

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PREPARATION ET EVALUATION
DE DIFFUSEURS DE PHEROMONE SEXUELLE
POUR LE PIEGEAGE DE LA PUNAISE TERNE (LYGUS LINEOLARIS)
EN CULTURE FRAISIERE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
OSCAR QUINTANA SANCHEZ

AOÛT 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le professeur Daniel Chapdelaine, de m'avoir donné sa confiance pour la réalisation de ce projet, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir partagé ses connaissances et son expérience.

De même, je tiens à remercier les chercheurs du Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel (CRAM), en particulier Monsieur François Dumont, Madame Laura Chouinard et Madame Maud Lemay, d'avoir partagé leurs techniques et leurs connaissances sur le terrain, qui nous ont permis d'effectuer une belle collaboration. Je tiens aussi à remercier Madame Caroline Provost, directrice du CRAM, pour son intérêt dans la collaboration avec les chercheurs universitaires.

Je suis également reconnaissant envers mes professeurs pour m'avoir orienté et envers toute l'équipe des techniciennes et du personnel de l'Université du Québec à Montréal pour l'appui à développer mon projet. Je suis reconnaissant envers l'Université pour l'opportunité de travailler dans ses installations. Je suis également reconnaissant envers mes collègues du laboratoire, Camille Cousseau, Amira Khelil et la stagiaire du baccalauréat en chimie Océane Gueudelin pour l'excellente ambiance de travail.

Enfin, je voudrais remercier MITACS pour le financement de mon projet via les bourses du programme Accélération lors de mes stages de l'été 2019 et de l'été 2020.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un
profond amour à ma mère, elle qui m'a doté
d'une belle éducation.

À mon cher ami et oncle Carlos, et à mon
inoubliable chien Figo.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xvi
RÉSUMÉ.....	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	7
1.1 La punaise terne, <i>Lygus lineolaris</i> (Palisot de Beauvois).....	7
1.2 Mode d'alimentation de la punaise terne et dommages causés aux plantes, dont les fraises de culture	9
1.3 Phéromones sexuelles et autres substances sémiologiques utilisées par les insectes.....	13
1.4 Substances volatiles isolées des punaises ternes.....	17
1.4.1 Extraction de substances volatiles à partir de punaises ternes sacrifiées	18
1.4.2 Captation de substances volatiles par aération de punaises ternes en alimentation.....	22
1.5 Sensibilité des antennes des punaises à des substances volatiles : la technique d'électroantennographie.....	32
1.6 L'influence des substances volatiles sur le comportement des punaises : la technique de l'olfactométrie	39
1.7 Piégeage sur le terrain avec des leurres odorants	42

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
2.1 Substances utilisées et matériel consommé.	50
2.2 Préparation de la phéromone synthétique.....	51
2.3 Méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masses (GC-MS)	53
2.4 Méthode d'analyse par résonance magnétique nucléaire.	54
2.5 Protocole de préparation des diffuseurs.....	54
2.5.1 Formulation des solutions de phéromone synthétique	54
2.5.2 Formulation de la solution d'odeur florale synthétique	55
2.5.3 Fabrication des diffuseurs de substances volatiles.....	55
2.6 Analyse du contenu des diffuseurs via extraction et chromatographie GC-MS....	55
2.7 Protocole d'extraction de volatils à partir d'aération de diffuseurs.....	56
2.8 Protocole de préparation et d'installation des pièges avec diffuseurs dans des champs de culture fraisière à l'été 2019 et à l'été 2020.....	59
CHAPITRE III RÉSULTATS, ANALYSE ET DISCUSSION.	63
3.1 Schéma de synthèse du butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle et du (<i>E</i>)-4-oxohex-2-énal	63
3.2 Spectres RMN ¹ H du butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle et du (<i>E</i>)-4-oxohex-2-énal purs.....	65
3.3 Analyse du contenu des diffuseurs neufs par extraction liquide et chromatographie GC-MS.....	68
3.4 Analyse du contenu en substances volatiles des diffuseurs après leur utilisation sur le terrain.	76
3.5 Taux de libération de la phéromone via l'aération et la captation des substances volatiles émises par des diffuseurs au laboratoire.	78
3.6 Résultats de piégeage des punaises ternes avec des diffuseurs préparés au laboratoire.	82
CONCLUSION.....	95
ANNEXE A DÉTAILS DES SITES D'ÉTUDES.....	98
ANNEXE B CONSTRUCTION DE LA COURBE STANDARD, ANALYSE PAR EXTRACTION DE VOLATILS.....	101

Tableau B1 Préparation de la solution standard de l'analyse par extraction	101
Tableau B2 Valeurs de la courbe standard.....	102
Tableau B3 Analyse des extraits de 6 diffuseurs après 14 jours de congélation	108
Tableau B4 Analyse des extraits, test du remplissage	110
Figure B1 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 1.....	103
Figure B2 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 2.....	104
Figure B3 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 3.....	105
Figure B4 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 4.....	106
Figure B5 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 5.....	107
ANNEXE C CONSTRUCTION DE LA COURBE STANDARD, ANALYSE PAR CAPTATION DE VOLATILS.	112
Tableau C1 Préparation de la solution standard de l'analyse par captation.....	112
Tableau C2 Valeurs de la courbe standard.....	113
Tableau C3 Analyse de 3 diffuseurs nouveaux, par captation de volatils pendant 18 heures sur charbon actif.....	119
Figure C1 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 1.....	114
Figure C2 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 2.....	115
Figure C3 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 3.....	116
Figure C4 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 4.....	117
Figure C5 Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 5.....	118

BIBLIOGRAPHIE 121

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
0.1 Les utilisations potentielles de substances sémiochimiques dans la lutte contre les insectes ravageurs	5
1.1 Punaise terne, <i>Lygus lineolaris</i> adulte. (MAPAQ, 2020)	8
1.2 Caractéristiques morphologiques de <i>Lygus lineolaris</i> (Mueller <i>et al.</i> , 2003)	9
1.3 Adultes de <i>Lygus lineolaris</i> sur une fraise (Drouin, 2020).....	10
1.4 Fruits rendus difformes suite à l'alimentation de <i>L. lineolaris</i> : poivrons verts (a), fraises (b) et (c).....	11
1.5 Classification des substances sémiochimiques.....	14
1.6 Connexion de l'électrode à l'antenne pour une expérience d'électroantennographie. La tête de l'insecte est excisée avec une lame de scalpel n° 11. Une première électrode est implantée dans la tête près de la base antennaire et une deuxième électrode est attachée à l'extrémité de l'antenne.....	33
1.7 Chromatogrammes GC-EAG (réponses antennaires des mâles de <i>L. lineolaris</i> , trace du haut) et GC-FID (trace du bas) à partir d'extraits de la GOM de femelles (A) et de mâles (B). (1) (<i>E</i>)-hex-2-éanal, (2) hexan-1-ol, (3) (<i>E</i>)-hex-2-énol, (4) butanoate d'hexyle, (5) butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle, (6) (<i>E</i>)-4-oxohex-2-éanal.....	37
1.8 Chromatogrammes GC-EAG (réponses antennaires des mâles de <i>L. lineolaris</i> , trace du haut) et GC-FID (trace du bas) à partir d'aérations de femelles (A) et de mâles (B). (1) (<i>E</i>)-hex-2-éanal, (2) hexan-1-ol, (3) (<i>E</i>)-hex-2-	

énol, (4) butanoate d'hexyle (HB), (5) butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle (E2HB), (6) (<i>E</i>)-4-oxohex-2-éanal (4OH).....	38
1.9 Olfactomètre à deux voies, dit en « Y » pour observer le choix des insectes (Biasazin <i>et al.</i> , 2018).....	40
1.10 Comparaison du nombre total de captures de punaises mâles avec différents mélanges de sémiochimiques (N) représente la durée en jours de chaque test.....	48
2.1 Séparation du filtre à cigarette d'un diffuseur de phéromones.....	56
2.2 Dispositif d'aération contrôlée au laboratoire, a) filtre de charbon actif ; b) diffuseur de phéromones ; c) cartouche de charbon activé pour capter les volatiles ; (d) tuyau vers la pompe, en poussée.....	58
2.3 Piège collant, comportant un diffuseur de phéromone sexuelle synthétique, installé dans un champ de culture fraisière.....	60
2.4 Disposition des pièges à phéromones. Un site consistait en une surface agricole divisée en 3 sections, soit le centre du champ, la bordure du champ et le milieu naturel à côté du champ. Chaque section comportait un exemplaire de chacun des quatre types de pièges mentionnés	61
3.1 Synthèse du butanoate d'(<i>E</i>)-hex-2-ényle. Rendement moyen du 90%......	64
3.2 Synthèse de l'(<i>E</i>)-4-oxohex-2-éanal, Rendement moyen du 60%.	65
3.3 Spectre RMN ¹ H du composé E2HB purifié	65
3.4 Spectre RMN ¹ H du composé 4OH purifié.	66
3.5 Synthèse du (<i>Z</i>)-4-oxohex-2-éanal	67
3.6 Spectre RMN du proton ¹ H de l'isomère (<i>Z</i>)-4-oxo-2-hexéanal brut. Sur le spectre, on observe les valeurs typiques de constante de couplage J ₃ , soit 10,2 Hz pour les alcènes de géométrie <i>Z</i>	68

3.7 Boîte de 60 diffuseurs de la phéromone sexuelle. Chaque diffuseur a été fabriqué à partir d'un embout de pipette en polypropylène de 1 mL contenant un filtre à cigarette en acétate de cellulose ensuite fermé avec un bouchon en liège	69
3.8 Chromatogramme d'un diffuseur extrait immédiatement après sa préparation. Mode SIM : ion 105 <i>m/z</i> : benzoate d'éthyle (étalon interne) (a) ; ion 84 <i>m/z</i> : HB (b) ; ion 82 <i>m/z</i> : E2HB (c) ; ion 83 <i>m/z</i> : 4OH (d)	72
3.9 Courbe d'étalonnage en GC-MS, mode SIM, pour les extractions du contenu des diffuseurs. Ratios des surfaces, par rapport à l'étalon interne benzoate d'éthyle, de HB (a), de E2HB (b) et de 4OH (c)	74
3.10 Courbe d'étalonnage en GC-MS, mode SIM, pour les aérations des diffuseurs au laboratoire. Ratios des surfaces, par rapport à l'étalon interne benzoate d'éthyle, de HB (a), de E2HB (b) et de 4OH (c)	80
3.11 Nombre total de captures de la punaise terne en fonction du type de piège, pour la saison 2018	84
3.12 Comparaison d'un piège à phéromones neuf (a) et après deux semaines d'utilisation (b)	85
3.13 Nombre total de captures de la punaise terne, en l'année 2018 et 2019-2020 confondues	87
3.14 Nombre de captures total de punaises ternes en fonction du sexe des individus et du type d'attractif, en 2019 et 2020 confondues	88
3.15 Nombre de captures total de la punaise ternes en fonction de l'espacement des pièges, en 2019 et 2020 confondues	89
3.16 Populations de punaises ternes observées par battage, en 2019 et 2020 confondues. Note : Les résultats affectés d'étiquettes différentes (a et b) sont statistiquement différents	90
3.17 Efficacité des pièges en fonction de l'emplacement, en 2019 et 2020 confondues. Note : Les résultats affectés d'étiquettes différentes (a et b) sont statistiquement différents. (ab) ne sont pas statistiquement différents	91

3.18 Nombre de captures total de punaises ternes mâles en fonction des attractifs utilisés et l'espacement des pièges, en 2019 et 2020, confondues.....	92
3.19 Nombre de captures total de punaises ternes femelles en fonction des attractifs utilisés et l'espacement des pièges, en 2019 et 2020, confondues	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Substances isolées par extraction d'individus <i>L. lineolaris</i> sacrifiés, glandes et insectes entiers.	22
1.2 Substances isolées par aération de punaises ternes, <i>L. lineolaris</i>	26
1.3 Les différentes molécules sémiochimiques décrites dans la littérature	30
1.4 Propriétés physico-chimiques des principaux sémiochimiques de <i>L. lineolaris</i>	32
1.5 Pièges utilisés dans les travaux précédents.....	44
2.1 Conditions météorologiques pendant les mois à l'étude de l'été 2019 et l'été 2020 à Mirabel, Québec..	62
3.1 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, immédiatement après leur fabrication (N=6).....	75
3.2 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, après la conservation au congélateur pendant 14 jours (N=6).....	76
3.3 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, après deux semaines d'utilisation sur le terrain (N=3).....	78
3.4 Quantification des substances volatiles libérées par des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, par aération au laboratoire pendant 18 heures (N=3).....	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

4OH	(<i>E</i>)-4-oxo-hex-2-éanal
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> , 2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-méthylphénol
CRAM	Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel.
CV	Coefficient de variation.
EAG	Électroantennographie.
E2HB	Butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle
GC-EAG	<i>Gas chromatography coupled with electroantennography</i> , Chromatographie en phase gazeuse couplée à de l'électroantennographie.
GC-FID	<i>Gas chromatography coupled with a flame ionisation detector</i> , Chromatographie en phase gazeuse couplée un détecteur à ionisation de flamme.
GC-MS	<i>Gas chromatography coupled with a mass spectrometer</i> , Chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectroscopie de masse.
GOM	Glande odorante métathoracique.
HB	Butanoate d'hexyle
LRT	<i>Likelihood ratio test</i> , test du rapport de vraisemblance.

pKa	Potentiel de la constante d'acidité.
RMN	Résonance magnétique nucléaire.
mCPBA	<i>meta-chloroperoxybenzoic acid</i> , acide 3-chloroperoxybenzoïque.

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITES

g	Gramme
h	Heure
L	Litre
m/z	Ratio masse sur charge
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
ng	Nanogramme
pg	Picogramme
α	Probabilité dans l'étude LRT

RÉSUMÉ

La punaise terne (*Lygus lineolaris*, Palisot de Beauvois) est un insecte ravageur de diverses cultures agricoles, causant de lourds dommages aux petits fruits, en particulier aux fraises. Ce projet porte sur l'utilisation d'une phéromone sexuelle comme leurre dans le piégeage permettant le dépistage ou le contrôle de cet insecte en culture fraisière. Il est connu que les femelles vierges de punaises ternes émettent des composés volatils qui attirent les mâles au moment de l'accouplement. Cette phéromone sexuelle est composée d'un mélange de substances, dont trois sont majoritaires selon des recherches antérieures. Il s'agit de deux esters (le butanoate d'hexyle, HB, et le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle, E2HB) et d'un aldéhyde (le (*E*)-4-oxohex-2-énal, 4OH). Dans ce contexte, une phéromone synthétique, constituée de ces trois composés a été préparée au laboratoire de chimie organique de l'Université du Québec à Montréal. Des diffuseurs ont été formulés avec cette phéromone (2 mg de HB, 5 mg de E2HB et 2,5 mg de 4OH) en solution dans de l'huile de tournesol contenant du BHT comme agent de conservation. La formulation visait une diffusion contrôlée dans l'air dans un but de dépistage. Le taux de libération des substances volatiles, à partir de diffuseurs neufs et usagés, a été évalué au laboratoire via des ventilations, captations et analyses par GC-MS. Consécutivement, durant l'été 2019 et l'été 2020, des pièges contenant des diffuseurs de phéromone ont été installés dans des cultures fraisières dans la région de Mirabel, Québec. Lors de chaque expérience, pendant trois mois, les pièges ont été ramassés et renouvelés, toutes les deux semaines. L'analyse du nombre de captures de mâles et de femelles, à la fin de cette période, a montré que la phéromone synthétique a réussi à piéger plus d'insectes (principalement des mâles) qu'un contrôle sans phéromone ou contenant d'autres types d'attractifs.

Mots clés : butanoate de (*E*)-hex-2-ényle, butanoate d'hexyle, chromatographie en phase gazeuse, diffuseurs de phéromone, *Lygus lineolaris*, (*E*)-4-oxohex-2-énal, phéromone sexuelle, pièges, punaise terne, spectrométrie de masse.

ABSTRACT

Tarnished plant bug (*Lygus lineolaris*, Palisot de Beauvois) is an insect pest for various agricultural crops, causing heavy damage to small fruits, especially strawberries. This project focuses on the use of a sex pheromone as a trapping lure, to detect or control this insect in strawberry crops. Virgin female tarnished plant bugs are known to emit volatile compounds that attract males upon mating. This sex pheromone is composed of a mixture of substances, three of which are predominant. According to previous research, these substances are: two esters (hexyl butyrate, HB, and *E*-2-hexenyl butyrate, E2HB) and an aldehyde (*E*-4-oxo-2-hexenal, 4OH). In this context, a synthetic pheromone made up of these three compounds was prepared in the organic chemistry laboratory of Université du Québec à Montréal. Additionally, some diffusers were formulated with the pheromone (2 mg HB, 5 mg E2HB and 2.5 mg 4OH) dissolved in sunflower oil containing BHT as a preservative. The formulation aimed a controlled diffusion in the air for screening purposes. Volatile substances release rates, from new and used diffusers, were evaluated in the laboratory via ventilation, adsorption and GC-MS analysis. Subsequently, during the summers of 2019 and 2020, pheromone traps were installed in strawberry fields in Mirabel, Quebec. Both summers, for three months, traps were collected and renewed, every two weeks. Numbers of capture (males and females) analysis at the end of this period, showed that the synthetic pheromone baited traps were able to catch more insects (especially males) than traps that were pheromone-free (control) or traps baited with other types of attractants.

Keywords : (*E*)-2-hexenyl butyrate, hexyl butyrate, *Lygus lineolaris*, (*E*)-4-oxo-2-hexenal, traps, pheromone diffusers, sex pheromone, tarnished plant bug.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les pesticides sont des substances utilisées pour lutter contre des organismes considérés comme indésirables ou nuisibles. Ils sont généralement classés en grandes catégories en fonction de leur usage : les insecticides, les rodenticides, les herbicides et les fongicides. En agriculture, ils sont utilisés pour protéger les productions végétales et animales. Cependant, l'exposition aux pesticides peut affecter la santé des plantes sauvages et des animaux non visés, vivant à proximité des cultures : des insectes, des oiseaux, des organismes aquatiques, des batraciens, des mammifères, etc. Non seulement, plusieurs pesticides de synthèse sont une menace à la biodiversité des écosystèmes, mais ils ont des impacts négatifs sur les populations d'organismes qui sont utiles à l'agriculture, tels que les vers de terre et les insectes pollinisateurs, pour ne nommer que ceux-là. De plus, les pesticides de synthèse présentent un potentiel danger pour la santé des êtres humains, tel que la bioaccumulation d'insecticides organochlorés observée dans des échantillons de plasma humain et dans les tissus adipeux (Minh *et al.*, 2006). De façon plus criante, aux États-Unis, plusieurs cas de toxicité modérée et aiguë, allant jusqu'à la mort, causées par la surutilisation des insecticides pyréthrinoïdes ont été rapportés durant les années 2000. Pour rappel, ces insecticides sont communément utilisés contre la punaise de lit, *Cimex lectularius* (Control et Prevention, 2011). En outre, les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme de différentes façons: contact cutané, inhalation par les voies respiratoires, et surtout, par l'exposition orale dans notre alimentation (MSSS, 2020).

Face à l'utilisation intensive des pesticides synthétiques, des alternatives existent et méritent d'être développées. Des méthodes dites biologiques exploitent des mécanismes relevant de l'écologie, telles que la sélection de cultures moins sensibles aux intempéries, aux maladies (bactériennes et fongiques), à la compétition des mauvaises herbes ou encore, qui sont moins appréciées des ravageurs par exemple (Wolfe, 2000). Également, le compagnonnage entre différentes espèces culturales permet parfois de repousser certains ravageur, d'optimiser l'absorption de nutriments ou encore d'attirer des insectes pollinisateurs et ainsi accroître la fécondité et la diversité (Ries *et al.*, 2001). Également, les méthodes de lutte biologique incluent l'utilisation et la promotion d'espèces prédatrices et parasites qui s'en prennent aux insectes ravageurs (Morrison et Lindell, 2012). Dans certaines cultures à petite échelle, on peut bien penser à l'enlèvement manuel des espèces non désirées (plantes adventices et insectes ravageurs), mais force est de constater qu'à moyenne et grande échelle, les couts de main-d'œuvre sont prohibitifs de cette approche ancestrale (Hatfield, P. et Pinter Jr, 1993).

Le projet actuel, visant à améliorer des pièges à insectes en utilisant des attractifs odorants, s'inscrit dans la philosophie des méthodes biologiques, en contribuant à diminuer l'utilisation d'insecticides synthétiques. Le piégeage des insectes à haute capacité, ou piégeage de masse, vise à diminuer de façon tangible la population d'une espèce en particulier (El-Sayed *et al.*, 2006). Cette méthode a rarement fait ses preuves en système ouvert, car elle peut contribuer à causer des zones très attractives pour les insectes des alentours, des « *hot spots* » risquant de concentrer les ravageurs près des diffuseurs d'odeurs (Bracalini *et al.*, 2021). Par contre, en milieu fermé, tel que dans des serres, le piégeage de masse est prometteur car il y a peu de chances d'attirer des insectes de l'extérieur des serres, munies de sas, de filtration de l'air, etc. (Phillips, 2006). Mais outre le piégeage de masse, les attractifs odorants peuvent

s'avérer utiles pour détecter des insectes d'une espèce particulière dès les balbutiements d'une nouvelle infestation, ce qui permet à l'exploitant (l'agriculteur) de poser des actions (régie biologique ou synthétique) juste à temps. Cette façon de faire, comparée aux traitements systématiques prophylactiques (en prévision d'infestations probables mais non avérées), permettrait de réduire considérablement la quantité totale et la fréquence des traitements phytosanitaires (Phillips, 2006).

L'écologie chimique est l'étude des mécanismes chimiques impliqués dans les interactions, intraspécifiques et interspécifiques, entre les êtres vivants. On pense que tous les organismes utilisent des signaux chimiques pour transmettre de l'information et le « langage chimique » est une des plus anciennes formes de ce transfert d'information. La recherche dans le domaine de l'écologie chimique vise l'identification et la synthèse des substances porteuses de ces informations. Elle s'intéresse à l'élucidation des systèmes récepteurs et de transduction qui reconnaissent et transmettent ces messages, qui prennent la forme de « substances chémiochimiques ». Enfin, elle étudie les conséquences comportementales, développementales, et écologiques des signaux chimiques (International Society of Chemical Ecology, 2020). Une connaissance de l'écologie chimique permet alors une meilleure compréhension des écosystèmes et peut aider à relever les défis majeurs liés à la lutte biologique contre les insectes ravageurs en milieu agricole. Dans le contexte plus large de l'amélioration des connaissances directement utiles aux humains, l'étude des plantes et des insectes profite au domaine agricole, un important secteur de l'économie. Si d'emblée, quand on pense à l'agriculture, ce sont les volumes considérables de céréales et de légumineuses qui nous viennent à l'esprit, on doit reconnaître que la culture d'un petit fruit comme la fraise a une importance économique non négligeable, entre autres dans l'économie du Québec. Selon le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ),

la fraise est le petit fruit le plus vendu au Québec (MAPAQ, 2020; Ministère de l'Agriculture, 2020). Ce petit fruit sucré ne plaît pas seulement aux humains mais aussi à quelques espèces d'insectes qui peuvent avoir un impact économique négatif sur le rendement des fermes fraisières, via des dommages causés aux plants ou spécifiquement aux fruits, diminuant ainsi leur valeur commerciale.

Dans le présent travail de recherche, l'attention a été portée à un des insectes les plus nuisibles dans de nombreuses cultures végétales, incluant celle des fraises (MAPAQ, 2020). En effet, la punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) est un insecte ravageur de diverses cultures agricoles, causant de lourds dommages aux petits fruits, en particulier aux fraises (Ministère de l'Agriculture, 2020). Il est reconnu que *Lygus lineolaris* est répandue partout en Amérique du Nord, de l'Alaska au sud du Mexique (Tingey et Pillimer, 1977).

À présent, les substances sémiochimiques émises par les insectes jouent un rôle clé pour l'essor des nouvelles méthodes de lutte biologique contre les insectes ravageurs. Ces substances sont utilisées pour détecter et lutter contre les insectes ravageurs grâce aux tactiques suivantes : la détection des espèces envahissantes et la délimitation de leur progression, le suivi des populations d'espèces endémiques pour synchroniser le calendrier des traitements insecticides, ainsi que l'évaluation de l'efficacité des tactiques de lutte antiparasitaire grâce à une évaluation post-application. Également, la réduction de la population de ravageurs peut être accomplie en utilisant des substances sémiochimiques au sein d'un traitement phytosanitaire proprement dit, par exemple par les techniques de perturbation de l'accouplement (aussi appelée

confusion sexuelle), d'attraction et destruction, de piégeage de masse ainsi que de répulsion (El-Shafie et Faleiro, 2017) . (Figure 0.1).

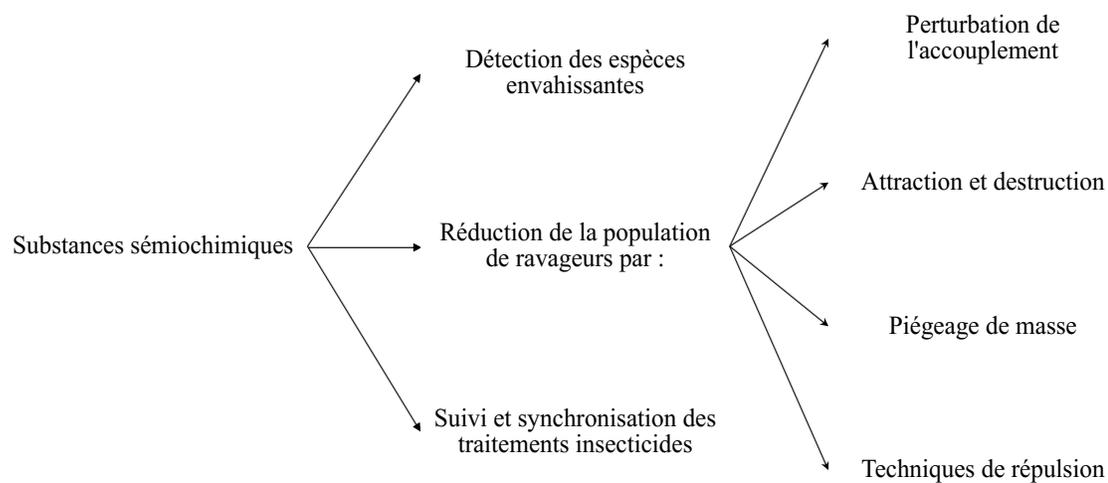


Figure 0.1 Les utilisations potentielles de substances sémiocchimiques dans la lutte contre les insectes ravageurs.

Le véritable défi de l'agriculture moderne et responsable est, à notre avis, de favoriser de nouvelles méthodes de production qui seront durables et en équilibre avec l'écosystème. Pour être largement adoptées, ces nouvelles méthodes devront répondre aux impératifs d'efficacité et de sécurité d'implémentation avant la mise en place, ces questions nécessitant présentement des efforts en recherche et développement. L'actuel projet de recherche participe de ces efforts. En effet, les substances constituant une phéromone sexuelle, par exemple, sont spécifiques (uniques pour une espèce) et relativement inoffensives dans l'environnement (El-Shafie et Faleiro, 2017). Ces avantages, par rapport aux pesticides synthétiques contre les insectes ravageurs, font des pièges appâtés avec des phéromones, des outils prometteurs pour

la gestion des infestations dans les entreprises agricoles, en particulier dans les systèmes de culture biologique.

Notre recherche vise à tester l'hypothèse selon laquelle des pièges, appâtés avec des diffuseurs libérant des substances mimant la phéromone sexuelle émise par des punaises ternes femelles, seront efficace pour capturer des punaises mâles lorsque installés dans des champs de culture fraisière.

Afin de tester cette hypothèse, des travaux de recherche ont été menés grâce à une collaboration entre l'Université du Québec à Montréal (UQAM) et le Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel (CRAM). Au laboratoire du professeur Chapdelaine au département de chimie de l'UQAM, les composés rapportés dans la littérature comme faisant partie de la phéromone sexuelle de la punaise terne (butanoate d'hexyle, butanoate de (*E*)-hex-2-ényle et (*E*)-4-oxohex-2-éanal) ont été soit achetés, soit synthétisés, puis formulés en solution et ensuite, placés dans des diffuseurs faits maison. Ensuite, ces diffuseurs ont été évalués quant à leur capacité et leur durabilité à émettre les composantes de la phéromone. Enfin, avec le CRAM, des pièges collants intégrant les diffuseurs de phéromone ont été installés dans des champs de culture de fraises dans la région de Mirabel pendant tout l'été 2019 et l'été 2020. Ces pièges ont été remplacés et analysés à toutes les deux semaines afin de compter les punaises ternes, mâles et femelles, qui ont été capturées. L'efficacité des attractifs a été évaluée en comparant le nombre d'insectes capturés dans les pièges appâtés, avec des pièges témoin (sans attractifs) ou encore, comportant d'autres types d'attractifs odorants.

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, l'actuelle situation agricole liée à la culture des fraises au Québec sera d'abord introduite. Ensuite, la morphologie de la punaise terne, *Lygus lineolaris* et son impact comme ravageur en Amérique du Nord seront décrits. Par la suite, les substances sémiocchimiques en général seront définies et leurs caractéristiques clés dans l'essor des nouvelles méthodes de lutte biologique, seront expliquées. Ensuite, un bilan des recherches antérieures concernant la phéromone sexuelle de *L. lineolaris* en particulier, sera dressé. Cela inclut l'identification des substances principales de la phéromone par différents auteurs, dans différents contextes et avec différentes limitations technologiques. Également, des expérimentations sur le terrain, utilisant des pièges contenant des phéromones synthétiques (différentes compositions) dans le piégeage des punaises ternes (et espèces apparentées) seront résumées.

1.1 La punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois)

La punaise terne, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) est un insecte de l'ordre des hémiptères, sous-ordre des hétéroptères, famille des miridés. (Figure 1.1) Ravageur polyphage, il se nourrit d'une large variété de graines, de légumes, de fruits, de fleurs ornementales et de plantes fourragères. Selon Young, cet insecte peut se nourrir de plus de 300 espèces végétales (Young, 1986). Depuis un demi-siècle, il est reconnu que *L. lineolaris* est présent dans toutes les provinces canadiennes, aux États-Unis et dans la plupart des états du Mexique (Kelton, 1975). En fait, plus de la moitié des

espèces de plantes cultivées aux États-Unis sont répertoriées comme des plantes hôtes de la punaise terne (Capinera, 2020).



Figure 1.1 Punaise terne, *Lygus lineolaris* adulte. (MAPAQ, 2020).

Au point de vue morphologique, le mâle adulte mesure 5 à 6 mm de long, avec une largeur de 2,4 à 3 mm. La femelle adulte est de taille similaire. Le pronotum (face dorsale du prothorax) est jaunâtre à brun rougeâtre, les angles antérieurs étant arrondis. (Figure 1.2) Le mésoscutum (face dorsale du mésothorax) est de couleur noire avec les zones latérales pâles ou rougeâtres. Les hémélytres (ailes antérieures) sont brun rougeâtre, avec une pubescence modérément longue, dense et jaunâtre. Les antennes et les pattes sont relativement longues. Les adultes ayant hiverné (nés l'été précédent) sont de couleur beaucoup plus foncée que les adultes nés durant l'été en cours (Kelton, 1975).

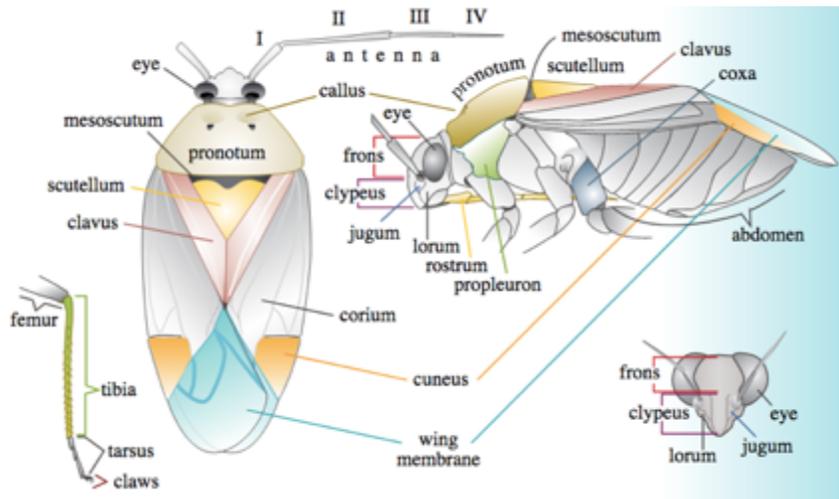


Figure 1.2 Caractéristiques morphologiques de *Lygus lineolaris* (Mueller, 2003).

1.2 Mode d'alimentation de la punaise terne et dommages causés aux plantes, dont les fraises de culture

Les punaises sont des insectes suceurs et pour se nourrir, elles procèdent en différentes étapes. D'abord, l'insecte se positionne sur l'hôte (fraisier par exemple), effectuant un repérage de la zone de meilleure qualité de nourriture, notamment sur la base d'un bouton floral ou sur les graines (Fleury *et al.*, 2003), qu'elle localise par des sondages à l'aide de ses antennes. Ensuite, l'insecte effectue des frappements rythmés sur l'hôte avec ses antennes. Par la suite, on observe l'insertion de l'organe suceur, le stylet, suivi par l'injection de salive dans le tissu de la plante. Enfin, grâce à l'action digestive des enzymes injectées, l'insecte peut ingérer, par succion toujours avec son stylet, la nourriture liquéfiée (Hatfield, L. *et al.*, 1983). On peut apprécier les dimensions d'une punaise terne sur une fraise dans la figure 1.3.



Figure 1.3 Adultes *Lygus lineolaris* sur une fraise (Drouin, 2020).

