



**Progrès vers l'identification de la phéromone
sexuelle de la cécidomyie du sapin *Paradiplosis
tumifex* Gagné (Diptera : Cecidomyiidae)**

Mémoire

Alexandre Langlois

Maîtrise en chimie
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Alexandre Langlois, 2015

Résumé

La cécidomyie du sapin, *Paradiplosis tumifex* Gagné (Diptera : Cecidomyiidae), est un ravageur important du sapin baumier puisqu'il cause la sénescence prématurée des aiguilles ce qui diminue sa valeur esthétique comme arbre de Noël. Notre objectif est d'élucider la structure chimique de la phéromone sexuelle émise par la femelle pour l'utiliser dans un piège à phéromone comme outil de dépistage.

Ainsi, nous avons collecté les effluves des femelles et des mâles où, en les analysant par chromatographie en phase gazeuse, un signal ayant seulement été observé chez les femelles pourrait correspondre à la phéromone. À l'aide des similarités entre les structures de celles connues chez 17 autres espèces de cécidomyies, nous avons synthétisé des analogues dont les indices de rétention ont été comparés à la phéromone afin d'aider à son identification. Finalement, bien que la structure n'ait pas été établie, les options disponibles pour atteindre notre but ont été exposées.

Abstract

The balsam gall midge, *Paradiplosis tumifex* Gagné (Diptera: Cecidomyiidae), is a significant pest of the balsam fir causing premature needle senescence, which diminishes its aesthetic value as a Christmas tree. Our goal is to elucidate the female-produced sex pheromone chemical structure to use it in a pheromone trap as a monitoring tool.

Thus, we collected female and male effluents where, by analysing them using gas chromatography, a signal shown exclusively in females was observed. Using structural similarities of sex pheromones known for 17 other cecidomyiidae species, we synthesized analogues for which retention indexes were compared to the pheromone to help its identification. Finally, even though the structure has not been determined, the available alternatives to reach our target were discussed.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des figures.....	XI
Liste des abréviations	XIII
Remerciements	XVII
1. Introduction générale	1
1.1 Problématique	1
1.2 Arbres de Noël.....	2
1.2.1 Production.....	2
1.2.2 Impacts économiques	2
1.2.3 Insectes ravageurs.....	5
1.3 Cécidomyie du sapin	6
1.3.1 Historique	6
1.3.2 Cycle de vie	6
1.3.3 Galles	9
1.3.4 Écologie	9
1.4 Phéromone sexuelle.....	10
1.4.1 Qu'est-ce qu'une phéromone sexuelle?.....	10
1.4.2 Fonctionnement	12
1.4.3 Historique	13
1.5 Lutte contre les ravageurs.....	16
1.5.1 Agents phytosanitaires.....	16
1.5.2 Pièges à phéromone	18
1.6 But et objectifs.....	19
2. Collecte de la phéromone	21
2.1 Introduction.....	21
2.1.1 Utilisation d'un insecte modèle	21
2.1.2 Extraction avec un solvant.....	22
2.1.3 Collecte d'effluves.....	26
2.1.4 Objectif	28
2.2 Matériel et méthodes.....	28
2.2.1 Extraction d'abdomens avec un solvant	28
2.2.2 Élevage des insectes pour la collecte d'effluves	28
2.2.3 Collecte d'effluves.....	29
2.3 Résultats.....	31
2.3.1 Cécidomyie du puceron — <i>Aphidoletes aphidimyza</i>	32

2.3.2 Cécidomyie du sapin — <i>Paradiplosis tumifex</i>	32
2.4 Discussion	33
2.4.1 Mâles vs femelles.....	33
2.4.2 Collecte d'effluves	33
2.5 Conclusion.....	34
3. Caractérisation des extraits.....	35
3.1 Introduction	35
3.1.1 Méthodes biologiques	35
3.1.2 Chromatographie en phase gazeuse.....	37
3.1.3 Utilisation de la chromatographie.....	43
3.1.4 Objectifs	45
3.2 Matériel et méthodes.....	45
3.2.1 Préparation des échantillons	45
3.2.2 Chromatographie en phase gazeuse.....	46
3.3 Résultats	47
3.3.1 Alcanes.....	47
3.3.2 Collecte d'effluves	48
3.4 Discussion	51
3.4.1 Analyse des extraits	51
3.4.2 Indices de rétention	53
3.4.3 Disponibilité du matériel vivant.....	53
3.5 Conclusion.....	53
4. Identification.....	55
4.1 Introduction	55
4.1.1 Structure de la phéromone	55
4.1.2 Influence de la stéréochimie	59
4.1.3 Objectifs et hypothèses	60
4.2 Matériel et méthodes.....	60
4.2.1 Remarques générales	60
4.2.2 Modes opératoires.....	61
4.3 Résultats	67
4.4 Discussion.....	70
4.4.1 Indice de rétention sur une colonne non polaire (DB-5).....	70
4.4.2 Identification de la phéromone	73
4.5 Conclusion.....	73
5. Conclusion générale	75
5.1 Conclusion.....	75
5.2 Perspectives futures.....	76
5.2.1 Poursuite de la synthèse d'analogues.....	76
5.2.2 Éléments d'amélioration	78

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Point d'ébullition des solvants à 760 mmHg	23
Tableau 2.2 Sommaire de l'extraction avec un solvant chez les cécidomyies femelles.....	24
Tableau 2.3 Sommaire de la collecte d'effluves chez les cécidomyies	27
Tableau 2.4 Nombre et âge maximal au début de la collecte d' <i>A. aphidimyza</i> utilisés et durée de la collecte	32
Tableau 2.5 Nombre et âge maximal au début de la collecte des <i>P. tumifex</i> utilisés et durée de la collecte	32
Tableau 3.1 Comparaison des caractéristiques de quelques détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse.....	42
Tableau 3.2 Indice de rétention en fonction du temps de rétention de <i>n</i> -alcanes	47
Tableau 3.3 Indice de rétention en fonction du temps de rétention des pics apparaissant chez la femelle de la cécidomyie	48
Tableau 4.1 Phéromones connues des cécidomyies	56
Tableau 4.2 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2	68
Tableau 4.3 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2 et C-(n-1)	69

Liste des figures

Figure 1.1 Superficie consacrée à la production d'arbres de Noël au Canada en 2011.....	3
Figure 1.2 Évolution des recettes agricoles tirées de la production d'arbres de Noël au Canada et au Québec entre 1997 et 2012.....	4
Figure 1.3 Valeur des arbres de Noël exportés par le Canada en 2011	5
Figure 1.4 Cycle de vie de la cécidomyie du sapin	7
Figure 1.5 Femelle et mâle adulte de la cécidomyie du sapin	8
Figure 1.6 Stades 1 à 4 du débourrement des bourgeons du sapin	8
Figure 1.7 Galles formées par la larve de la cécidomyie du sapin	9
Figure 1.8 Classification et terminologie des médiateurs chimiques en situant la phéromone sexuelle	11
Figure 1.9 Fonctionnement de la phéromone sexuelle : le panache de la phéromone (illustré en bleu) émise par la femelle attire le mâle	13
Figure 1.10 Phéromone d'alarme d' <i>Apis mellifera</i> : acétate de 3-méthylbutyle	14
Figure 1.11 Bombykol : (10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i>)-hexadéca -10,12-dièn-1-ol	15
Figure 1.12 Composante majoritaire de la phéromone de <i>M. destructor</i>	16
Figure 1.13 Structure du diazinon et du Movento ^{MD}	18
Figure 1.14 Pièges utilisés (piège collant et piège à émergence) pour le dépistage de la cécidomyie	19
Figure 2.1 Phéromone sexuelle émise par la femelle d' <i>Aphidoletes aphidimyza</i> , (2 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-diacétoxytridécane	22
Figure 2.2 Montage expérimental en action	29
Figure 2.3 Pipette de Porapak Q connectée au système	30
Figure 3.1 Comparaison du chromatogramme <i>FID</i> de la femelle, du mâle (fraction 100 % Et ₂ O, équivalent de 5 insectes injectés) et de la phéromone synthétique.....	43
Figure 3.2 Indice de rétention en fonction du temps de rétention de <i>n</i> -alcanes (heptane à hexadécane)	47
Figure 3.3 Comparaison du chromatogramme <i>FID</i> des femelles et des mâles de la cécidomyie dans l'échantillon 1, avec agrandissement sur la zone 8,5 à 12,5 min.....	49
Figure 3.4 Comparaison du chromatogramme <i>FID</i> des femelles et des mâles de la cécidomyie dans l'échantillon 4, avec agrandissement sur la zone 8,5 à 12,5 min.....	50
Figure 4.1 Structure générale basée sur les phéromones connues de cécidomyies	55
Figure 4.2 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2	68
Figure 4.3 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2 et C-(<i>n</i> -1)	69
Figure 4.4 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des acétates en position C-2 et des diacétates substitués en position C-2 et C-(<i>n</i> -1)	70

Figure 4.5 Influence de la position du second acétate sur l'indice de rétention pour le diacétate d'heptadécane-2,X-diyl	71
Figure 4.6 Influence de la position et de la géométrie d'une insaturation sur l'indice de rétention pour l'acétate de tridécèn-2-yl	72
Figure 4.7 Influence de la position et de la géométrie d'une insaturation sur des molécules ayant une chaîne principale de 12, 14 et 16 carbones respectivement portant un acétate en position C-1	72
Figure 5.1 Influence du positionnement relatif du second acétate	77
Figure 5.2 Influence d'une insaturation	77
Figure 5.3 Influence d'une molécule de type céto-acétate par rapport au diacétate	77

Liste des abréviations

CAM	Molybdate de cérium et d’ammonium
CI	Ionisation chimique
EAD	Détection par électroantennographie
EAG	Électroantennographie
EI	Ionisation par impact électronique
FID	Détection par ionisation de flamme
GC	Chromatographie en phase gazeuse
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
IR	Infrarouge
MAPAQ	Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec
MS	Spectrométrie de masse
RMN	Résonance magnétique nucléaire
THF	Tétrahydrofurane
TP	Température pièce

*Quand on ne peut revenir en arrière, on ne
doit se préoccuper que de la meilleure façon
d'aller de l'avant.*

– Paulo Coelho, *L'Alchimiste*¹

¹ Traduction du portugais : « Quando não se pode voltar, só devemos ficar preocupado com a melhor maneira de seguir em frente. » – Paulo Coelho, *O Alquimista*

Remerciements

Bien que ce mémoire porte principalement sur mes travaux de maîtrise, la contribution de plusieurs personnes mérite d'être soulignée sans qui ces travaux et cette maîtrise n'auraient pu être possible.

Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche, P^f Jean-François Paquin du département de chimie et P^f Conrad Cloutier du département de biologie, de m'avoir offert l'occasion de travailler sur ce projet multidisciplinaire. Je leur suis reconnaissant d'avoir balisé le chemin, grâce à leur grande disponibilité et leurs conseils judicieux, tout en m'accordant leur confiance en me laissant la liberté de tracer ce chemin.

Je désire aussi remercier les P^{rs} Dominic Larivière et Normand Voyer, du département de chimie, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Ensuite, je souhaite remercier mes collègues chimistes, plus particulièrement Marc-Olivier Turcotte-Savard pour m'avoir aidé à m'adapter à mon nouvel environnement (nouveau groupe de recherche, nouvelle université, nouvelle ville) ainsi que Pier Alexandre Champagne pour ses questions et commentaires toujours pertinents. Bien sûr, je tiens également à remercier mes collègues biologistes, notamment Jean-Frédéric Guay, Simon Boudreault et Jean-Michel Béland, de m'avoir appris le b.a.-ba de l'entomologie et pour leur collaboration à mes travaux.

Puis, je tiens à exprimer ma gratitude à M. Pierre Audet pour son aide avec la chromatographie en phase gazeuse et surtout de son temps pour avoir adapté l'appareillage spécifiquement pour ce projet ainsi que M. Christian Côté pour ses talents de verrier utilisés dans la construction de l'appareillage pour la collecte d'effluves.

Enfin, je tiens également à remercier mes parents de m'avoir encouragé à persévérer ainsi que Vincent Hébert, Sarah Prud'homme et Jean-Frédéric Guay, une autre fois, pour leur soutien.

De plus, la contribution des producteurs de sapins mérite d'être soulignée. En effet, messieurs S. B. Bédard et J. J. Croteau nous ont donné accès à leur plantation pour la collecte du matériel indispensable à nos recherches.

Enfin, je souhaite exprimer ma reconnaissance aux organismes subventionnaires, soit le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec par le programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire (projet n° 810254), la Fondation canadienne pour l'innovation, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada ainsi que l'Université Laval.

1. Introduction générale

1.1 Problématique

La cécidomyie du sapin, aussi connue sous le nom scientifique *Paradiplosis tumifex* Gagné (Diptera : Cecidomyiidae), est une mouche dont les galles causent l'abscission prématurée des aiguilles chez le sapin baumier *Abies balsamea* (Linnaeus) Miller et le sapin Fraser *Abies fraseri* (Pursh) Poiret les dépréciant en tant qu'arbres de Noël.^{2,3}

Des insecticides comme le diazinon et le Movento sont utilisés afin de lutter contre ce ravageur.⁴ Néanmoins, ils ne sont pas une panacée puisque non seulement la fenêtre de traitement est étroite,⁵ mais le dépistage est complexe puisque l'adulte est minuscule et éphémère.³ De plus, l'homologation du diazinon prendra fin le 31 décembre 2016 notamment en raison des risques préoccupants pour la santé et l'environnement.⁶

Étant donné que les épidémies sont cycliques et localisées,⁷ ce dépistage est primordial. Ainsi, le développement d'un outil accessible et efficace est crucial, car ceux actuellement à la disposition des producteurs sont d'une utilisation ardue.

L'approche du piège à phéromone est intéressante parce que ces pièges permettent une surveillance spécifique, même à de faibles densités, tout en étant simples et économiques⁸ d'autant plus que les cécidomyies sont connues pour émettre une phéromone sexuelle.^{9,10} Dans le cas de la cécidomyie du sapin, des résultats préliminaires obtenus par le groupe de

² Cloutier, C.; Mailhot, P.; Brodeur, J. *Le Naturaliste Canadien* **2006**, *130*, 32–36.

³ Giese, R. L.; Benjamin, D. M. *Forest Science* **1959**, *5*, 193–208.

⁴ Choquette, D.; Marcoux, J.; Pettigrew, A. Guide des traitements phytosanitaires dans la culture des arbres de Noël 2014, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 2014. <http://www.agrireseau.qc.ca/horticulture-arbresdenoel/documents/guide%20protection%20arbres%20de%20noel-%202014.pdf> (consulté le 13 juin 2014).

⁵ Bradbury, R. L.; Osgood, E. A. *Chemical Control of Balsam Gall Midge *Paradiplosis tumifex* Gagné (Diptera: Cecidomyiidae)*; 129; Maine Agricultural Experiment Station: Orono, ME, 1987.

⁶ Santé Canada. *Note de réévaluation REV2013-01, Plan de gestion des risques concernant le diazinon*; H113-5/2013-1F; Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire: Ottawa, 2013.

⁷ Osgood, E. A.; Bradbury, R. L.; Drummond, F. A. The Balsam Gall Midge—An Economic Pest of Balsam Fir Christmas Trees; 151; Maine Agricultural Experimental Station: Orono, ME, 1992.

⁸ Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 80–100.

⁹ Hall, D. R.; Amarawardana, L.; Cross, J. V.; Francke, W.; Boddum, T.; Hillbur, Y. *J. Chem. Ecol.* **2012**, *38*, 2–22.

¹⁰ Wicker-Thomas, C. *J. Insect Physiol.* **2007**, *53*, 1089–1100.

P^f Cloutier démontrent la présence d'une phéromone sexuelle.¹¹ De plus, il est raisonnable de croire qu'elle est une caractéristique conservée au sein du groupe des cécidomyies. Toutefois, cette approche nécessite de connaître la composition de cette phéromone.

1.2 Arbres de Noël

1.2.1 Production

Le Québec produit principalement deux espèces d'arbres de Noël : le sapin baumier et le sapin Fraser.¹² Le baumier, une espèce indigène, est l'arbre de Noël le plus planté au Québec et il dégage un parfum caractéristique comme l'indique son nom.¹² Le Fraser, quant à lui, a l'avantage de mieux conserver ses aiguilles,¹³ mais il est moins adapté aux conditions climatiques du Québec.¹²

La production d'un arbre de 2,1 m à 2,4 m requiert environ 14 ans, soit 4 ans en pépinière et de 9 à 10 ans en plantation.¹²

1.2.2 Impacts économiques

La production canadienne d'arbres de Noël, avec 2381 plantations ayant une superficie totale de 28 315 ha en 2011, est principalement située au Québec (surtout dans les régions de l'Estrie et de Chaudière-Appalaches), en Nouvelle-Écosse et en Ontario (figure 1.1). L'Ontario est la province ayant le plus de fermes (647 fermes), mais celles du Québec (379 fermes) sont, en moyenne, les plus grandes (22 ha par ferme comparativement à la moyenne canadienne de 12 ha par ferme).¹⁴

¹¹ Guay, J.-F. Laboratoire de P^f Cloutier, département de biologie, Université Laval, Québec, QC. Communication personnelle, 30 octobre 2012.

¹² Pettigrew, A. La culture des arbres de Noël au Québec, une production singulière, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Sherbrooke, QC, 6 juin 2011.

¹³ Choisir son sapin de Noël, des astuces pour faire une bonne affaire, 2010. Option consommateurs. <http://www.option-consommateurs.org/journalistes/chroniques/331/> (consulté le 16 juillet 2013).

¹⁴ *Recensement de l'agriculture de 2011, Données sur les exploitations et les exploitants agricoles*, Statistique Canada; 2012; N° 95-640-XWF.

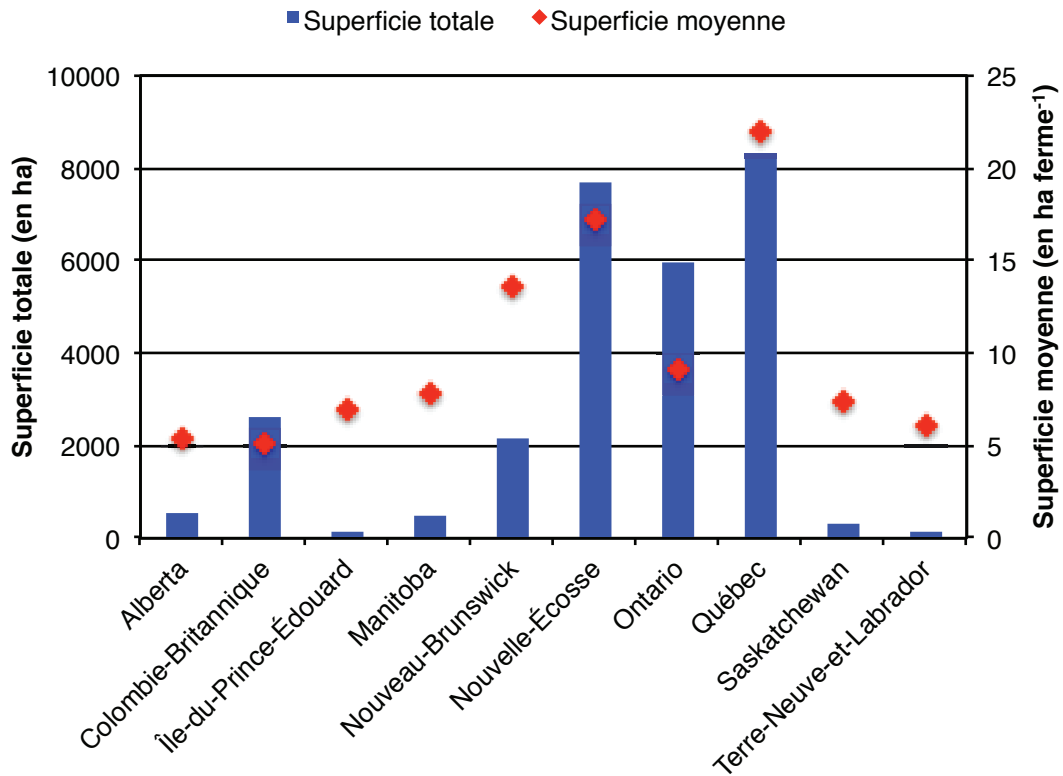


Figure 1.1 Superficie consacrée à la production d’arbres de Noël au Canada en 2011¹⁴

La production d’arbres de Noël en 2011 a généré des recettes agricoles d’environ 53,8 millions de dollars au niveau canadien dont 23,7 millions de dollars pour le Québec seulement.¹⁵ Par contre, entre le sommet de l’année 2001 et l’année 2012, les revenus canadiens ont diminué de 31 % (figure 1.2).

¹⁵ Statistique Canada. Tableau 002-0001 - Recettes monétaires agricoles, annuel (dollars), 2013. CANSIM (base de données). <http://www20.statcan.gc.ca/tables-tableaux/cansim/csv/00020001-fra.zip> (consulté le 5 septembre 2013).

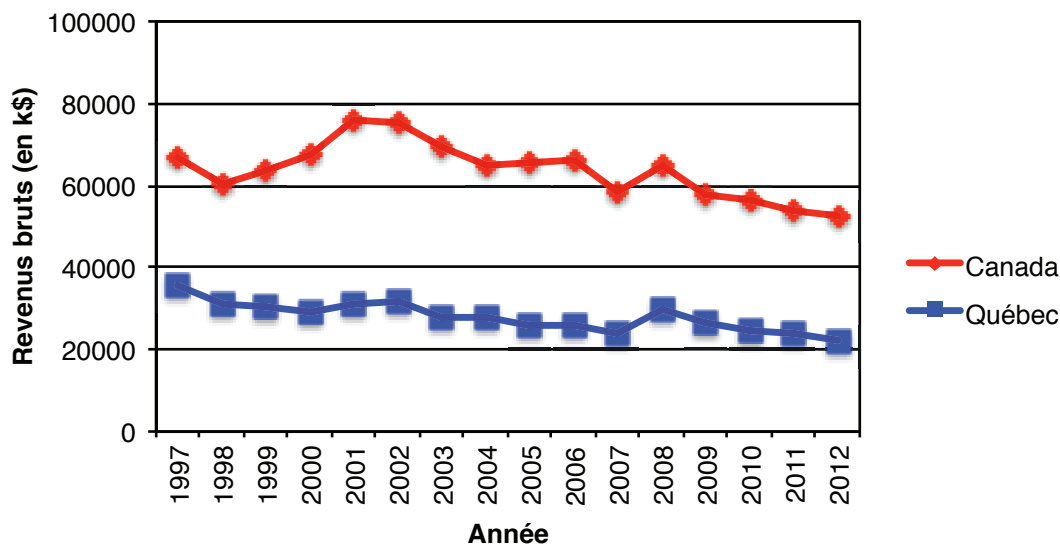


Figure 1.2 Évolution des recettes agricoles tirées de la production d’arbres de Noël au Canada et au Québec entre 1997 et 2012¹⁵

Au niveau international, le Canada a exporté 1,7 million d’arbres pour une valeur de 28,2 millions de dollars en 2011, dont 15,7 millions de dollars (56 %) pour le Québec (figure 1.3). Les exportations ont principalement pris la route des États-Unis avec environ 1,6 million d’arbres pour 25,8 millions de dollars (91 % des revenus d’exportation).¹⁶ Bien que l’arbre de Noël naturel s’avère un choix plus écologique,¹⁷ le Canada a importé en 2011 pour 47 millions de dollars d’arbres de Noël artificiels, principalement de la Chine, avec presque 46 millions de dollars à elle seule, et le reste provenait notamment de Thaïlande, des États-Unis, du Mexique et du Vietnam.¹⁶

¹⁶ Les arbres de Noël... en chiffres. Statistique Canada, 2012. http://www42.statcan.gc.ca/smr08/2012/smr08_169_2012-fra.htm (consulté le 5 septembre 2013).

¹⁷ Couillard, S.; Bage, G.; Trudel, J.-S. *Comparative Life Cycle Assessment (LCA) of artificial vs. natural Christmas tree*; Ellipso: Montréal, 2009; 91 p.

