

## LISTE DES ABREVIATIONS

CG-BP/SM-SM : Chromatographie Gazeuse à Basse Pression couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

CG-DIF : Chromatographie gazeuse couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme

CG-SM : Chromatographie gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

DVB : Divinylbenzène

HS-SDME : Headspace Single Drop Micro Extraction (Micro-Extraction par simple goutte)

HS-SPME : Headspace Solid Phase Micro Extraction (Micro-Extraction en Phase Solide conduite en mode espace de tête)

IRR : Indice de Rétention Relatif

MELL : Micro Extraction Liquide Liquide

PDMS : Polydiméthylsiloxane

SAU : Surface Agricole Utile

SPME : Solid Phase Micro Extraction (Micro Extraction en Phase Solide)

uma : unité de masse atomique

N.B : les mots signalés par un astérisque sont définis dans le glossaire

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	9
-------------------	---

## PREMIÈRE PARTIE ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1 : LES MOUCHES DE FRUITS NUISIBLES AUX CUCURBITACEAE.. 13

1. TAXONOMIE .....	13
2. ORIGINE ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE .....	15
3. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES.....	15
4. COMPORTEMENT ET SÉLECTION DE LA PLANTE HÔTE.....	16
5. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT .....	16

### CHAPITRE 2 : LES CUCURBITACEAE ..... 18

1. CARACTÈRES BOTANIQUES .....	18
1.1 Classification .....	18
1.2 Caractéristiques principales.....	18
1.2.1 Appareil végétatif .....	18
1.2.2 Appareil reproducteur .....	19
2. LES CUCURBITACEAE LES PLUS COMMUNES .....	20

### CHAPITRE 3 : CHIMIE DES COMPOSÉS VOLATILS DE PLANTES..... 22

1. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES COMPOSÉS VOLATILS .....	22
1.1 Headspace statique : la micro-extraction sur phase solide (SPME).....	23
1.1.1 Principe et généralités .....	23
1.1.2 Description du système .....	24
1.1.3 Revêtement des fibres polymériques .....	25
1.1.4 Modalités pratiques de mise en œuvre.....	25
1.2 Headspace dynamique .....	29
1.2.1 Closed-Loop Stripping.....	29
1.2.2 Pull systems (systèmes d'extraction) .....	30
1.2.3 Push-pull systems .....	31
1.2.4 Online Volatile Collection Systems.....	32

<b>2.</b>	<b>TECHNIQUES D'ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS</b> .....	33
2.1	La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	33
2.1.1	La chromatographie gazeuse.....	33
2.1.1.1	Historique.....	33
2.1.1.2	Principe .....	34
2.1.2	La spectrométrie de masse .....	38
2.1.2.1	Historique.....	38
2.1.2.2	Principe.....	39
2.2	La chromatographie gazeuse énantio-sélective.....	41
<b>3.</b>	<b>IDENTIFICATION DES COMPOSÉS VOLATILS</b> .....	43
3.1	Les spectres de masse .....	43
3.2	Les indices de rétention relatifs (IRR) .....	46
3.3	Corrélation masse-indices de rétentions relatives .....	47
<b>4.</b>	<b>DIVERSITÉ CHIMIQUE DES COMPOSÉS VOLATILS DE PLANTES</b> .....	48
4.1	Les différentes classes de composés .....	48
4.2	La variation de la composition des parfums .....	49
<b>5.</b>	<b>CAS PARTICULIER DES CUCURBITACEAE</b> .....	50

## DEUXIÈME PARTIE

### ÉTUDE DES COMPOSÉS VOLATILS DE QUELQUES CUCURBITACEAE DE LA RÉUNION

<b>1.</b>	<b>PRINCIPE DE LA METHODE</b> .....	55
<b>2.</b>	<b>MISE AU POINT DES CONDITIONS D'EXTRACTION</b> .....	56
2.1	Optimisation de la durée d'extraction pour le fruit découpé.....	57
2.1.1	Principe.....	57
2.1.2	Résultats .....	57
2.1.3	Discussion.....	58
2.2	Optimisation de la température d'extraction pour le fruit découpé.....	59
2.2.1	Principe.....	59
2.2.2	Résultats.....	59
2.2.3	Discussion.....	61

<b>3. PREMIERS ÉLÉMENTS RELATIFS À L'ATTRACTIVITÉ DES PLANTES-HÔTES</b> .....	61
3.1 Principe.....	61
3.2 Résultats .....	63
3.2.1 Étude comportementale .....	63
3.2.2 Étude des composés volatils .....	64
3.3 Discussion.....	65
3.3.1 Étude comportementale .....	65
3.3.2 Étude des composés volatils .....	66
3.3.3 Corrélation des données .....	67
CONCLUSION .....	70
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	72
GLOSSAIRE.....	76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	79
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	85

# INTRODUCTION

L'étude réalisée durant ce stage contribue à l'avancée des travaux de thèse menés par Toulassi ATIAMA-NURBEL (Direction Dr-HDR Serge QUILICI, UMR-PVBMT, CIRAD Réunion – Co-direction Dr-HDR Anne BIALECKI, LCSNSA, Université de la Réunion). Ces travaux sont consacrés à l'étude des relations insecte-plante et des stimuli attractifs chez deux espèces de *Dacini* (Diptera, Tephritidae) nuisibles aux Cucurbitaceae.

L'étude des plantes-hôtes\* constitue une étape clé dans la compréhension des relations insecte-plante. Le succès d'une descendance pour l'insecte réside en effet dans la capacité de la femelle à localiser et reconnaître la plante appropriée à la ponte et la survie de sa progéniture. Cette localisation s'effectue en deux temps : la découverte à distance (stimuli olfactifs et visuels) et la reconnaissance au contact (stimuli physiques et chimiques). L'importance relative des stimuli olfactifs et visuels a été étudiée par exemple pour la mouche de la tomate, *Neoceratitis cyanescens* (Brevault & Quilici, 1999; 2000 a et b ; 2007 a et b ; 2009).

Parmi les diptères Tephritidae trois espèces la tribu de *Dacini* sont responsables de graves dégâts causés aux cultures de Cucurbitaceae (courgette, citrouille, melon ...) à l'île de la Réunion. Deux d'entre elles, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) et *Dacus ciliatus* (Loew) sont au centre des travaux menés par Toulassi ATIAMA-NURBEL. Originaires d'Inde et d'Éthiopie respectivement, ces deux espèces de mouches, ont été introduites à La Réunion et dans de nombreux pays par l'intermédiaire du commerce des fruits et légumes et sont devenues envahissantes.

Pour ces deux espèces de mouches, on se propose d'étudier, les deux principaux types de stimuli attractifs intervenant dans la recherche du fruit hôte par la femelle afin de vérifier les hypothèses suivantes : (1) la spécificité de l'insecte (sténophage\* ou oligophage\*) influence le mode d'intervention et la hiérarchie des stimuli, (2) les composés spécifiques d'une famille de plantes sont à la base de l'attractivité des femelles de *Dacini* à la recherche du fruit hôte.

Pour atteindre cet objectif, la méthodologie proposée comprend trois étapes :

#### Étape 1 : Réponse des *Dacini* aux effluves de plantes

Cette étape consiste à déterminer l'attractivité relative des plantes-hôtes attaquées par ces *Dacini*, à l'aide d'études conduites en olfactomètre ou en cages de comportement. Celle-ci sera déterminée pour des fruits à différents stades phénologiques, mais aussi pour d'autres

organes (fleurs, feuilles), sur les principales espèces cultivées (courgette, concombre, melon...) ou sauvages (margoze, coccinia...).

### Étape 2 : Analyse des composés volatils de Cucurbitaceae

Pour ces analyses chimiques deux techniques seront employées. La première, la micro-extraction sur phase solide (SPME) est un procédé permettant de recueillir grâce à un dispositif particulier, les composés volatils émis par le fruit. La deuxième, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) permettra l'analyse des composés volatils extraits par SPME. Les analyses seront effectuées sur des fruits in situ ou prélevés, jeunes ou mûrs, entiers ou découpés.

### Étape 3 : Réponse des femelles aux composés volatils isolés ou en mélange

Les tests seront réalisés en olfactomètre et en cages de comportement et permettront d'évaluer l'attractivité d'une sélection de substances pour les femelles des deux espèces de mouches étudiées. Les expérimentations seront réalisées sur les composés les plus prometteurs (en fonction de leur concentration, de leur fréquence) dont l'attractivité sera évaluée pour une gamme de concentrations.

## **Objectif du stage**

L'objectif de ce stage est de contribuer à une meilleure connaissance des composés volatils émis par les Cucurbitaceae, en vue de mieux orienter les travaux futurs sur les relations insecte- plante et la recherche d'attractifs spécifiques des Dacini.

Les différentes étapes à réaliser pour atteindre notre objectif sont :

1. Étudier la nature et l'abondance relative des composés volatils émis par les fruits d'une large gamme de Cucurbitaceae cultivées ou spontanées en utilisant la SPME associée à la CG-SM.
2. Effectuer une analyse comparative des émissions volatiles pour différents stades phénologiques du fruit.

Ce travail a donné lieu à l'écriture d'un poster qui sera présenté au congrès annuel de la Société Internationale d'Ecologie Chimique qui se déroulera en Lituanie du 22 au 26 juillet 2012 (28th Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology) (Annexe 1).

# PREMIÈRE PARTIE

## Étude bibliographique

# CHAPITRE 1 : Les mouches de fruits nuisibles aux Cucurbitaceae

Sur l'île de la Réunion, la canne à sucre mobilise 24 500 ha des 43 000 ha de la SAU, mais le maraîchage tient également une place non négligeable. En effet, en terme de surface, la culture maraîchère recouvre 3600 ha ce qui représente une production en fruits et légumes de 95 000 t (site de la chambre d'agriculture de la Réunion). Cette production couvre près de 80% des besoins de la population réunionnaise.

Les Cucurbitaceae occupaient en 2008 environ 400 ha pour une production de 8 000 t. Ce sont principalement la courgette, le concombre, la citrouille, le chou chou, le melon et la pastèque (Agreste, 2009). Mais les récoltes de ces espèces fruitières peuvent fortement varier d'une année à l'autre, cela en fonction des conditions climatiques mais aussi des dégâts causés par de nombreux bio-agresseurs et maladies. Les ravageurs qui causent le plus de dégâts et qui présentent une réelle menace économique pour les agriculteurs sont les mouches de fruits. Les mouches femelles pondent dans les jeunes fruits, qui vont être dévorés par la suite par les larves. Les fruits ainsi altérés subissent une forte diminution de leur valeur marchande. À La Réunion, les pertes peuvent concerner 30 à 100% des récoltes selon l'espèce de Cucurbitaceae et la saison (Ryckewaert et al. 2010). On dénombre huit espèces d'importance économique appartenant à la famille des Tephritidae. Celle-ci comprend de nombreuses espèces dont certaines comptent parmi les ravageurs des fruits les plus dommageables dans le monde (Vontas et al 2011). *Bactrocera cucurbitae* et *D. ciliatus* sont les deux espèces de mouches sur lesquelles nous nous concentrerons pour cette étude bibliographique.

## 1. TAXONOMIE

Les mouches des fruits appartiennent à la famille de Tephritidae qui compte environ 4000 espèces réparties dans 500 genres. La Figure 1 présente la position taxonomique des espèces de Tephritidae présentes à La Réunion. Notons que toutes les espèces de cette famille ne sont pas des ravageurs de fruits (Duyck 2005).

Huit espèces d'importance économique sont présentes sur les cultures fruitières ou maraîchères à l'île de la Réunion. Elles font partie de la sous famille des *Dacinae* et appartiennent à deux tribus : celle des *Dacini* et celle des *Ceratitidini*.

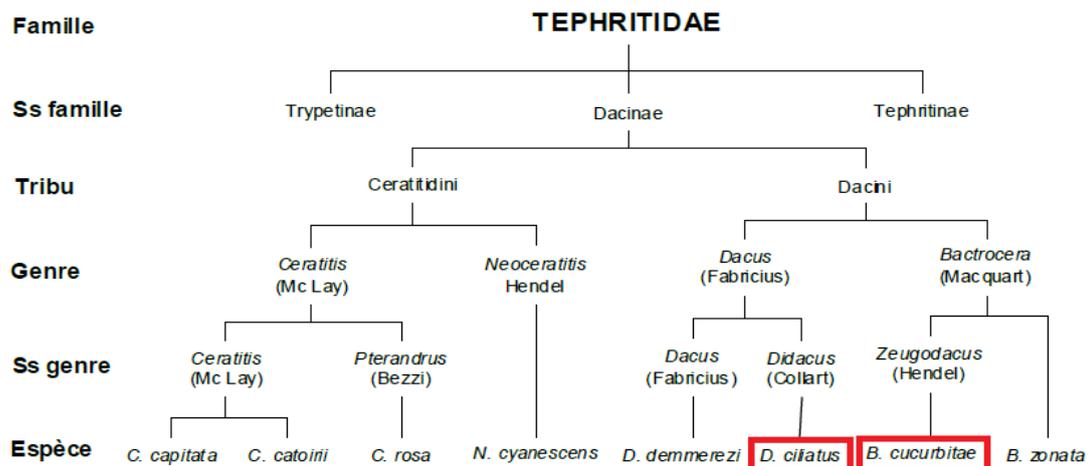


La tribu des *Ceratitidini* comprend quatre représentants sur l'île de la Réunion :

- *Neoceratitis cyanescens* (Bezzi) ou Mouche de la tomate,
- *Ceratitits rosa* (Karsch) ou Mouche du Natal,
- *Ceratitits capitata* (Wiedemann) ou Mouche méditerranéenne de fruits,
- *Ceratitits catoiriii* Guérin-Mèneville ou Mouche des fruits des Mascareignes.

La tribu des *Dacini* compte également quatre représentants sur l'île de la Réunion dont nos deux modèles d'étude :

- *Dacus ciliatus* Loew ou Mouche Ethiopienne des Cucurbitaceae,
- *Dacus demmerezi* (Bezzi) ou Mouche des Cucurbitaceae de l'Océan Indien,
- *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) ou Mouche du melon,
- *Bactrocera zonata* (Saunders) ou Mouche de la pêche.



**Figure 1:** Position taxonomique des espèces de Tephritidae nuisibles à La Réunion (d'après Norrbom, 2004)

La mouche de melon, *B. cucurbitae* est polyphage\* et attaque plus de 125 espèces de plantes, majoritairement des Cucurbitaceae et des Solanaceae (notamment les tomates) (Pinero et al. 2006).

*Dacus ciliatus* elle, est une mouche oligophage\* qui se développe dans les fruits d'une large gamme de Cucurbitaceae.

Ces deux espèces de *Dacini* sont caractérisées par une mobilité importante des adultes, une grande longévité, une fécondité importante, et une faculté à développer de nombreuses générations pendant toute l'année, tout au moins dans les zones de basse altitude (Vayssières 1999).

## 2. ORIGINE ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

*Bactrocera cucurbitae*, communément appelée « la Mouche du melon » serait originaire de l'Inde (Bezzi 1913), mais elle est actuellement largement répandue à travers le monde (Virgilio et al. 2011). Cette espèce est abondante en Asie de l'Est (Pakistan, Inde, Bangladesh, Népal, Chine, Indonésie et Philippines), en Océanie (Nouvelle-Guinée et les îles Mariannes) et à Hawaï, où elle a été introduite il y a quelques décennies (Bess et al. 1961). *Bactrocera cucurbitae* est également présente dans différents pays d'Afrique où elle a fait sa première apparition en Tanzanie en 1936. Dans les Mascareignes, la mouche du melon a été signalée à l'île Maurice en 1942, à La Réunion en 1972 (Oke 2008) et, plus récemment, aux Seychelles en 1999 (White et al. 2000).

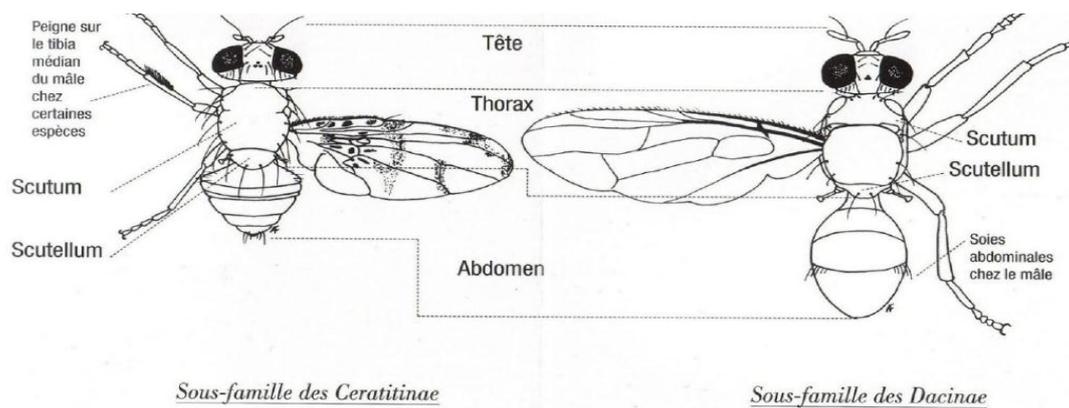
*Dacus ciliatus*, communément appelée « la Mouche éthiopienne des Cucurbitaceae », est probablement originaire d'Éthiopie. Elle est largement distribuée en Afrique, mais a aussi été introduite en Asie (Inde, Bangladesh, Pakistan, Sri-Lanka) et dans l'Océan Indien (Madagascar, Mayotte, Maurice, Ile de La Réunion) (Pointel 1964).

## 3. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES

La Figure 2 illustre les caractéristiques morphologiques qui permettent de distinguer les différentes espèces de mouches appartenant à la famille des Tephritidae.

*Dacus ciliatus* possède des antennes dont les gaines ont une tâche noire; le scutum\* est orange et n'a pas de bandes latérales ou médianes. Le scutellum\* est jaune à orange, les pattes sont principalement jaunes et l'abdomen est principalement orange.

*Bactrocera cucurbitae* possède un scutum avec une bande latérale et médiane jaunes. Sur les ailes, la nervure transversale, est couverte d'une zone brune.



**Figure 2** : Éléments de reconnaissance morphologique des mouches *Bactrocera cucurbitae* et *Dacus ciliatus* (Dessins A. Franck ; extrait de Quilici & Jeuffrault (2001))

#### 4. COMPORTEMENT ET SÉLECTION DE LA PLANTE HÔTE

La notion de plante-hôte\* est importante à considérer pour aborder les relations insectes plantes. Dans le cas des *Dacini*, une plante hôte est une plante spécifiquement choisie par la femelle comme site de ponte pour permettre le développement de sa progéniture. La femelle sélectionne donc les plantes sur lesquelles elle dépose ses œufs et sur lesquelles sa progéniture pourra s'alimenter. Le succès de leur descendance dépend ainsi du choix par la femelle de la plante hôte qui doit être adaptée aux besoins nutritifs de leur progéniture (Robert 1986). Ces mouches peuvent déposer leurs pontes dans les parties végétatives de la plante (tiges) comme dans les organes floraux (fleurs femelles et mâles) (Vayssières et al. 2000).

Ce comportement de sélection de la plante met en jeu un système d'échange d'informations entre cette dernière et l'insecte phytophage. Les informations perçues peuvent être de nature physique (stimuli visuels) mais sont majoritairement de nature chimique (composés volatils émis par la plante).