Les dommages potentiels à la plante, causés par l'alimentation de *L. lineolaris*, sont nombreux. D'une part, la blessure laissée par la punaise à l'hôte procure une porte d'entrée pour des organismes pathogènes. D'autre part, la salive contient des enzymes digestives de type lipase, protéase et amylase, pour faciliter la digestion des lipides, des protéines et des glucides respectivement, des tissus de la plante hôte, ce qui cause des dommages permanents à ces tissus (Schaefer et Panizzi, 2000) (Agustí et Cohen, 2000). De façon générale, l'alimentation de la punaise terne peut provoquer chez la plante hôte : malformation des fruits, croissance anormale, nécrose, abscission des structures fructifères, production de graines ratatinées ou sans embryon (Tingey et Pillimer, 1977). Du point de vue économique, outre que l'agression de la punaise

terne en alimentation prive la plante d'une partie de ses nutriments, les dommages que ces insectes infligent aux plantes résultent aussi en des malformations des fruits, qui les rendent peu attrayants et par là, non commercialisables (Layton, 2000). Les dommages économiques dans la culture des fruits et des légumes découlent la plupart du temps des déformations sévères lors de la croissance des fruits qui ont été attaqués à un stade précoce, tel qu'on peut en voir des exemples à la figure 1.4.



Figure 1.4 Fruits rendus difformes suite à l'alimentation de *L. lineolaris* : poivrons verts (a) et fraises (b) et (c).

Comme vu précédemment, parmi les plantes les plus endommagées par la présence de *L. lineolaris*, on distingue la fraise (Ministère de l'Agriculture, 2020). Malheureusement pour les producteurs de fraises, les déformations des fruits (*cat-faced strawberries*, fraises « à face de chat »), suite à l'alimentation de la punaise terne, anéantissent leur valeur commerciale. Il en résulte une pression énorme en faveur de l'utilisation de pesticides de synthèse afin de préserver les fruits contre ce minuscule, mais redoutable, ravageur que représente la punaise terne. Selon le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ, 2020), en 2015, la consommation de fraises était estimée à 8,5 millions de tonnes dans le monde. Dans l'intervalle 2007 à 2015, elle avait connu une croissance annuelle moyenne de 4,6 %. La Chine est le premier pays consommateur de fraises (39 % de la consommation mondiale), suivie des États-Unis (15 %) et du Mexique (5 %) (MAPAQ, 2020). Plus près de nous, la fraise est le petit fruit le plus vendu au Québec ; en effet, la consommation totale de fraises y aurait atteint 34 318 tonnes de fraises en 2017 (MAPAQ, 2020).

Parmi plusieurs espèces de punaises du genre *Lygus*, certaines ont un impact économique négatif important dans l'hémisphère nord, avec des différences régionales. Si *Lygus hesperus* (Knight) est le plus abondant dans l'ouest de l'Amérique du Nord, c'est *Lygus lineolaris* qui est le plus important de l'est de notre sous-continent (Clancy et Pierce, 1966), (Kelton, 1975). Par exemple, en Californie, *L. hesperus* est probablement l'espèce dominante, suivie de *Lygus elisus* (Van Duzee), tandis que *L. lineolaris* y est rarement trouvée (Mueller, 2003). Les trois espèces sont présentes en Arizona, *L. hesperus* étant l'espèce la plus commune dans la luzerne (*Medicago sativa* L.), tandis que les trois espèces se trouvent dans les moutardes du genre *Lesquerella* (Gis) et autres plantes oléagineuses de la famille des *Brassicaceae* (Blackmer et Byers, 2009). Les trois espèces sont des ravageurs polyphages de nombreuses cultures, y compris le coton, les fraises, la luzerne, les pommes et les poires (Patana, 1985); (Scott, 1977); (Young, 1986) ; (Byers *et al.*, 2013). En somme,

au Québec et en Ontario, il est reconnu que l'espèce de loin la plus abondante et qui a un impact économique néfaste, est *L. lineolaris* (Ferguson *et al.*, 2016).

1.3 Phéromones sexuelles et autres substances sémiachimiques utilisées par les insectes

Depuis une quarantaine d'années, des travaux en entomologie et en écologie chimique ont permis de comprendre l'importance de l'utilisation des molécules sémiachimiques dans le domaine de la lutte aux ravageurs des cultures, non seulement comme un moyen de contrôle, mais aussi comme une méthode de dépistage couplée aux méthodes actuelles (El-Shafie et Faleiro, 2017). Tout d'abord, il convient de définir ce que sont les substances sémiachimiques et leurs multiples rôles dans la communication des organismes vivants. Il est reconnu que plusieurs espèces animales, incluant les insectes, communiquent entre eux notamment en utilisant des molécules odorantes. Autrement dit, des substances produites par un organisme vont, lorsque perçues par un autre organisme, déclencher une perception et normalement, une réponse chez ce dernier. Ces substances sémiachimiques, que certains nomment écomones, sont donc des médiateurs de communications entre individus. Elles sont généralement classées en deux grandes catégories : les phéromones et les substances allélochimiques. D'une part, les phéromones possèdent une action intraspécifique, entre individus d'une même espèce. D'autre part, les substances allélochimiques sont de substances d'action interspécifique, donc entre individus d'espèces différentes. (Brossut, 1996)

Les substances allélochimiques, aussi appelées ectomones, sont normalement classées en trois groupes, en fonction de l'organisme à qui profite la réception du signal : les allomones, les kairomones et les synomones. Les allomones ne sont bénéfiques qu'à l'organisme émetteur. (Figure 1.5) Par exemple, certains insectes, comme *L. hesperus* (Byers, 2006), émettent des substances irritantes, et même toxiques, pour se prémunir

d'une attaque par des organismes ennemis, tels que les fourmis (Whitman *et al.*, 1990). En comparaison, les kairomones procurent un avantage uniquement à l'organisme récepteur. Par exemple, certains insectes herbivores, guidés par les substances volatiles émises par des plantes, sont capables de les trouver plus facilement pour s'en nourrir (Matsui *et al.*, 2012). Finalement, les synomones sont favorables, à la fois à l'émetteur et au récepteur. Par exemple, les substances volatiles odorantes émises par les fleurs attirent les abeilles, ce qui profite à ces dernières qui se nourrissent du pollen et du nectar, en même temps que la plante profite de ces visites qui favorisent la pollinisation croisée et donc, augmentent la fertilité de celle-ci.

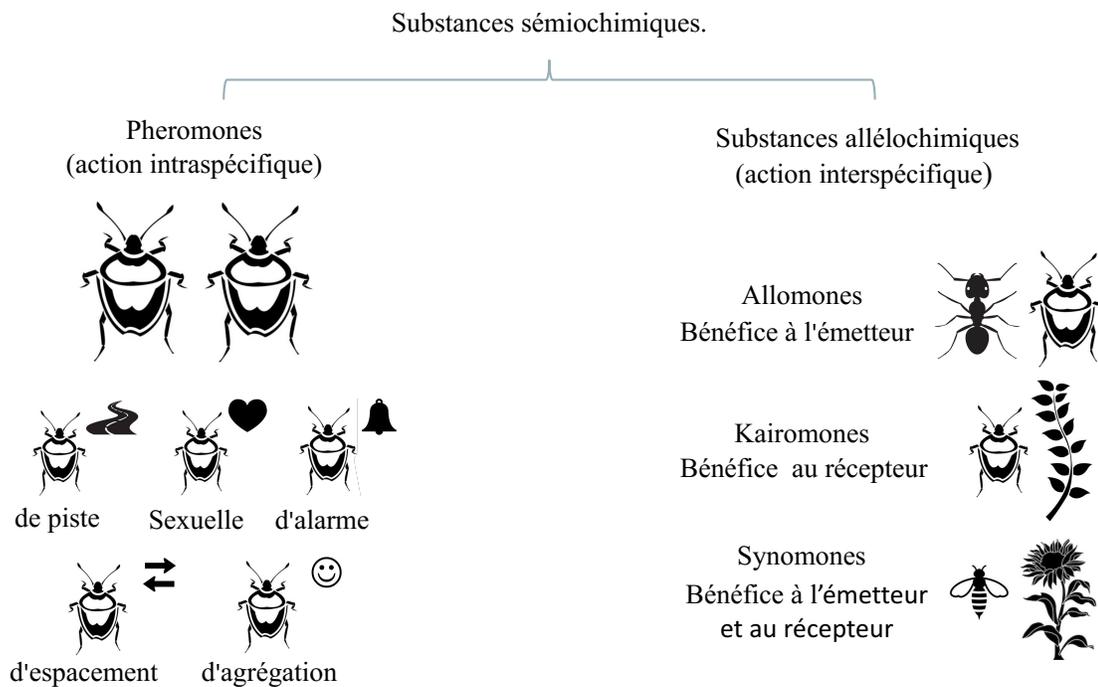


Figure 1.5 Classification des substances sémiochimiques.

Les phéromones, qui servent de message chimique entre individus d'une même espèce, peuvent avoir des rôles très variés, probablement aussi nombreux que les types d'interactions entre individus. Ce nombre peut être faible pour des insectes plutôt solitaires, mais plus élevé chez les insectes grégaires, particulièrement au sein des insectes dits sociaux, tels que les fourmis, les termites et les abeilles, par exemple. En outre, une phéromone est classifiée en fonction de son rôle, cette classification étant basée sur la réponse spécifique comportementale entre le récepteur et l'émetteur. Les principales phéromones qui ont été décrites sont les phéromones sexuelles, d'agrégation, de piste, d'espacement et d'alarme (Durieux *et al.*, 2010).

En particulier, les phéromones sexuelles sont normalement émises par les femelles pour indiquer leur disponibilité pour être fécondées et il est important de mentionner que les mâles sont attirés par ces phéromones, tandis que les femelles ne le sont pas. C'est ce qu'on appelle une forme de dimorphisme sexuel. Comme exemple célèbre de phéromone sexuelle, on trouve la substance nommée bombykol ((*E,Z*)-10,12-hexadécadiénol), utilisée par les femelles de l'espèce *Bombyx mori* pour attirer les mâles. Cette première phéromone caractérisée chimiquement a été décrite et synthétisée par le chimiste allemand Adolf Butenandt il y a une soixantaine d'années seulement (Butenandt *et al.*, 1961).

Les phéromones d'agrégation sont émises par les mâles et/ou par les femelles pour réunir des individus, mâles et femelles, sans distinction. Parmi les insectes sociaux, ces phéromones permettraient de maintenir la structure d'une colonie (Wyatt, 2003). Souvent, cette phéromone est émise par un individu ayant trouvé un site d'alimentation et elle attire d'autres individus (tous sexes confondus) de la même espèce. Le site devient un lieu d'alimentation, aussi éventuellement d'accouplement et de ponte, pour une colonie d'insectes. Par exemple, la complexe organisation de la société des abeilles mellifères prévoit de nombreuses activités coordonnées parmi ses trois types adultes (la reine, les ouvrières et les mâles) et a donc besoin d'un moyen de

communication dynamique entre les membres de la colonie. Les phéromones d'agrégation sont le facteur clé pour maintenir ces interactions (Bortolotti et Costa, 2014).

Les phéromones de piste, ou de trace, sont des substances utilisées par de nombreux insectes sociaux et ce, de façon remarquable chez les fourmis. Cela leur permet de tracer leur piste lorsqu'elles reviennent avec une ressource alimentaire: elles marquent leur itinéraire de retour à l'aide de la phéromone de trace, ce qui permet à leurs congénères de suivre la piste pour parvenir directement au site riche en aliments (Andryszak *et al.*, 1990).

Les phéromones épидéictiques, ou d'espacement, sont des substances que les femelles déposent au voisinage de leur site de ponte, ce qui rebute les autres femelles de la même espèce, les poussant à pondre leurs œufs ailleurs (Mignon, 1997).

D'autre part, les phéromones d'alarme sont des substances émises par des individus suite à la détection d'un danger, souvent une attaque de prédateur (Mizunami, 2010). Ce signal provoque chez les individus de son espèce (sexes confondus), soit la fuite tel qu'observé chez plusieurs espèces de pucerons, (Vandermoten *et al.*, 2012) soit l'attaque tel qu'observé chez la guêpe *Vespula squamosa* (Landolt *et al.*, 1999) (Payne *et al.*, 1988).

Ainsi, des pièges appâtés avec des phéromones sexuelles sont des outils importants pour détecter et surveiller de nombreux insectes nuisibles dans les sites d'agriculture (El-Sayed *et al.*, 2006). En particulier, cette stratégie pourrait être mise à profit dans le monitoring précoce d'une infestation par les punaises ternes. Cela permettrait d'établir le calendrier des mesures de lutte (biologique ou autre) contre les punaises au sein de cultures d'importance économique (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007). C'est ce qui fait l'objet principal du travail de recherche présenté dans ce mémoire.

Également, l'utilisation de la phéromone sexuelle de *L. lineolaris* pourrait s'inscrire dans des stratégies pour contrôler directement les populations de punaises ternes, soit via le piégeage de masse (plutôt limité aux milieux isolés, tels que des serres), soit via la perturbation de l'accouplement induite par la confusion sexuelle des mâles (Kakizaki, 2004). Cette dernière stratégie nécessiterait, par contre, de grandes quantités de la phéromone.

1.4 Substances volatiles isolées des punaises ternes.

Des études antérieures ont montré que les mâles de différentes espèces de *Lygus* sont attirés par des femelles *Lygus* lorsqu'elles sont exposées dans des cages, ce qui suggère l'existence d'une phéromone sexuelle (Graham, 1987). Par ailleurs, il a été observé expérimentalement que, comme de nombreux hétéroptères (Staddon, 1979), les adultes *L. lineolaris* produisent une odeur âcre lorsqu'ils sont dérangés (Blumenthal, 1978). Des substances volatiles, possiblement de nature différente de la phéromone sexuelle, pourraient alors aussi fonctionner comme allomone pour repousser les ennemis, comme phéromone d'alarme ou comme phéromone d'espacement (Aldrich, 1988); (Hislop et Prokopy, 1981). Blumenthal a observé que les composés libérés par des individus *L. lineolaris* agités provoquent des perturbations comportementales, telles que la mobilisation et la dispersion, parmi les conspécifiques. Les auteurs mentionnent qu'en cas d'exposition prolongée, ces substances volatiles ont causé des effets aussi délétères que la narcose et même la mort, si l'évasion n'est pas possible (Blumenthal, 1978).

Il semble donc clair que les punaises ternes émettent des substances volatiles dans diverses situations (femelles vierges prêtes à s'accoupler, individus mâles et/ou femelles agités) et que ces substances peuvent avoir des impacts variés sur le comportement des insectes (attraction des mâles, dispersion des individus). Il n'est pas clair si ce sont les mêmes composés qui sont en jeu dans ces différentes situations

et causant ces différents comportements. En fait, il est compliqué d'identifier avec exactitude les composés d'une phéromone et les événements déclencheurs de sa libération, même si plusieurs études ont été menées dans les 30 dernières années, en ce qui concerne la punaise terne.

1.4.1 Extraction de substances volatiles à partir de punaises ternes sacrifiées

On ne doit pas se surprendre que les recherches les plus anciennes pour déterminer la composition des substances odorantes dans les punaises ternes portaient sur des insectes sacrifiés, puis extraits avec un solvant organique. Historiquement, les appareillages étaient moins sensibles que de nos jours et c'était la façon la plus évidente pour isoler, ou du moins observer, ces composés volatils rares par chromatographie en phase gazeuse (GC). Ainsi, Gueldner et Parrott ont d'abord rapporté l'identification de composés volatils des punaises ternes, isolés par extraction avec du dichlorométhane et entraînement à la vapeur (Gueldner et Parrott, 1978). L'analyse par GC-MS a permis d'identifier une quinzaine de composés, la plupart étant des esters et la majorité du contenu (60-80 %), tel que vu par GC-FID, a été identifié comme étant le butanoate d'hexyle et le butanoate d'hexényle (isomère non spécifié). Une décennie plus tard, Aldrich et ses collaborateurs sont allés un peu plus loin en disséquant quelques individus pour extraire le contenu des glandes odorantes, identifiées au niveau du thorax (Aldrich *et al.*, 1988). Ils ont montré que les glandes des femelles (N = 1) et des mâles (N = 2) contenaient, en plus des 75-80 % de butanoates d'hexyle et de (*E*)-hex-2-ényle, également un composé identifié comme le 4-oxohex-2-éanal, présent à 20 % environ. Les auteurs ont rapporté également un apparent dimorphisme sexuel quant à la composition des esters, les mâles ne contenant pratiquement que l'ester saturé butanoate d'hexyle (HB, 75 % du total), tandis que la glande de femelle contenait, en plus de HB (49 % du total), également une quantité appréciable de l'ester insaturé butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB, 30 % du total). Noter que l'échantillon étant très petit, on peut penser qu'il

existe une incertitude importante quant aux compositions chimiques des glandes, relatées dans cette étude.

Il est maintenant bien reconnu que les composés odorants des insectes *Lygus* sont produits dans leur glande odorante métathoracique (GOM) (Zhang, Q.-H. et Aldrich, 2003). En effet, Zhang et Aldrich ont disséqué et extrait les GOM de punaises ternes, puis analysé ces extraits en GC-FID et GC-MS. Ils ont trouvé d'abord, que les femelles ($43 \pm 9 \mu\text{g/glande}$) semblent contenir une quantité légèrement plus élevée de substances volatiles que les mâles ($33 \pm 9 \mu\text{g/glande}$). (Voir tableau 1.1) Notons ici encore, que les petits échantillons analysés (3 individus de chaque sexe) expliquent l'incertitude relativement élevée sur les quantités du contenu des glandes. En ce qui concerne la composition, Zhang *et al.* ont trouvé que les substances majoritaires dans les extraits de la GOM des punaises des deux sexes étaient le butanoate d'hexyle (HB), le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB) et le (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH) (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007). D'autres composés ont bien été détectés, tels que l'hexanol, le (*E*)-hex-2-énol et le (*E*)-hex-2-éanal, mais ceux-ci comptaient pour seulement 5-10 % du total. Les chercheurs ont aussi noté un dimorphisme sexuel dans la composition des substances odorantes. Plus précisément, ils ont trouvé que les mâles contiennent, en moyenne, 73 % HB, 5 % E2HB et 18 % 4OH, tandis que les femelles contiennent ces composés dans le ratio 35 % HB, 35 % E2HB et 19 % 4OH. Autrement dit, les mâles contiennent majoritairement du HB et un peu de l'aldéhyde 4OH, tandis que les femelles contiennent des quantités équivalentes de HB et de E2HB, avec une portion appréciable de 4OH. Byers et al. (2013) ont aussi rapporté l'isolement et la caractérisation des substances volatiles à partir de punaises ternes (*L. lineolaris*) sacrifiées, via l'extraction non pas des glandes, mais bien des insectes entiers, dans de l'hexane. D'abord, il est permis de constater que, tout comme Zhang avait trouvé des quantités de l'ordre des microgrammes par glande, Byers a trouvé des quantités semblables à l'intérieur d'insectes complets. La plupart des auteurs s'entendent sur le fait que la glande odorante est le principal réservoir des substances

volatiles de la punaise terne et cela semble confirmé par les quantités rapportées par ces deux groupes de chercheurs. Tout comme Zhang, Byers a trouvé des quantités totales de substances volatiles en moyenne deux fois plus élevées chez la femelle (29 $\mu\text{g/insecte}$) que chez le mâle (17 $\mu\text{g/insecte}$). Si les deux sexes semblent contenir une quantité équivalente de l'aldéhyde 4OH (3 $\mu\text{g/insecte}$), c'est au niveau du ratio entre les esters saturé vs insaturé que le dimorphisme semble se situer. En effet, les mâles (N = 10) contiennent majoritairement l'ester saturé HB (13 $\mu\text{g/insecte}$) et dix fois moins de E2HB (1,5 $\mu\text{g/insecte}$), tandis que les femelles (N = 10) contiennent majoritairement l'ester insaturé E2HB (20 $\mu\text{g/insecte}$) et trois fois moins de HB (6 $\mu\text{g/insecte}$) (Voir tableau 1.1) (Byers *et al.*, 2013).

Ho et Millar, qui ont travaillé avec l'espèce apparentée *L. hesperus*, ont réalisé l'analyse relative du contenu en substances volatiles des extraits de glandes odorantes métathoraciques (GOM) d'une part, ainsi que de la macération d'insectes entiers, d'autre part. Ils ont été capables d'identifier 17 substances chémiochimiques dont HB, E2HB, 4OH, hexanol et (*E*)-hex-2-énal étaient les plus abondantes. De même, ils ont trouvé que les quantités de HB, de E2HB, d'(*E*)-hex-2-énal, et d'hexanol étaient similaires dans les extraits des GOM, des mâles et femelles (Ho et Millar, 2002) . Il semble que les glandes des espèces congénères *L. lineolaris* et *L. hesperus* contiennent sensiblement les mêmes composés, mais dans des ratios différents, ce qui est plutôt logique, car chaque espèce peut posséder ses propres signaux chimiques. Des espèces vivant dans un même environnement ont même avantage à posséder leurs propres phéromones sexuelles, ce qui évite des tentatives d'accouplement stériles entre espèces. Également, il faut admettre que même pour une espèce donnée, étant donné les faibles quantités de substances impliquées, ainsi que la variabilité entre différents individus (âge exact, alimentation, comportement, etc.), il est difficile de connaître précisément les quantités de chaque composé, d'où la grande variabilité dans les résultats de la littérature.

De façon encore plus importante, les quantités présentes dans les glandes odorantes des *Lygus* ne sont pas nécessairement liées aux quantités qui sont émises par les insectes, car un insecte ne vide pas nécessairement sa glande instantanément lors de l'émission d'un message chimique. Également, peut-être qu'il existe des disparités en termes des proportions de composés présents dans les glandes vs ce qui est émis dans un signal, car il est possible qu'un ou des composés soient produits « à la demande » juste au moment de l'émission du signal. Pour ces différentes raisons, il est plus réaliste, même si les quantités en jeu sont bien plus faibles, d'étudier les composés qui sont émis dans un contexte comportemental donné, tel que l'appel à l'accouplement ou la perception d'un danger quelconque, par exemple. De telles expériences, impliquant un processus d'aération et de captation, ont été relevées aussi dans la littérature.

Enfin, le commun dénominateur qui ressort des expériences d'extractions d'insectes sacrifiés de Zhang, Byers, Ho et Millar, est la présence prédominante des composés HB, E2HB et 4OH.

Tableau 1.1 Substances isolées par extraction d'individus *L. lineolaris* sacrifiés, glandes et insectes entiers.

Source (référence)	Sexe (N)	<i>(E)</i> -hex- 2-énal	Hexan- 1-ol	<i>(E)</i> - hex-2- énol	Butanoate d'hexyle	Butanoate de <i>(E)</i> -hex- 2-ényle	<i>(E)</i> -4- oxohex- 2-énal
Glande odorante métathoracique (Zhang <i>et al.</i> , 2007)	♂ (3)	0,76	0,76	0,03	24,02	1,52	5,91
	♀ (3)	1,68	1,81	1,30	14,90	15,47	8,04
Insecte entier (Byers <i>et al.</i> , 2013)	♂ (10)	0,02	ND	ND	13,00	1,52	2,88
	♀ (10)	0,10	ND	ND	5,90	19,80	3,20

1.4.2 Captation de substances volatiles par aération de punaises ternes en alimentation.

Il est évident que la quantité de substances présentes dans les extraits de glandes odorantes excisées nous informe peu sur le taux d'émission que les insectes libèrent dans l'environnement. (Byers *et al.*, 2013); (Zhang, Q.-H. et Aldrich, 2003); (Wardle *et al.*, 2003); (Fountain *et al.*, 2014). De plus, la composition des substances émises par les punaises pourrait être différente de celle qui se trouve dans les glandes, si un ou des composés étaient produits à la demande, par exemple. Il est donc apparu nécessaire de capter les composés volatils émis par des insectes dans des conditions contrôlées, pour les identifier et quantifier. La captation des composés volatils au laboratoire doit se faire dans des conditions environnementales et d'alimentation mimant le milieu naturel pour obtenir des résultats fidèles au comportement normal des punaises.

Il y a plus d'une trentaine d'années déjà, Aldrich et ses collaborateurs (1988) effectuaient des expériences d'isolement de phéromones par la captation de volatiles. Ils ont rapporté avoir effectué des captations des substances volatiles des punaises ternes (*L. lineolaris*) via aération d'individus sauvages, d'âge et de statut d'accouplement inconnus, par groupes de 65-80 individus du même sexe, par essai. Étonnamment, contrairement à ce qu'ils avaient observé par dissection des glandes, les auteurs ont trouvé très peu de (*E*)-4-oxohex-2-éanal (1-2 %), peu importe le sexe des insectes. Par ailleurs, les esters butanoates saturés vs insaturés se sont avérés majoritaires, et leurs proportions largement différentes d'un sexe à l'autre. De façon plutôt conforme aux ratios observés, le butanoate d'hexyle (HB) était largement majoritaire dans les émissions des mâles (73 %) tandis que E2HB en était presque absent, avec seulement 4 %. Chez la femelle, les taux de HB et E2HB trouvés étaient plutôt équivalents, à 33 % et 42 %. Le reste des composés captés (20-24 %) lors des aérations étaient des aldéhydes et des alcools à chaîne linéaire de 6 carbones, sans que les auteurs n'en fournissent le détail (Aldrich *et al.*, 1988). Même si les travaux d'Aldrich et ses collaborateurs posaient les bases des connaissances des chémiochimiques de la punaise terne, les limitations technologiques analytiques de l'époque n'ont pas permis leur caractérisation et ni leur quantification avec une plus grande précision. Leurs travaux informent sur la composition majoritaire des substances émises lors d'aérations d'insectes, mais ils ne donnent pas de détails sur les stimuli utilisés lors de la prise des échantillons, ni sur l'identité des composés trouvés en minorité.

Un facteur important à considérer est aussi le contrôle des stimuli « sociaux » lors de l'aération et la captation des volatiles émis par les punaises ternes. Wardle et ses collaborateurs ont à cet effet réalisé l'aération de punaises ternes en comparant des conditions calmes d'une part, et contrariées par la surpopulation, d'autre part. (Wardle *et al.*, 2003) Les auteurs ont pris soins d'utiliser dans leur étude, des jeunes mâles et femelles de *L. lineolaris* d'élevage, qui ont été séparés avant l'âge adulte

pour conserver leur virginité. Les insectes en conditions « calmes » étaient limités à un nombre de dix individus du même sexe, placés dans un espace où ils pouvaient s'éloigner les uns des autres à leur guise, tandis que les individus « contrariés » étaient au nombre de 50 individus, placés dans un espace plus restreint. Les auteurs ont trouvé que les six composés principaux dans les aérations des mâles et des femelles étaient : le (*E*)-hex-2-éanal, l'hexan-1-ol, le (*E*)-hex-2-énol, le butanoate d'hexyle (HB), le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB) et le (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH). Tout d'abord, les auteurs ont mis en évidence que les insectes contrariés émettaient des quantités totales considérablement plus élevées que des individus calmes, de l'ordre de 150 fois plus pour les mâles et de 300 fois plus pour les femelles. Les chercheurs voulaient mettre en évidence que, lorsqu'agitées, les punaises émettent des composés susceptibles d'éloigner les conspécifiques, composés qui seraient donc des phéromones d'espacement ou même, d'alarme. Ce qui nous intéresse davantage ici, dans un contexte de phéromone sexuelle attractive, ce sont les substances émises par les individus calmes. Tout d'abord, Wardle *et al.* ont observé que, dans ces conditions favorisées par une faible densité d'individus, les mâles émettaient au total, un peu plus de composés volatiles identifiés (200 ng/h/individu) que les femelles (130 ng/h/individu). Ensuite, ils ont montré des différences importantes en composition selon le sexe. En effet, les mâles émettent surtout du HB (88 %), tandis que E2HB et 4OH ne représentent que 4 et 7 % des aérations. En comparaison, les femelles émettent aussi HB de façon majoritaire (66 %), mais avec une quantité appréciable de E2HB (18 %), avec un peu de 4OH (5 %), le reste étant des alcools et des aldéhydes à chaîne linéaire de 6 carbones (Tableau 1.2).

Zhang *et al.*, pour leur part, ont aussi réalisé des travaux d'aération et de captation de volatiles auprès de groupes, soit de dix mâles, soit de dix femelles *L. Lineolaris* qu'ils avaient capturés, dont l'âge et le statut reproductif étaient inconnus. Les auteurs ont effectué des expériences dans de chambres en verre d'un litre, contenant chacune cinq haricots verts frais et une bouteille d'eau, pour éviter un état de faim et de

dessiccation chez les insectes. La quantification des composés en GC suggère que les femelles libèrent un peu plus de composés volatiles ($2,0 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{jour}/\text{individu}$; $n = 5$) que les mâles ($0,9 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{jour}/\text{individu}$; $n = 4$). Le rapport relatif du butanoate d'hexyle et du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle variait significativement entre les sexes, avec un ratio de 5 : 1 chez les mâles et de presque 1 : 1 chez les femelles (Zhang, Q.-H. et Aldrich, 2003). Ce dimorphisme des ratios HB : E2HB est semblable à ce qu'Aldrich avait observé précédemment à partir d'insectes sauvages (Aldrich et al., 1988).

Tableau 1.2 Substances isolées par aération de punaises ternes, *L. lineolaris*.

Référence	Sexe (N)	(E) hex-2-éanal	hexan-1-ol	(E) hex-2-énol	butanoate d'hexyle (HB)	butanoate de (E)-hex-2-ényle (E2HB)	(E)-4-oxohex-2-éanal (4OH)
Aldrich, 1988	♂ 11	ND	ND	ND		76 %	ND
	♀ 11	ND	ND	ND		68 %	ND
Wardle, 2003	(14 ¹) ♂	0	0,6	0,2	179,5	8,8	13,9
	(13)	48,2	189,7	32,3	27 144,2	1 227,8	2 516
	(21) ♀	5,2	5,4	2,8	84,6	22,9	7,1
	(21)	770,6	406,1	395,6	23 653,1	8 036,5	1 779,0
	(4 ²) ♂	0,6	2,1	0,8	30,9	2,1	0,9
	(5) ♀	4,2	6,5	6,6	37,8	19,9	8,2

¹ Pour Wardle, N représente le nombre d'expériences d'aération de groupes d'insectes (calmes : 10 ; agités : 50) pendant une heure durant la photophase (le jour).

² Pour Zhang, N représente le nombre d'expériences d'aération de groupes de 10 insectes pendant 24 heures.

Les conditions expérimentales mises en place lors des expériences d'aération et de captation ont une importance énorme sur les quantités, et peut-être les ratios, des substances observées. En ce sens, les travaux de Byers et ses collaborateurs sont révélateurs. Les auteurs ont réalisé des travaux de captation de volatiles avec l'espèce apparentée *L. hesperus*, dans le but de déterminer si les femelles libéraient les composants de la phéromone sexuelle préférentiellement pendant la journée ou plutôt, durant la nuit. Pour ce faire, les auteurs ont dû raffiner leurs protocoles, dont trois sont rapportés dans un processus expérimental évolutif (Byers *et al.*, 2013).

Dans le premier protocole, ils ont placé des groupes, soit de 20 femelles, soit de 20 mâles, dans un flacon de 1,9 litre contenant six haricots verts, et capté les volatiles pour de périodes de 2 heures pendant la journée et de 12 heures pendant la nuit. Avec cette première stratégie, les résultats furent inconsistants en raison, selon les auteurs, de l'apparente surpopulation des insectes et la possible libération de substances d'alarme, ou même peut-être de défense, par les punaises.

De façon à pallier ce possible problème d'agitation, un deuxième protocole a consisté à aérer et à capter les volatiles des insectes, pris isolément, en remplaçant les individus à chaque période d'échantillonnage de 2 heures, le jour ou de 12 heures, la nuit. Avec cette stratégie, il a été déterminé qu'en moyenne, les femelles libéraient $9,9 \pm 2,8$ ng/h ($n = 32$) de butanoate d'hexyle pendant les périodes de jour, tandis que pendant la nuit elles libéraient $61,6 \pm 27,9$ ng/h ($n = 11$). Les insectes mâles ont libéré le même composé en plus faibles quantités, soit seulement $3,5 \pm 1,1$ ng/h le jour et $0,9 \pm 0,2$ ng/h la nuit. Les auteurs ne mentionnent pas les autres composés émis, dont les concentrations sont probablement en-dessous des limites de détection, pour ces aérations et captations auprès d'individus isolés. Les auteurs mentionnent aussi que dans certains cas, la manipulation des insectes causait une agitation et a résulté, en particulier dans le cas de trois mâles, en une expulsion intensive du contenu de la glande odorante, soit 750-2750 ng/h. Cette quantité est semblable, selon les

chercheurs, à celle émise par un individu pour lequel on pincerait l'abdomen pendant une seconde avant la captation. Selon les auteurs, même s'ils n'ont pas comptabilisé les cas aberrants de ces trois mâles, un comportement défensif peut avoir causé une surestimation des substances volatiles émises.

Un troisième protocole visait donc à éviter l'agitation des insectes lors de leur introduction et leur manipulation dans les flacons de captation. Lors de cette expérience, on a aéré et capté les substances volatiles d'individus isolés et ce, pendant 24 heures selon des périodes de 2 heures, le jour et de 12 heures, la nuit. En utilisant cette procédure, un très faible niveau de volatiles a été détecté chez les mâles, moins de 1 ng/h, le jour comme la nuit. De plus, les femelles n'ont pas relâché des niveaux élevés de volatiles pendant le jour. L'apparition d'obscurité a cependant déclenché la libération de butanoate d'hexyle (HB) chez les femelles, une quantité de 86,5 ng/h a été détectée en moyenne pendant la nuit, ce qui était considérablement plus élevé que les 0,014 ng/h chez les mâles. En somme, la moyenne quotidienne du taux de captation (jour et nuit confondus) chez les mâles a été de 0,8 ng/h et de 28,8 ng/h chez les femelles. La libération de 4OH variait entre 6 à 11 %, tandis que celui de E2HB était d'environ 4 à 8 % de celui du butanoate d'hexyle respectivement.