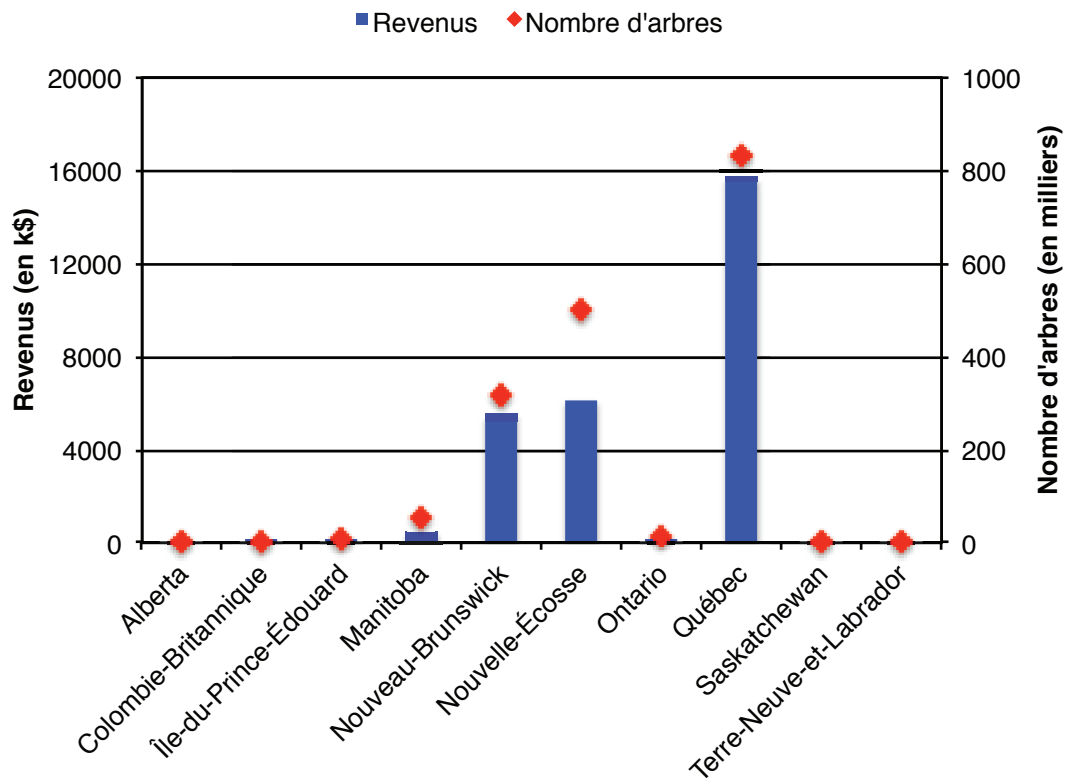


Figure 1.3 Valeur des arbres de Noël exportés par le Canada en 2011¹⁶

1.2.3 Insectes ravageurs

Puisque les arbres de Noël sont une culture où l'aspect esthétique de l'arbre prime, les insectes l'endommageant sont considérés comme des ravageurs. Les plus importants causant des dommages aux sapins sont : le puceron des pousses du sapin (*Mindarus abietinus* Koch [Hemiptera : Aphididae]); le tétranyque de l'épinette (*Oligonychus ununguis* Jacobi [Acari : Tetranychidae]) et la cécidomyie du sapin (*Paradiplosis tumifex* Gagné [Diptera : Cecidomyiidae]).^{18,19}

¹⁸ McCarthy, P. C.; Adam, C. I. *Insectes et maladies s'attaquant à l'arbre de Noël*; Ressources naturelles Canada, Centre de foresterie de l'Atlantique : Fredericton, NB, 2008.

¹⁹ Pettigrew, A. ABC des bibittes des sapins (ou l'art de les comprendre, pour les contrer), Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Thetford Mines, QC, 29 janvier 2009.

Le laboratoire de P^f Cloutier possède une grande expérience sur ces insectes et plusieurs articles scientifiques, un mémoire de maîtrise ainsi qu'un rapport de recherche ont été rédigés par le passé.^{2,20-25}

1.3 Cécidomyie du sapin

1.3.1 Historique

Les galles formées sur les aiguilles du sapin par des cécidomyies ont été étudiées dès 1886 par Lintner,²⁶ mais l'identification de l'espèce galligène n'a été faite qu'en 1978 par Gagné qui l'a décrite sous le nom de *Paradiplosis tumifex* Gagné (Diptera : Cecidomyiidae).²⁷ De plus, une cécidomyie inquiline, *Dasineura balsamicola* (Lintner), peut aussi se retrouver dans les galles.²⁷

Ainsi, il sera sous-entendu dans la suite de ce mémoire que le nom « cécidomyie du sapin » réfère spécifiquement à *Paradiplosis tumifex*.

1.3.2 Cycle de vie

La cécidomyie du sapin est un insecte univoltin, soit ayant seulement une génération par année, dont le cycle de vie est illustré à la figure 1.4.

²⁰ Mailhot, P. Écologie de la cécidomyie du sapin (*Paradiplosis tumifex*) : relations avec la cécidomyie inquiline des galles (*Dasineura balsamicola*) et ses parasitoïdes. Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec, QC, 2006.

²¹ Berthiaume, R.; Hébert, C.; Cloutier, C. *Environ. Entomol.* **2007**, *36*, 319–328.

²² Berthiaume, R.; Hébert, C.; Cloutier, C. *Can. Entomol.* **2001**, *133*, 151–154.

²³ Berthiaume, R.; Hébert, C.; Cloutier, C. *Biocontrol.* **2000**, *45*, 425–438.

²⁴ Deland, J.-P.; Berthiaume, R.; Hébert, C.; Cloutier, C. Programme alternatif de protection du sapin de Noël contre le puceron des pousses du sapin dans le contexte d'une saine gestion des ressources environnementales (Projet de recherche et technologie en environnement); Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec, 1998.

²⁵ Cloutier, C.; Roy, M.; Boudreault, S. Développement d'outils en lutte intégrée contre le tétranyque de l'épinette (Programme de soutien à l'innovation horticole, projet 07-2-703); Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Pêcheries du Québec, 2009.

²⁶ Lintner, J. A. *Fourth Report on the Injurious and Other Insects of the State of New York*; New York State: Albany, NY, 1888; pp. 60–63.

²⁷ Osgood, E. A.; Gagné, R. J. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1978**, *71*, 85–91.

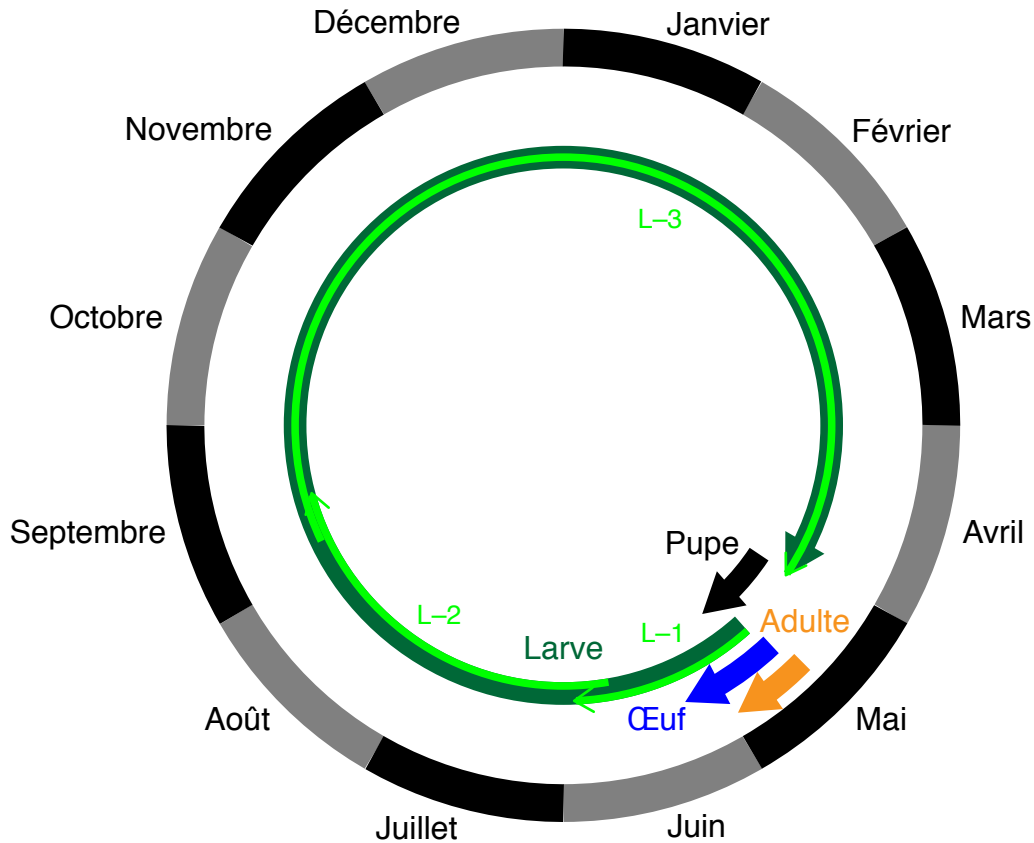
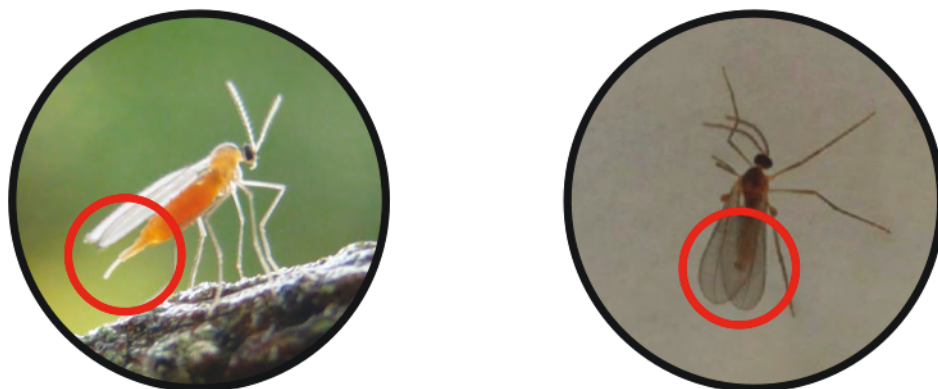


Figure 1.4 Cycle de vie de la cécidomyie du sapin²⁷

Tout d’abord, l’imago, ou l’insecte adulte, est une mouche orange mesurant environ 3,5 à 3,7 mm,³ émergeant dans la seconde moitié du mois de mai²⁷ et ayant une durée de vie d’environ deux jours seulement.³ Tel qu’illustré par la figure 1.5, le mâle et la femelle peuvent se différencier aisément notamment en regardant l’apex de l’abdomen où la femelle a un ovipositeur orange tandis que le mâle a deux crochets gris au niveau des *genitalia*.²⁷ Après l’accouplement, la femelle va pondre ses œufs entre les aiguilles des bourgeons du sapin en déploiement, dans la période où l’extrémité du bourgeon est découverte et que les aiguilles commencent à être exposées, soit vers la fin du stade 2 et au stade 3 des bourgeons (figure 1.6).²⁸ En effet, la synchronisation entre l’insecte et la plante est critique pour les insectes ayant une courte durée de vie comme les cécidomyies.²⁹

²⁸ Pettigrew, A. Avertissement No 05 – 16 mai 2012, Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec, 2012. <http://www.agrireseau.qc.ca/Rap/documents/a05an12.pdf> (consulté le 24 août 2012).

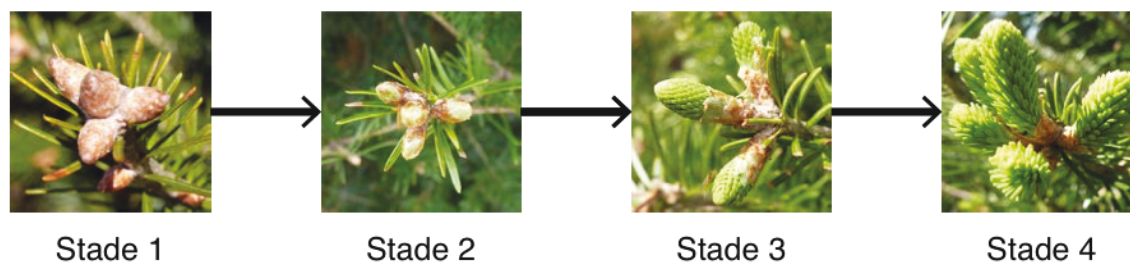
²⁹ Yukawa, J. *Popul. Ecol.* **2000**, *42*, 105–113.



Femelle

Mâle

Figure 1.5 Femelle³⁰ et mâle adulte de la cécidomyie du sapin



Stade 1

Stade 2

Stade 3

Stade 4

Figure 1.6 Stades 1 à 4 du débourrement des bourgeons du sapin^{28,31}

L'œuf, ovale et translucide, est présent de la mi-mai au début du mois de juin et il éclot après deux ou trois jours.²⁷

La larve passe par trois stades. Le premier stade, présent de la mi-mai à la mi-juin, initie la formation de la galle qui l'entoure dès la première semaine.^{27,32} Le second stade est présent de la fin juin à la mi-septembre puis au troisième stade, soit de début septembre au début du mois de mai, la larve sort de l'aiguille et hiverne dans la litière du sol.²⁷

La puppe, quant à elle, est présente dans la première moitié de mai.²⁷

³⁰ Boudreault, S. Laboratoire de P^r Cloutier, département de biologie, Université Laval, Québec, QC. Communication personnelle, 20 mai 2011.

³¹ Guay, J.-F. Laboratoire de P^r Cloutier, département de biologie, Université Laval, Québec, QC. Communication personnelle, 2012.

³² West, R. J.; Shorthouse, J. D. *Can. J. Bot.* **1982**, *60*, 131–140.

1.3.3 Galles

Une galle, ou cécidie, est par définition une excroissance hypertrophique présente sur un tissu végétal et elle est causée par un insecte. Le nombre d'espèces d'insectes galligènes est estimé à environ 13 000 espèces, réparties dans plusieurs groupes.³³

Dans notre cas, celle-ci est présente sur l'aiguille du sapin baumier *Abies balsamea* et du sapin Fraser *Abies fraseri*, tel qu'illustré par la figure 1.7. La formation de la galle est initiée par la larve de stade 1 de la cécidomyie du sapin dès sa première semaine de vie.³²



Figure 1.7 Galles formées par la larve de la cécidomyie du sapin³⁴

Les aiguilles portant des galles tombent prématurément ce qui affecte la valeur esthétique de l'arbre ayant pour conséquence une dépréciation de sa valeur marchande lorsque celui-ci est vendu comme arbre de Noël.³⁵

1.3.4 Écologie

Afin de comprendre les dynamiques de population intrinsèques au cas de la cécidomyie du sapin, les premières études exhaustives sur l'écologie ont été faites au Maine dans les années 1970.⁷ Quant au Québec, le groupe de P^r Cloutier possède une solide expérience en la matière.

³³ Stone, G. N.; Schönrogge, K. *Trends in Ecology & Evolution* **2003**, *18*, 512–522.

³⁴ Guay, J.-F. Laboratoire de P^r Cloutier, département de biologie, Université Laval, Québec, QC. Communication personnelle, 29 juillet 2012.

³⁵ Martineau, R. *Insectes nuisibles des forêts de l'est du Canada*; Éditions Marcel Broquet Inc.: La Prairie, QC, 1985; pp. 108–110.

Essentiellement, la population de la cécidomyie est régulée par divers autres organismes, en particulier des insectes.^{2,20} D'abord, il y a la cécidomyie inquiline du sapin ou *Dasineura balsamicola* (Diptera : Cecidomyiidae). Un organisme inquilin partage l'abri et la nourriture d'un autre.³⁶ En effet, contrairement à la cécidomyie *P. tumifex*, *D. balsamicola* est incapable d'initier la formation de la galle.²⁷ L'espèce inquiline est préjudiciable à la galligène en prenant le contrôle de la nourriture ce qui, à terme, cause la mort de la cécidomyie du sapin.^{20,27} Ensuite, la cécidomyie du sapin est fréquemment parasitée par des guêpes parasitoïdes telles que *Platygaster spp.* (Hymenoptera : Platygasteridae) et *Tetrastichus spp.* (Hymenoptera : Eulophidae). Celles-ci sont respectivement des endoparasites (de l'œuf et de la larve de la cécidomyie) et des ectoparasites (de la larve) causant alors la mort de l'insecte parasité.⁷

Le niveau de population est probablement aussi influencé par plusieurs facteurs abiotiques. Ainsi, un projet est en cours afin de comprendre l'effet du climat dans l'optique de prévoir l'impact des changements climatiques.³⁷

En conséquence, les épidémies de *P. tumifex* sont cycliques et localisées. En effet, au Maine, il y a environ sept ans entre les épidémies et elles durent généralement de deux à cinq ans.⁵ Celles-ci sont localisées notamment parce que la cécidomyie du sapin ne parcourt pas une grande distance.⁷ De plus, le dépistage étant difficile, des outils efficaces sont nécessaires afin d'aider les producteurs.

1.4 Phéromone sexuelle

1.4.1 Qu'est-ce qu'une phéromone sexuelle?

Les organismes vivants produisent ou acquièrent de leur environnement des molécules qui agissent en tant que médiateurs chimiques. Ceux-ci ont été classés par Whittaker et Fenny

³⁶ Gullan, P. J.; Cranston, P. S. *The Insects: An Outline of Entomology*, 4^e éd.; John Wiley & Sons : Chichester, 2010; p. 510.

³⁷ Cloutier, C. Développement de la surveillance de la cécidomyie du sapin de Noël basé sur les phéromones (Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, projet 810254); Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Pêcheries du Québec, 2011.

selon leur fonction ou leur effet dans une interaction³⁸ et les fonctions ne sont pas incompatibles entre elles.³⁹ Cette classification est illustrée à la figure 1.8.

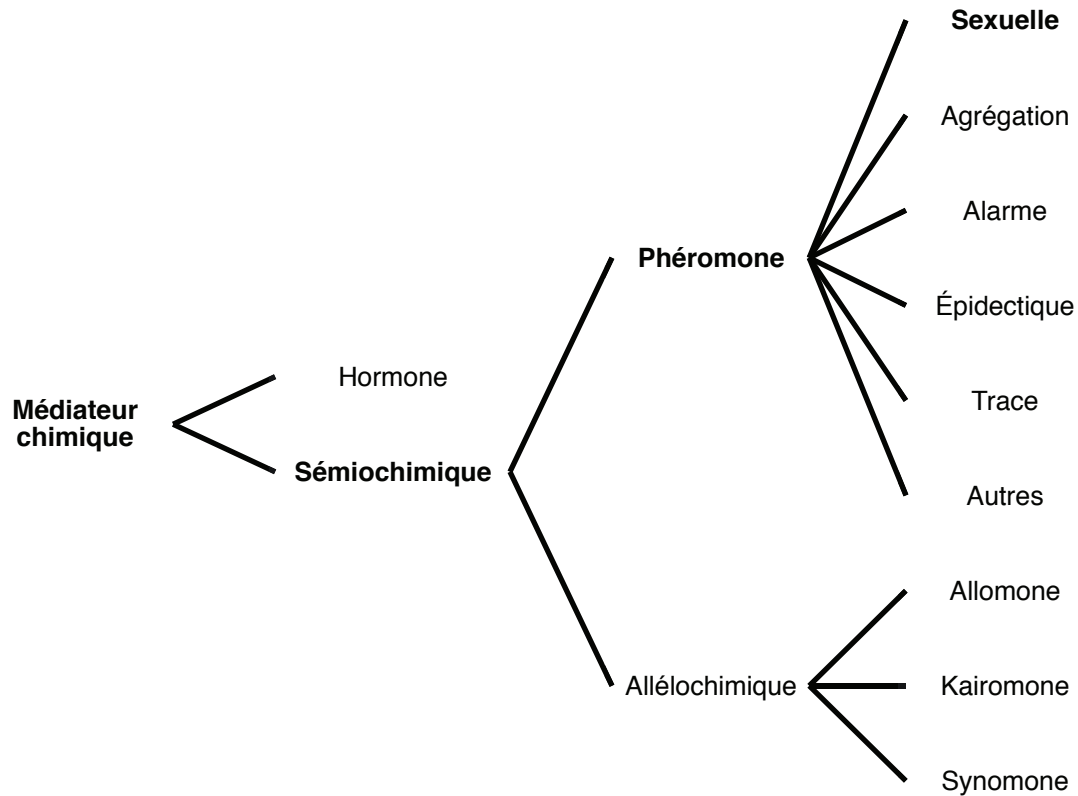


Figure 1.8 Classification et terminologie des médiateurs chimiques en situant la phéromone sexuelle

Les médiateurs chimiques se divisent d’abord en deux grandes classes : les hormones et les sémi chimiques. Les hormones (du grec *hormôn*, participe présent de *hormaô* « exciter ») sont des substances sécrétées à l’intérieur de l’organisme par les glandes endocrines et elles induisent une réponse d’un organe cible ou de l’organisme entier.⁴⁰ Les sémi chimiques (terme proposé par Law et Regnier, du grec *semeion* « signal ») sont sécrétés hors de l’organisme et transmettent quant à eux un message entre des individus.⁴¹

³⁸ Whittaker, R. H.; Fenny, P. P. *Science* **1971**, *171*, 757–770.

³⁹ Brown, W. L., Jr.; Eisner, T.; Whittaker, R. H. *BioScience* **1970**, *20*, 21–22.

⁴⁰ Hardie, D. G. *Biochemical Messengers: Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors*; Chapman & Hall : London; New York, 1991, p. 21.

⁴¹ Law, J. H.; Regnier, F. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 533–548.

Les sémiouchimiques se séparent en deux sous-classes : les phéromones et les allélochimiques. Les phéromones (du grec *pherin* « transmettre » et *hormôn*) ont été définies par Karlson et Lüscher comme étant des substances transmettant un message entre deux individus de façon intraspécifique,^{42,43} soit de la même espèce, tandis que les allélochimiques (du grec *allélôn* « l'un l'autre ») agissent plutôt de façon interspécifique (entre espèces différentes).³⁹ Les allélochimiques comportent au moins trois sous-catégories : les allomones (du grec *allos* « autre »), les kairomones (du grec *kairos* « opportuniste ») et les synomones (du grec *syn* « avec »), dépendant si l'interaction (le signal) profite respectivement à l'émetteur,⁴⁴ au receveur³⁹ ou aux deux.⁴⁵

Enfin, les phéromones comportent plusieurs sous-catégories fonctionnelles telles que : les phéromones sexuelles, d'agrégation, d'alarme, d'épidéictique (d'espacement), de trace, et les autres.⁴⁶

En résumé, une phéromone sexuelle est un composé chimique émis par le mâle ou la femelle de la même espèce et qui transmet un message de disponibilité reproductive afin d'augmenter la probabilité d'un accouplement réussi. Sauf indication contraire, il sera sous-entendu dans ce document que le terme phéromone désigne plus particulièrement la phéromone sexuelle.

1.4.2 Fonctionnement

Chez les insectes, une phéromone sexuelle d'attraction est souvent produite par la femelle vierge arrivant à maturité, à partir d'une glande spéciale.⁴⁷ Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés afin de l'émettre. D'une part, passivement, en la laissant s'évaporer de la surface de la glande.⁴⁷ Les femelles émettrices tendent d'ailleurs à adopter des comportements particuliers (appel) afin d'augmenter la surface exposée aux courants d'air.⁴⁷ D'autre part,

⁴² Karlson, P.; Lüscher, M. *Nature* **1959**, *183*, 55–56.

⁴³ Karlson, P.; Butenandt, A. *Annu. Rev. Entomol.* **1959**, *4*, 39–58.

⁴⁴ Brown, W. L., Jr. *Am. Nat.* **1968**, *102*, 188–191.

⁴⁵ Nordlund, D. A.; Lewis, W. J. *J. Chem. Ecol.* **1976**, *2*, 211–220.

⁴⁶ Jutsum, A. R.; Gordon, R. F. S. Introduction. Pheromones: Importance to Insects and Role in Pest Management. Dans *Insect Pheromones in Plant Protection*; Jutsum, A. R.; Gordon, R. F. S., Éd. John Wiley & Sons, 1989; pp. 1–13.