#### 5. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT

Le cycle de développement des Tephritidae est résumé dans la Figure 3. Après avoir choisi sa plante hôte, la mouche va pondre ses œufs. Les œufs, qui mesurent environ 1 mm, sont blancs et légèrement arqués. À l'éclosion, de minuscules asticots émergent des œufs. Les larves se nourrissent grâce aux nutriments contenus dans la pulpe du fruit. À l'issue du

développement larvaire, l'asticot quitte le fruit en sautant. Il retombe alors sur le sol dans lequel il s'enfonce pour se nymphoser\*, formant alors une pupa de laquelle émergera l'adulte (Duyck 2005).

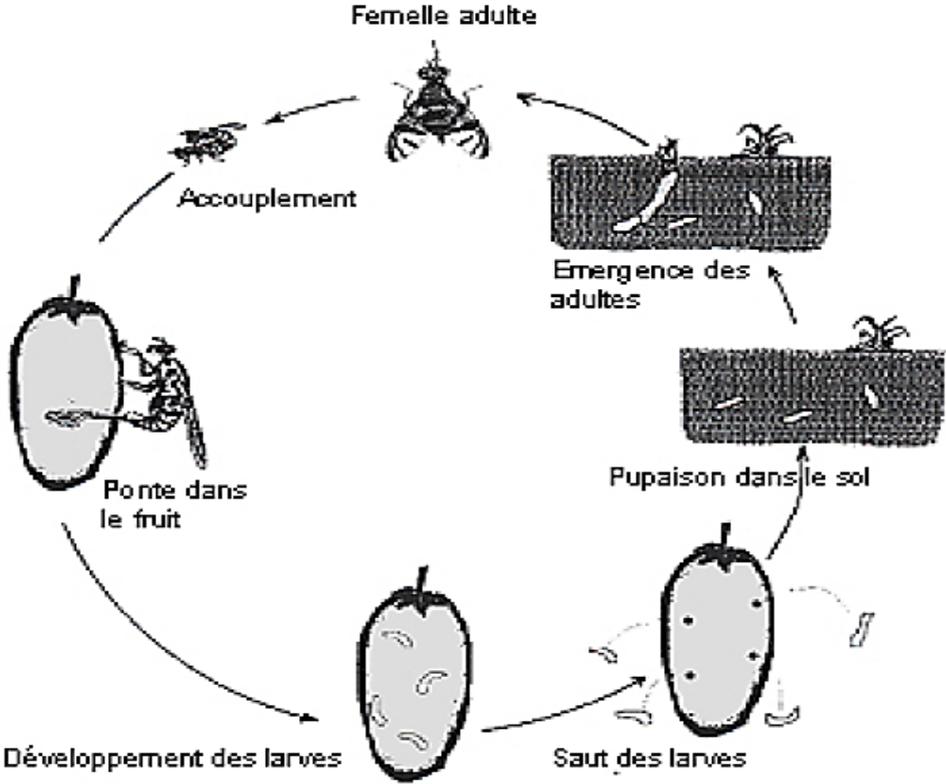


Figure 3: Cycle de développement des Tephritidae (Duyck 2005).

# CHAPITRE 2 : Les Cucurbitaceae

## 1. CARACTÈRES BOTANIQUES

### 1.1 Classification

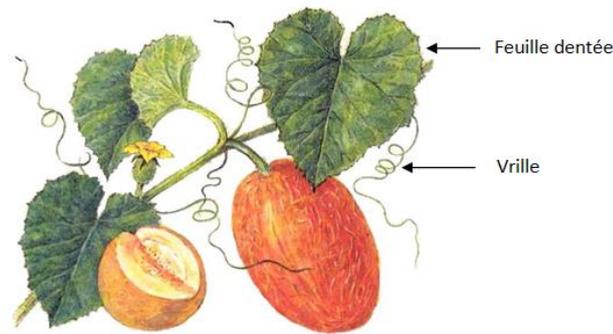
<b>Règne</b> : Végétal
<b>Sous-règne</b> : Eucaryotes
<b>Embranchement</b> : Archégoniates
<b>Sous-embranchement</b> : Phanérogames
<b>Classe</b> : Angiospermes
<b>Sous-classe</b> : Dicotylédones gamopétales
<b>Ordre</b> : Cucurbitales
<b>Famille</b> : Cucurbitaceae

La famille des Cucurbitaceae est une famille de plantes dicotylédones\* qui comprend environ 800 espèces tropicales et subtropicales. Elles sont regroupées en 119 genres dont les principaux sont : *Gurania* (75 espèces), *Sicyos* (50 espèces), *Momordica* (45 espèces), *Cayaponia* (45 espèces) et *Cucumis* (32 espèces) (Botineau 2010).

### 1.2 Caractéristiques principales

#### 1.2.1 Appareil végétatif

Les Cucurbitaceae sont des plantes herbacées, rampantes ou grimpantes grâce à des vrilles spiralées. Elles possèdent des tiges charnues. Chez certaines espèces les parties souterraines peuvent être charnues, permettant à la plante d'être vivace\*. Les feuilles sont alternes, souvent dentées (Figure 4). Leur forme peut varier d'un individu à un autre au sein d'une même espèce. Les plantes possèdent des poils rugueux du fait de la présence de cystolithes\* à la base (Botineau 2010).



**Figure 4:** *Cucumis melo*, le melon

### 1.2.2 Appareil reproducteur

L'appareil reproducteur se compose de trois éléments : l'inflorescence, la fleur et le fruit.

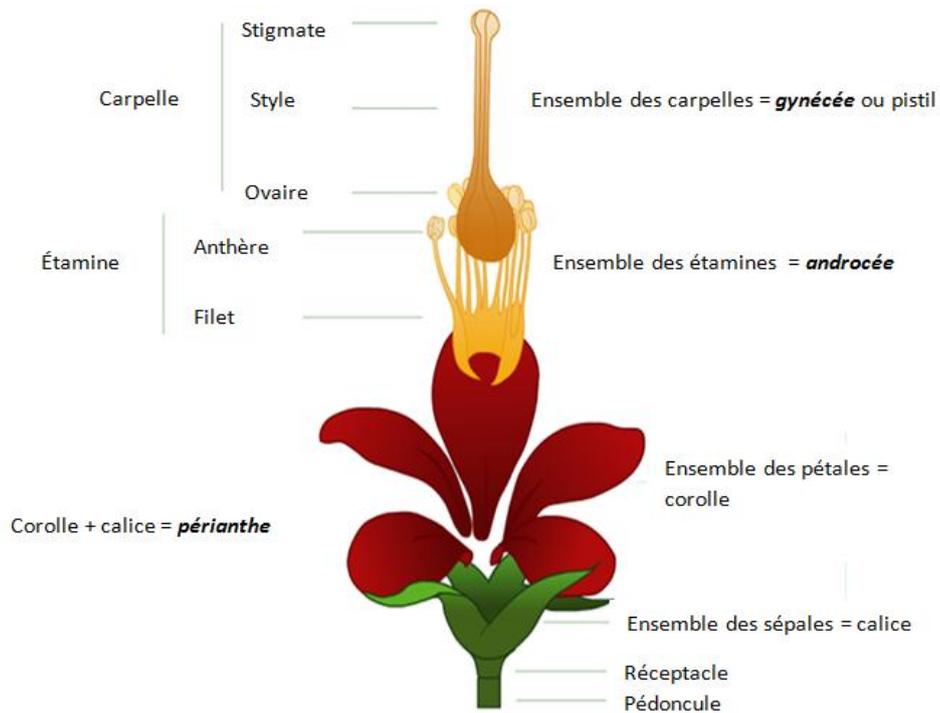
#### ✓ L'inflorescence

L'inflorescence est la disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur. Chez les Cucurbitaceae, l'inflorescence que l'on rencontre le plus souvent est une cyme\*.

#### ✓ La fleur

Les plantes sont le plus souvent monoïques\*, régulières, presque toujours unisexuées et sont constituées de plusieurs organes : le périanthe, l'androcée et le gynécée (Figure 5).

- Le **périanthe** est composé du calice (formé par l'ensemble des sépales) et de la corolle (formée par l'ensemble des pétales). C'est une enveloppe stérile, qui joue un rôle protecteur pour les pièces fertiles, et attractif pour les animaux pollinisateurs. Il peut être de couleur blanchâtre, jaune, orange ou rouge.
- L'**androcée** forme la partie mâle de la fleur c'est-à-dire l'ensemble des étamines qui produisent le pollen.
- Le **gynécée** ou pistil constitue la partie femelle de la fleur. Il est formé par trois carpelles généralement (parfois cinq).



**Figure 5:** Structure d'une fleur

Après la pollinisation, la fleur est fécondée et se transforme en fruit contenant les graines.

### ✓ Le fruit

La formation du fruit résulte de la transformation du pistil après fécondation. Le fruit obtenu est dénommé péponide. C'est plus précisément la paroi de l'ovaire (partie du pistil qui renferme l'ovule) qui devient la paroi du fruit, appelée péricarpe. Le péricarpe entoure les graines qui sont aplaties et parfois ailées.

## 2. LES CUCURBITACEAE LES PLUS COMMUNES

Les 8 espèces de Cucurbitaceae les plus communes à la Réunion et étudiées au cours de ce stage sont présentées dans le tableau I.

**Tableau I:** Espèces de Cucurbitaceae présentes à la Réunion

Espèces	Variétés	Noms vernaculaires	Illustrations	Descriptions
<i>Cucumis melo</i>	Anasta	Melon		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Afrique inter-tropicale</li> <li>-Fruits vert, jaune et même noir, à écorce lisse ou rugueuse</li> <li>-Pulpe généralement jaune-orange</li> <li>-Parfum intense et très particulier</li> </ul>
<i>Cucumis sativus</i>	Pointe blanche Antilla Tropical Showy green F1-04 Kenya	Concombre		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Inde</li> <li>- Fruits verts, jaunes ou blancs. Les plus répandus sont les verts</li> <li>- Consommés avant la maturité</li> </ul>
<i>Cucurbita moschata</i>	variété produite par le Cirad	Citrouille pays		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Amérique du Sud</li> <li>- Chair jaune à jaune orangé, fine</li> <li>- Fruit de 8 à 12 cm de diamètre pour la partie cylindrique, de 15 à 25 cm de haut</li> <li>- Son poids varie entre 1,5 et 3 kg.</li> </ul>
<i>Cucurbita pepo</i>	-	Courgette		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Amérique centrale</li> <li>-Fruit de forme allongée ou ronde, et de couleur verte ou jaune</li> <li>- Sa tige, qui rampe jusqu'à 10 mètres, porte de très grandes feuilles à 5 lobes, velues, au long pétiole, ainsi que des vrilles.</li> </ul>
<i>Luffa acutangula</i>	variété produite par le Cirad	Pipangaille à côte		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Origine : Inde</li> <li>-Liane grimpante ou rampante</li> <li>-Fruits cylindriques de 20 à 40 cm de long</li> <li>-Fruits jeunes consommés en légumes, fruits laissés à vieillir permettront d'obtenir une éponge végétale</li> </ul>
<i>Luffa cylindrica</i>	variété produite par le Cirad	Pipangaille lisse		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Origine : Inde</li> <li>-Liane grimpante ou rampante</li> <li>-Fruits cylindriques de 20 à 40 cm de long et possède une surface lisse</li> <li>-Fruits jeunes consommés en légumes, fruits laissés à vieillir permettront d'obtenir une éponge végétale</li> </ul>

Espèces	Variétés	Noms vernaculaires	Illustrations	Descriptions
<i>Momordica charantia</i>	Naja	Margoze cultivée		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Asie</li> <li>- Plante herbacée rampante ou grimpante</li> <li>- Fruit semblable à un cornichon</li> <li>- Verdâtre en naissant, jaune safran à maturité</li> <li>- Sa surface extérieure est parsemée d'énormes verrues</li> </ul>
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	variété produite par le Cirad	Patole		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origine : Asie, Australie et îles du Pacifique ouest</li> <li>- Plante grimpante tropicale cultivée pour son long fruit</li> <li>- Fruit mince, long et cylindrique, souvent vrillé, de 30 à 150 cm de long et de 2 à 10 cm de circonférence</li> <li>- Vert-gris rayé blanc immature, rouge foncé à maturité</li> </ul>

Les fruits de nombreuses Cucurbitaceae sont comestibles et possèdent une forte teneur en eau (atteignant 95% de la pulpe fraîche). D'autres peuvent être toxiques comme par exemple la Bryone ou vigne blanche (*Bryonia dioica*), le concombre d'Âne (*Ecballium elaterim*) ou encore la véritable Coloquinte officinale (*Citrillus colocynthis*).

## CHAPITRE 3 : Chimie des composés volatils de plantes

### 1. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES COMPOSÉS VOLATILS

Dans cette étude bibliographique, on se limitera à l'étude des techniques headspace c'est-à-dire à l'étude des composés volatils contenus dans l'espace de tête. La technique headspace est basée sur la volatilité de l'analyte recherché dans une matrice complexe non chromatographiable. Elle peut prendre deux aspects, soit statique, où le prélèvement se fait directement dans l'espace de tête, soit dynamique, après piégeage de l'analyte sur un support que l'on désorbe par un choc thermique. L'espace de tête correspond à la partie supérieure du flacon qui est comprise entre la matrice et le bouchon assurant l'étanchéité du flacon. Les

molécules volatiles se retrouvent dans cet espace et sont celles qui sont à identifier et à quantifier. (Papet et al. 2010).

### **1.1 Headspace statique : la micro-extraction sur phase solide (SPME)**

L'échantillonnage de composés volatils à partir de l'headspace statique a l'avantage de concentrer ces volatils dans un tube ou une chambre fermée. On prélève après une période d'équilibre thermodynamique dans l'espace de tête un volume fixe de manière manuelle ou automatique qui est injecté dans le chromatographe. Dans ces conditions, la quantité de chaque composé volatil contenue dans l'espace de tête est proportionnelle à la concentration contenue dans la matrice. Les impuretés qui peuvent résulter d'un flux d'air continu sont réduites, ce qui est un avantage lors de la collecte de composés à faible émission. Pour les applications qui requièrent une évolution dans le temps, c'est-à-dire avec un changement dans les émissions volatiles, l'échantillonnage headspace statique n'est pas le mieux adapté car tous les volatiles émis ne sont pas enlevés au même temps d'échantillonnage et les changements dans les émissions sont difficiles à déterminer (Dudareva & Pichersky, 2006).

#### **1.1.1 Principe et généralités**

La **Micro Extraction sur Phase Solide (SPME)** est une technique d'extraction sans solvant, applicable à des molécules organiques plus ou moins volatiles, à partir d'échantillon qui peuvent-être aqueux, solides ou gazeux ou même à l'état de trace. Les composés sont extraits par absorption\* ou adsorption\* sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère. (Pellerinet Burgot).

Introduite au début des années 1990 par les canadiens Pawliszyn et Arthus, et commercialisée en 1993 par la société Supelco, cette technique a su trouver de très nombreuses applications dans des domaines aussi variés que l'environnement, la pharmacie, la toxicologie, la chimie légale ou encore l'agroalimentaire.

Le principe de base de cette méthode repose sur la technique d'ab(ad)sorption-désorption utilisant une fibre revêtue de différents types d'ab(ad)sorbants inertes. Ces ab(ad)sorbants peuvent varier de polarité et d'épaisseur, et sont sélectionnés selon les différents types d'applications. Après concentration des molécules sur la phase polymérique pendant la phase d'extraction, ces molécules sont transférées dans l'injecteur d'un appareil de

chromatographie en phase gazeuse (CG) ou de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour être désorbés, c'est la phase de désorption des molécules (Dudareva & Pichersky, 2006).

### 1.1.2 Description du système

On distingue deux techniques de SPME, le système seringue (Figure 6) et le système colonne :

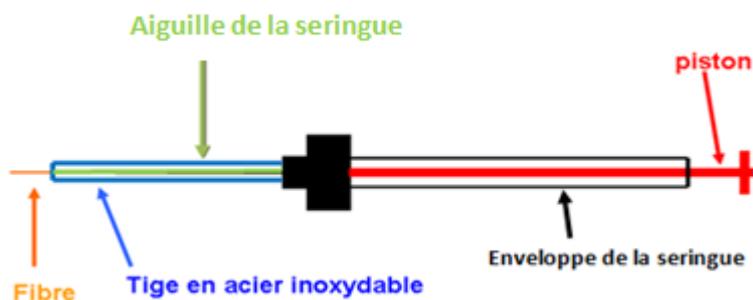
#### ✓ Le système seringue

Ce système est composé de deux éléments :

- Une fibre de silice fondue de 1 à 2 cm revêtue d'une phase polymérique dont l'épaisseur varie entre 7 et 16  $\mu\text{m}$ .
- Un piston en acier inoxydable à l'extrémité duquel est placée la fibre.

#### ✓ Le système colonne

Dans le système colonne une colonne capillaire entre 50 et 100 cm remplace la fibre. Cette colonne capillaire est recouverte des mêmes polymères que le système seringue et elle est placée dans une boucle d'injection. Ce système est davantage utilisé en CLHP.



**Figure 6:** Schéma du système SPME de type seringue

### 1.1.3 Revêtement des fibres polymériques

Le choix du polymère est fonction du composé à analyser et notamment de sa polarité et de sa volatilité. Il existe de nombreux polymères disponibles commercialement (Tableau II).

La fibre la plus utilisée est la fibre revêtue de Polydiméthylsiloxane (PDMS). Le PDMS présente les avantages de posséder une longue durée de vie (100 analyses environ) et une grande stabilité thermique (supporte jusqu'à 300°C). Mais sa sensibilité est limitée à des substances polaires ou peu volatiles. Ainsi le développement de nouveaux revêtements a été nécessaire. C'est ainsi qu'est apparu le polyacrylate (PA), le divinylbenzène (DVB) ou encore le carbowax. La sensibilité des fibres peut être augmentée en combinant plusieurs phases polymériques (Pawliszyn 1999).

**Tableau II** : Caractéristiques de quelques revêtements polymériques pour les fibres SPME

Nature du revêtement	Épaisseur	Polarité	Température maximale de désorption	Nature du composé
PDMS	100	Non polaire	280	Volatil (arômes, parfums, additifs alimentaires ...)
	30	Non polaire	280	Volatil (arômes, parfums, additifs alimentaires ...)
PDMS	7	Non polaire	340	Semi-volatil à non volatil, substance de haut poids moléculaire non polaire
PDMS-DVB	65	Bipolaire	270	Polaire volatil
Carbowax-DVB	65	Polaire	260	Polaire (alcools), cétone nitré
DVB-PDMS-Carboxen®	50/30	Bipolaire	270	Volatil et semi-volatil

### 1.1.4 Modalités pratiques de mise en œuvre

#### ❖ L'extraction

L'extraction des matrices liquides, solides ou gazeuses émettant des composés volatils s'effectue en plongeant la fibre dans l'échantillon. Plus précisément, l'échantillon à analyser est placé dans un flacon fermé par un bouchon équipé d'un septum ; le septum est tout d'abord percé à l'aide de l'aiguille (avec la fibre dans la position rétractée), et le piston est ensuite

abaissé, ce qui expose la fibre à l'échantillon. Les analytes peuvent ainsi se répartir à la surface du revêtement polymérique pendant quelques minutes. À l'issue de ce temps de pause, la fibre est ensuite rétractée dans l'aiguille puis retirée du flacon (Pawliszyn 1999).