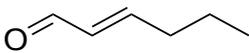
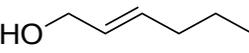
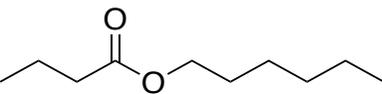
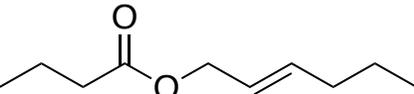
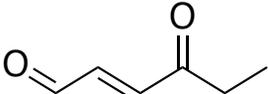
En résumé, bien que les expériences d'aération et de captation de Byers *et al.* n'aient pas impliqué *L. lineolaris*, mais plutôt *L. hesperus*, et que les composés volatiles ne peuvent pas être transposés, en quantité totale comme en ratio, il demeure des enseignements intéressants à retenir. L'analyse de ces résultats suggère premièrement que les conditions de captation influencent grandement la quantité de sémiochimiques captés, par exemple le butanoate d'hexyle est plus abondant, par trois ordres de grandeur, lors d'une période d'agitation. On notera que cette observation est semblable à celle soulevée par Wardle et al. avec *L. lineolaris*. Deuxièmement, il semblerait que les femelles calmes libèrent une plus grande quantité de sémiochimiques au total, que les mâles calmes, par un facteur 35 environ.

Troisièmement, il semblerait aussi que la quantité de substances volatiles émises varie beaucoup selon le moment de la journée ; par exemple, pendant la nuit, les femelles de *L. hesperus* libèrent beaucoup plus de substances que pendant le jour.

Dans une autre étude, Fountain et ses collaborateurs (Fountain *et al.*, 2014) ont trouvé que, chez quatre autres espèces d'insectes apparentés (*Lygus rugulipennis*, *Lygus pratensis*, *Lygocoris pabulinus*, et *Liocoris tripustulatus*), les composés principaux captés étaient HB, E2HB et 4OH, que les proportions variaient entre les sexes et que les quantités observées étaient plus abondantes dans les captations provenant des femelles. Ils ont aussi remarqué que dans certaines espèces, les individus décédés libéraient une plus large quantité de substances volatiles, démontrant l'importance de vérifier « l'état de santé » des insectes lorsqu'on effectue des aérations et captations. De la même façon que Byers et al. l'avait rapporté, il a été observé que le moment du jour influait sur le taux de libération des substances volatiles : ici encore, c'est la nuit, de plus grandes quantités ont été captées.

D'autre part, Groot et ses collaborateurs, dans leurs travaux avec l'espèce apparentée *Lygocoris pabulinus*, se sont intéressés à capter les volatiles libérés par des insectes mâles et femelles, calmes ou agités. Leurs résultats indiquent que le butanoate d'hexyle est le composé le plus présent chez cet insecte. Les mâles calmes et agités ont libéré environ 10 ng/h (la limite de détection de cette méthode) alors que les femelles calmes libéraient 10-92 ng/h, et les femelles dérangées de 25 jusqu'à 1 082 ng/h (Groot *et al.*, 2001). Ces observations avec une autre espèce d'insecte montrent que, comme chez *L. lineolaris*, les femelles libèrent plus de sémiochimiques que les mâles et que la quantité libérée augmente lorsque les femelles sont agitées. Le Tableau 1.3 résume les différentes substances volatiles, qui sont potentiellement des sémiochimiques de différentes punaises, décrites de la littérature.

Tableau 1.3 Les différentes molécules sémiochimiques des punaises ternes et espèces apparentées, décrites dans la littérature.

Composé	Structure	Espèce d'insecte
(<i>E</i>)-hex-2-éanal		<i>L. lineolaris</i> et <i>L. hesperus</i>
hexan-1-ol		<i>L. lineolaris</i>
(<i>E</i>)-hex-2-éno1		<i>L. lineolaris</i>
butanoate d'hexyle		<i>L. lineolaris</i> , <i>L. hesperus</i> et <i>L. pabulinus</i>
butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle		<i>L. lineolaris</i> , <i>L. hesperus</i> et <i>L. pabulinus</i>
(<i>E</i>)-4-oxohex-2-éanal		<i>L. lineolaris</i> , <i>L. hesperus</i> et <i>L. pabulinus</i>

En somme, la plupart des travaux précédents concluent que les composés majoritaires produits et libérés par *L. lineolaris* et les autres espèces *Lygus* apparentées sont deux esters, soit les butanoates d'hexyle (HB) et d'(*E*)-hex-2-ényle (E2HB), et un aldéhyde, soit le (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH).

Le butanoate d'hexyle (HB), également connu sous le nom de butyrate d'hexyle, appartient à la classe des composés organiques appelés esters d'acides gras car il peut être biosynthétisé à partir de l'acide butanoïque et de l'hexan-1-ol. La molécule de HB est hydrophobe, donc pratiquement insoluble dans l'eau, et relativement neutre

(voir Tableau 1.4) Le HB est naturellement présent dans de nombreux fruits comme les pommes, les fruits de la passion jaunes, les camomilles romaines, les poires, les cerises douces et d'autres fruits (Djojoputro, 2005).

Le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle est aussi une molécule lipidique d'ester gras, un composé à l'arôme fruité (pomme, banane) que l'on retrouve, entre autres, dans le bleuet en corymbe (Fahlbusch, 2000). Le E2HB possède des caractéristiques physico-chimiques semblables au butanoate d'hexyle. Entre autres, la similitude de leurs points d'ébullition et de leurs structures font du HB et du E2HB des composés difficiles à séparer thermiquement et donc à analyser par GC, tel qu'observé expérimentalement au laboratoire d'analyse organique de l'UQAM.

Le (*E*)-4-oxohex-2-éanal est une molécule lipidique d'aldéhyde gras, plutôt hydrophobe, légèrement polaire, peu soluble dans l'eau, et relativement neutre, incolore et possède une odeur piquante (American Chemical Society, 2021). Comme d'autres aldéhydes, mais à fortiori en raison de la présence de la conjugaison avec une portion énone, le 4OH est un composé toxique et mutagène. En l'occurrence, des cas de cancer ont été rapportés, liés à l'exposition prolongée de ce composé. (Kawai *et al.*, 2006) Répandu dans les sécrétions défensive de plusieurs espèces de punaises, il semble qu'il peut aussi être trouvé dans des herbes et des épices (Djojoputro, 2005) (Fahlbusch, 2000).

Tableau 1.4 Propriétés physico-chimiques des principaux sémiochimiques de *L. lineolaris* (Neveu et al., 2018).

Composé	Masse molaire (g/mol)	Température d'ébullition (°C) à 760 mm Hg	Masse volumique (g/cm ³) à 25 °C	Solubilité dans l'eau (g/L)
Butanoate d'hexyle	172,26	208	0,88	0,11
Butanoate de (<i>E</i>)-hex-2-ényle	170,24	190	0,88	0,22
(<i>E</i>)-4-Oxohex-2-énal	112,13	210	0,96	ND

1.5 Sensibilité des antennes des punaises à des substances volatiles : la technique d'électroantennographie

L'électroantennographie (EAG) est une technique largement utilisée en entomologie pour tester la détection des substances volatiles perçues par l'appareil olfactif antennaire des insectes. Cette technique, basée sur les travaux de Schneider (Schneider, 1957) consiste à mesurer des potentiels électriques déclenchés à travers une antenne d'insecte quand elle est mise en contact avec un stimulus olfactif et comme ça élucider une réponse physiologique ou l'absence d'elle. Chez les insectes, les antennes représentent le principal organe récepteur responsable de l'olfaction (Keil, 1999).

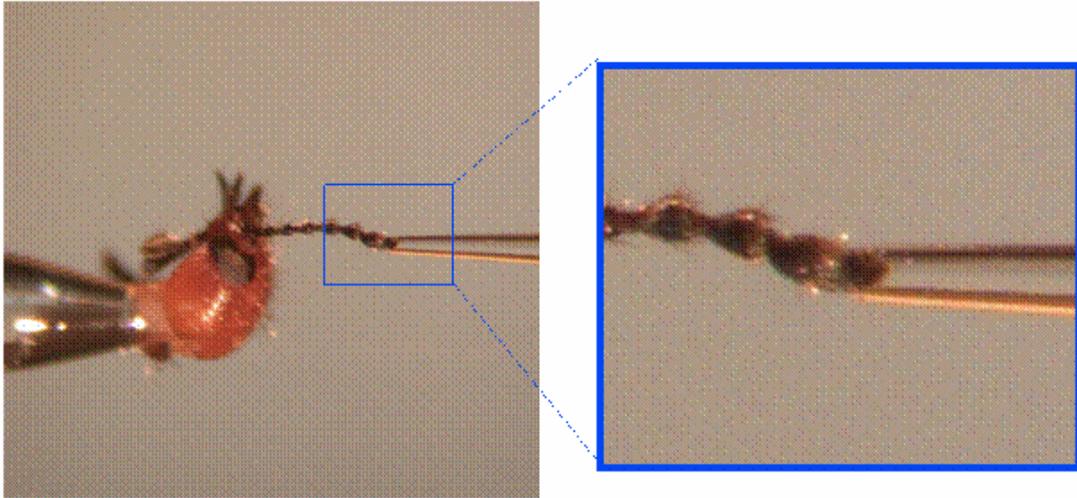


Figure 1.6 Connexion de l'électrode à l'antenne pour une expérience d'électroantennographie. La tête de l'insecte est excisée avec une lame de scalpel n° 11. Une première électrode est implantée dans la tête près de la base antennaire et une deuxième électrode est attachée à l'extrémité de l'antenne. (Department of Agriculture, 2015).

Dans ses travaux, Schneider a détecté de petites fluctuations de tension entre la pointe et la base d'une antenne d'un papillon à soie pendant la stimulation avec des substances sémiologiques (Figure 1.6). Il a remarqué une augmentation de l'amplitude des potentiels électriques avec l'augmentation des concentrations des stimuli. Même s'il n'existe pas une explication théorique robuste des résultats observés avec la technique de l'EAG, ces travaux suggèrent que l'amplitude des potentiels électriques, enregistrés dans un electroantennogramme, dépendent de la nature du stimulus, de l'espèce d'insecte et de son sexe. Cette technique est donc considérée comme une méthode empirique, car elle ne fournit pas de données physiologiques sur les mécanismes des récepteurs olfactifs des insectes. Enfin, comme la technique d'EAG permet la détection des réponses physiologiques

d'insectes à des stimuli olfactifs, elle constitue une sorte de détecteur lors de la chromatographie gazeuse de mélanges, pour l'identification des fractions actives, et donc la sélection de composés qui pourraient être sémiochimiques (Schneider, 1957).

Ainsi, on aperçoit dans littérature des sémiochimiques que la technique de l'EAG est souvent couplée à un chromatographe de phase vapeur, constituant la technique combinée GC-EAG. Cette procédure analytique permet l'identification rapide, à l'intérieur de mélanges complexes, des composés particuliers qui stimulent la sensille olfactive d'un insecte, en utilisant les banques de données traditionnelles des logiciels de la GC, en particulier de la GC-MS. Autrement dit, cette technique peut indiquer quels composés volatils spécifiques un insecte peut percevoir, et dans une certaine mesure, ceux qu'il ne peut pas. Ces informations peuvent être utilisées pour découvrir des composés potentiellement utiles, telles que les phéromones sexuelles, d'alarme ou de répulsion, qui modifient le comportement des insectes (Department of Agriculture, 2015). Cependant, on doit noter que la simple perception d'une substance par les antennes d'un insecte ne nous informera pas, a priori, sur l'effet comportemental que causera ladite substance : autant cette odeur peut être attractive, autant elle peut être répulsive ou même, avoir peu d'effets observables.

Dès 1994, Chinta et ses collaborateurs (Chinta *et al.*, 1994) ont testé 31 composés dans des essais d'électroantennographie (EAG) avec des antennes de punaises ternes, *L. lineolaris*. Certains composés avaient été choisis, soit parce qu'ils avaient été identifiés dans des extraits de punaises ternes, soit parce qu'ils sont émis par des plantes qui font partie de la diète appréciée de ces insectes, tels que le maïs, la moutarde, le coton et la verge d'or, par exemple. Ces essais ont été effectués en plaçant des quantités variées de composé pur, entre 0,001 et 100 microgrammes, dissous dans 1 microlitre d'hexane. La solution était ensuite imbibée sur un bout de papier filtre et celui-ci était placé dans une cartouche de verre, à travers laquelle un faible débit d'air purifié entraînait les odeurs au site exposant l'antenne d'insecte sous

tension. Cette étude prend son importance dans la diversité de composés testés, mais également dans la comparaison des réponses EAG des antennes de mâles et de femelles, ce qui permet d'apprécier l'existence d'un éventuel dimorphisme sexuel dans la perception des odeurs. Les auteurs ont conclu qu'en général, les antennes des mâles et des femelles réagissent de façon similaire à la plupart des stimuli. Cependant, ils ont noté une sensibilité légèrement plus grande des antennes de mâles pour HB et E2HB, tandis que les antennes de femelles semblaient plus sensibles au géraniole. Si cette étude s'avère intéressante en raison de la rigueur à tester des nombreux composés purs et dans des courbes dose-réponse, elle jette un doute sur le possible dimorphisme sexuel dans la réponse antennaire. Par ailleurs, la réponse vis-à-vis du (*E*)-4-oxohex-2-énoal (4OH) demeure inconnue, car ce composé n'a pas été testé. Enfin, on remarque dans cette étude que les aldéhydes saturés octanal et nonanal sont les composés qui ont provoqué les plus fortes réponses antennaires, indépendamment du sexe. Bien qu'aucun dimorphisme sexuel n'ait été observé pour ces composés, il serait intéressant de vérifier si cette activité antennaire se traduirait en pouvoir attractif auprès des punaises, mâles et femelles.

L'étude précédente concernait des composés purs, dont la sélection reposait sur leur prédominance dans les extraits ou captation de volatils dans punaises. On peut aussi se demander si on n'a pas écarté des composés qui, même s'ils se trouvent en plus faible proportion dans les sécrétions d'insectes, par exemple le 4OH, pourraient avoir des activités antennaires supérieures. Cette question a justement été adressée par une analyse GC-EAG directement effectuée à partir des mélanges émis par les punaises. En effet, dans leurs travaux de 2007, Zhang et ses collaborateurs ont effectué des essais d'électroantennographie avec des antennes de punaises ternes. Ils ont analysé, à partir des extraits de GOM excisées, de même que des extraits issus d'aération et captation, les substances volatiles libérées par des individus des deux sexes de *L. lineolaris*. Tel que dans les autres recherches mentionnées, les composés majoritaires ont été identifiés comme le butanoate d'hexyle (HB), le butanoate de (*E*)-hex-2-énoyle

(E2HB) et le (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH). De façon encore plus intéressante, les auteurs se sont testés la réponse physiologique des antennes des insectes aux substances volatiles en réalisant une analyse par séparation avec la chromatographie en phase gazeuse couplée, en parallèle à deux systèmes de détection. La moitié de l'effluent gazeux sortant de la colonne était dirigé vers un détecteur par ionisation à la flamme (FID), tandis que l'autre moitié de l'effluent était dirigé vers un détecteur électroantennographe (EAG). Pour constituer ce dernier détecteur, les auteurs ont excisé une antenne de punaise mâle et installé celle-ci selon les conditions : La sortie du détecteur EAG a été maintenue dans un débit d'air humidifié circulant vers l'antenne de l'insecte. Une électrode capillaire en verre a été remplie de solution Ringer (solution de plusieurs sels dissous dans l'eau en vue de créer une solution isotonique par rapport aux fluides corporels d'un insecte permettant une bonne conductivité électrique), mise à la terre via un fil d'argent, et insérée dans le côté ouvert de la tête de l'insecte. Ce montage en parallèle a permis d'observer la réponse simultanée du détecteur FID, qui permettait de détecter tous les composés présents, et de l'électroantennographe, qui permettait de discriminer les composés qui causent une réponse physiologique dans l'antenne de l'insecte. Les analyses GC-FID et GC-EAG ont été effectuées en utilisant les mélanges extraits des GOM (Tableau 1.1) et les mélanges des volatiles captés par aération (Tableau 1.2). Les analyses démontrent que 1) la composition des extraits de GOM et d'aérations sont semblables, tant pour les mâles que les femelles et 2) que les antennes de mâles *L. lineolaris* répondent aux trois sémiochimiques majoritaires, soit HB, E2HB et 4OH (Figure 1.7 et Figure 1.8). (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007).

Parallèlement, Ho et Millar ont effectué des études d'électroantennographie, mais toutefois avec l'espèce *L. hesperus*, en utilisant les substances sémiochimiques qu'ils ont capté par l'aération des insectes. Les auteurs suggèrent qu'il n'y avait pas de différences qualitatives dans les réponses antennaires entre des insectes femelles et mâles aux sémiochimiques étudiés. Cette absence de dimorphisme sexuel dans la

perception antennaire laisse planer un doute sur la présence d'une phéromone sexuelle parmi ces substances, du moins chez cette espèce de *Lygus* (Ho et Millar, 2002).

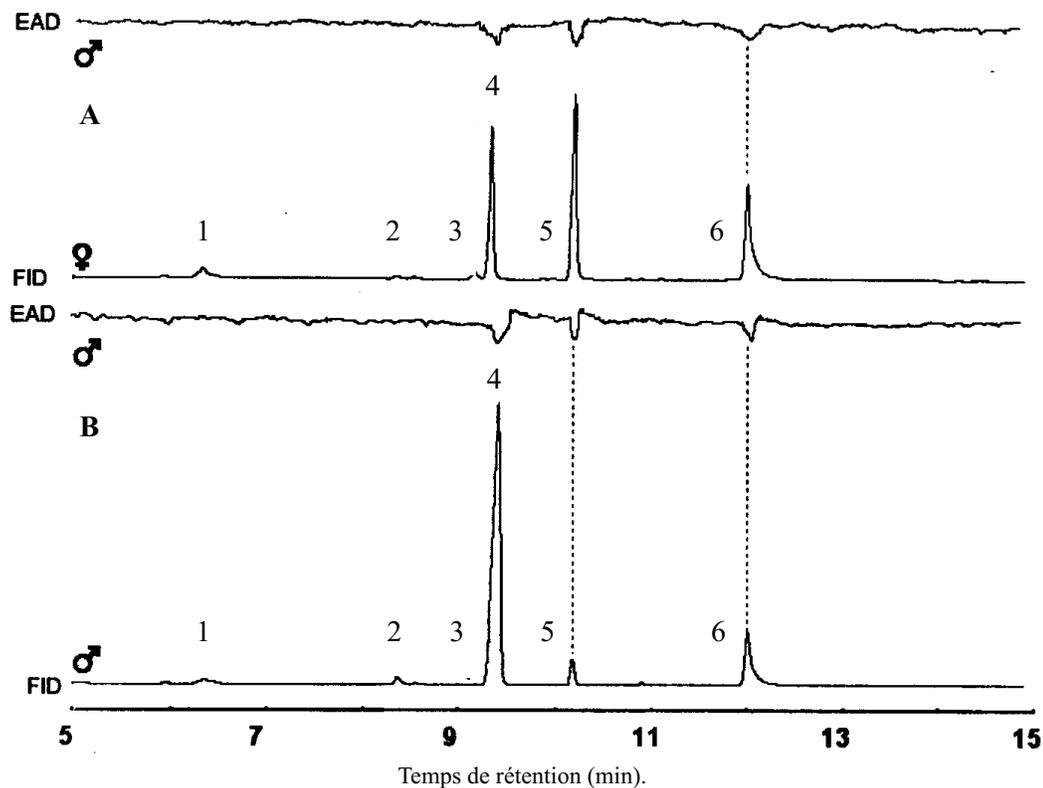


Figure 1.7 Chromatogrammes GC-EAG (réponses antennaires des mâles de *L. lineolaris*, trace du haut) et GC-FID (trace du bas) à partir d'extraits de la GOM de femelles (A) et de mâles (B). (1) (*E*)-hex-2-éanal, (2) hexan-1-ol, (3) (*E*)-hex-2-énol, (4) butanoate d'hexyle, (5) butanoate de (*E*)-hex-2-ényle, (6) (*E*)-4-oxohex-2-éanal (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007).

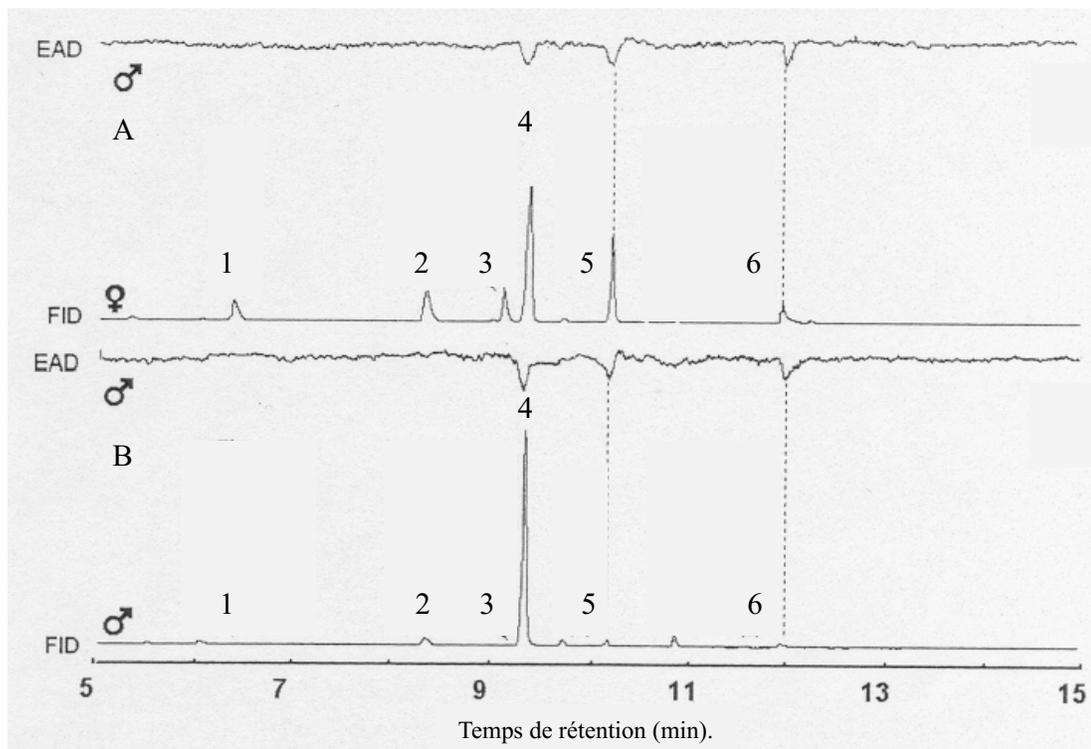


Figure 1.8 Chromatogrammes GC-EAG (réponses antennaires des mâles de *L. lineolaris*, trace du haut) et GC-FID (trace du bas) à partir d'aérations de femelles (A) et de mâles (B). (1) (*E*)-hex-2-éanal, (2) hexan-1-ol, (3) (*E*)-hex-2-énoïl, (4) butanoate d'hexyle (HB), (5) butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB), (6) (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH) (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007).

La lecture des travaux de Zhang, tout comme ceux de Ho et Millar, nous donnent une base pour penser que, non seulement des insectes *Lygus* libèrent des substances chémiochimiques, mais encore qu'ils répondent à ces mêmes stimuli. Bien que la composition idéale d'une phéromone sexuelle n'est pas encore démontrée, la technique de GC-EAG a permis de tester la réponse des antennes à une substance volatile, seule ou en mélange, avant de procéder aux essais expérimentaux tels que le piégeage avec de potentiels leurres aux phéromones. Mais auparavant de faire ces

expériences longues et coûteuses, il est souhaitable d'effectuer des tests comportementaux, lorsque possible, en laboratoire afin de pouvoir déterminer si les insectes sont attirés par tel composé ou mélange, comparé avec des contrôles.

1.6 L'influence des substances volatiles sur le comportement des punaises : la technique de l'olfactométrie

L'olfactométrie, dans sa plus vaste définition, est une méthode standardisée utilisée pour déterminer la concentration des odeurs et pour évaluer les réponses relatives aux odeurs (Brattoli *et al.*, 2011). En médecine, elle mesure la sensibilité de l'odorat (Caruso *et al.*, 1969). En entomologie, les expériences olfactométriques placent les insectes devant un choix entre deux ou plusieurs sources d'odeurs pour tester leurs préférences comportementales. Les résultats de ce type d'expérience permettent par exemple, de comparer les comportements d'attraction ou de répulsion des insectes, induits par des stimuli contrôlés. Cependant, il reste à savoir dans quelle mesure ces expériences reflètent le comportement réel des insectes dans la nature, en raison de la présence de plusieurs autres stimuli (Ballhorn et Kautz, 2013).

Un olfactomètre simple, à deux voies, est construit normalement avec un tube en verre transparent comprenant une fourche, dit en forme d'« Y », pour que les insectes quittent une chambre initiale pour se diriger vers l'une des deux chambres génératrices d'odeur, au-delà de la fourche. La chambre initiale, à la base du tube en Y, représente l'entrée du système. De l'autre côté de la fourche, chacun des tubes reçoit de l'air, poussé par une pompe, purifié et passé dans une chambre à odeur contenant soit un stimulus olfactif, soit un contrôle. Le principe du système est que l'insecte, placé devant deux stimuli différents, doit exercer un choix en s'engageant du côté préféré de la fourche. L'appareil est construit et manipulé de telle sorte que les facteurs interférents sont pratiquement contrôlés, comme la pureté, le taux d'humidité et le débit de l'air, mais aussi la luminosité et les bruits sonores, par exemple. Selon la

littérature, l'âge, le statut d'accouplement et l'appétit des insectes doivent être standardisés aussi (McIndoo, 1926) (Voir Figure 1.9).

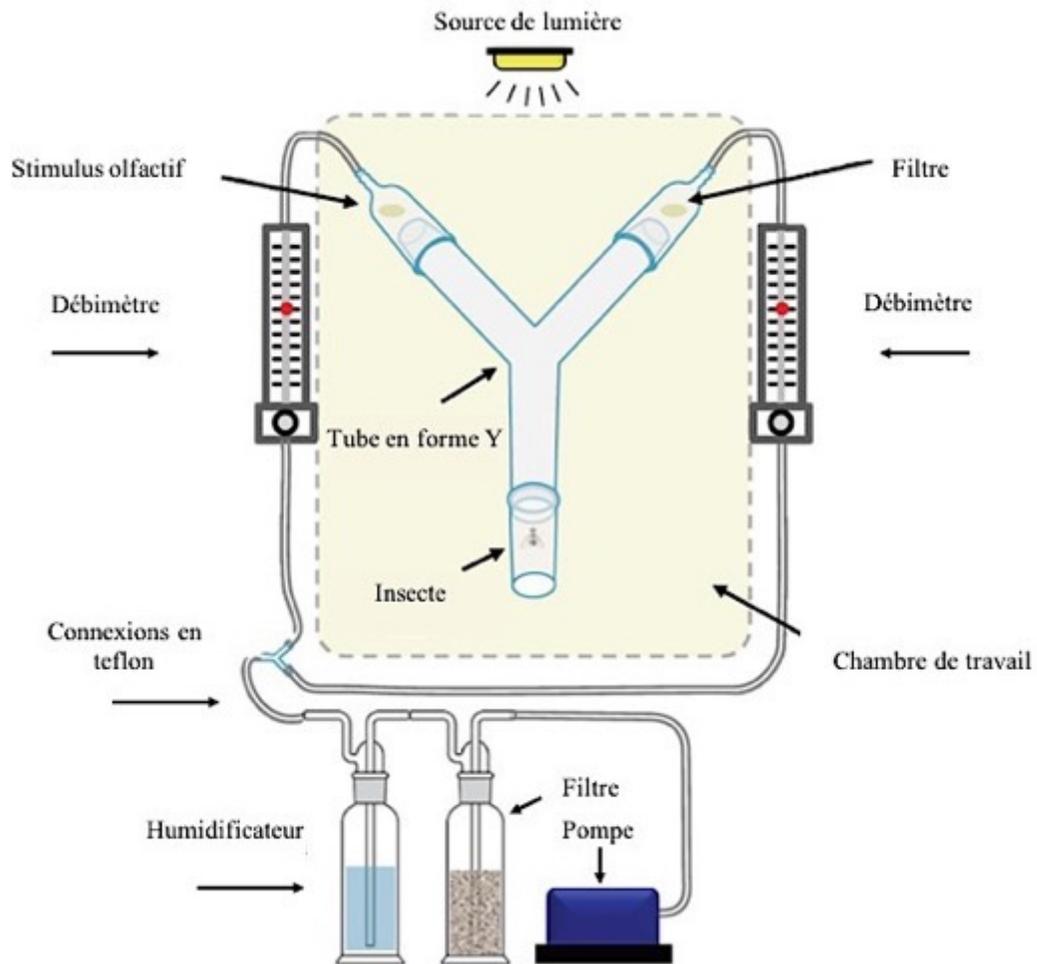


Figure 1.9 Olfactomètre à deux voies, dit en « Y » pour observer le choix des insectes (Biasazin *et al.*, 2018).

Zhang et ses collaborateurs ont réalisé des travaux avec un olfactomètre à deux voies afin de tester l'attraction (ou la répulsion) des punaises ternes face à certaines odeurs. Sa stratégie consistait en trois expériences différentes. Tout d'abord, une heure avant chaque expérience, 5 femelles vierges de *L. lineolaris*, âgées d'environ 7 jours, ont été placées dans un bocal en verre avec trois haricots verts frais, pour éviter des résultats influencés par un état de faim ; un autre bocal en verre, qui ne contenait que des haricots verts, servait de témoin. De même, les conditions de température et de propreté de l'air étaient contrôlées (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007).

La première expérience a consisté à placer un insecte (mâle, vierge) devant un choix entre les 5 femelles vierges et le témoin. La deuxième expérience a consisté à comparer l'attractivité du même récipient contenant cette fois les 5 femelles vierges avec un distributeur de butyrate d'hexyle (50 mg), par rapport à un témoin. Finalement, la troisième expérience consistait à comparer l'attractivité d'un distributeur de HB avec un témoin. Les tests ont été faits avec 10 à 20 individus, pris un à un, à trois répétitions.

Les résultats de la première expérience montrent que les insectes mâles se sont plus souvent déplacés vers le bras de l'olfactomètre avec les femelles vierges, que vers celui avec le témoin vide. Ce résultat milite en faveur d'un effet attractif sur les mâles, probablement causé par l'émission d'une phéromone sexuelle par les femelles vierges. Cependant, lors de la deuxième expérience, lorsqu'un distributeur de butyrate d'hexyle a été placé avec des femelles vierges dans le bocal, les mâles ont plus souvent choisi de marcher vers le côté du contrôle. Les auteurs ont proposé deux hypothèses sur la cause de ce renversement de préférence des mâles. Soit HB inhibe la libération de la phéromone sexuelle par les femelles, soit HB est répulsif en soi, pour les mâles. La troisième expérience a montré que les mâles préféraient progresser vers le contrôle, plutôt que vers le diffuseur de butyrate d'hexyle seul. Les auteurs

concluent alors que le butyrate d'hexyle pourrait avoir un effet répulsif envers les mâles.

Pour leur part, Wardle et ses collaborateurs, dans leurs travaux en olfactométrie, ont trouvé que les mâles, tout comme les femelles *L. lineolaris*, étaient repoussés par la présence d'un mélange des six substances volatiles isolés par aération et captation, équivalant à une heure de captation. (Tableau 1.2) Les auteurs rapportent un effet répulsif également, pour la plupart des composés, pris individuellement, ce qui les amènent à suggérer que les volatiles émis pourraient servir comme une phéromone d'alarme (Wardle *et al.*, 2003).

Malgré ces résultats qui semblent contradictoires, on peut en conclure que, bien que les punaises ternes mâles soient naturellement attirés par des femelles vierges, cette attraction peut être modifiée, ou même complètement bloquée, par la présence d'un stimulus répulsif. Le fait qu'un stimulus soit attractif ou répulsif, tient-il dans la nature de l'un ou l'autre des composés volatiles isolés à partir des aérations et captations, ou encore dans le ratio des composés, pouvant commuter une putative phéromone sexuelle en une, tout autant hypothétique, phéromone d'alarme ? On se doit de reconnaître que les résultats tirés de la littérature traitant des sémiachimiques des punaises ternes ne permettent toujours pas, même après plus de 40 ans de recherche, de répondre avec confiance à ces questions.

1.7 Piégeage sur le terrain avec des leurres odorants

Comme on l'a vu, la littérature sur les substances sémiachimiques de la punaise terne s'est intéressée à l'identification et la quantification des substances libérées par les femelles et semblant attirer les mâles, présumée comme une phéromone sexuelle. Si la caractérisation de cette phéromone est intéressante au point de vue fondamental, il faut bien avouer que l'un des principaux moteurs de cette recherche demeure ses

applications dans l'agriculture, à savoir, le piégeage des insectes avec l'aide de leurres olfactifs.