⁴⁷ Chapman, R. F.; McNeil, J. N.; Millar, J. G. Chemical communication: pheromones and allelochemicals. Dans *The Insects: Structure and Function*, 5^e éd.; Simpson, S. J.; Douglas, A. E., Éd. Cambridge University Press: Cambridge, 2013; pp. 857–900.

de manière plus active, elles peuvent battre des ailes ou générer des impulsions avec la glande afin de nébuliser la phéromone et faciliter l'évaporation.⁴⁷

La phéromone volatile permet de transmettre un message sur une longue distance. L'espace actif de la phéromone, ou le panache (*plume* en anglais), est la zone où la concentration est plus grande ou égale à celle du seuil d'olfaction.^{48,49} Les récepteurs olfactifs se situent généralement au niveau des antennes du mâle⁵⁰ et deux informations sensorielles lui sont indispensables afin de localiser la source de la phéromone : la présence de l'odeur et la direction du vent qui la transporte.⁴⁹ Comme illustré à la figure 1.9, celui-ci tendra alors à voler contre le vent afin d'arriver à la source, la femelle, située en amont.⁴⁹

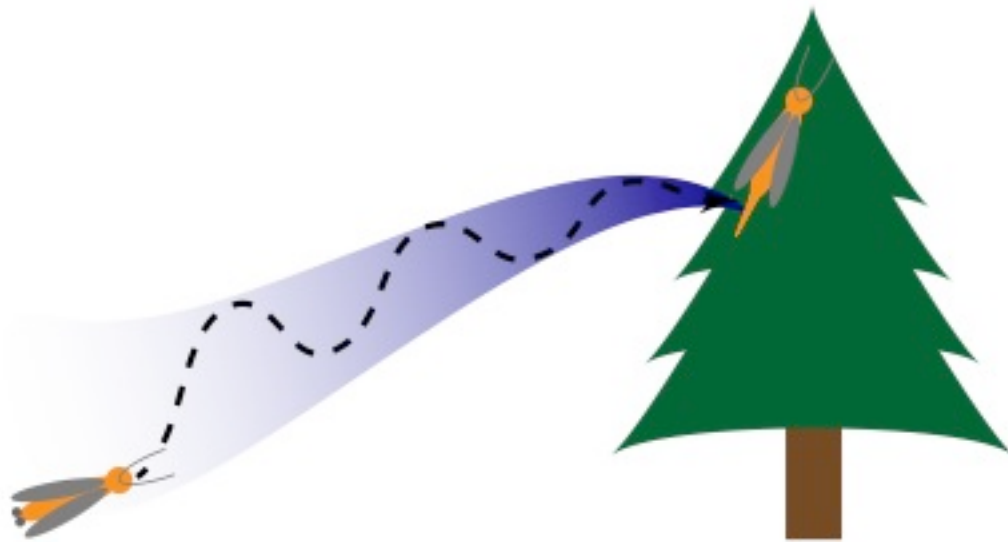


Figure 1.9 Fonctionnement de la phéromone sexuelle : le panache de la phéromone (illustré en bleu) émise par la femelle attire le mâle

1.4.3 Historique

La première description d'un comportement associé à une phéromone chez un insecte aurait été faite en 1608 par Charles Butler, un apiculteur anglais.⁵¹ En effet, l'abeille à miel, *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera : Apidae), émet une phéromone d'alarme lorsqu'elle pique et celle-ci est perçue par ses congénères qui réagissent en attaquant aussi l'agresseur.

⁴⁸ Wyatt, T. D. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*; Cambridge University Press: Cambridge, 2003.

⁴⁹ Cardé, R. T.; Willis, M. A. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 854–866.

⁵⁰ Schneider, D. *Naturwissenschaften* **1992**, *79*, 241–250.

⁵¹ Matthews, R. W.; Matthews, J. R. Chemical Communication. Dans *Insect Behavior*; Springer: Dordrecht, Pays-Bas, 2010; pp. 217–259.

Cette phéromone a été identifiée en 1962 comme étant l'acétate de 3-méthylbutyle (figure 1.10).⁵²

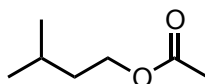


Figure 1.10 Phéromone d'alarme d'*Apis mellifera* : acétate de 3-méthylbutyle

Quelques siècles plus tard, soit en 1900, Jean-Henri Fabre, un entomologiste français, a rapporté d'intéressantes observations expérimentales sur les papillons, plus particulièrement sur *Saturnia pyri* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera : Saturniidae) et *Lasiocampa quercus* Linnaeus (Lepidoptera : Lasiocampidae).⁵³ Tout d'abord, il a observé qu'une femelle de *S. pyri* dans une cage grillagée avait attiré, pendant huit jours, 150 mâles provenant de kilomètres à la ronde.⁵³ Puis, poursuivant ses expériences avec *L. quercus*, il a découvert que cela était dû à une odeur bien que, à son étonnement, elle n'ait pas été masquée par le naphthalène ou d'autres composés très odorants. En effet, en isolant la femelle dans une cloche en verre hermétique, les papillons mâles se dirigeaient où avait précédemment reposé la femelle.⁵³

Par la suite, Adolf Butenandt, un biochimiste allemand lauréat du prix Nobel de chimie de 1939 (partagé avec Leopold Ružička) pour ses travaux sur les hormones sexuelles,⁵⁴ fût un autre pionnier dans ce domaine. Dès 1939, il a commencé ses travaux sur les phéromones sexuelles, plus particulièrement sur celle du papillon du ver à soie, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera : Bombycidae).⁵⁵

Le choix de ce papillon n'a pas été ingénu. En effet, deux importants défis avaient été identifiés afin de pouvoir mener les travaux à bon terme.

Premièrement, une importante quantité d'insectes est nécessaire pour l'isolation de la phéromone.⁵⁵ Or, ce papillon est un excellent insecte modèle puisqu'il était depuis longtemps

⁵² Boch, R.; Shearer, D. A.; Stone, B. C. *Nature* **1962**, *195*, 1018–1020.

⁵³ Fabre, J.-H. *Souvenirs entomologiques : études sur l'instinct et les mœurs des insectes*; Ch. Delagrave: Paris, 1900; Vol. 7; pp. 339–374.

⁵⁴ The Nobel Prize in Chemistry 1939, 2013. Nobel Media AB.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1939/ (consulté le 27 août 2013).

⁵⁵ Hecker, E.; Butenandt, A. Bombykol Revisited—Reflections on a Pioneering Period and on Some of Its Consequences. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 1–44.

une espèce domestiquée et élevée commercialement en grande quantité pour la production de soie.⁵⁵

Deuxièmement, il est crucial de développer une méthode de tests biologiques permettant de doser les composés actifs afin de les suivre pendant l'isolation.⁵⁵ Ainsi, le détecteur le plus sensible à la phéromone est l'antenne du mâle qui a pu être utilisée dans ce dessein.⁵⁵

Finalement, après 20 ans, à force d'essais et erreurs, bien que les travaux aient été affectés par la Seconde Guerre mondiale et au cours des années subséquentes, la phéromone, le bombykol (figure 1.11), a été isolée en 1959.⁵⁶ En 1961, la structure a été déterminée^{57,58} puis l'isomère actif a été confirmé par synthèse totale.⁵⁹ D'ailleurs, ce dernier fractionnement, en suivant l'activité des fractions, a demandé plus d'un million de cocons afin d'obtenir 500 000 insectes femelles pour en extraire, à partir des glandes à phéromone, 280 g de brut purifié pour obtenir 6 mg de bombykol (intentionnellement sous la forme d'un dérivé).⁵⁷

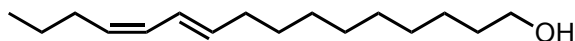


Figure 1.11 Bombykol : (10*E*,12*Z*)-hexadéca -10,12-diène-1-ol

Depuis ces premiers pas, de puissantes techniques ont été développées ce qui explique le nombre phénoménal de phéromones actuellement connues. En effet, la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur électroantennographique (qui utilise l'antenne du mâle comme détecteur) et des méthodes chimiques sur une microéchelle ou à la spectrométrie de masse permet de travailler sur la structure de la phéromone tout en ayant une quantité de matériel de départ beaucoup moins importante que celle utilisée par Butenandt.

Quant aux cécidomyies, la première phéromone à avoir été découverte l'a été chez un important ravageur du froment (blé), la mouche de Hesse⁶⁰ (*Mayetiola destructor* Say [Diptera : Cecidomyiidae]). En effet, la structure chimique de la phéromone sexuelle (du

⁵⁶ Butenandt, A.; Beckmann, R.; Stamm, D.; Hecker, E. *Z. Naturforsch.* **1959**, *14b*, 283–284.

⁵⁷ Butenandt, A.; Beckmann, R.; Hecker, E. *Z. Physiol. Chem.* **1961**, *324*, 71–83.

⁵⁸ Butenandt, A.; Beckmann, R.; Stamm, D. *Z. Physiol. Chem.* **1961**, *324*, 84–87.

⁵⁹ Butenandt, A.; Hecker, E. *Angew. Chem.* **1961**, *73*, 349–353.

⁶⁰ Onstad, D. W.; Knolhoff, L. Arthropod Resistance to Crops. Dans *Insect Resistance Management: Biology, Economics and Prediction*, 2^e éd.; Academic Press, 2014; pp. 293–326.

moins, de la composante majoritaire de celle-ci) a été établie dès 1991⁶¹ (figure 1.12) après que la présence d'une phéromone ait été démontrée en 1984 en exposant les mâles à des extraits dans les hexanes d'ovipositeurs de femelles vierges dans un olfactomètre en Y.⁶² Finalement, les autres composantes ont été identifiées bien plus tard, en 2009.⁶³

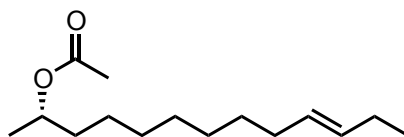


Figure 1.12 Composante majoritaire de la phéromone de *M. destructor*

Les cécidomyies requièrent le dernier cri des techniques analytiques puisque la quantité produite de phéromone est de l'ordre du pico au femtogramme (de 10^{-12} à 10^{-15} g).⁶⁴ Jusqu'à maintenant, la structure des molécules composant la phéromone sexuelle ont été identifiées chez au moins 17 espèces de cécidomyies.^{9,65}

1.5 Lutte contre les ravageurs

1.5.1 Agents phytosanitaires

Les agents phytosanitaires, englobés par les pesticides, sont les substances utilisées afin de protéger les plantes et les récoltes.⁶⁶ Bien que les pesticides soient utilisés depuis très longtemps, ce secteur a connu un essor considérable au cours de la Seconde Guerre mondiale avec les progrès de l'industrie chimique. Une molécule vedette de cette époque est sans contredit le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un composé organochloré dont la découverte des propriétés insecticides par le chimiste suisse Paul Hermann Müller a été récompensée avec le prix Nobel de médecine en 1948.⁶⁷ Par contre, ce composé est banni dans plusieurs pays depuis les années 1970 en raison de ses effets néfastes sur la reproduc-

⁶¹ Foster, S. P.; Harris, M. O.; Millar, J. G. *Naturwissenschaften* **1991**, 78, 130–131.

⁶² McKay, P. A.; Hatchett, J. H. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1984**, 77, 616–620.

⁶³ Andersson, M. N.; Haftmann, J.; Stuart, J. J.; Cambron, S. E.; Harris, M. O.; Foster, S. P.; Franke, S.; Francke, W.; Hillbur, Y. *J. Chem. Ecol.* **2009**, 35, 81–95.

⁶⁴ Millar, J. G. Role of Gas Chromatography in the Identification of Pheromones and Related Semiochemicals. Dans *Gas chromatography*; Poole, C., Éd.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp. 679–687.

⁶⁵ Fitzpatrick, S. M.; Gries, R.; Khaskin, G.; Peach, D. A. H.; Iwanski, J.; Gries, G. *J. Chem. Ecol.* **2013**, 39, 37–49.

⁶⁶ Lachuer, E. *Les produits phytosanitaires: Distribution et application Tome 1, Les différentes méthodes de lutte et le choix d'un produit en lutte chimique*, 3^e éd.; Educagri éditions : Dijon, 2011; p. 9.

⁶⁷ The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948, 2013. Nobel Media AB. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1948/ (consulté le 27 août 2013).

tion des oiseaux et sa persistance dans l'environnement.^{68,69} À l'heure actuelle, environ 2,5 millions de tonnes de pesticides sont utilisées annuellement dans le monde.⁷⁰

Dans le cas de la cécidomyie du sapin, le diazinon était le seul insecticide homologué en 2012 (figure 1.13),²⁸ un composé organophosphaté qui inhibe l'acétylcholinestérase (AChE).⁷¹ L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada a par ailleurs annoncé que l'utilisation de celui-ci devra être abandonnée au 31 décembre 2016, avec un report possible de deux ans, en raison des risques pour la santé et l'environnement.⁶ De plus, la larve est protégée à l'intérieur de la galle d'un insecticide non systémique comme le diazinon.^{18,35}

Depuis mai 2013, un nouvel insecticide, le Movento^{MD} de Bayer CropScience (spirotétramate, famille des céto-énols, figure 1.13), a été homologué dans le cadre du Programme d'extension du profil d'emploi pour les usages limités demandés par les utilisateurs (PE-PUDU).^{72,73} Il est un insecticide systémique circulant par le phloème et le xylème pour protéger les nouvelles aiguilles et il agit par ingestion par les stades immatures de l'insecte en inhibant la biosynthèse des lipides.^{74,75}

⁶⁸ Schoch, R. M. *Case Studies in Environmental Science*; West Publishing Company: St. Paul, MN, 1996; pp. 99–101.

⁶⁹ Le DDT (Dichloro-diphényl-trichloroéthane), 2007. Gouvernement du Canada.

<http://www.science.gc.ca/default.asp?Lang=Fr&n=730D78B4-1> (consulté le 16 janvier 2014).

⁷⁰ Mahmoud, M. F.; Loutfy, N. Uses and Environmental Pollution of Biocides. Dans *Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution*; Rathore, H. S.; Nollet, L. M. L., Éd.s.; Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2012; pp. 3–25.

⁷¹ Toxicologie de la matière active : diazinon, 2014. SAgE pesticides.

<http://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/resultats.aspx?Search=matiere&ID=120> (consulté le 21 février 2014).

⁷² Étiquette de l'insecticide Movento 240 SC, 2014. Bayer CropScience. http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/1_1/view_label?p_ukid=45394551 (consulté le 13 juin 2014)

⁷³ Étiquette de l'insecticide Movento 240 SC, 2013. Bayer CropScience.

<http://www.agrireseau.qc.ca/legumeschamp/documents/Movento%20240%20SC%20Insecticide.Several%20Crops.F%20Label.pdf> (consulté le 13 juin 2014)

⁷⁴ Caractéristiques des produits commerciaux : Movento 240 SC, 2014. SAgE pesticides.

<http://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/resultats.aspx?Search=produit&id=1167> (consulté le 13 juin 2014)

⁷⁵ Bulletin technique : Nouvel insecticide foliaire doté d'une suppression systémique unique à double action dans les cultures horticoles. Bayer CropScience.

<http://www.cropscience.bayer.ca/~media/Bayer%20CropScience/Country-Canada-Internet/Products/Movento/Movento-Bulletin-Technique.ashx> (consulté le 13 juin 2014)

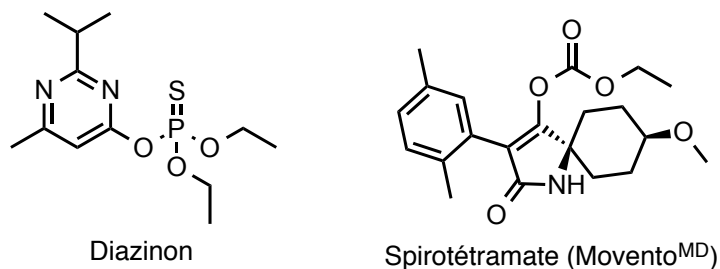


Figure 1.13 Structure du diazinon et du Movento^{MD}

La stratégie d'intervention recommandée par le MAPAQ est de faire le dépistage puis, si le niveau d'infestation le requiert, de faire un traitement sept à dix jours après l'apparition des insectes adultes (lorsque le nombre de larves est au maximum), afin de tuer le maximum de ces larves.^{4,28}

1.5.2 Pièges à phéromone

Depuis la découverte de la structure du bombykol par Butenandt, la recherche sur les phéromones a été encouragée par les utilisations possibles de celle-ci quant à la gestion des ravageurs. En effet, les phéromones sont intéressantes en raison de trois propriétés : spécificité à l'espèce; activité en faible quantité; et la quasi-totalité de celles-ci ne sont pas connues pour avoir un effet toxique chez les animaux.⁸

L'utilisation la plus répandue des pièges à phéromone est le dépistage.⁸ La cécidomyie du sapin est actuellement dépistée en examinant des pousses échantillonnées aléatoirement en début de saison, en utilisant des pièges collants et parfois des pièges à émergence (figure 1.14).^{28,31} Le dépistage conventionnel demande beaucoup de travail et une expertise particulière donc les producteurs doivent engager des dépisteurs compétents (clubs de dépistage). Le piège à phéromone, par contre, est beaucoup plus simple d'utilisation. Le dépistage est nécessaire afin déterminer si le traitement phytosanitaire est recommandé et, surtout, à quel moment le faire pour maximiser son efficacité.⁸

Le dépistage n'est pas la seule utilisation possible des phéromones. En effet, les pièges à phéromones peuvent être utilisés pour la confusion sexuelle ou la capture de masse.⁸



Piège collant



Piège à émergence

Figure 1.14 Pièges utilisés (piège collant³⁰ et piège à émergence) pour le dépistage de la cécidomyie

1.6 But et objectifs

Le but ultime de ce projet est de développer un piège à phéromone permettant le dépistage de la cécidomyie de sapin. Afin d'y parvenir, les objectifs suivants sont visés : extraire la phéromone sexuelle de l'insecte émetteur (chapitre 2); la caractériser (chapitre 3) et la comparer avec des analogues synthétiques (chapitre 4) afin d'identifier la phéromone (à poursuivre); la synthétiser et confirmer *in vivo* la structure et la stéréochimie (à poursuivre). Les hypothèses utilisées seront énoncées dans le chapitre y correspondant.

2. Collecte de la phéromone

2.1 Introduction

2.1.1 Utilisation d'un insecte modèle

Deux importants défis à relever dans la recherche sur les phéromones avaient été identifiés par Butenandt : l'importante quantité de matériel de départ nécessaire et la disponibilité d'une méthode de détection de la phéromone.⁵⁵ Ainsi, pour surmonter le premier problème, il avait choisi l'insecte qui lui semblait idéal pour ses recherches, soit le papillon du ver à soie (*Bombyx mori*).⁵⁵

Contrairement à eux qui ont choisi leur insecte, nous devons absolument orienter nos recherches sur la cécidomyie du sapin (*Paradiplosis tumifex*) afin de régler un problème précis. Or, cet insecte n'est pas le plus commode. En effet, sa disponibilité est limitée puisqu'il est univoltin³, sa forme adulte a une courte durée de vie³ et l'élevage est inenvisageable alors les ressources requises seraient excessives pour le cadre de ce projet. Ainsi, l'utilisation d'un insecte similaire où l'élevage serait possible est une option intéressante puisque cet insecte pourra notamment être utilisé afin d'appriivoiser les techniques de base en entomologie et pour tester au préalable les méthodes expérimentales.

La cécidomyie du puceron *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani) (Diptera : Cecidomyiidae)⁷⁶ présente des caractéristiques justifiant sa candidature comme modèle. Tout d'abord, cet insecte fait partie de la même famille que celui d'intérêt, celle des cécidomyies. Ensuite, elle est offerte commercialement sous forme de pupes puisqu'elle est utilisée comme agent de contrôle biologique contre les pucerons dans plusieurs cultures.⁷⁷ De plus, la différenciation sexuelle est possible à l'œil en raison du dimorphisme sexuel au niveau des antennes, celles du mâle étant significativement plus longues, plus recourbées et plus plumeuses que celles de la femelle.⁷⁸ Finalement, sa phéromone sexuelle est déjà connue et elle est consti-

⁷⁶ van Lenteren, J. C.; Schettino, M.; Isidoro, N.; Romani, R.; van Schelt, J. *Entomol. Exp. Appl.* **2002**, *102*, 199–209.

⁷⁷ Biobest *Aphidoletes-System*; Biobest: Westerlo, Belgique, 2011.

⁷⁸ van Lenteren, J. C.; Hale, A.; Klapwijk, J. N.; van Schelt, J.; Steinberg, S. Guidelines for quality control of commercially produced natural enemies. Dans *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*; van Lenteren, J. C., Éd.; CABI: Wallingford, Royaume-Uni, 2003; pp. 265–304.

tuée que d'une seule molécule émise par la femelle : le (2*R*,7*S*)-diacétoxytridécane (figure 2.1).⁷⁹

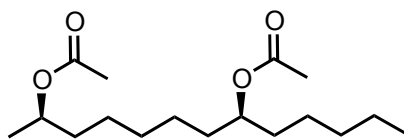


Figure 2.1 Pheromone sexuelle émise par la femelle d'*Aphidoletes aphidimyza*, (2*R*,7*S*)-diacétoxytridécane

La cécidomyie du puceron est un insecte nocturne dont l'adulte mesure 2,5 mm⁷⁷ et vit de deux à quatre jours sans eau ni nourriture, mais qui peut vivre de sept à dix jours avec du miellat ou de l'eau sucrée.^{76,77} Le rapport des sexes des adultes est d'environ trois femelles pour deux mâles.⁷⁶ Après l'accouplement, la femelle pond ses œufs dans les colonies de pucerons.⁷⁷

2.1.2 Extraction avec un solvant

C'est une technique simple qui consiste à utiliser un solvant pour extraire la phéromone à partir de l'insecte. Pour ce faire, il est possible de laver soit l'insecte entier, soit la glande à phéromone excisée voire l'abdomen.

Le solvant utilisé doit évidemment avoir la capacité de solubiliser la phéromone, mais surtout d'être suffisamment volatile pour s'évaporer sans avoir à trop chauffer l'extrait.⁸⁰ Les solvants les plus fréquents sont le dichlorométhane, l'hexane et l'éther diéthylique bien qu'ils ne soient pas les seuls ayant été utilisés (tableau 2.1).⁸⁰ Le chloroforme et le dichlorométhane ont aussi l'avantage d'être ininflammables. Le sulfure de carbone est très toxique et inflammable, mais il a l'avantage de se concentrer aisément et de répondre faiblement au détecteur à ionisation de flamme utilisé en chromatographie en phase gazeuse.⁸¹

⁷⁹ Choi, M.-Y.; Khaskin, G.; Gries, R.; Gries, G.; Roitberg, B. D.; Raworth, D. A.; Kim, D.-H.; Bennett, R. G. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 659–670.

⁸⁰ Jacobson, M. *Insect Sex Pheromone*; Academic Press: New York, 1972.

⁸¹ Golub, M. A.; Weatherston, I. Techniques for Extracting and Collecting Sex Pheromones from Live Insects and from Artificial Sources. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 223–286.

Tableau 2.1 Point d'ébullition des solvants à 760 mmHg⁸²

Solvant	Point d'ébullition °C
Éther diéthylique	34
Pentane	36
Dichlorométhane	40
Sulfure de carbone	46
Acétone	56
Chloroforme	61
Hexane	69
Acétate d'éthyle	77
Benzène	80
Heptane	98

En contrepartie de la simplicité de cette méthode, des contaminants sont aussi solubilisés.⁸³

Un sommaire des cas où cette technique a été utilisée chez les femelles des cécidomyies est présenté au tableau 2.2.

⁸² Physical Constants of Organic Compounds. Dans *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 94^e éd.; Haynes, W. M., Éd.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2013.

⁸³ Amarawardana, L. The Chemical Diversity of Midge Pheromones. Thèse de doctorat, University of Greenwich, Londres, 2009.

Tableau 2.2 Sommaire de l'extraction avec un solvant chez les cécidomyies femelles

Espèce	Partie extraite	Solvant	Méthode	Réf.
<i>Mayetiola destructor</i>	Ovipositeurs	Pentane	Ovipositeurs excisés et extraits.	61
		Hexane	Ovipositeurs de femelles en appel excisés et accumulés dans une fiole dans l'azote liquide, laissés réchauffer à TP, puis extraits pendant 1 à 1,5 min.	63
<i>Contarinia oregonensis</i>	Ovipositeurs	Hexane	Ovipositeurs de femelles en appel excisés et extraits pendant 5 à 50 min.	84
<i>Contarinia nasturtii</i>	Ovipositeurs	Hexane	Ovipositeurs de femelles en appel excisés et accumulés dans une fiole dans l'azote liquide, puis extraits pendant 1 à 2 min.	85
	Insectes entiers	Hexane	Insectes immergés dans l'hexane pendant 15 min.	85
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	Ovipositeurs	Pentane	Ovipositeurs de femelles de 1 à 3 jours en appel excisés et extraits.	79
<i>Mayetiola thujae</i>	Ovipositeurs	Hexane	Ovipositeurs de femelles en appel extraits pendant 5 à 50 min.	86
<i>Contarinia pisi</i>	Ovipositeurs	Hexane	Ovipositeurs de femelles de 1 jour en appel excisés et accumulés dans une fiole dans l'azote liquide, puis extraits pendant 1 à 2 min.	87
<i>Dasineura oxycoccana</i>	Ovipositeurs	Hexane	Ovipositeurs de femelles en appel excisés et extraits.	65

⁸⁴ Gries, R.; Khaskin, G.; Gries, G.; Bennett, R. G.; King, G. G. S.; Morewood, P.; Slessor, K. N.; Morewood, W. D. *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 2283–2297.

⁸⁵ Hillbur, Y.; Celander, M.; Baur, R.; Rauscher, S.; Haftmann, J.; Franke, S.; Francke, W. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 1807–1828.