L'extraction peut être réalisée selon trois modes :

✓ **L'extraction directe**

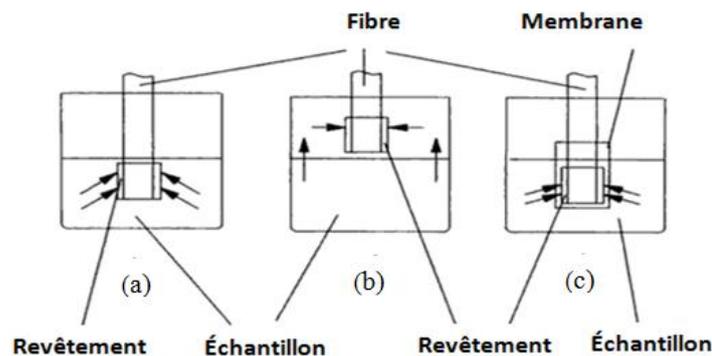
Ce type d'extraction s'applique aux matrices liquides en plongeant la fibre directement dans l'échantillon (Figure 7a). La fibre revêtue de sa phase polymérique est insérée dans l'échantillon et les analytes sont transportés directement de la matrice échantillon à la phase d'extraction. Pour réaliser une extraction plus rapide et ainsi attendre plus facilement le point d'équilibre, une agitation est nécessaire.

✓ **L'extraction de l'espace de tête appelé « headspace »**

Cette extraction s'applique aux matrices liquides, solides ou gazeuses qui émettent des composés volatils (Figure 7b). Les analytes sont extraits de la phase gazeuse équilibrée issue de l'échantillon. Ce mode d'extraction permet de protéger la fibre contre les effets néfastes susceptibles d'être provoqués par les substances non-volatiles de haut poids moléculaire présentes dans la matrice de l'échantillon. En général, le temps d'équilibre est atteint plus rapidement pour une extraction en « headspace » que pour une extraction directe.

✓ **L'extraction protégée d'une membrane**

La fibre est directement plongée dans l'échantillon mais elle est protégée par une membrane semi-perméable (Figure 7c). Celle-ci empêche certains composés susceptibles de dégrader la fibre de venir au contact de cette fibre.



**Figure 7:** Les différents modes d'extraction

- (a) Extraction directe
- (b) Extraction de l'espace de tête
- (c) Extraction protégée d'une membrane

Au cours de l'extraction, les analytes vont progressivement être concentrés sur la phase polymérique par absorption ou adsorption jusqu'à atteindre un équilibre au sein du système. Le point d'équilibre est déterminé par la grandeur du coefficient de partage de l'analyte entre la matrice et le matériau de revêtement.

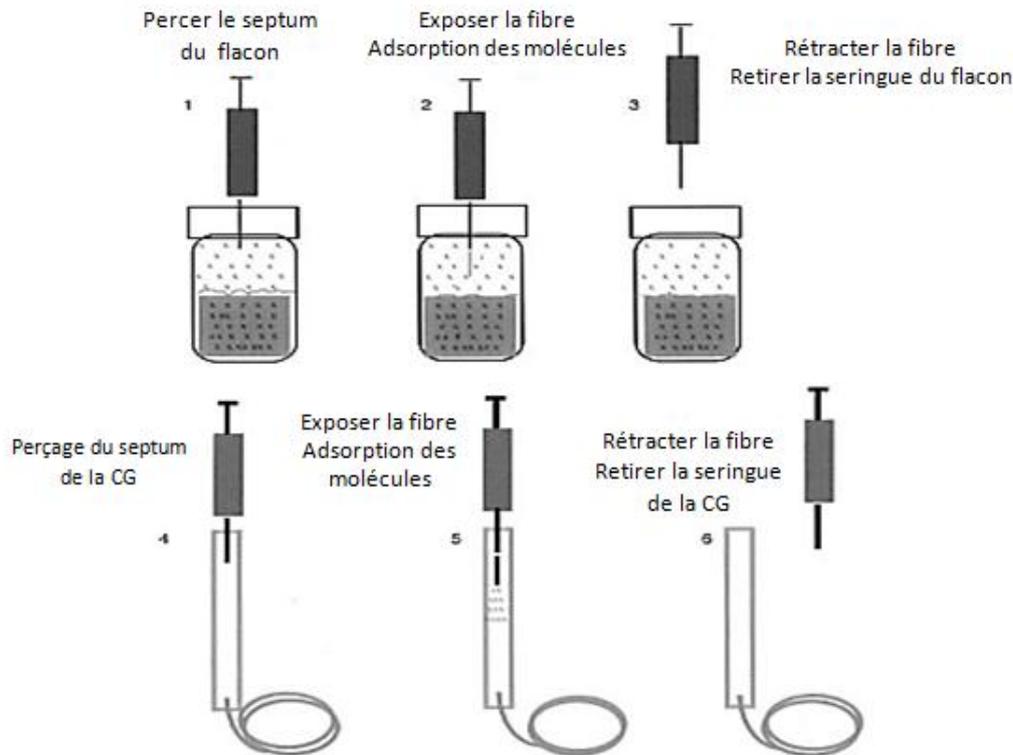
### ❖ Désorption

La désorption des composés préalablement concentrés au cours de l'extraction a lieu au sein d'un injecteur. Selon la nature de la matrice, la désorption est soit couplée à la CG, soit couplée à la CLHP.

#### ✓ Désorption par couplage avec un chromatographe en phase gazeuse (CG)

La CG est utilisée lors de l'analyse de matrices liquides, solides ou gazeuses émettant des composés volatils. La désorption se déroule de la manière suivante : l'aiguille est introduite dans l'injecteur, la fibre étant rétractée dans l'aiguille. La fibre est ensuite sortie quelques minutes de l'aiguille. Les composés concentrés sur la fibre sont alors thermiquement désorbés dans l'injecteur porté à haute température. Après quelques minutes de temps de pause, la fibre est rétractée dans l'aiguille et retirée de l'injecteur. Le chromatographe en phase gazeuse peut être couplé soit à un spectromètre de masse, soit à d'autres détecteurs tels

que le détecteur à ionisation de flamme (DIF, détecteur universel). La Figure 8 illustre une extraction de l'espace de tête et une désorption par CG.

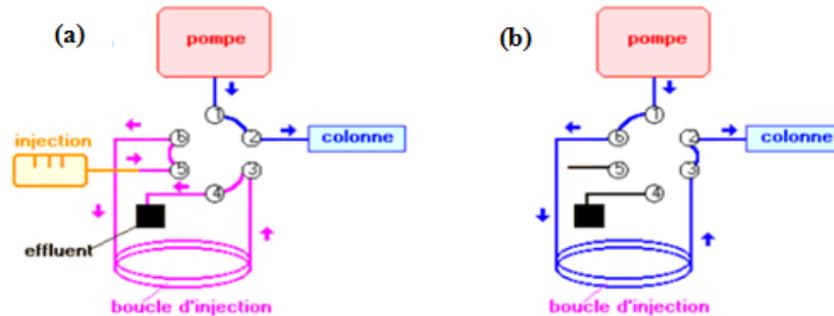


**Figure 8:** Illustration des différentes étapes de l'extraction de l'espace de tête (1-3) et de la désorption de molécules en CG (4-6) (Mitra 2003)

### ✓ Désorption par couplage avec un chromatographe en phase liquide (CLHP)

La CLHP est utilisée le plus souvent pour des matrices liquides et complexes. L'injecteur de la CLHP est constitué d'une vanne haute pression ( $P > 100$  bars, manuelle ou non) à plusieurs voies dont le fonctionnement se déroule en deux étapes (Figure 9). La première étape consiste à remplir la boucle : le solvant d'élution circule librement de la pompe (en **1**) à la colonne (en **2**). L'injection est réalisée (en **6**) dans la boucle. Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent, communément appelé l'évier (en **4**). La deuxième étape consiste en l'injection proprement dite de l'échantillon : on bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va alors balayer la boucle (de **1** à **4**) et entraîner l'échantillon dans la colonne. L'injection doit se faire de manière très rapide afin de perturber le moins longtemps possible le régime de circulation du solvant. Ce système permet une bonne reproductibilité à condition

de remplir entièrement la boucle. Le remplissage de celle-ci se fait grâce à une seringue et son volume est variable de 1 à 100mL.



**Figure 9:** Illustration de la désorption de molécules par CLHP  
 (a) Remplissage de la boucle  
 (b) Injection de l'échantillon

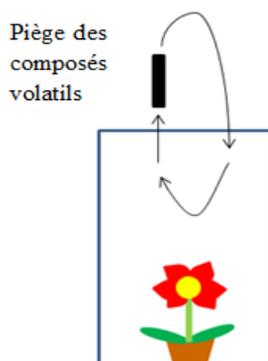
## 1.2 Headspace dynamique

L'échantillonnage des composés volatils par l'headspace dynamique élimine certains problèmes qui surviennent lors de l'échantillonnage par l'headspace statique. En général, de plus grandes quantités de composés volatils peuvent être recueillies sur de plus longues périodes d'ab(ad)sorption avec un flux d'air continu, permettant la détection et l'identification des composés. De plus, le système équipé d'une entrée continue d'air permet de fournir une température suffisante, un échange gazeux et évite l'accumulation de composés dans l'headspace, paramètres qui peuvent influencer sur la libération des composés volatils. L'humidité relative peut être ajustée dans le système push-pull à un pourcentage souhaité en ajoutant un flux d'air humide à l'air sec contenu dans le système. Cependant, il est nécessaire de nettoyer l'air entrant avec soin au moyen de filtres contenant par exemple, du charbon actif (Dudareva & Pichersky, 2006).

### 1.2.1 Closed-Loop Stripping

Dans le système closed-loop stripping (Figure 10), les composés volatils sont recueillis à l'intérieur d'un dispositif fermé en faisant circuler l'espace de tête d'ab(ad)adsorption.

L'inconvénient de ce procédé est la forte réduction d'échange d'air entre l'intérieur et l'extérieur de la chambre ce qui affecte l'échange de gaz de la plante pendant les longues périodes d'échantillonnage. Les composés volatils qui ne sont pas ab(ad)sorbés dans le matériau de piégeage ou qui passent au travers du piège car la surface ab(ad)sorbante est saturée s'accumulent dans la chambre et peuvent influencer le métabolisme de la plante.



**Figure 10:** Schéma de la collecte des composés volatils par closed-loop stripping

### 1.2.2 Pull systems (systèmes d'extraction)

Le pull système est un piège ab(ad)sorbant connecté à une pompe à vide qui est directement positionnée à côté de la fleur. Ce procédé est adapté aux plantes qui émettent de grandes quantités de composés volatils mais il présente le risque élevé de piéger de l'air ambiant contenant des impuretés, non liées à la fleur, risquant de masquer les composés mineurs des échantillons lors de l'analyse CG. L'isolement de la plante dans un petit récipient en verre ou dans un sac en polyacétate libérant très peu de composés volatils peut réduire la quantité d'impuretés de l'air ambiant.

Bien que cette méthode soit simple à mettre en place, elle possède quelques inconvénients :

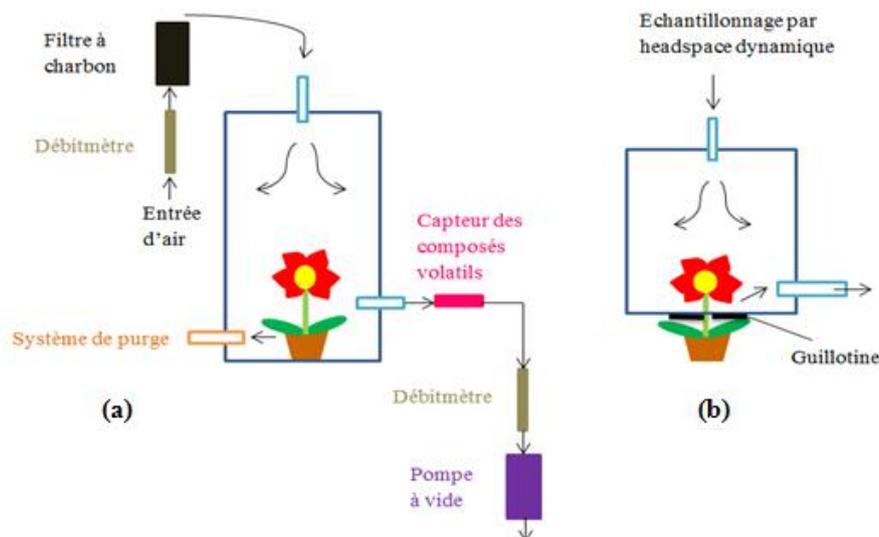
- La température peut augmenter quand la chambre est directement exposée au soleil ;
- L'humidité relative à l'intérieur de la chambre peut augmenter jusqu'à 100% dans un délai court et peut provoquer de la condensation sur les parois de la chambre ;
- L'utilisation d'un sac peut endommager les tissus de la plante lors de la pause altérant ainsi l'émission des composés volatils ;

- Des ouvertures dans la chambre peuvent fournir des sources supplémentaires d'air impur entrant dans le système.

### 1.2.3 Push-pull systems

Dans le système push-pull (Figure 11a), de l'air purifié, pouvant être humidifié selon un pourcentage souhaité, est propulsé dans une chambre contenant la plante, avec un débit contrôlé et régulé par un débitmètre. Une quantité définie de cet air est éliminée par une pompe à vide régulée par un deuxième débitmètre. Ainsi un pourcentage connu des composés volatils émis est collecté. Pour éviter le vide ou une surpression du système, un système de purge est disposé dans la chambre. La ventilation à pression positive empêche l'air ambiant de contaminer les matières volatiles recueillies.

Cette ventilation à pression positive est également utilisée dans quelques grandes chambres de collecte de verre dont le fond est constitué d'une sorte de guillotine (Figure 11b). La guillotine est constituée de deux lames revêtues de téflon amovibles qui ferment la partie inférieure de la chambre autour de la tige de la plante, en laissant une ouverture pour la tige lorsque les lames s'emboîtent. Ce système de collecte permet l'échantillonnage de composés volatils de certaines parties intactes de la plante en croissance tandis que la partie inférieure de la plante comprenant la terre et le pot, est complètement isolé. Les composés volatils recueillis sont par la suite élués du piège par un solvant et sont analysés par CG. Cette technique a été améliorée, avec l'automatisation par ordinateur qui permet l'analyse des échantillons à des intervalles de temps prédéfinis pendant plusieurs jours pour suivre l'évolution de l'émission de substances volatiles.



**Figure 11:** Schéma de la collecte des composés volatils par le push-pull system

- (a) Collecte avec les pièges à filtres
- (b) Collecte par le système de guillotine

#### 1.2.4 Online Volatile Collection Systems

Le piégeage des composés volatils sur des adsorbants et leur élution avec des solvants organiques ont été utilisés avec succès dans de nombreuses applications. Toutefois, la sensibilité de la méthode se traduit par la dilution des matières volatiles par le solvant dans le procédé de désorption. Étant donné que seules de petites quantités de composés élués peuvent être analysés par CG, les périodes d'échantillonnage doivent être suffisamment longues pour fournir un éluat avec suffisamment de matériau pour l'analyse. Donc des informations précises sur la libération des volatils pendant de courtes périodes sont difficiles à obtenir.

La désorption thermique\* est une méthode alternative, où les composés volatils sont collectés par un piège directement placé dans un petit four positionné au-dessus du chromatographe en phase gazeuse. En chauffant, le piège retenant les composés volatils, ces derniers sont transférés vers la colonne analytique. Toutefois, à cause des interactions entre les analytes et la surface ab(ad)sorbante, une forte température est requise pour la désorption en fonction des composés. Une température basse de désorption se traduira par la libération incomplète des composés du piège, tandis qu'une température trop élevée de désorption peut générer des artefacts à travers la formation de produits de dégradation. Dans la désorption thermique on utilise le Tenax® comme adsorbant, mais il peut générer des produits de dégradation provenant de la décomposition du squelette polymère et une désorption

incomplète des composés de haut poids moléculaire. En comparaison avec le Tenax®, le PDMS est connu pour avoir de meilleures propriétés dans la pré-concentration des analytes en les dissolvant sur la majeure partie de la phase liquide au lieu de les adsorber sur une surface poreuse. Ainsi moins d'énergie est nécessaire pour libérer les composés volatils piégés par du PDMS que ceux piégés par du Tenax®. De plus, de basses températures sont suffisantes pour transférer l'échantillon dans la colonne de la CG.

L'automatisation du système d'échantillonnage a été mise en place grâce à une méthode de désorption thermique online : Gerstel Online-TDS G.

## **2. TECHNIQUES D'ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS**

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CG-SM) est aujourd'hui l'une des techniques les plus utilisées de la chimie analytique. La CG permet de séparer les substances d'un mélange éventuellement très complexe de nature et de volatilité très diverse ; la spectrométrie de masse quant à elle, permet de détecter et d'identifier chacun de ces composants. La chromatographie gazeuse peut être couplée à différents types de détecteurs, mais le spectromètre de masse tend à devancer tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales. Ainsi, l'association de ces deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

### **2.1 La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse**

#### **2.1.1 La chromatographie gazeuse**

##### **2.1.1.1 Historique**

Depuis 1940, la CG s'est répandue au sein des laboratoires et elle n'a cessé d'évoluer. Le concept de la chromatographie a été introduit par Martin et James, qui furent également à la base de la chromatographie liquide-liquide (Skoog et al. 2003). Mais les véritables premières expériences de CG n'ont été réalisées qu'en 1951 sur des acides gras de faible masse moléculaire. Rapidement les chercheurs ont compris le potentiel du partage avec une phase gazeuse pour résoudre les problèmes de séparation de nombreux systèmes. Mais ce n'est qu'en 1955 qu'apparait le premier appareil de chromatographie en phase gazeuse. A

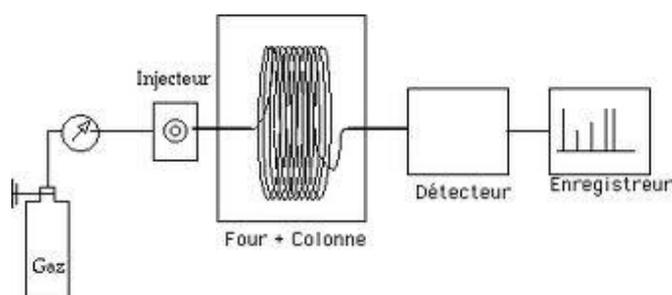


l'heure actuelle, cette technique de séparation est l'une des plus utiles et des plus répandues dans les laboratoires analytiques (Mendham et al. 2006).

### 2.1.1.2 Principe

La chromatographie gazeuse (CG) est une technique réservée à la séparation des molécules d'un mélange de composés relativement volatils et thermiquement stables. La CG est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile (gaz vecteur) et une phase liquide immobilisée sur la surface d'un support inerte (phase stationnaire).

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois éléments : un injecteur (ou chambre d'injection), une colonne et un détecteur (Figure 12).