Historiquement, les chercheurs ont dirigé leur attention à l'utilisation des phéromones comme moyen de lutte biologique sous la forme de pièges. Déjà Slaymaker et Tugwell en 1984 (Slaymaker et Tugwell, 1984) proposaient un piège pour *L. lineolaris*, utilisant des insectes femelles vivants de cette même espèce, comme appâts. Le piège de Slaymaker et Tugwell était construit avec un rectangle collant en carton laminé, formé en cylindre et utilisé pour revêtir l'intérieur d'un système qui contenait une cage en filet avec deux femelles de *L. lineolaris* et quelques morceaux de pomme de terre. Le cylindre était suspendu à 0,3 -1,0 m au-dessus du sol avec une tige métallique plantée dans le sol (Tableau 1.5). Le piège visait à vérifier l'hypothèse selon laquelle les femelles libéreraient une phéromone sexuelle, attirant les mâles, qui seraient capturés sur la surface collante. Les insectes femelles utilisés dans cette étude ont été élevés au laboratoire et ségrégués des mâles avant l'âge adulte. Les pièges ont été installés dans des cultures de luzerne et renouvelés toutes les deux semaines pour une période de 10 semaines. Cinq techniques ont été implémentées selon l'âge des femelles; a) des pièges avec des femelles âgées de moins d'une semaine; b) des pièges avec des femelles d'une semaine d'âge; c) des pièges avec des femelles d'une à deux semaines d'âge d) des pièges avec des femelles de deux à trois semaines d'âge et e) des pièges avec des femelles de trois à quatre semaines d'âge. Les cinq techniques ont été comparées avec des pièges contrôles, contenant des pommes de terre uniquement. Vers la fin de l'étude, 560 punaises ternes ont été capturées dans les pièges appâtés avec des femelles et seulement 32 dans les pièges contrôle. Même si les pièges appâtés étaient trois fois plus nombreux, on peut en déduire qu'ils sont tout de même six fois plus efficaces, que les pièges non appâtés. L'âge moyen des femelles utilisées était de 28 jours, cependant, les plus haut taux de captures ont été observés avec les pièges appâtés avec des femelles âgées de une à deux semaines, ainsi que de deux à trois semaines (7,8 et 6,5 mâles par piège par semaine). De l'ensemble des insectes

capturés, les mâles ont été trouvés environ 10 fois plus nombreux que les femelles. En outre, deux autres espèces d'insectes ont été aussi capturés, soit *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) et *Stenotus binotatus* (L.). Bien que le travail de Slaymaker et Tugwell, en tant que pionniers, a posé les bases de l'utilisation des phéromones pour le piégeage des punaises ternes, leur technique était conditionnée aux restrictions d'élevage pour l'utilisation de femelles vierges et il y a un avantage certain à utiliser des appâts synthétiques dans le piégeage des insectes. Zhang et ses collaborateurs pour leur part ont essayé deux techniques d'application de substances sémiochimiques comme moyen de lutte biologique, l'attraction et la répulsion d'insectes (Zhang, Q.-H. *et al.*, 2007). Premièrement, ils ont identifié, via la technique d'électroantennographie, les composés sémiochimiques les plus actifs provenant de la glande odorante métathoracique (GOM) des insectes *L. lineolaris*, soit le HB, le E2HB et dans une moindre mesure le 4OH. Le but de leur travail était de comparer l'attraction des mâles par les femelles, seules ou en présence des composés HB, E2HB et 4OH. À cet effet, ils ont réalisé deux expériences sur le terrain dans des champs de luzerne au cours des étés 2002 et 2003, utilisant des pièges « Jackson Delta » avec des surfaces collantes amovibles (Tableau 1.5), appâtés avec trois femelles *L. lineolaris* dans une cage en plastique qui contenait aussi des haricots, et selon le type d'expérience, un diffuseur à mèche contenant une ou des substances volatiles. Les jeunes insectes femelles de 7 jours d'âge adulte, utilisées comme appâts étaient des insectes d'élevage, séparés à l'âge adulte des mâles pour assurer leur virginité. Les surfaces collantes, les cages contenant les femelles et les diffuseurs à mèche étaient renouvelés tous les trois jours. La masse initiale des substances volatiles pures placées dans les diffuseurs à haut débit avec les femelles était de 100 mg, le taux de libération des diffuseurs, calculé par différence en masse au début et à la fin de la période était de 4,2 mg/jour pour HB et de 1,4 mg/jour pour E2HB. Les résultats de piégeage montrent, tout comme avaient observé Slaymaker et Tugwell, que les femelles seules ont capturé plus de mâles que les pièges témoin vides. Cependant, l'utilisation de diffuseurs à haut débit, que ce soit de HB et/ou de

E2HB, a réduit considérablement le nombre de captures dans les pièges, même en présence des femelles, faut-il le rappeler. On peut supposer que ces diffuseurs à haut débit modifient peut-être trop la signature chimique des femelles, au point de rebuter les mâles. Les auteurs ont aussi fait des essais avec des diffuseurs contenant des quantités variables de mélanges en combinaison binaire (HB : E2HB en proportion 1 : 1) ou en combinaison ternaire (HB : E2HB : 4OH en proportion 2 : 2 : 1) Les doses testées étaient de 0,02 à 200 mg de mélange, dissous dans 2 mL d'octane, placés dans des diffuseurs à mèche. Les taux de diffusion de ces diffuseurs ne sont pas déterminés mais on sait qu'ils sont pratiquement proportionnels à la concentration de la solution utilisée. Ces diffuseurs, lorsque placés dans des pièges, ont capturé si peu de punaises qu'ils se confondent avec le contrôle, tandis que des pièges distincts comportant trois femelles montraient encore là, leur efficacité. À prime abord, ce travail de Zhang *et al.* jette un doute sur la possibilité d'attirer des punaises ternes dans des pièges en utilisant des attractifs odorants constitués de HB, E2HB et/ou 4OH. Cependant, on peut penser que le ratio des composés volatils entre eux, est important pour attirer les punaises mâles, ce qui n'a pas été investigué dans cette étude.

Fountain et ses collaborateurs, dans leurs travaux de piégeage avec l'espèce d'insecte *L. rugulipennis* (Fountain *et al.*, 2014), décrit la capture des mâles, dans des pièges, appâtés avec un mélange synthétique de sémiochimiques émulant la phéromone sexuelle des femelles, en comparaison avec d'autres pièges comportant des femelles vierges. La stratégie consistait en la comparaison de trois types d'appâts, testés dans des pièges « Delta vert », dans des cultures de fraises. L'appât était, soit une femelle, soit un appât commercialisé pour cet insecte (fabriquée par Agrisense), ou encore un diffuseur de phéromone synthétique fabriqué au laboratoire. Ce diffuseur maison était préparé simplement, à partir d'un filtre de cigarette imprégné avec un mélange de sémiochimiques HB, E2HB et 4OH dans de l'huile végétale, puis inséré dans un embout de micropipette. Ces composés avaient préalablement été déterminés comme

des constituants de la phéromone sexuelle de cette espèce de punaise, plutôt répandue en Europe.

Les mélanges synthétiques testés étaient basés sur 10 mg de HB et sur une composition, totale ou partielle, de HB, E2HB et 4OH dans des proportions de 100 : 3 : 20 respectivement. Les trois possibilités de mélanges binaires (HB et E2HB, HB et 4OH, E2HB et 4OH), ainsi que le mélange ternaire ont été comparés comme appâts avec des femelles sauvages. Les auteurs ont observé que le mélange synthétique ternaire HB, E2HB et 4OH dans une proportion 100: 3: 20 respectivement; et le mélange binaire HB + 4OH (100 : 20) ont capturé plus de mâles *L. rugulipennis*, que les pièges appâtés avec des femelles. En outre, ils ont aussi capturés quelques individus d'autres espèces, telles que *L. pratensis* et *L. tripustulatus*. Le travail de Fountain et ses collaborateurs a permis de comparer deux types de diffuseurs, l'un commercialisé (Agrisense) et autre fabriqué au laboratoire, simplement avec du matériel peu cher. Cette recherche a permis d'affiner la technique de piégeage d'insectes avec des substances sémiocchimiques et pose les bases d'une implémentation agricole moins couteuse.

Concernant le piégeage de la punaise terne, Byers et ses collaborateurs se sont intéressés à trouver la composition idéale de substances volatiles qui serait spécifiquement efficace pour capturer des insectes *L. Lineolaris* sur le terrain, soit dans un champ de moutarde. Ils ont comparé différents mélanges d'une phéromone synthétique préparée à partir des substances volatiles majoritairement présentes dans les insectes ainsi que lors des aérations, soit HB, E2HB et 4OH (Byers *et al.*, 2013). Les auteurs ont trouvé que l'utilisation dans leurs pièges, d'un mélange dont le ratio est équivalent à celui trouvé dans les femelles (extraction de glandes odorantes ainsi que d'individus totaux) obtenaient les meilleurs résultats de capture. En effet, les pièges diffusant un ratio HB : E2HB : 4OH de 20 : 50 : 30 ont permis de capturer significativement plus de *L. lineolaris* que le témoin, ou que les mélanges binaires

omettant l'un des trois constituants. De façon intéressante, les résultats de piégeage suggèrent qu'un appât comportant un ratio élevé en E2HB résulte en une attraction plus élevée pour les mâles *L. lineolaris*. Or dans la même étude, les auteurs montrent également qu'un mélange riche en HB (HB : E2HB : 4OH = 56 : 6 : 38, mimant la composition des femelles *L. hesperus*) attire efficacement les mâles de l'espèce *L. hesperus*, mais sans attirer les *L. lineolaris*. En somme, cela représente une démonstration très efficace de la spécificité des phéromones.

Dans la figure 1.10, on observe les résultats de piégeage de mâles de *L. Lineolaris* avec le mélange synthétique libérant, selon les auteurs, les composés HB à un taux de 1,2 µg/h, E2HB à 3 µg/h et 4OH à 2 µg/h, soit dans une proportion de 20 : 50 : 30. Il ressort de cette comparaison que le mélange ternaire est plus attractif que le contrôle, mais qu'il est aussi supérieur à chacune des mélanges binaires équivalents.

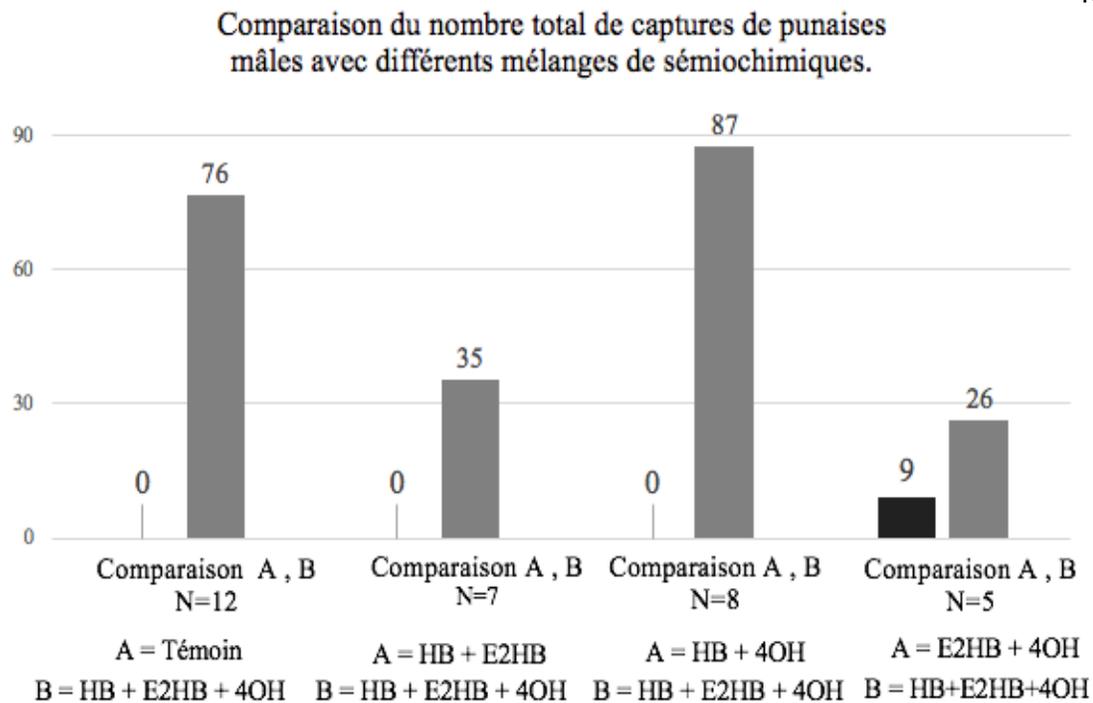


Figure 1.10 Comparaison du nombre total de mâles *L. Lineolaris* capturés dans les pièges par différents mélanges de sémiachimiques. (N) représente la durée en jours de chaque test (Byers *et al.*, 2013).

Actuellement, il existe des méthodes de lutte biologique modernes contre des insectes ravageurs qui utilisent des phéromones sexuelles dans différentes techniques, comme le piégeage de diagnostic, le piégeage en masse et la confusion sexuelle (El-Shafie et Faleiro, 2017) (Tableau 0.1). En particulier, on peut penser à utiliser une phéromone sexuelle pour capturer des *L. lineolaris* afin de détecter rapidement une infestation dans une culture donnée et même peut-être, à plus long terme si les pièges s'avéraient très efficaces, aller jusqu'à réduire localement une population de cet insecte nuisible. Pour ce faire, les composantes de cette phéromone doit être synthétisées au laboratoire pour être utilisées sous forme de leurres, formulées spécialement pour empêcher la dégradation et en favoriser une libération graduelle. Également, le design des pièges et leur emplacement (hauteur, espacement, protection contre les

intempéries, etc.) doit être adapté pour le type d'insecte à piéger ainsi que le type de culture qui accueillera ces pièges.

En résumé, au vu de la littérature traitant du piégeage de punaises ternes à l'aide de pièges appâtés avec un mélange de substances volatiles mimant la phéromone sexuelle, il existe un potentiel à explorer pour dépister cet insecte nuisible, au sein des cultures agricoles. Cependant, comme pour tous les cas de phéromones synthétiques, il est important d'émettre le bon ratio des sémiochimiques, pour optimiser son efficacité à attirer l'espèce d'insecte visée. Pour cette raison, ce projet s'est penché sur l'utilisation d'une phéromone à partir des composés HB, E2HB et 4OH avec une composition riche en E2HB.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre décrit la méthodologie utilisée pour piéger des punaises ternes, *Lygus lineolaris*, dans des cultures fraisières. D'abord, une description détaillée sera faite des matériels utilisés pour la synthèse et la formulation de la phéromone sexuelle synthétique et d'une imitation d'odeur florale, utilisées comme attractifs dans les diffuseurs. Ensuite, seront décrits les appareillages et les méthodes analytiques utilisés pour évaluer la pureté des attractifs ainsi que l'efficacité et la stabilité des formulations dans les diffuseurs de la phéromone synthétique. Finalement, la confection et l'installation des pièges à punaises, utilisant des diffuseurs d'attractifs en milieu agricole seront expliquées.

2.1 Substances utilisées et matériel consommé.

L'acétone (pureté 99,5 %) provenait de ACP Chemicals (Canada), l'ammoniaque concentrée 18 M (pureté 99,9 % métaux à l'état de traces, lot MFCD00066650) provenait de Sigma-Aldrich (Produit des USA), l'anhydride butanoïque (pureté > 98 %, lot A037881) provenait d'Acros Organics (Belgique), le butanoate d'hexyle (pureté > 98 %) provenait de Combi-Blocks (USA), le charbon actif (60 mesh) provenait de Sigma-Aldrich (Canada), le chloroforme deutéré (pureté 99,8 %) provenait de Cambridge Isotope Laboratories (USA), le dichlorométhane (grade solvant) provenait de Caledon Laboratory Chemicals (Canada), le 2,6-di-*tert*-butyl-4-

méthylphénol (*butylated hydroxytoluene*, BHT, pureté > 98 %) provenait de Sigma Aldrich (Canada), le (*E*)-hex-2-én-1-ol (pureté > 96 %, lot A0340603) provenait de Acros Organics (produit du Japon), l'éther diéthylique anhydre (pureté 99,7 % avec 1 ppm de BHT comme inhibiteur) provenait de Sigma-Aldrich (Produit des USA), le 2-éthylfurane (pureté > 98 %, lot 10167277) provenait d'Alfa Aesar (Royaume-Uni), le HCl concentré 12 M (contenu 36,5-38 %, lot MFCD00011324) provenait de Sigma-Aldrich (Produit des USA), l'hexane (pureté 98,5 %) provenait de Sigma-Aldrich (Produit des USA), la pyridine (pureté > 99,8 %, lot SH8G9492V) provenait de Sigma Aldrich (USA), l'huile de tournesol (de qualité alimentaire, biologique) provenait de Loblaws Canada (produit des USA), le *N*-bromosuccinimide (pureté > 99 %) provenait de Sigma Aldrich (USA), le phénylacétaldéhyde (pureté 90 %, lot MKBT1796V) provenait de Sigma-Aldrich (Canada), le sulfate de magnésium anhydre (pureté > 99 %) provenait de Fisher Scientific (Canada).

Les chromatographies sur couche mince (CCM), ont été effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck KGaA, Allemagne). Le gel de silice (400 mesh) utilisé pour la chromatographie éclair provenait de Canadian Life Science (Canada). Les embouts de pipettes en polypropylène translucide, de capacité de 1000 µL, provenaient de Sarstedt AG & Co. KG (Allemagne), les bouchons en liège provenaient de Fisher Scientific, (USA), les filtres à cigarette en acétate de cellulose (14 × 6 mm) provenaient de OCB (Espagne).

2.2 Préparation de la phéromone synthétique.

La phéromone synthétique préparée était un mélange de trois composés : du butanoate d'hexyle (HB), du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB) et du (*E*)-4-oxohex-2-énal (4OH).

Le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle a été préparé au laboratoire. Le (*E*)-hex-2-én-1-ol (4,00 mL, 33,9 mmol) a été dissous dans du dichlorométhane (68 mL). Ensuite, de la pyridine (5,25 mL, 69,6 mmol), suivie de l'anhydride butanoïque (6,20 mL, 37,9 mmol) ont été ajoutés. Le mélange, agité vigoureusement, a été maintenu à la température ambiante sous une atmosphère d'azote. Au bout de 18 heures, la réaction a été jugée complète par CCM, avec un mélange d'hexane et d'éther diéthylique 19 : 1 comme éluant. Postérieurement, le milieu réactionnel a été acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M (aq) pour éliminer les traces de pyridine et une extraction a été effectuée avec trois portions successives de dichlorométhane. L'extrait combiné a été lavé avec une solution d'ammoniaque concentrée 18 M (aq) pour détruire l'anhydride butanoïque résiduel, puis lavé avec de l'eau et séché avec du sulfate de magnésium anhydre. Ensuite, les solvants ont été évaporés avec un évaporateur rotatif sous vide. Le résidu a été purifié par chromatographie éclair avec du gel de silice et avec un mélange d'hexane et d'éther diéthylique 19 : 1 comme éluant. Le butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (3,94 g, 95 %) a été obtenu sous la forme d'une huile incolore, dont la pureté a été vérifiée par RMN ¹H.

Le (*E*)-4-oxohex-2-énal a été synthétisé au laboratoire via une modification de protocoles de la littérature (Moreira et Millar, 2005); (Fountain *et al.*, 2014). Du 2-éthylfurane (1,09 mL, 10,3 mmol) et de la pyridine (1,55 mL, 20,5 mmol) ont été dissous dans un mélange d'éther diéthylique, d'acétone et d'eau distillée 5 : 4 : 2 (60 mL). À 0 °C, du *N*-bromosuccinimide (2,51 g, 14,1 mmol) a été ajouté et le mélange, agité vigoureusement sous une atmosphère d'azote, a été maintenu à 0 °C (bain de glace) pendant 10 minutes, puis à la température ambiante (approximativement 22 °C). Au bout de 4 heures, la réaction a été jugée complète CCM, avec un mélange d'éther de pétrole et d'éther diéthylique 1 : 1 comme éluant. Postérieurement, le milieu réactionnel a été acidifié avec une solution d'acide chlorhydrique 2 M (aq) pour éliminer les traces de pyridine et une extraction a été effectuée avec trois portions successives de dichlorométhane. L'extrait combiné a été lavé avec de l'eau

et séché avec du sulfate de magnésium anhydre. Ensuite, les solvants ont été évaporés avec un évaporateur rotatif sous vide et le résidu a été purifié par chromatographie éclair avec du gel de silice et avec un mélange d'éther de pétrole et d'éther diéthylique 1 : 1 comme éluant. Le (*E*)-4-oxohex-2-éanal (0,55 g, 55,5 %) a été obtenu sous la forme d'une huile incolore, dont la pureté a été vérifiée par RMN ¹H.

2.3 Méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masses (GC-MS)

Les analyses des mélanges de composés volatils de ce travail ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Le chromatographe en phase gazeuse utilisé était de marque Agilent, modèle 7890A et il était couplé à un analyseur de masse également de marque Agilent, modèle 5975C. La colonne était une de marque Agilent, modèle HP-5MS non polaire, longueur de 30 m, diamètre interne de 250 µm, avec un revêtement de 0,25 µm d'épaisseur. Le gaz vecteur était de l'hélium (1 mL/min), le volume d'injection était de 1 µL en mode fractionné (*split*) au ratio de 10 : 1 dans un injecteur chauffé à 200 °C. À la sortie de la colonne, la ligne de transfert vers le spectromètre de masse était chauffée à 350 °C.

La température programmée pour les analyses était la suivante : température initiale de 50 °C, puis une rampe de chauffage de 1,5 °C/min jusqu'à 100 °C et par la suite, une rampe de 100 °C/min jusqu'à 300 °C, maintenue 3 min pour évacuer tout résidu de la colonne.

Dans les analyses GC-MS, les composés ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention et de leurs spectres de masse avec des standards purs (> 98 % de pureté, qu'ils soient issus de Sigma-Aldrich ou préparés au laboratoire de l'UQAM). Des courbes d'étalonnage ont été établies avec des solutions étalon préparées à partir de composés purs dans le dichlorométhane, avec l'ajout de benzoate d'éthyle comme

standard interne. Dans les conditions de température décrites ci-dessus, les temps de rétention observés étaient de 28,18 min, 28,52 min, 9,84 min et 25,72 min pour le HB, E2HB, 4OH et le benzoate d'éthyle, respectivement. Les ions sélectionnés pour la quantification étaient $m/Z = 84, 82, 83$ et 105, pour estimer les concentrations des composés.

2.4 Méthode d'analyse par résonance magnétique nucléaire.

La pureté et la structure moléculaire fine, incluant la stéréochimie, des composés obtenus par synthèse chimique et des substances volatiles utilisées comme attractifs ont été vérifiées avec une analyse utilisant la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H). Un échantillon (approximativement 5 mg) a été dissous dans du chloroforme deutéré (0,5 mL). L'appareil était un spectromètre RMN de marque Bruker (USA), modèle Ultrashield 300, fonctionnant à 300 MHz pour l'observation du proton. Les spectres ont été traités avec le logiciel TopSpin de Bruker.

2.5 Protocole de préparation des diffuseurs.

2.5.1 Formulation des solutions de phéromone synthétique

Une phéromone synthétique a été préparée à partir d'un mélange de HB, de E2HB et de 4OH dans la proportion 1 : 2,5 : 1,25 de la façon suivante. Une solution A a été préparée, contenant du HB (0,020 g/mL) et du E2HB (0,050 g/mL) dans de l'huile de tournesol. Une solution B a été préparée, contenant du 4OH (0,0715 g/mL) et du BHT (0,010 g/mL) comme préservatif, dans de l'huile de tournesol.

2.5.2 Formulation de la solution d'odeur florale synthétique

Une solution d'odeur florale synthétique a été préparée, contenant du phénylacétaldéhyde (0,100 g/mL) dans de l'huile de tournesol. Cette solution, imitant l'odeur de « fleurs blanches », a été rapportée comme attractive pour des punaises d'une espèce apparentée (Koczor *et al.*, 2012).

2.5.3 Fabrication des diffuseurs de substances volatiles

Afin d'obtenir une diffusion contrôlée des substances volatiles dans l'air, des diffuseurs peu coûteux ont été préparés au laboratoire. Un diffuseur consistait en un embout de pipette en polypropylène translucide de capacité de 1000 μ L ayant une petite ouverture de 0,2 mm. Par la grande ouverture de l'embout, un filtre à cigarette en acétate de cellulose (longueur de 14 mm, diamètre de 6 mm) a été installé. Ce dernier a été imprégné avec les solutions de substances volatiles appropriées puis la grande ouverture de l'embout a été fermée avec un bouchon en liège. Les diffuseurs de phéromone synthétique ont été imprégnés avec de la solution A (0,100 mL) et de la solution B (0,035 mL), procurant une charge de 2,06 mg HB, de 5,1 mg E2HB et de 2,5 mg 4OH. Les diffuseurs d'odeur florale synthétique ont été imprégnés avec de la solution de phénylacétaldéhyde (0,100 mL), procurant une charge de 10,0 mg de cette substance volatile. Les diffuseurs de phéromone et d'odeur florale synthétiques ont été conservés au congélateur (-20 °C) jusqu'au moment de leur utilisation.

2.6 Analyse du contenu des diffuseurs via extraction et chromatographie GC-MS.

Un diffuseur a été coupé avec un couteau propre, de façon à retirer le filtre à cigarette qui était imbibé de la solution de phéromone synthétique (figure 2.1). Le filtre à cigarette a été déposé dans un ballon à fond rond de 100 mL et du dichlorométhane (50,0 mL), contenant du benzoate d'éthyle ($4,00 \times 10^{-3}$ mg/mL) comme standard

interne, a été ajouté. Le mélange a été agité pendant 30 minutes à l'aide d'un barreau magnétique. Consécutivement, l'extrait a été filtré à travers une pipette Pasteur contenant du coton (ouate) et une portion de cet extrait (1,5 mL) a été déposée dans une bouteille à échantillon pour l'analyse par GC-MS, à l'aide d'une courbe d'étalonnage.



Figure 2.1 Séparation du filtre à cigarette d'un diffuseur de phéromones.

2.7 Protocole d'extraction de volatils à partir d'aération de diffuseurs.

Le but de cette expérience était de quantifier le taux de diffusion des substances volatiles dans l'air au laboratoire et d'estimer le taux de diffusion en champ. Pour atteindre cet objectif, un dispositif d'aération contrôlée a été monté au laboratoire. (Figure 2.2) Le principe consistait à aérer un diffuseur, avec une vitesse et une température constantes, et à en capter les volatils émis sur un matériau adsorbant (charbon actif), les extraire et les quantifier avec la GC-MS. Plus précisément, l'air ambiant a été poussé à l'aide d'une pompe à air de laboratoire (Neptune Dyna-Pump, Fisher Scientific, USA) équipée avec un débitmètre (LZM-6, GS02408, China). L'air à l'entrée était passé à travers un filtre, fabriqué à partir d'une pipette Pasteur remplie avec 150 mg de charbon actif 60 mesh. L'air entrant ensuite dans la chambre d'aération, soit un tuyau en verre de 20,0 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre

interne, qui contenait un diffuseur de phéromones à analyser. Conséquemment, à la sortie de la chambre d'aération, l'air a été passé à travers d'une cartouche d'adsorbant, fabriquée à partir d'une pipette Pasteur, remplie avec deux portions de charbon actif de 50 mg, séparées par un morceau de laine de verre d'approximativement 5 mg. Le charbon actif avait préalablement été lavé avec 5 mL de dichlorométhane et placé au moins 24 h dans une étuve à 110 °C. Les connexions entre les pièces de verrerie étaient des tuyaux en téflon pour éviter des pertes des volatiles ainsi que les contaminations. Finalement, le débit d'air à la sortie a été mesuré avec un autre débitmètre. Le débit d'air mesuré était de 1,36 L/min, ce qui correspond à une vitesse faciale de 4,6 cm/s, équivalent à 0,17 km/h. L'aération d'un diffuseur a été effectuée pendant 18 h à température ambiante. Ensuite, l'extraction des deux portions du charbon actif a été effectuée séparément. L'adsorbant a été déposé dans un ballon de 10 mL avec du dichlorométhane (3,00 mL), contenant du benzoate d'éthyle ($4,00 \times 10^{-3}$ mg/mL) comme standard interne et a été agité pendant 30 min à l'aide d'un barreau magnétique. Consécutivement, l'extrait a été filtré à travers une pipette Pasteur contenant du coton (ouate) et une portion (1,5 mL) a été déposée dans une bouteille à échantillon pour l'analyse par GC-MS, à l'aide d'une courbe d'étalonnage.



Figure 2.2 Dispositif d'aération contrôlée au laboratoire : (a) filtre de charbon actif; (b) diffuseur de phéromones ; (c) cartouche de charbon activé pour capter les volatiles ; (d) tuyau vers la pompe, en poussée.

2.8 Protocole de préparation et d'installation des pièges avec diffuseurs dans des champs de culture fraisière à l'été 2019 et à l'été 2020.

Pendant l'été 2019 et l'été 2020, de mai à septembre, grâce à une collaboration avec le Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel (CRAM), une expérience dans des champs de culture de fraises a été effectuée. Pour chacune de ces saisons, 15 sites ont été utilisés pour l'installation de pièges. Ces sites sont des fraisières commerciales en périphérie de Mirabel : cinq fraisières d'été (culture hâtive), cinq fraisières d'automne (culture tardive) et cinq fraisières produisant pendant la saison complète. Les détails des sites sont disponibles dans l'Annexe A.

La méthodologie consistait en la construction et l'installation de pièges pouvant accueillir des diffuseurs de phéromone synthétique et d'odeur forale synthétique. Un piège était constitué d'un piquet en bois ($2 \times 2 \times 45$ cm) planté de sorte qu'il émerge de 30 cm au-dessus du sol, surmonté par une feuille de polypropylène gaufré blanc de type Correx ($28,5 \times 23$ cm) pliée au centre, de façon à faire un toit à deux versants. La face supérieure du toit était enduite avec du gel collant en polybutène (Agralan) et un diffuseur était accroché en-dessous avec une attache en plastique, tel que montré à la Figure 2.3.



Figure 2.3 Piège collant, comportant un diffuseur de phéromone sexuelle synthétique, installé dans un champ de culture fraisière.

Sur chaque site étudié, l'installation de quatre types de pièges a été effectuée : (a) des pièges témoin, sans diffuseur ; (b) des pièges comportant un diffuseur de phéromone sexuelle synthétique ; (c) des pièges comportant un diffuseur d'odeur synthétique florale et (d) des pièges combo, comportant à la fois les deux types de diffuseurs. Enfin, des emplacements ont aussi été déterminés pour la capture manuelle de punaises ternes par la méthode du battage. Cette technique consistait en placer un tapis en plastique en dessous d'une plante et l'agiter fortement pendant cinq secondes, afin de vérifier s'il avait des insectes ou des larves tombés sur le tapis et de les compter. Chaque série de traitements a été répétée dans trois sections sur un même site, soit : au centre du champ, en bordure du champ et en milieu naturel en dehors du champ. On notera que les traitements en milieu naturel et en bordure de champ n'étaient jamais du même côté, voir figure 2.4. Toutes les deux semaines, les pièges étaient

ramassés et remplacés par de nouveaux traitements, dont le type était choisi de façon aléatoire à l'intérieur d'une série de traitements. Ultérieurement, les pièges ramassés ont été analysés visuellement pour compter les punaises ternes, mâles et femelles, piégées sur la surface collante.

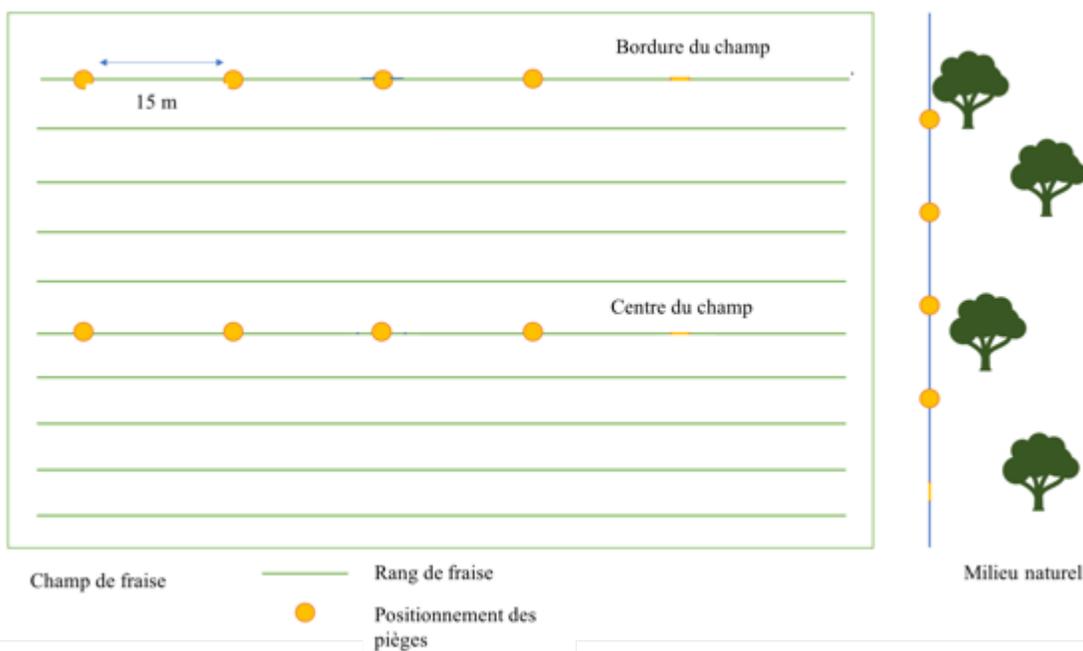


Figure 2.4 Disposition des pièges à phéromones. Un site consistait en une surface agricole divisée en 3 sections, soit le centre du champ, la bordure du champ et le milieu naturel à côté du champ. Chaque section comportait un exemplaire de chacun des quatre types de pièges mentionnés.

En 2019, le projet comprenait 15 sites, soit 5 champs de culture hâtive (du 30 mai au 10 juillet), 5 champs de culture tardive (du 11 juillet au 1^{er} octobre) ainsi que 5 champs de culture de saison complète (du 31 mai au 1^{er} octobre). Chacun des 15 sites accueillait 12 traitements, qui ont été renouvelés 8 fois chacun durant l'été, pour un

total de 960 diffuseurs installés vers la fin de l'été. En 2020, une disposition semblable des traitements a été faite, sauf que la date du début du projet a été retardée au 8 juin, et que le renouvellement a été effectué seulement 6 fois, pour un total 720 diffuseurs utilisés à la fin de l'été.

Dans le tableau 2.1, on observe les données météorologiques des mois à l'étude de l'été 2019 et l'été 2020. Ces conditions représentent les conditions environnementales à Mirabel pendant le déroulement de ce travail de recherche (Spark, 2020).

Tableau 2.1 Conditions météorologiques pendant les mois à l'étude de l'été 2019 et l'été 2020 à Mirabel, Québec.

(Environnement et ressources naturelles Québec, 2020).

Paramètre	2019					2020				
	Mai	Jui	Jul	Aoû	Sept	Jui	Jul	Aoû	Sep	
Température moyenne maximale (°C).	16,2	22,5	27,6	25,2	20,4	25	28,4	24,4	19,3	
Température moyenne minimale (°C).	5,3	9,9	14,4	11,8	8,3	10,9	16,1	13,1	7,4	
Température moyenne (°C).	10,75	16,2	21	18,5	14,35	17,95	22,25	18,75	13,35	
Vitesse du vent moyenne (km/h).	7,75	9,42	7,79	5,54	9,96	6,33	6,92	9,33	5,00	
Humidité relative moyenne (%).	54,42	79,83	71,46	65,58	73,88	53,04	66,50	69,67	78,71	

CHAPITRE III

RÉSULTATS, ANALYSE ET DISCUSSION.

