Recherche de traces de vie extraterrestre : élaboration d'une unité d'extraction et d'analyse chirale pour la séparation énantiomérique in situ de molécules organiques d'intérêt exobiologique

Caroline Freissinet

▶ **To cite this version:**

Caroline Freissinet. Recherche de traces de vie extraterrestre : élaboration d'une unité d'extraction et d'analyse chirale pour la séparation énantiomérique in situ de molécules organiques d'intérêt exobiologique. Autre. Ecole Centrale Paris, 2010. Français. NNT : 2010ECAP0033 . tel-00615481

HAL Id: tel-00615481

https://theses.hal.science/tel-00615481

Submitted on 19 Aug 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée par

Caroline FREISSINET

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR de l'Ecole Centrale Paris

Spécialité : Chimie Analytique

Laboratoires d'accueil : Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM)
Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA)

Recherche de traces de vie extraterrestre : élaboration d'une unité d'extraction et d'analyse chirale pour la séparation énantiomérique *in situ* de molécules organiques d'intérêt exobiologique

---

Soutenue le 29 Novembre 2010

Num. 2010ECAP0033

Devant une commission d'examen composée de :

Patrice COLL	Professeur, Univ. Paris Diderot	Président
Uwe MEIERHENRICH	Professeur, Univ. Nice Sophia-Antipolis	Rapporteur
Daniel GLAVIN	Directeur de Recherche Gouvernemental, NASA	Rapporteur
Frances WESTALL	Directeur de Recherche, CNRS Orléans	Examinateur
Arnaud BUCH	Maître de conférences, ECP	Codirecteur de thèse
Robert STERNBERG	Maître de conférences, Univ. Paris 12	Codirecteur de thèse
Moncef STAMBOULI	Professeur, ECP	Directeur de thèse
Michel VISO	Responsable de thématique, CNES	Invité
Jean-Bernard GUILLOT	Professeur, ECP	Invité

Ecole Centrale Paris
Grande Voie des Vignes
92295 CHATENAY-MALABRY Cedex

Universités Paris-Est Créteil, Paris-Diderot, CNRS (UMR 7583)
61 Avenue du Général de Gaulle
94010 CRETEIL Cedex

Recherche de traces de vie extraterrestre : élaboration d'une unité d'extraction et d'analyse chirale *in situ* pour la séparation énantiomérique de molécules organiques d'intérêt exobiologique.

La recherche de vie extraterrestre et en particulier de vie sur Mars est devenue un des enjeux majeurs des prochaines explorations spatiales. Dans ce cadre, la recherche de molécules organiques et l'étude de leur énantiomérie pourrait permettre d'obtenir les premiers indices en faveur d'une présence passée ou présente de vie sur cette planète. En effet la vie telle que nous la connaissons est uniquement basée sur des acides aminés L et sucres D. Ces molécules organiques et leur éventuel excès énantiomérique pourraient avoir été conservés dans les conditions martiennes.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) est actuellement la technique analytique spatialisable la plus pertinente pour la détection de composés organiques volatils. Afin de rendre volatils les composés réfractaires tels que les acides aminés, nous proposons une fonctionnalisation chimique au diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA). Cette fonctionnalisation couplée à une séparation chromatographique sur une colonne chirale est une technique parfaitement adaptée à la séparation énantiomérique et à la spatialisation. Nous avons donc mis au point une méthode de **fonctionnalisation des molécules organiques chirales par l'agent de méthylation DMF-DMA afin de séparer les énantiomères et de les étudier *in situ* en CPG-SM lors des futures missions martiennes**.

Cette technique d'analyse des molécules réfractaires chirales a ensuite été adaptée à une utilisation spatiale. Ainsi, la méthode d'analyse est constituée d'un four réactionnel dans lequel l'échantillon solide est placé, les molécules d'intérêt exobiologique sont ensuite successivement extraites et fonctionnalisées au DMF-DMA pour être analysées en CPG-SM. Les résultats ont permis de montrer qu' à partir d'une faible quantité de sols d'analogues martiens (50 mg de sol du désert d'Atacama, Chili) et après optimisation de chacune des étapes, plusieurs types de molécules organiques présentes à l'état de traces ont pu être détectées, telles que des acides aminés, des acides carboxyliques et des bases nucléiques. Parmi ces molécules chirales, plusieurs ont pu être séparées selon leur forme énantiomérique. Le protocole est élaboré dans les limites technologiques et opératoires d'une analyse spatiale ; chaque étape est pensée pour un usage robotisé. Nous avons ainsi développé une expérience globale, sensible et robuste, totalement compatible avec les exigences d'une analyse *in situ*. C'est la raison pour laquelle cette expérience sera intégrée sur la prochaine mission martienne Exomars 2016/2018 afin de rechercher des traces de matière organique à la surface et en subsurface de Mars. La découverte d'un excès énantiomérique, voire d'une homochiralité, apporterait des indices forts quant à la présence d'une vie passée ou présente sur la planète rouge.

Mots-clés : fonctionnalisation, homochiralité, DMF-DMA, Mars, indices de vie, molécules organiques, chromatographie, spectrométrie de masse, traitement d'échantillons.

Elaboration of an experimental device for the *in situ* enantiomeric separation of chiral organic molecules of exobiological interest.

Looking for extraterrestrial life, particularly on Mars, has become a challenging aim for future space missions. In this framework, looking for organic molecules and studying their enantiomeric properties could lead to the first clues of an extinct or extant life on this planet. Indeed, life as we know it consists in one of the two specular forms of organic molecules only, and it has been shown that conditions at Mars could preserve, at least partially, this enantiomeric excess.

Gas Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS) is nowadays the most pertinent space-compatible analytical tool for the detection of volatile organics. In order to transform refractory molecules such as amino acids into volatile ones, we are putting forward a chemical derivatization with dimethylformamide dimethyl-acetal (DMF-DMA). This reaction, when coupled with an analytical step using a chiral chromatographic column, is perfectly adapted to enantiomeric separation within the space constraints. This thesis develops a **method of derivatization of the chiral organic molecules with methylation reagent DMF-DMA in order to separate and analyze *in situ* the enantiomers by GC-MS during the future Martian missions.**

This analytical tool consists in a reaction chamber into which the solid sample is dropped. From this sample, the molecules of interest are successively extracted and derivatized with DMF-DMA to be detected by GC-MS. From a low quantity of Martian analogue soil (50 mg of Atacama soil) and after a complete optimization of each step, numerous molecules of different kinds present at traces levels have been successfully detected, such as amino, carboxylic and nucleic acids. Among these molecules, some of the chiral ones have been resolved regarding their enantiomeric forms. The whole procedure is elaborated within the technological and operational limits imposed by a space experiment, each step having been designed to be carried out robotically. Thus, we have developed a complete experiment, sensitive, robust and entirely meeting the requirements of an *in situ* analysis. That is the reason why this experiment has been selected to be integrated onboard the next Martian mission Exomars 2016/2018 in order to search traces of organic matter at Mars surface and subsurface. Determining an enantiomeric excess, or even homochirality, would be a remarkable breakthrough regarding the presence of an extinct or extant life on the red planet.

Key-words: derivatization, homochirality, DMF-DMA, Mars, life remnants, organic molecules, chromatography, mass spectrometry, sample treatment.

Caroline
FREISSINET

Arnaud
BUCH

Robert
STERNBERG

dans

Mars Conquest

LGPM & LISA PRESENTENT

UNE PRODUCTION ECP EN ASSOCIATION AVEC UPEC UN FILM DE CAROLINE FREISSINET - MARS CONQUEST (LES MARTIENS : MYTHE OU REALITE ?) AVEC ARNAUD, ROBERT, MONCEF, JEAN-BERNARD, AMELIE, CELINE, FERNANDO, JEAN, CAROLE B., SANDRA, GERALDINE, CATHERINE, EMILIE, HELENE, ESTELLE, JAMILA, ANNIE, CORINNE, MUSTAFA, JULES, ARUN, CAROLE G., SI, YASSINE, FRED, BRAHIM, AMAURY, HERVE, MARIE, NATHALIE, BARBARA, CYRIL, FRANCOIS, YVES, ANTOINE, HERVE, PATRICE, MURIELLE, MARC, NICO, SEBASTIEN, CYRIL, MARIE-CLAIRE, MANU, AUDREY, LENA, FABIEN, OLIVIER, FERNANDO, TAMI, FRED, YUAN, CAROLE, CORALIE, KAFILA, MEGANE, JAMILA, NICOLAS, CYRIELLE

29 Novembre 2010

Comment tout a Commence...

Titre original : Les Martiens : mythe ou réalité ?
Synopsis : *cf.* 4ème de couverture
Production : Arnaud Buch, Robert Sternberg, Moncef Stambouli
Scénario : Arnaud Buch, Robert Sternberg
Réalisation : Caroline Freissinet
Sociétés de production : LGPM – LISA
Société de distribution : ECP distribution©
Montage : Caroline Freissinet, Arnaud Buch
Effets spéciaux : GC-MS
Genre : Aventure - Humour
Durée : 45 min + 2h15 de bonus
Pays d'origine : France, imbibé de Nouvelle-Zélande
Date de sortie : 29 Novembre 2010
Public : Tout public (Adrien, 2 ans, a adoré)
Budget : R&T CNES - irrévélable
Format : 264 pages 21 x 29,7 + 53 diapos .pptx
Direction artistique : Arnaud Buch (pour ses chemises à fleurs roses)
Décors : ECP, UPEC

Un coup de téléphone. Ce coup de téléphone qui a fait basculer le cours de l'histoire. Il était 23h sur l'île du Nord, ou devrais-je plutôt dire 11:00 pm. Le labo était déserté depuis bien longtemps déjà. Ma partie de tennis venait de s'achever. A peine eu-je le temps de mettre la clé dans la serrure qu'IL appelait. Oh certes, après s'être probablement trompé plusieurs fois dans ce numéro si étrange. Il m'a proposé de réaliser un film parmi les scénarios les plus excitants de l'histoire du cinéma. Un remake de X-files, en mieux encore. Le titre initial était « Les Martiens : mythe ou réalité ? ». Certes, ce titre a un peu évolué depuis...

22h de vol et une audition à Centrale plus tard, le verdict est tombé : tu as le rôle principal, et tu réaliseras le film, m'a-t-il dit. Il ? Arnaud, mon producteur. C'est ainsi qu'à commencé une histoire de confiance entre un binôme de chic et de choc. Le scénario était parfait. Le décor… bon, peut être à revoir à certains endroits. Quelques erreurs de casting, des moments de tournage difficiles, quelques derushages défectueux, mais une équipe idéale. Toujours à fond pour refaire ces interminables scènes jusqu'à ce qu'elles soient parfaites. Tous meilleurs les uns que les autres.

A commencer par le producteur/scénariste, Arnaud Buch. J'avoue pouvoir difficilement avoir envisagé un meilleur superviseur que lui. Une grandeur d'âme, d'esprit… dans un être pourtant si petit ! C'est du concentré ! Du concentré de bonne humeur, de bons mots, de gentillesse, de talent (sauf sur la trottinette), de compréhension. Un encadrement de tous les instants, comme il dit. Que de moments partagés, entre les labos et les bistrots (Chez George Forever !!) ! Tout en étant particulièrement présent et aidant, il m'a laissé toutes les libertés que je souhaitais, liberté d'idées, liberté d'expériences, liberté d'horaires, liberté d'effectuer toutes les cascades sans doublage aucun (quelques séquelles s'en sont ressenties), liberté d'être ma propre costumière malgré les remarques désobligeantes et incessantes de certain(e)s. A ses côtés, Moncef Stambouli et Robert Sternberg, directeur de production et coproducteur respectifs, sans qui le tournage n'aurait pas été possible.

Je n'oublie pas non plus les membres du jury, qui ont jugé ce travail lors du désormais mondialement célèbre festival de Châtenay-Malabry. Ils étaient présents en grande pompe, Patrice Coll, Uwe Meierhenrich, Daniel Glavin, Frances Westall, Jean-Bernard Guillot et Michel Viso.

Non moins importants dans le casting, tous les acteurs, qui se sont donnés à fond pour rendre ces ~~3~~ 4 ans de tournage magiques, pour m'en laisser un souvenir impérissable de plénitude, de joie et de bonne humeur, de plaisir à venir jour après jour réaliser les scènes de ce long-métrage.

Je pense notamment aux acteurs Centrale, amis, collègues, les 2 : à commencer par JB Guillot, qui en plus de m'avoir autorisée à tourner dans son labo, est un puits sans fond de connaissances (et nous aura débloqué plus d'une fois aux mots fléchés en trouvant des mots dont même Google ignore l'existence). Mes pensées vont également aux « anciens » qui m'ont accueillie et fait découvrir ce nouveau monde, ainsi qu'aux « nouveaux » que j'ai pu accueillir dans ces lieux ; Amélie, Céline, Fernando qui a essayé en vain de m'apprendre quelques mots de portugais, Jean, dit Mc Gyver, toujours disponible et surtout incroyablement talentueux de ses mains, Carole dite « ma blonde » dont le chien me déteste depuis que j'ai squatté son panier, Sandra mon autre blonde à la porte de qui j'allais souvent gratter, au sens littéral du terme, Géraldine et Catherine aussi efficaces que sympathiques, Emilie, Hélène la super cuisinière, Estelle sans qui je ne serais jamais allée récupérer de l'eau croupie au fin fond du bois de Verrières, Jamila ou Minipouss' qui après toutes ces années de shopping ensemble a commencé à acheter autre chose que du noir (n'est-ce pas Collègue ?), Annie (bonjour Annie !!!) qui a fini par abandonner l'idée de me voir un jour porter une blouse, Cococ qui me tapait à chaque fois que je l'appelais ainsi en hurlant, Mouss' dit « ma c… » (non jpeux pas) qui participe activement à maintenir le français comme « langue vivante », Jules ou ma Juliette qui a persisté à ruiner toutes mes tentatives de drague en se faisant passer pour mon homme, Arun qui a supporté mes plaintes et complaintes des heures durant en partageant le même bureau que moi, Carole dite ma s... (non, je peux pas non plus) dont j'ai toujours été jalouse des photos d'Islande, Fred, dit bogoss, toujours présent pour se moquer gentiment de moi, Yassine qui subissait mes entrées soudaines et bruyantes dans son bureau, Si dont je n'ai jamais réussi à traduire les insultes en chinois qu'elle me disait avec le sourire lorsque je l'appelais « ni hao », Brahim qui malgré ses promesses ne m'a jamais présenté R., Amaury le ptit nouveau qui travaille sur un sujet prometteur et excitant, Hervé que je soupçonne d'échanger sa garde-robe avec celle d'Arno, Marie qui je crois n'existe qu'en mode souriante, Nathalie qui jouait le rôle du ptit ange qui prohibait l'alcool à certains quand moi j'avais le rôle du ptit démon, et les kikis qu'il fallait pourchasser lorsqu'ils tombaient (sautaient ?) de mon bureau ! Et tous ceux que l'on référera toujours en tant que « le rez-de-chaussée », notamment Barbara qui me faisait sentir moins extraterrestre par ses habits tout aussi colorés que les miens, et Cyril photographe officiel de la fête de la science, mais malheureusement Pentaxiste.

Je pense également aux acteurs LISA, où deux générations s'opposent et se complètent. Tout d'abord François Raulin qui m'a autorisée à tourner dans son labo et groupe à Créteil et qui s'est renseigné quo-ti-die-nne-ment et des mois durant sur l'état d'avancée de ma rédaction, Yves qui a mal estimé ce qu'impliquait cette phrase pourtant si anodine « tu peux t'installer dans mon bureau le temps de partir en post-doc » et a vite regretté ces quelques mots, Antoine, Hervé mon fournisseur officiel de logiciels photos, Marc pour tous ces cappuccinos partagés (d'antan), Murielle qui me tire la langue par reflexe chaque fois qu'elle me voit (et je lui rends bien), Patrice, humoriste incompris, dont les rumeurs disent qu'il se serait inscrit dans un stage de comédie par dépit, M'sieur Fray dit « multicolore » mais qui fut un parfait partenaire d'escalade, tout comme Sébastien d'ailleurs, Cyril qui ok n'est ni LISA ni Créteil, mais je n'allais pas créer un paragraphe spécial « aliens » non plus, Marie-Claire que je citerai en transition parfaite entre la 1ère ou 2ème catégorie de génération de crainte de me faire taper sur les doigts, Manu sans qui les road-trips en Allemagne et à Puerto Rico n'auraient pas été aussi rocambolesques (mémorable changement de roue en haut d'une piste de 4x4 qu'on avait réussi à grimper avec notre berline de loc, n'est-il pas ?), Audrey qui n'a pas hésité à prendre et à faire prendre ce risque incommensurable à son homme et à ses chats de m'héberger lorsque j'étais sans-abri, Léna-la-rurale qui m'accompagnait de bon cœur dans les montées alcoolémiques soudaines, Fabien partenaire de squash que je réussirai à battre un jour, Olivier-le-Blond un peu trop blond mais on s'y fait, Fernando dit Pepito, Tami, Yuan dit NiHao, Fred même si je n'ai jamais réussi à la prendre en photo, Carole qui a fui Créteil pour se réfugier dans un « environnement plus calme et serein » (métaphore) à Guyancourt, Thomas ancien

co-buro et adepte invétéré du 2nd degré, Coralie et Kafila les 2 plus belles M2 du monde comme elles aiment à se définir, et Mégane qui je suis sûre comprendra un jour les règles du jeu à Bang!

Je n'oublie pas non plus ces êtres venus d'ailleurs, que j'appellerai MEREIA, qui m'ont fait découvrir après moult années qu'il existait des entités et des couloirs au-delà de ceux du GPCOS : Jamila dite Pierre Richard pour sa propension à être un boulet, Nicolas et Cyrielle, partenaires idéaux pour les jeux de cartes.

Le tournage n'aurait pas été aussi parfait sans la GPCOSette, ses Candy'Up et ses petit LU au chocolat au lait, sans ses soirées endiablées chez George avec Hugo, sans ses interminables parties de Bang! et ses non moins interminables disputes sur les points obscurs des règles du jeu, qui pouvaient finir sur un « puisque c'est ça je m'en vais », ses mots-fléchés niveau 4 et même 5, ses courses de trottinette dans les couloirs de l'Ecole, et bien évidemment rien n'aurait été pareil sans QPUC, qui n'a fait qu'accroître notre culture et notre ouverture au monde !!

Une dernière pensée va à mes lyonnais, qui n'étant plus à Lyon m'ont permis de découvrir la France et l'Europe pour le tournage de certaines scènes mémorables, mes grimpeurs-marcheurs, mes kiwis, mes parisiens qui pour la plupart hurleraient de se faire traiter de parisiens mais qui pourtant sont classés comme tels dans mon répertoire MSN, et ma famille, d'où qu'ils aient pu me voir accomplir ce travail. Je n'oublie pas non plus la régie et tous les figurants qui ont été essentiels au bon déroulement et qui se reconnaitront.

L'avant-première s'est déroulée avec succès en présence de toute l'équipe de tournage, dont j'ai grandement apprécié la présence en haut des marches du bâtiment Dumas, ainsi qu'à la soirée qui a suivi, malheureusement pas chez Georges qui était fermé le lundi soir !!

Pour m'avoir permis de réaliser ce travail par votre implication à plusieurs échelles, à vous tous, ainsi qu'à tous ceux que je n'aurais pas volontairement oubliés, en un mot comme en 1606 :

MERCI

Introduction - Français ***1***

Introduction - English ***3***

Chapitre I – De l'état de l'art ***5***

I.1. Pourquoi l'homochiralité ? 5
I.1.1. Biomarqueurs - Bioindices 5
I.1.1.a. Ratios isotopiques 6
I.1.1.b. Activité biologique – marqueurs métaboliques 6
I.1.1.c. Energie 7
I.1.1.d. Présence de molécules organiques complexes – marqueurs moléculaires 8
L'ADN, la biosignature par excellence 8
Biosignature moléculaire 10
I.1.1.e. De la chiralité à l'homochiralité 12
Une brève histoire de l'activité optique 12
L'homochiralité pour définition de la vie (terrestre) 14
Origines de l'homochiralité 17
Théorie biotique 17
Théories abiotiques 20
L'apparition d'un excès énantiomérique 21
L'amplification de l'excès énantiomérique 28
I.1.2. La Lune 29
I.1.3. Les controverses de la météorite de Murchison 30
I.1.4. Stabilité du matériel (pré)biologique en conditions spatiales 32
I.1.5. La racémisation 33
Stabilité de la molécule et de son message énantiomérique 35

I.2. Où chercher la vie ? 36
Mars, candidate idéale 37

I.3. Les molécules d'intérêt exobiologiques 40
I.3.1. L'origine des molécules prébiotiques sur Mars 40
I.3.1.a. Exogène 40
Observations dans le MIS 41
Simulations du MIS 41
La matière organique sur les météorites, micrométéorites et comètes 42
Météorites 43
Comètes 43
Micrométéorites 44
La quantité d'apports exogènes 45
I.3.1.b. Endogène 46
I.3.2. Les acides nucléiques 47
I.3.3. Les acides carboxyliques et la théorie de Benner 48
I.3.4. Les acides aminés 49
I.3.5. Pertinence des molécules et du message 50

I.4. Les techniques de séparations et d'analyses chirales 51
I.4.1. Eléctrophorèse Capillaire 52
I.4.2. Chromatographie 53
I.4.2.a. Chromatographie en Phase Liquide (CPL) 55
I.4.2.b. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) 57
I.4.3. Spatialisation de la technique d'analyse *in situ* 59
Les missions spatiales embarquant de la CPG-SM 60

I.5. Les colonnes chromatographiques 68
I.5.1. Les colonnes chromatographiques achirales 69

I.5.2. Les colonnes chromatographiques chirales 71
I.5.2.a. Ponts hydrogène 73
I.5.2.b. Complexation/coordination 75
I.5.2.c. Inclusion (cyclodextrines modifiées) 75

I.6. La fonctionnalisation chirale 81
I.6.1. Généralités 83
I.6.2. Alkyle-alkoxyle-carbonylation/perfluoroestérification (chloroformiate d'alkyle) 84
I.6.3. Perfluoroacylation/perfluoroestérification 88
I.6.4. Alkylation (N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA)) 90

I.7. Objectifs expérimentaux de la thèse 93

I.8. Références 95

Chapitre II – De la fonctionnalisation et séparation énantiomérique des molécules organiques 113