**Figure 12:** Illustration des différents modules de la CG

#### ❖ Système d'injection

L'injecteur permet l'introduction de l'échantillon en solution à l'intérieur de l'appareil au moyen d'une seringue. La chambre d'injection a pour fonction de porter l'échantillon à l'état vapeur et de l'amener en tête de colonne grâce au gaz vecteur. Ce gaz vecteur, constitue la phase dite "mobile". Il est choisi inerte vis-à-vis des composés du mélange et de la phase stationnaire (He, N<sub>2</sub> pour les plus utilisés). Son rôle consiste à véhiculer les analytes de l'injecteur au détecteur via la colonne analytique. La viscosité d'un gaz variant avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit et de pression. Ces régulateurs ajustent la pression ou le débit du gaz en fonction de la température, de manière à ce que, selon les conditions opératoires choisies, le débit ou la

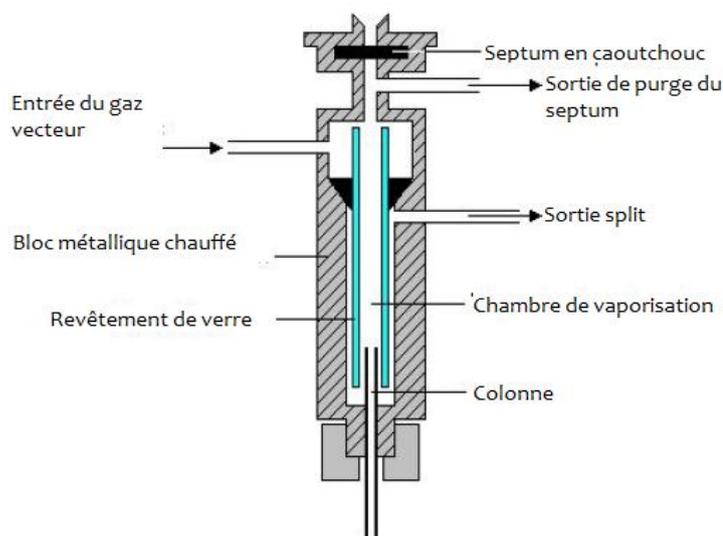
pression du gaz dans la colonne soit constant ; ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe (Bouchonnet et Libong).

Il existe différents systèmes d'injection en CG (Tableau III). Le choix du mode d'injection dépend de la nature de l'échantillon. Dans cette étude bibliographique, ne seront décrits que l'injecteur *split/splitless*.

**Tableau III** : Systèmes d'injection utilisés en chromatographie gazeuse capillaire

Nom	Volume de l'échantillon (µl)	Concentration	Application
Avec division de flux ( <i>split</i> )	0,1 – 2	élevée	générale
Sans division de flux ( <i>splitless</i> )	0,5 – 10	faibles – traces	solutions diluées
Directe à froid sur colonne	1,0 – 500	faibles – traces	concentrations faibles « délicates »
Vaporisation à température programmée	1,0 – 50	faibles – élevée	espèces thermiquement instables

La méthode d'introduction d'échantillon la plus courante est l'injection « avec division de flux » ou injection en *split* c'est-à-dire avec fuite (Figure 13). Les injecteurs à diviseurs de flux permettent d'injecter de très faibles volumes ce qui permet de ne pas saturer la colonne. Elle convient parfaitement à de nombreux types d'échantillon. Elle est utilisée pour l'analyse de petites quantités de solutions concentrées en analytes (>0,01 %) sans devoir les diluer au préalable. L'échantillon, entre 0,1 et 1,0µL, est injecté dans la chambre d'injection chauffée, où il se vaporise et se mélange avec le gaz vecteur. En mode *split*, seule une proportion prédéfinie, entre 1 et 10% est admise dans la colonne, le reste est rejeté dans l'atmosphère par une vanne de fuite. Ce type d'injecteur présente l'inconvénient de conduire à une erreur de concentration. Cela est dû à une discrimination entre les composés dont la volatilité est très différente. Les composés les plus lourds sont mal vaporisés et restent majoritairement dans l'injecteur alors que les composés volatils sont facilement éliminés par la fuite.



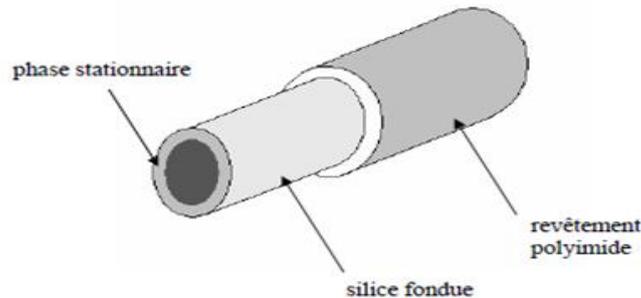
**Figure 13:** Injecteur en mode *split*

Le mode d'injection « sans division de flux » ou injection *splitless* c'est-à-dire sans fuite est recommandé pour la détection de traces, ce sont donc les échantillons qui contiennent de faibles concentrations en analytes qui sont les mieux adaptés. Ce mode est utilisé en SPME puisque cette technique est utilisée pour des microquantités de composés volatils, il n'y a donc pas de risque de saturation de la colonne. Dans le cas des échantillons très dilués, l'injecteur est dans un premier temps placé à basse température de façon à ne volatiliser que le solvant qui sera alors introduit dans la colonne en premier. Puis la température de l'injecteur est augmentée afin de volatiliser les analytes qui seront introduits à leur tour dans la colonne. Par rapport au mode *split*, la vanne de fuite reste fermée. Ainsi tout ce qui est introduit dans l'injecteur part dans la colonne de façon successive et donc sans risque de saturation. Le volume injecté est plus important que lors d'une injection en mode *split*, i.e entre 0,5 et 5 $\mu$ L (Mendham et al. 2006).

#### ❖ Colonne

Il s'agit d'une colonne capillaire, placée dans une enceinte thermostatée, pouvant aller de la température ambiante à 400°C. Elle se présente sous la forme d'un tube enroulé sur lui-même. Ce tube est constitué de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'une fine

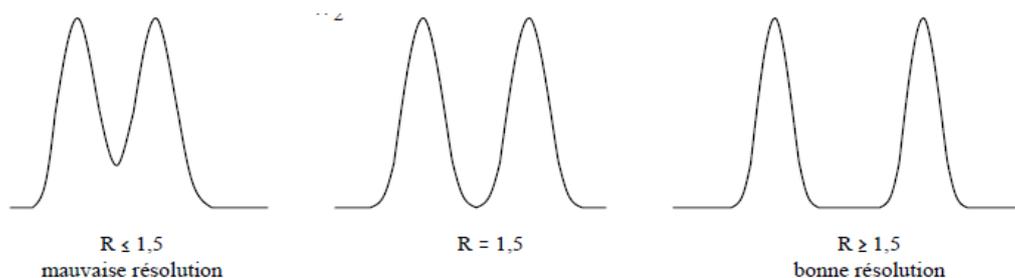
pellicule nommée "phase stationnaire". La paroi externe est enveloppée d'un revêtement en polyimide qui donne souplesse et robustesse à la colonne (Figure 14).



**Figure 14:** Représentation schématique d'une colonne capillaire

La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Ainsi la phase stationnaire peut être soit apolaire, soit mi-polaire, soit polaire. Par conséquent, selon sa polarité, les constituants du mélange à analyser seront séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire et de leur volatilité si cette dernière est apolaire (Bouchonnet et Libong).

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur entre 5 et 100m, son diamètre interne entre 0,1 et 0,75mm, l'épaisseur de sa phase stationnaire entre 0,2 et 5 $\mu$ m. Chacun de ses paramètres exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation. L'objectif étant de choisir la colonne la mieux adaptée à l'échantillon à analyser pour pouvoir obtenir des pics chromatographiques les plus fins possibles (grande efficacité), les mieux séparés possible (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum (Figure 15) (Pawliszyn 1999).



**Figure 15:** Notion de résolution chromatographiques

## ❖ Détecteurs

Il existe différents types de détecteurs mais le spectromètre de masse tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie. Le détecteur permet de repérer les composés en sortie de colonne et de transformer ce repère en un signal électrique ce qui permet de tracer un chromatogramme. Il existe des détecteurs dits universels c'est-à-dire sensibles à pratiquement tous les composés élués et ceux dits spécifiques c'est-à-dire spécifiques à un type particulier de molécules. Les détecteurs sont regroupés en deux groupes :

- Ceux qui conduisent au seul temps de rétention (le détecteur à conductibilité thermique TCD ou catharomètre, le détecteur à ionisation de flamme DIF, le détecteur thermo-ionique NPD et le détecteur à capture d'électron ECD) ;
- Ceux qui conduisent aux informations structurales des composés détectés (le détecteur de masse et le détecteur infra rouge).

Lorsqu'il y a couplage entre la chromatographie gazeuse et la spectrométrie de masse, la colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une "ligne de transfert". Il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ 300°C) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent entre les deux appareils.

### 2.1.2 La spectrométrie de masse

#### 2.1.2.1 Historique

Les premières expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées en 1910 par J.J Thompson, qui montra que le néon est en réalité formé de deux types d'atomes différents (ses isotopes). Ce premier spectromètre de masse avait un pouvoir de résolution\* de 15, alors que maintenant il peut atteindre 125 000. Dès 1919, F.W. Aston inventa la focalisation magnétique et électrostatique en introduisant le tri des ions en fonction de leur vitesse. Ceci lui permit de déterminer les abondances isotopiques du néon et de mettre en évidence les écarts entre les masses atomiques réelles et les nombres entiers (Mendham et al 2006). En 1936, F. M. Penning propose de combiner un champ électrique et un champ magnétique pour piéger les ions dans un très faible volume : c'est le piège de Penning. En 1940, A. O. Nier perfectionne la source d'ions à impact électronique. Puis, entre 1953 et 1960, W. Paul et

H. S. Steinwedel mettent au point l'analyseur quadripolaire, puis le piège ionique quadripolaire qui diffère de celui de Penning par l'absence de champ magnétique. En 1989, W. Paul et à H. Dehmelt reçoivent le prix Nobel grâce au retentissement dû au piège quadripolaire. Pendant les années 1960, L. G. Smith met au point le spectromètre de masse à radiofréquence. Depuis 1950, les techniques d'ionisation se diversifient de façon à s'adapter à la diversité des échantillons à analyser, particulièrement pour la chimie organique. Cette technique d'analyse bénéficie alors du couplage avec un chromatographe en phase gazeuse puis liquide. Les progrès de l'informatique ont permis l'automatisation des réglages de l'appareil ainsi que la mise en œuvre des analyseurs à quadripôle et des pièges ioniques dans de nombreuses applications de la spectrométrie de masse (Encyclopédie Universalis).

### 2.1.2.2 Principe

Le spectromètre de masse (SM) permet l'identification et la quantification des analytes. Le spectromètre de masse est constitué de trois éléments : une source qui permet l'ionisation des molécules de l'échantillon, un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et un détecteur. Chaque composé à la sortie de la colonne chromatographique est envoyé dans le spectromètre de masse pour y être analysé et ainsi obtenir un spectre de masse comme illustré dans la Figure 16 suivante.

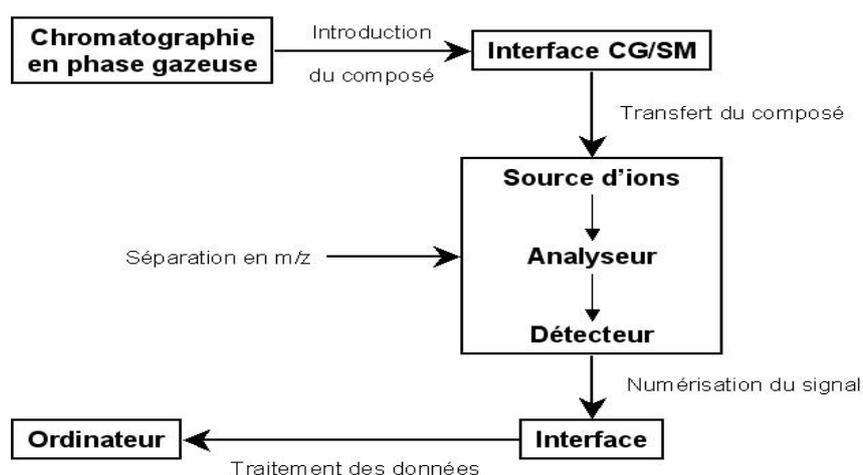
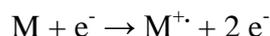


Figure 16: Schéma du couplage CG-SM

## ❖ Source ionique

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. La nature de la source utilisée dépend de l'état physique de la substance à analyser. En couplage avec un chromatographe en phase gazeuse, où les composés élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à "ionisation électronique" (IE) ou à "ionisation chimique" (IC). Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou facilement volatilisables (point d'ébullition n'excédant pas 400°C). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des analytes (Bouchonnet, Libong).

L'ionisation électronique est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée. C'est un mode d'ionisation énergétique qui provoque un maximum de fragmentation dans les liaisons chimiques et fournit un grand nombre d'espèces ioniques. L'"impact" d'un électron sur une molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^{\cdot+}$ .

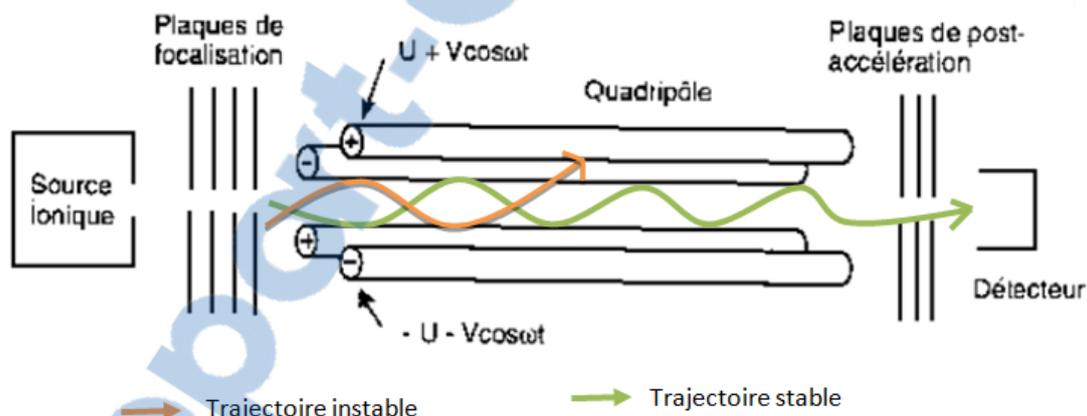


Les électrons sont produits par un filament incandescent sous une énergie de 70 eV et leur collision avec les molécules à analyser donne naissance à la formation d'un ion moléculaire radicalaire. Seuls les fragments chargés seront évacués de la source.

L'ionisation chimique est plus sélective que l'IE et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes (Bouchonnet, Libong). C'est une méthode qui utilise un gaz réactif (à la pression d'environ 1 mm Hg) qui est ionisé par un faisceau d'électrons et donne une série d'ions qui à leur tour réagissent avec les substances à analyser. En IC, la substance à analyser n'est pas directement ionisée par les électrons. Ce mode d'ionisation a pour principe de produire des ions par collision de la molécule M à analyser avec des ions primaires provenant de gaz tel que le méthane, l'ammoniac ou encore l'isobutane. Ce gaz R, dit "gaz réactant" introduit dans la source, subit l'ionisation électronique. Ce sont les ions  $RH^+$  formés qui, dans un deuxième temps, vont réagir avec l'analyte M en lui transférant un proton pour former des ions  $MH^+$  dans le cas de l'ionisation chimique positive et  $MH^-$  dans le cas de l'ionisation chimique négative.

## ❖ Analyseur

Également appelé système dispersif il permet la séparation des ions selon leur rapport masse/charge c'est-à-dire  $m/z$ . L'analyseur le plus utilisé lors du couplage CG-SM est l'analyseur quadripolaire. Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, ayant une section hyperbolique. À un couple d'électrodes on associe un champ magnétique  $F(t) = U + V\cos\omega t$  et à l'autre couple,  $-F(t)$  (Figure 17) (Bouchonnet et Libong). Sous l'influence du champ continu et sinusoïdal, les ions adoptent un mouvement latéral oscillatoire. Ce mouvement laisse passer certaines masses tandis que d'autres sont sur une trajectoire instable ne leur permettant pas d'atteindre le détecteur. Le quadripôle est donc un filtre de masse. La variation simultanée des valeurs de  $U$  et de  $V$  permet aux ions produits par la source d'être stables à tour de rôle. Ce système permet de transmettre au détecteur les ions par ordre croissant du rapport  $m/z$  et ainsi obtenir des spectres en basse résolution.

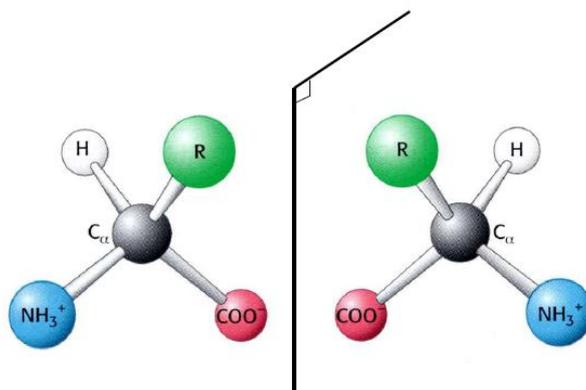


**Figure 17:** Schéma de l'analyseur quadripolaire

## 2.2 La chromatographie gazeuse énanti-sélective

La chiralité des composés odorants d'une plante est très importante pour la réponse olfactive des insectes et notamment celle des mouches. Ainsi la détermination de la composition énantiomérique des composés volatils est essentielle pour comprendre les interactions plante-insecte. La chiralité est une notion importante de la stéréo-isomérisation (Huhnerfuss 2009). Une molécule est dite chirale ou asymétrique si un atome de carbone

possède quatre substituants différents. Une molécule qui possède un carbone asymétrique existe sous deux configurations, lesquelles sont symétriques par rapport à un plan : ce sont deux énantiomères (Figure 18).



**Figure 18:** Représentation de deux molécules énantiomères

Gil-Av et al. ont présenté le premier exemple de séparation directe des énantiomères par CG en Israël, à l'institut des Sciences de Weizmann en 1966. Il s'agit de la résolution de racémiques d'esters d'acides aminés N-trifluoroacétylés sur phase stationnaire L-N-trifluoroacétylé L-isoleucine lauryl (Schurig 2002). L'application principale de la séparation des énantiomères par chromatographie en phase gazeuse porte sur la détermination précise des compositions énantiomériques de substances chimiques chirales, de précurseurs, de drogues, de pesticides, de fongicides, d'herbicides, de phéromones, d'arômes et de parfums (Schurig 2001). Ainsi, la chromatographie gazeuse énantio-sélective a démontré son potentiel pour un large éventail d'applications dans diverses industries. Des exemples de CG énantio-sélective incluent la séparation énantiomérique directe des composants optiquement actifs dans les produits naturels, les contaminants environnementaux, et ceux qui sont importants pour la science spatiale, l'agriculture, l'alimentaire, la saveur et les parfums industriels .

En CG énantio-sélective, trois grands types de phases stationnaires chirales ont été bien étudiés [2,3] :

- une classe sur la base de dérivés d'acides aminés chiraux ;
- une classe sur la base de composés chiraux de coordination de métal ;
- et une troisième classe sur la base de dérivés de la cyclodextrine.

Un exemple de phase stationnaire chirale : le populaire Chirasil-Val est fabriqué à partir de l'acide aminé valine facilement disponible. Cette phase stationnaire est disponible dans le commerce sous ses deux formes énantiomériques. Il y a eu un certain nombre de tentatives pour améliorer ses performances (Li et al., 2008).