Dans ce chapitre, les synthèses du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle et du (*E*)-4-oxohex-2-éanal sont décrites et discutées, avec à l'appui, des spectres RMN proton H⁺ de ces composés purs. En outre, on montre un schéma de préparation des diffuseurs de phéromone. Ensuite, le contenu des diffuseurs, avant et après leur utilisation dans des pièges sur le terrain, quantifié par GC-MS des substances volatiles, est décrit et analysé en termes de durabilité des diffuseurs sur le terrain. Les résultats de captation des substances volatiles émises par des diffuseurs au laboratoire sont également présentés et discutés, en termes de taux de libération de la phéromone synthétique. Ce taux de libération est comparé avec la différence de contenu des diffuseurs d'une part, mais aussi avec les quantités émises par les punaises ternes selon la littérature. Finalement, les résultats de piégeage de punaises ternes avec des diffuseurs utilisés dans des pièges sur le terrain, durant les étés 2019 et 2020, sont décrits et discutés, en termes d'efficacité de piégeage et de corrélation avec la densité d'insectes qui a été monitorée manuellement.

3.1 Schéma de synthèse du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle et du (*E*)-4-oxohex-2-éanal

La synthèse du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle a été effectuée par l'acylation du (*E*)-hex-2-én-1-ol avec l'anhydride *n*-butanoïque et la pyridine. (Voir la figure 3.1) Le rendement de la réaction, calculé à partir de l'alcool, oscillait autour de 90 % après la

purification par chromatographie éclair. Le défi de cette réaction résidait dans la surveillance de la consommation totale du réactif limitant, soit l'alcool. Ainsi, dans les premiers essais, un suivi par CCM était réalisé toutes les 30 minutes pendant quelques heures, avant d'établir que la réaction nécessitait idéalement toute la nuit, soit un temps de réaction d'environ 18 heures.

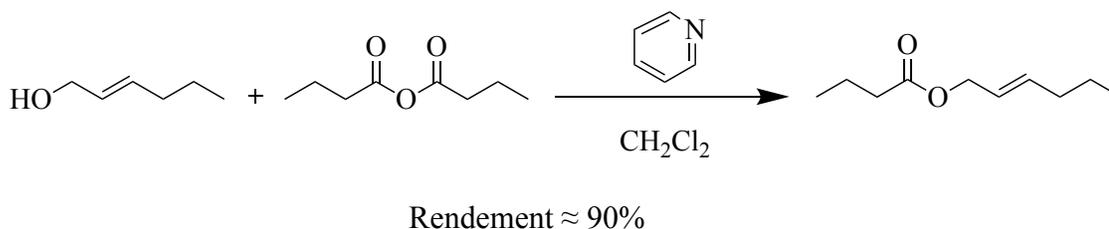
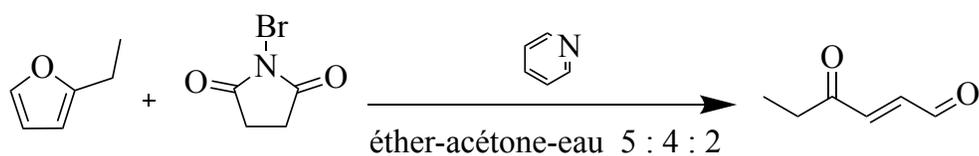


Figure 3.1 Synthèse du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle.

La synthèse du (*E*)-4-oxohex-2-éanal consiste en l'oxydation du 2-éthylfurane avec la *N*-bromosuccinimide et la pyridine. (Voir la figure 3.2) Le rendement de la réaction, calculé à partir du 2-éthylfurane, oscillait autour de 55 % à 65 % après la purification. Le défi de cette réaction réside dans la relativement haute volatilité du produit pur et dans sa fragilité face à l'oxydation, comme la plupart des aldéhydes, mais à plus forte raison dans le cas de cette petite molécule comportant aussi un groupement cétone, conjugué par un alcène au groupe aldéhyde. Cette combinaison de fonctionnalités hautement réactives fait du 4OH une molécule sensible aux réactions avec des nucléophiles, mais aussi probablement sujette à diverses réactions impliquant des radicaux libres ainsi que l'oxygène présent dans l'air. Cela explique les pertes lors de la réaction et de la purification. En guise de précaution, le produit purifié a été ensuite conservé en solution dans de l'huile de tournesol contenant du BHT à 1 % (10 mg/mL) pour éviter son oxydation prématurée par l'oxygène de l'air.



Rendement \approx 60%

Figure 3.2 Synthèse du (*E*)-4-oxohex-2-éнал.

3.2 Spectres RMN ^1H du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle et du (*E*)-4-oxohex-2-éнал purs.

Dans le spectre du E2HB, on observe neuf signaux de protons. En particulier, on a pu constater qu'il s'agit bien de l'isomère *E*, car pour les protons alcéniques 2 et 3, situés à 5,75 ppm et 5,58 ppm, on a mesuré une constante de couplage égale à 15,7 Hz, soit à l'intérieur des valeurs 11 à 18 Hz, caractéristiques des protons en position relative *trans*, sur un alcène (Silverstein et Bassler, 1962) (Figure 3.3). La configuration *E* du substrat hex-2-éнал a donc bien été conservée, comme attendu.

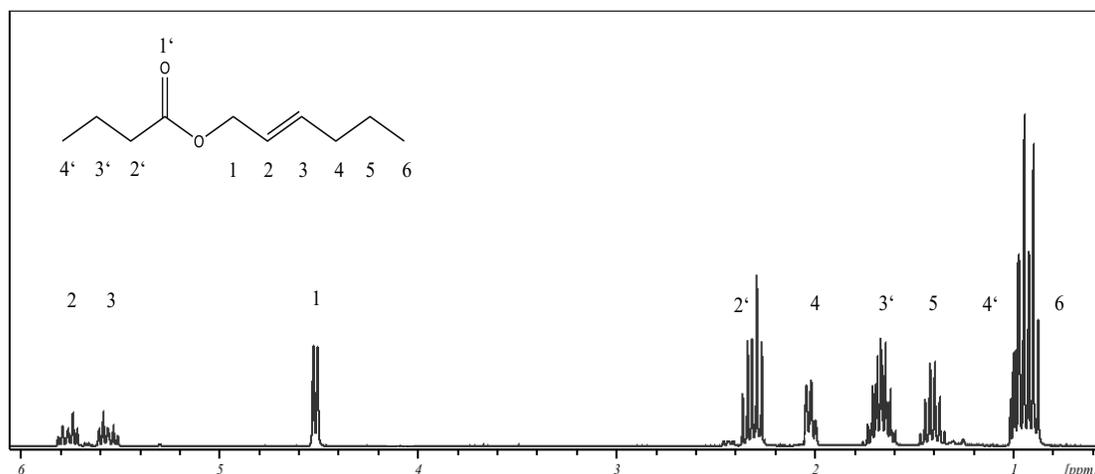


Figure 3.3 Spectre RMN ^1H du composé E2HB purifié.

Dans le spectre du 4OH, on observe cinq signaux de protons. De même, on est capable d'observer une constante de couplage caractéristique de 15 Hz pour la configuration *E* de l'alcène au sein de la molécule (Figure 3.4).

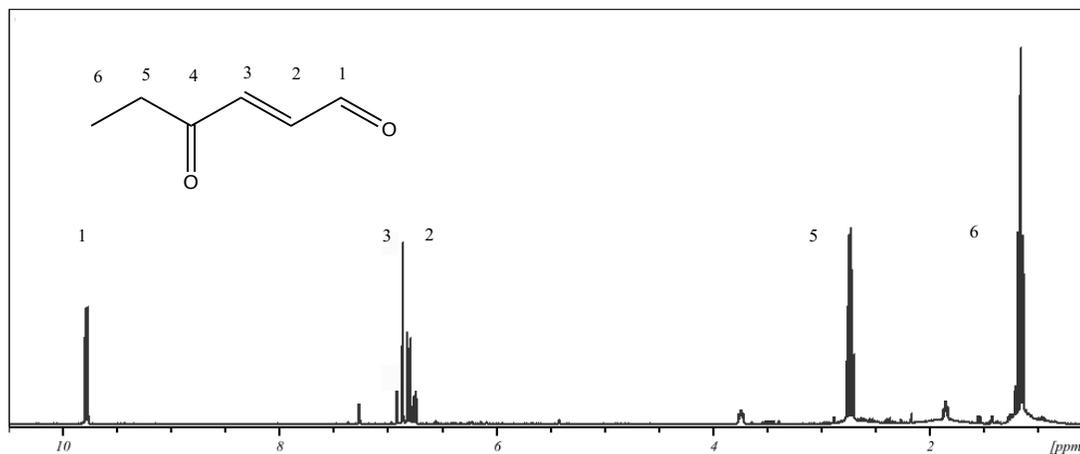


Figure 3.4 Spectre RMN ¹H du composé 4OH purifié.

Par ailleurs, afin d'améliorer le rendement, une autre méthode de synthèse du 4OH a été testée (Annangudi *et al.*, 2005), soit l'oxydation du 2-éthylfurane avec l'acide 3-chloroperoxybenzoïque (mCPBA) dans un solvant combinant du tétrahydrofurane, de l'acétone et de l'eau. Avec cette méthode, au lieu de l'isomère *E*, c'est l'isomère (*Z*)-4-oxohex-2-énal (voir Figure 3.5) qui a été obtenu, tel qu'on a pu observer par RMN ¹H.

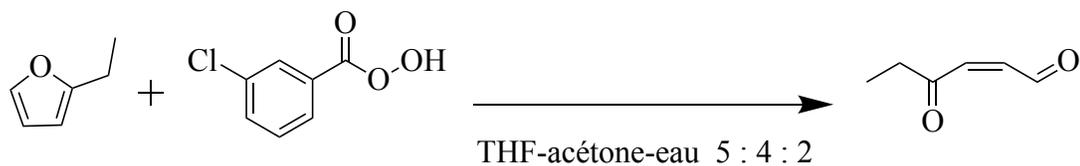


Figure 3.5 Synthèse du (Z)-4-oxohex-2-énal.

En effet, la constante de couplage entre les protons alcéniques, situés à 7,32 ppm et 7,51 ppm, était de 10,2 Hz, valeur typique de couplage entre des protons en position relative *cis* sur un alcène. (Voir Figure 3.6) Grâce à l'obtention de l'isomère *Z* avec cette méthode alternative, on a pu confirmer l'identité de l'isomère *E* obtenu avec la précédente méthode (Figure 3.4). Bien qu'il aurait pu être intéressant de tester l'attractivité de l'isomère géométrique *Z* au regard des punaises ternes, il s'avère que ce composé, lors du stockage durant seulement quelques jours, était converti en isomère *E*, probablement plus stable. D'ailleurs, en raison de son instabilité, le composé *Z* n'a pas pu être purifié et c'est donc le spectre RMN ^1H brut, non purifié, qui a été analysé. Pour ces mêmes raisons, le rendement de la réaction n'a pas été évalué.

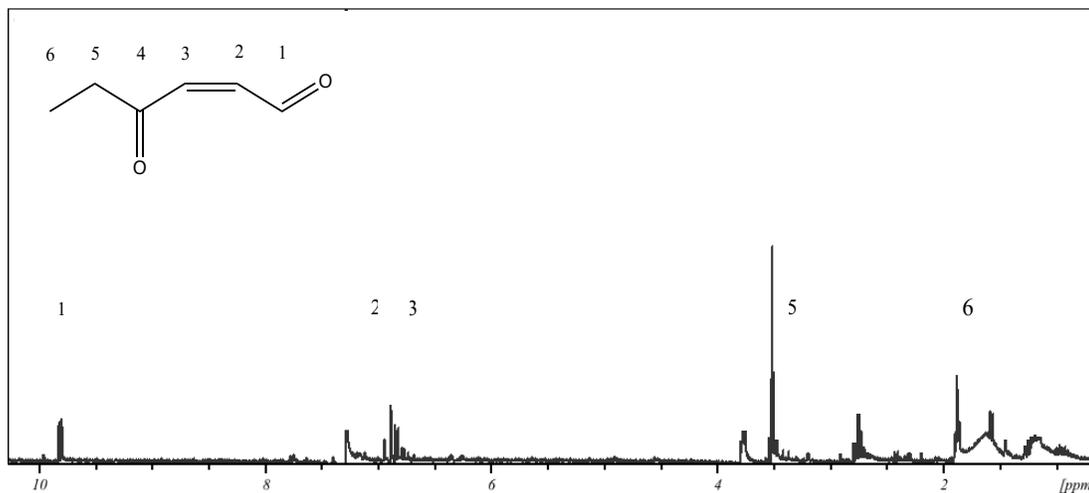


Figure 3.6 Spectre RMN ^1H de l'isomère (*Z*)-4-oxo-2-hexéнал brut. Sur le spectre, on observe les valeurs typiques de constante de couplage J_3 , soit 10,2 Hz pour les alcènes de géométrie *Z*.

3.3 Analyse du contenu des diffuseurs neufs par extraction liquide et chromatographie GC-MS.

Toutes les deux semaines, 60 diffuseurs de phéromone sexuelle et 60 diffuseurs d'odeur florale étaient préparés (Figure 3.7).



Figure 3.7 Boite de 60 diffuseurs de la phéromone sexuelle. Chaque diffuseur a été fabriqué à partir d'un embout de pipette en polypropylène de 1 mL contenant un filtre à cigarette en acétate de cellulose, ensuite fermé avec un bouchon en liège.

Il était essentiel de vérifier l'uniformité du remplissage des diffuseurs et de déterminer le taux de récupération de notre méthode d'extraction liquide. Ainsi, les quantités de composés présents dans les diffuseurs, immédiatement après leur préparation ou après quelques jours de conservation au congélateur, ont été déterminées par des extractions et des analyses GC-MS. Les échantillons ont été préparés et analysés selon la procédure de la section 2.5 Contenu des diffuseurs, décrite dans le chapitre 2 Matériel et méthodes. En clair, l'extraction du filtre de cigarette a été faite avec une solution de benzoate d'éthyle comme étalon standard interne (SI) dans le dichlorométhane. La solution a ensuite été analysée par chromatographie GC-MS.

Dans les chromatogrammes de GC-MS représentés sous forme de graphiques, l'axe X indique le temps de rétention, soit le temps nécessaire au composé pour atteindre le

détecteur en bout de colonne. Avec la colonne HP-5MS, qui est non polaire, les composés progressent simplement selon leur degré de volatilité : les composés plus volatiles passent une plus grande partie de leur temps dans la colonne sous forme gazeuse et sont donc entraînés plus rapidement par le gaz porteur, ici l'hélium. Les substances plus volatiles, donc à plus faible température d'ébullition, ont des temps de rétention inférieurs à ceux des substances moins volatiles. L'axe Y indique l'intensité du signal au détecteur, ici étant les ions qui sont générés dans la source à impact électronique et détectés par le spectromètre de masse à quadripôle. Cette mesure de l'intensité peut être considérée comme une mesure de la quantité du composé à condition qu'on compare avec l'intensité d'une concentration connue de l'analyte (Eurofins, 2020).

Le couplage du spectromètre de masse (MS) fournit une indication de la quantité de l'analyte présent, mais de plus, un avantage spécifique se trouve dans l'obtention de la masse moléculaire, ainsi que des fragments, à travers les spectres de masse d'ionisation électronique. La masse moléculaire et les fragments sont indicatifs de la composition atomique, qui peut être utile pour trouver la structure d'une molécule.

Le résultat d'une analyse de GC-MS peut être représenté sous différents modes, le mode chromatogramme d'ions totaux (TIC, *total ion chromatogram*) est celui qui montre tous les ions qui ont été détectés lors d'une analyse particulière. De toutes les données examinées par l'analyste, il s'agit de la plus importante, car elle représente la «vue d'ensemble», elle sert à identifier dans un premier temps, le temps de rétention et les valeurs m/z des analytes contenues dans un échantillon (Stauffer *et al.*, 2007). Dans notre analyse, on a utilisé le mode de surveillance des ions sélectionnés (SIM, *selected ion monitoring*). Ce mode de visualisation fait référence à l'utilisation de l'instrument pour enregistrer le courant ionique à des masses sélectionnées qui sont caractéristiques du composé d'intérêt dans une fenêtre de temps de rétention prévue. Dans ce mode, le spectromètre de masse ne passe pas de temps à balayer toute la

plage de masse, mais change rapidement entre les valeurs m/z pour lesquelles des ions caractéristiques sont attendus (Kitson *et al.*, 1996). De cette façon, on a commencé par une analyse TIC pour identifier les temps de rétention et valeurs m/z caractéristiques de nos composés, pour postérieurement programmer l'appareil à se concentrer seulement sur ces derniers (SIM). L'avantage du mode SIM par rapport au mode TIC réside dans la possibilité de sélectionner un ion spécifique dans un mélange, pour visualiser sélectivement des composés même si d'autres molécules ne sont pas bien séparées par l'étape de chromatographie. Cela permet la quantification des signaux qui sont difficilement séparés, tels que les analytes HB et E2HB dans notre étude. (Zhang, W. et Zhao, 2014).

Bien que le SIM soit sensible aux molécules présentes à l'échelle des picogrammes, cette sensibilité dépend fortement de la matrice contenant les composés d'intérêt et des interférences chimiques présentes. Souvent, il est pratiquement possible de détecter des nanogrammes de composés. Afin que le signal du détecteur soit vraiment relié à la concentration de la substance en solution, il est nécessaire de minimiser l'effet de la variabilité du volume d'injection, en même temps que les effets de matrice et autres interférences. Pour cette raison, on utilise un étalon interne à une concentration connue, ce qui permet de relier adéquatement les quantités des composés contenus dans un mélange avec le ratio des intensités des signaux de ces composés avec l'intensité du signal de l'étalon interne, qui est de concentration constante.

Dans les analyses des composés de la phéromone sexuelle synthétique, les temps de rétention (en minutes) caractéristiques pour nos composés, que l'on a observés sont : 28,20 pour HB, 28,56 pour E2HB, 9,90 pour 4OH et 25,77 pour le benzoate d'éthyle (étalon interne). Comme les esters HB et E2HB sont piètrement séparés, on a dû se résoudre à utiliser, non pas le signal TIC qui est plus intense, mais le signal SIM, qui est plus sélectif mais moins intense. Les ions sélectionnés pour l'analyse en mode

SIM ont été, pour HB, E2HB, 4OH et le benzoate d'éthyle, les m/z 84, 82, 83 et 105, respectivement. La figure 3.8 donne un exemple de chromatogramme des signaux des substances extraites d'un diffuseur de phéromone sexuelle.

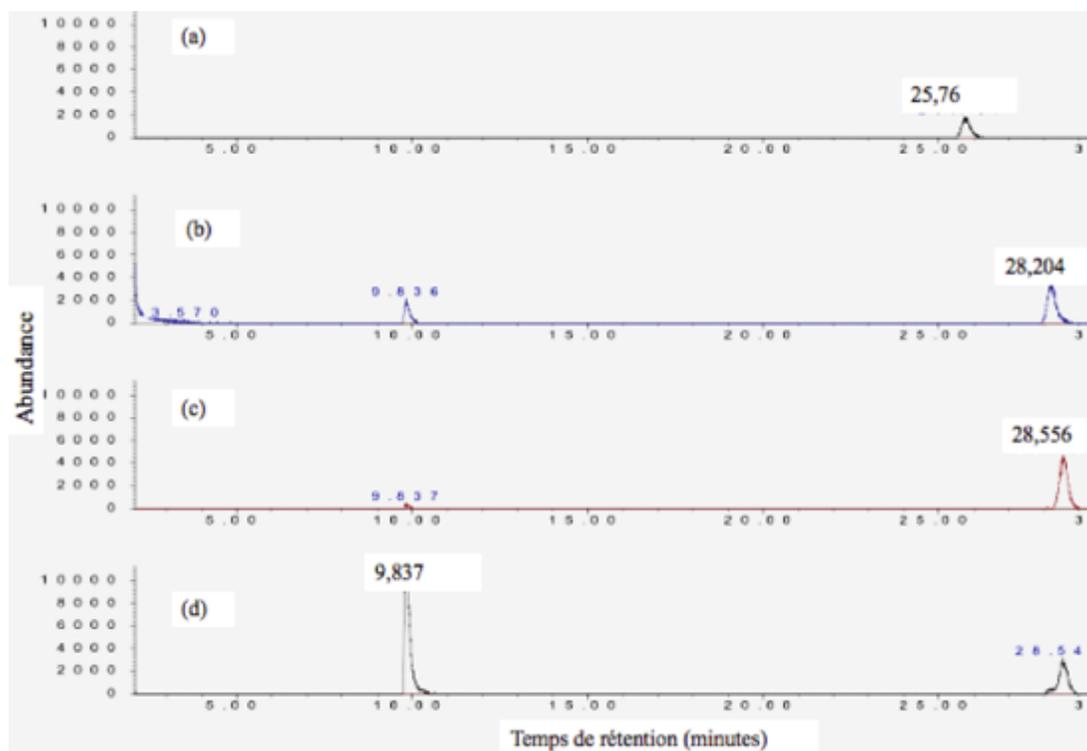


Figure 3.8 Chromatogramme d'un diffuseur extrait immédiatement après sa préparation. Mode SIM : ion 105 m/z : benzoate d'éthyle (étalon interne) (a) ; ion 84 m/z : HB (b) ; ion 82 m/z : E2HB (c) ; ion 83 m/z : 4OH (d).

Une analyse quantitative fut réalisée à l'aide d'une courbe d'étalonnage. En effet, une solution standard de HB, de E2HB, du 4OH et du benzoate d'éthyle comme étalon interne a été préparée. Consécutivement, cinq solutions étalon avec des concentrations allant de 0,0200 mg/mL jusqu'à 0,350 mg/mL des analytes (HB, E2HB et 4OH) et contenant l'étalon interne benzoate d'éthyle à 0,00400 mg/mL ont été préparées. (Annexe B) Ces solutions ont été analysées en GC-MS pour construire

une courbe d'étalonnage qui servira à quantifier les échantillons issus des extractions de diffuseurs.

Dans la figure 3.9, on observe que les courbes d'étalonnage de HB, de E2HB et de 4OH donnent des coefficients de corrélation linéaire supérieure à $R^2 \geq 0,99$. Les équations de régression linéaire issues des courbes d'étalonnage ont donc pu être utilisées pour déterminer le contenu en phéromone des extraits des diffuseurs.

Dans la figure 3.9, le ratio de la valeur de la surface de l'analyte sur la surface du standard interne représente une magnitude de la corrélation de la concentration des étalons. Autrement dit, au fur et à mesure qu'on augmente la concentration des étalons, l'aire des pics des analytes dans le chromatogramme augmentent, cette réciprocity nous permet de normaliser les valeurs des signaux.

L'extraction et l'analyse de six diffuseurs neufs, immédiatement après leur préparation, a été réalisée. Les quantités moyennes de sémiochimiques qui ont été déterminées sont très proches des quantités utilisées pour préparer ces diffuseurs, tel que présenté au tableau 3.1. En effet, on a pu évaluer le taux de récupération de l'extraction comme étant 91 % pour HB, 100 % pour E2HB et 99 % pour 4OH. L'écart-type relativement faible indique que la préparation des diffuseurs semble uniforme. En conséquence, le rapport des substances volatiles (HB : E2HB : 4OH) dans les extraits fut très proche de ce qui a été préparé, soit : 1 : 2,7 : 1,3. (Voir le tableau 3.1.)

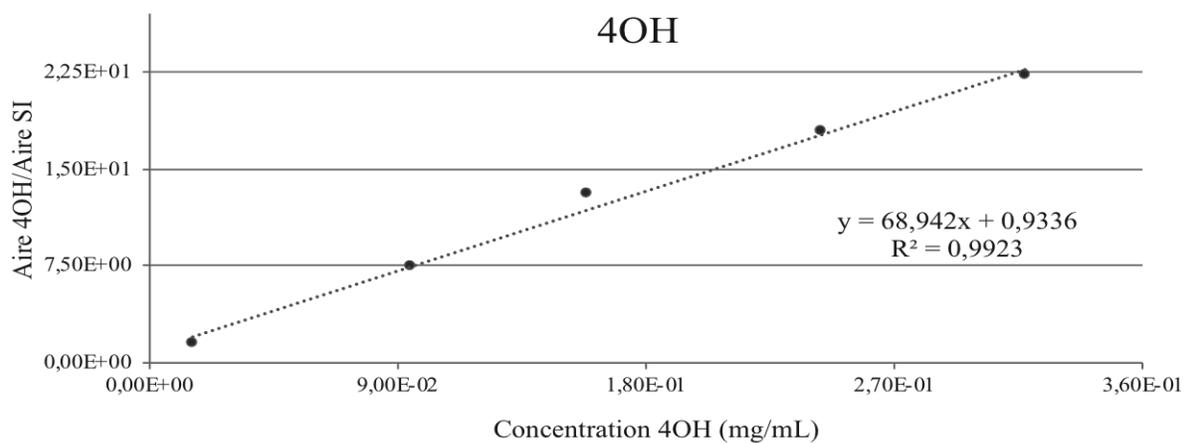
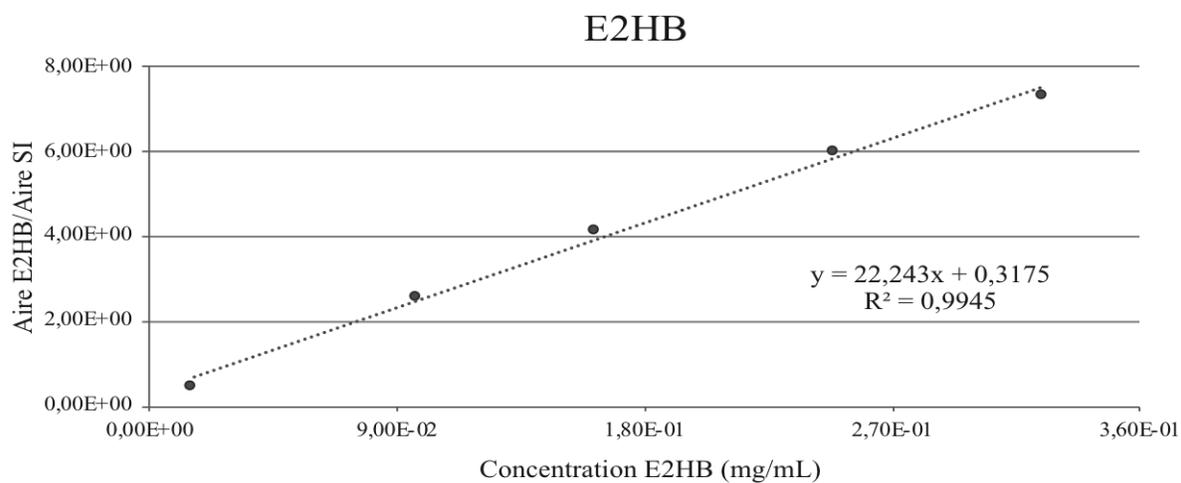
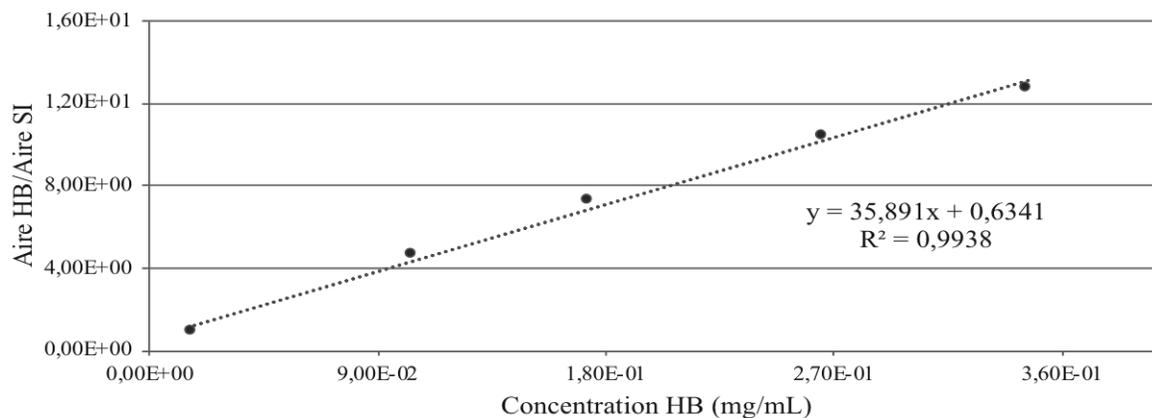


Figure 3.9 Courbe d'étalonnage en GC-MS, mode SIM, pour les extractions du contenu des diffuseurs. Ratios des surfaces, par rapport à l'étalon interne benzoate d'éthyle, de HB (a), de E2HB (b) et de 4OH (c).

Tableau 3.1 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, immédiatement après leur fabrication. (N=6)

Composés	Quantité trouvée (mg)	Écart-type (mg)	Quantité attendue (mg)	Taux de récupération (%)	Rapport
Butanoate d'hexyle	1,9	0,11	2,0	91	1
Butanoate de (<i>E</i>)-2-hexényle	5,1	0,14	5,1	100	2,7
(<i>E</i>)-4-Oxohex-2-éanal	2,5	0,07	2,5	99	1,3

En outre, les extraits des diffuseurs conservés au congélateur pendant 14 jours ont été analysés avec la même méthodologie. Les résultats obtenus sont tout à fait semblables à ceux obtenus avec des diffuseurs immédiatement après leur préparation, tant au niveau des quantités moyennes des analytes que des écarts-type. On peut donc affirmer que la congélation est une bonne méthode pour conserver les diffuseurs de phéromones synthétiques, du moins pour quelques jours. (Voir le tableau 3.2.)

Tableau 3.2 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, après la conservation au congélateur pendant 14 jours. (N=6).

Composés	Quantité trouvée (mg)	Écart-type (mg)	Quantité attendue (mg)	Taux de récupération (%)	Rapport
Butanoate d'hexyle	1,9	0,1	2,0	91	1
Butanoate de (<i>E</i>)-2-hexényle	5,1	0,1	5,1	100	2,7
(<i>E</i>)-4-Oxohept-2-énal	2,5	0,1	2,5	99	1,3

3.4 Analyse du contenu en substances volatiles des diffuseurs après leur utilisation sur le terrain.

Pendant les mois d'été des années 2019 et 2020 où on a utilisé des diffuseurs dans des pièges en culture fraisière (voir Annexe A), avec des conditions de température moyennes telles que décrites sur le tableau 2.1 (Environnement et ressources naturelles Québec, 2020) (Spark, 2020). Dans ces conditions, il était à prévoir que les substances volatiles allaient s'évaporer, du moins partiellement. D'ailleurs, cette évaporation était même souhaitable, afin de potentiellement attirer des punaises dans les pièges. En conséquence, on s'est intéressé à quantifier le contenu en substances volatiles des diffuseurs, suite à leur utilisation dans les pièges sur le terrain. Pour cette raison, trois diffuseurs choisis au hasard, utilisés pendant deux semaines dans des pièges, ont été soumis à la procédure d'extraction et d'analyse par GC-MS déjà décrite au chapitre 2, Matériel et méthodes. Les résultats obtenus montrent la quantité de substances volatiles qui persistent dans les diffuseurs, suite à une exposition au grand air dans les conditions climatiques décrites ci-dessus. Ainsi, on retrouve encore les trois composants de la phéromone sexuelle dans les diffuseurs après deux

semaines, bien que les quantités restantes trouvées dans les diffuseurs usagés aient été, tel que prévu, inférieures à celles dans les diffuseurs neufs. (Voir le tableau 3.3.) Le fait qu'il reste une quantité appréciable des substances odorantes dans les diffuseurs nous permet de confirmer que les quantités de substances volatiles utilisées accomplissent les expectatives de diffusion dans les conditions météorologiques à Mirabel pendant la période de l'étude. On remarque donc que, s'il reste environ la moitié des esters de la phéromone synthétique (38 % pour HB et 48 % pour E2HB), l'aldéhyde 4OH a été autrement plus consommé, car il n'en reste que 22 % par rapport à ce qui a été placé au début. Ceci peut être la conséquence de la volatilité estimée plus élevée du 4OH (Tableau 1.4), mais aussi possiblement, de la dégradation accélérée de ce composé plus sensible. En conséquence du résiduel plus faible de 4OH, le rapport des sémiochimiques HB, E2HB et 4OH dans les diffuseurs est passé, après deux semaines, à 1 : 3,1 : 0,7. Si l'on compare avec le ratio initial préparé, qui était de 1 : 2,5 : 1,25, il y a donc lieu de s'inquiéter de la durabilité des diffuseurs quant à leur contenu en 4OH, et par là, de la diminution accélérée du taux de libération de ce composé au fil du temps.

À partir des résultats d'analyse du contenu restant dans les diffuseurs usagés, on peut déduire la quantité qui a donc été consommée, durant cette période de deux semaines. Ainsi, on peut estimer que la consommation va comme suit :

- HB : 1,20 mg durant la période, soit en moyenne 85 µg/jour ;
- E2HB : 2,65 mg durant la période, soit en moyenne 190 µg/jour ;
- 4OH : 1,95 mg durant la période, soit en moyenne 140 µg/jour.

Tableau 3.3 Quantification des substances volatiles dans des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, après deux semaines d'utilisation sur le terrain. (N=3).

Composés	Quantité trouvée (mg)	Écart-type (mg)	Quantité préparée (mg)	Portion restante (%)	Rapport restant
Butanoate d'hexyle	0,79	0,1	2,0	38	1
Butanoate de (<i>E</i>)-2-hexényle	2,45	0,1	5,2	48	3.1
(<i>E</i>)-4-Oxohept-2-énal	0,55	0,1	2,5	22	0,7

Bien que l'on serait tenté de déterminer, à partir de ces analyses de diffuseurs usagés, un « taux de libération de la phéromone », il est préférable de s'en tenir au terme « taux de consommation de la phéromone », car celui-ci inclut bien sûr la libération dans l'air, mais aussi la dégradation des composantes de la phéromone lorsqu'elle est exposée aux conditions de température, mais aussi d'humidité et d'ensoleillement, sur le terrain. La section suivante s'intéresse au taux de libération proprement dit, de chacune des substances lorsqu'un diffuseur est aéré au laboratoire.