⁸⁶ Gries, R.; Khaskin, G.; Bennett, R. G.; Miroshnychenko, A.; Burden, K.; Gries, G. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 2933–2946.

⁸⁷ Hillbur, Y.; El-Sayed, A.; Bengtsson, M.; Löfqvist, J.; Biddle, A.; Plass, E.; Francke, W. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1941–1952.

Espèce	Partie extraite	Solvant	Méthode	Réf.
<i>Dasineura mali</i>	Ovipositeurs	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (3:1)	Ovipositeurs de femelles fraîchement émergées extraits au moins 2 h à TP (100 µL de solvant), 2 fois.	⁸⁸

⁸⁸ Heath, J. J.; Zhang, A.; Roelofs, W. L.; Smith, R. F. *Northeastern Nat.* **2005**, *12*, 93–102.

2.1.3 Collecte d'effluves

Cette technique consiste à collecter les substances que les insectes émettent dans l'air. Pour ce faire, une pompe génère un courant d'air en l'aspirant à la sortie du système. Ainsi, l'air est d'abord filtré par du charbon activé puis entre en contact avec les insectes vivants et, enfin, les effluves sont collectés en utilisant un piège cryogénique ou une substance adsorbante dont les effluves sont finalement désorbés avec un solvant ou thermiquement.

L'utilisation d'une substance adsorbante, comme le Porapak^{MD} Q, est une approche simple et peu dispendieuse de collecter la phéromone en comparaison avec, par exemple, un piège cryogénique.⁸⁹ Le Porapak Q est un copolymère d'éthylvinylbenzène-divinylbenzène, ayant une surface spécifique de 500–600 m² g⁻¹ et une densité de 0,34 g cm⁻³,⁹⁰ dont il a été démontré qu'il avait la capacité d'adsorber à partir de l'air des composés similaires aux phéromones.⁹¹ De plus, le piège cryogénique a le défaut d'accumuler une grande quantité d'eau rendant difficile d'y extraire les composés organiques.⁹²

Par contre, cette méthode comporte également des inconvénients. En effet, le nettoyage du Porapak Q avant son utilisation est primordial⁹³ et il est assez laborieux, surtout pour la récupération de quantités sous l'ordre du milligramme.⁹¹ De plus, il est possible que des composés très volatils réussissent à passer ou que des composés très sensibles soient oxydés.⁹¹

Ce système permet de collecter les substances émises par les insectes pendant une longue période de temps sans les impuretés non volatiles.⁹ Par contre, il est beaucoup plus complexe à mettre en œuvre que l'extraction de l'insecte par un solvant et il peut parfois être difficile d'obtenir un comportement d'appel de la part des femelles.⁹

Un sommaire des cas où cette technique a été utilisée chez les cécidomyies est présenté au tableau 2.3.

⁸⁹ Peacock, J. W.; Cuthbert, R. A.; Gore, W. E.; Lanier, G. N.; Pearce, G. T.; Silverstein, R. M. *J. Chem. Ecol.* **1975**, *1*, 149–160.

⁹⁰ Waters. *Waters Porapak Gas Chromatography Column Packing Materials Care and Use Manual*; Waters, 2008.

⁹¹ Byrne, K. J.; Gore, W. E.; Pearce, G. T.; Silverstein, R. M. *J. Chem. Ecol.* **1975**, *1*, 1–7.

⁹² Browne, L. E.; Birch, M. C.; Wood, D. L. *J. Insect Physiol.* **1974**, *20*, 183–193.

⁹³ Bjostad, L. B.; Gaston, L. K.; Shorey, H. H. *J. Insect Physiol.* **1980**, *26*, 493–498.

Tableau 2.3 Sommaire de la collecte d'effluves chez les cécidomyies

Espèce	Adsorbant	Débit mL min ⁻¹	Durée	Méthode de désorption	Réf.
<i>Rhopalomyia longicauda</i>	Porapak Q	200	4 j.	Élué avec CH ₂ Cl ₂ (3 x 0,5 mL)	94
<i>Dasineura gleditchiae</i>	Charbon activé	–	3 x 5 h	Élué avec hexanes (40 µL)	95
<i>Contarinia pyrivora</i>	Porapak Q	500	3 à 7 j.	Élué avec CH ₂ Cl ₂ (1,5 mL)	83
<i>Dasineura pyri</i>	Porapak Q	500	3 à 7 j.	Élué avec CH ₂ Cl ₂ (1,5 mL)	83
<i>Dasineura tetensi</i>	Porapak Q	500	3 à 7 j.	Élué avec CH ₂ Cl ₂ (1,5 mL)	83
<i>Resseliella theobaldi</i>	Porapak Q	200	7 j.	Élué avec CH ₂ Cl ₂ (3 x 0,5 mL)	96

⁹⁴ Liu, Y.-J.; Hall, D.; Cross, J.; Farman, D.; Amarawardana, L.; Liu, Q.-R.; He, X.-K. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 715–723.

⁹⁵ Molnár, B.; Kárpáti, Z.; Szöcs, G.; Hall, D. R. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 706–714.

⁹⁶ Hall, D. R.; Farman, D. I.; Cross, J. V.; Pope, T. W.; Ando, T.; Yamamoto, M. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 230–242.

2.1.4 Objectif

L'objectif de ce chapitre est de collecter la phéromone sexuelle de *Paradiplosis tumifex* émise par la femelle afin de pouvoir la caractériser subséquentement.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Extraction d'abdomens avec un solvant

Cette manipulation a été effectuée par Simon Boudreault, professionnel au laboratoire de P^f Cloutier, entre le 18 mai et le 14 juin 2011 à partir de galettes de litière qu'il a récoltées sur le terrain. Les insectes ont été anesthésiés avec du CO₂ puis 10 abdomens de *P. tumifex* ont été excisés et déposés dans une fiole conique contenant un petit volume d'hexanes (Grade HPLC Omnisolv^{MD}, EMD Chemicals, produit n° HX0296-1, lot n° 50307) pendant 30 min. Les hexanes ont été transférés dans une autre fiole conique qui a été scellée avec du Parafilm^{MD} et conservée au congélateur jusqu'à son utilisation.⁹⁷

2.2.2 Élevage des insectes pour la collecte d'effluves

Aphidoletes aphidimyza

Environ 1000 pupes d'*Aphidoletes aphidimyza* (Aphidoletes-System, 3000 pupes sur vermiculite, Biobest Sustainable Crop Management) ont été placées individuellement dans un microtube ayant le couvercle percé contenant un morceau de papier d'un diamètre d'environ 5 mm imbibé de 5 µL d'une solution d'eau de Javel 0,05 % v/v. Le restant, avec la vermiculite, a été séparé dans 4 contenants. Le tout a été mis à 22 °C en photopériode inverse à jours longs (le jour pendant 16 h de 17 h à 9 h et la nuit pendant 8 h entre 9 h et 17 h). Les insectes ont été rassemblés par sexe dès l'émergence. L'âge maximal des insectes au début de la collecte a été indiqué au tableau 2.4.

Paradiplosis tumifex

Des galettes de litière, d'environ 10 cm d'épaisseur, ont été récoltées dans les zones de plantations ayant été infestées l'année précédente (d'une plantation à St-Julien, QC) le 24 avril, le 26 avril et le 4 mai 2012. L'insecte passe l'hiver dans la litière sous les arbres alors on peut s'attendre à y récolter les pupes hivernées. Ces galettes ont été conservées à une

⁹⁷ Boudreault, S. Laboratoire de P^f Cloutier, département de biologie, Université Laval, Québec, QC. Communication personnelle, mai 2011.

température similaire à la température extérieure lors de la récolte (4 °C). Afin de vérifier l'émergence des mouches et les collecter, les galettes ont été réchauffées progressivement à 20 °C en photopériode normale à jours longs, avec des journées de 16 h et des nuits de 8 h, arrosées quotidiennement. Le réchauffement de galettes a été étalé dans le temps afin de pouvoir répéter l'expérience à quatre reprises avec des insectes différents. Les insectes ont été rassemblés par sexe dès l'émergence et l'âge maximal de ceux-ci a été indiqué au tableau 2.5.

2.2.3 Collecte d'effluves

Fabrication du montage expérimental

Filtres au charbon activé Chambres avec les insectes Pipettes de Porapak Q

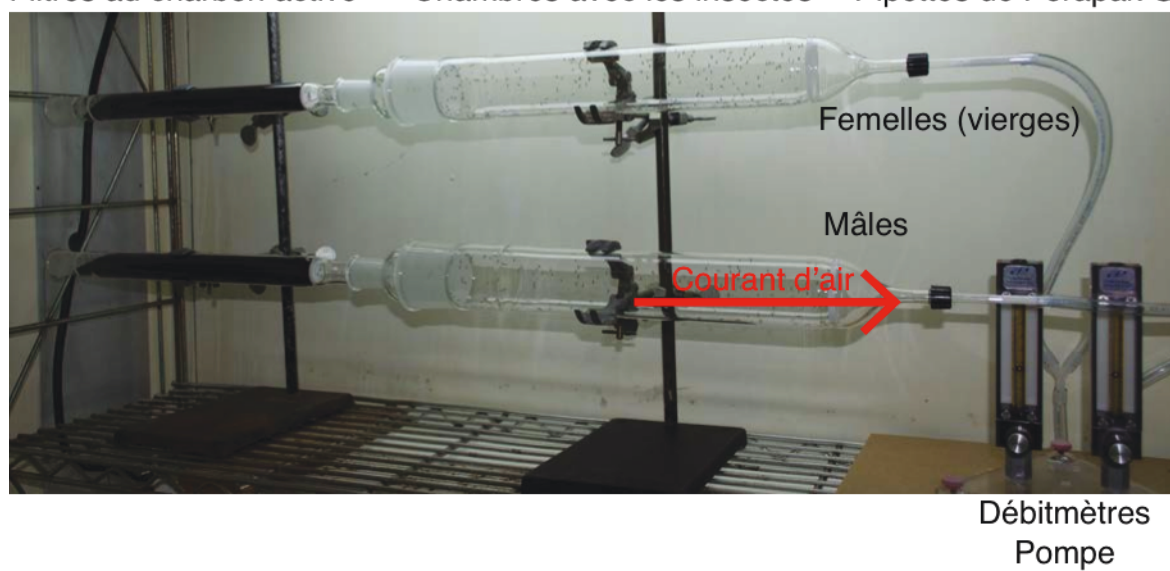


Figure 2.2 Montage expérimental en action

Les deux filtres à charbon activé ainsi que les deux contenants à insectes vivants ont été fabriqués par Christian Côté, technicien au département de chimie, à partir de pièces en verre borosilicate Pyrex^{MD} provenant de chez Chemglass Life Sciences (Vineland, NJ). Ces deux morceaux ont été assemblés avec un adaptateur comprenant un joint de taille 24/40 et un joint mâle de taille 55/50. La verrerie a été nettoyée la première fois avec du HCl concentré puis rincée à l'eau, à l'eau distillée, à l'acétone et aux hexanes avant d'être placée à l'étuve.

Filtre au charbon activé

Les pièces suivantes ont été assemblées : un joint femelle de taille 24/40, un cylindre ayant un diamètre extérieur de 32 mm et une épaisseur d'environ 2 mm coupé à une longueur d'environ 35 cm, un filtre en verre fritté d'un diamètre de 25 mm ayant des pores d'un diamètre de 40 à 60 μm (*coarse*) et un joint mâle de taille 24/40.

Chambre avec les insectes vivants

Les pièces suivantes ont été assemblées : un joint femelle de taille 55/50, un cylindre ayant un diamètre extérieur de 57 mm et une épaisseur d'environ 3 mm coupé à une longueur d'environ 35 cm, un filtre en verre fritté d'un diamètre de 50 mm ayant des pores d'un diamètre de 170 à 220 μm (*extra coarse*) et un cylindre de verre, ayant une extrémité filetée à l'extérieur, d'un diamètre extérieur de 11 mm acceptant des cylindres ayant un diamètre extérieur de 4 à 7 mm avec sceau d'étanchéité et un capuchon de compression.

Conditionnement du Porapak Q et préparation de la pipette

Le Porapak Q (50/80 mesh, Supelco Analytical, produit n° 20300-U, lot n° 173) a été nettoyé en le chauffant à 180 °C pendant 24 h sous un flux d'Ar, puis à 110 °C sous un flux d'Ar, lavé dans un appareil de Soxhlet avec des hexanes pendant 24 h sous une atmosphère d'Ar et séché en le chauffant à 100 °C pendant 4 h sous un flux d'Ar.⁹¹ Celui-ci a ensuite été placé entre deux morceaux de fibre de verre ayant été lavée avec de l'acétone et des hexanes puis séchée à l'étuve, dans une pipette Pasteur ayant un diamètre extérieur de 7 mm dont l'extrémité a été coupée comme indiqué à la figure 2.3. La pipette est branchée au débitmètre avec un tube de Tygon ayant un diamètre intérieur d'environ 6,35 mm. Les deux débitmètres sont connectés ensemble à la pompe avec un joint en Y.

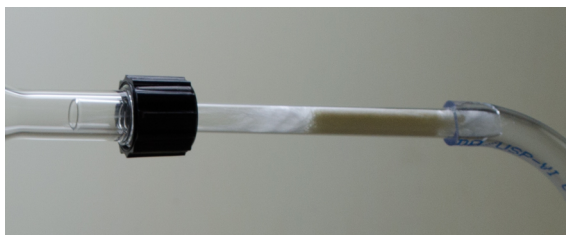


Figure 2.3 Pipette de Porapak Q connectée au système

Collecte d'effluves

La verrerie du montage a été lavée à l'eau savonneuse puis rincée avec de l'eau distillée, de l'acétone et des hexanes avant d'être placée à l'étuve. Le montage a été assemblé comme

indiqué à la figure 2.2. Le montage a été placé dans une chambre avec un humidificateur, en photopériode à jours longs (journées de 16 h et des nuits de 8 h, photopériode inverse pour *A. aphidimyza* et normale pour *P. tumifex*), à environ 20 °C. Les filtres ont été remplis avec du charbon activé (Sigma-Aldrich, produit n° 242241-1KG, DARCO^{MD}, 12–20 mesh). Les insectes ont été transférés par sexe dans le contenant approprié. Les pipettes vides ont été placées à l'extrémité du montage, la pompe a été démarrée et le débit a été ajusté à environ 3,2 L min⁻¹ (soit à « 55 » sur le débitmètre selon la fiche de calibration)⁹⁸ pendant 1 h à 2,5 h. La pompe a été arrêtée et les pipettes vides ont été remplacées par les pipettes contenant le Porapak Q^{MD}. La pompe a été démarrée et le débit a été ajusté à environ 1,2 L min⁻¹ (soit à « 25 » sur le débitmètre selon la fiche de calibration)⁹⁸ pendant la durée indiquée au tableau 2.4 dans le cas d'*A. aphidimyza* et au tableau 2.5 pour chacun des échantillons avec *P. tumifex*. La pompe a été arrêtée lorsqu'une majorité d'insectes étaient morts et les pipettes ont été scellées avec du ruban de polytétrafluoroéthylène (PTFE) et placées au congélateur jusqu'à l'extraction du contenu.

Extraction de Soxhlet

Le contenu de la pipette (fibre de verre et Porapak Q) a été vidé dans la cartouche en verre de taille micro de l'extracteur de Soxhlet dont les pores du filtre ont un diamètre de 40 à 60 µm. Environ 15 mL d'hexanes ont été versés dans le ballon de 25 mL et le montage a été mis sous atmosphère d'Ar. Le ballon avec les hexanes a été chauffé pendant 24 h. Les hexanes ont été vidés dans une fiole scellée avec du Parafilm et placée au congélateur jusqu'à son utilisation.

2.3 Résultats

⁹⁸ FM013-88ST Flowmeter Calibration Data

2.3.1 Cécidomyie du puceron — *Aphidoletes aphidimyza*

Tableau 2.4 Nombre et âge maximal au début de la collecte d'*A. aphidimyza* utilisés et durée de la collecte

Sexe	Nombre	Âge maximal h	Durée de la collecte h
♂	205	56,75	44,00
♀	302		

Observations

Il y a plus de femelles que de mâles qui ont émergé des pupes isolés dans des microtubes et des contenants avec le restant des pupes dans la vermiculite.

Les mâles sont beaucoup plus actifs que les femelles. Seize heures après le début de la collecte, une importante mortalité a été constatée (environ 70 % des mâles et 40 % des femelles).

2.3.2 Cécidomyie du sapin — *Paradiplosis tumifex*

Tableau 2.5 Nombre et âge maximal au début de la collecte des *P. tumifex* utilisés et durée de la collecte

Échantillon	Sexe	Quantité	Âge maximal h	Durée de la collecte h
1 ^a	♂	227 + 564	36,00 + 24,50	21,50 + 44,00
	♀	442 + 943		
2	♂	601	38,50	40,00
	♀	941		
3 ^b	♀	1500	14,00	36,75
	♀	910		
4	♂	560	18,50	36,50
	♀	1117		

^a Après le premier 21,50 h de collecte avec 227 mâles et 442 femelles, la plupart des mâles et environ 60 % des femelles étaient morts, alors le montage a été arrêté. Les insectes ayant émergé entre-temps ont été ajoutés, le montage a été mis en fonction avec des pipettes vides pendant 1 h puis elles ont été remplacées par celle contenant le Porapak Q durant 44 h supplémentaires.

^b En effet, cet échantillon ne contient que des femelles.

Observations

Les mâles avaient tendance à émerger surtout en matinée tandis que les femelles émergeaient plutôt dans l'après-midi et la soirée. Il y avait aussi plus de femelles que de mâles qui émergeaient.

Les mâles étaient beaucoup plus actifs que les femelles. En effet, ceux-ci volaient beaucoup dans la chambre tandis que les femelles restaient sur les parois. La mortalité était beaucoup plus rapide au niveau des mâles.

2.4 Discussion

2.4.1 Mâles vs femelles

Autant chez la cécidomyie du puceron *Aphidoletes aphidimyza* que chez la cécidomyie du sapin *Paradiplosis tumifex*, il a été remarqué qu'il y avait plus de femelles que de mâles. Cela concorde avec ce qui avait été décrit précédemment dans la littérature. Par exemple, dans le cas de la cécidomyie du puceron, van Lenteren et coll. avaient observé un ratio de 39 % de mâles et 61 % de femelles.⁷⁶ En fait, le rapport des sexes est souvent biaisé en faveur des femelles chez les cécidomyies.⁹⁹

Van Lenteren et coll. avaient aussi remarqué que l'émergence de la cécidomyie du puceron était protandre, soit que les mâles émergeaient avant les femelles.⁷⁶ Bien qu'il n'y ait pas eu ce genre d'observations pour la cécidomyie du puceron de fait, l'émergence de celle du sapin a aussi montré une tendance à la protandrie.

Quant à l'activité plus grande des mâles comparativement aux femelles. C'est très logique puisque le mâle doit voler pour aller à la rencontre de la femelle qui, elle, émet sa phéromone afin de s'accoupler. Cela combiné au fait qu'ils émergeaient plus tôt dans la journée, pourrait aussi expliquer pourquoi ils sont morts les premiers.

2.4.2 Collecte d'effluves

Il n'avait pas été jugé nécessaire de rincer les chambres contenant les insectes après utilisation puisque les substances volatiles de l'air ont été récupérées par le Porapak pendant une

⁹⁹ Dorchin, N. Gall Midges (Diptera : Cecidomyiidae). Dans *Encyclopedia of Entomology*; Capinera, J. L., Éd.; 2^e éd.; Springer, 2008; pp. 1576–1580.

période d'au moins 36 h. Par contre, il existe une possibilité que la phéromone se soit aussi adsorbée sur le verre. En effet, il a été montré, certes dans une expérience sans courant d'air, que le verre avait la possibilité d'adsorber des phéromones, mais que celles-ci pouvaient être facilement désorbées en rinçant avec un solvant.¹⁰⁰ Il y a même des systèmes qui ont été testés où la substance adsorbante est uniquement de la fibre de verre.¹⁰¹ L'expérience de Byrne et coll. avec des composés modèles dans un système similaire au nôtre, soit avec un courant d'air, a montré que lors de l'expérience avec 40 mg de composé, le verre de la chambre l'avait adsorbée, ce qui n'était pas le cas dans l'expérience avec 0,5 mg.⁹¹ Cependant, le montage était en fonction pendant 168 h à un débit de 2 L min⁻¹ alors il est possible que les composés aient pu se désorber du verre,⁹¹ ce qui est moins aisé dans notre situation où la durée était plus courte et le débit était moins important (une durée de 36,5 h à 44 h à un débit de 1,2 L min⁻¹).

De plus, il a été montré dans une expérience sans circulation d'air que la présence d'insectes vivants, ou de cadavres, réduisait substantiellement la récupération d'une molécule modèle en raison d'une possible adsorption de la molécule sur ceux-ci.¹⁰⁰

Finalement, il existe la possibilité que des composés très volatils puissent réussir à se désorber et traverser le Porapak ou que des composés très sensibles puissent être oxydés par l'oxygène de l'air.⁹¹

Les analyses de ces extraits ont été effectuées au chapitre suivant.

2.5 Conclusion

En conclusion, des ovipositeurs des femelles de la cécidomyie du sapin ont été extraits avec des hexanes et les effluves ont été collectés à partir des femelles et des mâles (séparés dans des contenants différents, en même temps) de la cécidomyie du sapin. Ceux issus de la cécidomyie du puceron (l'insecte modèle) ont été utiles pour l'apprentissage des techniques utilisées en entomologie ainsi que pour un exercice des étapes de la procédure pour collecter les effluves. Les analyses de ces extraits seront décrites au chapitre suivant.

¹⁰⁰ Baker, T. C.; Cardé, R. T.; Miller, J. R. *J. Chem. Ecol.* **1980**, *6*, 749–758.

¹⁰¹ Baker, T. C.; Gaston, L. K.; Pope, M. M.; Kuenen, L. P. S.; Vetter, R. S. *J. Chem. Ecol.* **1981**, *7*, 961–968.

3. Caractérisation des extraits

3.1 Introduction

3.1.1 Méthodes biologiques

Introduction

Deux obstacles avaient été identifiés par Butenandt afin de mener à bon port des travaux sur les phéromones : l'importante quantité de matériel de départ nécessaire (traitée au chapitre précédent) et la disponibilité d'une méthode de détection de la phéromone.⁵⁵ Idéalement, cette méthode devrait être développée dès le départ afin de pouvoir vérifier la présence de la phéromone à chaque étape du processus.

Puisqu'une phéromone est une substance qui sert à transmettre un message intraspécifique, il est rationnel d'en conclure que le détecteur le mieux adapté de celle-ci est le destinataire prévu dudit message. Autrement dit, lorsque la phéromone sexuelle est émise par la femelle, le mâle de la même espèce en est le récepteur attendu.

Tests comportementaux

D'un point de vue behavioriste, les phéromones se séparent en deux classes : les phéromones incitatrices (anglais : *releaser*) lorsque la perception de celle-ci déclenche une réponse comportementale immédiate et réversible contrôlée par le système nerveux tandis que les phéromones modificatrices (anglais : *primer*) déclenchent plutôt une réponse physiologique.¹⁰² La plupart des phéromones, comme les phéromones sexuelles, sont du premier groupe.¹⁰³

Ainsi, la connaissance du comportement associé à la perception de la phéromone sexuelle par le mâle peut permettre de développer une méthode d'essai biologique. Par exemple, le mâle du papillon du ver à soie (*Bombyx mori*) montre son excitation lorsqu'il est exposé à la phéromone avec un battement d'ailes caractéristique.¹⁰⁴ Cette observation a permis de développer une méthode biologique de dosage de la phéromone semi-quantitatif d'une solution en exposant un groupe de mâles à une tige de verre trempé dans celle-ci (par

¹⁰² Wilson, E. O.; Bossert, W. H. *Recent Prog. Horm. Res.* **1963**, *19*, 673–716.

¹⁰³ Regnier, F. E.; Law, J. H. *J. Lipid Res.* **1968**, *9*, 541–551.

