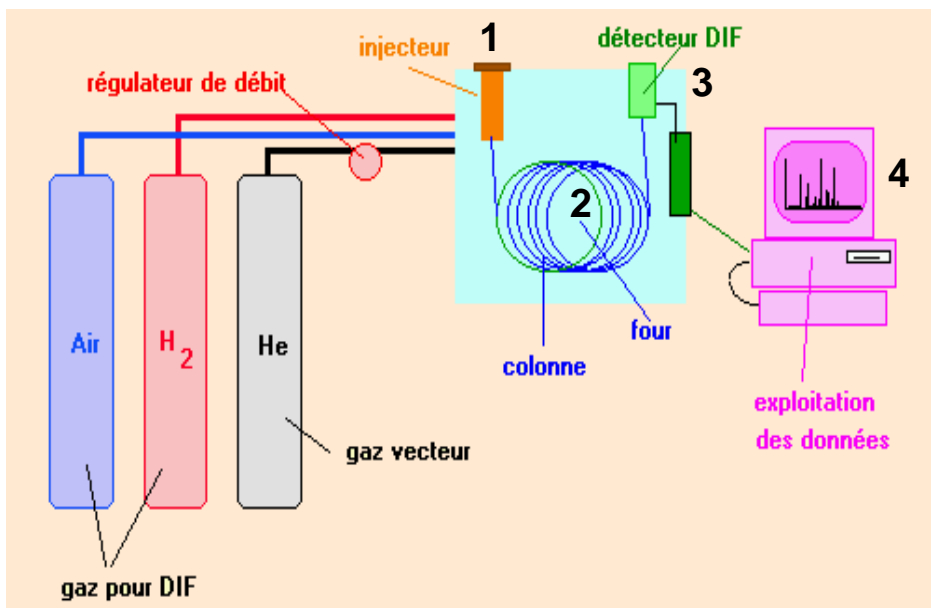
Chromatographie en Phase Gazeuse (GLC)

➤ Rappels

- Composants à séparer : - **solubles** dans la phase mobile, pas d'interaction avec phase mobile
 - **affinité** pour la phase stationnaire
- Programmation de **température**
- Importance des **coefficients de distribution** ($K=C_s/C_m$)

Chromatographie en Phase Gazeuse (GLC)

➤ Principe de fonctionnement



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

Chromatographie en Phase Gazeuse (GLC)

Utilités

- Permet l'analyse de quantités minimales (μg , ng , pg)
- Séparation de mélanges complexes
- Analyse qualitative et quantitative aisée
- Nombreux domaines d'application

Limites

Ne convient pas pour les produits :

- qui se décomposent à chaud (thermolabiles)
- qui sont peu volatils
- ionisés

Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

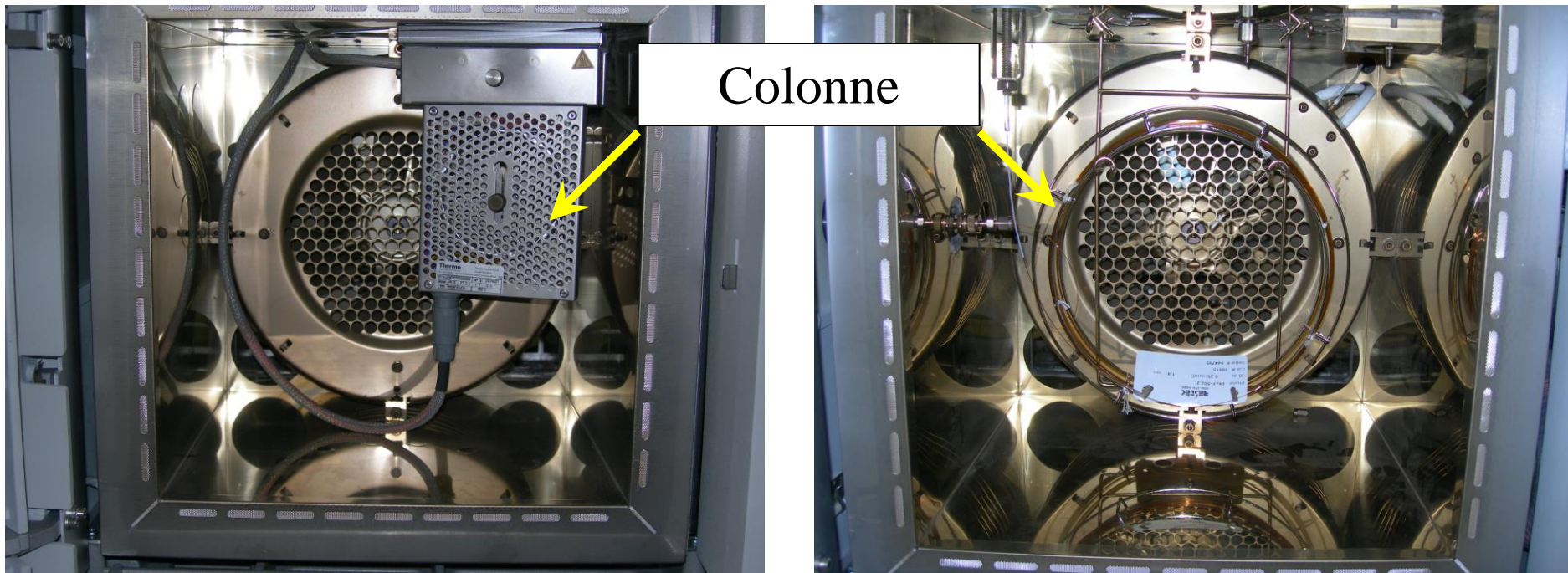
Par rapport à l'analyse GC classique :