3.5 Taux de libération de la phéromone via l'aération et la captation des substances volatiles émises par des diffuseurs au laboratoire.

Tel que vu à la section précédente, on ne peut pas lier directement la quantité de phéromone consommée sur le terrain à la quantité réellement libérée à partir d'un diffuseur. On a donc étudié la libération dans l'air des substances volatiles à partir d'un diffuseur de phéromone, en conditions contrôlées au laboratoire, dans le but

d'établir le taux de libération horaire ou quotidien. Si le taux de libération au laboratoire peut s'avérer une piètre prédiction analytique de la quantité absolue de sémiochimiques diffusée sur le terrain en raison des conditions atmosphériques différentes, il peut s'avérer bien utile pour comparer différents types de diffuseurs ou de formulations ainsi que pour obtenir une bonne idée des proportions de chaque constituant dans les vapeurs.

Les conditions expérimentales d'aération, de captation puis d'extraction sont décrites dans le chapitre 2, Matériel et méthodes. Une analyse quantitative des substances ainsi libérées et captées a été réalisée à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie spécialement pour la captation de volatiles, en raison des plus faibles concentrations d'analytes inhérentes à l'aération. En effet, une solution standard de HB, de E2HB, de 4OH et du benzoate d'éthyle comme standard interne a été préparée. Consécutivement, cinq solutions étalon avec des concentration allant de $3,18 \times 10^{-3}$ mg/mL jusqu'à $1,50 \times 10^{-2}$ mg/mL des analytes (HB, E2HB et 4OH) et contenant l'étalon interne benzoate d'éthyle à $4,00 \times 10^{-3}$ mg/mL ont été préparées (Annexe C).

Dans la figure 3.10, on observe que les courbes d'étalonnage de HB, de E2HB et de 4OH donnent une relation linéaire entre la concentration de l'analyte et l'aire des pics des ions sélectionnés de cette substance, normalisée par rapport à l'aire du signal du standard interne. En effet, des coefficients de corrélation linéaire obtenus ont été satisfaisants, avec $R^2 \geq 0,99$. Les équations de régression linéaire issues des courbes d'étalonnage ont donc pu être utilisées pour déterminer le contenu en phéromone des extraits issus des aérations des diffuseurs.

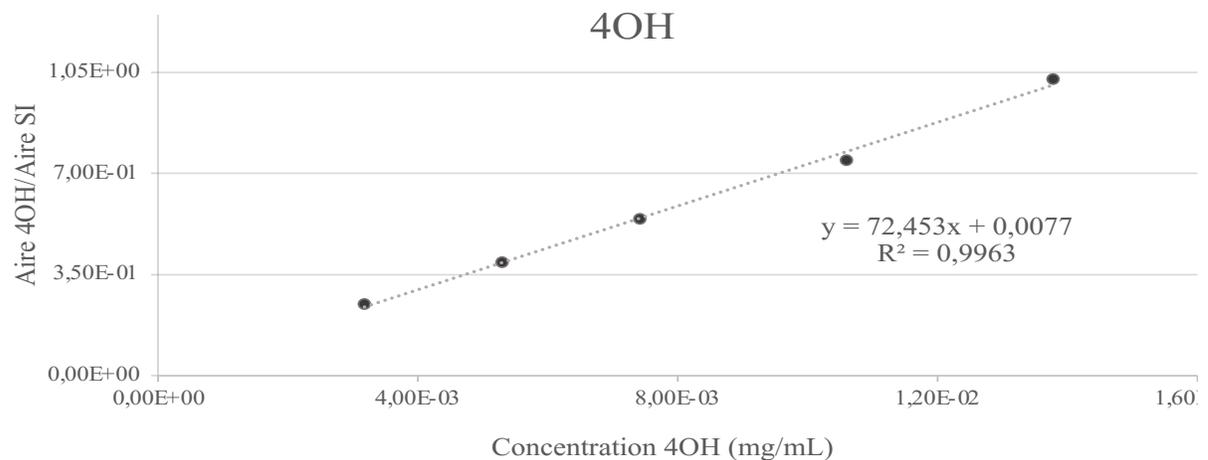
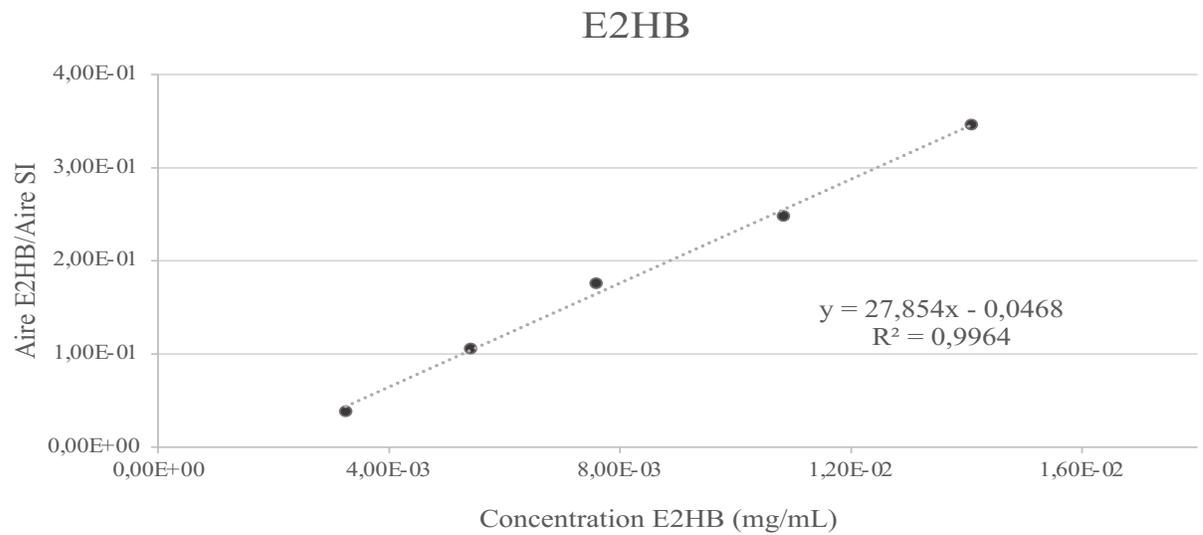
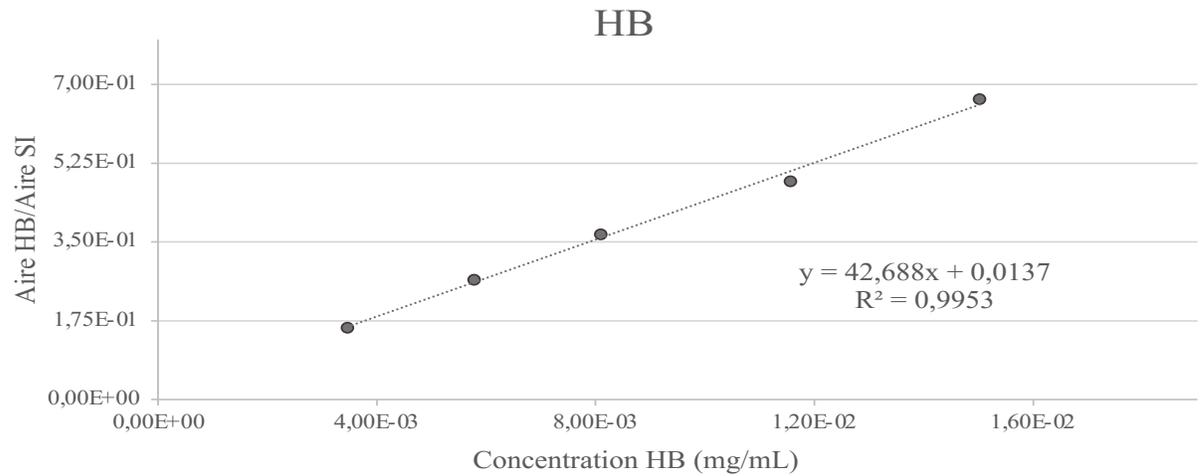


Figure 3.10 Courbe d'étalonnage en GC-MS, mode SIM, pour les aérations des diffuseurs au laboratoire. Ratios des surfaces, par rapport à l'étalon interne benzoate d'éthyle, de HB (a), de E2HB (b) et de 4OH (c).

L'analyse par aération et captation des diffuseurs a été réalisée à partir de trois diffuseurs fraîchement préparés. Les quantités moyennes de chacune des trois substances volatiles sont présentées au tableau 3.4. On remarquera que la quantité totale de substances libérées a été d'environ 50 µg durant la totalité de la durée de l'aération. Comme l'aération et la captation des diffuseurs ont été réalisées pendant 18 heures, le taux moyen de substances volatiles libérée se monte à 67 µg/jour, ou près de 3 µg/h. On remarque que les ratios HB : E2HB : 4OH trouvés sont très proches des ratios utilisés pour la préparation des diffuseurs, et ce, même si l'aldéhyde est plus volatil que les esters. Logiquement, l'aldéhyde devrait se libérer plus rapidement en raison de sa volatilité, mais comme ce n'est pas ce qui est observé lors de la captation, on peut poser l'hypothèse que ce composé non seulement se volatilise, mais aussi qu'une portion non négligeable de celui-ci se dégrade. Cela demeure du niveau hypothétique, car aucun composé de dégradation de 4OH n'a été identifié lors de la chromatographie GC-MS.

Tableau 3.4 Quantification des substances volatiles libérées par des diffuseurs de phéromone sexuelle synthétique, par aération au laboratoire pendant 18 heures (N=3).

Composés	Quantité captée (µg)	Écart-type (µg)	Taux de libération (µg/jour)	Taux de libération (ng/h)	Rapport
Butanoate d'hexyle	10,1	1,0	13,4	561	1
Butanoate de (E)-2-hexényle	27,9	1,3	37,2	1550	2,8
(E)-4-Oxohex-2-énal	12,5	0,7	16,7	696	1,2

Enfin, si l'on trace un parallèle entre, d'une part, les taux quotidiens moyens de substances volatiles consommées (414 µg/jour, section précédente) et les taux

quotidiens des composés libérés (67 µg/jour), il est évident que la méthode d'aération et captation au laboratoire sous-évalue, ici par un facteur 6, la quantité qui sera consommée sur le terrain. Néanmoins, cette incertitude, qui demeure quand même en-deçà d'un ordre de grandeur, est selon nous acceptable étant donné tous les facteurs impondérables des essais réalisés sur le terrain. En particulier, la température, la vitesse du vent ainsi que l'effet accélérateur de l'ensoleillement lors d'une chaude journée d'été peuvent influencer considérablement le taux de libération ainsi que, particulièrement pour l'aldéhyde 4OH, le taux de dégradation des substances formulées dans les diffuseurs de phéromone. Par ailleurs, les taux de libération doivent normalement diminuer au fil des jours, en raison de l'épuisement progressif des substances volatiles. Cela rend très hasardeuse l'idée de convertir une consommation sur 14 jours, en taux de libération quotidien, bien sûr. De plus, si l'on compare la quantité de sémiochimiques libérée par nos diffuseurs (2800 ng/h, évaluée par aération et captation), avec celle émise par les punaises ternes femelles calmes (tableau 1.2, 130 ng/h selon Wardle et al., 83 ng/h selon Zhang et al., soit une moyenne d'environ 100 ng/h), un diffuseur libère donc une quantité de phéromone équivalente à celle émise par environ 25-30 insectes femelles. Ce facteur multiplicatif est avantageux dans le but d'attirer des mâles dans des pièges sur le terrain, car un diffuseur devrait émettre davantage de phéromone pour qu'il soit plus attractif qu'une femelle qui appelle.

3.6 Résultats de piégeage des punaises ternes avec des diffuseurs préparés au laboratoire.

Le projet de piégeage de *Lygus lineolaris* en utilisant une phéromone sexuelle avait commencé durant l'été 2018 avec un produit de préparation commerciale, composé des sémiochimiques HB, E2HB et 4OH (Chouinard-Thuly *et al.*, 2020). Cette phéromone, installée dans les pièges sous la forme d'une pastille, avait une composition théorique HB : E2HB : 4OH de 4 : 10 : 7. Cela dit, suite à l'extraction et

l'analyse GC-MS de quelques pastilles, on a trouvé que le ratio était plutôt 3 : 10 : 2, les pastilles contenant en moyenne 4.4 mg de HB, 13.8 mg de E2HB et 2.5 mg de 4OH. Dans la figure 3.13, on observe que les pièges collants ont capturé environ 1,64 fois plus de punaises ternes mâles que de femelles vers la fin de l'été ($LRT_1 = 110,93$; $p < 0,0001$). Cependant, dans la figure 3.11 on observe que la plupart de captures de ces insectes a été réalisée dans les pièges appâtés avec l'odeur florale (phénylacétaldéhyde) ou les pièges témoins. Les pièges à phéromones (combiné ou non à l'odeur florale) ont capturé de 1,83 à 2,32 fois moins d'individus que les pièges témoin ou avec l'odeur florale seulement ($LRT_3 = 24,29$; $p < 0,0001$) (Figure 3.13) (Dumont *et al.*, 2020). Cette première expérience de piégeage des punaises ternes en utilisant une phéromone synthétique était donc un échec.

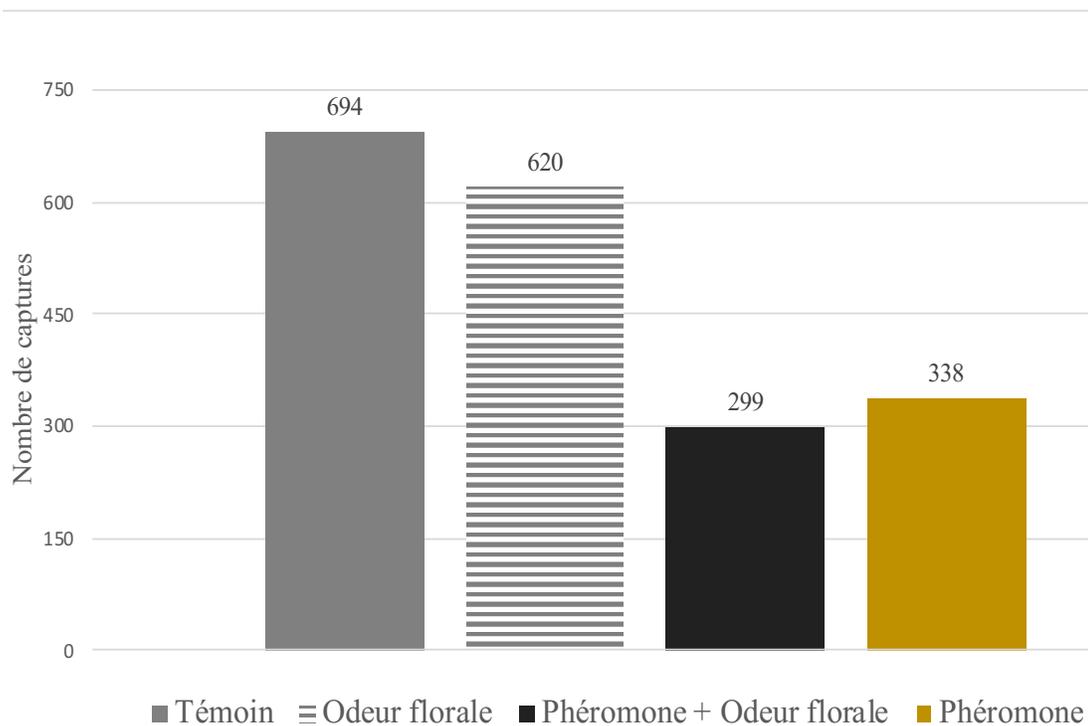


Figure 3.11 Nombre total de captures de la punaise terne en fonction du type de piège, pour la saison 2018.

En outre, dans la Figure 3.12 on observe la comparaison d'un piège au début de la période de capture et deux semaines après. Chaque piège était ramassé et les insectes étaient comptés séparément, mâles et femelles.

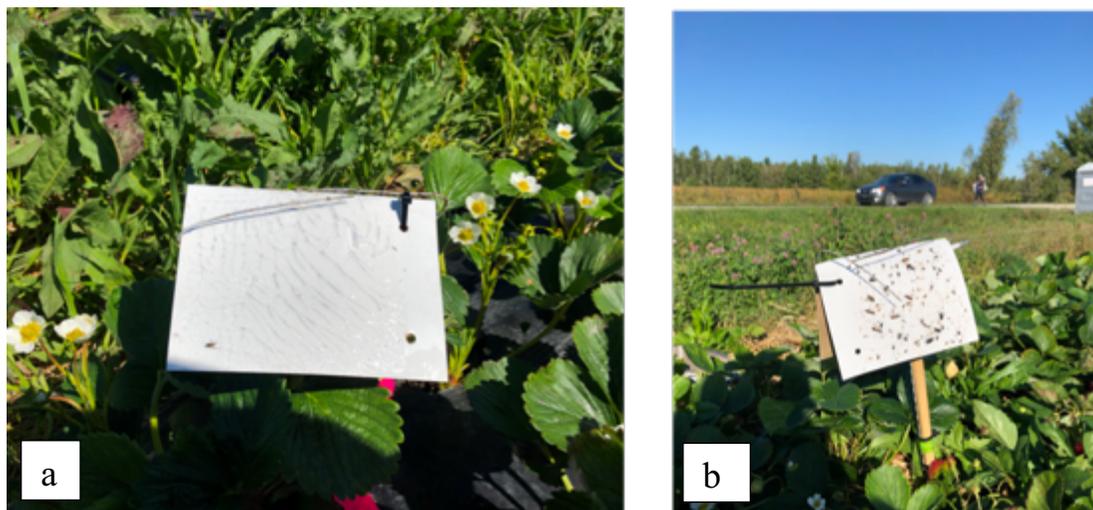


Figure 3.12 Comparaison d'un piège à phéromones neuf (a) et après deux semaines d'utilisation (b).

En raison de l'apparente indifférence des insectes à la formulation commerciale de la phéromone utilisée en 2018, une autre formulation fabriquée dans notre laboratoire à l'UQAM a été testée en 2019 et en 2020. Les travaux de Byers (Byers *et al.*, 2013) montraient que pour attirer *L. lineolaris* dans des pièges à phéromone, non seulement E2HB devait être deux à trois fois plus concentré que HB, mais également que le 4OH était un important constituant du mélange. Avec la nouvelle formulation que nous avons préparée et décrite dans les sections précédentes, combinant HB, de E2HB et 4OH dans un ratio 1 : 2,5 : 1,25, on prédisait un plus grand nombre de captures dans les pièges appâtés avec la phéromone.

Les détails expérimentaux de la confection, de l'installation et de la répartition des pièges collants pour le piégeage des punaises ternes ont été donnés dans le chapitre 2, Matériel et méthodes. En résumé, on se rappellera que quatre types de pièges ont été comparés : (a) ne comportant pas de diffuseur (témoins) ; (b) comportant un diffuseur

d'odeur florale synthétique ; (c) comportant un diffuseur de phéromone synthétique et un diffuseur d'odeur florale synthétique ; et (d) comportant un diffuseur de phéromone synthétique.

Premièrement, dans la figure 3.13 on compare le nombre total d'insectes capturés, mâles et femelles, avec la phéromone commerciale utilisée durant l'été 2018, et la phéromone formulée dans notre laboratoire utilisée en 2019 et en 2020. Noter que, comme les mêmes compositions d'attractifs ont été utilisées en 2019 et en 2020, les résultats de ces deux années sont traités comme une même expérience. D'abord, si le nombre total d'insectes capturés en 2018 était de 1951, ce nombre était de 1144 en 2019-2020, c'est simplement parce que durant ces deux dernières saisons la population d'insectes dans les champs fraisier était plus basse. Ensuite, le fait qu'environ deux fois plus de mâles que de femelles aient été capturés au total, peut être lié à plusieurs facteurs, tels que le dimorphisme sexuel dans l'attractivité des diffuseurs, mais on ne peut pas exclure qu'une plus grande proportion de mâles que de femelles constituait la population de punaises.

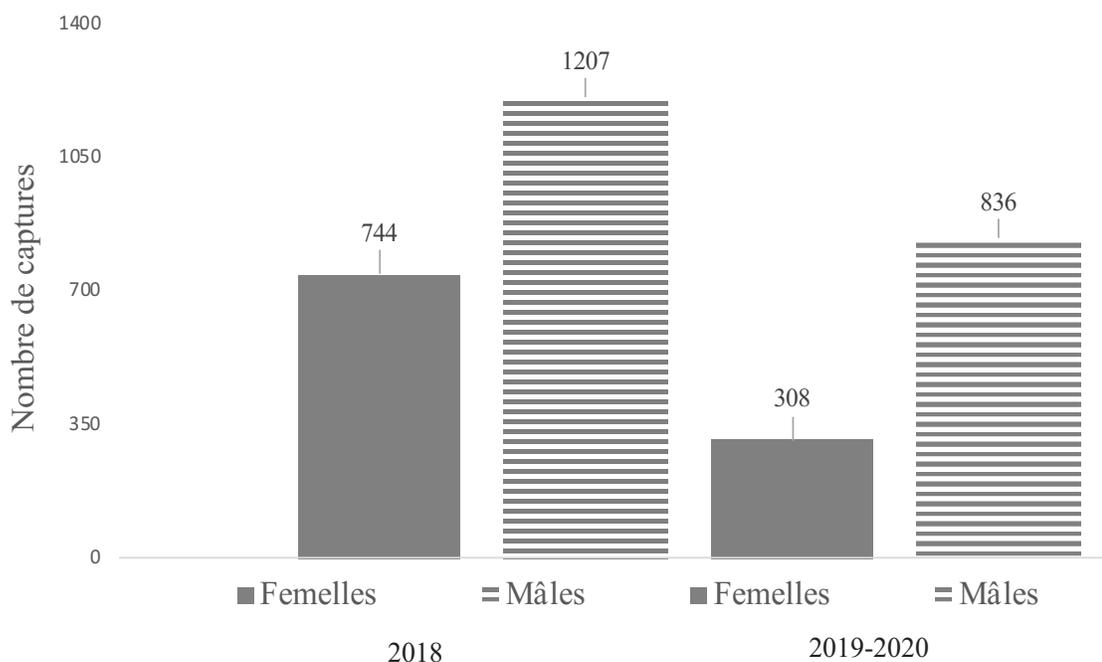


Figure 3.13 Nombre total de captures de punaises ternes, en l'année 2018 et en 2019 et 2020 confondues.

C'est en comparant les captures des différents types de pièges durant la même expérience que l'on peut apprécier si les diffuseurs de phéromone synthétique sont efficaces pour piéger des punaises. En l'occurrence, dans la figure 3.14 on observe qu'en moyenne dans les saisons de 2019 et 2020, les punaises ternes mâles étaient 2,68 fois plus nombreuses dans les pièges collants que les femelles ($LRT1 = 111,50$; $p < 0,0001$). Le fait que cette prédominance de mâles capturés par rapport aux femelles (forme de dimorphisme sexuel) soit plus élevée dans les pièges avec phéromone que dans les autres pièges porte à confirmer le caractère « phéromone sexuelle » de ce mélange. De même, il a été observé que les pièges collants avec des diffuseurs à phéromones ont capturé, sexes confondus, de 1,69 à 2,36 fois plus de

punaises ternes que les pièges témoins ou avec uniquement un attractif d'odeur florale ($LRT_3 = 32,69$; $p < 0,0001$). De plus, le nombre d'insectes capturés dans les pièges avec l'odeur florale n'était pas significativement différents de celui des pièges témoin, sans diffuseur.

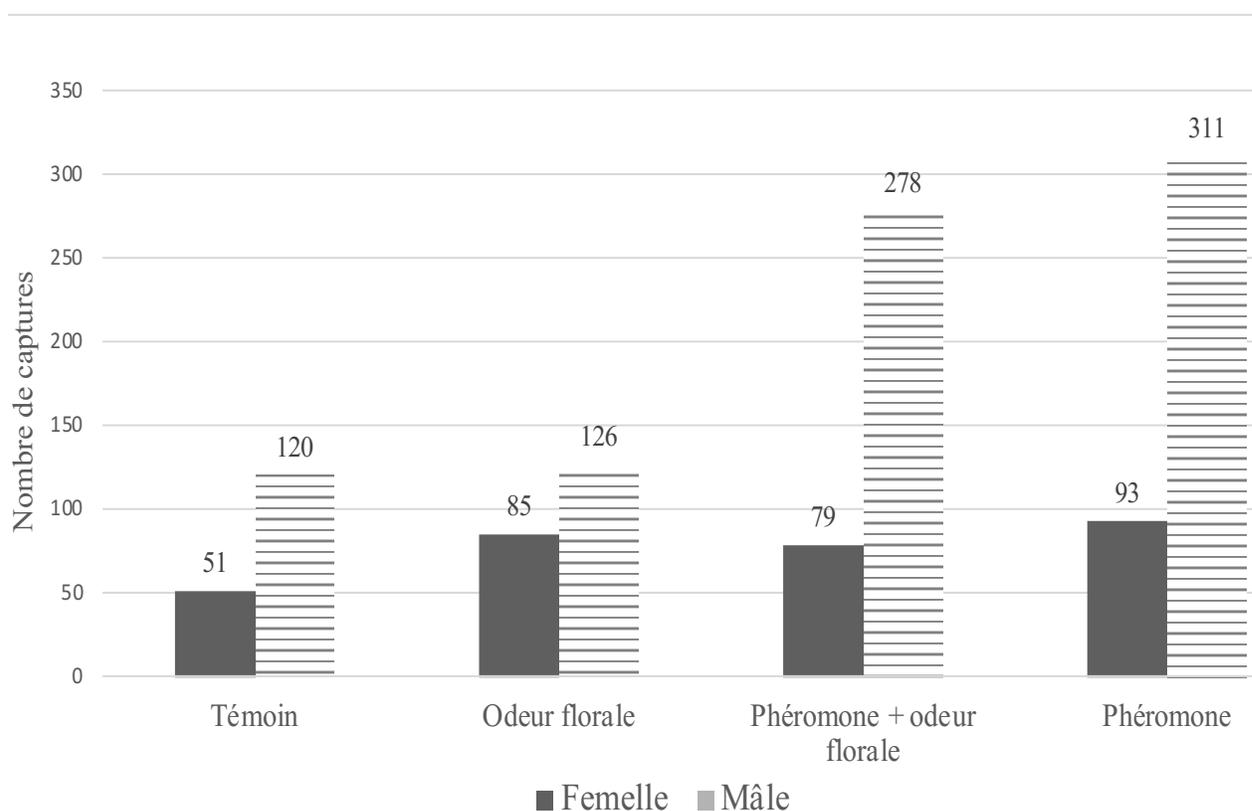


Figure 3.14 Nombre de captures total de punaises ternes en fonction du sexe des individus et du type d'attractif, en 2019 et 2020 confondues.

Il était aussi intéressant de se demander si l'emplacement des pièges jouait un rôle dans le nombre d'insectes capturés. À cet égard, dans la figure 3.15 on observe une comparaison du nombre total d'insectes capturés dans des pièges installés au centre ou en bordure du champ de fraises, ou encore à l'extérieur du champ, nommé ici le

milieu naturel. On remarque que les captures furent jusqu'à 1,93 fois plus importantes à l'intérieur des champs (centre et bordure confondus) qu'en milieu naturel (LRT2 = 45,54 ; $p < 0,0001$). Cette différence semble indiquer qu'en milieu naturel, les pièges à phéromones ne remportent pas la compétition, contre les nombreuses femelles, pour attirer les mâles. En champ par contre, il y a relativement peu de femelles et la phéromone synthétique subit donc moins de compétition et attire conséquemment, plus de mâles dans les pièges.

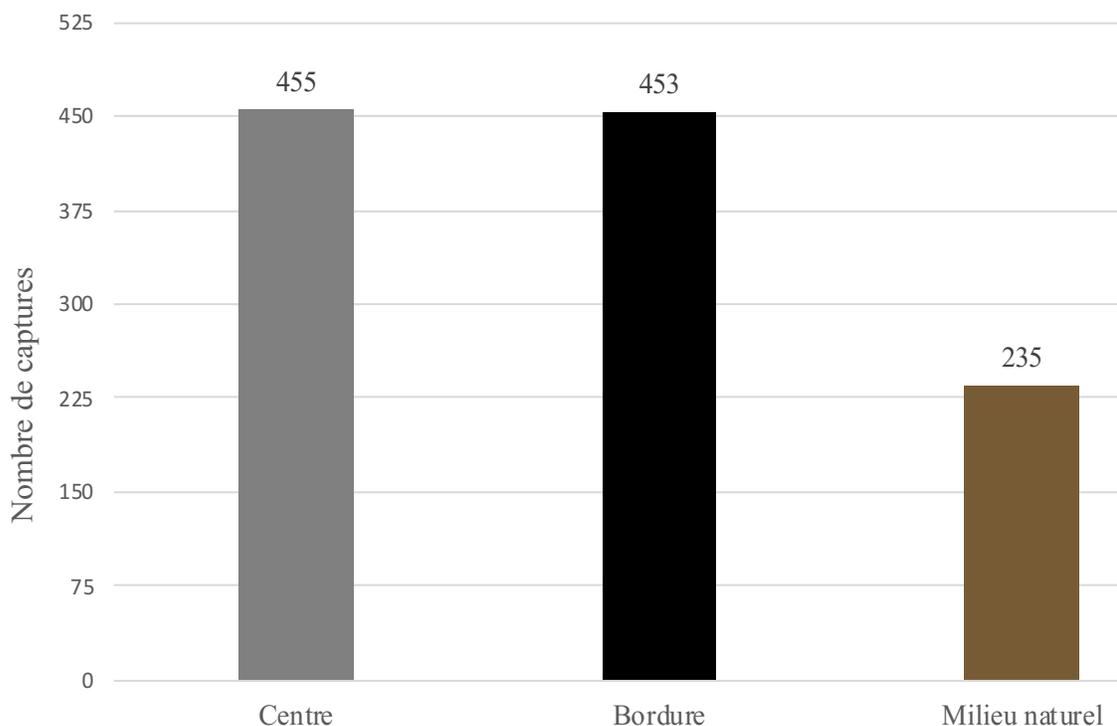


Figure 3.15 Nombre de captures totales de punaises ternes en fonction de l'emplacement des pièges, en 2019 et 2020 confondus.

Par ailleurs, la plus grande densité de punaises ternes dans le milieu naturel, par rapport au champ de culture, est démontrée par les captures manuelles observée au moyen de battages. Dans la figure 3.16, on observe que les larves de punaises ternes

étaient plus abondantes en milieu naturel qu'en champ de fraises (centre ou bordure) ($LRT_2 = 98,43$; $p < 0,0001$). Le même patron était observé pour les adultes ($LRT_2 = 128,23$; $p < 0,0001$).

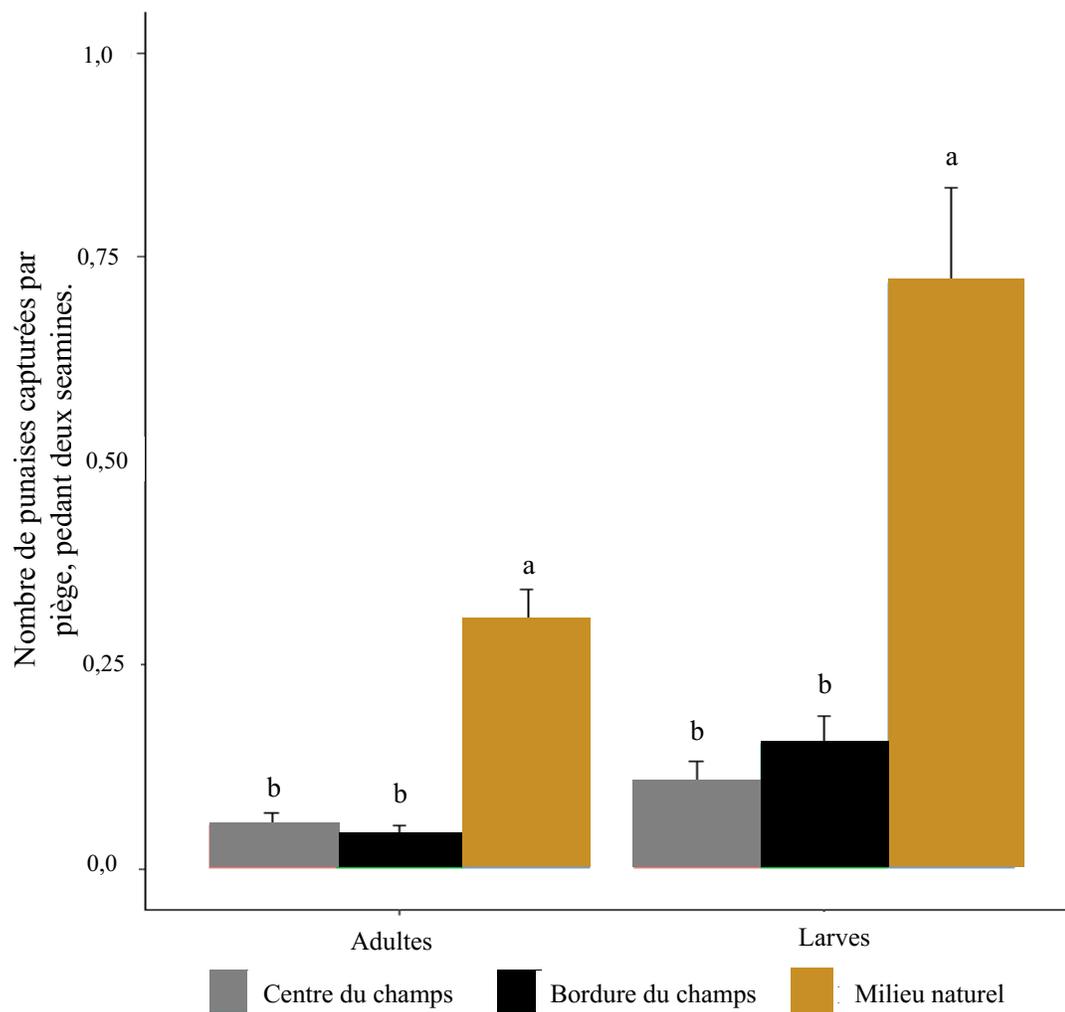


Figure 3.16 Populations de punaises ternes observées par battage, en 2019 et 2020 confondues. Note : Les résultats affectés d'étiquettes différentes (a et b) sont statistiquement différents.