II.1. Etude comparative de la séparation des molécules organiques volatiles 113
II.1.1. Objectif 113
II.1.2. Matériel et méthodes 114
II.1.2.a. Le hardware 114
II.1.2.b. Les molécules cibles 117
II.1.2.c. Les phases stationnaires 121
Théorie des plateaux 122
Paramètres cinétiques : mesure de l'efficacité d'une colonne chromatographique 124
II.1.3. Résultats et discussion 127
II.1.3.a. Optimisation des paramètres cinétiques de la séparation chromatographique 127
II.1.3.b. Le comportement des solutés et grandeurs thermodynamiques 129
II.1.3.c. Paramètres thermodynamiques : mécanismes de séparation 134
II.1.3.d. Réponse chromatographique, limite de détection et limite de quantification 141
II.1.4. Conclusion 146

II.2. Etude de la séparation chirale des acides aminés biogéniques 147
II.2.1. Matériels et méthodes 148
II.2.1.a. Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse 148
II.2.1.b. Molécules 148
Les molécules cibles 148
L'étalon interne 149
L'agent de fonctionnalisation ; le DMF-DMA 150
II.2.1.c. Procédure de fonctionnalisation 151
II.2.2. Résultats et discussion 151
II.2.2.a. Optimisation de l'analyse chromatographique 151
Détermination de la vitesse optimale du gaz vecteur 151
II.2.2.b. Optimisation de la programmation de température pour la séparation chromatographique chirale des acides aminés 154
II.2.2.c. Librairie de masse spectrale et informations structurelles des molécules d'intérêt 154
Librairie de spectre de masse et fragmentation des acides aminés 155
II.2.2.d. Optimisation de la fonctionnalisation 164
Optimisation de la température et du temps de la réaction de fonctionnalisation 165
La racémisation 172
Tentatives d'amélioration des conditions expérimentales 175
- Racémisation 175
- Rendement 176
II.2.2.e. Séparation chromatographique et résolution des paires énantiomériques 177
Séparation chirale 177
Résolution chromatographique 179

II.2.2.f. Etudes quantitatives 180
Linéarité – Courbe de calibration 181
Limites de détection et limites de quantification 182
Mode Single Ion Monitoring (SIM) 183
II.2.3. Conclusion 184

II.3. Stabilité du DMF-DMA 184
II.3.1. Mode opératoire 185
II.3.2. Résultats et discussion 185
II.3.3. Conclusion 186

II.4. Les autres composés d'intérêt exobiologique 186
II.4.1. Les acides aminés non protéiniques 187
II.4.2. Les acides carboxyliques 187
II.4.3. Les bases nucléiques 189

II.5. Pertinence de ces valeurs par rapport aux valeurs attendues sur Mars 191
II.5.1. Les sources exogènes 192
II.5.1.a. Les micrométéoritiques. 192
II.5.1.b. Les météorites 195
II.5.1.c. Les comètes 195
II.5.1.d. Les poussières interplanétaires 195
II.5.1.e. Les sources endogènes 195
II.5.2. Conclusion 197

II.6. Comparaison Chirasil-Val et Chirasil-Dex 199

II.7. Discussion générale 200

II.8. Conclusion 203

II.9. Bibliographie 206

Chapitre III – De la conception et la réalisation de l'expérience spatialisable 213

III.1. Introduction 213

III.2. Le Dispositif de Préparation de l'Échantillon (DPE) 214
III.2.1. Descriptif du Dispositif de Préparation d'Échantillon 214
III.2.2. Principe général de fonctionnement du Dispositif de Préparation de l'Echantillon (DPE) 224
III.2.2.a. One pot - two steps 225
III.2.2.b. One pot - one step 225
III.2.2.c. Principe mécanique 226

III.3. Mise point d'un point d'un protocole expérimental d'analyse de la matière organique pour le spatial 228
III.3.1. Les différentes matrices utilisées 229
III.3.1.a. Analogue 229
III.3.1.b. Sol de Jardin 231
III.3.2. Caractérisation du sol de jardin 231
III.3.3. Mise au point de la thermodésorption comme technique d'extraction *in situ* 232
III.3.3.a. Principe de la thermodésorption 233
III.3.3.b. Principe de la fonctionnalisation 233
III.3.3.c. La thermodésorption 233
Procédure expérimentale 233
Résultats et discussion 234
III.3.3.d. Comparaison thermodésorption - extraction solide-liquide assistée par ultrasons 236

III.4. Application à l'expérience MOMA de la thermodésorption suivie de la fonctionnalisation au DMF-DMA 237
III.4.1. Contraintes de la spatialisation 237
III.4.2. Procédure expérimentale 238
III.4.3. Résultats et discussion 239
III.4.3.a. Optimisation de la température 239
III.4.3.b. Optimisation de la durée de la thermodésorption 240
III.4.3.c. Optimisation de la durée de fonctionnalisation 241
III.4.3.d. Influence de la quantité de sol et de réactif 242
III.4.4. Proposition et tests de la procédure d'analyse des composés réfractaires pour l'expérience MOMA 243
III.4.4.a. Méthodologie 243
III.4.4.b. Sol de jardin 245
III.4.4.c. Sol du désert d'Atacama 248

III.5. Conclusion 251

III.6. Perspectives 252

III.7. Bibliographie 257

Conclusion générale 259

Liste des publications liées à ces travaux 265

Introduction

En observant sous l'œil du microscope une cellule humaine, elle semble n'avoir que peu en commun avec une cellule bactérienne. Mais tout comme les linguistes essaient de s'accorder sur l'origine commune de tous les langages humains, il semblerait que toutes les formes de vie aient également une origine commune. En comparant les mécanismes fondamentaux du vivant dans les trois domaines (procaryotes, archaea et eucaryotes), il devenait alors possible de définir "le plus petit dénominateur commun aux trois" : LUCA, pour Last Universal Common Ancestor, organisme unicellulaire primitif qui représenterait l'ancêtre de toute forme de vie actuelle sur Terre. Nous parlons aujourd'hui d'un univers biologique, potentiellement parsemé de vie. En considérant la vie comme composante à part entière dans l'évolution cosmique, l'exobiologie soulève des questions éthiques sur la place de l'humanité dans la nature et dans l'univers, plaçant *Homo sapiens* dans un contexte cosmique tout comme Darwin l'avait fait en le plaçant dans un contexte terrestre. En ce sens, l'exobiologie, à l'instar d'autres grandes révolutions scientifiques, a le potentiel pour apporter des réponses à un grand nombre de questions sur le passé, le présent et le futur de la vie.

Il existe des différences considérables entre les premiers questionnements théologiques et philosophiques sur l'origine de la vie ou l'existence d'une vie extraterrestre, et l'exobiologie d'aujourd'hui. Cette dernière place la vie dans le contexte de son histoire planétaire, et couvre tous les aspects depuis l'origine et l'évolution de la vie sur Terre, à sa distribution dans l'univers, en passant par l'étude de la vie dans les environnements extrêmes, la recherche de systèmes exoplanétaires et l'étude des biosignatures.

Parmi les biosignatures ou bioindices possibles, l'étude de l'activité optique de certaines molécules organiques, menant au concept de chiralité et donc d'homochiralité de la vie est particulièrement intéressante. Cette discipline émergente qu'est l'exobiologie pourrait donc être le socle disciplinaire pour une meilleure compréhension des fondements de la chiralité biologique. Comprendre l'origine de l'homochiralité pourrait être un élément clé à la compréhension des origines de la vie, et la retrouver ailleurs pourrait être un indice fort envers la présence d'une vie passée ou présente.

Ce que nous savons aujourd'hui sur l'apparition de la vie sur Terre demeure relativement limité. Depuis les travaux de Miller (1953), le courant de pensée prônant l'apparition *in situ* des premières molécules d'intérêt exobiologique sur Terre dans l'atmosphère ou dans les océans était en vogue. Aujourd'hui, les recherches proposent une alternative : des molécules plus ou moins complexes, venant de l'espace, ont pu ensemencer la Terre et toute autre planète du système solaire. Cet avenant à la théorie dite de la panspermie, qui stipulait que de petites entités vivantes auraient pu ensemencer la Terre, indique en un sens les formes de vie qu'il serait possible de trouver ailleurs dans le système solaire. En effet, les biomarqueurs du vivant tel qu'on le connaît pourraient être les

mêmes que ceux d'une forme de vie exotique ou extraterrestre, les molécules disponibles à sa formation étant les mêmes.

Ainsi, la recherche de biomarqueurs du vivant terrestre peut être étendue à la recherche de ces mêmes biomarqueurs dans des milieux extraterrestres, où la vie aurait eu des possibilités d'apparaître, de se développer, et d'y laisser des traces de son activité ou de sa présence jusqu'aux jours actuels. Développer des techniques précises d'analyse de ces bioindices dans un environnement autre que terrestre devient alors une étape indispensable à la recherche de traces de vie extraterrestre. C'est en particulier le but du travail présenté ici.

Pour atteindre cet objectif nous avons tout d'abord listé les composés cibles et les techniques compatibles avec l'exploration spatiale. Puis nous avons testé et mis au point une technique de fonctionnalisation basée sur l'utilisation du diméthylformamide dimethylacetal (DMF-DMA) et compatible avec la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Enfin, nous avons développé un réacteur permettant de tester et réaliser l'extraction et la fonctionnalisation d'un échantillon d'analogue martien.

- Une recherche bibliographique exhaustive a permis de sélectionner les molécules les plus pertinentes pour la recherche de la vie sur d'autres environnements que la Terre. En effet, différents paramètres sont à prendre en compte : la nature de l'atmosphère, la présence ou non d'eau, le type de sol rencontré (solide, liquide ou gazeux), les conditions physico-chimiques et enfin le plus important la vie telle qu'on la connait sur Terre. De tous ces paramètres et sans être un réel biomarqueur biologique, la chiralité des acides aminés s'est révélée être un bon indice de présence de vie.

- Nous avons ensuite fait le bilan des différentes techniques susceptibles de permettre la détection de la chiralité. Forte de son héritage de plus de 30 ans, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse se révèle encore être la meilleure technique d'exploration spatiale pour la chiralité.

- Plusieurs classes de colonnes chirales ont été étudiées et classées en fonction de leur énantiosélectivité. Une technique de fonctionnalisation basée sur l'utilisation du DMF-DMA a été développée et a permis de séparer plus de 10 acides aminés sur les 20 du vivant. Les limites de détection et de quantification ont également été déterminées.

- Afin de valider l'ensemble du protocole d'analyse *in situ* de la matière organique nous avons alors choisi de développer un Dispositif de Préparation de l'Echantillon (DPE) permettant d'optimiser chacune des étapes de l'analyse : extraction, fonctionnalisation et injection. Des tests dans les conditions de la future expérience Mars Organic Molecule Analyser (MOMA) de la mission martienne ExoMars ont alors pu être menés sur des analogues martiens.

Ce travail devrait permettre d'implanter au cours de la mission ExoMars l'extraction et la détection de la chiralité et en particulier pour les acides aminés.

Introduction

Looking closely at the inside of a human cell, it seems to have nothing to do with a bacterial cell. But similar to how linguists try to converge on the common origin of all the human languages, it seems that all kinds of living forms share the same origin. Comparing fundamental mechanisms of life in the three branches of life (prokarya, eukarya and archea), it became thus possible to define their smallest common unity: LUCA, standing for Last Universal Common Ancestor. LUCA would have been a primitive single-celled organism being the ancestor of all kind of today's life on the Earth. We are talking nowadays about a biological universe potentially spread with life. If we consider life as a whole component of cosmic evolution, astrobiology raises then ethical issues about the position of mankind regarding nature, placing *Homo sapiens* in a cosmic context the same way Darwin placed it in a terrestrial context. Astrobiology has thus the potential to display answers to a wide range of questions about life origins, present and future.

There is now a conceptual gulf between the first theological and philosophical questioning on the origin of life and the extraterrestrial life on one hand, and astrobiology today, on the other hand. This latter tries to replace life in the context of its planetary history, and covers all aspects from the origin and evolution of life on the Earth to its widespread distribution in the Universe, via studies of life in extreme environments, searching exoplanetary systems and studying biosignatures.

Among the biosignatures or possible hints, studies about the optical activity of some organic molecules of interest, linked to the chirality concept and homochirality of life, is one of particularly interesting. Astrobiology, as an emerging disciplinary, could thus be the disciplinary base for a better understanding of the foundations of biological chirality. Finding out the origin of homochirality could be a key to the understanding of the origin of life. Finding it elsewhere would be a strong hint toward the existence of a past or present life.

What we know today about the apparition of life on the Earth remains poor. Since Miller in 1953 and its famous experiments, it had been thought that the first molecules of exobiological interest appeared in the Earth's atmosphere or oceans. Today, researchers suggest an alternative: more or less complex molecules coming from space could have seeded the Earth and any other planet of the solar system. This amendment to the theory of panspermia, which stipulated that small living entities could have scattered the Earth, would give clues on the type of life forms we would be able to find in the solar system. Indeed, biomarkers of the life as we know it could then be the same that the ones of an exotic form of life, having the same building blocks.

Thus, looking for the same biomarkers as the Earth's life one, but in extraterrestrial environment, is a way to detect an environment where life has emerged, developed and let remnants tracks of its activity. Developing leading-edge analysis techniques of these biohints in an alien environment become a compulsory step to the search of traces of extraterrestrial life.

Chapitre I – De l'état de l'art

I.1. Pourquoi l'homochiralité ?

I.1.1. Biomarqueurs - Bioindices

Une des difficultés pour identifier des traces de vie est précisément le manque de connaissances sur ce que nous devrions chercher. En effet, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui n'est pas forcément la même que la vie à ses origines. Comment alors chercher quelque chose que nous ne sommes pas capables d'appréhender ? Pour élaborer des techniques et des instruments susceptibles de chercher des traces de vie, il est tout d'abord indispensable de faire une comparaison avec quelque chose que nous connaissons ; à savoir pour l'instant, la seule vie reconnue, la vie terrestre. La première étape est donc d'identifier des biomarqueurs ou bioindicateurs organiques terrestres, des composés ou des caractéristiques du vivant qui nous révèleraient de manière sûre ou sous forme d'indices la présence d'une vie passée ou présente. Même si la vie n'est pas définie de manière universelle, nous sommes capables d'en déterminer ce qui la caractérise. Le terme de biomarqueur peut être employé en substitution du terme de biosignature, c'est-à-dire une combinaison de composés qui, après identification et mesure, révèlerait une présence de vie. Un biomarqueur se doit de produire des preuves indiscutables d'une présence passée ou présente de vie. Il s'agit typiquement d'un fossile, ou d'une caractéristique de la vie telle que nous l'aurons définie. Un biomarqueur doit être produit par la vie et la vie seule, ne doit pas avoir une explication alternative à la vie pour justifier son existence. S'il s'agit d'une trace de vie potentielle, avec par exemple une explication abiotique, on parlera alors de bioindice.

Si la vie est détectée ailleurs que sur Terre, cela aura une répercussion considérable. En effet, cela signifierait que la vie n'est pas unique, qu'elle peut être présente sur de nombreuses autres planètes, dans d'autres systèmes solaires et d'autres galaxies de l'Univers (Brack 2000). La détection d'indices ou de signatures de vie, chimique (composition élémentaire, ratios isotopiques, chiralité etc.) ou morphologique (inspection macroscopique et microscopique de la surface des échantillons, sur une base de techniques analytiques paléontologiques, biologiques ou minéralogiques), ou d'une signature globale (la signature infrarouge du dioxyde de carbone peut indiquer une exoplanète tellurique, la présence d'eau, un indice en faveur d'une possible habitabilité, une détection d'O_3, une absorption différentielle de la lumière polarisée circulairement correspond à une biosignature potentielle) est parmi les objectifs prioritaires des missions d'exploration spatiale de la NASA et de l'ESA.

Il devient donc indispensable, pour la communauté des exobiologistes, de pouvoir recenser les moyens et les connaissances qui nous permettent d'identifier au mieux les indices présents ou passés de possibles traces de vie.

I.1.1.a. Ratios isotopiques

Il est bien connu des biologistes que les être vivants privilégient le ^{12}C plutôt que son isotope plus lourd le ^{13}C lors des processus autotrophiques de fixation du carbone inorganique en carbone organique. Cette conversion de ^{13}C en ^{12}C est retenue dans les résidus de carbones biogéniques.
La redistribution isotopique des carbones la plus notable se produit lors de la photosynthèse, où les enzymes de fixation du CO_2 utilisent préférentiellement le $^{12}CO_2$. le taux de carbone 13 diminue alors en faveur du carbone 12. Sur Terre, cette préférence du ^{12}C lors de la photosynthèse représente un changement de ratio de 20 à 30%. Cette différence reste relativement stable et permanente, étant maintenue continuellement depuis 3,5 milliards d'années.
Puisqu'il ne semble pas exister de réaction ou de systèmes abiotiques capables de conduire à un tel enrichissement, cette préférence de la vie envers le ^{12}C peut donc être utilisée comme biomarqueur. Cependant une telle conclusion nécessite que le ratio isotopique des précurseurs carbonés soit connu.

L'abondance relative de certains isotopes par rapport à d'autres peut donc être considérée comme un bioindice, indiquant une présence potentielle de vie dans l'échantillon étudié. De même que pour le fractionnement isotopique $^{12}C/^{13}C$, un fractionnement de 30% est détecté pour l'abondance d'hydrogène comparé à son isotope lourd, le deutérium, sur Terre. Cette différence provient de l'activité des microorganismes méthanogènes. Un tel ratio $^{1}H/^{2}H$ repéré sur Mars serait un indice fort en faveur de la présence de microorganismes (Brack *et al.* 1999). De la même manière, le fractionnement isotopique biologique $^{15}N/^{14}N$ (par dénitrification bactérienne préférentielle du $^{14}NO_3$) rend intéressante la détermination de ce rapport dans des systèmes extraterrestres. Il en est de même pour la détermination d'un éventuel changement de composition isotopique $^{32}S/^{34}S$ dû à la réduction préférentielle des sulfates ^{32}S par les bactéries. La sulfato-réduction est l'un des mécanismes énergétiques les plus primitifs, et est très courant dans l'environnement terrestre moderne.

C'est en se basant sur de telles constatations que le rover martien Beagle 2 a embarqué un spectromètre de masse (expérience GAP) capable de mesurer le ratio isotopique $^{12}C/^{13}C$ dans le dioxyde de carbone. Si Beagle 2 ne s'était pas perdu, il aurait ainsi été capable de détecter un excès isotopique supérieur à 3% synonyme d'une possible vie passée ou présente sur Mars (Wright *et al.* 2003).

I.1.1.b. Activité biologique – marqueurs métaboliques

Certains composés produits par le métabolisme, notamment des composés gazeux comme par exemple le CH_4, H_2S, CH_3SH (methyl mecarptans) et N_2O, sont observés dans des cultures ou sur des colonies microbiennes *in situ*.
Si ces gaz peuvent être détectés dans des conditions extraterrestres, en parallèle avec d'autres indices, il serait fort probable qu'une forme de vie ait pu les produire. Ces résidus d'activité métabolique ne seraient cependant que des indices ; combiné au fait que cette détection ne soit pas

la plus facilement réalisable, cette méthode n'est pas la plus adéquate. Cependant, s'ils sont identifiés, ces indicateurs de métabolisme pourraient avoir des implications importantes pour l'identification d'une possible forme de vie.

Sur Mars, du méthane a été détecté à hauteur de 250 ppb avec des variations spatiales (Formisano *et al.* 2004; Krashnopolsky *et al.* 2004; Mumma *et al.* 2004; Allen *et al.* 2006; Villanueva *et al.* 2008; Mumma *et al.* 2009). Ces mesures sont proches de la limite de détection des techniques utilisées et méritent d'être confirmées. Si ces observations sont exactes cela signifie que les sources de méthane relarguent leur gaz en continue, accréditant la thèse d'une possible vie martienne ou simplement d'un phénomène géologique tels que du volcanisme ou des réactions à basses températures entre roche et eau.

I.1.1.c. Energie

Toute forme de vie nécessite de l'énergie, quelle que soit sa composition, ses fonctions ou ses similitudes avec les formes de vie terrestres. Il serait donc possible d'identifier une forme de vie exotique, totalement étrangère à celle que nous connaissons, en détectant ses émissions énergétiques. Il deviendrait alors intéressant de trouver les composants chimiques clés d'une chaîne de transport d'électrons, utilisée par l'organisme pour drainer l'énergie dans des réactions contrôlées d'oxydoréduction entre les donneurs et les accepteurs d'électrons (Crawford *et al.* 2001), pour y voir une signature énergétique. Etant donné que l'adénosine tri-phosphate (ATP) est la molécule énergétique universelle du vivant (Figure I.1-1), et puisque se rattacher à une forme de vie existante restera « humainement » et scientifiquement inévitable, il serait donc intéressant d'essayer de révéler la présence d'ATP dans des environnements extraterrestres.

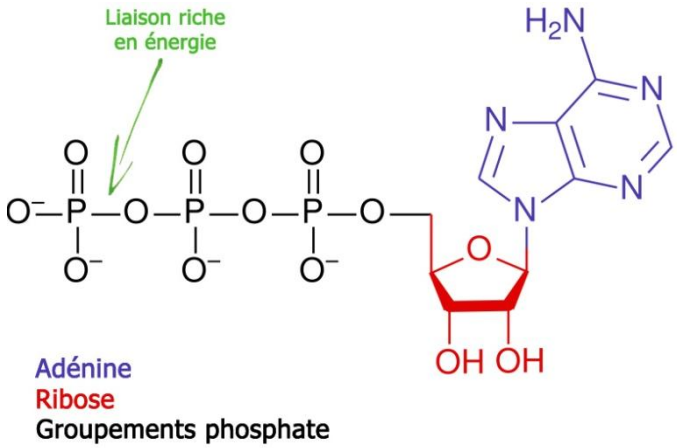


Figure I.1-1 : l'adénosine tri-phosphate (ATP). L'hydrolyse de sa liaison phosphoanhydride distale est la source d'énergie principale des êtres vivants. Elle est constitué d'une base azotée, l'adénine, d'un sucre, le ribose, et de trois groupements phosphates reliés entre eux par des liaisons anhydride phosphorique.

La possibilité d'exploiter cette énergie potentielle de la molécule d'ATP a été conservée au fil de l'évolution par tous les organismes vivants recensés. Il est particulièrement facile de déterminer la présence de molécules d'ATP dans un échantillon d'intérêt ; nombres de réactions utilisent cette molécule et uniquement celle-ci pour aboutir à un évènement visible, tel que la lumière (cas de la réaction luciférine/luciférase). Cette molécule est d'autant plus intéressante qu'elle est un précurseur dans la synthèse de l'ADN. Ce nucléotide peut alors s'intégrer dans une méthode de recherche plus globale des molécules organiques d'intérêt exobiologique (cf. paragraphe suivant). En effet, les nucléotides, ainsi que les sucres et les bases azotées qui les composent, entrent dans les critères de sélection des molécules organiques d'intérêt potentiellement détectables dans des environnements extraterrestres. Ainsi, la recherche d'ATP dans un échantillon extraterrestre est aussi simple que sa signification serait importante.