- 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



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

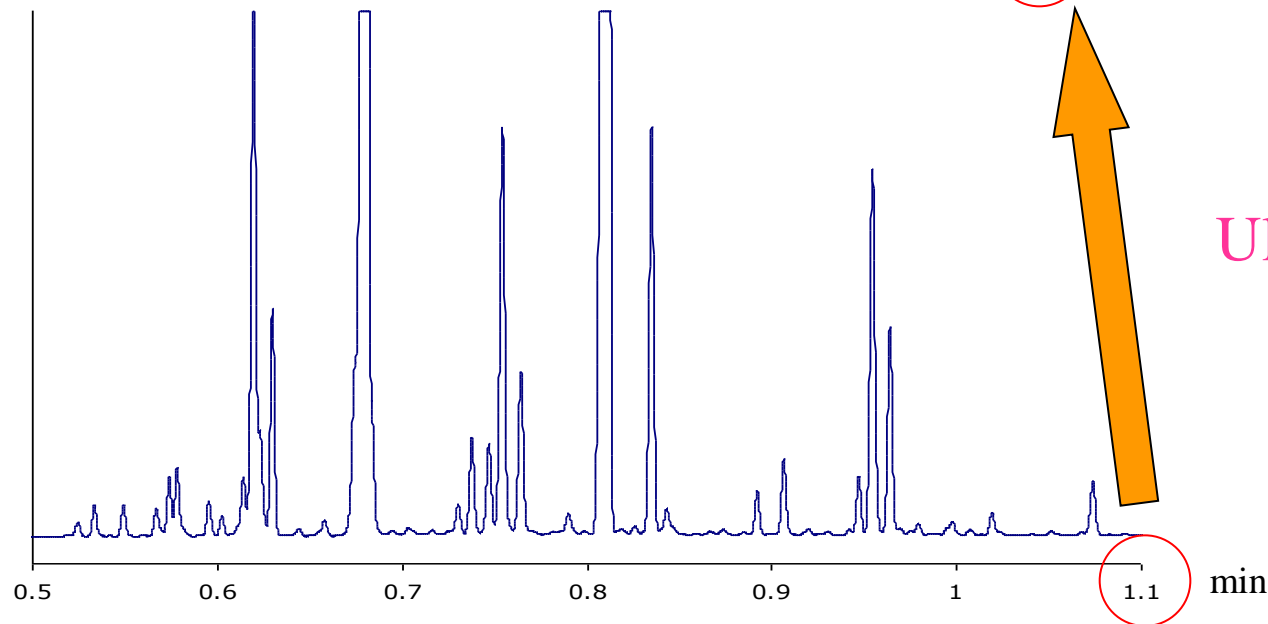
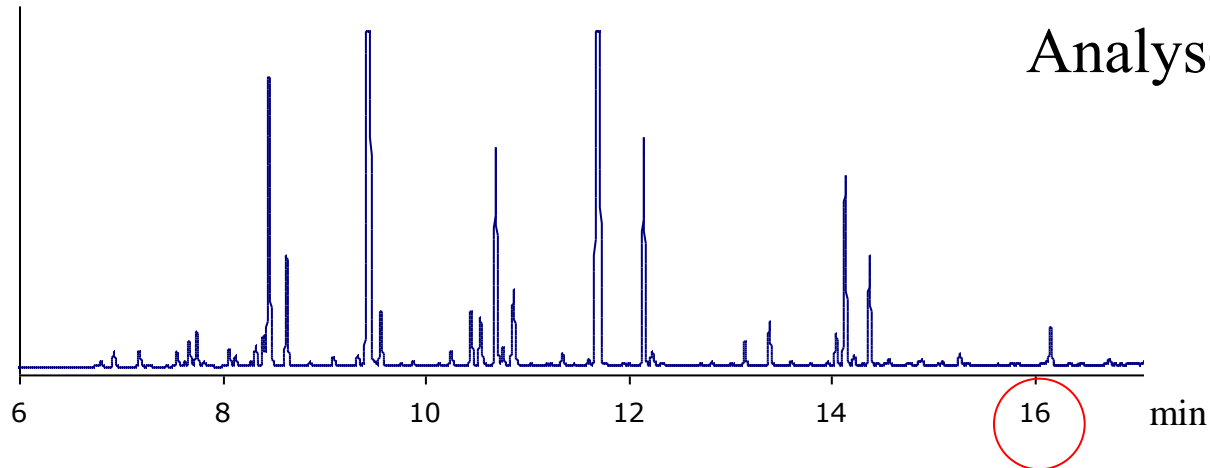