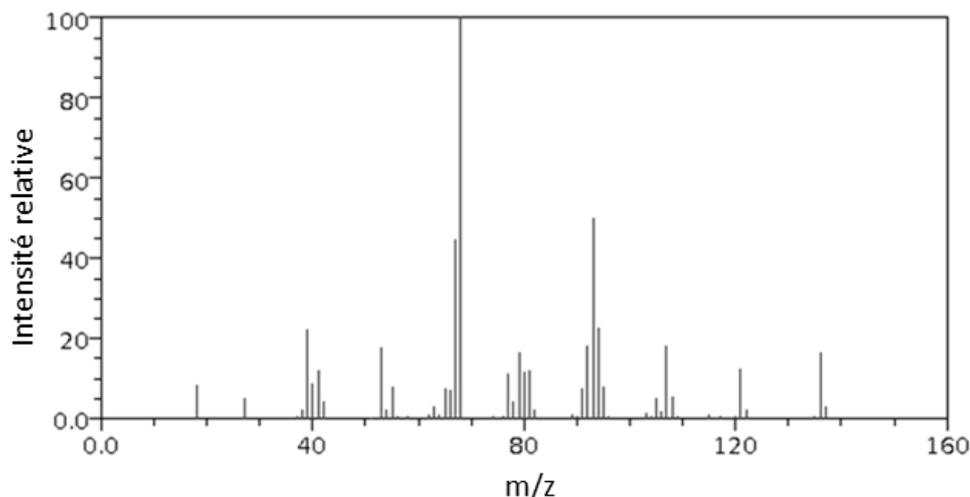
### 3. IDENTIFICATION DES COMPOSÉS VOLATILS

Lorsque des difficultés surviennent à séparer des mélanges complexes, il est souvent nécessaire d'avoir recours à une augmentation du pouvoir de résolution de techniques chromatographiques unidimensionnelles classiquement utilisées. L'approche multidimensionnelle de séparation de composés volatils implique l'utilisation de plus d'une colonne (presque toujours deux colonnes) disposées en série, tels que les articles sélectionnés d'un chromatogramme, soient soumis à une séparation sur chacune des colonnes dans le système. La chromatographie gazeuse multidimensionnelle est utilisée pour séparer des composés qui ont été élués avec des temps de rétention similaires (Marriott 2000).

#### 3.1 Les spectres de masse

Un spectre de masse est un graphique ou un tableau à double entrée produit par un spectromètre de masse. Il présente le courant d'ions mesuré en fonction du rapport masse (dalton) sur la charge ( $m/z$ ). Le graphique peut se présenter sous la forme de deux tracés différents :

- Le premier, qualifié de vrai spectre de masse ou spectre continu est le reflet fidèle du courant ionique que reçoit le détecteur en fonction du rapport  $m/z$  et se présente sous la forme d'un ensemble de pics plus ou moins larges.
- Le deuxième, spectre «barres» est obtenu après traitement informatique du vrai spectre de masse, chaque pic étant présenté sous la forme d'un trait vertical (Figure 19). Le pic le plus intense du spectre, correspondant au type d'ion le plus abondant, est appelé le pic de base, son intensité est chiffrée à 100 %. Les intensités des autres pics s'expriment en % de celle du pic de base (Menet 2011).

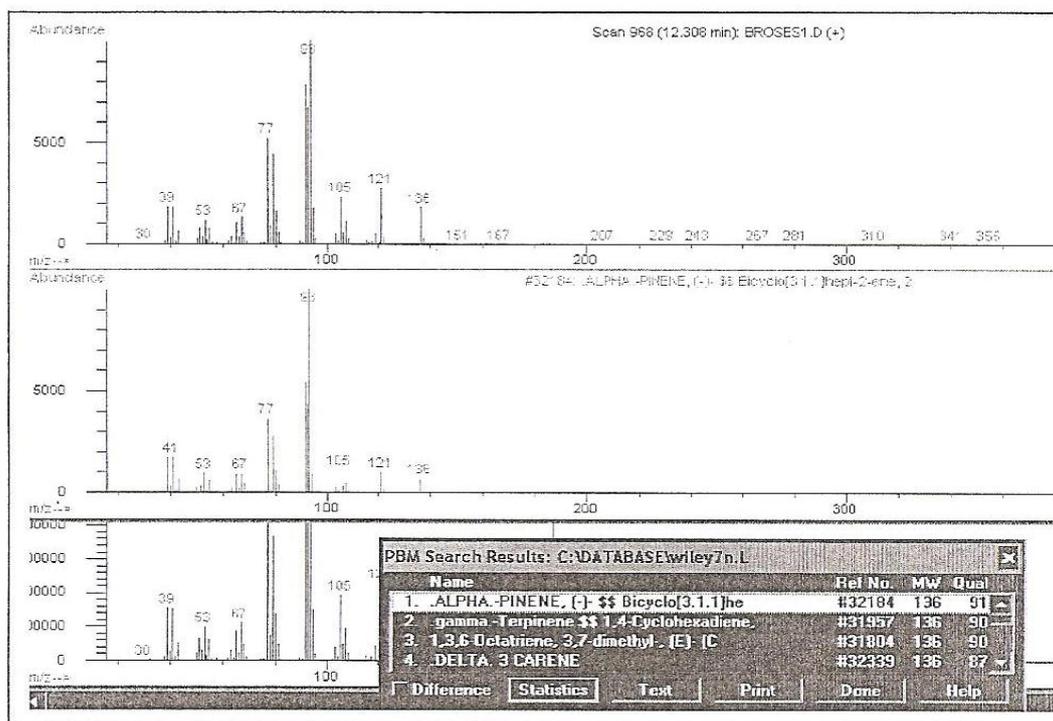


**Figure 19:** Spectre obtenu pour le limonène par impact électronique

Pour pouvoir identifier les composés volatils donnés par le spectre, on fait appel aux centaines de composés stockés dans les banques de données spectrales. Les constituants sont identifiés par comparaison des enregistrements des modèles de spectre de masse avec ceux de la banque de données qui peuvent être informatisés ou non. La recherche des spectres de masse informatisés réalisée par une banque de donnée est une recherche algorithmique connue sous le nom de PBM. Cela permet de vérifier que les pics présents dans le spectre de masse de référence se retrouvent dans celui du spectre inconnu.

La banque de donnée à l'avantage d'ignorer les pics supplémentaires du spectre inconnu permettant ainsi l'analyse de spectre résultant d'un mélange de composés. Mais ce système peut également induire en erreur car les pics supplémentaires ne correspondent pas forcément à un deuxième composé co-élué.

Pour chaque composé, la banque de donnée listera les 20 meilleurs spectres de référence présentant le plus de similitudes avec le spectre inconnu indiquant le nom de chaque composé, le poids moléculaire (MW) et le coefficient de corrélation ou qualité (Qual) (Figure 20). Le coefficient de corrélation est utilisé comme premier critère d'identification mais il ne peut être considéré comme critère unique et absolu.



**Figure 20:** Recherche effectuée pour la banque de données informatisée Wiley

*Apparait en haut de la fenêtre de spectre de masse de l' $\alpha$ -pinène présent dans l'échantillon analysé et au milieu de la fenêtre, l' $\alpha$ -pinène de référence. La seconde possibilité correspond au  $\gamma$ -terpinène, dont le degré de similitude est très proche de celui de l' $\alpha$ -pinène (91 vs 90)*

Les banques de données informatiques présentent quelques limites :

- (1) Deux spectres de masse ne sont jamais absolument identiques mais seulement similaires. À partir d'un même spectromètre de masse dans des conditions identiques, la similitude est en générale excellente. Or dans la plupart des cas, le spectre de masse de la banque de donnée et celui du composé inconnu ont été enregistrés avec des spectromètres de masse différents, ce qui entraîne de différences notables ;
- (2) La grande faiblesse de la spectrométrie de masse est que bien souvent les spectres de masse ne sont pas uniques. Un grand nombre d'isomères de même formule brute mais de structure différente peuvent montrer des spectres identiques, ce qui rend leur identification difficile voire impossible.

Pour identifier des composés ayant les mêmes spectres de masse il devient alors indispensable d'avoir recours à des données complémentaires. Ainsi, il est possible, si l'on dispose de standards, de les injecter dans les mêmes conditions que l'échantillon étudié afin de comparer les temps de rétention, ou d'associer les spectres de masse aux indices de

rétention relatifs (IRR). Cette technique est la plus souvent utilisée et permet l'identification du composé (Gross & Caprioli, 2006).

### 3.2 Les indices de rétention relatifs (IRR)

Les indices de rétention relatifs IRR, ont deux objectifs principaux :

- Caractériser tous les composés par une grandeur générale autre que le temps de rétention car celui-ci dépend des conditions opératoires (programmation de température du four, nature et débit du gaz vecteur, longueur de la colonne ...)
- Suivre l'évolution dans le temps de colonnes.

Des tables ont été constituées, avec comme entrées la nature de la phase stationnaire et la température. Néanmoins, un certain nombre de contraintes existent au niveau du choix des étalons et l'on préfère souvent se référer à une échelle universelle, par exemple à celle des indices de rétention, proposée par Kovats (1963). Ces derniers sont fondés sur la relation linéaire constatée entre le logarithme du volume de rétention spécifique et le nombre  $n$  d'atomes de carbone du soluté, dans une famille de produits homologues, par exemple celle des hydrocarbures saturés aliphatiques.

Dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour la table d'alcane, le mélange à étudier est injecté. Ainsi, le nouveau chromatogramme permet d'accéder à l'IRR qui correspond au produit par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'alcane théorique ayant le même temps de rétention réduit.

$$\text{Log } t_r' = an + b$$

$t_r'$  : temps de rétention réduit

$n$  : nombre d'atomes de carbone

Deux calculs permettent d'obtenir directement l'IRR à partir des  $t_r'$  de deux alcanes ( $C_n$  et  $C_{n+1}$ ) qui encadrent le composé inconnu  $x$ .

$$t_r'_{C_n} < t_r'(x) < t_r'_{C_{n+1}}$$

Les indices de rétention se calculent de deux manières différentes suivant le fonctionnement en température du chromatographe :

✓ L'analyse est effectuée en isotherme

$$\text{IRR}(X) = 100n + 100x \frac{\log(\text{tr}'(X)) - \log(\text{tr}'(C_n))}{\log(\text{tr}'(C_{n+1})) - \log(\text{tr}'(C_n))}$$

✓ L'analyse par programmation de température

$$\text{IRR}(X) = 100n + 100x \frac{\text{tr}'(X) - \text{tr}'(C_n)}{\text{tr}'(C_{n+1}) - \text{tr}'(C_n)}$$

x représente la différence du nombre d'atomes de Carbone entre l'hydrocarbure le plus grand et le plus petit.

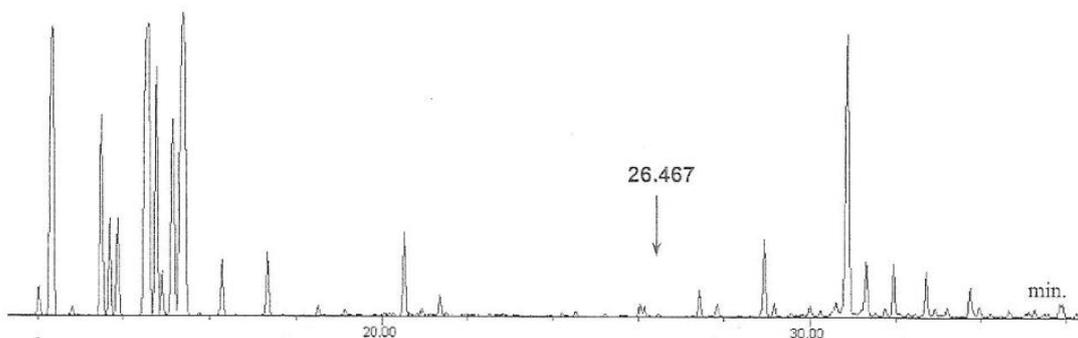
On peut employer indifféremment des logarithmes népériens ou des logarithmes décimaux.

À chaque composé on attribue ainsi un IRR qui lui est propre pour une phase stationnaire donnée. Ces indices pourront être comparés à ceux donnés dans la littérature afin de pouvoir identifier les composés.

### 3.3 Corrélation masse-indices de rétentions relatives

Lorsque que l'on combine l'IRR avec le spectre de masse, la qualité des données augmente proportionnellement et fournit un excellent guide pour les identités possibles de composants.

Prenons un exemple pour mieux comprendre cette corrélation : l'huile essentielle de *Schinus terebinthifolius* a été analysée par CG-SM, le chromatogramme obtenu est représenté en Figure 21 :



**Figure 21:** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Schinus terebinthifolius*

Pour le pic à 26,467 minutes la banque de données informatisée propose :

- L' $\alpha$ -cubébène, avec un match quality de 99% ;
- L' $\alpha$ -copaène, avec un match quality de 90%.

Par la suite l'IRR du composé à 26,467 minutes est calculé. Grâce au calcul précédemment cité, l'IRR<sub>SPB-5</sub> correspondant est de 1357. Dans la littérature, pour une phase stationnaire similaire (DB-5), les valeurs des IRR proposées sont :

- IRR<sub>DB-5</sub> ( $\alpha$ -cubébène) = 1351
- IRR<sub>DB-5</sub> ( $\alpha$ -copaène) = 1377.

Par comparaison des valeurs des IRR<sub>SPB-5</sub> et IRR<sub>DB-5</sub>, il est alors possible de conclure sur l'identification du composé sortant à 26,467 minutes. En effet, il est visible que la valeur de l'IRR la plus proche de 1357 est 1351, le composé élué à 26,467 minutes correspond donc à l' $\alpha$ -cubébène.

#### **4. DIVERSITÉ CHIMIQUE DES COMPOSÉS VOLATILS DE PLANTES** (Dudareva & Pichersky, 2006)

##### **4.1 Les différentes classes de composés**

Les plantes émettent des bouquets d'arômes allant de quelques-uns à plus d'une centaine de composés différents présents dans des quantités variables. Le nombre et la diversité de ces constituants donnent aux parfums floraux l'un des aspects de variabilité du phénotype des plantes. Les composés volatils émis par les fleurs appartiennent à plusieurs

classes différentes: les composés aliphatiques, les terpènes, les composés benzoïques et phénylpropanoïques, les composés soufrés et nitrogenés ainsi que des composés cycliques divers. Parmi ces différentes classes, les deux plus grandes sont les terpènes, synthétisés par la voie du mévalonate et les composés aliphatiques, synthétisés principalement à partir de chaînes d'acides gras.

Jusqu'à aujourd'hui un total de 556 terpènes a été répertorié, incluant les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les terpènes irréguliers. Les monoterpènes possèdent soit un squelette acyclique soit un squelette cyclique. Ces derniers peuvent être des squelettes mono-, bi-, ou tricycliques. Les sesquiterpènes sont également caractérisés par des squelettes cycliques ou acycliques mais les squelettes cycliques sont plus communs. Parmi les différents terpènes, le pourcentage de composés oxygénés est beaucoup plus important pour les monoterpènes (81%) que pour les sesquiterpènes (38%). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les sesquiterpènes oxygénés sont moins volatils que les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes hydrocarbonés. Seuls les sesquiterpènes mono-oxygénés sont susceptibles d'avoir une volatilité suffisante pour être trouvés dans l'espace de tête.

Un nombre de 528 composés aliphatiques a également été listé. Ils sont composés de chaînes allant de 1 à 27 atomes de carbone, la majorité ayant entre 2 et 17 atomes de carbones. Les composés en C6 c'est-à-dire les composés issus des feuilles vertes, comme l'acétate de 3(Z)-hex-3-ényle, se trouvent dans les parfums végétatifs ainsi que de nombreuses plantes florales et jouent probablement un rôle dans la défense de la plante.

## **4.2 La variation de la composition des parfums**

La composition quantitative et qualitative des parfums des plantes varie dans et entre chaque espèce. Ces variations de composition peuvent expliquer l'attraction et la sélection d'une plante par un insecte pour la pollinisation ou encore pour assurer la descendance de l'insecte.

La production et la composition des parfums floraux sont génétiquement déterminées, mais les facteurs environnementaux peuvent également exercer une grande influence sur les senteurs émises. Par exemple, le stress hydrique et une forte ou faible température peuvent diminuer la production de composés volatils ou l'inhiber complètement. En effet, les

composés volatils émis par la plante peuvent varier dans le temps car les émissions volatiles suivent un cycle circadien ou des stimuli externes comme la lumière ou la température. D'autre part, l'émission des composés volatils varie également d'un organe de la plante à l'autre.

## **5. CAS PARTICULIER DES CUCURBITACEAE**

L'analyse des composés volatils a déjà été réalisée sur plus d'une quinzaine d'espèces Cucurbitaceae (Tableau IV).

Ces analyses chimiques menées principalement sur la pulpe de fruits, montrent une grande diversité des composés volatils. Parmi eux, les aldéhydes, les alcools, les sesquiterpènes et les monoterpènes. L'une des classes les plus représentée est la classe des aldéhydes et notamment les aldéhydes en C9 tels que le (2E)-non-2-éanal, (6Z)-non-6-éanal, (2E, Z)-nona-2,6-diéanal...