I.1.1.d. Présence de molécules organiques complexes – marqueurs moléculaires

L'ADN, la biosignature par excellence

De nombreux biologistes adhèrent à la théorie selon laquelle la présence d'ADN (Figure I.1-2) est un critère auto-suffisant pour déterminer une présence de vie. En effet, notre « arbre du vivant » est basé sur cette molécule (Benton *et al.* 2003) et seul le vivant semble pouvoir synthétiser cette molécule.

La justification du choix de l'ADN comme biomarqueur tient à trois raisons principales :
(1) l'ADN est reconnu comme étant universel dans le monde du vivant et sa formation ne peut être réalisée de façon abiotique ou par artefact.
(2) Les techniques de détection moléculaire de l'ADN comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) sont ultraspécifiques et ont une sensibilité largement supérieure à toutes les autres techniques d'analyse classique en permettant notamment la détection d'une seule molécule (Paabo *et al.* 1989).
(3) Enfin, nous disposons d'une connaissance étendue de la physico-chimie de cette macromolécule depuis les années soixante.

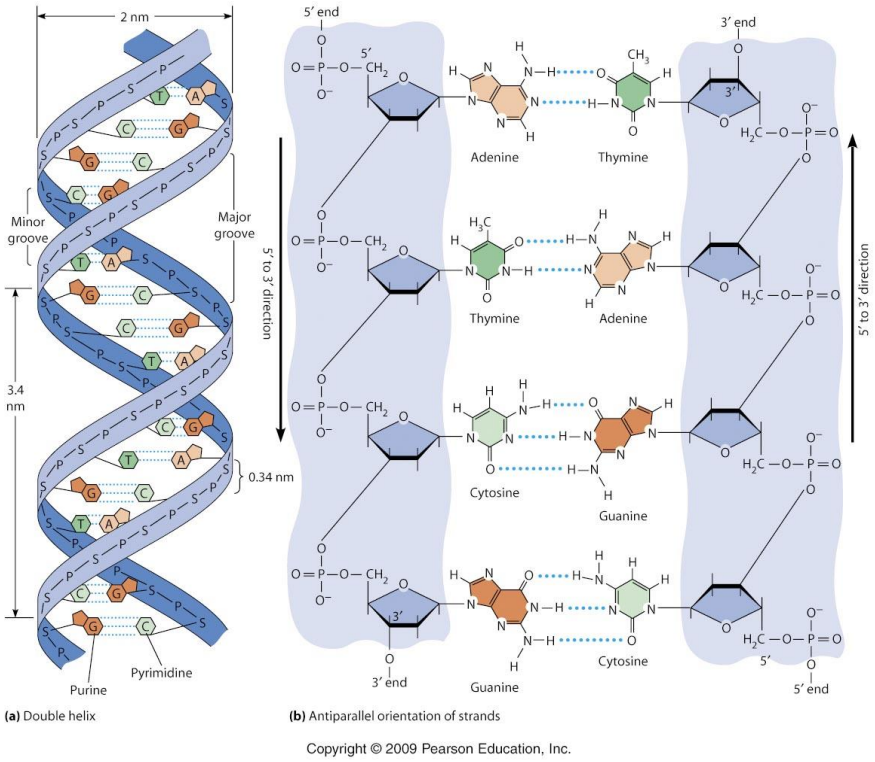


Figure I.1-2 : à gauche : la structure en double-hélice de l'ADN. A droite : la composition nucléotidique du polymère.

Malheureusement, la détection d'ADN dans des environnements spatiaux est un challenge expérimental impressionnant, voire irréalisable. En effet, lorsque des fossiles sont récupérés, l'ADN des organismes qui y sont présents est rarement préservé. Il a en général été détruit ou remplacé. Naturellement, ces observations ont été réalisées sur Terre, et l'espoir d'une préservation accrue des brins d'ADN qui agiraient en synergie en faveur de cette préservation dans des conditions extraterrestres telles que Mars, est plus qu'hypothétique. Cependant, la recherche d'ADN, aussi indicative que serait sa révélation, reste à apprécier d'un regard critique ; cette molécule est très spécifique de la vie telle que nous la connaissons. Si sa présence est indispensable à la vie sur terre, son absence sur une autre planète serait insignifiante. En cherchant cette molécule si spécifique, nous ne prenons pas en compte la possibilité d'autres molécules susceptibles de porter l'information de la vie. Or, cette tentative de détection d'ADN est une expérience à part entière. Expérience qui se limite donc uniquement à la recherche d'un potentiel biomarqueur, certes robuste, mais tellement spécifique de la vie terrestre qu'il risque de conduire à des faux-négatifs en cas de dégradation de l'ADN ou d'une autre forme de vie Comparativement à la présence d'ADN, la présence de macromolécules telles des protéines serait d'un impact majeur dans l'avancée de la description de vie extraterrestre. De même, les lipides ont été identifiés comme une classe de biomarqueurs chimiques pour l'identification de la vie. Comme l'ADN et les protéines, les lipides sont des composants essentiels de toute forme de vie actuellement connue. En effet, les lipides ont des fonctions biologiques nombreuses et variées, ainsi que des structures biologiques diverses dans le monde vivant, et sont de plus les précurseurs de toute structure membranaire.

Malheureusement, étant donnée la fragilité de ces macromolécules à l'épreuve du temps (Simoneit *et al.* 1998), la détection de ces dernières ne peut être utilisée pour déterminer si des organismes ont vécu sur l'échantillon, mais seulement si la vie y est toujours présente ou récemment éteinte. La possibilité d'observer des biomolécules polymériques telles que l'ADN, les protéines et les lipides d'une vie passée *in situ* est fortement improbable, compte tenu des environnements dégradants auxquels ils sont soumis.

Biosignature moléculaire

Après la mort d'un organisme, ses biopolymères primaires (protéines, lipides, ADN et polysaccharides) subissent d'une part un processus complexe de dégradation et de condensation (humification) donnant naissance à des macromolécules complexes et chimiquement stables, que l'on nomme kérogènes, et d'autre part une dégradation occasionnant la libération des monomères de ces molécules. Les kérogènes représentent la majeure partie (>90%) de la matière organique sédimentaire, et leur composition chimique dépend des conditions thermiques auxquelles ils ont été exposés. Après dégradation de l'ADN, il sera également possible d'en retrouver les acides nucléiques et sucres qui le composaient. Il en est de même pour les protéines, qui vont laisser apparaître les acides aminés qui les constituaient. Les lipides quant à eux existent sous différentes formes. Les acides gras, qui sont des acides carboxyliques à longue chaîne aliphatique, en font partie. Ces acides gras sont retrouvés dans toutes les huiles, les graisses, les cires, les lipopolysaccharides (constituant essentiel des parois bactériennes), les mono-, di- et triglycérides (réserve d'énergie animale), les glycéro-phospholipides et les sphingolipides (composants des membranes plasmiques eucaryotes). Ces acides gras, lors d'une dégradation, subiront une transformation en acides carboxyliques plus courts. Or, les acides carboxyliques sont particulièrement résistants à la dégradation, même exposés à des conditions drastiques, ce qui rend leur recherche en tant que bio-indice pertinente. Ces composés sont intéressants en tant que résidus, produits dérivés de la vie, qui peuvent subsister longtemps après que la vie ait été balayée. Certains acides carboxyliques ont en effet pu être détectés dans des sols extrêmement arides et oxydants du désert d'Atacama au Chili (Navarro-Gonzalez *et al.* 2003). Les monomères de nos macromolécules d'intérêt sont donc beaucoup plus stables que les polymères dont ils sont issus, même exposés à des conditions drastiques. D'autres lipides, cycliques, tels que les stérols (hopanoïdes, stéroïdes) sont source d'intérêt exobiologique par leur importance biologique (présence dans les membranes bactériennes) et la résistance de leur squelette carboné aux conditions dégradantes (Tableau I.1-1).

Tableau I.1-1 : exemples de biomarqueurs et occurrence dans le monde vivant (source : (Simoneit *et al.* 1998)).

Compound class[a]	Common biotic source[b]	Analytical detection method
1. Labile compounds to assess contemporary or recent life processes		
Amino acids/peptides	all life	GC, Py-GC
Sugars/polysaccharides	flora (some fauna)	GC
Nucleotides, bases, etc.	all life	specific methods
Unsaturated lipid compounds	all life	GC, GC-MS
2. Lipid/bitumen compounds to assess biosynthesis in prior geological times:		
Aliphatic hydrocarbons	ubiquitous/not specific	GC, GC-MS, GC-IRMS
Isoprenoids	biogenic	GC, GC-MS, GC-IRMS
Steroids	flora/fauna	GC-MS, GC-IRMS
Triterpenoids	flora/microbes	GC-MS, GC-IRMS
Diterpenoids	flora/microbes	GC-MS, GC-IRMS
Pigments	flora/microbes	HPLC-MS, HPLC-IRMS
Biopolymers	flora/microbes	Py-GC-MS
Novel and unknown biomarkers	–	GC-MS, Py-GC-MS

[a] Labile markers are stable for briefer geological periods after diagenetic preservation. Group 2 is stable for longer geologic periods.
[b] Slash indicates that a distinction is possible.

Toutefois, alors que les polymères de molécules complexes sont de réels biomarqueurs, les kérogènes et monomères en tant que tels ne sont que des indices de vie. La plupart d'entre eux pouvant être créés *ex vivo*, leur présence n'est pas irrévocablement liée à la présence d'une vie organique. Des acides carboxyliques et aminés ont déjà été synthétisés dans des simulations expérimentales, sous des conditions pré-biotiques plausibles, et ont pu être détectés dans de nombreuses météorites et échantillons de sol lunaire (Harada K 1971; Hamilton PB 1975; Brinton *et al.* 1996).

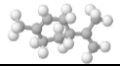
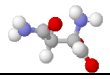
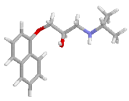
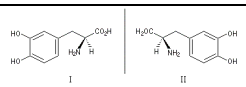
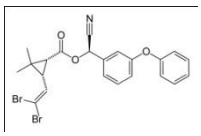
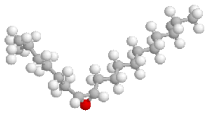
C'est pourquoi une preuve supplémentaire est nécessaire afin de valider l'origine biotique de ces molécules. Dans certains cas, certaines de ces molécules possèdent un ou plusieurs carbones asymétriques engendrant des énantiomères dont un seul est utilisé par le vivant. Pour ces molécules, l'analyse de leur activité optique devrait être un outil de diagnostic complémentaire pertinent pour discerner entre une origine biotique ou abiotique. Il est certes possible pour des acides aminés prébiotiques de porter une signature chirale, ce qui rend l'observation d'une rotation optique dénuée de toute portée argumentaire en faveur d'une indication non-ambiguë de vie (Pizzarello *et al.* 2000). Néanmoins, en déterminant la valeur de l'excès énantiomérique, il pourrait être possible de se baser sur une détection d'homochiralité pour indiquer la provenance biotique de ces éventuelles molécules. Cette homochiralité serait alors un biomarqueur, marquant pour sûr la présence d'une vie passée ou présente (MacDermott *et al.* 1996). Cette propriété permettrait aux chercheurs d'avoir un système de détection de vie puissant, simple et inexpansif.

I.1.1.e. De la chiralité à l'homochiralité

Une brève histoire de l'activité optique

Depuis sa découverte par Jean-Baptiste Biot en 1815, l'activité optique des molécules est particulièrement étudiée dans différents domaines scientifiques, qu'ils soient appliqués ou fondamentaux. L'activité optique est la capacité qu'a une molécule de dévier le plan de polarisation d'une lumière incidente polarisée linéairement, dans un sens ou dans l'autre selon l'énantiomérie des molécules du milieu qu'elle traverse. Cette activité optique a été liée à la chiralité (du grec « χειρ », la main) des molécules par Pasteur quelques années plus tard, en 1848. Il a fallu attendre 1904 pour avoir une définition de la chiralité, par Lord Kelvin, définition encore admise aujourd'hui. « J'appelle toute figure géométrique, ou groupe de points, chiral, si son image dans un miroir plan ne peut être amenée à coïncider avec lui-même ». Cette propriété implique généralement un centre asymétrique au sein de la molécule. Cependant, les molécules possédant une hélicité, un axe ou un plan de chiralité peuvent également être chirales, sans pour autant présenter de carbone asymétrique. Les deux énantiomères d'une molécule chirale, malgré leurs caractéristiques physiques et chimiques relativement proches, peuvent avoir des propriétés biochimiques radicalement différentes, voire opposées ; senteurs différentes, flaveurs différentes, effet biologique ou inertie de la molécule, et même médicament/poison pour les inverses optiques d'une molécule tragiquement connue, la thalidomide (Tableau I.1-2).

Tableau I.1-2 : exemple de différentes molécules chirales et leurs rôles biochimique/biologique respectifs selon leur forme énantiomérique.

	Forme R	**Forme S**
Thalidomide	Sédatif	Sédatif + tératogène
Limonène	Odeur d'orange 	Odeur de citron
Asparagine	Saveur sucrée	Saveur amère 
Propanolol	 Contraceptif	β-bloquant
Carvone	Odeur de menthe	Odeur d'aneth
Citronellal	Arôme d'orange	Arôme de citron
Naproxène	Toxine hépatique	Anti-inflammatoire
DOPA  **(précurseur dopamine)**	Toxine	Activité thérapeutique contre la maladie de Parkinson
	Forme	**Forme**
Deltaméthrine	R,R,S : insecticide	 S,S,R ; aucun effet sur insectes
Chloramphenicol	R,R : antibiotique	S,S ; aucun effet sur bactéries
Paclobutrazol	R,R : fongicide	S,S Régulateur de croissance végétale
Disparlure	R,S : phéromone sexuel du Bombyx disparate 	S,R : aucune action biochimique

Trois nomenclatures existent pour classer les énantiomères.

- la nomenclature chimique R/S, déterminée par un classement des groupements autour du centre asymétrique par ordre de priorité chimique et par une flèche rotative imaginaire en fonction de ces priorités. Si la flèche tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, la molécule sera déterminée R, et inversement pour la forme S.
- la nomenclature optique, d/l, ou +/-, basée sur l'effet de la molécule en solution sur le plan de polarisation de la lumière. d (dextrogyre), ou +, tournera ce plan de polarisation vers la droite, l (lévogyre) ou – vers la gauche.
- la nomenclature D/L est basée sur des règles assez floues. Elle est purement conventionnelle, et pourtant la plus utilisée en biologie.

L'homochiralité pour définition de la vie (terrestre)

Malgré l'existence des deux inverses optiques, les molécules chirales retrouvées dans les organismes vivants ne se présentent que sous une seule des deux formes énantiomériques. Dans le cas d'un système abiotique, le mélange sera racémique (du latin « racemus », grappe de raisin), c'est-à-dire 50% d'une forme et 50% de son inverse optique. Fisher a ainsi démontré que les biomolécules fonctionnelles sont composées uniquement de sucres D, constituants essentiels de l'ADN (Figure I.1-3), et d'acides aminés L, monomères des protéines (Figure I.1-4).

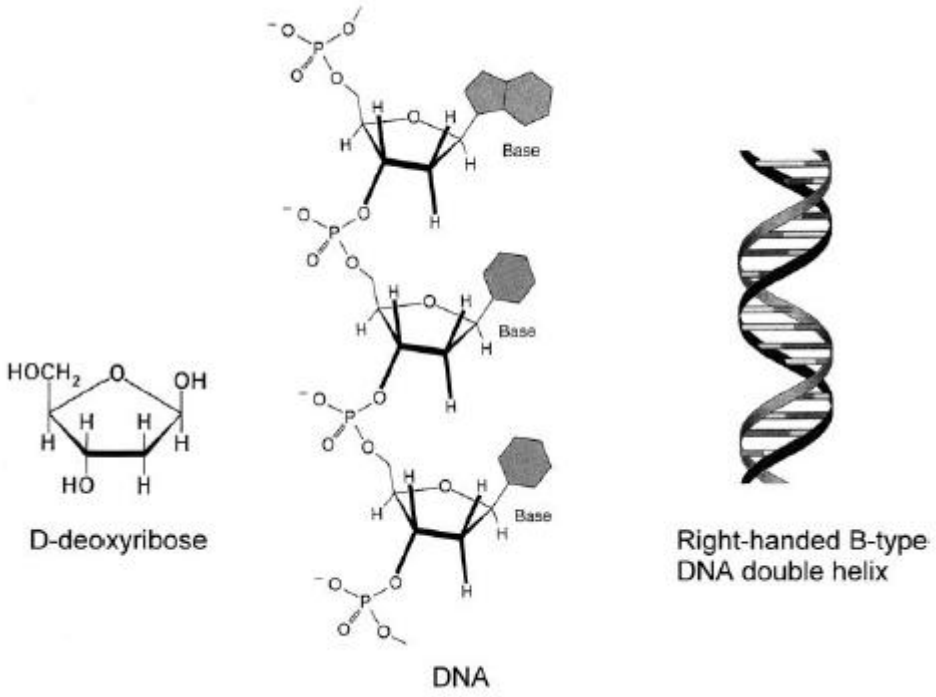


Figure I.1-3 : Les acides nucléiques sont formés exclusivement de sucres homochiraux de forme D, tel le D-désoxyribose pour l'ADN. Cela génère une structure secondaire homochirale, comme la double-hélice droite de l'ADN pour l'ADN de type B (le plus courant) (Barron 2008).

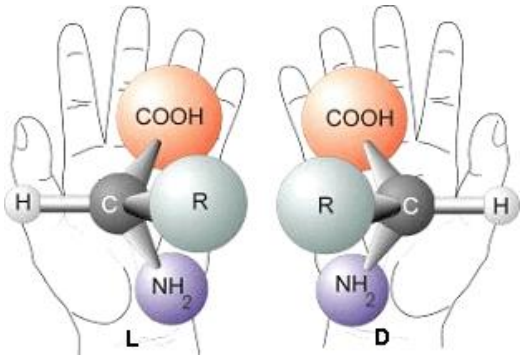


Figure I.1-4 : exemple d'un acide aminé chiral.

La règle générale de la nature est l'asymétrie, de l'échelle des particules élémentaires avec la violation de parité au niveau de la force nucléaire faible et de la chiralité des neutrinos, au monde macroscopique, avec ses galaxies spirales, ses planètes qui révolutionnent dans un sens précis, la spiralité des coquilles d'escargot (dextre chez la majorité des gastéropodes), l'enroulement des plantes, le sens de rotation des flagelles procaryotes et eucaryotes (déterminants pour l'asymétrie du corps humain), ou encore l'observation cruciale d'une asymétrie dans le mouvement de la mâchoire des vaches durant la mastication (Jordan *et al.* 1927) (Figure I.1-5)

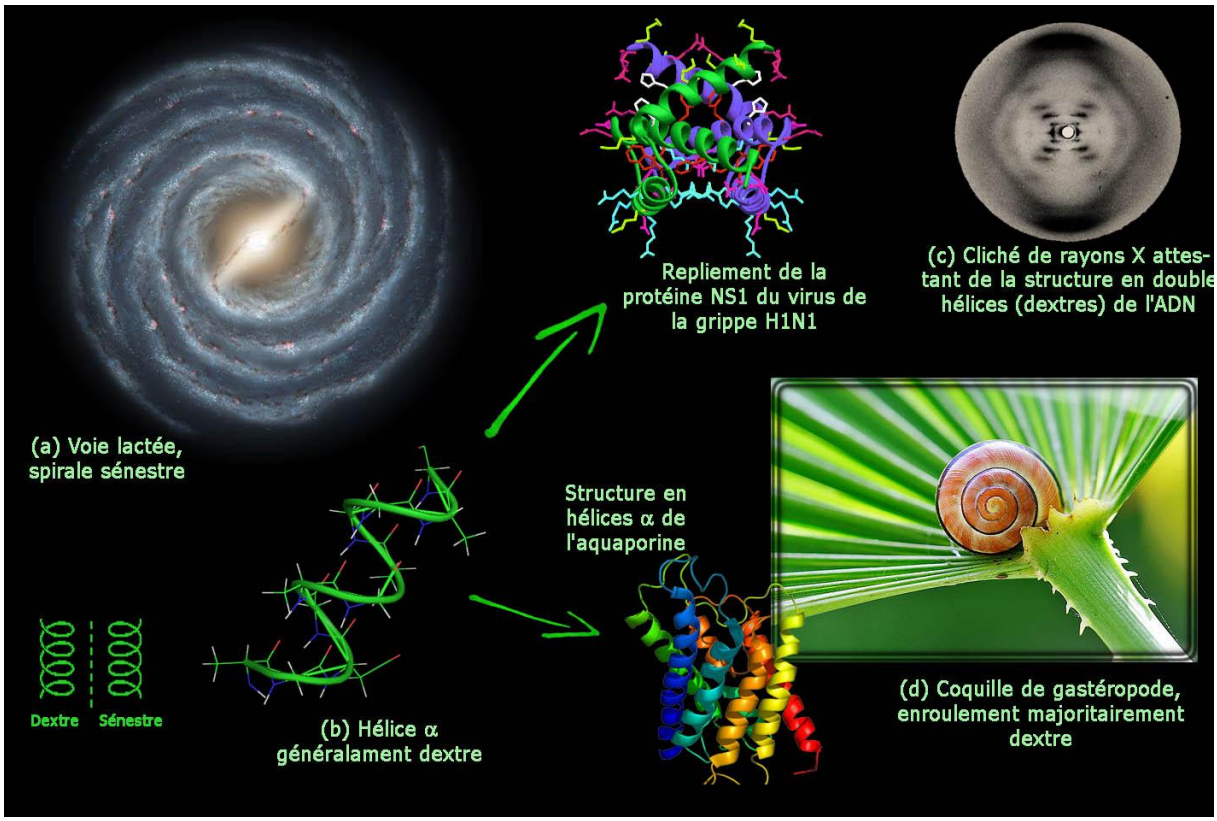


Figure I.1-5 : l'asymétrie dans la nature, des galaxies spirales (a) aux structures moléculaires (b, c). Les contraintes stériques des acides aminés de forme L favorisent l'hélice α droite des protéines (b). Ces structures secondaires des protéines sont essentielles à leurs fonctions. (d) : la majorité des gastéropodes ont une coquille d'enroulement spiral droit.