Colonne Ultra Fast GC :

- 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 ± 1 min
- Durée de vie prolongée (10000 cycles, 3x >)

Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

Analyse d'une huile essentielle



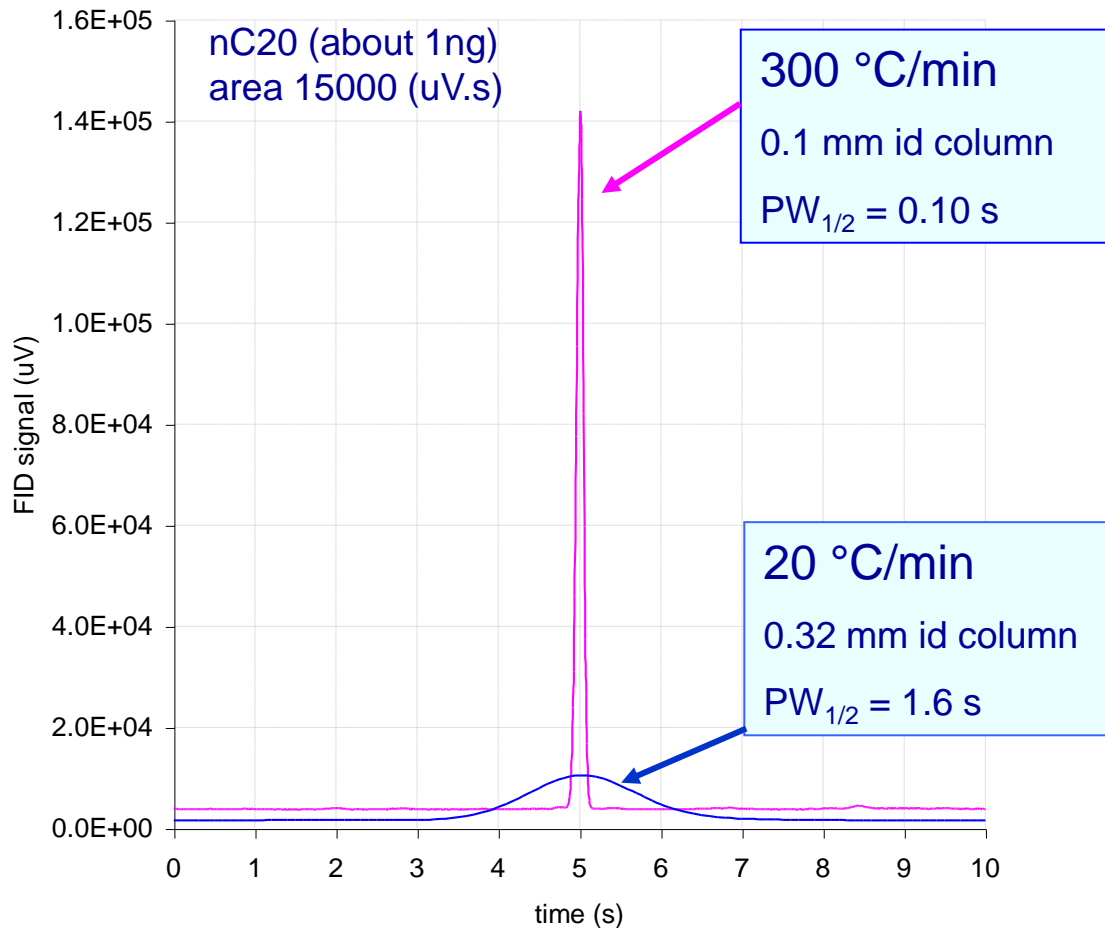
Nouvelle technologie : Ultra Fast GC

Avantages de l'UFGC :

- Rapidité
- Durée de vie de la colonne
- Répétabilité des temps de rétention
- Sensibilité : * compression des pics
 - * injections splitless
- 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 :

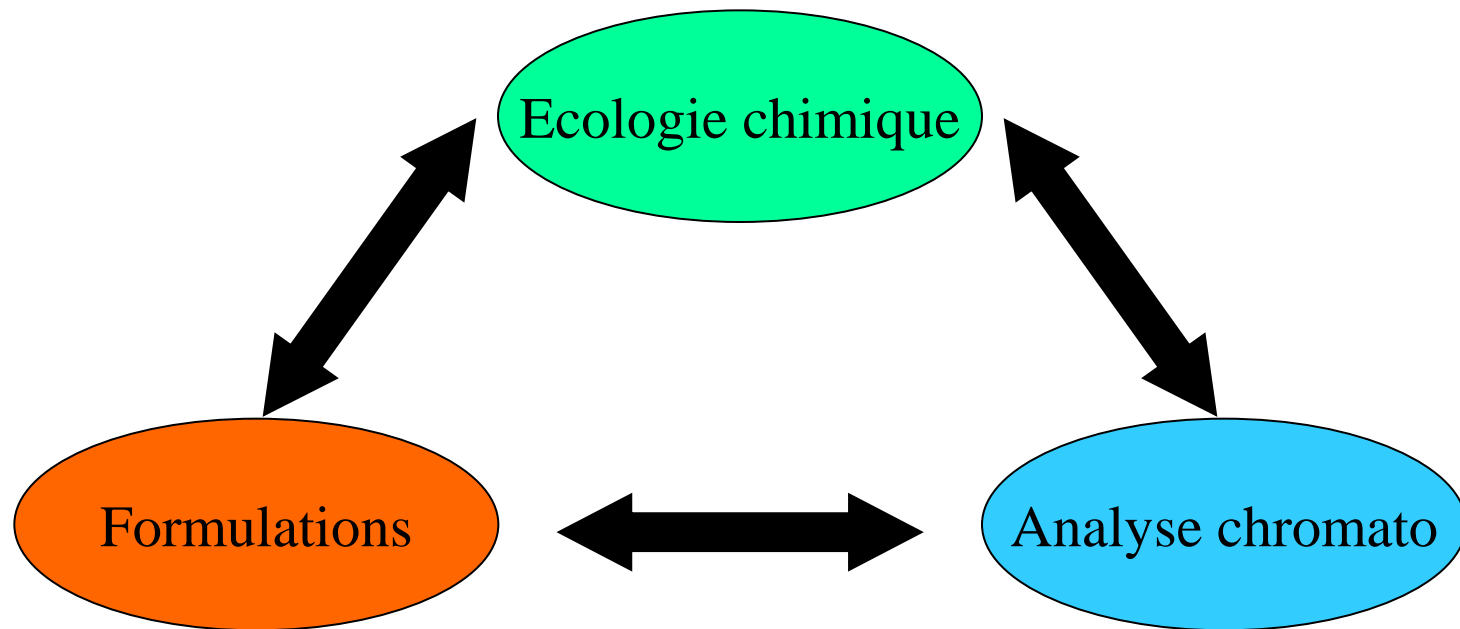
- Produits pétroliers
- VOCs
- Arômes
- Huiles essentielles
- FAME (Fatty acid methyl esters)
- ...

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

Conclusions

Conclusions

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



→ En constante évolution

Conclusions

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 sémiouchimiques (NOLDUS, EAG, olfacto,...)
- Expérimentations en champs avec les formulations

Conclusions



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

Conclusions

Analyse chromato

- 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

Questions

???