**Tableau IV:** Les composés volatils des Cucurbitaceae : travaux antérieurs

Espèces	Organes étudiés	Techniques utilisées		Composés majoritaires	Références
		Extraction	Analyse		
<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsun & Nakai	Pulpe	SPME	CG-SM	2( <i>E</i> )-non-2-éнал 6( <i>Z</i> )-non-6-éнал 2,6( <i>E, Z</i> )-nona-2,6-diéнал 6-méthyl-5-heptén-2-one 3( <i>Z</i> )-non-3-én-1-ol 2-pentylfurane	Beaulieu et al. (2006)
<i>Citrullus vulgaris</i>	Pulpe	Distillation vapeur sous vide	CG	nona-2,6-diéнал non-2-éнал nona-3,6-diéнал-1-ol non-3-én-1-ol	Kemp (1975)
<i>Cucumis spp.</i> (concombre)	Pulpe	HS-SDME SPME	CG-SM	2,6( <i>E, Z</i> )-nona-2,6-diéнал 2( <i>E</i> )-non-2-éнал	Ligor & Buszewski (2008)
<i>Cucumis melo</i>	Pulpe	Distillation vapeur sous vide	CG-SM	acétate de 2-méthylbutyle 3( <i>E</i> )-non-3-én-1-ol 6( <i>E</i> )-non-6-én-1-ol	Kemp et al. (1973)
	Pulpe	SPME	CG-SM	nonanol non-6-éanol non-3-én-1-ol acétate d'hexyle acétate de benzyle nonanal	Shalit et al. (2001)
	Pulpe	SPME	CG-SM	$\gamma$ -cadinène $\delta$ -cadinène $\alpha$ -copaène ( <i>E</i> )-caryophyllène $\alpha$ -muurolène	Lewisohn et al. (2008)
	Pulpe	SPME	CG-SM	hexanal camphre méthanethiolate	Obando-Ulloa et al. (2010)
	Pulpe	SPME	CG-SM	acide 4-hydroxy-1,2-benzènedicarboxylique pentadécanoate de méthyle ester butyrique 2-méthylpropyle d'acide 1,2-benzènedicarboxylique 4-hydroxy-2-butanone	Tang et al. (2010)
<i>Cucumis melo L.</i> <i>var reticulatus</i> Naudin	Pulpe	SPME	CG-SM	acétate de benzyle acétate d'hexyle acétate de 2-méthylbutyle	Shalit et al. (2000)

Tableau IV (suite)

Espèces	Organes étudiés	Techniques utilisées		Composés majoritaires	Références
		Extraction	Analyse		
<i>Cucumis melo</i> L. var dudaim	Peau et Pulpe	MELL	CG-DIF CG-SM	butanoate d'éthyle 2-méthylbutanoate d'éthyle acétate de 3-(méthylthio) propyle acétate de 2-(méthylthio) éthyle 2-méthylpropanol heptanal hexanal 3(Z)-hex-3-éнал	Aubert & Pitrat (2006)
<i>Cucumis melo</i> L. var inodorus	Pulpe (jus)	SPME	CG-SM	acétate d'éthyle hexanal 2-éthylhexan-1-ol méthyldisulfanylméthane méthanethiolate camphre acétone 2-éthylfurane	Obando-Ulloa et al. (2008)
<i>Cucumis melo</i> L. var reticulates cv Sol Real	Pulpe	SPME	CG-SM	hexanal 2(E)-hex-2-éнал 2,4(E, Z)-hepta-2,4-diéнал nonanal 2(E)-non-2-éнал 2,4(E, Z)-nona-2,4-diéнал 2,6(E, Z)-nona-2,6-diéнал 2(E)-oct-2-éнал 2-méthylbutanoate d'éthyle 2-méthylpropanoate d'éthyle 2-méthyl butanoate de méthyle	Beaulieu & Grimm (2001)
<i>Cucumis melo</i> L. var reticulatus	Pulpe (jus)	SPME	CG-SM	acétate de 3-méthylbutyle acétate de 2-méthylbutyle propanoate d'éthyle butanoate d'éthyle 2-méthyl butanoate de méthyle 2-méthyl butanoate d'éthyle eucalyptol alcool benzylique acétate de benzyle	Beaulieu (2006)
<i>Cucumis melo</i> var cantalupensis	Pulpe	Extraction au dichloro- méthane	CG-DIF CG-SM	acétate de 2-méthylpropyle butanoate d'éthyle acétate de butyle acétate de 2-méthylbutyle acétate de benzyle acétate de 2-(méthylthio)éthyle acétate de 3-(méthylthio)propyle acétate d'éthyl-2-(méthylthio) alcool benzylique 3-hydroxy-2-butanone	Aubert & Bourger (2004)

Tableau IV (suite)

Espèces	Organes étudiés	Techniques utilisées		Composés majoritaires	Références
		Extraction	Analyse		
<i>Cucumis sativus</i>	Pulpe	SPME	CG-DIF	2( <i>E</i> )-non-2-éнал 2,6( <i>E, Z</i> )-nona-2,6-dièнал	Palma-Harris et al. (2001)
	Pulpe	SPME	CG-DIF	2,6( <i>E, Z</i> )-nona-2,6-dièнал	Buescher & Buescher (2001)
	Fruit vert	Distillation	CG-SM	2( <i>Z</i> )-non-2-éнал 2,6( <i>Z, E</i> )-nona-2,6-dièнал	Kemp et al. (1974)
<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne ex Lam.	Fleurs	Distillation	CG-DIF CG-SM	benzaldéhyde indole 1,4-diméthoxybenzène cadinène 3( <i>Z</i> )-hex-3-én-1-ol 2( <i>E</i> )-hex-2-én-1-ol	Andersen (1987)
<i>Cucurbita pepo</i>	Fleurs	HS-SPME	CG-BP/ SM-SM	1,4-diméthoxybenzène	Granero et al. (2004)
	Pulpe		CG-SM	hexanal 2-hexanal <i>cis</i> -3-hexén-1-ol	Parliment et al. (1981)
<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. <i>Momordica charantia</i>	Fleurs	SPME	CG-SM	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimène linalol 2-aminobenzaldéhyde anthranilate de méthyle	Fernando & Grün (2001)
<i>Momordica charantia</i> L.	Pulpe	Distillation	CG-SM	myrténol <i>cis</i> -hex-3-énol alcool benzylique pent-1-én-3-ol <i>cis</i> -pent-2-én-1-ol <i>trans</i> -hex-2-éнал	Binder et al. (1988)

## DEUXIÈME PARTIE

Étude des composés volatils de quelques  
Cucurbitaceae de la Réunion

## 1. PRINCIPE DE LA METHODE

Les composés volatils des Cucurbitaceae ont été dans un premier temps extraits par SPME au moyen d'une fibre triphasique (DVB/Carboxen/PDMS) démontrée plus efficace que les fibres mono- ou biphasiques pour l'extraction d'un mélange complexe de composés volatils (Ferreira et al. 2009 ; Paolini et al. 2008). Puis dans un second temps ils ont été analysés par CG-SM. Les expériences ont été réalisées au minimum trois fois avec des conditions opératoires identiques pour chaque Cucurbitaceae afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

Il a été envisagé l'étude des composés volatils de fruits de 8 Cucurbitaceae disponibles dans le commerce ou cultivées au CIRAD pour deux stades de maturité du fruit jeune et mûr (Tableau V).

**Tableau V:** Espèces de Cucurbitaceae étudiées

Espèces	Variétés	Noms vernaculaires	Maturité du fruit	
			Jeune	Mûr
<i>Cucumis melo</i>	Anasta	Melon	+	+
<i>Cucumis sativus</i>	Showy green	Concombre	+	+
	Tropical	Concombre	-	+
<i>Cucurbita moschata</i>	Cirad	Citrouille pays	+	+
<i>Cucurbita pepo</i>	Cirad	Courgette	-	+
<i>Luffa acutangula</i>	Cirad	Pipangaille à côte	-	+
<i>Luffa cylindrica</i>	Cirad	Pipangaille lisse	+	+
<i>Momordica charantia</i>	Naja	Margoze cultivée	-	+
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	Cirad	Patole	-	+

+ expérience aboutie

- expérience non aboutie

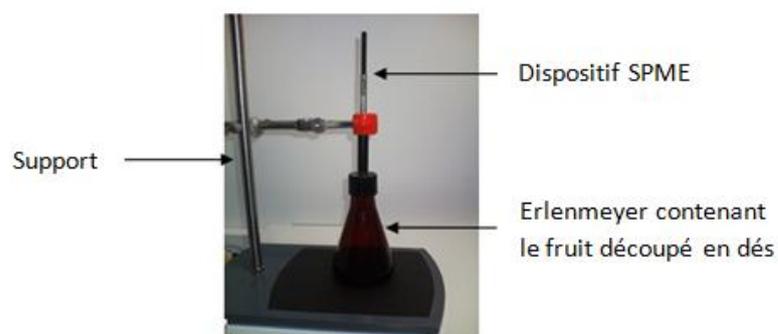
Les expériences non menées à terme pour certaines des espèces Cucurbitaceae sont dues soit à la non reproductibilité des résultats soit à l'indisponibilité du fruit. En effet, cette étude est tributaire de la production saisonnière des fruits.

## 2. MISE AU POINT DES CONDITIONS D'EXTRACTION

Deux modalités d'extraction ont été réalisées :

### ➤ Fruits découpés

Les fruits découpés en dés sont transférés dans un erlenmeyer hermétiquement fermé. La fibre est par la suite exposée à l'espace de tête saturé en composés volatils au-dessus de la matière végétale (Figure 22).



**Figure 22:** Dispositif expérimental mis en place pour les fruits découpés

### ➤ Fruits entiers in situ

Les fruits sont placés dans une cloche en verre dont l'extrémité inférieure est obstruée par du coton pour saturer l'espace de tête en composés volatils. La fibre est introduite dans l'espace de tête et y est exposée pendant une durée de 4 heures (Figure 23).



**Figure 23:** Dispositif expérimental mis en place pour les fruits in situ

Pour les fruits découpés, un travail préliminaire d'optimisation des paramètres d'extraction a été nécessaire notamment concernant la durée et la température d'extraction.

## **2.1 Optimisation de la durée d'extraction pour le fruit découpé**

### **2.1.1 Principe**

Ce paramètre a été étudié pour les fruits mûrs de 3 Cucurbitaceae :

- *Cucurbita pepo* (courgette) ;
- *Cucurbita moschata* (citrouille pays) ;
- *Cucumis sativus* (concombre variété «Tropical»).

Deux durées d'extraction ont été testées : 3 heures et 4 heures. Pour chacune de ces deux durées d'extraction, deux températures ont été expérimentées : température ambiante et 37°C. L'objectif de ces tests était de voir si en augmentant le temps d'extraction, il est possible d'augmenter la sensibilité de la méthode. Des durées plus élevées n'ont pas été testées, car des observations préliminaires ont montré qu'au-delà de 4h, le fruit commence à fermenter.

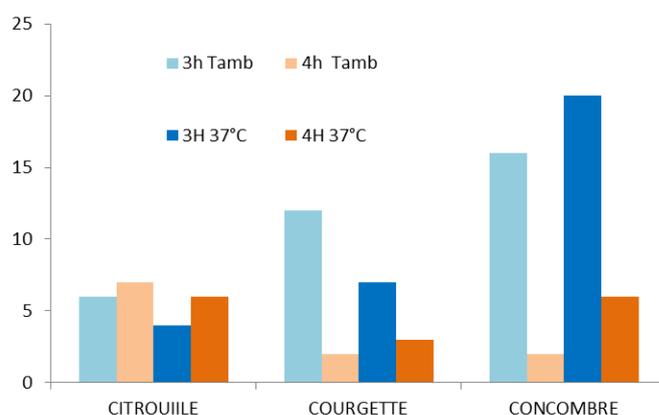
### **2.1.2 Résultats**

Les résultats des analyses de composés volatils réalisées sur la citrouille, la courgette et le concombre pour une durée d'extraction de 3h à 4h figurent dans les tableaux 2.1, 2.2, et 2.3 de l'annexe 2. Les composés y ont été rassemblés par familles et listés par ordre croissant d'indices de rétention relatifs.

Le tableau VI et la figure 24 représentent en outre le nombre de composés détectés pour chaque expérience.

**Tableau VI:** Nombre de composés volatils détectés après 3h et 4h de pause à température ambiante et à 37°C pour *Cucurbita moschata* (citrouille commerciale), *Cucurbita pepo* (courgette) et *Cucumis sativus* (concombre variété «Tropical»)

	Nombre de composés détectés			
	Pause : 3h		Pause : 4h	
	Température ambiante	37°C	Température ambiante	37°C
<i>Cucurbita moschata</i> (citrouille commerciale)	6	4	7	6
<i>Cucurbita pepo</i> (courgette)	12	7	2	3
<i>Cucumis sativus</i> (concombre variété «Tropical»)	16	20	2	6



**Figure 24:** Nombre de composés volatils détectés après 3h et 4h de pause à température ambiante et à 37°C pour *Cucurbita moschata* (citrouille commerciale), *Cucurbita pepo* (courgette) et *Cucumis sativus* (concombre variété «Tropical»)

### 2.1.3 Discussion

Pour la citrouille, le nombre de composés volatils ne varie pas de façon significative en fonction du temps d'extraction (tableau VI, figure 24). Par contre, le nombre de composés volatils est plus important pour une extraction d'une durée de 3h que d'une durée de 4h pour la courgette et le concombre.

À l'issue de ces résultats, il semble que pour une durée d'extraction trop importante, il y ait un phénomène de désorption de la fibre, phénomène auquel il faudra trouver des explications à l'avenir. En conséquence, le temps d'extraction choisi sur des fruits découpés est de 3h.

## **2.2 Optimisation de la température d'extraction pour le fruit découpé**

### **2.2.1 Principe**

Ce paramètre a été étudié pour les fruits jeunes et mûrs de 4 Cucurbitaceae :

- *Cucumis melo* (melon, variété «Anasta») ;
- *Cucumis sativus* (concombre, variété «Showy green») ;
- *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse) ;
- *Cucurbita moschata* (citrouille pays).

Deux températures ont été testées : température ambiante et 37°C pour une durée d'extraction de 3 heures. L'objectif étant de voir si en augmentant légèrement la température cela permet un transfert plus important des composés volatils de la matrice (fruits découpés) vers l'espace de tête.

Des températures plus élevées n'ont pas été testées, il s'agit d'un choix délibéré, afin de ne pas trop s'éloigner des conditions naturelles et ne pas provoquer un début de cuisson du fruit modifiant la nature des composés volatils émis.

### **2.2.2 Résultats**

Les résultats des analyses de composés volatils pour chaque fruit et chaque stade de maturité figurent en annexe 2 :

- Tableaux 2.4 et 2.5 pour fruit de *Cucumis melo* jeune et mûr respectivement ;
- Tableaux 2.6 et 2.7 pour fruit de *Cucumis sativus* jeune et mûr respectivement ;
- Tableaux 2.8 et 2.9 pour fruit de *Luffa cylindrica* jeune et mûr respectivement ;
- Tableaux 2.10 et 2.11 pour fruit de *Cucurbita moschata* jeune et mûr respectivement.

Les composés y ont été rassemblés par famille et listés par ordre d'indices de rétention relatifs. Pour chaque analyse, les proportions relatives de chaque famille de composés chimiques sont reprises sous forme d'un graphique de type « secteur » (circulaire) (Figures 2.1 à 2.8, annexe 2).

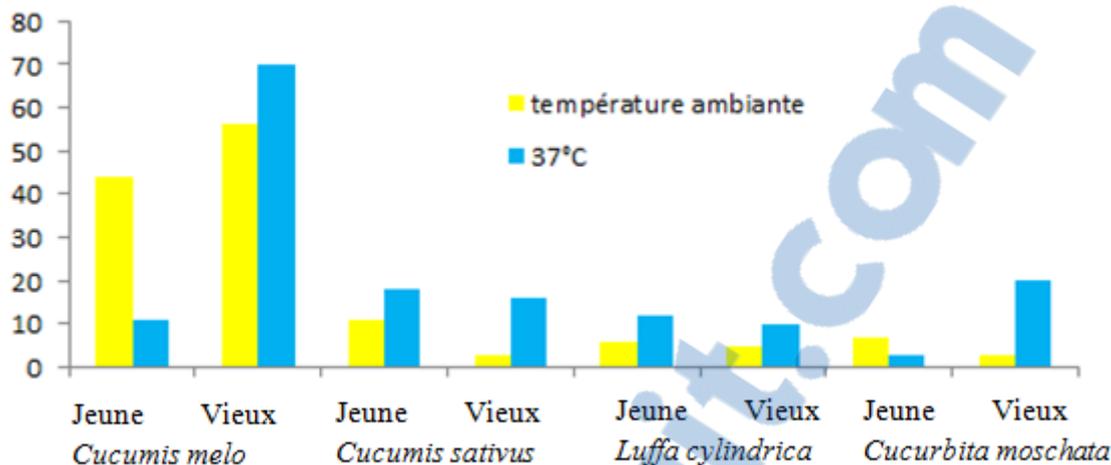
Le tableau 2.12 en annexe 2, regroupe tous les composés volatils identifiés pour les 4 espèces de Cucurbitaceae étudiées aux deux stades phénologiques du fruit, pour les modalités :

- fruit découpé à température ambiante ;
- fruit découpé à 37°C ;
- fruit entier in situ.

Les composés volatils sont notés « + » lorsqu'ils sont présents dans le fruit. Ce tableau récapitulatif a permis de dresser le tableau VII et de réaliser la figure 24. Ils reprennent le nombre de composés détecté pour chaque Cucurbitaceae étudiée aux stades jeune et mûr, à température ambiante et 37°C.

**Tableau VII:** Nombre de composés volatils détectés pour les fruits jeunes ou mûrs des 4 Cucurbitaceae étudiées, après 3 heures de pause à température ambiante ou à 37°C

		Nombre de composés	
		Température ambiante	37°C
<i>Cucumis melo</i> (melon, variété «Anasta»)	Jeune	4	11
	Mûr	56	70
<i>Cucumis sativus</i> (concombre, variété «Showy green»)	Jeune	11	18
	Mûr	3	16
<i>Luffa cylindrica</i> (pipangaille lisse)	Jeune	6	12
	Mûr	5	10
<i>Cucurbita moschata</i> (citrouille pays)	Jeune	7	3
	Mûr	3	20



**Figure 25:** Nombre de composés volatils détectés pour les fruits jeunes ou mûrs des 4 Cucurbitaceae étudiées, après 3 heures de pause à température ambiante ou à 37°C

### 2.2.3 Discussion

À l'exception de la citrouille pays jeune et du melon variété « Anasta » jeune, l'élévation de la température entraîne une augmentation du nombre de composés détectés lors de l'analyse CG-SM. Par ailleurs, pour un même composé, son signal peut être plus important pour une extraction à 37°C qu'à la température ambiante, ce qui permet une meilleure définition du spectre de masse. Il semble a priori qu'une température de 37°C permette d'améliorer les conditions d'extraction. Cependant les résultats obtenus sont à prendre avec précaution car le chauffage peut également engendrer la formation d'artéfacts.

## 3. PREMIERS ÉLÉMENTS RELATIFS À L'ATTRACTIVITÉ DES PLANTES-HÔTES

### 3.1 Principe

Notre étude contribue à l'avancée des travaux d'une thèse dont l'objectif est d'étudier les relations insecte-plante et les stimuli olfactifs conduisant les femelles de *Bactrocera cucurbitae* et de *Dacus ciliatus* vers leurs fruits-hôtes. Les travaux envisagés pour atteindre cet objectif se répartissent en 3 étapes :

- (1) Étudier les réponses des *Dacini* aux effluves de plantes
- (2) Analyser les composés volatils de Cucurbitaceae
- (3) Étudier les réponses des femelles aux composés volatils isolés ou en mélange.

Pour pouvoir comprendre l'attractivité des composés volatils des plantes-hôtes étudiés, la corrélation des données de l'étape 1 et de l'étape 2 est nécessaire.

L'étape 1 est en cours de réalisation en parallèle de mon stage, par l'équipe du Cirad au Pôle de Protection des Plantes à Saint-Pierre. Les premiers travaux portent sur la réponse dans des cages de comportement de *B. cucurbitae* en présence des fruits de 10 espèces de Cucurbitaceae :

- *Cucurbita pepo* (courgette)
- *Cucurbita moschata* (citrouille pays)
- *Trichosantes cucumerina* (patole)
- *Luffa acutangula* (pipangaille à côtes)
- *Cucumis melo* (melon, variété «Anasta»)
- *Momordica charantia* (margoze sauvage)
- *Momordica charantia* (margoze variété « Naja »)
- *Citrillus lanatus* (pastèque)
- *Cucumis sativus* (concombre variété «Showy green »)
- *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse)

Les expériences sont conduites dans des cages de comportement. Il s'agit de petites cages d'élevage (30\*30\*30 cm) en polyester blanc (largeur de maille : 680µm, MegaView Science Co. Ltd, Taiwan) contenant 30 ou 40 femelles. À l'intérieur de ces cages sont placées des boîtes en polypropylène (Sodico, Réunion) de 11 cm de diamètre et 8 cm de hauteur, qui ont été transformées en dispositifs de « piègeage » avec 5 ouvertures ou sont placés des tubes Eppendorff (diamètre d'ouverture : 1cm) coupés à la taille de 2 cm pour éviter la sortie des mouches qui ont pénétré dans le « piège ». La boîte est fermée par un couvercle. Dans chaque petite cage deux boîtes sont disposées, l'une contenant 30 g de fruit mûr coupé et l'autre étant vide (témoin). Le nombre de femelles piégées dans les boîtes est comptabilisé au bout d'un certain temps d'exposition aux effluves des plantes hôtes.