La complexité des organismes vivants ne pourrait être possible sans cette homochiralité. Des avantages certains existent en faveur d'une dissymétrie énantiomérique (Soai *et al.* 1995). En effet, il est facile de comprendre pourquoi toutes les vis du monde ont le même pas droit, pour l'universalité des appareillages. On ne pourrait pas imaginer acheter un mélange racémique de vis. Il en est de même pour l'ADN et les protéines. L'incorporation de L-ribose perturberait une structure basée sur l'énantiomère D. L'hélice d'ADN se doit de contenir une seule forme énantiomérique de ce sucre (Goldanskii *et al.* 1986). Si l'ADN contenait des D- et L-ribose, il ne serait plus possible de former les ponts hydrogènes entre les bases, origine même de la complémentarité et responsables de la formation de la double-hélice. L'ajout d'une molécule de la mauvaise forme tend à terminer la polymérisation en cours des nucléotides.

Concernant les protéines et leurs constituants, les acides aminés, une substitution d'un énantiomère d'acide aminé avec un autre conduirait dans la plupart des cas, à une variante structurale inactive de la protéine, voir à une mauvaise structuration 3D de la molécule pour plusieurs changements énantiomériques à l'intérieur de la protéine, et donc à sa destruction par les systèmes intrinsèques à la cellule. La synthèse d'un polypeptide de mauvaise composition énantiomérique pourrait même être une des causes du processus de vieillissement et de cancer (Ulbricht 1981). Il s'agit peut être d'une des raisons pour laquelle le corps humain contient une enzyme spéciale, la D-acide-aminé-oxydase, qui permet d'éliminer les acides aminés de « mauvaise » forme.

La formation des biopolymères, leurs structures secondaires et leurs fonctions sont donc basées sur cette homochiralité, qui est alors considérée comme essentielle dans la vie terrestre (Cronin *et al.* 2005). Peu importe quelle forme est choisie, l'important est qu'il n'y en ait qu'une. Le monde tournerait aussi bien avec des vis toutes de forme gauche.

Les molécules suffisamment complexes pour être le support d'une forme de vie devraient présenter une chiralité, et donc nécessairement une homochiralité pour avoir une biochimie efficace. Alors que la présence d'acides carboxyliques, acides aminés ou acides nucléiques ne seraient que des indices d'une forme de vie, l'étude de la chiralité de ces derniers et notamment la présence d'un excès énantiomérique pourrait apporter une preuve importante en faveur de leur origine biotique. Le monde vivant est chiral. Les bio-monomères ne présentent qu'une seule des deux conformations chirales. Les acides aminés, les sucres et les lipides sont principalement homochiraux dans tous les systèmes vivants et leur structure polymérique forme des arrangements secondaires asymétriques (hélices α, feuillets β, conformations A, B et Z de l'ADN, conformation hélicoïdale des polysaccharides). Les acides carboxyliques aussi peuvent être chiraux. La chiralité peut donc aussi être utilisée pour estimer le caractère biotique ou abiotique de ces acides.

Les recherches exobiologiques actuelles n'accordent que peu de crédit aux formes de vie qui pourraient être fondamentalement différentes de celles connues sur Terre, et qui n'entreraient donc pas dans le cadre du « moule biologique ». Il est pour sûr plus difficile de prévoir un marqueur d'une forme de vie exotique sans jamais l'avoir rencontrée, que d'extrapoler des marqueurs trouvés dans un contexte de vie terrestre. De plus, il est probable que suite aux échanges de matières interplanétaires permanents, si la vie existe ailleurs dans le système solaire, elle serait similaire à celle que l'on connaît sur Terre (van Loon 2005). Mais l'exclusion de ces formes potentielles de vie serait une erreur. En cela, l'homochiralité est un atout pour les scientifiques ; sa recherche permet de déceler à la fois les formes de vie telles que nous les appréhendons, mais aussi des formes de vie basées sur des molécules radicalement différentes. L'expression dominante d'une seule des deux formes énantiomériques de toute molécule chirale devrait être caractéristique de toute potentielle forme de vie ; la vie se dirige vers la complexification des molécules, et la stabilité des polymères de ces molécules dépend de leur homochiralité. Puisque l'homochiralité permet l'identification de nombres de

molécules, il s'agit d'un biomarqueur universel et important approprié tant aux composés biologiques connus qu'aux composés extraterrestres potentiellement biologiques.

L'homochiralité peut être étudiée et détectée de différentes manières : par une analyse énantiomérique *in situ* directe des éventuels composés d'intérêt exobiologique. Cela pour une analyse de vie passée ou présente. Par le suivi énantiomérique de l'évolution métabolique de $^{14}CO_2$, qui indiquerait une activité microbienne et non oxydante si un énantiomère venait à l'emporter sur l'autre dans le processus. Par l'identification de rayonnements polarisés circulairement (CPL) droit et gauche, qui auraient une absorption différente à 6700A par des composés chiraux tels que ceux impliqués dans la photosynthèse.

Cependant avant de s'intéresser plus en détail à l'analyse et la détection d'excès énantiomérique et/ou de l'homochiralité il est intéressant voire indispensable d'avoir une réflexion sur les origines de l'homochiralité. En effet, la compréhension de cette origine pourrait permettre de mieux comprendre pourquoi la vie terrestre n'utilise que des acides aminés L et des sucres D mais aussi de mieux appréhender les possibilités de trouver ailleurs une vie basée sur d'autres dissymétries que celles connues sur terre.

Origines de l'homochiralité

« L'univers est un ensemble dissymétrique et je suis persuadé que la vie, telle qu'elle se manifeste à nous, est fonction de la dissymétrie de l'univers ou des conséquences qu'elle entraine ». Cette phrase précurseur de la pensée actuelle a été prononcée par Pasteur en 1874, qui a été le premier à proposer l'importance d'un univers asymétrique. Les découvertes ultérieures ont dépassé de bien loin les pensées de cet homme, et il s'est révélé que l'origine de l'homochiralité du vivant a peut-être bel et bien des bases cosmiques. Alors que l'on commence à comprendre pourquoi la vie est homochirale, nous sommes encore dans l'incapacité d'expliquer comment cette homochiralité est apparue, et pourquoi cette forme a pris le dessus sur l'autre. L'origine de l'homochiralité est aujourd'hui encore inconnue. Accident ? Choix ? Hasard ? La vie nécessite-elle une dissymétrie déjà présente, où peut-elle elle-même créer cette dissymétrie à partir d'un mélange parfaitement racémique ? Ces théories, respectivement abiotique et biotique, ont été élaborées par Bonner (Bonner 1995).

Théorie biotique

Selon la théorie biotique, puisque la formation de molécules chirales ne peut être un processus significatif sous les conditions géologiques, l'origine de l'asymétrie trouve ses fondements aux origines de la vie. Cela implique que la vie était initialement basée sur des molécules achirales et/ou sur des mélanges racémiques de molécules chirales, et l'utilisation d'un énantiomère spécifique a fait suite à l'évolution de la vie (Bada *et al.* 1987). Puisque dans la théorie actuellement en vogue du monde ARN pour l'apparition et l'évolution de la vie, les ARN ont précédé les protéines, la sélection des L-acides aminés a pu être une conséquence logique de la chiralité de l'ARN (Bailey 1998), par interférences stériques (Bailey 1997) des réactions entre ces deux entités lorsque l'ARN est contraint

sur une surface, et non libre en solution (Ferris *et al.* 1996). Ainsi, de même que les D-riboses sélectionnent des L-AA par interférences stériques (Hegstrom *et al.* 1990), des L-riboses auraient sélectionné des D-AA. Fischer propose en 1894 que les réactions des substances chirales sont gouvernées par un principe clé-serrure, le produit naturellement sélectionné sera celui résultant de la meilleure interaction stéréochimique. Considérant les propos ci-dessus, seuls les acides nucléiques ont eu besoin de la capacité de faire émerger une homochiralité à partir d'un mélange racémique.

Dès 1974, Miller (Miller *et al.* 1974) a révélé que des assemblages courts isotactiques, ou homochiraux, peuvent se former aléatoirement par oligomérisation stochastique à partir d'un mélange racémique (n = 10 nucléotides) (Goldanskii *et al.* 1986), conduisant à un nombre égal de polymères basés sur des formes D et des polymères basés sur des formes L. Ces assemblages courts peuvent se lier entre eux ou grandir de manière homochirale grâce aux phénomènes d'inhibition croisée (les équations cinétiques montrent que la croissance de systèmes mutuellement antagonistes au niveau de leur énantiomérie génère de l'instabilité) et/ou d'oligomérisation dirigée à partir d'une matrice (homochiralité imposée pour la formation des structures secondaires (Brack *et al.* 1980; Brack *et al.* 1981)).

Des séquences homochirales aléatoires ont ainsi pu émerger d'un mélange racémique. Lorsque la complexité constitutionnelle potentielle dépasse le nombre de séquences réellement créées, les librairies L et D ne deviennent plus équivalentes d'un point de vue évolutif, et si une séquence favorable apparaît sous des pressions de sélections précises, cette forme D ou L prendra le dessus sur son inverse optique.

La capacité de briser la symétrie moléculaire semble donc pouvoir être une propriété intrinsèque des molécules auto-organisées, tels que les systèmes oligonucléotidiques, à travers leur chimie. Les acides nucléiques homochiraux seraient alors capables de se détacher d'un chaos énantiomérique initial. Un tel processus serait en accord avec la théorie biotique, selon laquelle l'homochiralité est un phénomène biotique conduit par l'oligomérisation elle-même des biomolécules complexes. La synthèse asymétrique spontanée serait donc une propriété naturelle de la vie. Cependant, la forme chirale pourrait être choisie accidentellement (Figure I.1-6).

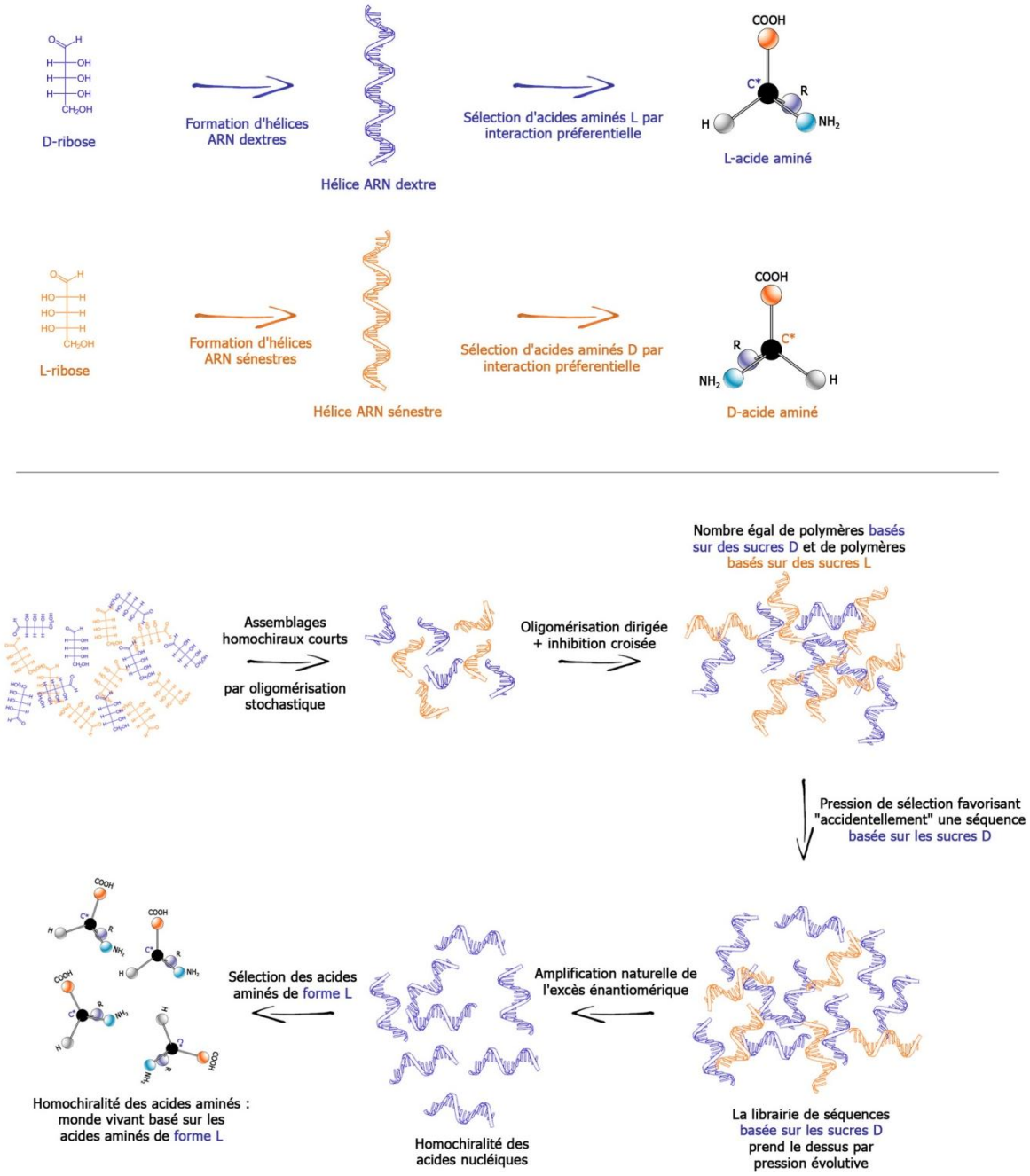


Figure I.1-6 : la théorie biotique de l'homochiralité du vivant.

Cependant, cette théorie est peu admise, et plusieurs phénomènes sont en sa défaveur (Bolli *et al.* 1997). De nombreux auteurs considèrent que la vie ne peut être initiée à partir d'un mélange totalement racémique, et qu'elle a du être en présence d'un excès déjà présent. Une solution partielle à ce problème serait donc l'existence d'un excès énantiomérique sur Terre avant l'apparition de la vie, créé sur la Terre-même ou importée d'ailleurs. Tous les scénarii abiotiques considèrent l'apparition d'un excès énantiomérique, voire d'une homochiralité, accidentelle ou déterministe, antérieure ou conjointe à l'apparition de la vie.

Théories abiotiques

Contrairement à la théorie biotique, la théorie abiotique affirme que la tendance à l'homochiralité est inhérente à l'évolution chimique, et que la vie n'a fait qu'utiliser et/ou amplifier une asymétrie énantiomérique déjà présente au temps de son apparition. Cette brisure initiale de symétrie peut être la conséquence de mécanismes déterministes ou aléatoires. Les mécanismes déterministes impliquent un agent extérieur, qui peut lui-même être subdivisé en phénomène universel ou phénomène local. L'apparition d'un excès énantiomérique peut être due à une synthèse ou à une destruction sélective d'un énantiomère par rapport à son inverse optique. Ces phénomènes hypothétiques englobent une violation de parité au niveau moléculaire dans l'interaction faible (Bonner 2000), les photoréactions asymétriques (Buchardt 1974; Rau 1983) sur Terre ou dans l'espace (avec un transfert postérieur sur Terre), la chimie radiative (Zagorski 2003), l'influence des impacts (Managadze *et al.* 2009), la chiralité de l'orbite terrestre (He *et al.* 2008), les adsorptions asymétriques sur des surfaces minérales chirales, telles que le quartz ou les argiles ou encore les fluctuations aléatoires (Burmeister 1998) (Figure I.1-7).

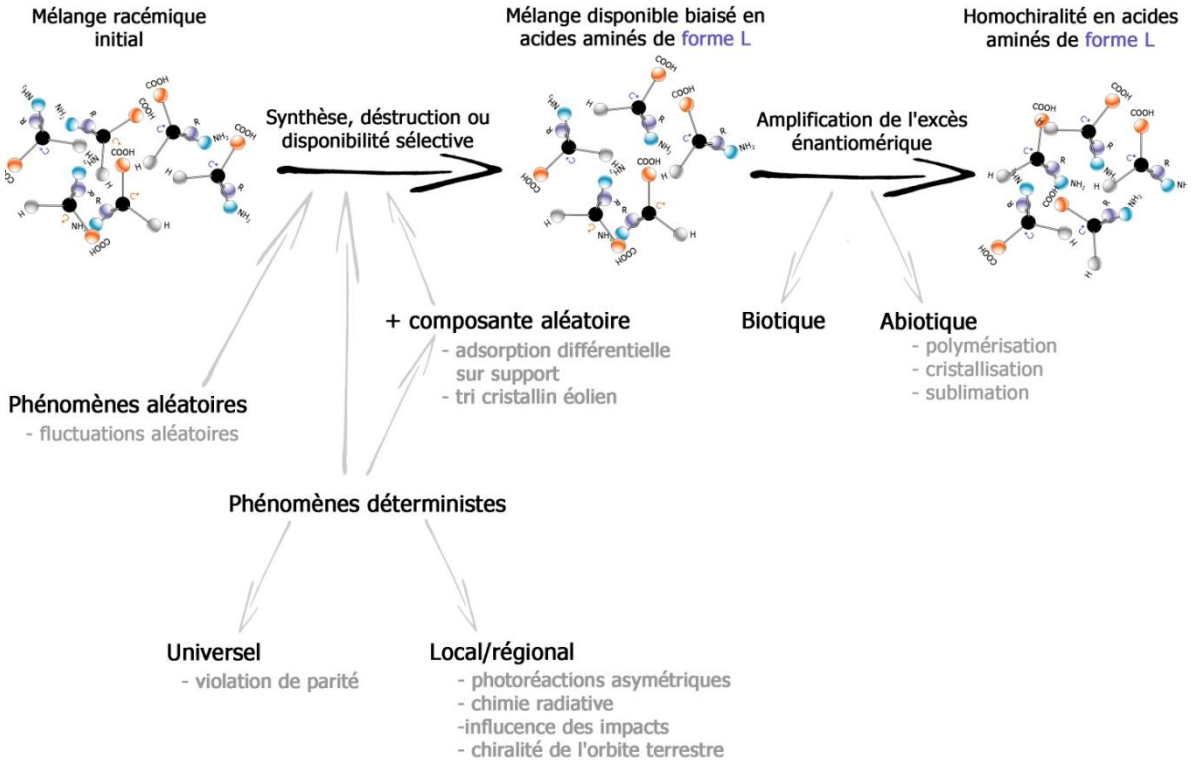


Figure I.1-7 : la théorie abiotique de l'homochiralité du vivant.

L'apparition d'un excès énantiomérique

La violation de parité de la force nucléaire faible

Parmi les phénomènes déterministes universels, citons donc l'influence de la force nucléaire faible, l'une des quatre forces fondamentales. Dès 1957, Lee (Lee *et al.* 1956) a énoncé une violation de parité dans cette force, et cette propriété a été reliée à la cause potentielle de l'homochiralité biologique par Ulbricht et Vester (Ulbricht *et al.* 1962). En effet, les électrons et antineutrino émis lors de la désintégration bêta ont un excès énantiomérique de forme respectivement gauche et droite. Ces différences spéculaires pourraient avoir un effet indirect sur les molécules chirales via ces électrons qui, lorsqu'ils interagiront avec la matière, conduiront à la formation de photons polarisés circulairement qui eux-mêmes pourraient initier une réaction de synthèse énantiosélective (Hegstrom 1982). Depuis bientôt 50 ans que cette théorie existe, ces considérations théoriques n'ont pas été vérifiées en pratique, les expériences de cristallisation sous irradiation bêta n'ayant pas été concluantes (Mahurin *et al.* 2001). Si tel était le cas, sa force agirait à une magnitude telle que l'excès énantiomérique créé ne dépasserait pas un sur 10^{17} ou 10^{18} (Hegstrom 1987), avec une différence énergétique entre les énantiomères telle qu'elle serait improbable pour expliquer les origines de la chiralité biologique. Etant donné que cette théorie atteste d'un mécanisme universel, une même forme chirale serait retrouvée pour les mêmes molécules à travers l'univers entier.

La majorité des autres hypothèses dans la théorie abiotique considèrent des phénomènes déterministes ou pseudo-déterministes à une échelle beaucoup plus régionale. C'est le cas des photoréactions asymétriques, réactions de destruction ou formation préférentielle d'une forme spéculaire par rapport à l'autre, dans un environnement terrestre ou dans le milieu interstellaire.

Les photoréactions asymétriques

Oparin (Oparin 1924) et Miller (Miller 1953) ont été les premiers à avancer l'idée d'une synthèse abiotique sous influence des rayonnements solaires de l'atmosphère terrestre, suivis par Terenin en 1959 qui parle d'un rôle possible d'une photocatalyse hétérogène dans l'abiogenèse sur la Terre primitive. Les photoréactions asymétriques sont aujourd'hui principalement documentées sous la forme des rayonnements ultra-violets polarisés circulairement (CPL-UV). Dès 1970, les bases de cette théorie ont été énoncées par Harada (Harada *et al.* 1970). En 2002, Jorissen (Jorissen *et al.* 2002) établit la relation entre la différence du coefficient d'absorption d'une lumière polarisée circulairement + ou – par un mélange racémique et un excès énantiomérique. Les molécules du mélange racémiques peuvent alors être plus efficacement photosynthétisées ou photolysées selon leur forme énantiomérique. Ces CPL-UV peuvent être créés sur Terre par la diffusion des radiations solaires par les aérosols et les molécules de l'atmosphère, en faible quantité (<0,01 %) (Kemp *et al.* 1987), par interaction de la lumière solaire avec le champ magnétique terrestre, par effet Faraday (Mortberg 1971) ou encore par la polarisation circulaire intrinsèque de la lumière solaire (un photon sur 10^6) (Kemp *et al.* 1987). Ces CPL solaires semblent cependant trop faibles pour être efficaces. Cela d'autant plus que les nuages denses de poussières présents aux temps d'apparition de la vie

empêchaient les rayons d'atteindre la surface de la Terre. De plus, ces rayonnements ne permettraient pas d'expliquer la présence d'un excès énantiomérique d'acides aminés retrouvés sur les météorites.

Une influence à une échelle plus régionale signifierait la présence de ces CPL-UV dans l'espace. De telles observations ont pu être effectuées autour d'étoiles à neutrons (Bonner *et al.* 1987), ou de nuages moléculaires dans des zones de formation d'étoiles (Bailey *et al.* 1998).