¹⁰⁴ Schwinck, I. Z. *Vergl. Physiol.* **1955**, *37*, 439–458.

exemple, un extrait de la glande à phéromone de la femelle).⁵⁵ Dans le cas de *B. mori*, ce test permet de détecter jusqu'à une concentration de 1 ag mL^{-1} ($10^{-18} \text{ g mL}^{-1}$) de la phéromone synthétique.⁵⁹ D'ailleurs, il a été montré que le mâle a une réponse comportementale à un courant d'air contenant aussi peu que 200 molécules de phéromone par cm^3 .¹⁰⁵

Selon la même logique, il est possible d'utiliser le comportement de l'insecte par le piégeage en champ.¹⁰⁶ De plus, les tests comportementaux peuvent être jumelés à la chromatographie en phase gazeuse.¹⁰⁷

Électrophysiologie

Deux techniques complémentaires d'électrophysiologie consistent à utiliser les antennes, le principal organe récepteur responsable de l'olfaction,¹⁰⁸ comme détecteur vivant : l'électroantennographie (EAG) et l'enregistrement monosensillaire (*single sensillum recording, SSR*).¹⁰⁹ Ces techniques peuvent être jumelées à la chromatographie en phase gazeuse afin de profiter non seulement de la sensibilité et la spécificité du mâle aux composantes de la phéromone, mais également d'une puissante technique de séparation.^{110–113} À l'heure actuelle, elles sont extensivement utilisées dans la recherche sur les phéromones, plus particulièrement l'électroantennographie combinée à la chromatographie en phase gazeuse.

¹⁰⁵ Boeckh, J.; Kaissling, K. E.; Schneider, D. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1965**, *30*, 263–280.

¹⁰⁶ Baker, T. C.; Cardé, R. T. Techniques for Behavioral Bioassays. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 45–74.

¹⁰⁷ Hummel, H. E. The Tandem Gas Chromatography—Behavior Bioassay, Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 191–216.

¹⁰⁸ Keil, T. A. Morphology and Development of the Peripheral Olfactory Organs. Dans *Insect Olfaction*; Hansson, B. S., Éd.; Springer, 1999; pp. 5–47.

¹⁰⁹ Olsson, S. B.; Hansson, B. S. Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae. Dans *Pheromone Signaling, Methods and Protocols*; Touhara, K., Éd.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp. 157–177.

¹¹⁰ Moorhouse, J. E.; Yeadon, R.; Beevor, P. S.; Nesbitt, B. F. *Nature* **1969**, *223*, 1174–1175.

¹¹¹ Arn, H.; Städler, E.; Rauscher, S. *Z. Naturforsch.* **1975**, *30c*, 722–725.

¹¹² Struble, D. L.; Arn, H. Combined Gas Chromatography and Electroantennogram Recording of Insect Olfactory Responses. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 161–178.

¹¹³ Wadhams, L. J. The Coupled Gas Chromatography—Single Cell Recording Technique. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 179–190.

3.1.2 Chromatographie en phase gazeuse

Introduction

La chromatographie, terme forgé au début du XX^e siècle par le botaniste russe Mikhaïl Tswett,¹¹⁴ désigne un ensemble de méthodes permettant la séparation des constituants d'un mélange complexe. Ces méthodes ont en commun qu'une phase mobile transporte l'échantillon au travers d'une phase stationnaire immiscible immobilisée et que la séparation est effectuée par la différence d'affinité de chacun des composants du mélange avec les deux phases.¹¹⁵

Pour les travaux sur les phéromones, des substances généralement volatiles, une de ces techniques est particulièrement adaptée : la chromatographie gaz-liquide. Communément appelée chromatographie en phase gazeuse ou *GC* (de l'anglais *Gas Chromatography*), elle est la méthode chromatographique où la phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur une colonne solide.¹¹⁵

Cette technique a été proposée par Martin et Synge en 1941,¹¹⁶ d'ailleurs lauréats du prix Nobel de chimie de 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage,¹¹⁷ mais les premiers travaux n'ont été publiés qu'en 1952 par James et Martin en améliorant, entre autres, la théorie de la chromatographie de partage afin de tenir compte d'une phase mobile compressible.^{118,119}

La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation et l'analyse de mélanges complexes dont les constituants sont thermostables et ayant un point d'ébullition relativement faible.¹²⁰

¹¹⁴ Tswett, M. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **1906**, *24*, 316–323.

¹¹⁵ Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*; 6^e éd.; Thomson Brooks/Cole: Belmont, CA, 2007.

¹¹⁶ Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M. *Biochem. J.* **1941**, *35*, 1358–1368.

¹¹⁷ The Nobel Prize in Chemistry 1952, 2013. Nobel Media AB.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/ (consulté le 5 septembre 2013).

¹¹⁸ James, A. T.; Martin, A. J. P. *Biochem. J.* **1952**, *50*, 679–690.

¹¹⁹ James, A. T.; Martin, A. J. P. *Analyst* **1952**, *77*, 915–932.

¹²⁰ Ménard, H. *CAN 508 : Techniques de séparation*, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, 2008.

Appareillage

Le chromatographe est constitué des composants suivants qui seront décrits subséquemment : alimentation en gaz vecteur, injecteur, colonne dans une enceinte thermostatique et un détecteur branché à un enregistreur.

Alimentation en gaz vecteur

Le gaz vecteur, ou gaz porteur, est la phase mobile de la chromatographie en phase gazeuse. L'hélium est généralement utilisé puisque le gaz doit être chimiquement inerte, mais l'argon, l'azote ou l'hydrogène peuvent aussi l'être, selon le détecteur.¹¹⁵ Il doit finalement être très pur et sans traces d'oxygène ou d'eau.¹²⁰

Système d'injection

L'injecteur a pour fonction de vaporiser l'échantillon puis de l'entraîner en tête de colonne en étant mélangé au gaz vecteur.¹²⁰ Ainsi, l'échantillon est introduit sous forme d'un « bouchon » de vapeur à l'aide d'une microseringue.¹¹⁵

L'injection peut être faite de façon manuelle ou automatique. L'injecteur automatique réduit les impacts de l'opérateur sur la qualité de l'analyse.¹²⁰ Celui-ci prélève d'abord l'échantillon puis l'introduit rapidement dans l'injecteur et, enfin, nettoie la seringue.¹²⁰

Dans le cas des colonnes capillaires, la taille de l'échantillon doit être très petite (de l'ordre de 10^{-3} μL).¹¹⁵ Les modes d'injection possibles sont les suivants : avec division (*split*), sans division (*splitless*) ou dans la colonne (*on-column*). Premièrement, le rôle du diviseur est de diriger une fraction prédéterminée (entre 1:50 et 1:500) de l'échantillon vers la colonne et de rejeter le reste.¹¹⁵ Deuxièmement, l'injection sans division force l'échantillon à aller dans la colonne pendant le premier 30 à 60 secondes puis la valve de purge, fermée à l'injection, s'ouvre, et ce qui peut rester est rapidement évacué.¹¹⁵ Ainsi, la sensibilité est augmentée.¹¹⁵ Finalement, le dernier mode consiste à injecter à froid l'échantillon dans la colonne où il est vaporisé lorsque la température augmente. Cela est utile pour des composés fragiles, mais des composés ayant des volatilités différentes ne sont pas discriminés.^{115,120}

Colonne chromatographique

Deux types de colonnes existent : remplies (*packed*) et tubulaires ouvertes (*open tubular*) aussi connues comme les colonnes capillaires. De nos jours, les colonnes capillaires, dont la théorie a été introduite par Marcel Golay en 1958,¹²¹ sont généralement utilisées, car elles sont plus performantes.¹¹⁵ Il y a deux grandes classes de colonnes capillaires : les *WCOT* (*wall-coated open tubular*) et les *SCOT* (*support-coated open tubular*).¹¹⁵ Les plus fréquentes sont une sous-catégorie des *WCOT* : les *FSWC* (*fused-silica wall-coated open tubular column*).¹¹⁵ Ces dernières sont fabriquées en utilisant de la silice fondue spécialement purifiée contenant une quantité minimale d'oxydes métalliques et elles sont recouvertes d'une gaine de polyimide pendant l'étirage du capillaire.¹¹⁵

Une colonne est constituée de deux parties : le support solide (en silice pour les *FSWC*) et la phase stationnaire. Les propriétés recherchées d'une phase stationnaire liquide sont : faible tension de vapeur, stabilité thermique, inertie chimique et des propriétés de solvants permettant de bien séparer les composés du mélange.¹¹⁵

Les facteurs dont on doit tenir compte dans le choix d'une colonne chromatographique sont : la phase stationnaire, le diamètre de la colonne, la longueur et l'épaisseur du film de phase stationnaire.

La phase stationnaire, le facteur le plus important, est choisie en fonction de la sélectivité, la polarité et la proportion en phényles.¹²² En cas de doute, il est préférable de débiter avec une colonne non polaire (Agilent Technologies recommande une colonne DB-1 ou DB-5).¹²²

¹²¹ Marcel J.E. Golay. Dans *75 years of Chromatography a Historical Dialogue*; Ettre, L. S.; Zlatkis, A., Éd.s.; Journal of Chromatography Library; Elsevier, 1979; Vol. 17, pp. 109–114.

¹²² *Agilent J&W GC Column Selection Guide*; Agilent Technologies, 2010.

Four

La colonne chromatographique est située dans un four où la température doit être contrôlée avec précision, exactitude et de façon reproductible puisque la température affecte significativement le temps de rétention.¹²³

La méthode chromatographique est soit isotherme, soit avec une variation de température (*programmed-temperature gas chromatography*). Cette dernière permet de réduire la durée de l'analyse, d'augmenter la détectabilité globale, d'éluer les composants du mélange avec un haut point d'ébullition et donc, aussi, d'empêcher la rémanence de ces composés.¹²³

Détecteur

Le détecteur idéal, un concept théorique, posséderait les caractéristiques suivantes : une sensibilité appropriée; une bonne stabilité et reproductibilité; une réponse linéaire sur plusieurs ordres de magnitude; une température de fonctionnement entre la température ambiante et au moins 400 °C; un temps de réponse rapide et indépendant de la vitesse d'écoulement; une grande fiabilité et facilité d'utilisation; une réponse uniforme à tous les solutés ou une réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés; et, enfin, être non destructif (afin de préserver de l'intégrité de l'échantillon).¹¹⁵

Le tableau 3.1 compare différents détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Parmi ceux-ci, trois attirent particulièrement l'attention, soit : le *EAD*, le *FID* et le *MS*.

D'abord, le détecteur électroantennographique (*Electroantennographic detector, EAD*) est basé sur une technique d'électrophysiologie utilisant les antennes de l'insecte afin de profiter de sa capacité olfactive pour détecter les composés auxquels celui-ci réagit. Comme décrit précédemment, le mâle détecte avec une grande sensibilité et sélectivité la phéromone sexuelle émise par la femelle de la même espèce.¹²⁴ Ainsi, selon l'insecte, le *EAD* peut avoir une limite de détection dans l'ordre du femtogramme, soit plus sensible que le *FID* de plusieurs ordres de grandeur en plus d'être très sélectif.⁶⁴

¹²³ Barry, E. F. Columns: Packed and Capillary; Column Selection in Gas Chromatography. Dans *Modern Practice of Gas Chromatography*; Grob, R. L.; Barry, E. F., Éd.; 4^e éd.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2004.

¹²⁴ Roelofs, W. L. Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromones. Dans *Techniques in Pheromone Research*; Hummel, H. E.; Miller, T. A., Éd.; Springer-Verlag: New York, 1984; pp. 131–160.

Ensuite, le détecteur à ionisation de flamme (*Flame ionization detector, FID*) pyrolyse les composés organiques en produisant des ions et la quantité d'ions produite est approximativement proportionnelle au nombre de carbones méthyléniques, ce qui en fait un détecteur sensible à la masse plutôt qu'à la concentration. Bien qu'il soit destructif, sa grande sensibilité en fait un détecteur fréquemment utilisé. Par contre, certains groupements fonctionnels produisent peu d'ions (par exemple : les carbonyles, les alcools, les halogènes et les amines).¹¹⁵

Finalement, la spectrométrie de masse (*Mass spectrometry, MS*) est intéressante parce qu'en plus de fournir un temps de rétention comme les autres détecteurs, elle fournit aussi un spectre de masse. Ce spectre permet d'obtenir des informations sur la structure de la molécule en observant sa fragmentation. Il est un détecteur destructif et il est généralement moins sensible que le *FID*.¹¹⁵

Tableau 3.1 Comparaison des caractéristiques de quelques détecteurs utilisés en chromatographie en phase gazeuse¹²⁵

Détecteur ^a	Réponse	Détecte	Limite de détection ^b	Domaine dynamique	Sélectivité	∞ concentration ou masse	Destructif
<i>TCD</i>	Universelle	Tout avec conductivité thermique différente du gaz vecteur	400 pg/mL	10 ⁵	—	Concentration	Non
<i>FID</i>	Universelle	Carbone	2 pg C/s	10 ⁷	—	Masse	Oui
<i>ECD</i>	Sélective	Groupes électroattracteurs	50 fg/mL (selon structure)	10 ⁴	Jusqu'à 10 ⁶	Concentration	Non
<i>MS</i>	Universelle et spécifique	S'accorde à l'espèce souhaitée	10 pg à ng (selon mode)	10 ⁵	∞ selon groupe fonctionnel	Masse	Oui
<i>EAD</i> ⁶⁴	Spécifique	Composés stimulant l'insecte	~ fg (selon espèce)			Concentration	Non

^a Abréviation du nom anglophone : *TCD* : *Thermal conductivity detector* (détecteur à conductivité thermique); *FID* : *Flame ionization detector* (détecteur à ionisation de flamme); *ECD* : *Electron capture detector* (détecteur à capture d'électrons); *MS* : *Mass spectrometer* (spectromètre de masse); *EAD* : *Electroantennographic detector* (détecteur électroantennographique).

^b En supposant une injection sans division de 1 µL, un débit de 1 mL min⁻¹ et un pic d'une largeur de 5 s.

¹²⁵ Klee, M. S. Detectors. Dans *Gas chromatography*; Poole, C., Éd.; Elsevier: Amsterdam, 2012; pp. 307–347.

3.1.3 Utilisation de la chromatographie

Dans le cas des travaux sur les phéromones, la chromatographie peut être utilisée de plusieurs manières afin d'obtenir des informations sur la structure du composé recherché.

Comparaison des femelles avec les mâles

Des extrémités d'abdomens du carpocapse des pommes, *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera : Tortricidae), ont été extraits dans l'Et₂O tant pour les femelles que pour les mâles.¹²⁶ Ces extraits ont subi le même traitement puis ils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme.¹²⁶ La phéromone étant exclusivement émise par la femelle, il a été remarqué que le chromatogramme de l'extrait de chacun des sexes (figure 3.1) montre une série de pics communs, mais que celui des femelles contient un pic supplémentaire (concordant avec celui de la phéromone synthétique).¹²⁶ Ainsi, en utilisant l'extrait provenant des mâles en tant que référence et il a été possible pour Buser et Arn de déterminer aisément lequel des pics correspond effectivement à celui de la phéromone.¹²⁶

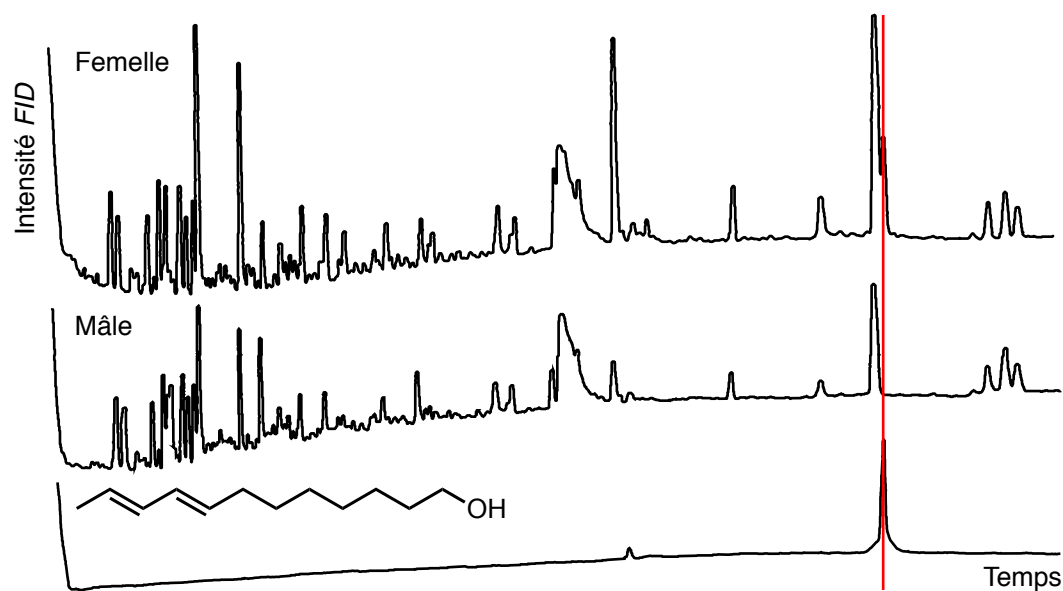


Figure 3.1 Comparaison du chromatogramme *FID* de la femelle, du mâle (fraction 100 % Et₂O, équivalent de 5 insectes injectés) et de la phéromone synthétique¹²⁶

¹²⁶ Buser, H.-R.; Arn, H. *J. Chromatogr.* **1975**, *106*, 83–95.

Indices de rétention

La chromatographie est une technique efficace pour séparer les constituants d'un mélange. La première dimension du chromatogramme indique le temps de rétention pour chacune des composantes ce qui permet de confirmer la présence de composés connus. Or, ce temps de rétention n'est pas une caractéristique reproductible d'un composé entre deux systèmes chromatographiques. Ainsi, il est nécessaire d'exprimer ce temps de rétention sous une forme standardisée indépendante des conditions d'opération afin de permettre cette comparaison, notamment avec les résultats déjà publiés.

Cette forme standardisée, appelée « indice de rétention », est calculée en utilisant les équations développées en 1958 par Kováts¹²⁷ pour les méthodes isothermes puis elles ont été retravaillées en 1963 par van den Dool et Kratz¹²⁸ pour les méthodes utilisant une programmation de température.

L'échelle de ces indices est généralement basée sur les alcanes non ramifiés et, par définition, l'indice de rétention de ceux-ci est défini comme le nombre de carbones de la chaîne fois 100 ($I = 100 z$).¹²⁷

L'indice de rétention d'un composé, dans une méthode avec programmation de la température, est déterminé par l'interpolation linéaire à partir du temps de rétention de l'alcane éluant directement avant le composé et celui directement après, soit par l'équation suivante :

$$I = 100 \left(z + \frac{t_{R_i} - t_{R_z}}{t_{R_{(z+1)}} - t_{R_z}} \right)$$

Où I : indice de rétention; z : nombre de carbones du n -alcane éluant directement avant le composé; t_R : temps de rétention; i : l'inconnu.

De plus, l'indice de rétention d'une molécule inconnue ainsi que la différence entre les indices de rétention obtenus par une analyse sur des colonnes différentes, par exemple une

¹²⁷ Kováts, E. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1915–1932.

¹²⁸ van den Dool, H.; Kratz, P. D. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463–471.

colonne chromatographique ayant une phase stationnaire non polaire et une autre polaire, peuvent permettre d'estimer la nature chimique de cet inconnu comme la longueur de la chaîne et les groupements fonctionnels présents.^{64,129–131}

Séparation d'énantiomères

La chromatographie peut aussi être utilisée afin de séparer des énantiomères. En effet, ils peuvent être dérivés en faisant réagir avec un agent de résolution énantiomériquement pur (afin de former des diastéréomères) pour ensuite être séparés par une colonne achirale ou en utilisant simplement une colonne ayant une phase stationnaire chirale.¹¹⁵

3.1.4 Objectifs

L'objectif de ce chapitre est d'utiliser les extraits contenant la phéromone qui ont été obtenus comme indiqué au chapitre précédent et de les analyser afin de caractériser la ou les composantes de la phéromone sexuelle dans le but de déterminer la structure de ces molécules.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Préparation des échantillons

Extraction avec un solvant ou collecte d'effluves

Les extraits ont été concentrés sous un faible flux d'argon.

Alcanes

Alcane (Source) : méthane (Praxair); pentane (Sigma-Aldrich, produit n° 154954, lot n° 09858MD); hexane (Sigma-Aldrich, produit n° 296090, lot n° 03343BD); heptane (Fisher Scientific, produit n° H-340, lot n° 704547); octane (Aldrich Chemical, produit n° 41223, lot n° 04921JF); décane (Aldrich Chemical, produit n° D90, lot n° 04901TF); hexadécane (Sigma-Aldrich, produit n° 296317, lot n° 18886LD).

Trois gouttes de chacun des alcanes ci-dessus (sauf le méthane) et 1 mL d'Et₂O ont été mis dans un flacon.

¹²⁹ Wehrli, A.; Kováts, E. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2709–2736.

¹³⁰ Marques, F. de A.; McElfresh, J. S.; Millar, J. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 592–599.

¹³¹ Rohrschneider, L. *J. Chromatogr.* **1966**, *22*, 6–22.

Le méthane a été prélevé de la bonbonne avec une microseringue de 10 μL et injecté directement.

3.2.2 Chromatographie en phase gazeuse

Les chromatogrammes en phase gazeuse ont été enregistrés avec un chromatographe Thermo Scientific Trace GC Ultra équipé d'une colonne non polaire DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) de Agilent Technologies. L'injecteur a été chauffé à 250 $^{\circ}\text{C}$ puis 1 μL a été injecté manuellement ou par l'injecteur automatique, sans division (*splitless*) en attendant une minute avant l'ouverture de la vanne de fuite ou avec division (*split*) avec un ratio de 50:1. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 mL min^{-1} . La température du four a été programmée afin qu'elle soit de 50 $^{\circ}\text{C}$ pendant 2 min suivi d'une augmentation au rythme de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ pendant 20 min (soit jusqu'à 250 $^{\circ}\text{C}$) puis stable à 250 $^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min, pour une durée totale de 37 min. La détection a été faite par spectrométrie de masse ou par ionisation de flamme.

Détection par spectrométrie de masse

La détection par spectrométrie de masse a été effectuée par le spectromètre de masse avec trappe ionique ITQ 900 de Thermo Scientific en ionisation électronique (EI) ou en ionisation chimique (CI). La température de la source d'ions a été fixée à 200 $^{\circ}\text{C}$ en ionisation positive. L'intervalle de masse de 40 à 550 m/z a été observé après 3 ou 4 minutes.

En ionisation électronique, les électrons ont été accélérés à 70 eV.

En mode ionisation chimique, le méthane a été utilisé comme gaz réactif à un débit de 1,1 mL min^{-1} .

Détection par ionisation de flamme

La détection par ionisation de flamme a été effectuée avec le détecteur à une température de 250 $^{\circ}\text{C}$ en utilisant l'air à un débit de 350 mL min^{-1} , l'hélium à 35 mL min^{-1} et le N_2 à 30 mL min^{-1} .

3.3 Résultats

3.3.1 Alcanes

Les alcanes ont été analysés par GC-MS puis ceux dont le temps de rétention se trouvait à l'intérieur de l'intervalle de la rampe de température (2,00 à 22,00 min) ont été conservés pour établir l'échelle des indices de rétention (heptane à hexadécane).

Tableau 3.2 Indice de rétention en fonction du temps de rétention de *n*-alcanes

Composé	Indice de rétention	Temps de rétention min
Méthane	100	1,46
Pentane	500	1,64
Hexane	600	1,97
Heptane	700	2,68
Octane	800	3,94
Décane	1000	7,30
Hexadécane	1600	15,80

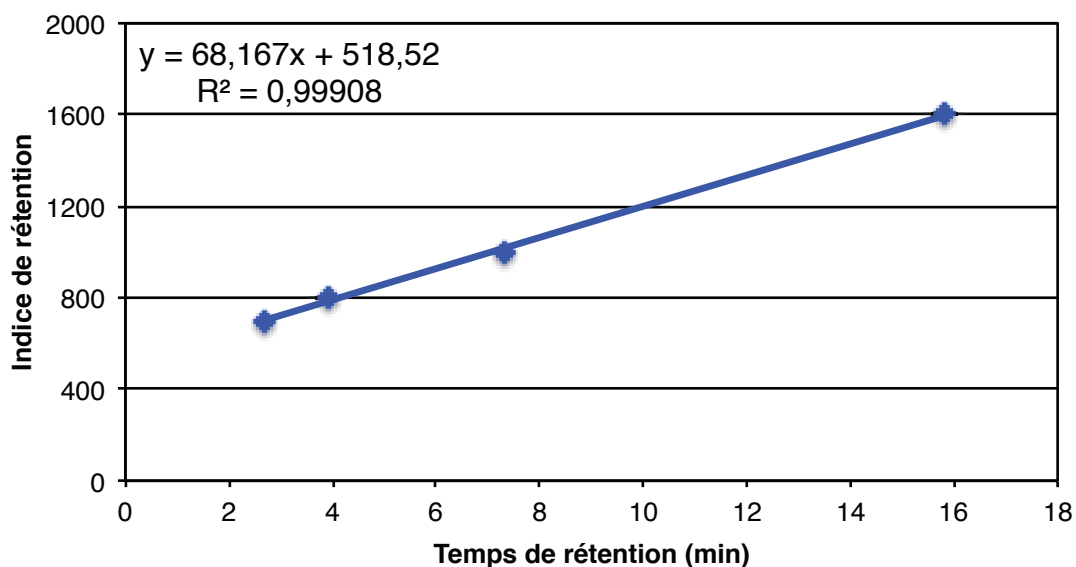


Figure 3.2 Indice de rétention en fonction du temps de rétention de *n*-alcanes (heptane à hexadécane)

3.3.2 Collecte d'effluves

Les extraits des mâles et des femelles de la cécidomyie du sapin obtenus par la méthode de la collecte d'effluves décrite au chapitre précédent ont été analysés par GC-MS. Par la suite, le chromatogramme des mâles et des femelles provenant de la même collecte ont été comparés à la recherche d'un signal supplémentaire chez la femelle. Afin de mieux illustrer cette comparaison, un agrandissement de la zone d'intérêt a été fait. Les résultats obtenus ont été résumés au tableau 3.3.