Par la suite, dans la figure 3.17 on observe que les pièges munis de phéromones sexuelles synthétiques étaient plus attractifs pour les mâles que les pièges témoins ou muni d'un attractif floral (LRT₃ = 64,38; $p < 0,0001$).

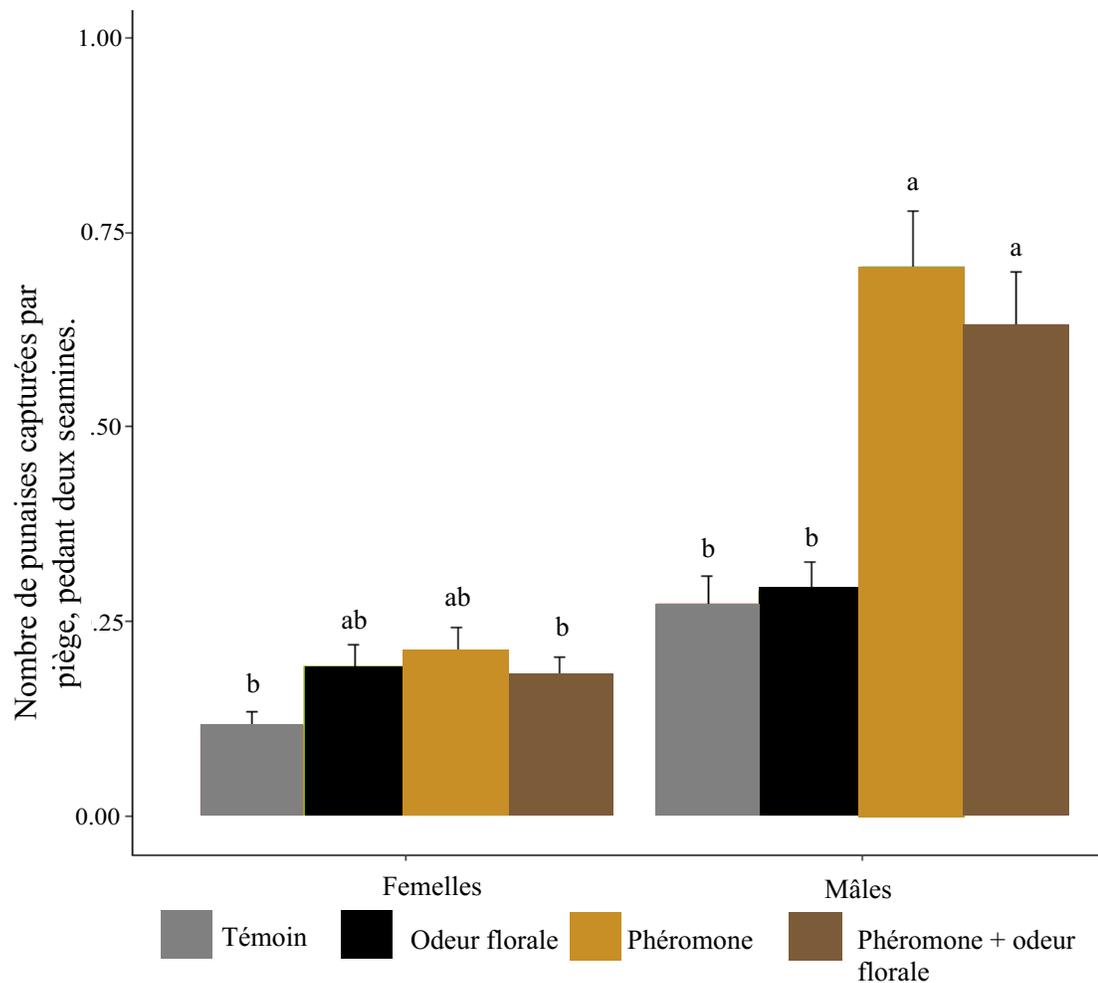


Figure 3.17 Efficacité des pièges en fonction de l'emplacement, en 2019 et 2020 confondues. Note : Les résultats affectés d'étiquettes différentes (a et b) sont statistiquement différents. (ab) ne sont pas statistiquement différents.

Enfin, on a évalué simultanément l'interaction entre les trois variables suivantes : le stimulus olfactif, l'emplacement des pièges et le sexe des individus capturés. Premièrement, comme on l'a vu précédemment, la formulation de la phéromone synthétique, conçue pour imiter la phéromone sexuelle libérée par les femelles *L. lineolaris*, attire plus fortement les insectes mâles (311) que les femelles (93) (Figure 3.14). Par la suite, si l'on prend isolément les résultats de capture des mâles (figure 3.18), on distingue qu'il n'y a pas d'interaction entre le stimulus olfactif et l'emplacement des pièges ($LRT_6 = 5,07$; $p = 0,53$). Autrement dit, l'emplacement des pièges n'altère pas la préférence des mâles envers les pièges contenant la phéromone. En bref, dans toutes les trois zones étudiées, la tendance de la phéromone sexuelle synthétique, seule ou en combinaison avec l'odeur florale, à être plus attractive pour les mâles que le témoin ou l'odeur florale seule, reste constante.

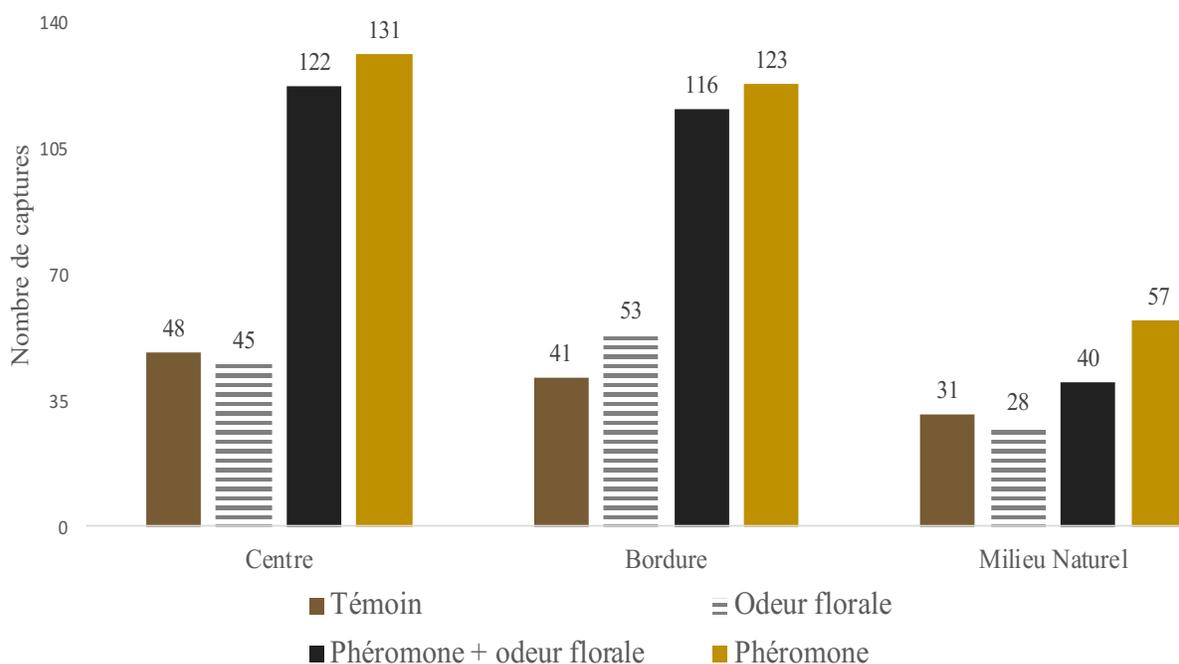


Figure 3.18 Nombre de captures total de punaises ternes **mâles** en fonction des attractifs utilisés et de l'emplacement des pièges, en 2019 et 2020, confondues.

Enfin, si l'on a observé que des femelles ont aussi été capturées par les pièges appâtés avec la phéromone synthétique seule ou en combinaison avec l'odeur florale, ces captures ne sont pas significativement différentes des pièges témoin ou exposant l'odeur florale; elles semblent plutôt accidentelles (Figure 3.19).

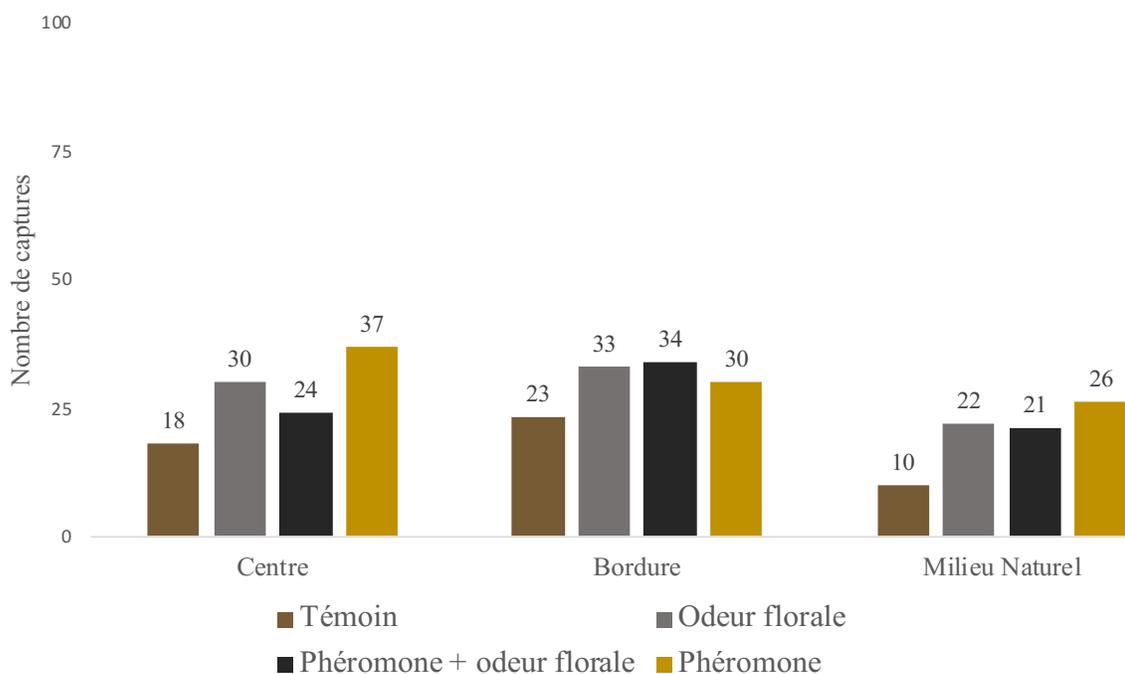


Figure 3.19 Nombre de captures total de punaises ternes **femelles** en fonction des attractifs utilisés et l'emplacement des pièges, en 2019 et 2020, confondues.

Ces derniers résultats sont intéressants du point de vue de la validation du rôle joué par l'attractif synthétique formulé par nos soins. Ainsi, le dimorphisme sexuel dans la réponse de piégeage, soit l'efficacité de piégeage supérieure envers les mâles comparée à celle envers les femelles, est tout à fait en accord avec une activité de phéromone sexuelle, supposée attirer spécialement les insectes mâles. En résumé, la phéromone synthétique, conçue pour imiter la phéromone sexuelle libérée par les

femelles *L. lineolaris*, est efficace pour attirer les insectes de cette espèce, particulièrement les insectes mâles.

CONCLUSION

Dans ce travail de recherche, nous voulions tester l'hypothèse selon laquelle des pièges, appâtés avec des diffuseurs libérant des substances mimant la phéromone sexuelle émise par des punaises ternes femelles, seraient efficaces pour capturer des punaises mâles lorsque installés dans des champs de culture fraisière.

Les objectifs, d'une perspective chimique, étaient de synthétiser au laboratoire une phéromone conçue pour imiter la phéromone sexuelle libérée par les femelles *L. lineolaris*, à partir du mélange de trois molécules volatiles, ensuite de fabriquer des diffuseurs pour libérer cette phéromone et finalement, de tester son efficacité pour piéger sélectivement des punaises mâles dans des champs fraisiers.

L'objectif de synthèse organique a été atteint grâce à la préparation du butanoate de (*E*)-hex-2-ényle (E2HB) avec un rendement excellent et un grand niveau de pureté, ainsi que la synthèse du (*E*)-4-oxohex-2-éanal (4OH), avec un rendement correct et un niveau de pureté acceptable. Il est à noter que, tout de suite après chromatographie éclair de cette dernière molécule hautement électrophile, on a pu en évaluer la pureté par RMN ¹H et par la suite elle pouvait être conservée au congélateur, en solution dans de l'huile de tournesol contenant du BHT comme conservatif. Le butanoate d'hexyle (HB) quant à lui, est commercialement disponible et on l'a donc utilisé tel quel.

La formulation d'un mélange dosé des trois constituants HB, E2HB et 4OH dans de l'huile de tournesol avec du BHT comme conservatif s'est avérée adéquate pour préparer des diffuseurs de phéromone synthétique. À cet effet, la formulation

synthétisée comportait 2 mg de HB, 5 mg de E2HB et 2,5 mg de 4OH, ce qui correspond au ratio libéré par des femelles vierges, tel que rapporté dans la littérature. Pour la fabrication des diffuseurs, on a utilisé la technologie décrite par Fountain et ses collaborateurs (Fountain *et al.*, 2014), qui utilise du matériel peu coûteux et relativement standard, à savoir un filtre à cigarette inséré dans un embout de micropipette en polypropylène. Ce dispositif a permis une consommation lente et durable des trois constituants de la phéromone tel qu'on a pu l'évaluer en faisant l'extraction et la quantification de ces substances dans des diffuseurs recueillis après leur usage sur le terrain. Cela nous a permis de montrer qu'après deux semaines d'utilisation, il demeurait encore une bonne portion de la phéromone de départ, allant de 22 % à 48 %, selon le constituant. Des aérations en conditions contrôlées au laboratoire ont aussi permis de montrer que lorsqu'ils sont fraîchement préparés, les diffuseurs libèrent les trois composantes de la phéromone dans les ratios mimant ceux émis par les femelles punaises ternes, et cela à une intensité correspondant à 25-30 femelles simultanément.

Ensuite, l'efficacité des diffuseurs de phéromone synthétique dans des pièges a été testée dans des champs fraisiers de la région de Mirabel grâce à la collaboration avec le Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel (CRAM) pendant l'été 2019 et l'été 2020.

Dans ces tests qui comparaient le nombre de captures de punaises terne mâles et femelles dans des pièges avec diffuseurs de phéromone, par rapport à des pièges témoin et d'autres diffusant une odeur florale, on a démontré que c'est avec notre phéromone qu'on a capturé le plus de punaises ternes mâles. De plus, on a constaté que l'emplacement des pièges n'affectait pas la préférence des mâles pour la phéromone vs les témoins. Par contre, on a observé un nombre de captures par piège plus élevé en champ qu'en milieu naturel, probablement en

raison du fort potentiel attractif des femelles qui y sont présentes en plus grande densité, tel que montré d'ailleurs par la détection manuelle.

De façon très satisfaisante, l'efficacité des pièges contenant la phéromone synthétique pour capturer des punaises mâles a été beaucoup plus élevée que pour capturer des femelles, ce qui confirme le rôle de l'attractif comme étant un mimé de la phéromone sexuelle, normalement libérée par les femelles, et sensée attirer les mâles. Cela vérifie donc notre hypothèse de travail.

Dans les conditions, cette recherche pointe vers un potentiel pour une implémentation graduelle des pièges à diffuseurs de phéromones, du moins comme méthode de dépistage pour prédire des populations de punaises ternes. Cela permettrait, par exemple, d'ajuster le dosage d'éventuels traitements insecticides selon des seuils pré-définis de détection.

Un prochain défi que ce projet devra affronter pour positionner l'utilisation de phéromones comme une réelle alternative de lutte biologique pour les producteurs de fraises du Québec sera, à notre avis, de relier les taux de captures observés dans les pièges dans des conditions standardisées, avec les populations d'insectes présents. Cela demanderait des expérimentations pendant plusieurs saisons et ce, dans différentes régions du Québec, notamment dans des champs libres de traitement insecticide.

ANNEXE A

DETAILS DES SITES D'ETUDES.

<i>Année</i>	<i>Site</i>	<i>Producteur</i>	<i>Localisation</i>	<i>Coordonnées géographiques</i>	<i>Type de champs</i>	<i>Régie</i>	<i>Période d'utilisation</i>
2018	P1	Ferme Marinier	Oka	45.495584; -74.080270	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 29 mai au 11 juillet 2018 (début de saison)
2018	S1	Domaine Villeneuve	Saint-Joseph-du-Lac	45.543697; -74.029160	Fraises d'automne sur racines	Conventionnelle	Du 29 mai au 11 juillet 2018 (début de saison)
2018	M1	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.562855; -74.001770	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 31 mai au 1 ^{er} octobre 2018 (saison complète)
2018	N1	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.561933; -73.997400	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 31 mai au 1 ^{er} octobre 2018 (saison complète)
2018	C1	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.653210; -73.966000	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 29 mai au 10 juillet 2018 (début de saison)
2018	L1	Patrice Coursol	Mirabel	45.620505; -73.979330	Fraises d'été sur paille	Biologique	Du 30 mai au 10 juillet 2018 (début de saison)
2018	T1	Fraisière Lauzon et fils	Saint-Anne-des-Plaines	45.758631; 73.885260	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 30 mai au 12 juillet 2018 (début de saison)
2018	I1	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.743358; -73.740700	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 30 mai au 1 ^{er} octobre 2018 (saison complète)
2018	E1	Fraisebec	Saint-Anne-des-Plaines	45.717772; -73.789330	Fraises d'automne	Conventionnelle	Du 30 mai au 1 ^{er} octobre 2018 (saison complète)
2018	E2	Fraisebec	Saint-Anne-des-Plaines	45.713073; -73.794130	d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 30 mai au 1 ^{er} octobre 2018 (saison complète)
2018	Q1	Ferme Marinier	Oka	45.491526; -74.079420	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 11 juillet au 1 ^{er} octobre 2018 (fin de saison)
2018	S2	Domaine Villeneuve	Saint-Joseph-du-Lac	45.543918; -74.028810	Fraises d'automne sur racine	Conventionnelle	Du 11 juillet au 1 ^{er} octobre 2018 (fin de saison)

2018	D1	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.651490; -73.969090	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 10 juillet au 1 ^{er} octobre 2018 (fin de saison)
2018	U1	Fraisière Lauzon et fils	Saint-Anne-des-Plaines	45.762350; -73.891970	Fraises d'automne sur racine	Conventionnelle	Du 12 juillet au 1 ^{er} octobre 2018 (fin de saison)
2018	H1	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.806209; -73.800730	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 10 juillet au 1 ^{er} octobre 2018 (fin de saison)
2019	DD1	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.564017; -73.988910	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 27 mai au 20 septembre 2019 (saison complète)
2019	DD2	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.569095; -73.987520	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 27 mai au 20 septembre 2019 (saison complète)
2019	AA1	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.761578; -73.801100	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 10 juin au 5 septembre 2019 (saison complète)
2019	AA2	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.757320; -73.793100	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 10 juin au 5 septembre 2019 (saison complète)
2019	EE1	Fraisebec	Saint-Anne-des-Plaines	45.717896; -73.787810	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 27 mai au 20 septembre 2019 (saison complète)
2019	FF1	Ferme Marinier	Oka	45.495584; -74.080270	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 10 juin au 10 juillet 2019 (début de saison)
2019	VV1	Domaine Villeneuve	Saint-Joseph-du-Lac	45.543918; -74.028810	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 27 mai au 10 juillet 2019 (début de saison)
2019	PP1	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.651992; -73.964870	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 27 mai au 9 juillet 2019 (début de saison)
2019	CC1	Patrice Coursoi	Mirabel	45.622072; -73.977220	Fraises d'été sur paille	Biologique	Du 27 mai au 9 juillet 2019 (début de saison)
2019	RR1	Fraisière Lauzon et fils	Saint-Anne-des-Plaines	45.762350; -73.891970	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 27 mai au 9 juillet 2019 (début de saison)
2019	PP2	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.650156; -73.965070	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juillet au 18 septembre 2019 (fin de saison)
2019	PP3	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.662695; -73.968580	Fraises d'automne sur	Conventionnelle	Du 8 juillet au 18 septembre 2019 (fin de saison)

2019	FF2	Ferme Marinier	Oka	45.519795; -74.082290	d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juillet au 18 septembre 2019 (fin de saison)
2019	DD3	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.572445; -73.995600	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juillet au 20 septembre 2019 (fin de saison)
2019	MM1	Ferme Pommix	Saint-Joseph-du-Lac	45.546862; -74.043870	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juillet au 18 septembre 2019 (fin de saison)
2020	SSS1	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.559948; -73.991077	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juin au 22 septembre 2020 (saison complète)
2020	SSS2	Ferme Denis Lauzon et fils	Saint-Eustache	45.563487; -73.996481	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 6 juillet au 1 ^{er} octobre 2020 (fin de saison)
2020	FFF1	Ferme Marinier	Oka	45.479198; -74.089219	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 8 juin au 7 juillet 2020 (début de saison)
2020	FFF2	Ferme Marinier	Oka	45.519768; -74.082307	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juin au 28 septembre 2020 (saison complète)
2020	FFF3	Ferme Marinier	Oka	45.518727; -74.080572	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 6 juillet au 28 septembre 2020 (fin de saison)
2020	MMM1	Ferme	Saint-Joseph-du-Lac	45.547632; -74.044226	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 8 juin au 7 juillet 2020 (début de saison)
2020	CCC1	Patrice Courso	Mirabel	45.621402; -73.976664	Fraises d'été sur paille	Biologique	Du 8 juin au 8 juillet 2020 (début de saison)
2020	CCC2	Patrice Courso	Mirabel	45.620085; -73.978505	Fraises d'automne sur plastique	Biologique	Du 6 juillet au 30 septembre 2020 (fin de saison)
2020	PPP1	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.661367; -73.968351	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 8 juin au 9 juillet 2020 (début de saison)
2020	PPP2	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.652699; -73.969776	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juin au 16 septembre 2020 (saison complète)
2020	PPP3	Au pays des petits fruits	Mirabel	45.653281; -73.968722	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 6 juillet au 16 septembre 2020 (fin de saison)
2020	EEE1	Fraisebec	Saint-Anne-des-Plaines	45.722538; -73.792040	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juin au 30 septembre 2020 (saison complète)
2020	RRR1	Fraisière Lauzon et fils	Saint-Anne-des-Plaines	45.761369; -73.890481	Fraises d'été sur paille	Conventionnelle	Du 8 juin au 10 juillet 2020 (début de saison)
2020	AAA1	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.743355; -73.740701	Fraises d'automne sur plastique	Conventionnelle	Du 8 juin au 25 juin 2020 (saison complète/champ abandonné)
2020	AAA2	Jocelyn Alarie	Saint-Anne-des-Plaines	45.807920; -73.803123	Fraises d'automne	Conventionnelle	Du 6 juillet au 1 ^{er} octobre 2020 (fin de saison)

ANNEXE B

CONSTRUCTION DE LA COURBE STANDARD, ANALYSE PAR
EXTRACTION DE VOLATILS.

Tableau B1. Préparation de la solution standard de l'analyse par extraction.

Composés	(mg/mL)
Butyrate d'hexyle	0,58
Butanoate de (E)-2-hexényle	0,54
(E)-4-oxohex-2-éнал	0,53
Benzoate d'éthyle	0,004

Tableau B2. Valeurs de la courbe standard.

Étalon	V stock É (mL)	Concentration finale (mg/mL)			
		SI	HB	E2HB	4OH
E1	0,3	4,00E-03	1,73E-02	1,63E-02	1,59E-02
E2	0,5	4,00E-03	1,04E-01	9,76E-02	9,54E-02
E3	0,7	4,00E-03	1,73E-01	1,63E-01	1,59E-01
E4	1	4,00E-03	2,66E-01	2,49E-01	2,44E-01
E5	1,3	4,00E-03	3,47E-01	3,25E-01	3,18E-01
Étalon	Aire de l'analyte (GC-MS-EIC)				
E1	1,37E+05	1,17E+05	6,65E+04	2,03E+05	
E2	1,64E+05	7,51E+05	4,16E+05	1,19E+06	
E3	1,87E+05	1,37E+06	7,80E+05	2,44E+06	
E4	2,18E+05	2,26E+06	1,31E+06	3,93E+06	
E5	2,17E+05	2,75E+06	1,59E+06	4,84E+06	
Étalon	Ratio Aire analyte/Aire SI				
E1	8,46E-01	4,82E-01	1,49E+00		
E2	4,58E+00	2,55E+00	7,36E+00		
E3	7,26E+00	4,15E+00	1,31E+01		
E4	1,03E+01	6,00E+00	1,79E+01		
E5	1,27E+01	7,32E+00	2,22E+01		

Figure B1. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 1.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 174 COURBE EXTRAC- OQS 175 COURB CAPT\
 Data File : OQS 174 E1 essai 1.D
 Acq On : 18 Jan 2021 15:54
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 174 E1 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 174 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.722	4496	4555	4636	BB 2	642	99468	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 99468
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 174 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.827	1448	1492	1528	BB 4	252	19337	23.32%	18.913%
2	28.180	4969	5029	5089	BB 7	554	82906	100.00%	81.087%

Sum of corrected areas: 102243
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 174 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.514	5036	5093	5142	BB 6	404	47634	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 47634
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 174 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.835	1442	1493	1548	BB 4	1459	165347	100.00%	87.606%
2	28.520	5049	5095	5135	BB 5	240	23393	14.15%	12.394%

Sum of corrected areas: 188740
 INL-250C_75..._DETOF_12_M Tue Jan 19 18:12:37 2021

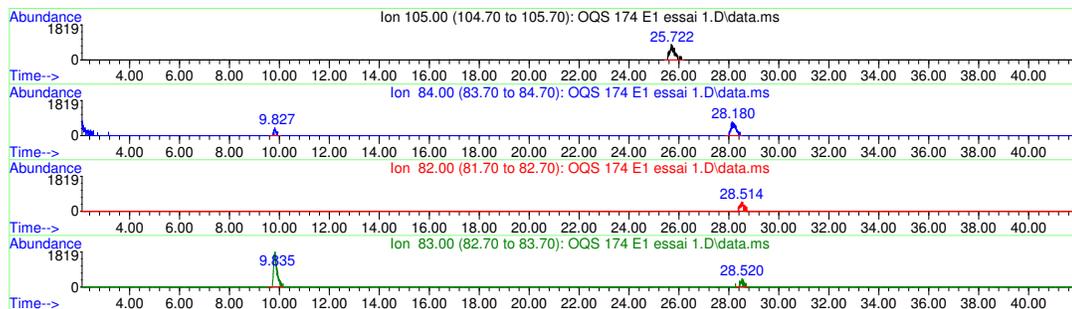


Figure B2. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 2.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 174 COURBE EXTRAC- OQS 175 COURB CAPT\
 Data File : OQS 174 E2 essai 1.D
 Acq On : 18 Jan 2021 16:42
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 174 E2 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 174 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.720	4490	4555	4616	BB 4	819	127006	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 127006
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 174 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.810	1442	1488	1548	BB 4	1583	168298	28.73%	22.321%
2	28.183	4956	5029	5122	BB 7	3440	585696	100.00%	77.679%

Sum of corrected areas: 753994
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 174 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.811	1448	1489	1528	BB 4	344	35603	10.62%	9.598%
2	28.524	5016	5095	5162	BB 8	2132	335351	100.00%	90.402%

Sum of corrected areas: 370954
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 174 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.810	1442	1488	1601	BB 4	9602	1077712	100.00%	78.588%
2	28.524	4962	5095	5162	BB 8	1479	293637	27.25%	21.412%

Sum of corrected areas: 1371349

INL-250C_75..._DETOF_12_M Tue Jan 19 18:17:32 2021

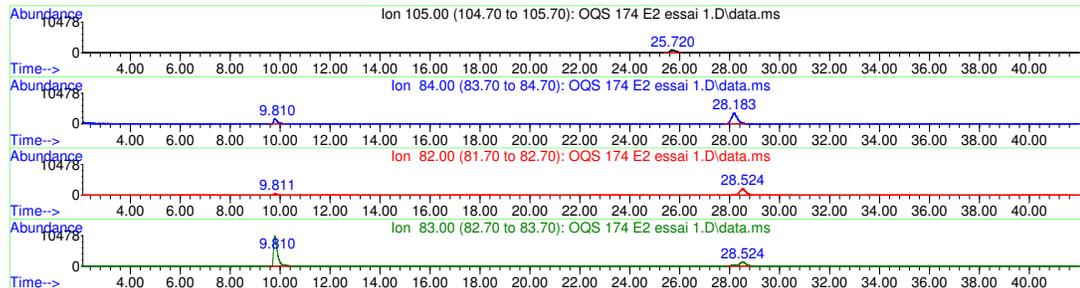


Figure B3. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 3.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 174 COURBE EXTRAC- OQS 175 COURB CAPT\
 Data File : OQS 174 E3 essai 1.D
 Acq On : 18 Jan 2021 17:31
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 174 E3 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 3 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 174 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.727	4490	4556	4616	BB 4	939	144730	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 144730

Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 174 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.802	1315	1487	1548	BB 4	2629	302693	29.67%	22.883%
2	28.184	4862	5030	5142	BB 8	5789	1020118	100.00%	77.117%

Sum of corrected areas: 1322811

Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 174 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.804	1442	1487	1528	BB 4	624	64940	10.96%	9.877%
2	28.528	4989	5096	5182	BB 9	3567	592551	100.00%	90.123%

Sum of corrected areas: 657491

Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 174 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.802	1435	1487	1621	BB 4	17222	1959673	100.00%	79.206%
2	28.531	4962	5096	5169	BB 8	2425	514471	26.25%	20.794%

Sum of corrected areas: 2474144

INL-250C_75..._DETOF_12_M Tue Jan 19 18:21:53 2021

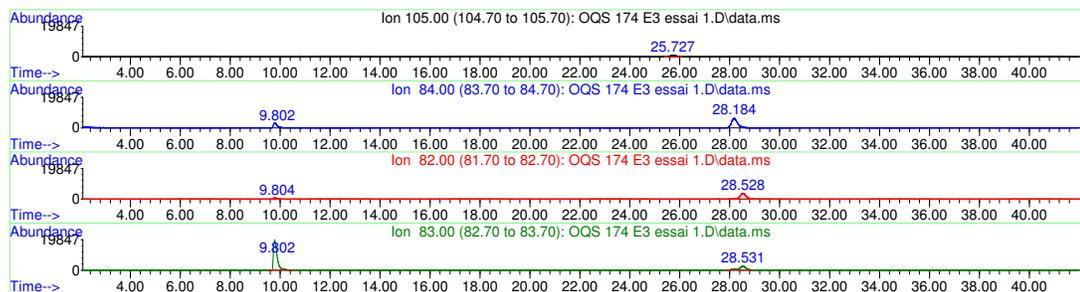


Figure B4. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 4.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 174 COURBE EXTRAC- OQS 175 COURB CAPT\
 Data File : OQS 174 E4 essai 1.D
 Acq On : 18 Jan 2021 18:20
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 174 E4 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 174 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.717	4483	4554	4616	BB 5	1197	182229	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 182229

Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 174 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.800	1435	1487	1568	BB 3	4507	482847	25.91%	20.578%
2	28.197	4949	5032	5142	BB 8	10571	1863622	100.00%	79.422%

Sum of corrected areas: 2346469

Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 174 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.801	1435	1487	1528	BB 3	1096	108417	9.94%	9.041%
2	28.544	4976	5099	5182	BB 8	6547	1090716	100.00%	90.959%

Sum of corrected areas: 1199134

Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 174 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.800	1435	1487	1628	BB 3	27716	3006309	100.00%	75.901%
2	28.541	4956	5099	5175	BB 7	4681	954529	31.75%	24.099%

Sum of corrected areas: 3960838

INL-250C_75...DETOF_12_M Tue Jan 19 18:25:14 2021

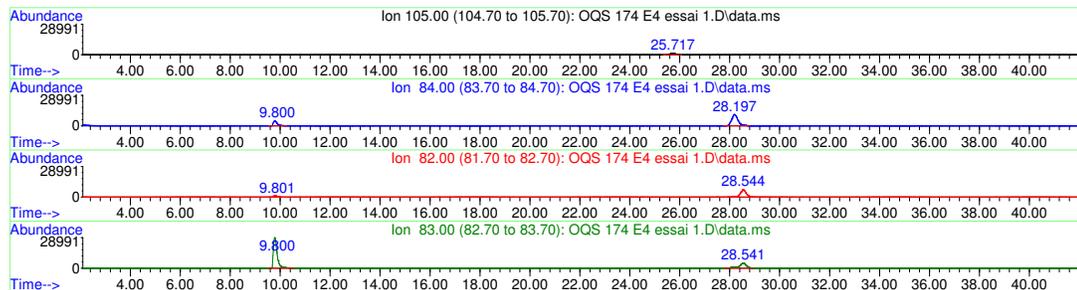


Figure B5. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 5.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 174 COURBE EXTRAC- OQS 175 COURB CAPT\
 Data File : OQS 174 E5 essai 1.D
 Acq On : 18 Jan 2021 19:08
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 174 E5 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 5 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 174 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.725	4490	4556	4616	BB 5	1205	168795	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 168795

Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 174 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.799	1435	1486	1568	BB 5	5210	558769	25.89%	20.567%
2	28.199	4942	5033	5142	BB 5	12402	2158093	100.00%	79.433%

Sum of corrected areas: 2716862

Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 174 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.800	1435	1486	1528	BB 5	1205	122902	9.87%	8.979%
2	28.545	4976	5099	5189	BB 5	7583	1245828	100.00%	91.021%

Sum of corrected areas: 1368730

Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 174 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.798	1435	1486	1641	BB 5	33387	3576343	100.00%	76.654%
2	28.545	4929	5099	5182	BB 5	5229	1089248	30.46%	23.346%

Sum of corrected areas: 4665591

INL-250C_75..._DETOF_12_M Tue Jan 19 18:30:11 2021

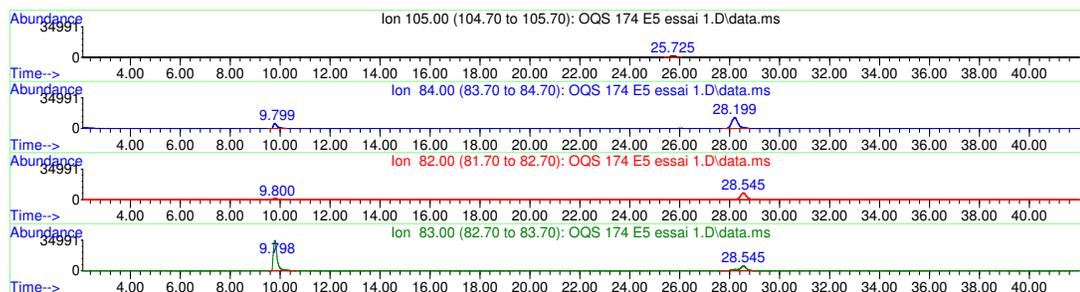


Tableau B3. Analyse des extraits de 6 diffuseurs après 14 jours de congélation.