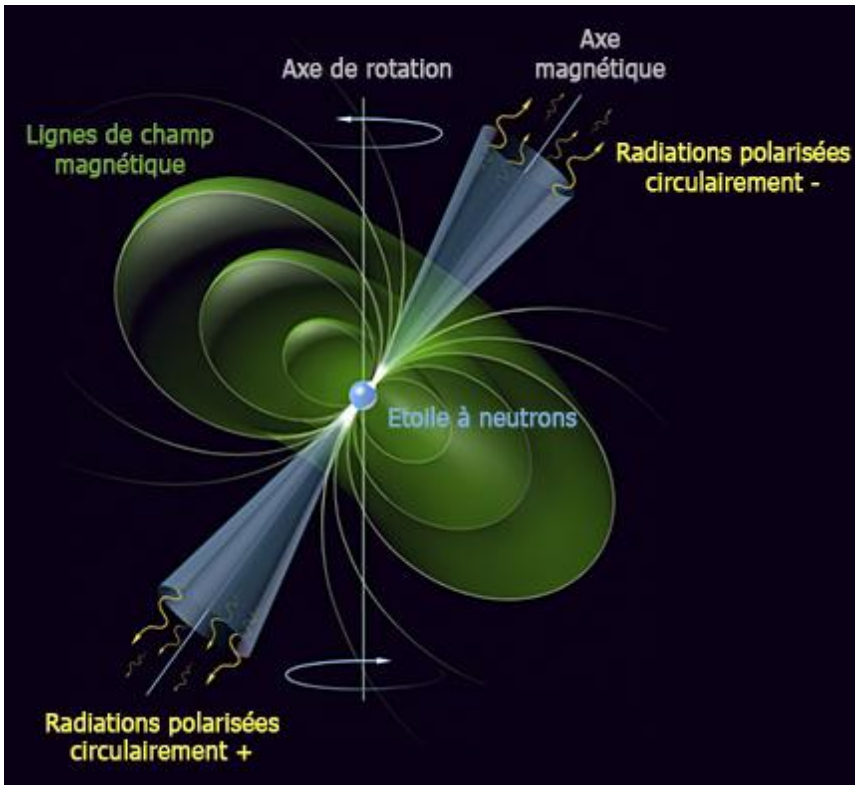


Figure I.1-8 : le rayonnement (UV) polarisé circulairement dans des sens opposés aux pôles opposés d'une étoile à neutrons.

Les étoiles à neutrons, qui sont le résultat de l'effondrement d'une étoile massive sur elle-même en fin de vie, peuvent former des radiations polarisées circulairement de sens opposé aux pôles inverses de l'étoile (Bonner 1991) ou a des fréquences différentes (Gogoberidze *et al.* 2005) (Figure I.1-8). Selon que le pole magnétique soit dirigé ou non vers le nuage interstellaire, une forme ou l'autre de molécules organiques chirales serait préférentiellement photolysée (Bonner *et al.* 1987) pouvant atteindre un excès énantiomérique allant jusqu'à 10%. Lorsque ce nuage interstellaire se condensera pour former un système solaire, ou lorsqu'un système traverse ce nuage, les molécules possédant un excès énantiomérique pourront alors être apportées sur une planète, en l'occurrence, la Terre, par des impacts cométaires, météoritiques et/ou micrométéoritiques, créant de ce fait une même forme d'excès chiral dans tout le système planétaire. Cependant, ces molécules seraient également exposées aux radiations ionisantes à haute énergie de l'étoile en question, conduisant à une radioracémisation, voire à une destruction totale de ces molécules (Keszthelyi 2001).

Ce type de rayonnement polarisé serait détecté dans certaines régions de formation d'étoiles. Cette polarisation pourrait être le résultat de la diffusion de Mie des radiations stellaires non-polarisées sur des alignements de grains de poussières non sphériques, dans des zones denses de formation d'étoiles. Cette polarisation existe à des longueurs d'onde plus courte (infrarouge), tels les 17% de polarisation dans le nuage moléculaire d'Orion OMC-1 détectés par Bailey (Bailey *et al.* 1998). Ces régions sont connues pour contenir nombre de molécules organiques (Ohishi 1997), et ressemblent fortement au nuage moléculaire dans lequel notre système solaire a été créé. De même que l'observation de Keszthelyi pour la racémisation ultérieure ou la destruction de ces molécules ainsi créées, ces CPL-UV ou IR doivent être les dernières radiations rencontrées par les molécules organiques, et cela même si liées à un matériau solide, les acides aminés se révèlent plus résistants (Takano *et al.* 2004).

Des expériences ont été menées au sol pour tenter d'affirmer l'hypothèse de réactions photolytiques énantiosélectifs sous CPL-UV. Des destructions sous CPL-UV ont été réalisées sur des solutions racémiques de molécules organiques, telles que des acides aminés, aboutissant à un excès énantiomérique allant jusqu'à 20% des molécules ayant résisté à ces rayonnements (Kuhn *et al.* 1930; Kagan *et al.* 1974; Flores *et al.* 1977; Bonner *et al.* 2000; Meierhenrich *et al.* 2005). Une nouvelle donnée a été apportée par Nuevo et al. (Nuevo *et al.* 2006), qui parle d'une synthèse préférentielle plutôt que d'une destruction sélective. Cette étude a été étendue par Takano *et al.* (Takano *et al.* 2007), qui ont irradié l'équivalent de la composition du milieu interstellaire avec des CPL-UV (Figure I.1-9).

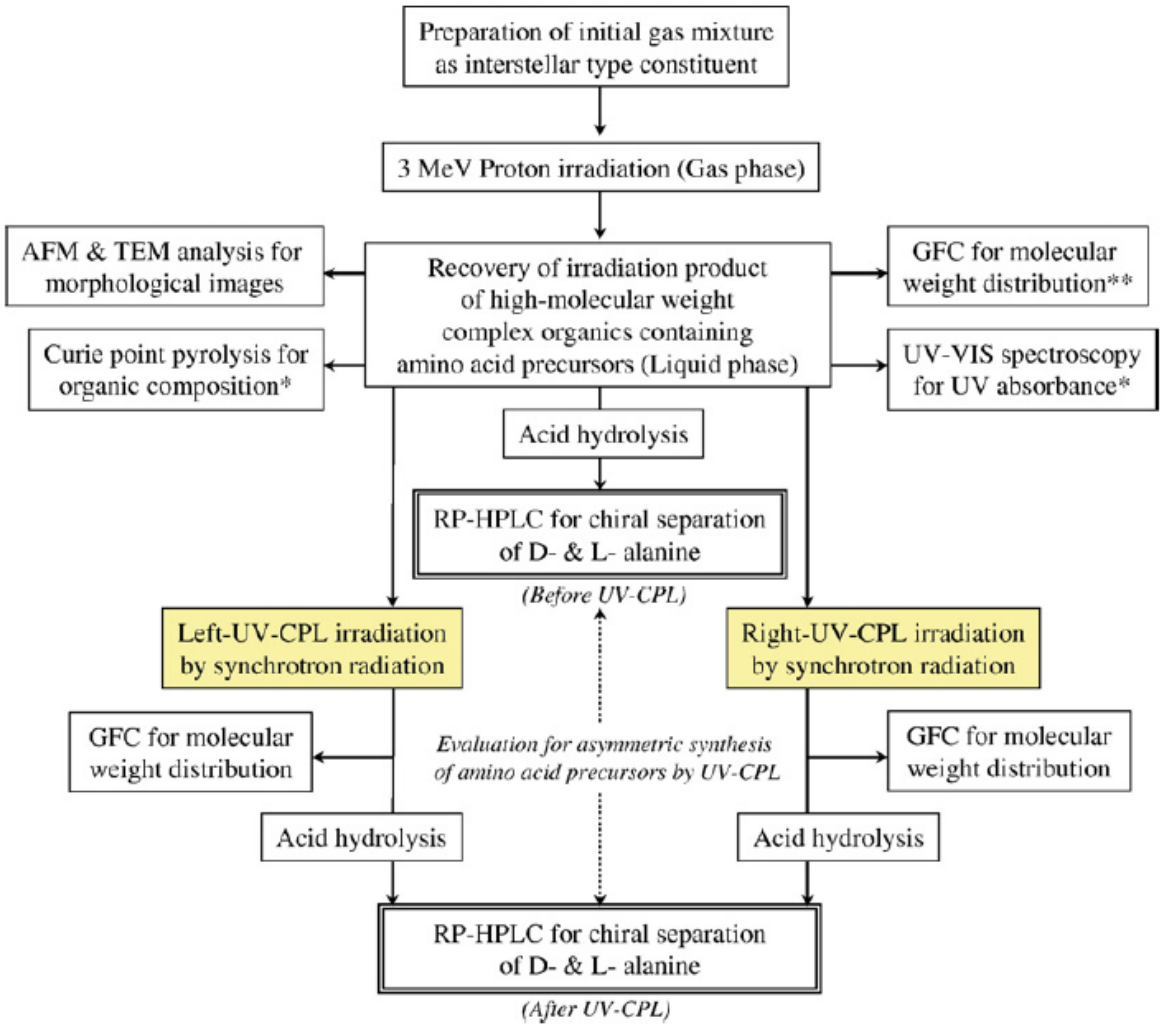


Figure I.1-9 : Procédure expérimentale de la synthèse asymétrique de précurseurs d'acides aminés à partir de molécules organiques complexes de type interstellaires (Takano *et al.* 2007).

Ils ont détecté entre autres un précurseur intéressant d'acide aminé, des acides alcanoïques α-méthyl-α-aminés. Ces molécules sont non seulement des précurseurs des acides aminés, mais elles sont aussi plus résistantes à la racémisation que ces derniers. Elles permettent en outre d'amplifier un excès énantiomérique par la tendance qu'ont leurs polymères à former des structures secondaires chirales. Une hydrolyse acide permet alors à ces molécules de générer des acides aminés. L'irradiation ultérieure de ces précurseurs par des D et L CPL-UV ont permis de former préférentiellement des D et L-alanine, respectivement, par destruction sélective après formation par ces mêmes rayonnements.

Ces expériences attestent que les CPL-UV ont un rôle essentiel dans la formation et la destruction asymétrique de molécules organiques chirales, sans toutefois prouver que ce phénomène est celui qui est responsable de l'homochiralité du vivant. Cependant, et d'après Nahon (Nahon *et al.*

2007), aucune autre expérience liée à une théorie concurrente n'a pu atteindre de tels excès énantiomériques qu'avec les CPL-UV.

Cette hypothèse amène à la conclusion que selon la polarisation des radiations, les régions de l'univers peuvent exister avec des molécules d'un excès énantiomérique opposé. Si l'on considère les régions étendues d'où proviennent les CPL-UV, un système planétaire entier montrera une même forme chirale de ses biomolécules. Les acides aminés retrouvés sur les météorites devraient alors être synthétisés à partir de molécules organiques extraterrestres, sous influence des CPL-UV, et donc posséder un excès énantiomérique dans le même sens que celui retrouvé sur Terre dans les systèmes vivants. Or, les excès énantiomériques produits par les expériences au sol sous rayonnements CPL-UV se montrent similaires à ceux retrouvés sur les acides aminés météoritiques (Cronin *et al.* 1997; Nuevo *et al.* 2008), ce qui renforce cette théorie.

La chimie radiative

La chimie radiative implique fortement les radiations ionisantes dans les origines de l'homochiralité du vivant. Bien que proposé depuis une cinquantaine d'années (Hasselstron *et al.* 1956), cette théorie n'a jamais été reprise, au grand dam de Zagorski (Zagorski 2003) qui tente vainement de l'imposer. Pour lui, les sources de radiation intensives aux temps de formation des molécules prébiotiques étant intensément supérieures à ce qu'elles sont aujourd'hui (Garzon *et al.* 2001), elles seraient responsables de la formation de molécules organiques et de leur excès énantiomérique par sélection positive. Il met en avant le fait que mieux que l'apport extraterrestre de molécules organiques, qui implique une résistance (pour lui impensable) des molécules aux radiations cosmiques, ces réactions peuvent avoir lieu à température ambiante et indépendamment de l'énergie solaire, donc possiblement en phase aqueuse directement au fond des océans. Peu d'expériences, et aucune fiable, n'a pu mettre cette influence de la chimie des radiations en évidence pour un enrichissement quelconque d'énantiomères de biopolymères. La théorie entière repose sur des modèles, et un pessimisme injustifié de l'auteur envers les théories concurrentes font ressembler ce papier plus à une apologie des radiations qu'à une étude scientifique sur la question des origines.

L'influence des impacts

Il en est de même pour l'influence des impacts. Ce phénomène déterministe a été avancé pour expliquer la création d'un excès énantiomérique initial. Il stipule que l'énergie des impacts météoritiques sur Terre ou des impacts de particules dans le milieu interstellaire est en mesure de générer un plasma, créant ainsi un champ magnétique (Stamper 1991). Ce champ magnétique, combiné avec un champ électrique qui ne lui est pas perpendiculaire, sous un apport énergétique puissant apporté par l'impact lui-même, pourrait être en mesure de créer des molécules organiques (Managadze *et al.* 2009) ainsi qu'une asymétrie dans la synthèse de ces isomères (Managadze 2007).

La chiralité de l'orbite terrestre

La chiralité de l'orbite terrestre a été proposée par He et Qi (He *et al.* 2008) comme étant la force physique potentiellement responsable de l'homochiralité organique. Elle considère une asymétrie globale entre le système solaire, le sens droit de révolution de notre planète autour du soleil et sur elle-même. Ces forces rotationnelles droite pourraient avoir des effets stabilisateurs sur les hélices droites présentes dans la nature, au niveau des hélices macroscopiques comme moléculaires. Les hélices droites des acides nucléiques (basées sur les sucres D) seraient alors sélectionnées préférentiellement grâce à cette force. Aucune étude sérieuse n'a été menée pour confirmer ou infirmer ces stabilisations, et aucun fait ne le montre. De plus, les auteurs ont une légère tendance à l'extrapolation de cet effet à certaines grandes énigmes biologiques. Cet effet miracle, même s'il peut être intéressant de le citer, n'est donc qu'à prendre avec grande précaution parmi d'autres hypothèses.

Les adsorptions asymétriques sur des surfaces minérales chirales

Dès 1987, de nombreux auteurs, dont Julg (Julg 1987) ont observé une adsorption ou formation préférentielle d'un énantiomère par rapport à l'autre sur des surfaces minérales cristallines. Ces résultats ont été corroborés par ceux de Klabunovskii (Klabunovskii 2001) et par Bonner (Bonner *et al.* 1974) sur la stéréosélectivité de cristaux de quartz sur la D-alanine aboutissant à un excès énantiomérique allant jusqu'à 20%. Des études concernant d'autres molécules et d'autres cristaux (dont la silice, la calcite) ont pu confirmer ces résultats (Hazen *et al.* 2001; Sato *et al.* 2003) (Figure I.1-10).

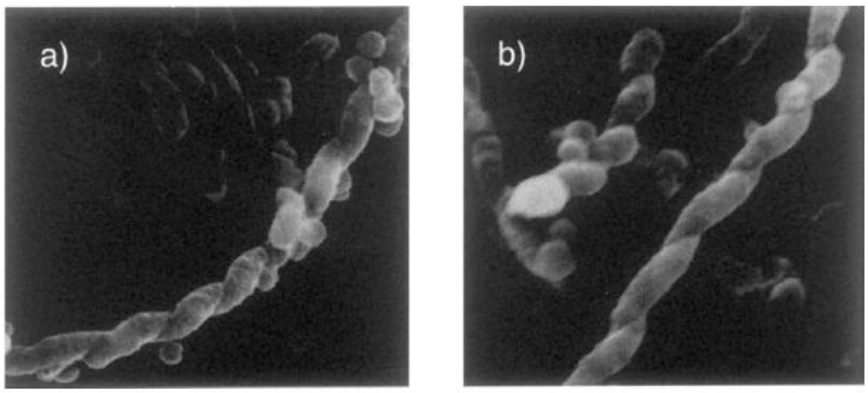


Figure I.1-10 : image en microscopie électronique à balayage d'une hélice de silice sénestre (a) et dextre (b).

Cette différence d'adsorption peut être expliquée par des différences d'énergie de liaison/d'affinité entre les énantiomères respectifs et les cristaux énantiomorphes. Ces adsorptions peuvent avoir un rôle à la fois ségrégatif envers un énantiomère, permettant une synthèse homochirale de polymères, mais également protecteur contre les agressions extérieures, favorisant ainsi un excès stochastique d'une forme sur l'autre. Cet effet peut être inverse, c'est-à-dire un effet

chélatant, rendant indisponible une forme par rapport à l'autre pour la synthèse de polymères. Cette solution ne fait cependant que repousser l'énigme d'une brisure de symétrie à des considérations minérales. Il s'agirait d'un mécanisme déterministe pour le fait de l'adsorption préférentielle d'un énantiomère par rapport à l'autre, combiné à un mécanisme aléatoire pour le fait qu'une face cristalline soit plus présente que l'autre (ou déterminée, mais d'une façon inconnue aujourd'hui). Une information intéressante à coupler à cette théorie est l'hypothèse de Carins-Smith (Cairns-Smith 1982), stipulant un autre rôle pour les argiles minérales : elles pourraient avoir été porteuses de l'information génétique, avant la domination des polynucléotides pour ce rôle. Ces informations auraient pu avoir été transférées ultérieurement aux ARN, acides aminés et autres molécules, grâce au pouvoir catalyseur de polymérisation des minéraux. Cette théorie n'est cependant que peu acceptée dans la communauté, et largement sous-étudiée pour pouvoir y porter crédit.

Les fluctuations aléatoires

Un mécanisme aléatoire suppose que le processus de sélection d'un énantiomère sur l'autre n'est pas induit par un catalyseur externe. Les fluctuations aléatoires en font donc partie intégrante. Selon Burmeister (Burmeister 1998), l'homochiralité était une condition nécessaire de la vie et le hasard a décidé quelle forme choisir, à partir d'une égalité de chances. Peu d'indices de synthèse asymétriques dans des milieux achiraux ont été énoncés, et peuvent de toute évidence avoir différentes explications. Si cette hypothèse est confirmée, la forme homochirale devrait être distribuée aléatoirement à chaque endroit où est apparue une forme de vie, ce qui implique que toute vie ait évolué à partir d'une même molécule initiale, ou que la compétition ultérieure ait éliminé les formes de vie basées sur l'autre énantiomère. Selon Frank (Frank 1953) cependant, « si la production de molécules de la vie est un processus rare, comparé au taux de multiplication de ces molécules, la Terre entière devrait est peuplée d'une descendance de cette première molécule avant qu'une autre ait le temps d'apparaître ».

Tri (Beauchamp et al.)

Tous ces excès énantiomériques potentiellement créés le sont à une échelle très faible. Un autre phénomène a été avancé pour créer un excès énantiomérique plus important, à une échelle locale. Il s'agit d'un processus simple impliquant une cristallisation en conglomérats, des vents et des aspérités du sol. Le principe est simple ; une solution racémique va être évaporée sous l'action du soleil, formant ainsi des conglomérats cristallins de la solution, c'est-à-dire des cristaux énantiopurs. Ces cristaux seront ensuite dispersés par les vents, et se déposeront aux aléas des aspérités du sol. Des pluies subséquentes redissolveront les cristaux, et les molécules se retrouveront alors en solution. Nous nous retrouvons alors avec des zones locales énantioenrichies, voire énantiopures, à partir desquelles la vie pourra émerger utilisant la forme privilégiée à l'endroit adéquate où elle se forme. Cependant, cette hypothèse reste soumise au hasard, puisqu'un facteur supplémentaire entre en jeu : pourquoi une zone contenant une forme sera privilégiée par rapport à la zone adjacente contenant une majorité de la forme spéculaire ? Cependant, et malgré cette interrogation qui repousse

la question de la brisure de symétrie un peu plus loin, cette théorie a le mérite de proposer un enrichissement énantiomérique très important, ne nécessitant pas forcément une amplification ultérieure de l'enrichissement, par des processus biotiques ou abiotiques. Cette idée est illustrée ci-dessous en figure I.1-11.

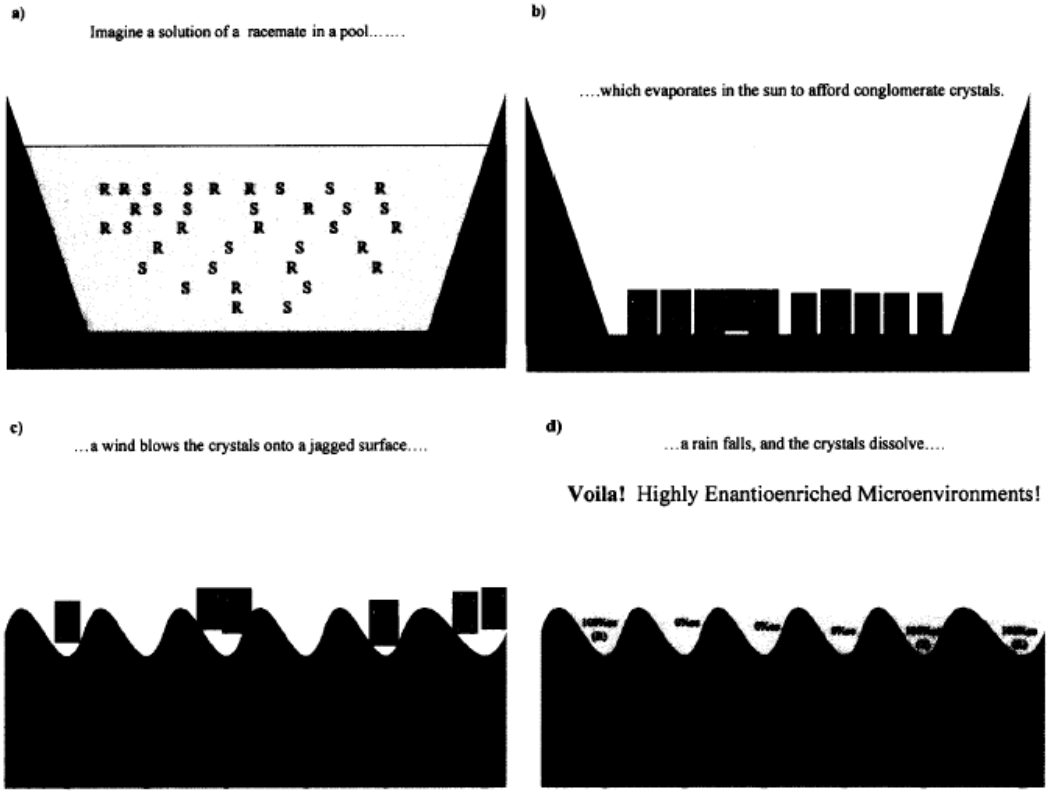


Figure I.1-11 : génération abiotique de microenvironnements hautement enrichis en un énantiomère par tri stochastique de conglomérats cristallins. De (Beauchamp *et al.*).