Tableau 3.3 Indice de rétention en fonction du temps de rétention des pics apparaissant chez la femelle de la cécidomyie

Échantillon ^a	Détecteur	Temps de rétention min	Indice de rétention
1	<i>FID</i>	10,79	1254
2	<i>MS-EI</i>	— ^b	—
3 ^c	<i>MS-EI</i>	—	—
4	<i>FID</i>	10,76 ^b	1252

^a Échantillons correspondants à ceux du tableau 2.5.

^b Un signal supplémentaire a été observé chez la femelle de l'échantillon 4, sans être reproductible avec l'échantillon 1, mais un signal au même temps de rétention était aussi présent chez le mâle et la femelle de l'échantillon 2.

^c Cet échantillon contenait deux extraits de femelles (tableau 2.5), celui contenant 910 femelles a été analysé.

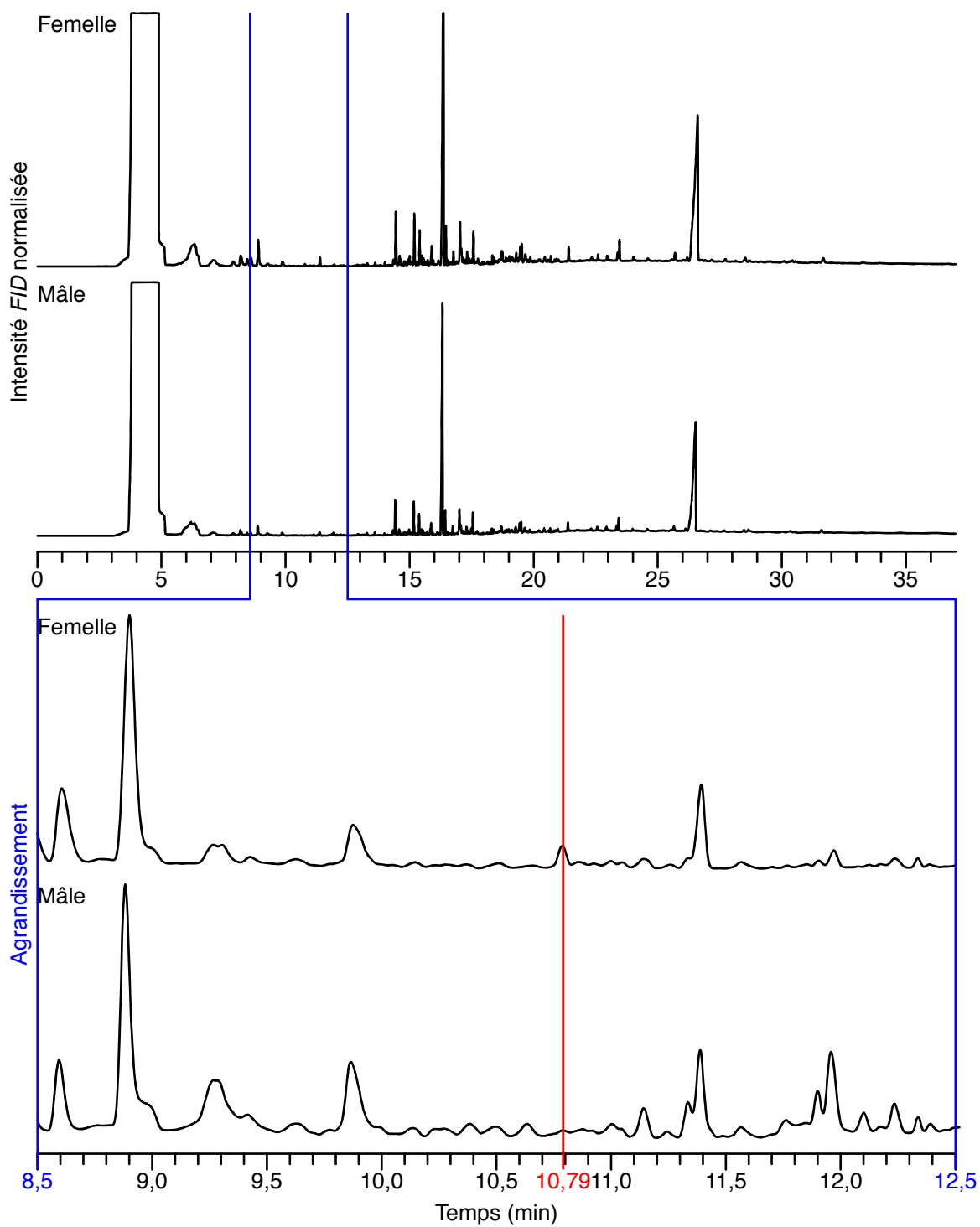


Figure 3.3 Comparaison du chromatogramme *FID* des femelles et des mâles de la cécido-
myie dans l'échantillon 1, avec agrandissement sur la zone 8,5 à 12,5 min

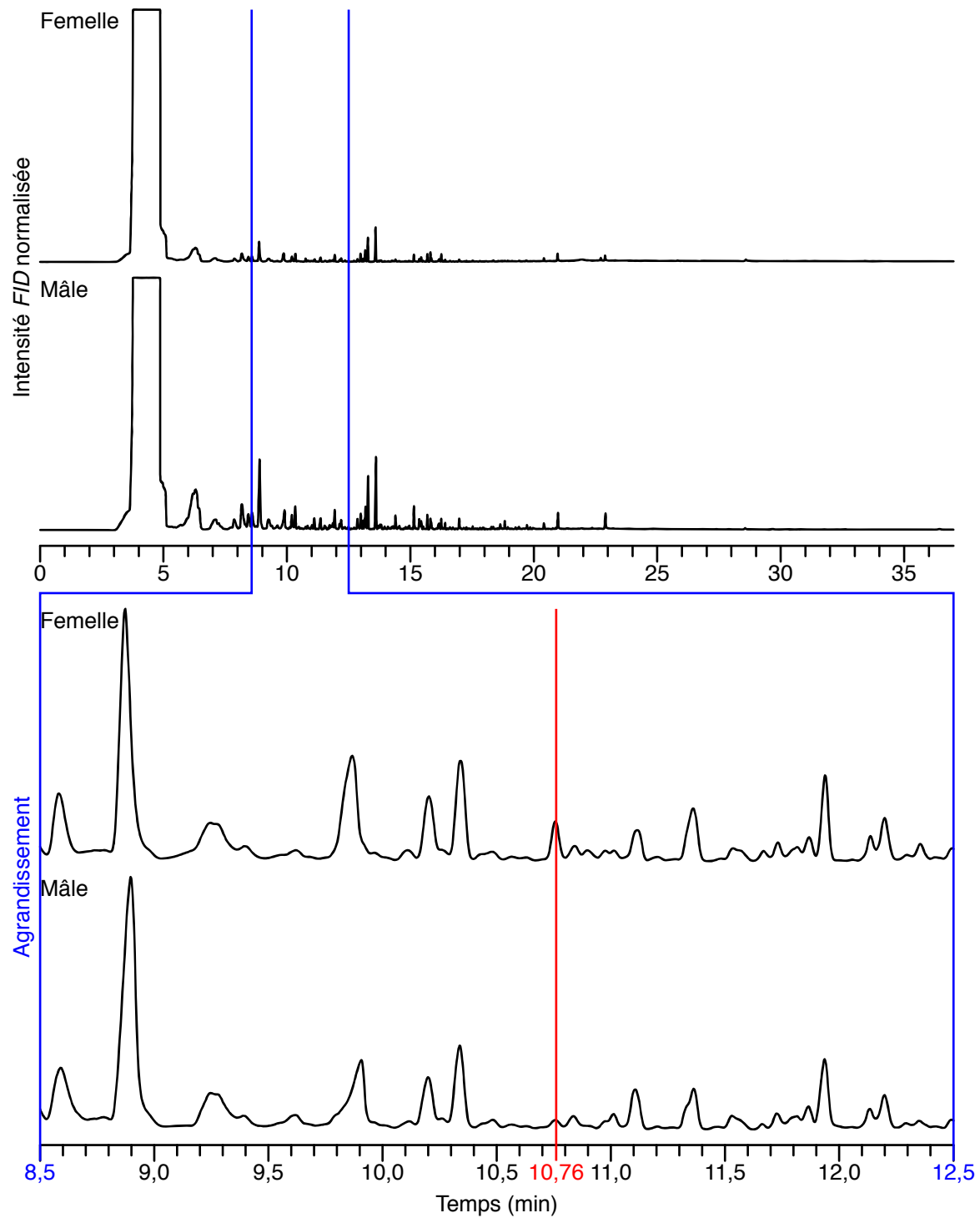


Figure 3.4 Comparaison du chromatogramme *FID* des femelles et des mâles de la cécidomyie dans l'échantillon 4, avec agrandissement sur la zone 8,5 à 12,5 min

3.4 Discussion

3.4.1 Analyse des extraits

Au cours de la saison 2011, l'abdomen de femelles a été extrait dans les hexanes puis analysé par GC-MS. Les résultats obtenus montraient une multitude de signaux sans qu'il soit possible d'associer un de ceux-ci à la phéromone. En effet, la technique d'extraction à l'aide d'un solvant a l'inconvénient d'extraire des contaminants comme des gras qui seront détectés par le spectromètre de masse qui n'est pas un détecteur spécifique.

Ainsi, pour la saison 2012, la méthode de récupération de la phéromone a été remplacée par la collecte d'effluves et les mâles ont été utilisés comme groupe témoin. La comparaison des effluves des femelles et des mâles devrait montrer les mêmes composantes, mais la phéromone en plus chez les femelles.

Quant aux analyses, un ajustement a été apporté. En effet, au lieu d'utiliser le détecteur par spectrométrie de masse (*MS*), celui par ionisation de flamme (*FID*) a été privilégié. Bien que le *MS* est fort utile, car il permet d'obtenir un spectre de masse fournissant de l'information sur la structure des composés, le *FID* est significativement plus sensible. En résumé, l'objectif était de prendre moins de risques afin d'obtenir un minimum d'information sur la phéromone, tel que le temps de rétention de ses composantes, afin de pouvoir progresser plutôt que risquer de ne rien obtenir du tout.

Les extraits correspondant aux échantillons 1 et 4 (figure 3.3 et figure 3.4 respectivement) ont été analysés par avec le *FID*. Chez ceux-ci, un pic était présent chez la femelle (ayant respectivement un temps de rétention de 10,79 et de 10,76 min). Par contre, cette différence n'était pas aussi évidente que chez la carpocapse des pommes, car les pics étaient minuscules. Néanmoins, considérant cette coïncidence, que le pic soit apparu dans l'analyse et la comparaison de deux groupes d'insectes différents, l'hypothèse a été faite qu'il correspondait à la phéromone, sa composante majoritaire du moins.

De plus, l'allure des chromatogrammes des effluves provenant de chacun des sexes est similaire dans un échantillon, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour des échantillons différents. Ainsi, il est supposé que le filtre contenant du charbon activé n'a pas été suffi-

samment efficace ou que la durée de la période où la pompe était en fonction avec des pipettes sans Porapak n'a pas été suffisamment longue.

Par la suite, des analyses par spectrométrie de masse (impact électronique) ont été faites sur les échantillons 2 et 3 (tableau 3.3), mais le chromatogramme des femelles ne montrait pas de différences significatives par rapport à celui des mâles.

À défaut de mieux, l'hypothèse que le pic supplémentaire observé dans les échantillons 1 et 4 (figure 3.3 et figure 3.4) correspondait probablement à la composante majoritaire de la phéromone sexuelle de la cécidomyie du sapin a été faite. Par contre, au moins deux grandes questions subsistent. D'abord, est-ce que la phéromone était effectivement présente dans l'extrait lorsqu'il a été injecté dans le chromatographe? Ensuite, est-ce que le détecteur du chromatographe est suffisamment sensible pour la détecter?

La première interrogation aurait pu être répondue de deux façons différentes. D'une part, un standard interne présentant des caractéristiques similaires à une phéromone sexuelle (notamment au niveau de la volatilité) aurait pu être utilisé au cours du processus, soit en le mettant directement dans le flacon avant les extractions, ou dans le montage lors de collecte des effluves. Ainsi, il aurait permis de suivre chaque échantillon et de confirmer qu'il n'y a pas eu de pertes au cours des multiples étapes comme la concentration de l'extrait, ou l'extraction de la cartouche de Porapak Q au Soxhlet par exemple. D'autre part, il aurait été intéressant d'avoir un test biologique afin de confirmer que les échantillons contenaient bel et bien la phéromone. En fait, bien que Butenandt ne disposât pas de GC, chaque fraction était testée afin de suivre la phéromone de *Bombyx mori*.

Concernant le second point, le détecteur par excellence est celui basé sur l'électrophysiologie de l'insecte comme l'électroantennographie. En effet, celui-ci peut être extraordinairement plus sensible que le *FID*, le détecteur le plus sensible à notre disposition, en plus d'être spécifique. D'ailleurs, il a été possible d'identifier les phéromones chez des lépidoptères ou des cécidomyies qui étaient indétectables avec les détecteurs classiques de GC.⁶⁴ À défaut d'avoir accès à un détecteur électroantennographique, une autre méthode existe afin d'abaisser la limite de détection d'un composé. En effet, le détecteur à capture d'électrons (*ECD*, *Electron Capture Detector*) est particulièrement sensible aux groupe-

ments électroattracteurs, dont les halogènes. Ces atomes d'halogènes peuvent être introduits avec un réactif de dérivatisation.^{132,133}

3.4.2 Indices de rétention

La théorie stipule que l'alcane éluant immédiatement avant et celui éluant immédiatement après le composé inconnu devraient être utilisés pour l'interpolation linéaire afin de déterminer son indice de rétention,¹²⁸ Ainsi, une droite de régression a été tracée ($R^2 = 0,999$) avec les alcanes disponibles dont le temps de rétention était situé au cours de l'augmentation de température ($t_R = 2,00$ à $22,00$ min), soit l'heptane, l'octane, le décane et l'hexadécane (figure 3.2).

De plus, un biais de quelques unités d'indice de rétention n'aurait pas eu un impact significatif. L'inconnu sera comparé avec des analogues au chapitre suivant.

3.4.3 Disponibilité du matériel vivant

En plus de la faible quantité de phéromone émise, un énorme défi de ce projet est la disponibilité du matériel vivant qui est très limitée.

En effet, avec une bonne préparation au printemps, il est possible d'étirer la disponibilité d'insectes vivants sur une période d'environ un mois. Par contre, l'adulte ayant une durée de vie très limitée, il doit rapidement être utilisé.

De plus, il y a une dépendance à la nature qui est imprévisible. Par exemple, la population de la cécidomyie a diminué drastiquement dans nos sites d'échantillonnage pour la saison 2013. Ainsi, malheureusement, il n'a pas été possible d'utiliser l'expérience acquise afin de répéter les expériences, ce qui aurait été utile pour comparer les indices de rétention entre différentes colonnes, pour confirmer les résultats de l'année précédente, etc.

3.5 Conclusion

En conclusion, bien que des incertitudes subsistent, l'hypothèse reste que le pic ayant un temps de rétention de 10,76–10,79 min, soit ayant un indice de rétention de 1252–1254

¹³² Kuwahara, Y.; Casida, J. E. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 681–684.

¹³³ Wassgren, A.-B.; Bergström, G. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 987–994.

avec une colonne DB5, présent chez la femelle lors des analyses par *FID*, correspond à la phéromone, du moins à sa composante majoritaire.

Au chapitre suivant, des analogues ont été synthétisés afin d'obtenir de l'information sur la phéromone par comparaison.

4. Identification

4.1 Introduction

4.1.1 Structure de la phéromone

La structure chimique des molécules composant la phéromone sexuelle a été identifiée chez au moins 17 autres espèces de cécidomyies (tableau 4.1). En se basant sur les similarités entre ces molécules, il est possible d'établir la structure d'une molécule hypothétique exprimant la diversité de ces phéromones sur la base des caractéristiques communes entre celles-ci.

Ainsi, une composante d'une phéromone de cécidomyie aurait les caractéristiques suivantes (modèle illustré à la figure 4.1) : une chaîne de carbone contenant un nombre de carbones impair variant entre 7 et 17; un groupement oxygéné sur le second carbone (souvent un groupement acétoxy, mais il est aussi possible que ce soit un ester butylique, une cétone voire un alcool); la possibilité d'un second groupement sur la chaîne à une position non terminale; et la possibilité que la chaîne contienne une ou deux insaturations (souvent *cis*, mais il y a quelques exemples d'une insaturation *trans*). Compte tenu de ces caractéristiques, la molécule hypothétique contiendrait alors aussi un ou deux stéréocentres.^{9,10} Finalement, la phéromone peut être constituée soit d'une seule, soit de plusieurs composantes souvent assez semblables.^{9,10}

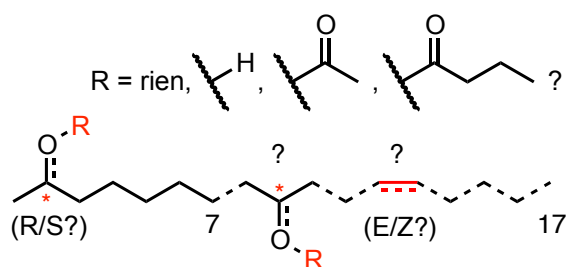
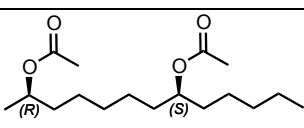
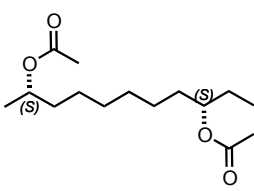
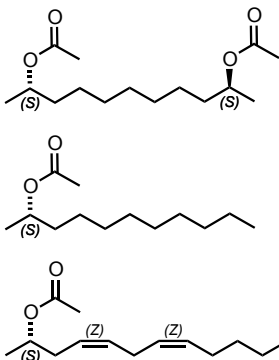
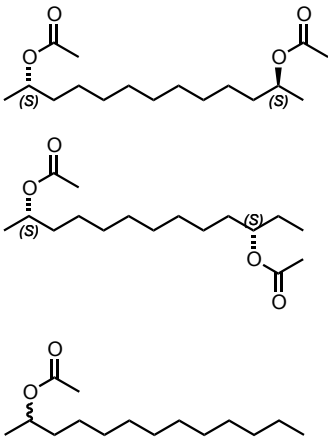
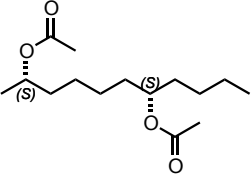
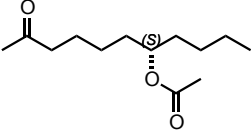
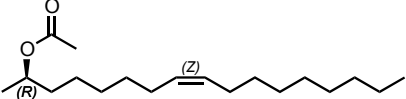
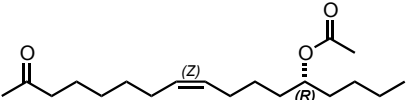
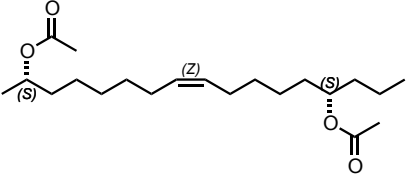
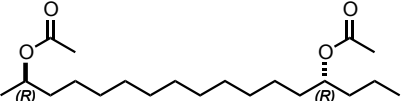
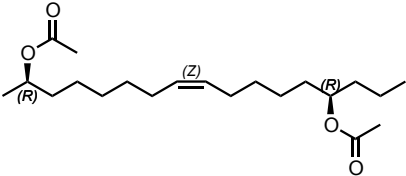
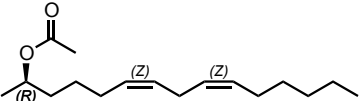
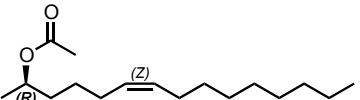


Figure 4.1 Structure générale basée sur les phéromones connues de cécidomyies

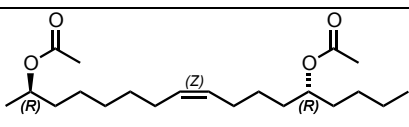
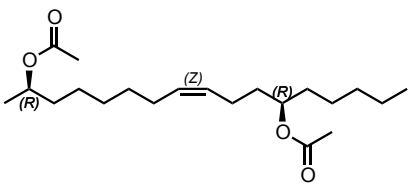
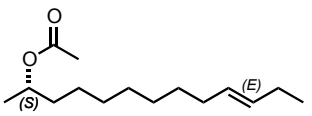
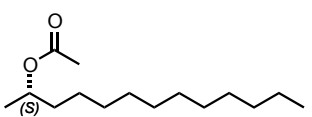
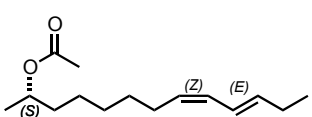
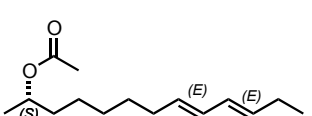
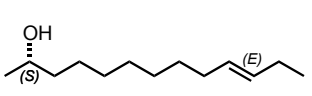
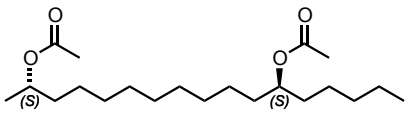
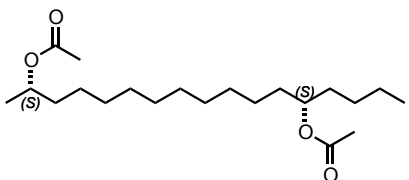
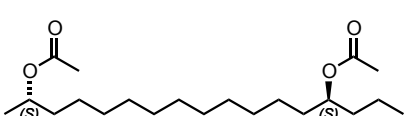
Tableau 4.1 Phéromones connues des cécidomyies

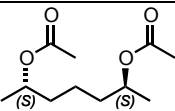
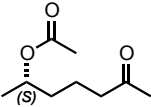
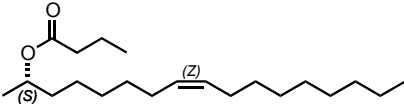
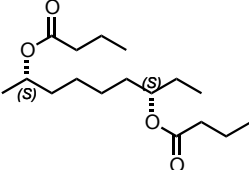
Espèce ^a	Composantes	Réf.
<i>Aphidoletes aphidimyza</i> Cécidomyie du puceron <i>Aphid midge</i>		79
<i>Contarinia nasturtii</i> Cécidomyie du chou-fleur <i>Swede midge</i>		85
<i>Contarinia oregonensis</i> Cécidomyie des cônes du Douglas <i>Douglas-fir cone gall midge</i>		84
<i>Contarinia pisi</i> Cécidomyie du pois <i>Pea midge</i>		134

¹³⁴ Hillbur, Y.; Anderson, P.; Arn, H.; Bengtsson, M.; Löfqvist, J.; Biddle, A. J.; Smitt, O.; Högberg, H.-E.; Plass, E.; Franke, S.; Francke, W. *Naturwissenschaften* **1999**, *86*, 292–294.

Espèce ^a	Composantes	Réf.
<i>Contarinia pyrivora</i> Cécidomyie des poires <i>Pear midge</i>	 	83,9
<i>Dasineura gleditchiae</i> Cécidomyie du févier <i>Honeylocust podgall midge</i>		95
<i>Dasineura mali</i> Cécidomyie du pommier <i>Apple leaf midge</i>		135,9
<i>Dasineura oxycoccana</i>^b Cécidomyie des atocas <i>Cranberry tipworm</i> Cécidomyie du bleuet <i>Blueberry gall midge</i>	<p>Canneberge</p>  <p>Bleuet</p>  	65
<i>Dasineura plicatrix</i> Cécidomyie des feuilles de la ronce <i>Blackberry leaf midge</i>	 	9

¹³⁵ Cross, J. V.; Hall, D.R. Pheromones. U.S. Patent 8,071,117 B2, 6 décembre 2011.