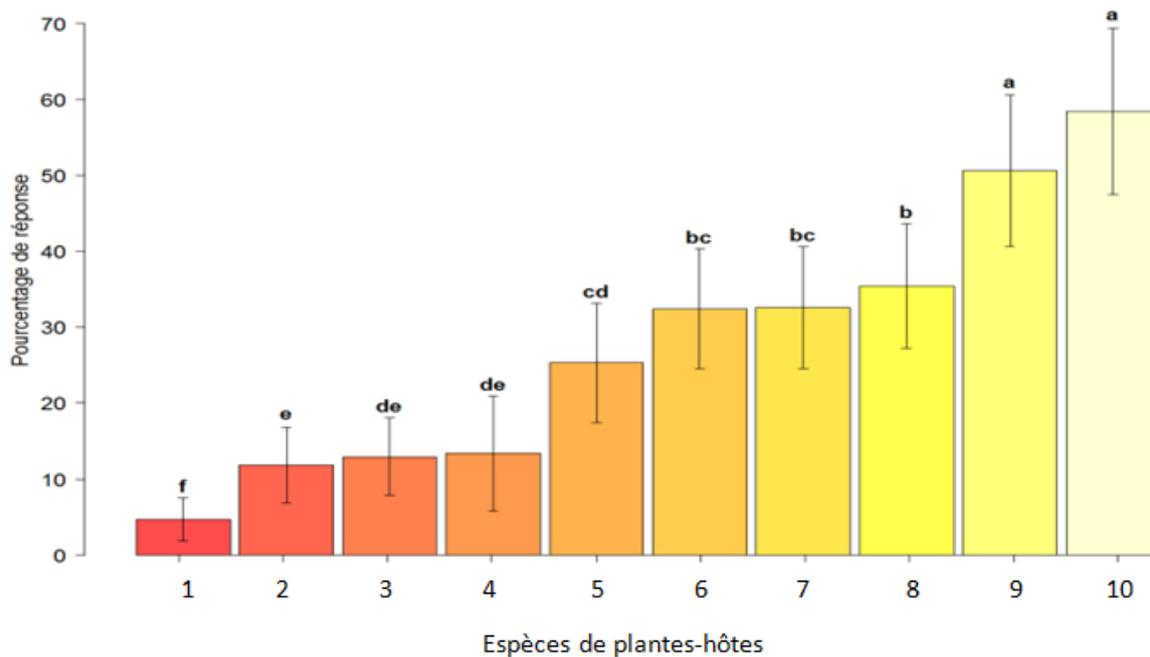
L'étape 2 a été consacrée à l'étude des composés volatils par SPME/CG-SM sur 8 des 10 fruits mûrs et découpés de Cucurbitaceae étudiés dans l'étape 1 :

- *Cucurbita pepo* (courgette)
- *Cucurbita moschata* (citrouille pays)
- *Trichosantes cucumerina* (patole)
- *Luffa acutangula* (pipangaille à côtes)
- *Cucumis melo* (melon, variété «Anasta»)
- *Momordica charantia* (margoze, variété «Naja»)
- *Cucumis sativus* (concombre, variété «Showy green»)
- *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse)

## 3.2 Résultats

### 3.2.1 Étude comportementale

Cette étude a été menée par Késia BOULY, stagiaire en Master 2<sup>ème</sup> année Biodiversité des Écosystèmes Tropicaux, sous la direction de Serge QUILICI et de Toulassi ATIAMA-NURBEL. Son étude a porté sur l'attraction de *Bactrocera cucurbitae* par les effluves de Cucurbitaceae : contribution méthodologique et mesure de l'attractivité. Les différentes expériences menées ont abouti aux résultats suivants :



- |   |   |
|---|---|
| 1 : <i>Cucurbita pepo</i> (courgette)             | 6 : <i>Momordica charantia</i> (margoze sauvage)              |
| 2 : <i>Cucurbita moschata</i> (citrouille)        | 7 : <i>Momordica charantia</i> (margoze, variété «Naja»)      |
| 3 : <i>Trichosanthes cucumerina</i> (patole)      | 8 : <i>Citrillus lanatus</i> (pastèque)                       |
| 4 : <i>Luffa acutangula</i> (pipangaille à côtes) | 9 : <i>Cucumis sativus</i> (concombre, variété «Showy green») |
| 5 : <i>Cucumis melo</i> (melon, variété «Anasta») | 10 : <i>Luffa cylindrica</i> (pipangaille lisse)              |

**Figure 26:** Réponse des femelles de *Bactrocera cucurbitae* aux effluves des fruits mûrs découpés de 10 espèces de Cucurbitaceae

### 3.2.2 Étude des composés volatils

Les analyses des espaces de têtes par SPME/CG-SM ont permis :

- Pour *Momordica charantia* (margoze « Naja »), de détecter et d'identifier 10 composés (Tableau 3.1, Figure 3.2) ;
- Pour *Trichosanthes cucumerina* (patole), de détecter et d'identifier 2 composés (Tableau 3.2, Figure 3.2) ;

- Pour *Luffa acutangula* (pipangaille à côtes), de détecter et d'identifier 14 composés (Tableau 3.3, Figure 3.2) ;
- Pour *Cucurbita pepo* (courgette), de détecter 13 composés parmi lesquels 8 composés ont été identifiés soit 91,6% de l'espace de tête (Tableau 3.4, Figure 3.3) ;
- Pour *Cucurbita moschata* (citrouille pays), de détecter et d'identifier 6 composés (Tableau 3.5, Figure 3.2) ;
- Pour *Cucumis melo* (melon «Anasta»), de détecter 57 composés parmi lesquels 54 ont été identifiés soit 98,6% de l'espace de tête (Tableau 3.6, Figure 3.2) ;
- Pour *Cucumis sativus* (concombre, variété «Showy green»), de détecter et d'identifier 3 composés (Tableau 3.7, Figure 3.1) ;
- Pour *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse), de détecter 5 composés parmi lesquels 4 ont été identifiés soit 92,3% de l'espace de tête (Tableau 3.8, Figure 3.1).

### 3.3 Discussion

#### 3.3.1 Étude comportementale

Le diagramme obtenu pour les réponses des mouches aux effluves de Cucurbitaceae montrent que :

- *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse) et *Cucumis sativus* (concombre, variété «Showy green»), sont les fruits les plus attractifs avec 58,5% et 50,6% de réponse respectivement ;
- *Citrullus lanatus* (pastèque), *Momordica charantia* (margoze sauvage et margoze «Naja»), *Cucumis melo* (melon «Anasta») sont des fruits moyennement attractifs avec 35,4%, 32,4%, 32,6% et 25,3% de réponses respectivement ;
- *Luffa acutangula* (pipangaille à côtes), *Trichosanthes cucumerina* (patole), *Cucurbita moschata* (citrouille pays) sont des fruits peu attractifs avec 13,3%, 12,9% et 11,8% de réponses respectivement ;
- *Cucurbita pepo* (courgette) semble être la plante-hôte la moins attractive avec seulement 4,7% de réponse.

### 3.3.2 Étude des composés volatils

- *Momordica charantia* (margoze « Naja ») :

L'espace de tête de la margoze est composé d'une forte proportion de monoterpènes hydrocarbonés (62,6%) dont l' $\alpha$ -pinène présent à hauteur de 45,6%.

- *Trichosanthes cucumerina* (patole) :

Dans l'espace de tête du patole, seuls 2 composés ont été détectés :

- Un alcool, le 4-méthylpentanol (26,4%)
- Un sesquiterpène hydrocarboné, le caryophyllène (73,6%).

- *Luffa acutangula* (pipangaille à côtes) :

L'espace de tête de la pipangaille à côtes contient une forte proportion d'esters (63,8%). Parmi ceux-ci, l'acétate de méthyle et l'acétate d'éthyle détectés à hauteur de 42,2% et 20,2% respectivement.

- *Cucurbita pepo* (courgette) :

Les composés identifiés appartiennent majoritairement à 2 familles de composés :

- Les monoterpènes hydrocarbonés (58,6%) dont le composé majoritaire est le (Z)- $\beta$ -ocimène (54,2%)
- Les hydrocarbures (29,6%) incluant le pentane (18,7%) et le 2-méthylpentane (7,9%).

- *Cucurbita moschata* (citrouille pays) :

Deux familles prépondérantes se retrouvent dans l'espace de tête du fruit mûr découpé :

- La famille des alcools (33,8%) constituée principalement d'éthanol (17,8%) et de butan-2,3-diol (8,6%)
- La famille des cétones exclusivement représentée par le 3-hydroxy-butan-2-one à hauteur de 63,7%.

- *Cucumis melo* (melon, variété «Anasta») :

L'espace de tête de ce fruit est caractérisé par les nombreux esters qu'il contient (96,5%). Il est constitué majoritairement de l'acétate d'hexyle (15,4%), de l'acétate d'hex-3-ényle (14,2%), de l'acétate de 2-méthylbutyle (12,4%), de l'acétate d'éthyle (7,8%), de l'hexanoate d'éthyle (6,6%), du butanoate d'éthyle (5,6%) et de l'acétate de benzyle (5,0%).

- *Cucumis sativus* (concombre, variété «Showy green») :

Dans l'espace de tête du fruit mûr, seuls trois composés ont été détectés : le tétradécène (25,9%), l'éthanol (46,2%) et l' $\alpha$ -humulène (27,9%).

- *Luffa cylindrica* (pipangaille lisse) :

L'espace de tête du fruit mûr découpé comprend majoritairement des hydrocarbures (78,5%) dont le 2-méthylpentane (26,7%) et le 3-méthylpentane (47,5%).

### 3.3.3 Corrélation des données

L'étude comportementale de la réponse des femelles de *B. cucurbitae* vis-à-vis des fruits mûrs de 8 espèces de Cucurbitaceae a permis de classer ces dernières en 4 groupes : fruits très attractifs, moyennement attractifs, peu attractifs et très peu attractifs.

L'analyse des composés volatils des espaces de tête de ces mêmes Cucurbitaceae quant à elle, a montré une très grande diversité de profils olfactifs empêchant tout regroupement similaire à celui établi pour l'étude comportementale (Tableau VIII). À titre d'exemple, *Cucumis melo* et *Momordica charantia*, qui montrent une attractivité à peu près similaire pour *B. cucurbitae* présentent des profils olfactifs complètement différents : l'espace de tête du premier renferme 56 composés appartenant majoritairement à la classe des esters (96,5%) alors que celui du second comprend 10 composés, principalement des monoterpènes hydrocarbonés (62,6%).

Cette étude montre donc que si le comportement de la mouche est effectivement guidé par des stimuli olfactifs, il n'existe pas **un** mais **des** profils olfactifs attractifs autrement dit il n'existe pas **un** mais **des** composés pouvant exercer différemment une attractivité vis-à-vis de la mouche. Afin de confirmer cette hypothèse il faudrait à présent passer à l'étape 3 des travaux de recherche en étudiant par olfactométrie la réponse des femelles de mouches aux

composés volatils isolés ou en mélange présents dans les espaces de tête des fruits les plus attractifs.

Ces tests ont été réalisés uniquement sur des fruits matures. Il serait judicieux de réaliser ces mêmes tests sur les fruits jeunes. En effet, selon les études bibliographiques, la ponte des œufs par les femelles de la mouche a lieu principalement dans les fruits jeunes. Il existerait donc également dans le fruit jeune des composés volatils attractifs.

Cette étude serait d'autant plus intéressante que nous avons montré qu'il pouvait exister une grande différence de composition chimique entre l'espace de tête du fruit jeune et celui du fruit mûr (Figures 2.1 à 2.8, Annexe 2).

Par ailleurs, afin de se rapprocher le plus possible des conditions « naturelles », il serait intéressant de réaliser en parallèle de notre analyse chimique des effluves de fruit in situ, des études sur la réponse des femelles de *B. cucurbitae* en présence de fruits non dénaturés de différents stades.

**Tableau VIII:** Corrélation des données

Espèces	Étude comportementale	Analyse de l'espace des têtes	
		Famille	Composés majoritaires
<i>Luffa cylindrica</i> (pipangaille lisse)	Très attractif	Hydrocarbures	2-méthylpentane (26,7%) 3-méthylpentane (47,5%)
<i>Cucumis sativus</i> (concombre, variété «Showy green»)	Très attractif	Hydrocarbures Alcools Sesquiterpènes hydrocarbonés	tétradécène (25,9%) éthanol (46,2%) $\alpha$ -humulène (27,9%)
<i>Momordica charantia</i> (margoze, variété «Naja»)	Moyennement attractif	Monoterpènes hydrocarbonés	$\alpha$ -pinène (45,6%)
<i>Cucumis melo</i> (melon, variété «Anasta»)	Moyennement attractif	Esters	acétate d'hexyle (15,4%) acétate d'hex-3-ényle (14,2%) acétate de 2-méthylbutyle (12,4%) acétate d'éthyle (7,8%) hexanoate d'éthyle (6,6%) benzoate d'éthyle (5,6%) acétate de benzyle (5,0%)
<i>Luffa acutangula</i> (pipangaille à côtes)	Peu attractif	Esters	acétate de méthyle (42,2%) acétate d'éthyle (20,2%)
<i>Trichosanthes cucumerina</i> (patole)	Peu attractif	Alcool	4-méthylpentanol (26,4%)
		Sesquiterpènes hydrocarbonés	caryophyllène (73,6%)
<i>Cucurbita moschata</i> (citrouille pays)	Peu attractif	Alcools	éthanol (17,8%) butan-2,3-diol (8,6%)
		Cétones	3-hydroxy-butan-2-one (63,7%)
<i>Cucurbita pepo</i> (courgette)	Très peu attractif	Monoterpènes hydrocarbonés	(Z)- $\beta$ -ocimène (54,2%)
		Hydrocarbures	pentane (18,7%) 2-méthylpentane (7,9%)

## CONCLUSION

L'objectif de ce stage était d'étudier l'abondance relative des composés émis par les fruits d'une large gamme de Cucurbitaceae,

- en comparant plusieurs méthodes de collecte (sur fruits découpés à température ambiante et à 37°C et sur fruits entiers in situ) ;
- en comparant plusieurs stades phénologiques du fruit (jeune et vieux).

Cette recherche d'optimisation des conditions d'extractions nous a conduits aux conclusions suivantes :

- Sur les fruits découpés, la durée d'extraction optimale est de 3h ;
- Sur les fruits découpés, une température de 37°C permet d'augmenter le nombre de composés détectés par rapport à une extraction menée à température ambiante. Mais les résultats obtenus pour les analyses réalisées à cette température sont à prendre avec précaution car le chauffage peut également être à l'origine d'une production d'artéfacts ;
- Par ailleurs, on note une variation de la composition entre les analyses menées à température ambiante in situ et sur fruits découpés. Le processus de découpage du fruit déclencherait des réactions enzymatiques à l'origine de la production de composés volatils « artéfacts » tel que l'éthanol.
- Une nette différence entre la composition des espaces de tête des fruits jeunes et des fruits mûrs est également visible. Par exemple, pour le fruit de *Cucumis melo* (melon variété « Anasta »), sa composition en ester varie selon son stade phénologique : pour le fruit mûr 96,5% d'esters ont été détectés, alors que pour le fruit jeune, seuls 16,7% sont présents.

Suite à ce travail d'optimisation des conditions d'extractions, l'étude comportementale des mouches vis-à-vis des Cucurbitaceae a été amorcée. Ces premières expérimentations menées sur les mouches de fruits *Bactrocera cucurbitae* femelles et 8 Cucurbitaceae a montré une très grande diversité de profils olfactifs empêchant tout regroupement similaire à celui établi pour l'étude comportementale menée par olfactométrie. Cette étude laisse donc supposer que si le comportement de la mouche est effectivement guidé par des stimuli

olfactifs, alors il n'existe pas un mais des profils olfactifs attractifs autrement dit, il n'existe pas un mais des composés pouvant exercer différemment une attractivité vis-à-vis de la mouche.

Des études complémentaires devront donc être menées, et notamment des expériences du même type avec de jeunes fruits de Cucurbitaceae, terrain favorable à la ponte des œufs des femelles de la mouche *Bactrocera cucurbitae*.

Rapport-Gratuit.com

# PARTIE EXPÉRIMENTALE

## 1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur différentes espèces de Cucurbitaceae dont la maturité de chaque espèce de fruit et leur provenance sont indiqués dans le tableau IX.

**Tableau IX:** Nature et provenance des espèces de Cucurbitaceae étudiées

Espèces	Variétés	Noms vernaculaires	Maturité du fruit		Provenance
			Jeune	Mûr	
<i>Cucumis melo</i>	Anasta	Melon	+	+	France
<i>Cucumis sativus</i>	Showy green	Concombre	+	+	Taiwan
	Tropical	Concombre	-	+	France
<i>Cucurbita moschata</i>	-	Citrouille pays	+	+	France-Réunion
<i>Cucurbita pepo</i>	-	Courgette	-	+	France-Réunion
<i>Luffa acutangula</i>	-	Pipangaille à côte	-	+	France-Réunion
<i>Luffa cylindrica</i>	-	Pipangaille lisse	+	+	France-Réunion
<i>Momordica charantia</i>	Naja	Margoze cultivée	-	+	France-Réunion
<i>Trichosanthes cucumerina</i>	-	Patole	-	+	France-Réunion

## 2. Extraction des composés volatils par SPME

L'extraction des composés volatils de Cucurbitaceae étudiées a été réalisée par micro-extraction sur phase solide au moyen d'une fibre grise du type DBB-Carboxen-PDMS dont l'épaisseur de phase est de 50-80µm (Supelco).

Cette extraction a été réalisée selon deux modalités par le fruit :

- (1) Découpé en morceaux
- (2) Entier, in situ.

### 2.1 Fruits découpés en morceaux

#### ✓ Préparation de l'extraction

100g de fruits découpés en petits dés sont placés dans un erlenmeyer à vis muni d'un bouchon percé afin de laisser passer l'aiguille du dispositif SPME. L'espace de tête de l'erlenmeyer est saturé pendant 15 minutes avant que la fibre soit poussée hors de l'aiguille.

### ✓ Optimisation de la température et de la durée d'extraction

Les paramètres (température, durée) optimaux d'extraction ont été recherchés pour 3 Cucurbitaceae : la citrouille commerciale, la courgette commerciale et le concombre «Tropical». Ils ont ensuite été appliqués aux autres échantillons. Pour cela :

- deux températures d'extraction ont été testées : températures ambiante et 37°C
- deux durées d'extraction ont été testées : 3h et 4h.

Les analyses par CG-SM des composés volatils ont été réalisées par un chromatographe Agilent Technologies 5973N et équipé d'une colonne capillaire apolaire SPB-5. Les conditions d'analyse des composés volatils extraits par SPME sont données dans le tableau X.

**Tableau X:** Conditions d'analyse par CG-SM

<b>Chromatographe : Agilent Technologies 5973N</b>	
Colonne	
Phase stationnaire	SPB-5
Longueur	60 m
Diamètre interne	0,32 mm
Épaisseur de film	0,25 µm
Injecteur	
Mode	<i>splitless</i>
Température	250°C
Four	
Température du four	230°C
Pas de programmation	4°C/min
Température finale	230°C
Gaz vecteur	
Gaz	Hélium
Débit de la colonne	0,7 mL/min
<b>Spectromètre de masse</b>	
Vide	37mtorr
Source	Impact
Courant d'ionisation	70°C
Température de la source	230°C
Mode de détection	Scan
Gamme de masse	30 à 550 uma
Délai de solvant	0 minute

Parallèlement à ces analyses par CG-SM, les indices de rétention relatifs (IRR) propres à chacun des composés ont été calculés à partir d'une table d'alcane de C<sub>8</sub> à C<sub>22</sub>.

L'identification des composés a ensuite été réalisée par comparaison :

- (1) Des spectres de masse expérimentaux à ceux de la littérature (Adams, 2004), ceux de banques de données informatisées NIST 02 et Wiley7n et de standards injectés dans les mêmes conditions.
- (2) Des IRR calculés à ceux de la littérature (Adams, 2004), ceux des banques de données (NIST 02) et de standards injectés dans les mêmes conditions.