D'autres mécanismes ont pu être vaguement décrits, basés sur des décharges électriques, des plasmas froids ionosphériques, d'ondes de choc dans l'atmosphère ou encore de sublimation de roches lors d'impacts météoritiques (Barak *et al.* 1975; Mukhin *et al.* 1989; Mackie *et al.* 1990; Blank *et al.* 2001), mais ne peuvent être prises en considération étant donné le peu d'informations qui existent les concernant.

L'amplification de l'excès énantiomérique

Exceptée la théorie du tri cristallin par les vents, les autres théories supposent que le mélange racémique dévie vers un excès énantiomérique faible. Cet excès, si faible soit-il, permettrait à la vie de choisir préférentiellement une forme par rapport à sa forme spéculaire. D'autres auteurs vont estimer que la vie seule n'est pas capable de créer une homochiralité à partir d'un mélange peu biaisé, et qu'un processus totalement abiotique d'énantiomérisation totale est nécessaire avant l'apparition des premières formes de vie. Des expériences ont montré qu'il était possible par polymérisation, cristallisation ou sublimation, d'atteindre des mélanges presque énantiomériquement purs par

amplification d'un excès énantiomérique. Soai (Soai *et al.* 2008) a créé un excès énantiomérique supérieur à 99,5% à partir d'un excès initial de 0,00005% par simple autocatalyse asymétrique. L'homochiralité ainsi créée pourrait réduire les barrières entropiques à la formation de structures organisées, favorisant ainsi la formation de ces structures spécifiques dans un mélange énantiomériquement pur (Julian *et al.* 2005). Ces mélanges seraient alors un pré-requis à l'apparition de la vie.

De nombreuses hypothèses existent aujourd'hui quant à l'apparition d'un excès énantiomérique, mais aucune d'entre elle n'est complètement satisfaisante. Il est impossible de trouver aujourd'hui une explication authentique à la déviance initiale du racémisme, l'influence chirale qui l'a créée pouvant être de n'importe quel ordre, y compris biotique. Des études *in situ* de la chiralité pourraient y apporter des explications, en fonction de la forme de l'éventuelle chiralité qui y serait trouvée. Influence locale, systémique, universelle ? Les seuls indices que nous pouvons avoir aujourd'hui sont sur la chiralité des acides aminés extraterrestres où que l'on puisse les trouver. C'est-à-dire principalement sur la Lune, les météorites, les comètes ou d'autres environnements tels que Mars.

I.1.2. La Lune

Il est intéressant d'étudier les acides aminés sur la Lune pour évaluer l'hypothèse de l'apport par des sources extraterrestres des composés organiques nécessaires à l'émergence de la vie sur Terre (Chyba *et al.* 1992). Cet astre a l'avantage de n'avoir aucune source de contamination terrestre, contrairement aux météorites qui ont pu être apportées sur Terre (Harada K 1971). Pourtant, il semblerait que les acides aminés détectés sur les échantillons lunaires de la mission Apollo XVII proviendraient d'une contamination terrestre. Des estimations basées sur le taux de racémisation ont cependant révélé un niveau faible, mais existant, d'acides aminés libres ne provenant pas d'une contamination terrestre. Le niveau est cependant tellement proche du bruit de fond que de nombreuses controverses existent sur leur présence réelle. Des études ont trouvé 15 ppb de précurseurs endémique à la Lune (Fox *et al.* 1972), extraits après hydrolyse acide des sols. Les origines potentielles sont multiples, et bien que certains précurseurs d'acides aminés semblent endogènes, le faible taux laisse penser qu'ils peuvent être la conséquence de dépôts météoritiques, micrométéoriques ou de queue cométaire. La distribution de ces acides aminés dans le sol lunaire diffère significativement de celle des météorites de Murchison et autres chondrites carbonées. Brinton et Bada (Brinton *et al.* 1996) ont estimé à 0,8 % la limite supérieure de chance de survie des acides aminés à un apport météoritique. Cependant, l'impact lunaire est considéré exempt de toute protection atmosphérique, contrairement aux impacts planétaires, et représente alors le pire cas pour la survie des molécules organiques à un impact. Les sources d'imprécisions sur les résultats de calculs de Brinton et Bada sont multiples : contamination établie sur ces échantillons et manque d'études adéquates sur la spécificité et la sensibilité de la séparation énantiomérique. De fait ces résultats

n'apportent que trop peu d'informations pour confirmer ou infirmer certaines hypothèses sur l'apparition initiale d'un excès énantiomérique dans nos molécules organiques d'intérêt.

I.1.3. Les controverses de la météorite de Murchison

Cela fait maintenant une trentaine d'années que les météorites, et notamment les chondrites carbonées, sont passées au crible sur leurs contenus en acides aminés et précurseurs, ainsi que sur la stéréochimie de ces molécules.

La météorite de Murchison (Figure I.1-12), découverte en Australie en 1969, est source de nombreux débats depuis ses débuts. Bien qu'il soit maintenant admis que la chimie intrinsèque de cette météorite a été capable de produire plus de 100 acides aminés (Cronin *et al.* 1983; Meierhenrich *et al.* 2004), et plus de 500 composés organiques en général (Sephton *et al.* 2002) avec une prédominance d'acide aminé AIB, aucun consensus n'a pu être trouvé jusqu'alors concernant un potentiel excès énantiomérique sur cette chondrite. Les analyses effectuées sur les météorites de Murray, Orgueil, et d'autres météorites Antarctique (Cronin *et al.* 1971; Shimoyama *et al.* 1985; Cronin 1989) n'ont pas non plus permis de statuer ce problème.

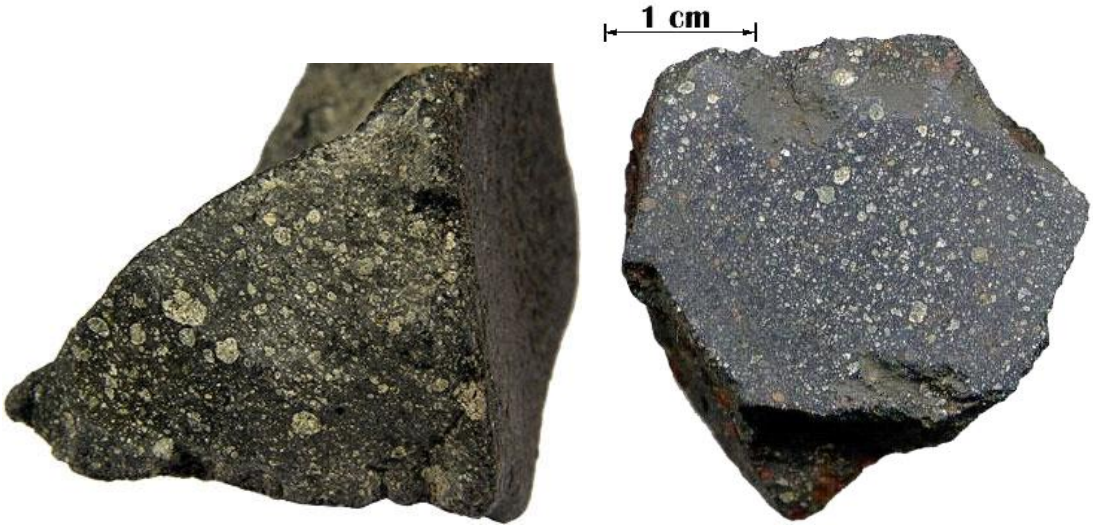


Figure I.1-12 : gros plan sur les chondrules de la météorite de Murchison.

Les premières études ont été menées à l'aide des méthodes optiques, et les résultats se sont révélés négatifs (Mueller 1953; Kaplan *et al.* 1963; Briggs *et al.* 1964). Des analyses polarimétriques conduites des années plus tard se sont révélées cette fois-ci positives (Nagy 1965; Nagy 1966). Ces résultats ont été fortement débattus, et les premières études par chromatographie en phase gazeuse ont admis l'existence d'un mélange racémique de tous les acides aminés chiraux détectés (Kvenvold.K *et al.* 1970). Des études ultérieures ont apporté des résultats antagonistes, allant d'un mélange parfaitement racémique (Pollock *et al.* 1975; Engel *et al.* 1982) à des excès énantiomériques mesurés pouvant atteindre 33% pour la L-Ala (Engel *et al.* 1997), en passant par des valeurs

intermédiaires de 2,8 à 9,1% (Cronin *et al.* 1999). Il ressort toutefois de ces études que les α-methyl-AA semblent présenter une plus forte déviance énantiomérique (Pizzarello *et al.* 2003).

Des études isotopiques et chimiques, notamment la présence d'un excès énantiomérique de l'α-methyl-L-isovaline, acide aminé non présent dans les systèmes vivants (Glavin *et al.* 2009), ont permis d'éliminer les critiques stipulant une contamination terrestre de la météorite de Murchison pour expliquer l'excès énantiomérique. Il a donc été montré que les artefacts de contamination terrestres sont minimes, et que la météorite n'a reçu que peu ou pas d'apports de sources exogènes postérieures à l'impact (Engel *et al.* 1982). Une autre contestation des résultats provient d'une co-élution possible entre les L-AA et d'autres composants de la météorite, induisant un faux-positif d'excès énantiomérique. Bien que cela ait pu expliquer les excès particulièrement forts observés, notamment les 33% pour la L-Ala, ces co-élutions ne peuvent être responsables de tous les excès énantiomériques observés.

Après 40 années de débats passionnés, il est maintenant possible de quantifier l'excès énantiomérique sur la chondrite carbonée de Murchison entre 0 et 15,2 %, selon les auteurs, selon les molécules et selon l'échantillon de roche analysé (Cronin *et al.* 1997; Pizzarello *et al.* 2000; Pizzarello *et al.* 2003). Ces découvertes seraient la première indication d'une activité optique extraterrestre, si l'on exclut l'alternative peu probable d'une racémisation avancée à partir de molécules homochirales elles-mêmes résiduelles d'une décomposition organique de systèmes vivants complexes.

Il est supposé que la météorite ait apporté des acides aminés α-méthylés comportant un excès énantiomérique relativement important (jusqu'à 15%). Ces acides aminés α-méthylés sont plus résistants à la racémisation que leurs équivalents α-non substitués. Bien que ces composés méthylés ne soient que peu présents dans la biosphère actuelle, ils ont pu transmettre leur excès énantiomérique à leurs dérivés non méthylés, créant ainsi des acides aminés dont les formes spéculaires étaient disponibles en proportions inégales.

Si l'on considère authentique cet excès de formes L des acides aminés, il reste en suspend la question de son origine. Cette hypothèse apporte néanmoins des indices quant à deux questions fondamentales. D'une part, des molécules organiques complexes prébiotiques ont pu être synthétisées dans un environnement extraterrestre (Engel *et al.* 2001). Même si l'hypothèse d'une formation endogène de molécules prébiotiques parallèle à l'ensemencement exogène ne peut être écartée (Pizzarello 2004), la nécessité d'une influence des derniers sur les premiers et d'une évolution complémentaire des deux entités par réactions croisées discrédite quelque peu cette théorie. D'autre part, le déséquilibre énantiomérique présent a pu être un effet inductif sur l'évolution moléculaire asymétrique sur la Terre primitive.

La découverte d'excès énantiomériques dans des échantillons extraterrestres accrédite la théorie abiotique de l'apparition de l'homochiralité, cet excès étant apporté de l'espace par les

météorites avant l'apparition des premières formes de vie. De plus, ces découvertes vont dans le sens d'un processus régional au système solaire, n'agissant pas à une échelle plus locale. Si les composés organiques détectés sur les chondrites carbonées telles que Murchison sont représentatifs du milieu organique présent sur la Terre primitive (Chyba *et al.* 1992), le léger excès énantiomérique pourrait, d'une façon ou d'une autre, avoir fourni un biais chiral suffisant pour créer à long terme une homochiralité du monde vivant (Pizzarello *et al.* 2000).

Comme il en a déjà été question dans le paragraphe précédent consacré aux CPL-UV, rappelons ici que des comparaisons ont été effectuées entre les excès énantiomériques des acides aminés produits par irradiation d'analogues de glaces interstellaires sous influence des CPL-UV et les excès énantiomériques des acides aminés trouvés dans les météorites. Des résultats analytiques similaires renforcent cette théorie des CPL-UV, qui créeraient un biais par destruction préférentielle d'une forme chirale par rapport à son inverse. Si l'excès initial peut avoir trouvé réponse, l'amplification de cet excès minime jusqu'à une homochiralité reste soumise à de nombreuses théories.

Cette théorie d'apport de matière organique de l'espace nous amène tout naturellement à la question de la survie de ces molécules et de la préservation de leur information énantiomérique au travers de leur course dans l'espace, et cela jusqu'à leur arrivée dans ce milieu favorable qu'était la Terre.

I.1.4. Stabilité du matériel (pré)biologique en conditions spatiales

La stabilité du matériel prébiologique est essentiellement à étudier lors de son voyage à travers l'espace. La question est : comment le matériel prébiologique peut-il résister à des échelles de temps géologiques à des phénomènes physico-chimiques tels que des températures principalement froides (4K) pouvant varier brusquement, des faibles pressions (10^{-14} Pa) voire du vide, de la microgravité, des radiations ionisantes et non-ionisantes (UV, radiations cosmiques (γ ou particules chargées), des vents solaires (atomes, ions et particules solaires), des rayons X, électrons, particules α, ions lourds cosmiques et des radiations intrinsèques de la radioactivité naturelle ?
L'absence d'eau et d'oxygène évite cependant les phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse des molécules.

Les études sur la résistance des molécules organiques à ces conditions extrême aide à une meilleure compréhension des limites des transferts intersidéraux et interplanétaires de cette matière prébiotique (Horneck 1999). Une large gamme d'activités européennes en orbite terrestre vise à mieux comprendre le comportement des microorganismes, spores bactériennes ou fongiques, virus ou biomolécules telles que les acides aminés, ADN et liposomes dans l'environnement critique spatial hors de la protection magnétique et atmosphérique terrestre. Les expériences BIOPAN ont étudié la

résistance d'acides aminés et peptides courts dans les conditions d'orbite terrestre (vide spatial, températures variant de -41 à +16°C, radiation UV intenses, rayonnement cosmique). Ces molécules étaient sous forme libres ou associés à des minéraux argileux (kaolinite ou montmorillonite) d'épaisseur mimant ainsi les 50µm de taille moyenne des micrométéorites (Maurette 1998). Il a alors été déterminé qu'une semaine de flux UV solaire, correspondant au flux calculé sur 10^6 années dans l'espace interstellaire (Barbier *et al.* 1998), n'endommageait pas les acides aminés et leur chiralité. Il a ainsi été démontré qu'il existait une grande résistance des acides aminés face à la dégradation et à la racémisation, et cela d'autant plus lorsqu'ils sont protégés par association avec des minéraux (Takano *et al.* 2004).

Des polypeptides ont également été exposés pour l'étude de la stabilité du pont peptidique. Les peptides semblent plus résistants que les acides aminés seuls. De surcroît, les dipeptides ne monomérisent pas, ce qui semble attester d'une bonne résistance du pont peptidique aux UV. La stabilité des bases nucléiques a également été étudiée dans ces mêmes conditions. Elles semblent plus résistantes que les acides aminés. Les PAH ayant le même niveau de dégradation que les bases nucléiques, et étant retrouvés sur les météorites, ces molécules sont alors potentiellement capables de survivre aux photoionisations/photodissociations dans le milieu interstellaire et interplanétaire (Pilling *et al.* 2008).

I.1.5. La racémisation

La racémisation est l'interconversion des énantiomères L et D d'un composé comportant un centre chiral. Dans le cas d'une interconversion au carbone a d'n acide aminé possédant deux centres chiraux, comme l'isoleucine, le terme d'épimérisation est utilisé (Figure I.1-13).

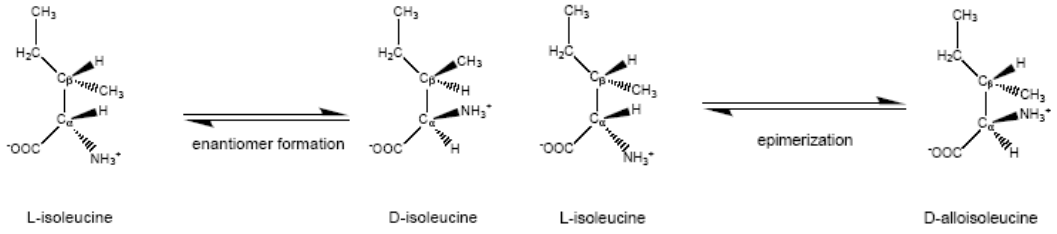


Figure I.1-13 : racémisation *vs.* épimérisation.

De nombreuses études existent sur la recherche des causes physiques et/ou chimiques des excès énantiomériques dans l'univers. Cette recherche est d'autant plus difficile qu'il existe un phénomène de racémisation, l'environnement hostile de l'espace peut détruire rapidement cet excès

tout juste créé, si ce n'est détruire la molécule elle-même, jouant alors contre la préservation de la chiralité. Les irradiations puissantes, les fortes températures et les agents chimiques sont capables de faire perdre aux molécules l'activité optique qu'elles avaient préalablement acquises.

Le mécanisme généralement accepté pour la racémisation des acides aminés en solution aqueuse implique un intermédiaire carbanion (Ebbers *et al.* 1997). Cela a été suggéré par Neuberger en 1948. Le mécanisme de réaction implique le retrait de l'hydrogène lié au carbone α par une base telle qu'un ion hydroxyde ou une molécule d'eau. Lors de cet enlèvement, les trois groupements fonctionnels restant se réarrangent, formant un intermédiaire carbanion plan chargé négativement. La dernière étape consiste en l'addition d'un ion hydrogène au carbanion, avec une probabilité 50% qu'un énantiomère D ou L soit formé (Basiuk 2001). La figure I.1-14 illustre le mécanisme.

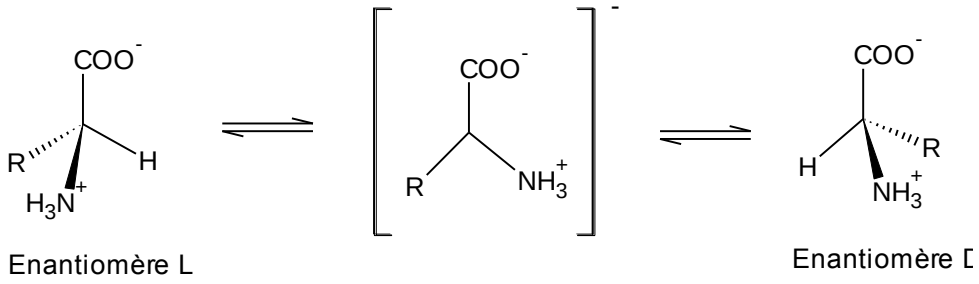


Figure I.1-14 : le mécanisme de racémisation d'un acide aminé en milieu aqueux.

Sous des conditions anhydres, les acides aminés racémisent probablement par substitution d'un proton du carbone central. Il est probable que le carbone asymétrique soit alors hybridé sp^3, le doublet d'électrons libres étant à une extrémité du tétraèdre. Le carbanion aurait alors une structure pyramidale en parapluie, et se retournerait de la même manière qu'un parapluie se retourne pris dans un vent fort. La paire d'électrons libres oscillerait alors d'un côté à l'autre, permettant la conversion entre les deux inverses optiques (Figure I.1-15).

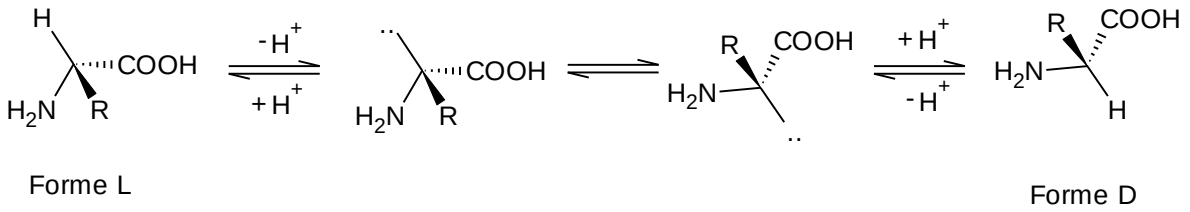


Figure I.1-15 : le mécanisme de racémisation en milieu anhydre.

Cependant, comme il a été montré avec les missions BIOPAN, la dégradation chimique des molécules est plus probable que leur racémisation, sous des conditions de flux UV et autres agressions de l'espace. Dose et al. (Dose *et al.* 1996) ont déterminé un taux de conversion de 0,01% des acides aminés exposés lors de la mission EUROPA/ERA. Peu de variables influencent une

conversion d'un composé énantiomériquement pur en un mélange racémique (Hare *et al.* 1966) ; seuls le ratio initial, la durée, la température et l'état (anhydre ou en solution) (Williams *et al.* 1977) ont un rôle primordial sur cette conversion d'un énantiomère à l'autre. Plus le ratio initial, c'est-à-dire plus l'enrichissement initial d'une forme par rapport à l'autre est grande, plus la signature énantiomérique finale sera différente de l'original. Pour des mélanges ayant un enrichissement initial plus faible, le ratio final sera beaucoup plus proche de l'excès initial. En solution, le taux de racémisation varie en fonction de la force ionique et du pH. Toutefois, il a été montré qu'il n'existait pas d'influence significative sur la racémisation de la force ionique et du pH dans une gamme de pH de 7-12 et de $0,01 < I < 0,5$ M (Wonnacott 1979). Cette gamme de pH est celle prédite par Zolensky (Zolensky *et al.* 1989) de la phase aqueuse d'un corps astéroïdal. La racémisation des composés sur les astéroïdes dépendrait alors principalement de la température et de la durée de la phase aqueuse. En solution, et en fonction de la température, une racémisation complète peut être obtenue très rapidement.

Stabilité de la molécule et de son message énantiomérique

Mais ces biomolécules chirales et leur éventuelle signature énantiomérique pourraient-elles subsister jusqu'à leur détection sur Terre ou sur tout autre corps suffisamment proche pouvant être étudié ? Et cela malgré toutes les conditions qu'elles devront traverser ? Si l'on prend la condition d'apparition la plus contraignante quant à ces résistances nécessaires, c'est-à-dire une formation extraterrestre des molécules puis un apport subséquent sur Terre. Nous parlons alors d'une synthèse des molécules organiques dans le milieu interstellaire. Que la formation soit en phase solide sur les grains, ou en phase gazeuse dans le milieu, les molécules sont inévitablement incorporées sur un corps parent, astéroïde ou comète, en solution. Cette phase est critique, étant donné que les molécules en solution sont beaucoup plus sujettes à la racémisation que celles restées dans un milieu anhydre (Schroeder 1974; Bada *et al.* 1994). Heureusement, les températures alors présentes sont relativement faibles (<300K) et les périodes d'expositions aux phases aqueuses sont relativement courtes (10^2 à 10^4 années) (Grimm *et al.* 1989; Zolensky *et al.* 1989; Lerner 1995).