Espèce ^a	Composantes	Réf.
<i>Dasineura pyri</i> Cécidomyie des feuilles du poirier <i>Pear leaf midge</i>		83
<i>Dasineura tetensi</i> Cécidomyie des pousses de cassissier <i>Blackcurrant leaf midge</i>		83,9
<i>Mayetiola destructor</i> Mouche de Hesse <i>Hessian fly</i>	    	63
<i>Mayetiola thujae</i> Cécidomyie des cônes du thuya géant <i>Red cedar cone midge</i>	  	86

Espèce ^a	Composantes	Réf.
<i>Orseolia oryzae</i> Cécidomyie du riz <i>Rice gall midge</i>		9
<i>Resseliella theobaldi</i> Cécidomyie de l'écorce du framboisier <i>Raspberry cane midge</i>		96
<i>Rhopalomyia longicauda</i> Cécidomyie du chrysanthème <i>Crysanthemum gall midge</i>		94
<i>Sitodiplosis mosellana</i> Cécidomyie orangée du blé <i>Orange wheat blossom midge</i>		136

^a Nom binominal (latin) et, lorsque disponible, les noms communs en français et anglais.

^b Les populations sur la canneberge et sur le bleuet répondent à une phéromone sexuelle différente alors elles représentent deux espèces cryptiques.

4.1.2 Influence de la stéréochimie

La stéréochimie, ou l'arrangement spatial des atomes d'une molécule, revêt une importance particulière dans les systèmes non symétriques, comme dans les systèmes vivants. Le parfum différent des énantiomères du limonène, où le *R*-(+) a un parfum d'orange tandis que le *S*-(-) sent plutôt le citron, est un exemple illustrant leur interaction différente.¹³⁷

Dans les cas des phéromones, Mori a réparti les relations entre la stéréochimie et l'activité biologique de celles-ci en dix catégories.¹³⁸ Il est crucial d'étudier cette relation puisque des

¹³⁶ Gries, R.; Gries, G.; Khaskin, G.; King, S.; Olfert, O.; Kaminski, L.-A.; Lamb, R.; Bennett, R. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 450–454.

¹³⁷ Willock, D. *Molecular Symmetry*; John Wiley & Sons: Chichester, 2009.

¹³⁸ Mori, K. *Chem. Commun.* **1997**, 1153–1158.

stéréomères de la phéromone qui nous intéresse pourraient aussi inhiber son activité biologique.^{139,140}

Ainsi, lorsque la structure sera élucidée, l'élaboration de stratégies de synthèse asymétrique deviendra importante.

4.1.3 Objectifs et hypothèses

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la structure de la phéromone sexuelle de la cécidomyie du sapin en la comparant à des composés analogues dont la structure est connue. Pour ce faire, les hypothèses suivantes ont été posées : le signal supplémentaire observé chez la femelle au chapitre précédent correspond à la phéromone et sa structure est similaire à celle des autres cécidomyies.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Remarques générales

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (^1H , ^{13}C) ont été enregistrés à la température ambiante avec un spectromètre Agilent DD2 500 ou Varian Inova 400. L'étalon interne est le chloroforme (7,26 ppm) ou le tétraméthylsilane (0,00 ppm) pour la résonance des protons et le chloroforme (77,0 ppm) pour la résonance des carbones. Les spectres en infrarouge ont été enregistrés avec un spectromètre Thermo Scientific Nicolet 380 FT-IR. Les chromatogrammes en phase gazeuse ont été obtenus selon la méthode décrite au chapitre précédent. Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus avec un LC-MS-TOF Agilent 6210 en utilisant l'ionisation par électrospray (*electrospray ionization, ESI*). Les mesures de point de fusion ont été effectuées avec un appareil OptiMelt MPA100 de Stanford Research System.

Le but recherché est seulement d'obtenir le temps de rétention des alcools et des acétates en chromatographie en phase gazeuse afin de calculer l'indice de rétention pour comparer avec la phéromone. Ainsi, l'isolation et la caractérisation complète des composés ne sont pas nécessaires puisque la chromatographie en phase gazeuse permet justement de séparer un

¹³⁹ Mori, K. *Chirality* **1998**, *10*, 578–586.

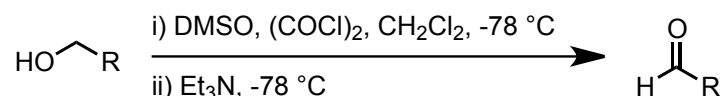
¹⁴⁰ Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7505–7523.

mélange et la spectrométrie de masse suffit pour assigner le temps de rétention à chacune de ses composantes.

4.2.2 Modes opératoires¹⁴¹

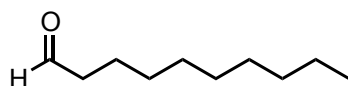
Oxydation de Swern

Protocole général



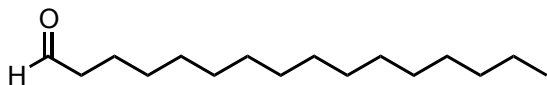
Les aldéhydes ont été préparés selon le protocole rapporté par Matuszewska et coll.¹⁴² puis le produit brut a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice pour obtenir le produit désiré.

Décanal (1)



La procédure générale a été suivie en utilisant le décan-1-ol (1.11 g, 7.01 mmol) comme alcool de départ puis le brut obtenu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (Ø 3 cm, H 16 cm) en éluant avec un mélange d'AcOEt et d'hexanes (5:95). Un liquide incolore (550 mg, 50 %) a été obtenu. **CCM** (AcOEt:Hexanes, 5:95, v/v) $R_F = 0.38$; **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.76 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.42 (td, $J = 7.4, 1.9$ Hz, 2H), 1.63 (quintet, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.34–1.26 (m, 12H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H). Les données spectroscopiques correspondent avec celles rapportées dans la littérature.¹⁴³

Hexadécanal (2)



La procédure générale a été suivie en utilisant l'heptadécan-1-ol (850 mg, 3.51 mmol) comme alcool de départ puis le produit brut obtenu a été purifié par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice (Ø : 3 cm, H : 17 cm) en l'imprégnant sur la silice (*dry pack*, H : 2 cm) et en éluant avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexanes (5:95). L'alcool de départ (269 mg) a été récupéré et un solide blanc (442 mg, 52 %) a été obtenu. **CCM**

¹⁴¹ Afin de simplifier la lecture de cette section, le point a été utilisé comme séparateur décimal.

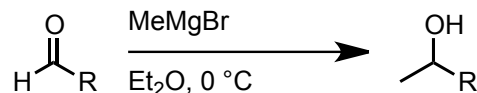
¹⁴² Matuszewska, I.; Leniewski, A.; Roszkowski, P.; Czarnocki, Z. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *135*, 131–145.

¹⁴³ Chowdhury, A. D.; Ray, R.; Lahiri, G. K. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5497–5499.

(AcOEt:Hexanes, 5:95, v/v) $R_F = 0.48$ (révélé avec KMnO_4); **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9.76 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.42 (td, $J = 7.4, 1.9$ Hz, 2H), 1.63 (quintet, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.34–1.22 (m, 24H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H). Les données spectroscopiques correspondent avec celles rapportées par la littérature.¹⁴⁴

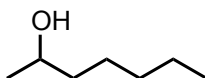
Réaction de Grignard

Protocole général



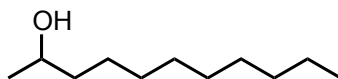
Le bromure d'éthylmagnésium (3.0 M dans l' Et_2O , 1.10 éq.) a été ajouté à une solution de l'aldéhyde correspondant dans l' Et_2O à 0°C sous atmosphère inerte. Après 1 h, la réaction a été parachevée par l'addition d'une solution aqueuse saturée en NH_4Cl (25 mL). Les phases ont été séparées et la phase organique a été lavée avec de l'eau (2 x 20 mL). Les phases aqueuses combinées ont été extraites avec de l' Et_2O (3 x 20 mL). Les phases organiques combinées ont été séchées avec du Na_2SO_4 anhydre et filtrées. Le solvant a été évaporé sous pression réduite pour obtenir l'alcool désiré.

Heptan-2-ol (3)



La procédure générale a été suivie en utilisant l'hexanal (0.62 mL, 5.16 mmol), fraîchement distillé en utilisant un appareil de distillation de Hickman sous atmosphère inerte, comme aldéhyde de départ. Une huile transparente (332 mg, 55 %) a été obtenue. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.79 (sex, $J = 6.0$ Hz, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.48–1.17 (m, 11H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); **GC-MS-EI** 5.59 min, $m/z = 55$ (100, $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$), 45 (57, $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}]^+$), 41 (34, $[\text{C}_3\text{H}_5]^+$). Les données spectroscopiques correspondent avec celles rapportées dans la littérature.¹⁴⁵

Undécane-2-ol (4)

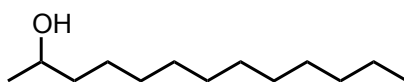


¹⁴⁴ Miao, C.-X.; He, L.-N.; Wang, J.-L.; Wu, F. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 257–260.

¹⁴⁵ Barozzino Consiglio, G.; Queval, P.; Harrison-Marchand, A.; Mordini, A.; Lohier, J.-F.; Delacroix, O.; Gaumont, A.-C.; Gérard, H.; Maddaluno, J.; Oulyadi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6472–6480.

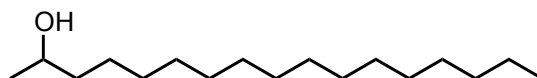
La procédure générale a été suivie en utilisant le décane **1** (548 mg, 3.51 mmol) comme aldéhyde de départ à la différence que le résidu a été dissous dans l'Et₂O et filtré à nouveau. Un liquide jaune (438 mg, 52 %) a été obtenu. **CCM** (AcOEt:Hexanes, 1:4, v/v) R_F = 0.55 (révélé avec KMnO₄); **IR** (ATR, ZnSe) ν = 3348, 2959, 2921, 2853, 1465, 1115, 936, 721 cm⁻¹; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.80 (sex, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.48–1.18 (m, 19H), 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 68.2, 39.4, 31.9, 29.65, 29.63, 29.56, 29.3, 25.8, 23.5, 22.7, 14.1; **SMHR-ESI** calculé pour C₁₁H₂₄ONa [M+Na]⁺ 195.1719, trouvé 195.1728.

Tridécan-2-ol (5)



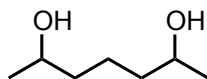
La procédure générale a été suivie en utilisant le dodécane (0.66 mL, 2.99 mmol) comme aldéhyde de départ. Un liquide jaune (571 mg, 95 %) a été obtenu. **CCM** (AcOEt:Hexanes, 1:4, v/v) R_F = 0.46 (révélé avec KMnO₄); **IR** (ATR, ZnSe) ν = 3340, 2958, 2919, 2853, 1466, 1117, 721 cm⁻¹; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.80 (sex, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.61 (s, 1H), 1.48–1.19 (m, 23H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 68.2, 39.4, 31.9, 29.6 (5C), 29.3, 25.8, 23.5, 22.7, 14.1; **GC-MS-EI** 14.58 min, *m/z* = 125 (3, [C₉H₁₇]⁺), 111 (15, [C₈H₁₅]⁺), 97 (29, [C₇H₁₃]⁺), 83 (35, [C₆H₁₁]⁺), 69 (58, [C₅H₉]⁺), 55 (100, [C₄H₇]⁺), 45 (39, [CH(CH₃)OH]⁺), 41 (74, [C₃H₅]⁺).

Heptadécane-2-ol (6)



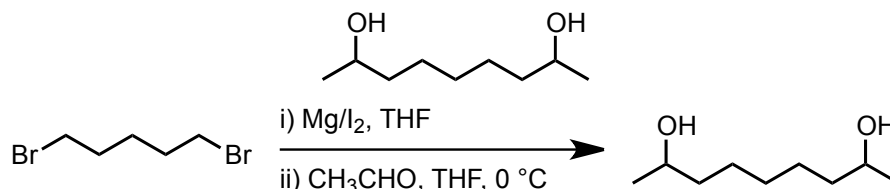
La procédure générale a été suivie en utilisant l'hexadécane **2** (442 mg, 1.84 mmol) comme aldéhyde de départ, à la différence que les phases organiques combinées ont été lavées avec de la saumure (25 mL). Un solide blanc (461 mg, 98 %) a été obtenu. **CCM** (AcOEt:Hexanes, 1:4, v/v) R_F = 0.40 (révélé avec KMnO₄); **P_f** 37.9–40.3 °C; **IR** (ATR, ZnSe) ν = 3313, 2956, 2915, 2848, 1465, 1136, 929, 720 cm⁻¹; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.80 (sex, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.70 (s, 1H), 1.47–1.18 (m, 31H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 68.2, 39.4, 31.9, 29.6 (9C), 29.4, 25.8, 23.5, 22.7, 14.1; **SMHR-ESI** calculé pour C₁₇H₄₀NO [M+NH₄]⁺ 274.3104, trouvé 274.3100.

Heptane-2,6-diol (7)



La solution aqueuse de pentanedial (50 %) a été extraite en suivant le protocole rapporté par Bihovsky et coll.¹⁴⁶ puis la procédure générale a été suivie en utilisant une part de ce pentanedial (750 mg, 7.49 mmol) avec 4.00 éq. de MeMgBr (10 mL, 30 mmol). Le résidu obtenu a été distillé au Kugelrohr (75–180 °C, 3 mmHg) puis purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (Ø : 2.5 cm, H : 21 cm) en utilisant un mélange d'acétone et d'hexanes (1:4). Un liquide transparent (421 mg) a été obtenu. Puis, il a été purifié à nouveau par chromatographie éclair sur gel de silice (Ø : 1.5 cm, H : 14.5 cm) en utilisant un mélange d'acétone et d'hexanes (2:3). Un liquide transparent a été obtenu. **CCM** (Acétone:Hexanes, 2:3, v/v) $R_F = 0.29$. **GC-MS-EI** 8.92 min (heptane-2,6-diol), $m/z = 81$ (49, $[C_6H_9]^+$), 55 (71, $[C_4H_7]^+$), 45 (100, $[CH(CH_3)OH]^+$), 43 (80, $[C_3H_7]^+$), 42 (30, $[C_3H_6]^+$), 41 (67, $[C_3H_5]^+$), 30.27 min.

Nonane-2,8-diol (8)



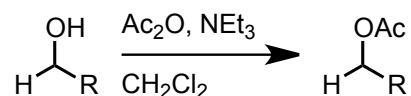
Dans un bicol, contenant le Mg (188 mg, 7.74 mmol) et un petit cristal de I₂, surmonté d'une ampoule à addition et d'un réfrigérant sous atmosphère inerte, du THF (2 mL) a été ajouté. Une solution de 1,5-dibromopentane (0.35 mL, 2.58 mmol) dans le THF (9 mL) a été ajoutée lentement et l'ampoule a été rincée avec du THF (1 mL). Le mélange réactionnel a été porté à reflux pendant 4 h. Il a été refroidi dans un bain de glace puis une solution d'acétaldéhyde (0.44 mL, 7.74 mmol) dans le THF (9 mL) a été ajoutée lentement et l'ampoule à addition a été rincée avec du THF (1 mL). Le mélange réactionnel a été laissé se réchauffer à la température ambiante et il a été laissé sous agitation pendant 1 h. La réaction a été parachevée en ajoutant lentement une solution aqueuse de HCl 10 % (25 mL). La solution a été extraite avec de l'Et₂O (3 x 15 mL) et les phases organiques combinées ont été lavées avec de l'eau (15 mL) et de la saumure (15 mL) puis séchées avec du Na₂SO₄

¹⁴⁶ Bihovsky, R.; Selick, C.; Giusti, I. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4026–4031.

anhydre et filtrées. Le résidu obtenu a été purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (\varnothing : 2.5 cm, H : 16.5 cm) en éluant avec un mélange d'AcOEt et d'hexanes (1:4). La colonne a été rincée à l'acétone et cette dernière fraction a été purifiée par chromatographie éclair sur gel de silice (\varnothing : 1.5 cm, H : 14 cm) en éluant avec un mélange d'acétone et d'hexanes (1:4). Un liquide visqueux légèrement jaune (80 mg, 19 %) a été obtenu. **CCM** (Acétone:Hexanes, 1:4, v/v) $R_F = 0.18$ (révélé avec le CAM); **IR** (ATR, ZnSe) $\nu = 3326, 2965, 2928, 2856, 1463, 1372, 1013, 932 \text{ cm}^{-1}$; **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.81 (sex, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H), 1.62–1.18 (m, 18H); **RMN ^{13}C** (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 68.1 (2C), 39.2 (2C), 29.6, 25.7 (2C), 23.5 (2C); **HRMS-ESI** calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 161.1536, trouvé 161.1516.

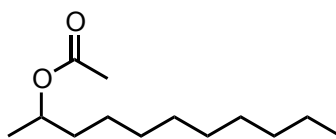
Acétylation

Protocole général



L'alcool, la triéthylamine (2.00 éq.) et le dichlorométhane (5 mL) ont été ajoutés dans un ballon mis sous atmosphère inerte. L'anhydride acétique (2.00 éq.) a été ajouté et le mélange réactionnel a été laissé sous agitation pendant 16 h, puis le mélange réactionnel a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dilué dans l' Et_2O (15 mL) puis lavé avec une solution aqueuse de HCl 10 % (10 mL), une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 (10 mL) et de la saumure (10 mL). La phase organique a été séchée avec du Na_2SO_4 anhydre puis filtrée et le solvant a été évaporé sous pression réduite.

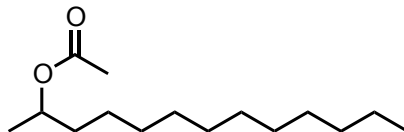
Acétate de undécan-2-yl (9)



La procédure générale a été suivie en utilisant l'undécan-2-ol **4** (150 mg, 0.88 mmol) comme alcool de départ. Le produit brut (133 mg) sous forme d'un liquide jaune contient l'acétate désiré en plus de l'alcool de départ. **GC-MS-EI** 11.93 min (undécan-2-ol **4**), $m/z = 111$ (5, $\text{M} - [\text{C}_8\text{H}_{15}]^+$), 97 (16, $[\text{C}_7\text{H}_{13}]^+$), 83 (23, $[\text{C}_6\text{H}_{11}]^+$), 69 (42, $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$), 55 (100, $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$), 45 (50, $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}]^+$), 41 (61, $[\text{C}_3\text{H}_5]^+$), 13.90 min (acétate de undécan-2-yl),

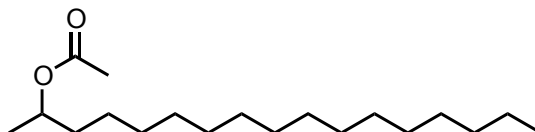
m/z = 111 (7, [C₈H₁₅]⁺), 97 (13, [C₇H₁₃]⁺), 83 (15, [C₆H₁₁]⁺), 69 (38, [C₅H₉]⁺), 55 (63, [C₄H₇]⁺), 43 (100, [COCH₃]⁺), 41 (57, [C₃H₅]⁺).

Acétate de tridécane-2-yl (10)



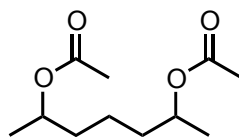
La procédure générale a été suivie en utilisant le tridécane-2-ol **5** (150 mg, 0.75 mmol) comme alcool de départ. Le produit brut (144 mg) contient l'acétate désiré en plus de l'alcool de départ. **GC-MS-EI** 14.58 min (tridécane-2-ol **5**), m/z = 125 (3, [C₉H₁₇]⁺), 111 (16, [C₈H₁₅]⁺), 97 (27, [C₇H₁₃]⁺), 83 (30, [C₆H₁₁]⁺), 69 (59, [C₅H₉]⁺), 55 (100, [C₄H₇]⁺), 45 (46, [CH(CH₃)OH]⁺), 41 (78, [C₃H₅]⁺), 16.01 min (acétate de tridécane-2-yl), m/z = 125 (4, [C₉H₁₇]⁺), 111 (11, [C₈H₁₅]⁺), 97 (26, [C₇H₁₃]⁺), 83 (28, [C₆H₁₁]⁺), 69 (41, [C₅H₉]⁺), 55 (88, [C₄H₇]⁺), 43 (100, [COCH₃]⁺), 41 (63, [C₃H₅]⁺).

Acétate d'heptadécane-2-yl (11)



La procédure générale a été suivie en utilisant l'heptadécane-2-ol **6** (150 mg, 0.58 mmol) comme alcool de départ. Le produit brut (146 mg) sous forme d'un solide blanc contient l'acétate désiré en plus de l'alcool de départ. **GC-MS-EI** 19.15 min (heptadécane-2-ol **6**), m/z = 139 (9, [C₁₀H₁₉]⁺), 125 (15, [C₉H₁₇]⁺), 111 (35, [C₈H₁₅]⁺), 97 (57, [C₇H₁₃]⁺), 83 (43, [C₆H₁₁]⁺), 69 (61, [C₅H₉]⁺), 55 (100, [C₄H₇]⁺), 45 (36, [CH(CH₃)OH]⁺), 41 (79, [C₃H₅]⁺), 20.25 min (acétate d'heptadécane-2-yl), m/z = 139 (6, [C₁₀H₁₉]⁺), 125 (14, [C₉H₁₇]⁺), 111 (29, [C₈H₁₅]⁺), 97 (50, [C₇H₁₃]⁺), 83 (36, [C₆H₁₁]⁺), 69 (60, [C₅H₉]⁺), 55 (100, [C₄H₇]⁺), 43 (98, [COCH₃]⁺), 41 (70, [C₃H₅]⁺).

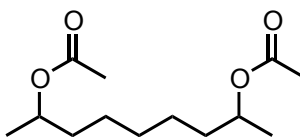
Diacétate d'heptane-2,6-diyl (12)



La procédure générale a été suivie en utilisant l'heptane-2,6-diol **7** (70 mg, 0.53 mmol) comme alcool de départ à la différence que 5.02 éq. de triéthylamine (0.26 mL, 2.66 mmol)

et d'anhydride acétique (0.37 mL, 2.66 mmol) ont été utilisés. Le produit brut (90 mg) sous forme d'un liquide transparent a été obtenu. **GC-MS-EI** 12.47 min (diacétate d'heptane-2,6-diyl), $m/z = 81$ (73, $[C_6H_9]^+$), 69 (11, $[C_5H_9]^+$), 67 (13, $[C_5H_7]^+$), 55 (25, $[C_4H_7]^+$), 43 (100, $[COCH_3]^+$), 41 (21, $[C_3H_5]^+$), 18.73 min, 18.96 min, 20.94 min, 22.38 min.

Diacétate de nonane-2,8-diyl (13)



La procédure générale a été suivie en utilisant le nonane-2,8-diol **8** (75 mg, 0.47 mmol) comme alcool de départ à la différence que 5.98 éq. de triéthylamine (0.39 mL, 2.81 mmol) et 5.87 éq. d'anhydride acétique (0.27 mL, 2.76 mmol) ont été utilisés, la saumure a été remplacée par de l'eau, puis le produit a été dissous à nouveau dans l'Et₂O, séché avec du Na₂SO₄, filtré et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Un liquide jaune (89 mg, 77 %) a été obtenu. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.89 (sex, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.04 (s, 6H), 1.64-1.16 (m, 16H); **RMN** ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8 (2C), 70.9 (2C), 35.8 (2C), 29.3, 25.3 (2C), 21.4 (2C), 20.0 (2C). **GC-MS-EI** 15.12 min, $m/z = 81$ (14, $[C_6H_9]^+$), 67 (100, $[C_5H_7]^+$), 55 (17, $[C_4H_7]^+$), 43 (63, $[COCH_3]^+$), 41 (17, $[C_3H_5]^+$).

4.3 Résultats

Tout d'abord, des analogues ne contenant qu'un acétate ont été synthétisés et le temps de rétention de ceux-ci, ainsi que des alcools correspondants, a été déterminé par GC-MS afin de définir la plage sur laquelle les analogues s'étendent.