## **2.2 Fruits entiers, in situ**

Les extractions ont été réalisées au CIRAD sur les plants de Cucurbitaceae cultivés en serre.

Une cloche en verre a été placée sur le fruit. L'extrémité inférieure (la plus large), de la cloche permettant l'introduction du fruit, a été fermée à l'aide de coton, afin d'obtenir un espace de tête le plus saturé possible. La seringue SPME, support de la fibre, est introduite par l'extrémité supérieure (la plus étroite).

La fibre est ensuite poussée hors de l'aiguille après 15 minutes, le temps que l'espace de tête soit saturé. Après quatre heures de pause, la fibre est rétractée dans l'aiguille, retirée du dispositif puis désorbée dans l'injecteur du chromatographe.

# GLOSSAIRE

**Absorber** : processus par lequel des molécules de gaz ou de liquide mis en contact avec un matériau solide s'incorporent dans la totalité de son volume. Lorsque ce processus ne concerne que la surface du solide, on parle d'adsorption.

**Adsorber** : phénomène de surface par lequel des atomes ou des molécules de gaz ou de liquides (adsorbats) se fixent sur une surface solide (adsorbant) selon divers processus plus ou moins intenses.

**Cyme** : inflorescence simple, dans laquelle l'axe principal est terminé par une fleur.

**Cystolithe** : agrégation de carbonate de calcium ou d'oxalate de calcium à l'intérieur des cellules d'une feuille.

**Désorber/Désorption thermique** : la température de l'injecteur permet aux composés volatils retenus par la fibre de passer à l'état vapeur. Mais cette température doit être en-dessous de la température de dégradation du polymère c'est-à-dire 10 à 20°C en-dessous de cette température.

**Dicotylédone** : désigne l'ensemble des plantes qui appartiennent aux grands groupes se caractérisant par la présence de cotylédon, feuille primordiale constitutive de l'embryon.

**Monoïque** : terme qualifiant une plante qui porte des fleurs mâles et des fleurs femelles séparées les unes des autres, mais sur un même pied.

**Nymphoser** : phénomène de métamorphose pendant lequel une larve d'insecte se transforme en nymphe.

**Oligophage** : se dit d'un animal dont les proies appartiennent à un petit nombre d'espèces différentes.

**Phytophage** : organisme vivant dont le régime alimentaire est constitué de végétaux appartenant à différentes familles botaniques ou de phytoplancton.

**Plante-hôte** : il s'agit d'une plante qui héberge une partie du cycle de développement d'un insecte.

**Pouvoir de résolution** : Le pouvoir de résolution  $R$  du spectromètre s'exprime par la formule  $R = \lambda / \Delta\lambda$  où  $\Delta\lambda$  est la différence la plus fine en longueur qu'on peut mesurer. Par exemple, si on arrive à distinguer les deux raies jaunes du sodium ( $\lambda_1 = 589,00 \text{ nm}$ ;  $\lambda_2 = 589,59 \text{ nm}$ , ce qui donne  $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1 = 0,59 \text{ nm}$ ), le pouvoir de résolution vaut au moins :  $R = 589 / 0,59 = 1000$ .

**Scutellum** : constitue la portion postérieure élargie de la face dorsale de l'insecte.

**Scutum** : constitue la plus grande partie de la surface dorsale du thorax des diptères.

**Sténophage** : se dit d'un animal ou insecte possédant un régime alimentaire très spécialisé.

**Unisexué** : qualifie une espèce dont les sexes sont séparés. Les individus de cette espèce sont soit mâles, soit femelles. S'oppose à hermaphrodite.

**Vivace** : plante vivant plus de deux ans, mais qui vit souvent beaucoup plus longtemps, la limite de deux ans étant fixée pour séparer les vivaces des bisannuelles.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## ➤ ARTICLES

ANDERSEN J.F (1987) Composition of the floral odor fo *Cucurbita maxima* Duschesne (Cucurbitaceae) *J. Agric. Food Chem.*, 35, 60-62.

AUBERT C., BOURGER N. (2004) Investigation of volatiles cantaloupe melons (*Cucumis melo* Var. *cantaloupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4522-4528.

AUBERT C., PITRAT M. (2006) Volatile compounds in the skin and the pulp of Queen Anne's pocket melon. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 8177-8182.

BEAULIEU J.C. (2006) Volatile changes in cantaloupe during growth, maturation, and storage fresh-cuts prepared from fruit harvested at various maturities *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131, 127-139.

BEAULIEU J.C., GRIMM C.C. (2001) Identification of volatile compounds in cantaloup at various developmental stages using solid phase microextraction *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1345-1352.

BEAULIEU J.C., LEA J. (2006) Characterization and semiquantitative analysis of volatiles in seedless watermelon varieties using SPME. *J.Agric. Food Chem*, 54, 7789-7793.

BESS HA, VAN DEN BOSCH R, HARAMOTO FH (1961) Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. Proceedings of the Hawaiian Entomological Society, 27, 367–378.

BEZZI M. (1913) Indian Tephritids (fruit flies) in the collection of the Indian Museum, Calcutta. Memoirs of the Indian Museum, 3, 153–175.

BICCHI C., CORDERO C., LIBERTO E., SGOBINI B. , RUBIOLLO P., (2008) Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A*, 1184 220–233.

BINDER R.G., FLATH R.A, RICHA MON T. (1988) Volatile components of bitter melon *J. Agric. Food Chem.*, Vol 37, No2.

BOUCHONNET S. et LIBONG D. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 1999: Factors affecting behavioural responses to visual stimuli in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*. *Physiological Entomology*, 24: 333-338.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 2000a: Relationships between temperature, development and survival of different life stages of the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*. *Entomol. Exp. Applic.* 94: 25-30.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 2000b: Diel patterns of reproductive activities in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*. *Physiological Entomology*, 25: 1-9.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 2007a: Visual response of the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*, to colored fruit models. *Entomol. Exp. et Applic.*, 125: 45-54.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 2007b: Influence of habitat pattern on orientation during host fruit location in the tomato fruit fly, *Neoceratitis cyanescens*. *Bull. Entomol. Res.*, 97: 637-642.

BREVAULT T. and S. QUILICI, 2009: Flower and fruit volatiles assist host-plant location in the Tomato fruit fly *Neroceratitis cyanescens*. *Physiological Entomology*, 34, 1-10.

BUESCHER R.H., BUESCHER R.W. (2001) Production and stability of (E,Z)-2,6-nonadienal, the major flavor volatile of cucumbers *J. Food Sciences*, Vol 66, No2.

FERNANDO L.N., GRÜN I.U. (2001) Headspace-SMPE analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter melon (*Momordica charantia*) *Flavour Fragr.J.*, 16, 289-293.

FERREIRA L., PERESTRELO R., CÂMARA J.S, 2009. Comparative analysis of fraction of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection. *Talanta*, 77, 1087-1096.

GRANERO A.M., EGEA GONZALEZ F.J., GARRIDO FRENICH A., GUERRA SANZ J.M., MARTINEZ VIDAL J.L (2004) Single step determination of fragrances in *Cucurbita* flowers by coupling headspace solid-phase microextraction low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry *J. Chromatography A*, 1045, 173-179.

HÜHNERFUSS H., MUHAMMAD RAZA SHAH. (2009) Enantio-selective chromatography-A powerful tool for the discrimination of biotic and abiotic transformation processes of chiral environmental pollutants. *Journal of Chromatography A*, 1216, 481-502.

KEMP T.R., (1975) Identification of some volatile compounds from *Citrullus vulgaris* *Phytochemistry*, 14, 2637-2638.

KEMP T.R., KNAVEL D.E., STOLTZ L.P. (1973) Volatile *Cucumis melo* components: identification of additional compounds and effects of storage conditions. *Phytochemistry*, 12, 2921-2924.

KEMP T.R., KNAVEL D.E., STOLTZ L.P. (1974) Identification of some volatile compounds from cucumber *J. Agric. Food Chem.*, Vol 22, No 4.

LEWISOHN E., PORTNOY V., BENYAMINI Y., BAR E., HAREL-BEJA R., GEPSTEIN S., GIOVANNONI J.J., SCHAFFER A.A, BURGER J., TADMOR Y., KATZIR N. (2008) Sesquiterpene aroma biosynthesis in melon (*Cucumis melo*) rinds.

Li M., Huang J, Li T. (2008) Enantiomeric separation of alcohols and amines on a proline chiral stationary phase by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1191, 199-204.

LIGOR T., BUSZEWSKI B. (2008) Single drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of volatile aldehydes in fresh cucumbers. *Anal Bioanal Chem*, 391, 2283-2289.

MARRIOTT P. (2000) Multidimensional Gas Chromatography. RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia.

MENET M-C. (2011) Principes de la spectrométrie de masse. Elsevier Masson SAS. *Revue francophone des laboratoires* n°437.

MIN LI, JUNMIN HUANG, TINGYU LI. (2008) Enantiomeric separation of alcohols and amines on a proline chiral stationary phase by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1191, 199-204.

NORRBOM et al. (2004) Fruit fly (Tephritidae) names and bibliography database.

OBANDO-ULLOA J.M., MORENO E., GARCIA-MAS J., NICOLAI B., LAMMERTYN J., MONFORTE A.J., FERNANDEZ-TRUJILLO J.P. (2008) *Postharv. Biol. Techn.*, 49, 27-37.

OBANDO-ULLOA J.M., RUIZ J., MONFORTE A.J., FERNANDEZ-TRUJILLO J.P. (2010). Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo L.*) *Food Chem.*, 118, 815-822.

OKE OA (2008) Effectiveness of two insecticides to control melon fruit fly (*Bactrocera cucurbitae* Coq.) in cucumber (*Cucumis sativus L.*) crop at Anse Boileau Seychelles. *European Journal of Scientific Research*, 22, 84–86.

PALMA-HARRIS C., MCFEETERS R.F., FLEMING H.P. (2001) Solid phase microextraction (SPME) technique for measurement of generation of fresh cucumber flavor compounds *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4203-4207.

PAOLINI J., LEANDRI C., DESJOBERT J.M, BARBONI T., COSTA J., 2008. Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatils fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species. *Journal of Chromatography A*, 1193, 37-49.

PARLIMENT T.H., KOLOR M.G., RIZZO D.J., HERZING-GIORDANO D. (1981) Volatile constituents of pumpkins General Foods Corporation, Technical Center, 250 North Street, White Plains, NY Chapter 11, 129–136.

PIÑERO J., JÁCOME I., VARGAS R., PROKOPY R.J. (2006) Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121: 261–269.

POINTEL J.G. (1964) Lutte contre les mouches des fruits. Vol. 76: Rapport annuel. Ed. IRAT, La Réunion.76.

ROBERT P.C. (1986) Les relations plantes-insectes phytophages chez les femelles pondeuses: le rôle des stimuli chimiques et physiques. Une mise au point bibliographique. *Agronomie* 6:127-142.

RYCKEWAERT P., DEGUINE J.P., BRÉVAULT T., VAYSSIÈRES J.F. (2010) Fruit flies (Diptera: Tephritidae) on vegetable crops in Reunion Island (Indian Ocean): State of knowledge, control+ methods and prospects for management. *Fruits*, 65 (2): 113-130.

SCHURIG V. (2001) Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 906, 275–299.

SCHURIG V. (2002) Practice and theory of enantioselective complexation gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965, 315–356.

SHALIT M., KATZIR N., LARKOV O., BURGER Y., SHALEKHET F., LASTOCHKIN, RAVID U., AMAR O., EDELSTEIN M., LEWINSOHN E. (2000) Aroma formation in muskmelons: volatile acetates in ripening fruits. *Acta Hort.* 510.

SHALIT M., KATZIR N., TADMOR Y., LARKOV O., BURGER Y., SHALEKJET F., LASTOCHKIN E., RAVID U., AMAR O., EDELSTEIN M., KARCHI Z., LEWINSOHN E. (2001) Acetyl CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *Food Chem.* 49, 794-799.

TANG M., BIE Z., WU M., Yi H., Feng J. (2010) Aroma characterization of 'flavor No3' melon using headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry Key laboratory of horticultural plant biology, college of horticulture and forestry, China.

VAYSSIÈRES J.F., DELVARE G., MALDÈS J.M. ET ABERLENC J.P. (2000) Inventaire Préliminaire des Arthropodes Ravageurs et Auxiliaires des Cultures Maraichères sur l'île de la Réunion. Review Article *Insect Sci. Applic.* Vol. 21, No. 1, pp. 1-22.

VIRGILIO M., DELATTE H., BACKELJAU T, DE MEYER M. (2010) Macrogeographic population structuring in the cosmopolitan agricultural pest *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology* 19, 2713–2724.

VONTAS J., HERNÁNDEZ-CRESPO P., MARGARITPOULOS J.T., ORTEGO F., FENG H-T., MATHIOPOULOS K.D., HSU J.-C. (2011) Insecticide resistance in Tephritid flies *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100, 199–205.

WHITE IM, DE MEYER M, STONEHOUSE J (2000) A review of the native and introduced fruit flies (Diptera, Tephritidae) in the Indian Ocean Islands of Mauritius, Re´union, Rodrigues and Seychelles. In: Proceedings of the Indian Ocean Commission, Regional Fruit Fly Symposium (eds Price NS, Seewooruthun I), pp. 15–21. Indian Ocean Commission, Mauritius.

## ➤ OUVRAGES

ADAMS (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Ed Allured.

BOTINEAU M. (2010) Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed Tec & Doc, Lavoisier, p722-733.

DUDAREVA N. & ERAN P. (2006) Biology of floral scent. Ed Taylor & Francis Group. Section I Chap 1 p3, chap 2 p27.

Gross M.L., CAPRIOLO R.M. (2006) The encyclopedia of mass spectrometry. Ed Elsevier. Volume 8, chap 8, p737.

MENDHAM, DENNEY, BARNES, THOMAS (2006). Analyse chimique quantitative de Vogel. Edition de boeck. Chap 9 p314, chap 19 p 783.

MITRA S. (2003) Sample preparation techniques in analytical chemistry. Volume 162, p202.

PAWLISZYN J. (1999) Applications of solid phase microextraction. RSC Chromatography monographs chap 1 p3-7.

PELLERIN F., BURGOT G. Microextraction en Phase Solide (SPME). Ed. Techniques Ingénieur p1430.

SKOOG D., HOLLER J., NIEMAN T. (2003) Principes d'analyse instrumentale. Edition de boeck. Chap 27, p702.

➤ **THÈSE**

DUYCK P-F. (2005) Compétition interspécifique et capacités invasives. Le cas des Tephritidae de l'île de La Réunion. Thèse de doctorat Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive.

VAYSSIÈRES J.F. (1999) Les relations insectes-plantes chez les Dacini (Diptera - Tephritidae) ravageurs des Cucurbitaceae à la Réunion. Thèse de Doctorat Entomologie Persyst / UPR HORTSYS.

ROUSSE P. (2007) Spécificité parasitaire et sélection de l'hôte chez un parasitoïde ovo-pupal de mouches des fruits Tephritidae. Thèse de doctorat Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical.

➤ **SITES INTERNET**

Cirad : [reunion-mayotte.cirad.fr/](http://reunion-mayotte.cirad.fr/)

Chambre d'agriculture de la Réunion : [www.reunion.chambagri.fr/](http://www.reunion.chambagri.fr/)

Agreste, 2009 - *La statistique, l'évaluation et la prospective agricole.*  
<http://www.agreste.gouv.fr>

Université de la Réunion : <http://www.univ-reunion.fr/>

Banque de données informatisée : <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

**LISTE DES FIGURES  
ET DES TABLEAUX**

<b>Figure 1:</b> Position taxonomique des espèces de Tephritidae nuisibles à La Réunion .....	14
<b>Figure 2 :</b> Éléments de reconnaissance morphologique des mouches .....	16
<b>Figure 3:</b> Cycle de développement des Tephritidae . .....	17
<b>Figure 4:</b> <i>Cucumis melo</i> , le melon .....	19
<b>Figure 5:</b> Structure d'une fleur .....	20
<b>Figure 6:</b> Schéma du système SPME de type seringue.....	24
<b>Figure 7:</b> Les différents modes d'extraction.....	27
<b>Figure 8:</b> Illustration des différentes étapes de l'extraction de l'espace de tête (1-3) et de la désorption de molécules en CG (4-6) .....	28
<b>Figure 9:</b> Illustration de la désorption de molécules par CLHP .....	29
<b>Figure 10:</b> Schéma de la collecte des composés volatils par closed-loop stripping .....	30
<b>Figure 11:</b> Schéma de la collecte des composés volatils par le push-pull system .....	32
<b>Figure 12:</b> Illustration des différents modules de la CG.....	34
<b>Figure 13:</b> Injecteur en mode <i>split</i> .....	36
<b>Figure 14:</b> Représentation schématique d'une colonne capillaire .....	37
<b>Figure 15:</b> Notion de résolution chromatographiques .....	37
<b>Figure 16:</b> Schéma du couplage CG-SM.....	39
Figure 17: Schéma de l'analyseur quadripolaire .....	41
<b>Figure 18:</b> Représentation de deux molécules énantiomères.....	42
<b>Figure 19:</b> Spectre obtenu pour le limonène par impact électronique .....	44
<b>Figure 20:</b> Recherche effectuée pour la banque de données informatisée Wiley .....	45
<b>Figure 21:</b> Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....	48
<b>Figure 22:</b> Dispositif expérimental mis en place pour les fruits découpés .....	56
<b>Figure 23:</b> Dispositif expérimental mis en place pour les fruits in situ .....	56
<b>Figure 24:</b> Nombre de composés volatils détectés après 3h et 4h de pause à température ambiante et à 37°C pour <i>Cucurbita moschata</i> (citrouille commerciale), <i>Cucurbita pepo</i> (courgette) et <i>Cucumis sativus</i> (concombre variété «Tropical») .....	58
<b>Figure 25:</b> Nombre de composés volatils détectés pour les fruits jeunes ou mûrs des 4 Cucurbitaceae étudiées, après 3 heures de pause à température ambiante ou à 37°C.....	61
<b>Figure 26:</b> Réponse des femelles de <i>Bactrocera cucurbitae</i> aux effluves des fruits mûrs découpés de 10 espèces de Cucurbitaceae .....	64
<b>Tableau I:</b> Espèces de Cucurbitaceae présentes à la Réunion.....	21
<b>Tableau II :</b> Caractéristiques de quelques revêtements polymériques pour les fibres SPME.....	25
<b>Tableau III :</b> Systèmes d'injection utilisés en chromatographie gazeuse capillaire .....	35
<b>Tableau IV:</b> Les composés volatils des Cucurbitaceae : travaux antérieurs .....	51
<b>Tableau V:</b> Espèces de Cucurbitaceae étudiées .....	55
<b>Tableau VI:</b> Nombre de composés volatils détectés après 3h et 4h de pause à température ambiante et à 37°C pour <i>Cucurbita moschata</i> (citrouille commerciale), <i>Cucurbita pepo</i> (courgette) et <i>Cucumis sativus</i> (concombre variété «Tropical») .....	58

<b>Tableau VII:</b> Nombre de composés volatils détectés pour les fruits jeunes ou mûrs des 4 Cucurbitaceae étudiées, après 3 heures de pause à température ambiante ou à 37°C .....	60
<b>Tableau VIII:</b> Corrélation des données.....	69
<b>Tableau IX:</b> Nature et provenance des espèces des Cucurbitaceae étudiées.....	73
<b>Tableau X:</b> Conditions d'analyse par CG-SM .....	74