La période de résidence ultérieure des molécules sur le corps parent a été calculée à environ $4.5.10^9$ années, à une température basse (155K) sous des conditions anhydres. La température élevée d'une éventuelle collision entre les météorites parents et quelques formations d'astéroïdes détruiraient tous les acides aminés contenus dans le corps parent. L'effet d'une collision destructrice n'est donc pas à prendre en compte pour la racémisation (Rodante 1992). La présence du corps parent dans une orbite proche de la Terre ne dépasserait pas 10^6 années, à des températures qui ne dépassent pas 270K. A cette température et en milieu sec, la racémisation est donc négligeable. L'atterrissage est le paramètre suivant à prendre en compte dans ce voyage. Il s'agit en fait d'un dépôt non-destructif du matériel organique. L'atmosphère, si tant est qu'elle existe, est traversée si rapidement (quelques dizaines de secondes) que la chaleur provoquée par le frottement de l'air n'a pas le temps de pénétrer à l'intérieur du corps. Sur Terre, des chondrites antarctiques non-fondues ont été retrouvées, indiquant des conditions de températures non drastiques à cette arrivée,

n'influençant donc que peu la destruction ou la racémisation du matériel organique considéré (Mileikowsky *et al.* 2000; Brack *et al.* 2001). A des pressions de choc importantes, certaines racémisations peuvent néanmoins être observées (Bertrand *et al.* 2009).

D'après ces modèles, il devient évident que le pourcentage de racémisation des acides aminés piégés dans des astéroïdes ou comètes est négligeable. Ainsi, s'il existait un enrichissement initial, il aurait pu, dans certaines conditions, être délivré sur les planètes destinataires, apportant ainsi l'excès initial nécessaire.

I.2. Où chercher la vie ?

Les extrêmophiles terrestres montrent que les frontières spatiales, temporelles et environnementales qui restreignent la survie et la viabilité de la vie microbienne sur Terre sont beaucoup plus vastes que nous pouvions le penser. La vie a plus d'imagination que les scientifiques. Des espèces barophiles, hyperthermophiles, cryophiles, vivant dans des sources hydrothermales ou dans des roches des profondeurs, dans des glaciers ou aux calottes polaires, ont étonné la communauté. Les purges acides des mines, les sources chaudes volcaniques, l'eau de refroidissement des réacteurs nucléaires et les bassins de réserves ont démontré que des microorganismes acidophiles, alcalinophiles, halophiles et résistants aux radiations étaient capables de se développer dans des environnements extrêmement hostiles. Ces découvertes ont aidé à la conceptualisation de la grande variété de viabilité microbienne. Ces résultats encouragent à penser que la vie microbienne pourrait être trouvée dans d'autres régimes du système solaire, des endroits autrefois considérés inhospitaliers et donc dénué de toute forme de vie. Les microorganismes des sources hydrothermales ou des profondeurs de la croûte terrestre représentent des analogues potentiels de ce qui pourrait exister dans les profondeurs martiennes ou aux régimes hautes températures de Vénus, ou encore associés au volcanisme de Io.

Les environnements endolithiques et les espaces poreux des roches sont des habitats ubiquistes pour les microorganismes sur Terre et pour l'ADN extracellulaire (Walker *et al.* 2005). Dans les environnements les plus extrêmes, ces microorganismes sont souvent la principale forme de vie (Friedmann 1980). Ils constituent de ce fait une cible importante pour la recherche de la Vie ailleurs dans le système solaire.

Comment la vie est apparue et a évolué à ses débuts est une des plus anciennes et des plus intrigantes questions de l'humanité, et qui n'a toujours pas été élucidée. De Duve a affirmé en 1995 que « la vie est un impératif cosmique », un artefact imposé, une émergence spontanée.

Les trois théories sur la présence primordiale des molécules organiques sur Terre, i.e. la synthèse *in situ* dans l'atmosphère, la synthèse *in situ* dans les profondeurs océaniques et l'apport extraterrestre après synthèse *ex situ*, ne sont absolument pas antagonistes. Une production

endogène peut avoir eu lieu en parallèle d'un apport exogène. Cette production endogène a pu avoir lieu dans tout système ressemblant à la Terre primitive. De plus, si l'hypothèse d'un ensemencement extraterrestre par des molécules prébiotiques est vérifiée, alors ces molécules auraient été disponibles dans tout le système solaire, ainsi que sur toutes les planètes éventuelles dans la nébuleuse extrasolaire, qui auraient subis les mêmes impacts. Ainsi, les produits d'une chimie organique extraterrestre permettraient une chimie prébiotique similaire à celle connue sur Terre, dans toute la galaxie, au moins.

Depuis les théories du milieu du XXème siècle prédisant la présence abondante de planètes extrasolaires, les techniques de détection de plus en plus performantes ont permis de détecter des centaines d'exoplanètes. Les études biologiques de ces planètes sont malheureusement pour l'instant hors de portée. Plus près de nous cependant, avec la confirmation d'une couche de glace sur Europe et la possibilité d'un océan en dessous, et avec la découverte de molécules organiques dans l'atmosphère de Titan, le système solaire est un objet d'intérêt considérable pour l'exobiologie. La planète privilégiée dans cette recherche reste Mars, avec son enchaînement de missions à succès ou de défaites.

Mars, candidate idéale

Cette petite sœur de la Terre a été observée très tôt dans l'histoire. Mais durant des milliers d'années, elle n'était qu'un point rouge-sang parmi les hôtes de la voûte céleste, un voyageur sans nom de la nuit étoilée. Parfois, lorsqu'elle se rapprochait "dangereusement" de la Terre et brillait comme un charbon brûlant dans l'obscurité, elle soulevait des terreurs incommensurables parmi les observateurs primitifs, pour s'amenuiser de nouveau et être une fois de plus oubliée. Du temps où les Egyptiens colonisaient les bords du Nil, elle est devenue suffisamment familière pour recevoir un nom, « Har Decher », la Rouge. Les Babyloniens s'en référaient à « Nergal », l'Etoile de la Mort, et les Grecs l'ont associée à la guerre et au carnage. Elle était la Peur, la Crainte, ou le dieu de la guerre, Arès, l'équivalent du dieu Romain Mars (Figure I.2-1).

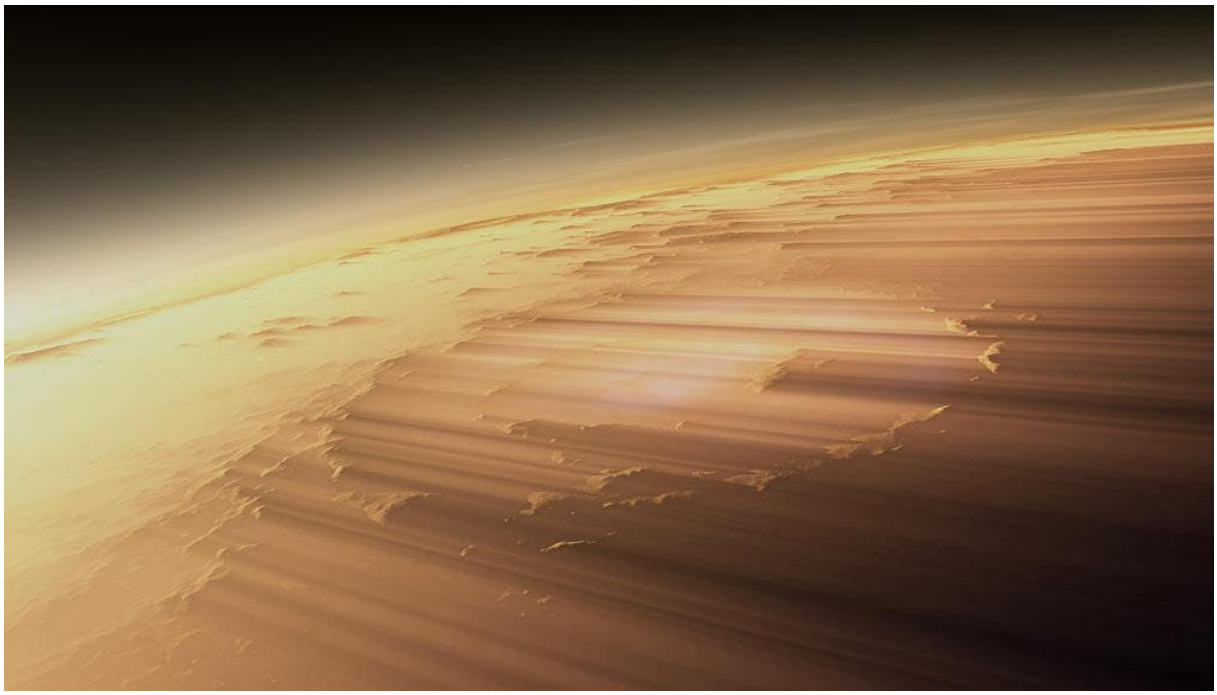


Figure I.2-1 : Mars la rouge.

Les premières recherches scientifiques sur une planète Mars vivante ont été effectuées par les missions Viking 1 et 2 en 1976. Malheureusement, cette mission de plusieurs milliards de dollars n'a trouvé aucune des preuves espérées. Il en a résulté un déclin d'intérêt pour cette planète. Vingt années plus tard, en 1996, la soi-disant découverte de nanofossiles bactériens sur la météorite martienne ALH84001 a relancé l'intérêt exobiologique pour cette planète. Puis la mission Mars Express lancé en 2003 à permis d'apporté les preuves de l'existence sur de longues périodes d'eau liquide abondant à la surface de Mars (Bibring *et al.* 2006).

Depuis les premières observations de canaux martiens par Schiaparelli, de nombreuses étapes ont été accomplies et les exigences sont revues à la baisse pour la recherche de « vie ». Ces espérances vont d'une vie intelligente (les canaux, « le visage »), à une vie développée (végétation), à une vie microbienne (Viking), à une vie nanobactérienne (ALH84001), à aujourd'hui des traces moléculaires d'une vie passée.

Lorsque l'on parle de vie primitive, on s'accorde à considérer comme vivant tout système chimique capable, *a minima*, de transférer ses informations moléculaires via autoreproduction, et d'évoluer. Quelle que soit l'explication concernant son apparition, et bien que ce fusse peut-être un phénomène absolument improbable sous des conditions extrêmement limitantes, une chose est sûre ; cela a fonctionné. Si la vie s'est développée sur Terre, il n'y a aucune raison connue pour qu'elle n'ait pas aussi évoluée sur Mars en ces mêmes temps et sous ces mêmes conditions. En effet, cette planète, lors de la création de notre système planétaire et jusqu'à la perte de son atmosphère 500 millions à 1 Ga après sa formation, possédait des conditions de température, de pression, d'humidité et de composition atmosphérique semblables à celle de notre planète primitive, c'est-à-dire

potentiellement nécessaires et suffisantes pour développer et abriter la vie telle que nous la connaissons.

Mars est depuis de longues années sujette à débats sur sa potentialité à avoir abrité une vie de quelle sorte que ce soit. Si la question d'une vie passée est encore loin d'être résolue, les scientifiques s'accordent généralement à dire qu'elle n'est plus considérée comme pouvant abriter une vie présente en surface. Même si la possibilité d'oasis de conditions plus favorables à la vie ne peut être éliminée, les chances qu'une vie existe sur Mars aujourd'hui semblent plutôt faibles.

S'il y a eu de la vie sur Mars, qu'est-elle alors devenue ? Les résidus de cette vie pourraient être trouvés, attestant d'une vie passée. Mais de nombreuses menaces existent pour la survie des restes d'une vie passée. La surface de Mars est stérilisée par une combinaison de rayonnements UV solaires, de radiations externes et internes, d'une aridité et d'une acidité (Quinn *et al.* 2005) extrêmes des sols, et d'un sol particulièrement oxydant, qui supprimeraient toute trace de molécules organiques résiduelles à la surface de Mars (Oro *et al.* 1979; Haber 1996). Il n'en est pas de même à l'abri de ces agressions, c'est-à-dire sous la surface, à des profondeurs variables selon les estimations, où le rayonnement UV et l'oxydation ne pénétreraient pas (Mancinelli 2000). Cette oxydation atmosphérique est néanmoins, au moins localement, limitée à une couche très superficielle, et les matériaux du sol situés immédiatement sous la surface, à seulement quelques centimètres de profondeur, sont protégés de cette oxydation (Figure I.2-2).

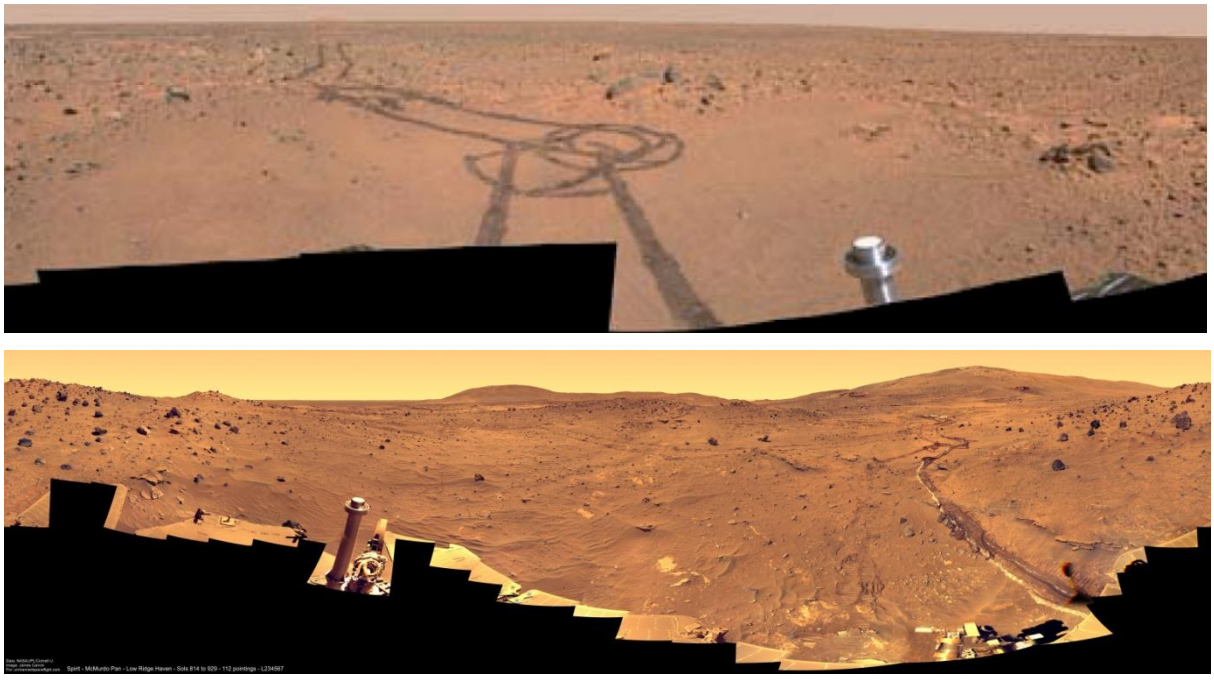


Figure I.2-2 : panoramas réalisés par le Rover américain Spirit. Crédits : NASA/JPL/Cornell U. Le léger « bêchage » du sol par les roues du rover, ou son « bêchage » plus profond dû au dysfonctionnement d'une roue du rover, suffisent à faire apparaître les minéraux sombres sous-jacents, non altérés, montrant la très faible épaisseur de la couche d'oxydation.

Jusqu'au retour d'échantillons martiens, les mesures *in situ* resteront la seule et unique possibilité d'analyser des échantillons non-altérés. De plus, la possibilité de trouver de la vie sur une autre planète est générateur d'intérêt pour le public, ce qui permet, notamment aux Etats-Unis, de justifier les financements alloués à la recherche martienne.

De la même manière qu'il existe des théories sur l'origine des premières molécules prébiotiques, il en existe également de nombreuses sur leur nature. Il est donc essentiel, avant toute tentative d'analyse *in situ*, de définir et de préciser les molécules d'intérêt à rechercher.

I.3. Les molécules d'intérêt exobiologiques

Il est important de déterminer quelles molécules organiques sont potentiellement présentes là où nous souhaitons les chercher. En effet, la méthode expérimentale développée devra être compatible avec les molécules potentiellement présentes, et la recherche sera d'autant plus précise que nous l'orientons vers des types de molécules particulières. C'est pourquoi nous allons examiner quelles molécules organiques sont d'intérêt exobiologique, par leur message biologique ainsi que la leur possibilité de présence sur Mars.

I.3.1. L'origine des molécules prébiotiques sur Mars

I.3.1.a. Exogène

La quantité astronomique d'apport de matériel organique, incluant des précurseurs complexes d'acides aminés, par des comètes et des météorites peuvent avoir joué un rôle catalytique primordial dans l'origine de la chiralité biomoléculaire dans les premières étapes de l'évolution chimique de la vie sur Terre (Chyba *et al.* 1992). Cette idée a maintenant plus d'une centaine d'années, énoncée pour la première fois en 1908 par Chamberlin (Chamberlin *et al.* 1908). Ces apports, lors notamment des bombardements météoritiques intenses des débuts de la création du système solaire, ont frappé la Terre comme Mars. Il existe donc un ensemencement similaire, qualitativement, de la Terre et de Mars. Pour élaborer des modèles de prédiction de molécules présentes à la surface ou sub-surface de Mars, il est donc indispensable de considérer les apports météoritiques, micrométéoritiques et cométaires, et leurs contenus respectifs en molécules organiques. Ces corps sont les témoins du nuage moléculaire initial dans lequel s'est formé notre soleil et autres étoiles locales.

Les molécules organiques de notre système solaire montrent de nombreuses propriétés similaires avec les observations de matière organique astronomique. Les comètes (Charnley *et al.* 2008) et les chondrites carbonées, telle la météorite de Murchison, contiennent des signatures interstellaires, et l'enrichissement en deutérium des acides aminés et acides carboxyliques météoritiques laissent penser à une origine interstellaire de ces molécules ou de leurs précurseurs (Yang *et al.* 1983; Epstein *et al.* 1987). C'est pourquoi l'étude de la chimie du milieu interstellaire est

essentielle à la détermination des molécules éventuellement présentes sur ces corps météoritiques et cométaires.

Pour cela, deux approches complémentaires sont employées. Les observations directes de molécules présentes dans le milieu interstellaire, et les simulations de formation de ces molécules dans les conditions supposées de ladite formation.

Observations dans le MIS

Longtemps après les prédictions effectuées par Swings (Swings *et al.* 1937) sur les molécules présentes dans les nuages interstellaires, ces régions de formation d'étoiles se sont révélées particulièrement denses en molécules organiques (Irvine 1994; Ohishi 1997; Snyder 2006) complexes (PAH ou hydrocarbonés aliphatiques cycliques et/ou linéaires) (Pendleton 1997; Snow 2001). Les observations radio du milieu interstellaire révèlent la présence de plus de 150 molécules organiques dans la phase gazeuse (Kwok 2009), allant des hydrocarbures aux acides carboxyliques, en passant par des cétones, aldéhydes, amines et même un sucre, le glycoaldehyde (Hollis *et al.* 2000). De la glycine a même été annoncée dans le nuage d'Orion et Sgr B2 (Kuan *et al.* 2003). Cette observation reste cependant controversée (Snyder *et al.* 2005), mais l'observation récente de glycine sur un échantillon cométaire renforce cette présomption (Elsila *et al.* 2009). Cependant, aucune molécule chirale n'a (encore) été détectée, et des recherches sont en cours pour déterminer les meilleures molécules candidates chirales à rechercher. Ces candidates seront stables (puisqu'il existe une corrélation entre l'énergie relative des isomères et leur abondance dans le milieu interstellaire), auront un moment dipolaire adéquat (pour faciliter leur détection) et présenteront un carbone asymétrique (pour la chiralité).

La connexion entre les molécules organiques trouvées dans le milieu interstellaire et celles incorporées dans les corps les plus primitifs du système solaire est fondamentale pour l'évolution des molécules biogéniques, pour le processus de formation planétaire et probablement pour l'origine de la vie, voire de l'homochiralité terrestre. Ce lien chimique entre les étoiles naissantes, le milieu interstellaire, le solaire système jeune et la terre représente un champ d'étude de grand intérêt.

Simulations du MIS

Les limites des observations directes ont conduit à des études de simulation de synthèse des molécules organiques à partir d'irradiations UV, de polymérisation thermique et de bombardements ioniques d'analogues de glaces interstellaires (Nuevo *et al.* 2007) (Figure I.3-1). Ces études ont permis de synthétiser de nombreuses molécules organiques, dont des acides aminés (Bernstein *et al.* 2002; Caro *et al.* 2002). Nuevo et al. (Nuevo *et al.* 2008) ont été capables de détecter 15 acides aminés protéogéniques parmi les résidus obtenus après irradiations VUV des analogues (Figure I.3-1). Cela suggère qu'une génération spontanée d'acides aminés dans le milieu interstellaire est

possible. Sous certaines conditions, une polymérisation de ces acides aminés est obtenue jusqu'à la création de tripeptides (Gontareva *et al.* 2009). Des efforts similaires ont été réalisés pour produire des bases d'acides nucléiques, par irradiation par protons. Une production d'uracile et thymine a pu être observée par ce biais (Kobayashi *et al.* 2004).

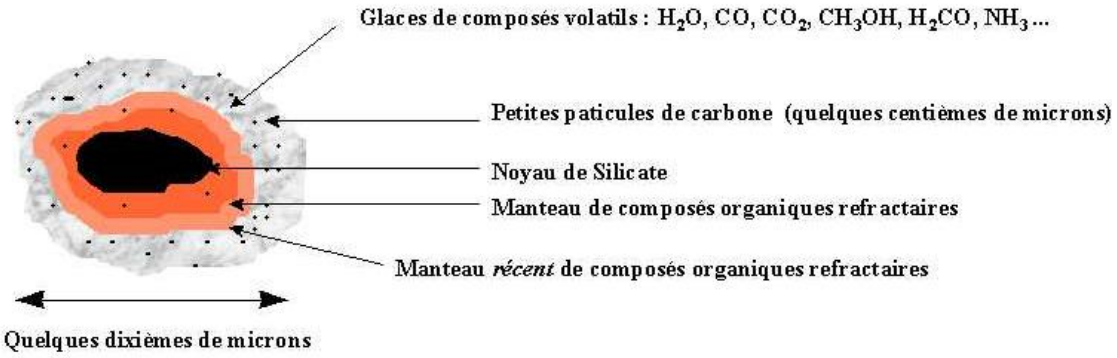


Figure I.3-1 : particule de poussière interstellaire dans un nuage moléculaire (Cottin *et al.* 1999).