Tableau 4.2 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2

Composé	Longueur de la chaîne Atomes de C	Temps de rétention min	Indice de rétention
Alcools en position 2			
Heptan-2-ol	7	5,59	900
Undécane-2-ol	11	11,95	1333
Tridécan-2-ol	13	14,58	1512
Heptadécan-2-ol	17	19,11	1821
Acétates en position 2			
Acétate de undécane-2-yl	11	13,59	1445
Acétate de tridécan-2-yl	13	16,01	1610
Acétate de heptadécan-2-yl	17	20,25	1899

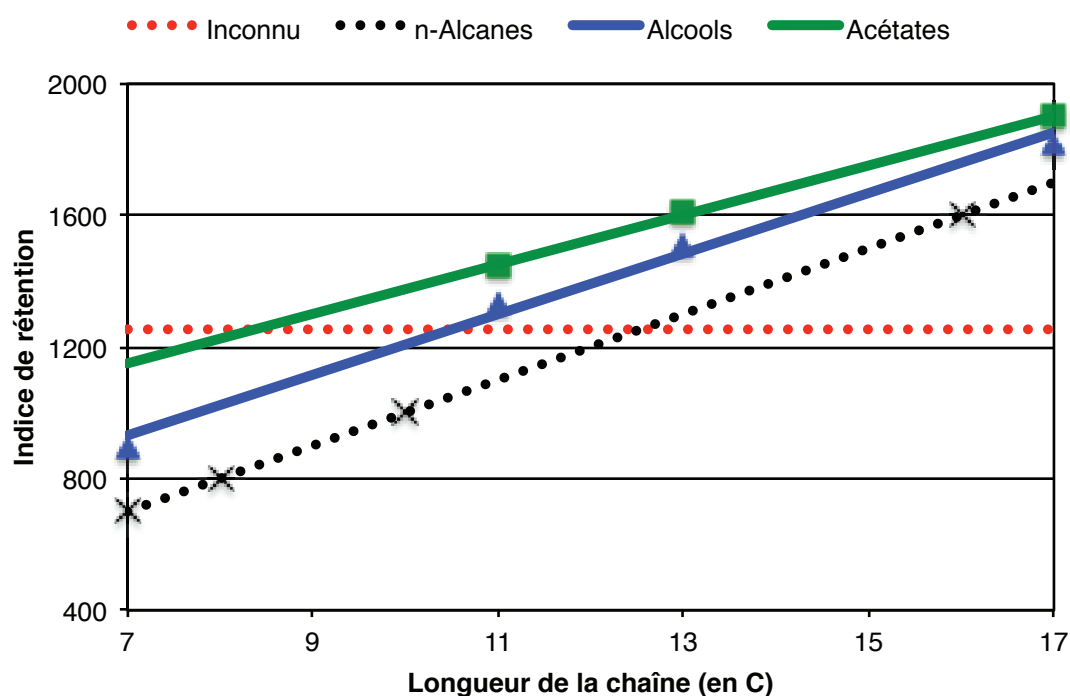


Figure 4.2 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2

Par la suite, des analogues contenant deux acétates (un sur le second carbone, un sur l'avant-dernier de la chaîne principale) ont été synthétisés et le temps de rétention de ceux-ci ainsi que des alcools correspondants a été déterminé par GC-MS.

Tableau 4.3 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2 et C-(n-1)

Composé	Longueur de la chaîne Atomes de C	Temps de rétention min	Indice de rétention
Diols			
Heptane-2,6-diol	7	8,92	1127
Nonane-2,8-diol	9	11,97	1334
Diacétates			
Diacétate d'heptane-2,6-diyl	7	12,47	1369
Diacétate de nonane-2,8-diyl	9	15,12	1549

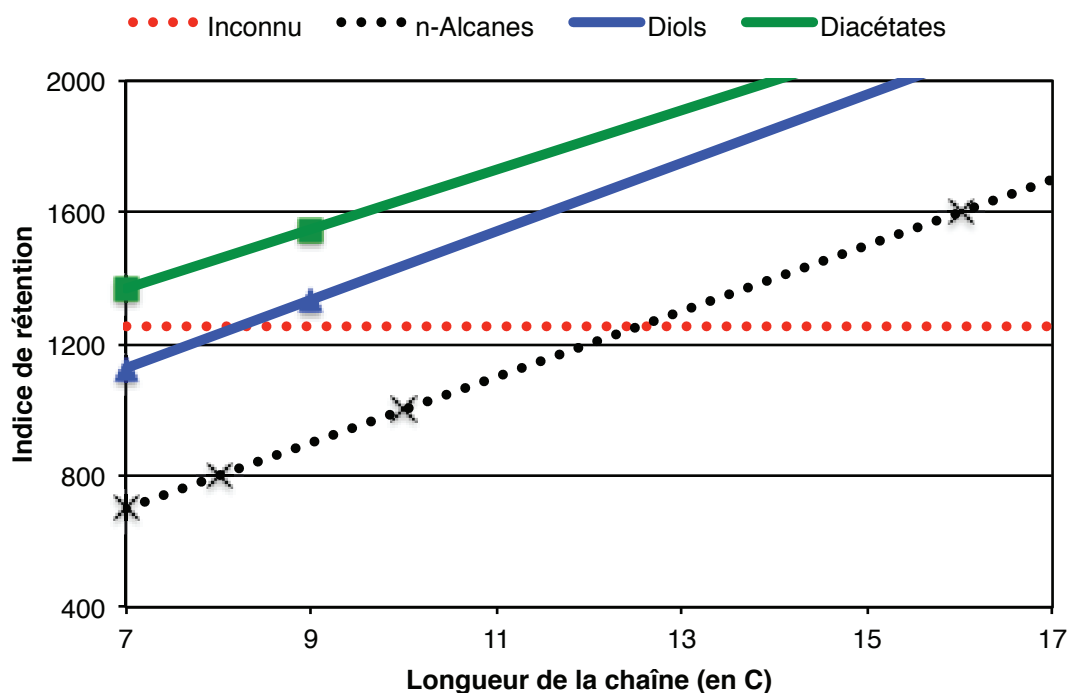


Figure 4.3 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des alcools et acétates en position C-2 et C-(n-1)

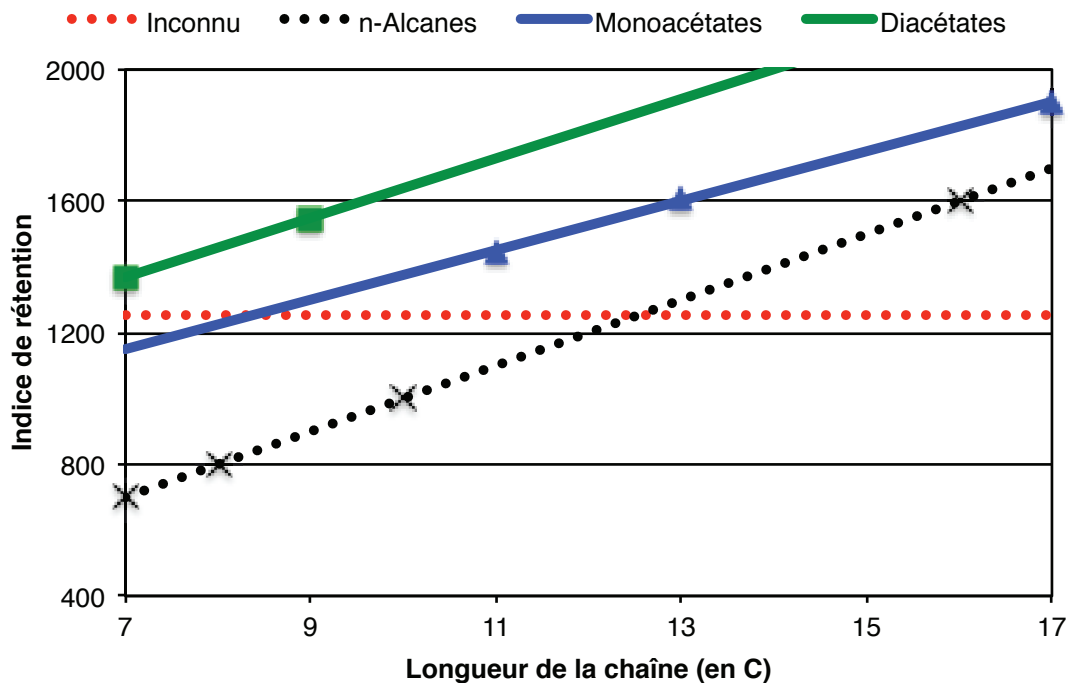


Figure 4.4 Indice de rétention en fonction de la longueur de la chaîne pour des acétates en position C-2 et des diacétates substitués en position C-2 et C-(n-1)

4.4 Discussion

4.4.1 Indice de rétention sur une colonne non polaire (DB-5)¹⁴⁷

Longueur de la chaîne carbonée

Sur une colonne ayant une phase stationnaire non polaire, l'indice de rétention d'une série de composés homologues est relié au point d'ébullition.¹²⁷ Ainsi, comme montré par la figure 4.2, la figure 4.3 et la figure 4.4, l'indice de rétention augmente lorsque la longueur de la chaîne carbonée, donc la masse molaire, augmente.

Nature du substituant

La présence d'un substituant augmente le temps de rétention donc l'indice de rétention par rapport à l'alcane correspondant. Comme montré par la figure 4.2, sur une colonne non polaire, l'ordre d'éluion pour un composé ayant une chaîne de carbone d'une longueur donnée, est *n*-alcane, alcool et acétate.

¹⁴⁷ Les incertitudes n'ont pas été calculées pour les indices de rétention notamment en raison du faible nombre de répétitions pour le composé d'intérêt et de l'utilisation d'une droite de régression au lieu de l'interpolation linéaire entre deux alcanes. Par contre, ces indices ont été utilisés de façon qualitative afin de comparer, par exemple, l'effet d'un groupement ou l'influence de son positionnement relatif.

Présence et position d'un second substituant

Comme montré par la figure 4.4, l'ajout d'un second substituant acétate augmente aussi l'indice de rétention, mais l'impact relatif semble s'accroître au fur et à mesure de l'allongement de la chaîne carbonée. Il a été montré pour le diacétate d'heptadécane-2,X-diyl (figure 4.5) que l'augmentation due à l'ajout du second acétate était de moins en moins grande lorsque la position de cet acétate s'éloignait de l'extrémité. Cependant, il reste à démontrer l'importance de cet effet dans le cas d'une molécule ayant une chaîne principale constituée de 7 carbones.

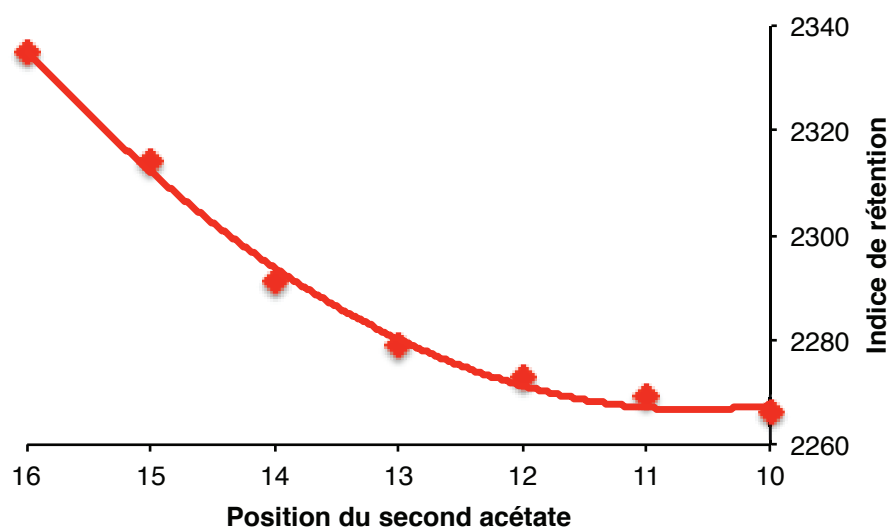


Figure 4.5 Influence de la position du second acétate sur l'indice de rétention pour le diacétate d'heptadécane-2,X-diyl⁸⁶

Position d'une insaturation

La présence d'une ou plusieurs insaturations dans la phéromone constitue une des possibilités à envisager (figure 4.1). L'impact sur l'indice de rétention de la présence d'une insaturation pour l'acétate de tridécène-2-yl a été montré (figure 4.6) ainsi que pour l'acétate de dodécène-1-yl, l'acétate de tétradécène-1-yl et l'acétate de hexadécène-1-yl (figure 4.7). Essentiellement, la présence de l'insaturation affecte à la baisse l'indice de rétention sur la majorité de la molécule dans les cas observés.

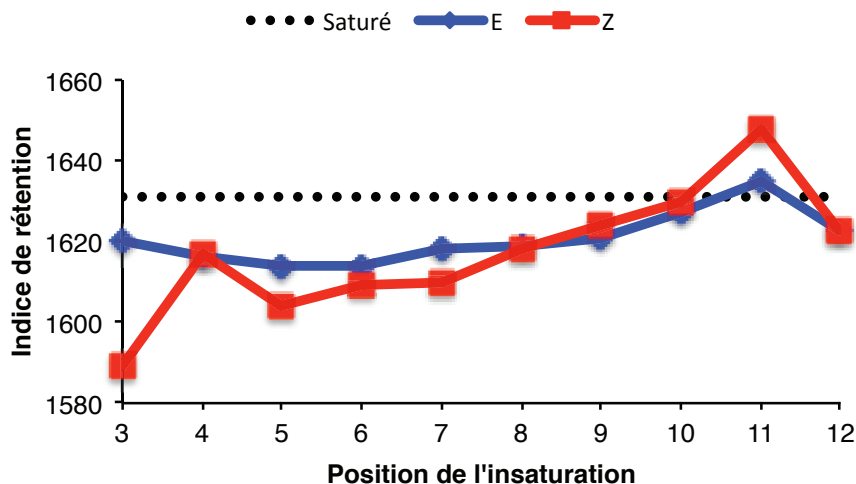


Figure 4.6 Influence de la position et de la géométrie d'une insaturation sur l'indice de rétention pour l'acétate de tridécène-2-yl^{84,148}

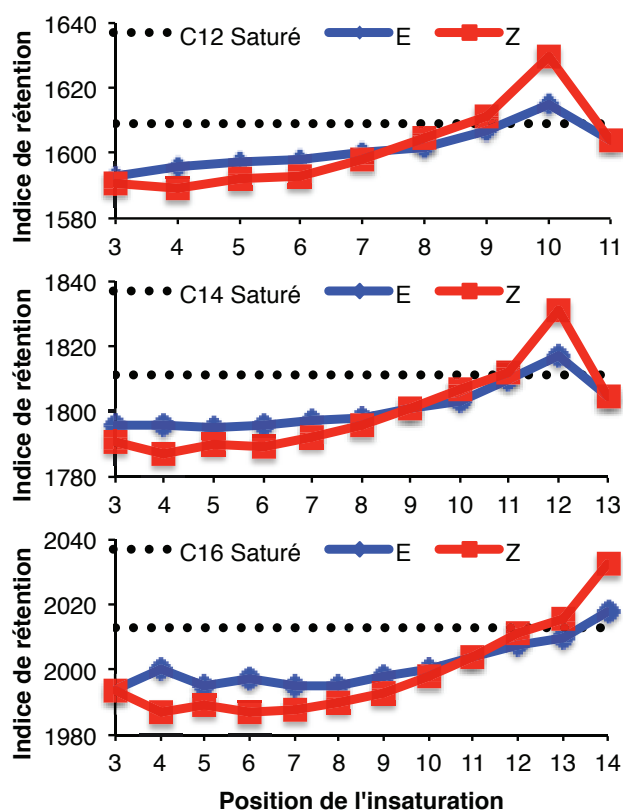


Figure 4.7 Influence de la position et de la géométrie d'une insaturation sur des molécules ayant une chaîne principale de 12, 14 et 16 carbones respectivement portant un acétate en position C-1^{130,148}

¹⁴⁸ Lorsque l'insaturation est située sur l'avant-dernier carbone, celle-ci n'est ni E ni Z, mais le résultat correspondant, lorsque disponible, a été mis dans chaque série afin que le graphique soit cohérent.

4.4.2 Identification de la phéromone

Jusqu'à maintenant, la composante de la phéromone correspondant au signal supplémentaire observé chez la femelle n'a pu être identifiée. Par contre, l'influence de quelques facteurs sur une molécule ayant une chaîne comptant 7 carbones, tels que le positionnement du second acétate ainsi que la présence d'une insaturation mérite d'être approfondie. En effet, l'indice de rétention du diacétate d'heptane-2,6-diyl ($I = 1369$) est légèrement supérieur à celui recherché ($I = 1253$).

Dans le même ordre d'idée, la possibilité de la présence d'une molécule de type céto-acétate, comme observé chez *Orseolia oryzae* et *Resseliella theobaldi* (tableau 4.1), est aussi à considérer. En effet, il a été observé que l'indice de rétention d'un céto-acétate est plus petit que celui du diacétate dans le cas du undécane substitué en position 2 et 7.⁸³

D'autres méthodes existent afin de déterminer les groupements fonctionnels comme la comparaison de l'indice de rétention obtenu avec une colonne dont la phase stationnaire est d'une polarité différente ou des réactions sur une microéchelle.^{64,149}

4.5 Conclusion

En conclusion, la structure de la ou les molécules agissant comme phéromone sexuelle n'a pu être identifiée, mais la chaîne principale de cette molécule semble avoir une longueur de sept carbones. De plus, le positionnement relatif d'un second acétate, la présence d'une insaturation et la possibilité d'une molécule de type céto-acétate sont des possibilités qui seront à considérer.

¹⁴⁹ Attygalle, A. B.; Morgan, E. D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 460–478.

5. Conclusion générale

5.1 Conclusion

En conclusion, la cécidomyie du sapin est un petit diptère univoltin dont la larve se nourrit dans une galle formée sur une aiguille du sapin baumier ou Fraser. Puisque cette aiguille tombera à l'automne, un dommage esthétique est causé ce qui réduit la valeur du sapin comme arbre de Noël.

Une phéromone sexuelle est émise par la femelle adulte, phéromone qui attire le mâle de la même espèce. Dans un but de dépistage, cette dernière pourrait être utilisée dans un piège approprié.

Ainsi, l'identification de ce composé sémi chimique est essentielle. Afin d'y parvenir, il est d'abord nécessaire de collecter cette substance, ce qui a été fait soit par l'extraction de l'abdomen de la femelle avec un solvant, soit par la collecte des effluves. En l'absence de tests biologiques, il n'a pas été possible de prouver hors de tout doute que la phéromone fût effectivement présente dans l'extrait.

Les extraits collectés, contenant un mélange de diverses substances, ont ensuite été séparés par chromatographie en phase gazeuse, une méthode particulièrement adaptée dans le cas de substances volatiles. Il a été hypothétisé que les femelles et les mâles contenaient et émettaient sensiblement les mêmes composés, la phéromone en plus chez la femelle, et que la quantité émise de cette phéromone était très faible. Ainsi, le détecteur le plus sensible à notre disposition, le détecteur à ionisation de flamme (*FID*), a été utilisé et un temps de rétention d'une substance correspondant à la phéromone a été obtenu en se basant sur l'hypothèse précédemment formulée. À partir de ce temps de rétention (10,76–10,79 min), un indice de rétention (1252–1254 sur une colonne DB5) a été calculé. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir un spectre de masse en raison de la sensibilité moindre de ce détecteur. De plus, il n'a pas été possible de comparer l'indice de rétention obtenu avec des colonnes ayant une phase stationnaire d'une polarité différente en raison du petit nombre d'échantillons disponibles.

Afin de retirer le maximum d'information de ce temps ou indice de rétention, des composés ayant une structure analogue à la phéromone ont été synthétisés. Cette structure est basée sur les similarités observées chez les phéromones actuellement connues de cécidomyies. En comparant ces analogues avec la phéromone, il en a été déduit que celle-ci avait probablement une longueur de sept carbones. Cependant, l'influence du positionnement relatif d'un second acétate, la présence d'une insaturation et la présence d'une molécule ayant une structure de type céto-acétate sont des éléments qui restent à considérer.

Malheureusement, la phéromone n'a pas été complètement identifiée jusqu'à maintenant, mais des progrès ont été accomplis dans cette direction.

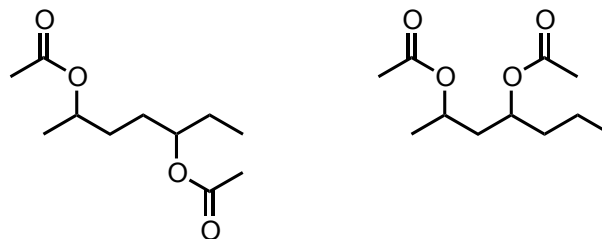
5.2 Perspectives futures

L'épigraphe est véritablement représentative du but visé par ce document. En effet, à défaut d'avoir complètement identifié la phéromone, l'optique de ce mémoire est d'initier rapidement le lecteur sur ce système, les contraintes et les nuances pour lui faire bénéficier de l'expérience acquise au cours de ce projet afin de mener à terme les travaux et d'arriver, finalement, au but souhaité.

5.2.1 Poursuite de la synthèse d'analogues

Plusieurs analogues ont déjà été synthétisés afin d'aider la détermination de la structure de la phéromone sexuelle. Jusqu'à maintenant, l'influence sur le temps de rétention de trois éléments apparaît intéressante à étudier.

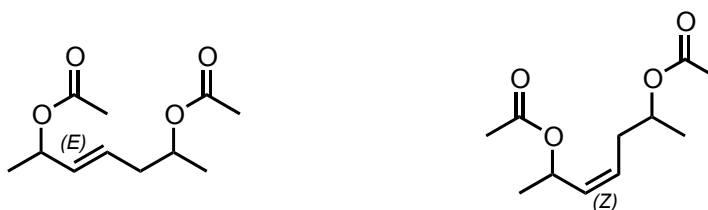
Premièrement, mesurer l'influence du positionnement relatif du second acétate. Deux molécules devraient alors être synthétisées (figure 5.1) : le diacétate d'heptane-2,5-diyl et le diacétate d'heptane-2,4-diyl.



Diacétate d'heptane-2,5-diyl Diacétate d'heptane-2,4-diyl

Figure 5.1 Influence du positionnement relatif du second acétate

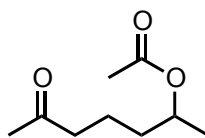
Deuxièmement, la présence et l'influence d'une insaturation pourraient être déterminées en synthétisant le diacétate de (*E*)-hept-3-ène-2,6-diyl et l'isomère *Z* correspondant (figure 5.2).



Diacétate de (*E*)-hept-3-ène-2,6-diyl Diacétate de (*Z*)-hept-3-ène-2,6-diyl

Figure 5.2 Influence d'une insaturation

Troisièmement, synthétiser une molécule de type céto-acétate comme l'acétate de 6-oxoheptan-2-yl (figure 5.3) afin de comparer le temps de rétention relativement au diacétate correspondant.



Acétate de 6-oxoheptan-2-yl

Figure 5.3 Influence d'une molécule de type céto-acétate par rapport au diacétate

Si la phéromone est, comme prévu, la substance ayant un indice de rétention autour de 1253, il devrait être possible de déterminer sa structure en deux dimensions avec ces molécules.

Évidemment, une fois cette structure trouvée, il sera nécessaire de synthétiser tous les diastéréomères afin de déterminer lequel correspond réellement la phéromone.

5.2.2 Éléments d'amélioration

Ces travaux de maîtrise ont été réalisés avec les moyens à notre disposition et avec les insectes ayant été récupérés dans des plantations de sapin. Comme indiqué tout au long du mémoire, il existe actuellement des méthodes et des techniques mieux adaptées.

Méthodes de détection

D'abord, le détecteur par électroantennographie, sans être une panacée, est un outil absolument essentiel pour la recherche de phéromones sexuelles. Cet appareil demande une expertise particulière qui n'est pas à la portée de tous les groupes, mais ceux travaillant intensivement sur les phéromones en disposent généralement d'un. Il permet la détection sélective de composés actifs sur les insectes tout en ayant une sensibilité plus grande de quelques ordres de grandeur comparativement au détecteur à ionisation de flamme.

À défaut d'y avoir accès, le développement d'une méthode de test biologique en utilisant les insectes vivants permettrait de compenser. Par contre, puisque l'imago est éphémère et que cette méthode requiert plusieurs essais, cette méthode est difficilement utilisable.

Dans le pire des cas, l'utilisation d'un détecteur à capture d'électron (*ECD*) est possible en hydrolysant les esters des extraits puis en utilisant un réactif de dérivatisation approprié (contenant des halogènes) afin de détecter une quantité significativement plus faible qu'avec le *FID*. Évidemment, des impuretés pourraient aussi avoir une réponse importante en fonction de leurs structures. De plus, ce détecteur est non-destructif alors il est possible de récupérer l'échantillon après l'analyse.

Méthodes de détermination de la structure

À partir du moment où une méthode suffisamment sensible de détection est disponible, il est possible d'obtenir des informations sur la structure en faisant des réactions sur une microéchelle. Par exemple, une hydrogénation afin de détecter la présence d'une insaturation, une hydrolyse afin de déterminer la présence d'ester suivi d'une estérification pour déterminer lequel des esters (acétate ou butyrate) était initialement présent sur la molécule (s'il y a lieu), etc.

De plus, l'analyse de l'échantillon sur des colonnes ayant une polarité différente peut permettre d'obtenir de l'information structurale en calculant l'indice de rétention du composé sur chaque colonne afin d'obtenir un indice de rétention différentiel.