	Diffuseur 1			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,84E+05			
HB (Hexyl)	5,74E+05	2,023	0,039	1,9
E2 HB (Hexenyl)	7,28E+05	2,565	0,101	5,1
4OH (Aldehyde)	1,24E+06	4,363	0,050	2,5
	Diffuseur 2			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,78E+05			
HB (Hexyl)	5,81E+05	2,092	0,041	2,0
E2 HB (Hexenyl)	7,28E+05	2,621	0,104	5,2
4OH (Aldehyde)	1,21E+06	4,371	0,050	2,5
	Diffuseur 3			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,85E+05			
HB (Hexyl)	5,72E+05	2,004	0,038	1,9
E2 HB (Hexenyl)	7,43E+05	2,602	0,103	5,1
4OH (Aldehyde)	1,23E+06	4,301	0,049	2,4
	Diffuseur 4			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,48E+05			

HB (Hexyl)	2,75E+05	1,859	0,034	1,7
E2 HB (Hexenyl)	3,62E+05	2,450	0,096	4,8
4OH (Aldehyde)	6,18E+05	4,186	0,047	2,4
	Diffuseur 5			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,39E+05			
HB (Hexyl)	2,73E+05	1,966	0,037	1,9
E2 HB (Hexenyl)	3,59E+05	2,587	0,102	5,1
4OH (Aldehyde)	6,17E+05	4,439	0,051	2,5
	Diffuseur 6			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,39E+05			
HB (Hexyl)	2,74E+05	1,974	0,037	1,9
E2 HB (Hexenyl)	3,60E+05	2,595	0,102	5,1
4OH (Aldehyde)	6,17E+05	4,440	0,051	2,5

	Total			
	Taux de récupération %	Moyen 6 diffuseurs (mg)	(rapport)	Coef. Var
HB (Hexyl)	91	1,9	1,00	0,11
E2 HB (Hexenyl)	100	5,1	2,69	0,14
4OH (Aldehyde)	99	2,5	1,32	0,07

Tableau B4. Analyse des extraits, test du remplissage.

	Diffuseur 1			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,39E+05			
HB (Hexyl)	2,73E+05	1,966	0,037	1,9
E2 HB (Hexenyl)	3,59E+05	2,587	0,102	5,1
4OH (Aldehyde)	6,17E+05	4,439	0,051	2,5
	Diffuseur 2			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,48E+05			
HB (Hexyl)	2,75E+05	1,859	0,034	1,7
E2 HB (Hexenyl)	3,62E+05	2,450	0,096	4,8
4OH (Aldehyde)	6,18E+05	4,186	0,047	2,4
	Diffuseur 3			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	1,39E+05			
HB (Hexyl)	2,74E+05	1,974	0,037	1,9
E2 HB (Hexenyl)	3,60E+05	2,595	0,102	5,1
4OH (Aldehyde)	6,17E+05	4,440	0,051	2,5
	Diffuseur 4			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle	2,84E+05			

Benzoate				
HB (Hexyl)	5,74E+05	2,023	0,039	1,9
E2 HB (Hexenyl)	7,28E+05	2,565	0,101	5,1
4OH (Aldehyde)	1,24E+06	4,363	0,050	2,5
	Diffuseur 5			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	277803			
HB (Hexyl)	581252	2,092	0,041	2,031
E2 HB (Hexenyl)	728190	2,621	0,104	5,179
4OH (Aldehyde)	1214274	4,371	0,050	2,493
	Diffuseur 6			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	285349			
HB (Hexyl)	571746	2,004	0,038	1,908
E2 HB (Hexenyl)	742562	2,602	0,103	5,136
4OH (Aldehyde)	1227356	4,301	0,049	2,442

	Total			
	Taux de récuperation %	Moyen 6 diffuseurs (mg)	Écart- type(mg)	Coef. Var
HB (Hexyl)	91,4	1,9	0,11	0,06
E2 HB (Hexenyl)	100,1	5,1	0,14	0,03
4OH (Aldehyde)	99,1	2,5	0,07	0,03

ANNEXE C

CONSTRUCTION DE LA COURBE STANDARD, ANALYSE PAR CAPTATION
DE VOLATILS.

Tableau C1. Préparation de la solution standard de l'analyse par captation.

Composés	(mg/mL)
Butyrate d'hexyle	0,0578
Butyrate de (E)-2-hexényle	0,0542
(E)-4-oxohex-2-énal	0,0542
Benzoate d'éthyle	0,0040

Tableau C2. Valeurs de la courbe standard.

Étalon	V stock É (mL)	Concentration finale (mg/mL)			
		SI	HB	E2HB	4OH
E1	0,3	4,00E-03	3,47E-03	3,25E-03	3,18E-03
E2	0,5	4,00E-03	5,78E-03	5,42E-03	5,30E-03
E3	0,7	4,00E-03	8,09E-03	7,59E-03	7,42E-03
E4	1	4,00E-03	1,16E-02	1,08E-02	1,06E-02
E5	1,3	4,00E-03	1,50E-02	1,41E-02	1,38E-02

Étalon	Aire de l'analyte (GC-MS-EIC)				
E1	2,08E+05	3,32E+04	7,97E+03	5,17E+04	
E2	2,14E+05	5,67E+04	2,25E+04	8,36E+04	
E3	2,23E+05	8,17E+04	3,91E+04	1,21E+05	
E4	2,41E+05	1,17E+05	5,97E+04	1,80E+05	
E5	2,45E+05	1,63E+05	8,47E+04	2,52E+05	

Étalon	Ratio Aire analyte/Aire SI			
E1	1,59E-01	3,83E-02	2,48E-01	
E2	2,66E-01	1,05E-01	3,92E-01	
E3	3,67E-01	1,76E-01	5,43E-01	
E4	4,85E-01	2,48E-01	7,47E-01	
E5	6,67E-01	3,46E-01	1,03E+00	

Figure C1. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 1.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 175 ET OQS 178\
 Data File : OQS 175 E1 essai 1.D
 Acq On : 23 Jan 2021 00:03
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 175 E1 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 175 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.739	4490	4559	4636	BB 5	1239	206900	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 206900
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 175 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.182	4969	5029	5069	BB 5	307	34450	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 34450
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 175 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.524	5055	5095	5129	BB 2	153	8963	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 8963
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 175 E1 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.888	1455	1503	1548	BB 2	545	51768	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 51768

INL-250C_75..._DETOF_12_M Mon Jan 25 11:54:23 2021

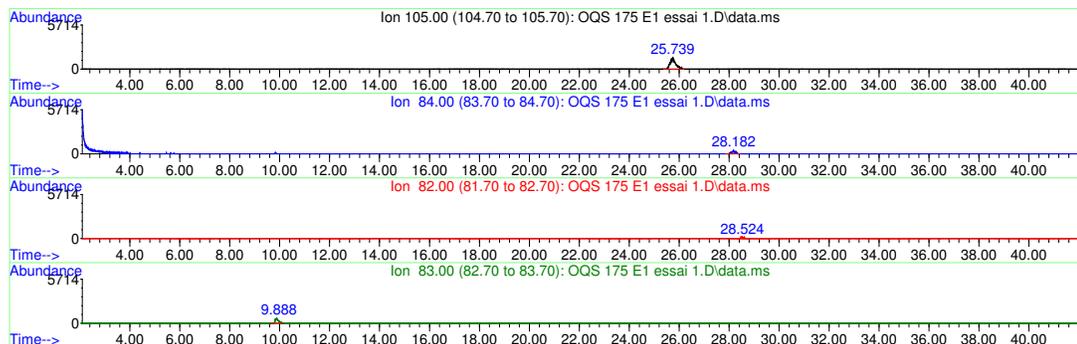


Figure C2. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 2.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 175 ET OQS 178\
 Data File : OQS 175 E2 essai 1.D
 Acq On : 23 Jan 2021 00:51
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 175 E2 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 5 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 175 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.729	4490	4556	4643	BB 4	1267	211626	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 211626
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 175 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.196	4976	5032	5075	BB 4	453	57343	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 57343
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 175 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.539	5042	5098	5122	BB 6	181	20912	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 20912
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 175 E2 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.881	1455	1502	1548	BB 2	802	87313	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 87313

INL-250C_75..._DETOF_12_M Mon Jan 25 11:57:16 2021

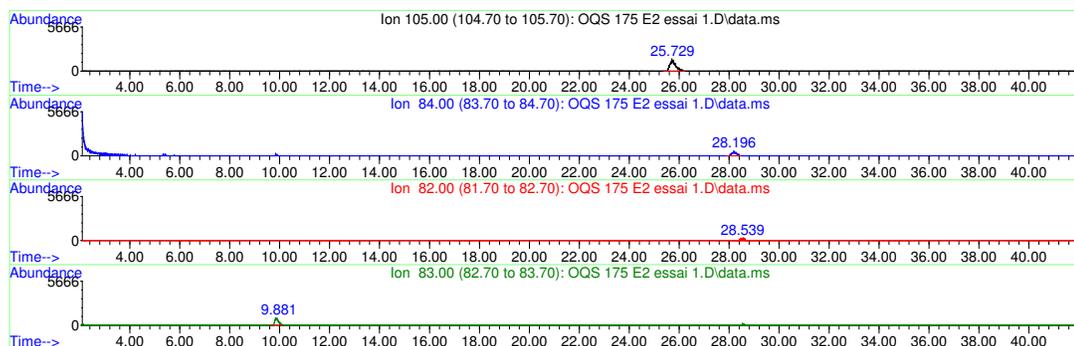


Figure C3. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 3.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 175 ET OQS 178\
 Data File : OQS 175 E3 essai 1.D
 Acq On : 23 Jan 2021 1:40
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 175 E3 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 6 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 175 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.738	4490	4558	4643	BB 4	1406	234145	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 234145
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 175 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.309	576	621	663	BB	135	7865	8.84%	7.172%
2	9.872	1455	1500	1541	BB 5	209	12867	14.47%	11.735%
3	28.188	4962	5030	5089	BB 4	600	88919	100.00%	81.093%

Sum of corrected areas: 109650
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 175 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.530	5042	5096	5142	BB 7	309	40265	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 40265
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 175 E3 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.874	1455	1501	1561	BB 4	1170	125676	100.00%	88.589%
2	28.532	5029	5097	5129	BB 8	88	16187	12.88%	11.411%

Sum of corrected areas: 141863
 INL-250C_75..._DETOF_12_M Mon Jan 25 11:59:36 2021

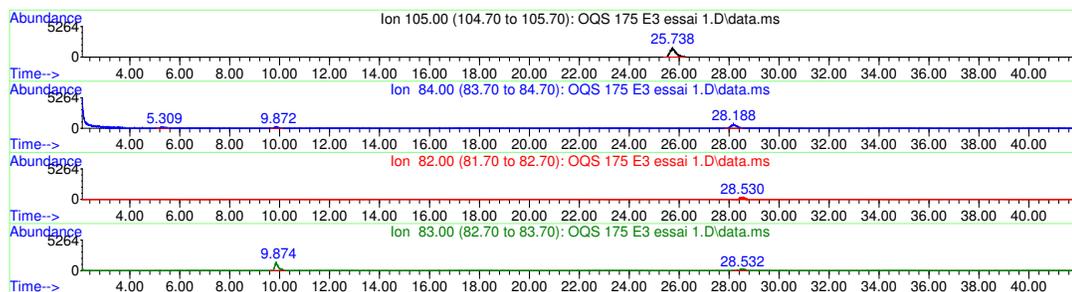


Figure C4. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 4.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 175 ET OQS 178\
 Data File : OQS 175 E4 essai 1.D
 Acq On : 23 Jan 2021 2:28
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 175 E4 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 7 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 175 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.734	4490	4558	4630	BB 5	1397	240839	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 240839
 Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 175 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.224	563	605	656	BB 2	139	21994	18.09%	13.200%
2	9.865	1455	1499	1535	BB 4	255	23056	18.97%	13.837%
3	28.194	4969	5032	5095	BB 7	776	121571	100.00%	72.962%

Sum of corrected areas: 166621
 Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 175 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.538	5042	5098	5149	BB 7	419	62695	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 62695
 Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 175 E4 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.868	1455	1500	1568	BB 4	1635	181911	100.00%	84.773%
2	28.542	5002	5099	5135	BB 9	258	32674	17.96%	15.227%

Sum of corrected areas: 214585

INL-250C_75...DETOF_12_M Mon Jan 25 12:01:43 2021

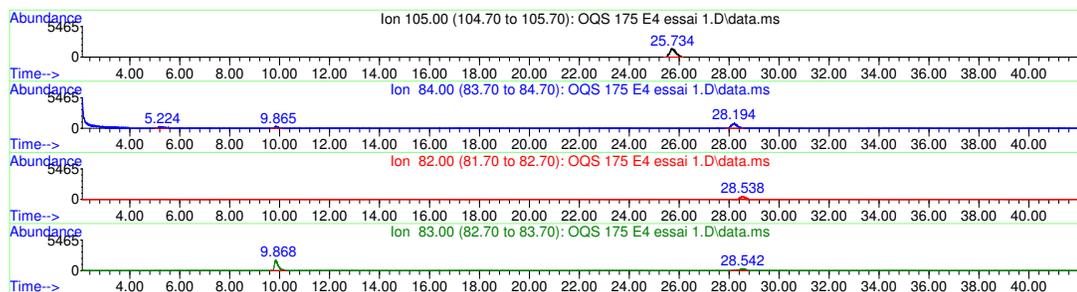


Figure C5. Données d'absorbance, GC-MS de l'étalon 5.

Area Percent Report

Data Path : D:\msdchem\DATA\Labo Chapdelaine\Oscar.D\OQS 175 ET OQS 178\
 Data File : OQS 175 E5 essai 1.D
 Acq On : 23 Jan 2021 3:17
 Operator : OSCAR
 Sample : OQS 175 E5 essai 1
 Misc :
 ALS Vial : 8 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: autoint1.e
 Integrator: ChemStation

Method : D:\msdchem\DATA\Labo Frenette\Ehsan\20191212\tetraline2.D\INL-250C_75C-5-MIN-20CMIN-7
 ... 5-300C_SLES_DETOF_12_M
 Title :

Signal : EIC Ion 105.00 (104.70 to 105.70): OQS 175 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	25.737	4490	4558	4630	BB 3	1374	252926	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 252926

Signal : EIC Ion 84.00 (83.70 to 84.70): OQS 175 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	3.685	197	308	370	BB 3	57	-3519	-2.14%	-1.538%
2	5.162	550	593	643	BB 2	221	31865	19.36%	13.924%
3	9.856	1455	1497	1528	BB 3	453	35950	21.85%	15.709%
4	28.185	4962	5030	5089	BB 7	942	164553	100.00%	71.905%

Sum of corrected areas: 228849

Signal : EIC Ion 82.00 (81.70 to 82.70): OQS 175 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	28.537	5036	5098	5149	BB 7	576	86238	100.00%	100.000%

Sum of corrected areas: 86238

Signal : EIC Ion 83.00 (82.70 to 83.70): OQS 175 E5 essai 1.D\data.ms

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	9.860	1448	1498	1568	BB 2	2295	257705	100.00%	82.593%
2	28.517	4996	5094	5135	BB 10	297	54312	21.08%	17.407%

Sum of corrected areas: 312017

INL-250C_75...DETOF_12_M Mon Jan 25 12:03:46 2021

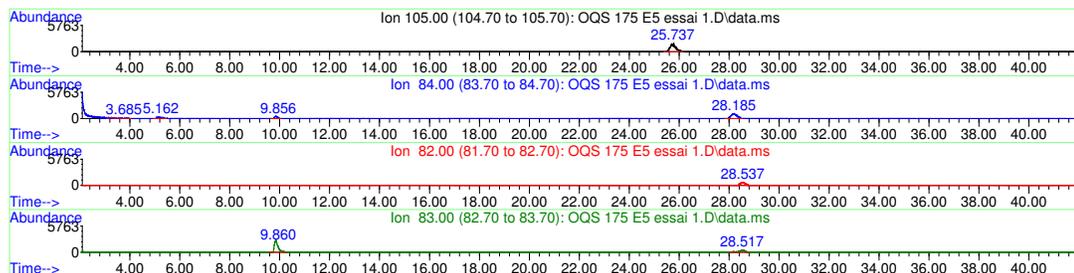


Tableau C3. Analyse de 3 diffuseurs nouveaux, par captation de volatils pendant 18 heures sur charbon actif.

	Diffuseur 1			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,65E+05			
HB (Hexyl)	4,05E+04	0,153	3,25E-03	0,0098
E2 HB (Hexenyl)	5,63E+04	0,212	9,30E-03	0,0279
4OH (Aldehyde)	8,78E+04	0,331	4,46E-03	0,0134
	Diffuseur 2			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,35E+05			
HB (Hexyl)	4,09E+04	0,174	3,75E-03	0,0113
E2 HB (Hexenyl)	5,28E+04	0,224	9,74E-03	0,0292
4OH (Aldehyde)	7,09E+04	0,301	4,05E-03	0,0122
	Diffuseur 3			
	Aire analyte (via GC-MS)	Ratio Aire (Anal./SI)	Conc. Finale (mg/mL)	Qtité total (mg)
Ethyle Benzoate	2,28E+05			
HB (Hexyl)	3,32E+04	0,146	3,09E-03	0,0093
E2 HB (Hexenyl)	4,54E+04	0,199	8,84E-03	0,0265
4OH (Aldehyde)	6,81E+04	0,299	4,02E-03	0,0121

	Total			
	Moyenne (mg)	Rapport	(ng/h)	Écart-type(mg)
HB (Hexyl)	0,0101	1,0	561,06	0,0010
E2 HB (Hexenyl)	0,0279	2,8	1549,09	0,0013
4OH (Aldehyde)	0,0125	1,2	696,16	0,0007

BIBLIOGRAPHIE

Agustí, N. et Cohen, A. C. (2000). *Lygus hesperus* and *L. lineolaris* (Hemiptera: Miridae), phytophages, zoophages, or omnivores: evidence of feeding adaptations suggested by the salivary and midgut digestive enzymes. *Journal of Entomological Science*, 35: 176-186.

Aldrich, J. (1988). Chemical ecology of the Heteroptera. *Annual Review of Entomology*, 33: 211-238.

Aldrich, J., Lusby, W., Kochansky, J., Hoffmann, M., Wilson, L. et Zalom, F. (1988). *Lygus bug pheromones vis-à-vis stink bugs*

American Chemical Society, A. (2021). *Hexyl butyrate, 2-Hexenyl butanoate & (E)-4-Oxo-2-hexen-1-al*. Récupéré le 06 Mars 2021 de https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=2639-63-6

Andryszak, N., Payne, T. L., Dickens, J., Moser, J. C. et Fisher, R. (1990). Antennal olfactory responsiveness of the Texas leaf cutting ant (Hymenoptera: Formicidae) to trail pheromone and its two alarm substances. *Journal of Entomological Science*, 25: 593-600.

Annangudi, S. P., Sun, M. et Salomon, R. G. (2005). An efficient synthesis of 4-oxoalkenoic acids from 2-alkylfurans. *Synlett*, 2005, 09: 1468-1470.

Ballhorn, D. J. et Kautz, S. (2013). How useful are olfactometer experiments in chemical ecology research? *Communicative & integrative biology*, 6: e55602.

Biasazin, T. D., Chernet, H. T., Herrera, S. L., Bengtsson, M., Karlsson, M. F., Lemmen-Lechelt, J. K. et Dekker, T. (2018). Detection of volatile constituents from food lures by tephritid fruit flies. *Insects*, 9: 119.

Blackmer, J. L. et Byers, J. A. (2009). *Lygus* spp.(Heteroptera: Miridae) host–plant interactions with *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae), a new crop in the arid southwest. *Environmental entomology*, 38: 159-167.

Blumenthal, M. A. (1978). The Metathoracic Gland System of *Lygus Lineolaris* (Heteroptera: Miridae) Cornell University.

Bortolotti, L. et Costa, C. (2014). Chemical communication in the honey bee society. Dans *Neurobiology of chemical communication*. CRC Press/Taylor & Francis.

Bracalini, M., Croci, F., Ciardi, E., Mannucci, G., Papucci, E., Gestri, G., . . . Panzavolta, T. (2021). *Ips sexdentatus* Mass-Trapping: Mitigation of Its Negative Effects on Saproxylic Beetles Larger Than the Target. *Forests*, 12: 175.

Brattoli, M., De Gennaro, G., De Pinto, V., Demarinis Loiotile, A., Lovascio, S. et Penza, M. (2011). Odour detection methods: Olfactometry and chemical sensors. *Sensors*, 11: 5290-5322.

Brossut, R. (1996). *Phéromones: la communication chimique chez les animaux* Belin.

Butenandt, A., Beckmann, R. et Hecker, E. (1961). Über den sexuallockstoff des seidenspinners, i. der biologische test und die isolierung des reinen sexuallockstoffes bombykol. *Hoppe-Seyler s Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 324: 71-83.

Byers, J. A. (2006). Production and predator-induced release of volatile chemicals by the plant bug *Lygus hesperus*. *Journal of chemical Ecology*, 32: 2205-2218.

Byers, J. A., Fefer, D. et Levi-Zada, A. (2013). Sex pheromone component ratios and mating isolation among three *Lygus* plant bug species of North America. *Naturwissenschaften*, 100: 1115-1123.

Capinera, J. (2020). *Handbook of vegetable pests* Academic press.

Caruso, V., Hagan, J. et Manning, H. (1969). Quantitative Olfactometry in the Measurement of Posttraumatic Hyposmia: A Simple Method. *Archives of Otolaryngology*, 90: 500-503.

- Chinta, S., Dickens, J. C. et Aldrich, J. R. (1994). Olfactory reception of potential pheromones and plant odors by tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Chemical Ecology*, 20: 3251-3267.
- Chouinard-Thuly, L., Dumont, F., Provost, C., Lemieux, M., Chapdelaine, D., Quintana Sanchez, O. et Montiglio, P. O. (2020). Efficiency of volatile baited sticky traps for the Tarnished Plant Bug (*Lygus lineolaris*) in strawberry fields. *Journal of Applied Entomology*, 144: 331-334.
- Clancy, D. et Pierce, H. D. (1966). Natural enemies of some *Lygus* bugs. *Journal of Economic Entomology*, 59: 853-858.
- Control, C. f. D. et Prevention. (2011). Acute illnesses associated with insecticides used to control bed bugs--seven states, 2003--2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 60: 1269-1274.
- Department of Agriculture, U. S. o. A. (2015). *GC-EAD, What is GC-EAD?* U.S. Forest Service. Récupéré de <https://www.srs.fs.usda.gov/idip/tools/gc-ead/>
- Djojoputro, H., & Ismadji, S. (2005). Density and viscosity correlation for several common fragrance and flavor esters. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 50: 727-731.
- Drouin, B. (2020, 20 mai 2020). *Le Réseau d'Avertissements Phytosanitaires*. Dans Ministère de l'Agriculture, *Partenariat Canadien pour l'Agriculture*. Récupéré de https://www.agrireseau.net/documents/Document_97797.pdf
- Dumont, F., Chouinard-Thuly, L. et Provost, C. (2020, 1er Février 2020). *Surveillance à l'échelle régionale de la punaise terne, un ravageur polyphage, dans un contexte de changements climatiques*. Dans Fondsvert. Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel.
- Durieux, D., Verheggen, F., Vandereycken, A., Joie, E. et Haubruge, É. (2010). Synthèse bibliographique: l'écologie chimique des coccinelles. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14: 351-367.

El-Sayed, A., Suckling, D., Wearing, C. et Byers, J. (2006). Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *Journal of economic entomology*, 99: 1550-1564.

El-Shafie, H. A. F. et Faleiro, J. R. (2017). Semiochemicals and their potential use in pest management. *Biological Control of Pest and Vector Insects*; Shields, V., Ed, 1-22.

Environnement et ressources naturelles Québec. (2020). *Rapport de données quotidiennes pour juillet 2019*. Dans *MONTREAL MIRABEL INTL A, QUÉBEC. Opérateur de station opérationnelle : NAVCAN*. Récupéré de https://climat.meteo.gc.ca/climate_data/daily_data_f.html?StationID=49608&timeframe=2&StartYear=1840&EndYear=2020&Day=3&Year=2019&Month=7#legendM

Eurofins, L. (2020). *Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse, analyse GC-MS*. Récupéré de <https://www.eaglabs.fr/cm/gc-ms.html>

Fahlbusch, K. G., Hammerschmidt, F. J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K., ... & Surburg, H. (2000). Flavors and fragrances. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.

Ferguson, G., Murphy, G., Shipp, L. et Broadbent, B. (2016). Lutte contre la punaise terne dans les cultures de serre. Dans Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales Ontario.

Fleury, D., Pare, J. et Vincent, C. (2003). Histological identification of injuries on inflorescence of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) at the bloom by *Lygus lineolaris* (Parisot de Beauvois) (Heteroptera: Miridae). *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales Le Botaniste (France)*.

Fountain, M., Jåstad, G., Hall, D., Douglas, P., Farman, D. et Cross, J. (2014). Further studies on sex pheromones of female *Lygus* and related bugs: development of effective lures and investigation of species-specificity. *Journal of chemical ecology*, 40: 71-83.

Graham, H. (1987). Attraction of *Lygus* spp. males by conspecific and congeneric females. *The Southwestern entomologist (USA)*.

Groot, A. T., Drijfhout, F. P., Heijboer, A., Van Beek, T. A. et Visser, J. H. (2001). Disruption of sexual communication in the mirid bug *Lygocoris pabulinus* by hexyl butanoate. *Agricultural and Forest Entomology*, 3: 49-55.

Gueldner, R. et Parrott, W. (1978). Volatile constituents of the tarnished plant bug. *Insect Biochemistry*, 8: 389-391.

Hatfield, L., Ferreira, J. et Frazier, J. (1983). Host selection and feeding behavior by the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 76: 688-691.

Hatfield, P. et Pinter Jr, P. (1993). Remote sensing for crop protection. *Crop protection*, 12, 403-413.

Hislop, R. G. et Prokopy, R. J. (1981). Mite predator responses to prey and predator-emitted stimuli. *Journal of chemical ecology*, 7: 895-904.

Ho, H.-Y. et Millar, J. G. (2002). Identification, electroantennogram screening, and field bioassays of volatile chemicals from *Lygus hesperus* Knight (Heteroptera: Miridae). *Zoological studies-taipei-*, 41: 311-320.

International Society of Chemical Ecology. (2020). *International Society of Chemical Ecology, Inc. (ISCE)*. Dans What is Chemical Ecology? Récupéré de <https://www.chemecol.org/aboutISCE.shtml>

Kakizaki, M. (2004). The sex pheromone components for mating disruption of the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium* (Heteroptera: Miridae). *Applied entomology and zoology*, 39: 221-228.

Kawai, K., Matsuno, K. et Kasai, H. (2006). Detection of 4-oxo-2-hexenal, a novel mutagenic product of lipid peroxidation, in human diet and cooking vapor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603: 186-192.

Keil, T. A. (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. Dans *Insect olfaction*: 5-47. Springer.

- Kelton, L. A. (1975). The Lygus bugs (genus *Lygus* Hahn) of North America (Heteroptera: Miridae). *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 107: 5-101.
- Kitson, F. G., Larsen, B. S. et McEwen, C. N. (1996). *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*, Academic Press.
- Koczor, S., Vuts, J. et Tóth, M. (2012). Attraction of *Lygus rugulipennis* and *Adelphocoris lineolatus* to synthetic floral odour compounds in field experiments in Hungary. *Journal of Pest Science*, 85: 239-245.
- Landolt, P. J., Reed, H. C. et Heath, R. R. (1999). An alarm pheromone from heads of worker *Vespula squamosa* (Hymenoptera: Vespidae). *The Florida Entomologist*, 82: 356-359.
- Layton, M. (2000). Biology and damage of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*, in cotton. *Southwestern entomologist*, 23: 7-20.
- MAPAQ, B. D. (2020). *Réseau d'avertissement phytosanitaire*. Récupéré de https://www.agrireseau.net/documents/Document_97797.pdf
- Matsui, K., Sugimoto, K., Mano, J. i., Ozawa, R. et Takabayashi, J. (2012). Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLoS One*, 7: e36433.
- McIndoo, N. (1926). An insect olfactometer. *Journal of economic entomology*, 19: 545-571.
- Minh, T., Watanabe, M., Kajiwara, N., Iwata, H., Takahashi, S., Subramanian, A., Hata, J. (2006). Human blood monitoring program in Japan: contamination and bioaccumulation of persistent organochlorines in Japanese residents. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 51: 296-313.
- Ministère de l'Agriculture (2020). *Portrait-diagnostic sectorielle de l'industrie de la fraise et de la framboise au Québec*. Récupéré de https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Portraitdiagnostic-sectoriel fraises_framboises.pdf

Moreira, J. A. et Millar, J. G. (2005). Short and simple syntheses of 4-oxo-(E)-2-hexenal and homologs: pheromone components and defensive compounds of Hemiptera. *Journal of chemical ecology*, 31: 965-968.

Morrison, E. B. et Lindell, C. A. (2012). Birds and bats reduce insect biomass and leaf damage in tropical forest restoration sites. *Ecological Applications*, 22: 1526-1534.

MSSS (2020). *Pesticides et risques pour la santé*. Dans *Santé et environnement*. Récupéré de <https://www.quebec.ca/sante/conseils-et-prevention/sante-et-environnement/pesticides-et-risques-pour-la-sante/risques-d-exposition-aux-pesticides/>

Mueller, S. C., Summers, C. G. et Goodell, P. B. (2003). A field key to the most common *Lygus* species found in agronomic crops of the central San Joaquin Valley of California.

Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C. et Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database 716 for 2018. *Nucleic Acids Res*, 46, 608-617.

Patana, R. (1985). Rearing *Lygus hesperus* in the laboratory, 45 US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Payne, T., Andryszak, N., Wieser, H., Dixon, E., Ibrahim, N. et Coers, J. (1988). Antennal olfactory and behavioral response of southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*, to analogs of its aggregation pheromone frontalin. *Journal of chemical ecology*, 14: 1217-1225.

Phillips, T. W. (2006). The science and technology of postharvest insect control: challenges, accomplishments and future directions. *Insect management for food storage and processing*, 2: 211-222.

Ries, S., Baughan, R., Nair, M. G. et Schutzki, R. (2001). Repelling animals from crops using plant extracts. *HortTechnology*, 11: 302-307.

Schaefer, C. W. et Panizzi, A. R. (2000). Adventitious Biters—“Nuisance” Bugs. Dans *Heteroptera of economic importance*: 575-582. CRC Press.

Schneider, D. (1957). Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation. *Experientia*, 13: 89-91.

Scott, D. (1977). An annotated listing of host plants of *Lygus hesperus* Knight. *Bulletin of the ESA*, 23: 19-22.

Silverstein, R. M. et Bassler, G. C. (1962). Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39: 546.

Slaymaker, P. et Tugwell, N. (1984). Inexpensive female-baited trap for the tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae). *Journal of economic entomology*, 77: 1062-1063.

Spark, W. (2020). *Météo habituelle à Mirabel Canada, Vent*. Récupéré de <https://fr.weatherspark.com/y/24114/M%C3%A9t%C3%A9o-habituelle-%C3%A0-Mirabel-Canada>

Staddon, B. W. (1979). The scent glands of Heteroptera. Dans *Advances in Insect Physiology*, 14: 351-418. Elsevier.

Stauffer, E., Dolan, J. A. et Newman, R. (2007). *Fire debris analysis*. Academic Press.

Tingey, W. M. et Pillimer, E. A. (1977). Lygus bugs: crop resistance and physiological nature of feeding injury. *Bulletin of the ESA*, 23: 277-287.

Vandermoten, S., Mescher, M. C., Francis, F., Haubruge, E. et Verheggen, F. J. (2012). Aphid alarm pheromone: an overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42: 155-163.

Wardle, A., Borden, J., Pierce, H. et Gries, R. (2003). Volatile compounds released by disturbed and calm adults of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Journal of chemical ecology*, 29: 931-944.

Whitman, D. W., Blum, M. S. et Alsop, D. W. (1990). Allomones: chemicals for defense. *Insect Defenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*, 289, 351.

- Wolfe, M. S. (2000). Crop strength through diversity. *Nature*, 406, 681-682.
- Wyatt, T. D. (2003). *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste* Cambridge University Press.
- Young, O. (1986). Host plants of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79: 747-762.
- Zhang, Q.-H. et Aldrich, J. R. (2003). Male-produced anti-sex pheromone in a plant bug. *Naturwissenschaften*, 90: 505-508.
- Zhang, Q.-H., Chauhan, K. R., Zhang, A., Snodgrass, G. L., Dickens, J. C. et Aldrich, J. R. (2007). Antennal and behavioral responses of *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois)(Heteroptera: Miridae) to metathoracic scent gland compounds. *Journal of Entomological Science*, 42: 92-104.
- Zhang, W. et Zhao, P. X. (2014). *Quality evaluation of extracted ion chromatograms and chromatographic peaks in liquid chromatography/mass spectrometry-based metabolomics data*, 15. BioMed Central.