Les expériences en laboratoire ont montré que les photolyses UV et les polymérisations thermiques sont une voie possible pour la production de résidus organiques complexes dans la phase solide des nuages moléculaires interstellaires. Cette chimie prébiotique a permis d'appréhender la diversité des molécules organiques hypothétiquement apportées sur les planètes en quête de vie par des corps astéroïdaux ou cométaires. Il n'en reste pas moins que les observations directes des molécules organiques présentes sur ces corps d'intérêt reste la plus sûre méthode de détecter les composés qui auraient ensemencé Mars et les autres entités du système solaire.

La matière organique sur les météorites, micrométéorites et comètes

Bien que les corps parents des météorites et comètes aient été formés dans le milieu interstellaire, et par conséquent ont été contaminés par les mêmes molécules que celles présentes dans le milieu interstellaire, les différences compositionnelles observées entre les molécules organiques des expériences de simulation et les molécules organiques analysées sur les météorites laissent penser que les molécules organiques du milieu interstellaire évoluent avant leur incorporation dans le matériel du système solaire (comètes et météorites) et/ou avant leur apport planétaire. Cette altération des molécules organiques serait due aux conditions de l'espace interstellaire, de la nébuleuse solaire et de l'astéroïde parent lui-même (altération thermique et aqueuse (Nuevo *et al.* 2008)). Ces mêmes rayonnements qui ont été à l'origine de la synthèse des molécules, deviennent alors destructeurs une fois la molécule formée. Les actions des rayonnements sur ces molécules agissent donc à la fois en tant que conditions synthétiques et destructrices du matériel organique.

Météorites

Dans le classement des météorites, les chondrites carbonées sont celles ayant le plus grand intérêt organique. Elles contiennent jusqu'à 5% en masse de matière organique (Sephton *et al.* 2000). Sur ces dernières, les classes de composés retrouvés incluent des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, des acides aminés, des acides carboxyliques, des composés hétérocycliques (bases nucléiques AGUTC xanthine hypoxanthine), des acides sulfoniques, acides phosphoniques, alcools, aldéhydes, cétones, sucres, amines, amides, hétérocycles azotés, hétérocycles sulfurés et d'autres matériaux macromoléculaires de poids moléculaire élevé (Kwok 2009) (Sephton 2002).

Sur les chondrites carbonées de type CM (2% des météorites totales) dont Murchison et Murray sont les représentantes les plus étudiées, plus de 70 acides aminés ont été reportés, dont les plus représentés sont l'AIB, la glycine et l'isovaline. En ce qui concerne les acides carboxyliques, l'acide acétique est le plus présent. On y trouve entre 1 et 100 ppm d'acides aminés et de bases nucléiques. La météorite de Murchison, de formation contemporaine à la formation du système solaire a révélé plus de 500 composés organiques, dont de nombreuses bases nucléiques et 74 acides aminés, dont 8 protéogéniques (Botta *et al.* 2002). 1% de son carbone organique sont des acides aminés, et l'AIB représente 10 ppm, soit 10% des acides aminés.
Des acides aminés ont été retrouvés sur d'autres types de chondrites carbonées (Orgueil, CI, 4100 ppb), mais pas sur toutes (Tagish lake, sur laquelle la majorité des acides aminés trouvés semblent être dus à la contamination terrestre (Kminek *et al.* 2002)). Cela suggère des origines différentes ou des voies de formation différentes pour ces météorites. Des auteurs on pu détecter des structures membranaires ayant pu être développées à partir de composants organiques lipides-like de la météorite de Murchison (Deamer 1997). Hoover (Hoover 2008) va même jusqu'à proposer la possible présence de traces de microfossiles filamentaires endogènes sur les météorites d'Orgueil, Ivuna et Murchison.

Des chondrites carbonées de type CR, parmi les plus primitives, ont également été étudiées vis-à-vis de leur contenu en acides aminés. Parmi trois CR antarctiques, deux présentent des taux d'acides aminés supérieurs à toute autre chondrite étudiée, à savoir entre 180 et 249 ppm. Les acides aminés les plus présents sont la glycine, l'isovaline, l'α-AIB et l'alanine. La dernière, la plus altérée hydrauliquement, ne présentait pas d'acides aminés. Dans les CR et CM, l'abondance absolue en acides aminés semble corrélée au degré d'altération aqueuse de leur corps parent (Martins *et al.* 2007).

Comètes

Les observations de poussières dans la coma de la comète Halley (Figure I.3-2) montrent que le carbone organique correspond à quelques 20% de la masse cométaire. Une combinaison d'observations, de simulations numériques et de simulations expérimentales ont conduit à la conclusion qu'une centaine de molécules organiques complexes peuvent être présentes dans les

comètes (Cottin *et al.* 1999). Leur importance dans l'apport de matière organique terrestre, et par conséquent à tout le système solaire, a été suggérée dès 1961 par Oro (Oro 1961). « Je propose qu'une conséquence importante de l'interaction des comètes avec la Terre serait l'accumulation sur notre planète de grandes quantités de composés carbonés, connus pour subir des transformations spontanées en acides aminés, purines et autres composés biochimiques ».

Figure I.3-2 : noyau de la comète de Halley filmé depuis la sonde Giotto en 1986 à environ 18000 km de distance.

Micrométéorites

Ces particules de tailles inférieures au mm (Figure I.3-3) représentent plus de 20% du matériel exogène arrivé sur la Terre, et presque la totalité de son matériel organique (Maurette 1998). Les micrométéorites carbonées représentent 80% des micrométéorites et contiennent 2% de carbone en moyenne. 80% ne sont pas fondues après leur arrivée sur terre. Des acides aminés y ont été identifiés (dont l'AIB (80ppm), dix fois plus concentré que sur les météorites CM), de l'alanine (Brinton *et al.* 1998), de même qu'une grande proportion de sulfides métalliques, oxydes et minéraux argileux qui appartiennent à différentes classes de catalyseurs. Malheureusement, au vu du rapport de la surface sur le volume, la contamination terrestre est un problème considérable pour l'analyse du contenu de ces micrométéorites. L'étude de leurs minéralogie, chimie et composition isotopique indique qu'elles peuvent être liées aux chondrites carbonées, malgré une concentration en carbone bien supérieure. Une origine cométaire leur est également prêtée (Brinton *et al.* 1998).

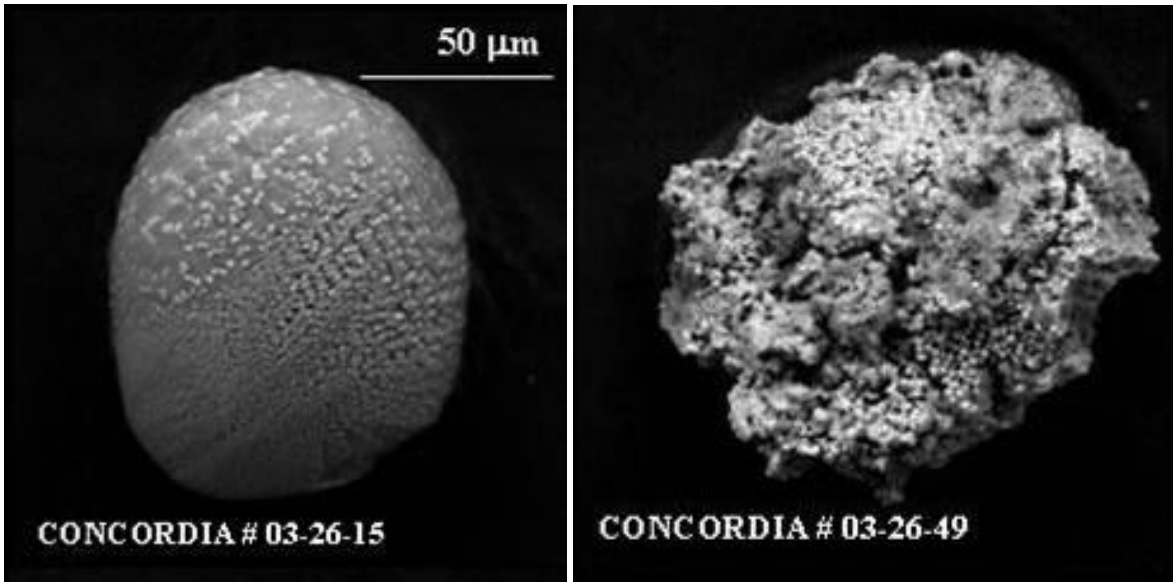


Figure I.3-3 : exemples de micrométéorites.

La quantité d'apports exogènes

Grâce à ces apports exogènes, une masse particulièrement importante de matière carbonée organique a été mise à disposition sur la Terre primitive. La quantité de carbone organique distribuée chaque année sur terre a été estimée à 300 tonnes. Elle est majoritairement apportée par les poussières interplanétaires (Anders 1989), mais aussi par les comètes et les météorites. Lors de la période de bombardement intense tardif (Figure I.3-4), ces valeurs pouvaient atteindre 50 000 tonnes par an (Chyba 1990). La majorité des apports de carbone exogènes le sont sous forme de micrométéorites, apportant de trois ordres de grandeur de plus de matériel organique que les comètes, et de cinq ordres de grandeur de plus que les météorites (Botta *et al.* 2002). Ces micrométéorites, de 50 à 500 µm (99% de la masse apportée) représentent alors un apport de carbone, sur 300 millions d'années, supérieur à la quantité de carbone engagée dans la biomasse terrestre (10^{18}g) (Brack *et al.* 1998).

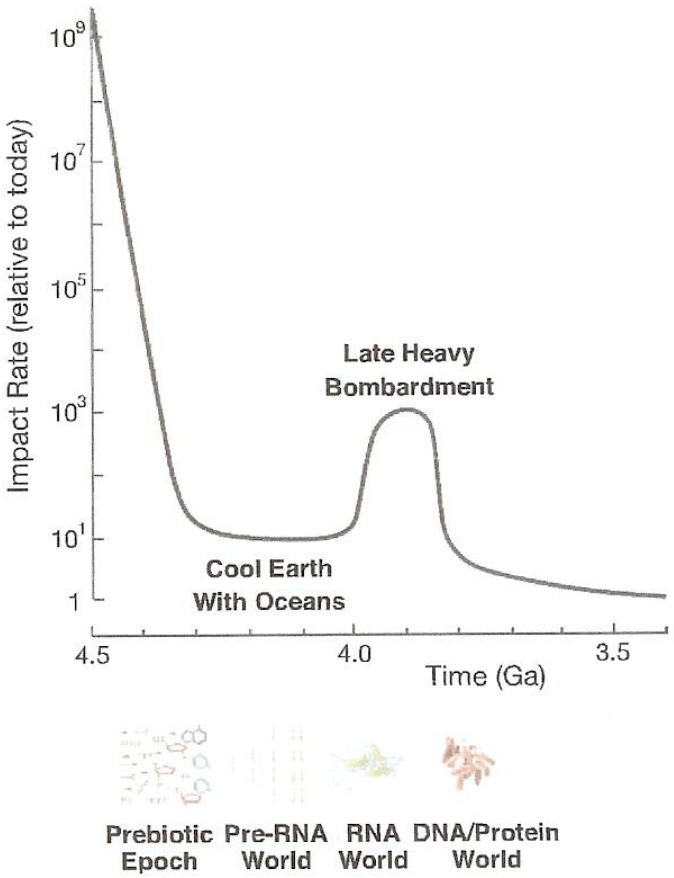


Figure I.3-4 : représentation à l'échelle du bombardement intense tardif.

I.3.1.b. Endogène

L'existence potentielle de matériel organique endogène sur Mars pourrait provenir de sources abiotique, ou plus hypothétiquement encore, de sources biotiques. A l'instar des hypothèses de formation de molécules organiques sur Terre, des molécules organiques ont pu être synthétisées sur Mars par les mêmes processus ; la formation dans l'atmosphère Martienne, ou dans des sources hydrothermales. En considérant l'atmosphère primitive de Mars identique à l'atmosphère primitive terrestre, les molécules endogènes Martiennes devraient être les mêmes que les molécules endogènes terrestres. Dans ses expériences de synthèse de matériel prébiotique en recréant les supposées conditions primitives, Miller a obtenu des acides aminés, principalement de l'AIB et de l'isovaline (Miller 1953). Quant à la création d'acides aminés dans les sources hydrothermales, elle a été positivement documentée par Holm et Andersson (Holm *et al.* 1995).

Cependant, il semble que sur la Terre prébiotique comme sur Mars, plus de matériel organique exogène qu'endogène ait était disponible. Après de nombreuses années sous le succès de l'expérience de Miller, ces hypothèses ont perdu beaucoup de leur crédit. En effet, Miller considérait l'atmosphère primitive comme réductrice. On suppose plutôt maintenant que l'atmosphère primitive

était oxydante. Dans ces conditions, il est bien plus difficile de synthétiser du matériel organique. Les recherches actuelles suggèrent que, quantitativement, l'importance des apports exogènes est négligeable si l'atmosphère primitive était réductrice, mais devient prédominante si l'atmosphère était dominée par le CO_2, comme aujourd'hui sur Mars (Irvine 1998) (Figure I.3-5).

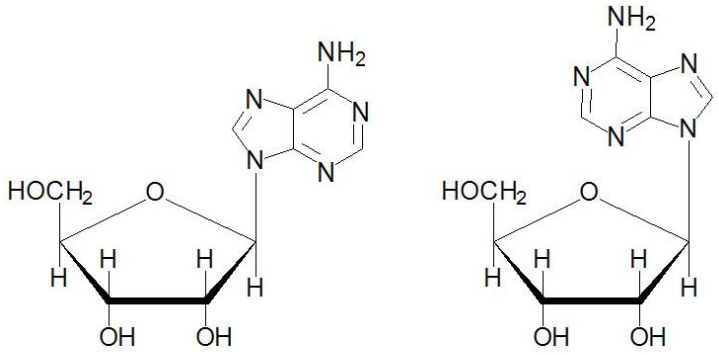
Source	Miller–Urey atmosphere (kg year^{-1})	H_2-rich CO_2 atmosphere (kg year^{-1})^a	Intermediate oxidation-state atmosphere (kg year^{-1})^b
Electric discharge	3×10^9	3×10^8	3×10^7
IDPs	2×10^8	2×10^8	2×10^8
Micrometeorites	7×10^7	7×10^7	7×10^7

Figure I.3-5 : différences quantitatives des apports exogènes *vs.* endogènes selon le degré d'oxydation de l'atmosphère. De (Thomas *et al.* 1997).

Lister la totalité des molécules organiques complexes retrouvées sur les météorites, micrométéorites, comètes, simulées sur des analogues ou *in silico*, ou supposées par des réactions endogènes serait superflu (pour une revue complète des molécules retrouvées sur les météorites voir (Botta *et al.* 2002)). Si l'on considère les molécules synthétisées et présentes dans des conditions abiotiques, la résistance des molécules dans des environnements extrêmes, les molécules possédant un centre chiral et les molécules qui ont été utilisées par la vie, trois familles de molécules organiques vont attirer notre attention en tant que monomères prébiotiques clés ; les acides aminés, les acides nucléiques et les acides carboxyliques.

I.3.2. Les acides nucléiques

Les sucres présents dans l'ADN sont précisément et exclusivement des β-D-désoxyriboses, ceux présents dans l'ARN des β-D-riboses. Dans cette forme D, le substitut hydroxyle sur le carbone n-1 est à droite dans la représentation de Fisher, et à gauche sur la forme L de ce pentose. Alors que l'existence d'une chiralité pour les nucléosides et nucléotides mono et tri-phosphates est avérée, il est moins évident que les bases puriques et pyrimidiques seules présentent une asymétrie, vis-à-vis de leur précédente liaison N-osidique qui peut être syn ou anti (Figure I.3-6).



Adénine anti Adénine syn

Figure I.3-6 : conformations possibles des liaisons osidiques, impliquant une asymétrie des bases nucléiques. Exemple de l'adénosine.

Il est intéressant de noter ici que dans les conformations A et B de l'ADN, ces liaisons osidiques sont anti, alors que la forme Z, qui tourne dans le sens inverse, possède des liaisons osidiques syn. L'étude des bases ATGC, de leurs nucléosides et nucléotides respectifs, notamment les nucléotides triphosphates, précurseurs dans la formation de l'ADN et porteur d'énergie (ATP) est donc envisagée.

I.3.3. Les acides carboxyliques et la théorie de Benner

Les acides carboxyliques sont les produits de dégradation des acides gras, et certains d'entre eux possèdent un centre asymétrique. Ces résidus de la vie vont nous intéresser, d'autant plus qu'ils sont des produits particulièrement résistants aux conditions drastique du milieu extraterrestre. En effet, Benner leur a déterminé une certaine résistance. La théorie de Benner (Benner *et al.* 2000) part du principe que nombres de molécules organiques ont dû être apportées à la surface de Mars par les météorites et micrométéorites, ou synthétisées *in situ* via des processus abiotiques ou hypothétiquement biologiques. Or, aucune de ces molécules organiques n'a pu être détectée par les missions Viking 1 et 2 en 1976. Benner considère alors que la surface oxydante de Mars a transformé ces molécules de surface en des composés invisibles aux techniques d'analyses de la mission Viking. Benner considère la voie d'oxydation suivante ; les alcanes réagissent avec les radicaux réactifs $HO^{\bullet}$ et aboutissent à la formation d'alcools secondaires, eux-mêmes ne s'accumulant pas mais générant rapidement des cétones. A son tour, la cétone oxydée formera un ester, qui en se clivant aboutira a un acide carboxylique plus un alcool primaire, ce dernier s'oxydant directement en un acide carboxylique. Ces acides carboxyliques seront des intermédiaires métastables, plus lents à dégrader qu'à être formés. De même, les alkylbenzènes, par une voie d'oxydation impliquant les mêmes radicaux, aboutiront, via des benzyle-alcools, à une accumulation d'acide benzoïque, avant dégradation en CO_2 de ces derniers (Figure I.3-7).

Ainsi, plusieurs molécules organiques pourraient être détectable dans les quelques dizaines de cm de profondeur de la surface martienne suite à ces processus d'oxydation forte. Il est intéressant de noter qu'une étude réalisée par Navarro-Gonzalez *et al.* en 2002 semble donner crédit à la théorie de Benner (Navarro-Gonzalez *et al.* 2003). L'étude, réalisée sur des sols du désert d'Atacama au Chili, sol pour le moins aride et oxydant, a montré que les molécules organiques présentes sont dégradées selon des processus non-biologiques ; les processus décrits par Benner. En effet, certaines molécules prédites par Benner dans son modèle ont pu être détectées suite au processus d'oxydation se produisant dans cet environnement extrême.

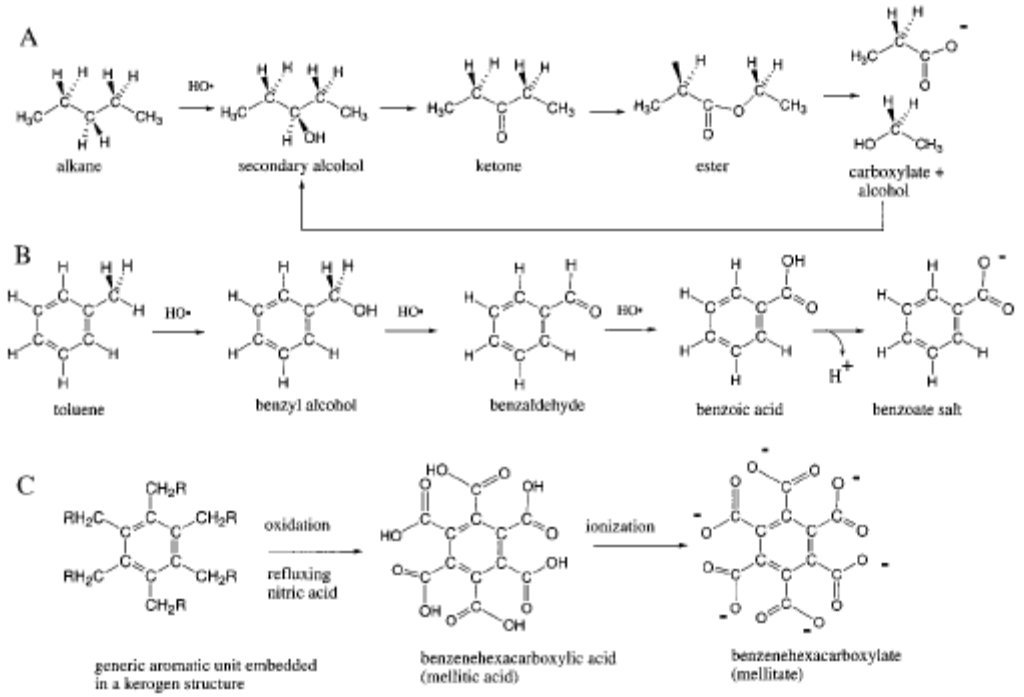


Figure I.3-7 : Dégradation oxydative d'un alcane (représenté ici par un pentane) en acide acétique (A), d'un toluène en acide benzoïque (B) et d'un kérogène en acide benzènehexacarboxylique (acide mellitique) (C) (Benner *et al.* 2000).

I.3.4. Les acides aminés

La détection des acides aminés est d'un grand intérêt pour les exobiologistes. D'une part, ils sont les constituants des protéines et sont donc présents dans tous les organismes vivants sur Terre. D'autre part, ils possèdent (presque tous) un centre chiral. De surcroît, ces molécules ont été montrées comme étant particulièrement résistantes à la dégradation et à la racémisation, comme le montrent les études théoriques et expérimentales sur le sujet (cf. paragraphe précédent), ainsi que la présence d'acides aminés sur les météorites. De ce fait, l'étude des 20 acides aminés du vivant est particulièrement intéressante pour les exobiologistes, et seront les objets d'études principaux dans le cadre de ma thèse. D'autres acides aminés, fréquents sur les météorites, ont également pu être analysés. En plus de ces 20 acides aminés reconnus, certaines archaea et eubactéries codent pour des 21ème et 22ème acides aminés, la sélénocystéine et la pyrrolysine. Etant donné les découvertes

récentes de ces derniers acides aminés, il n'est pas incongru de penser que la nature puisse nous surprendre avec d'autres acides aminés, même si l'encodage direct d'un 23ème acide aminé a été déterminé comme improbable. Improbable, mais pas impossible. Il y a donc une possibilité que la vie telle que nous la connaissons nous cache encore des acides aminés qui lui sont indispensables.

Toutes ces molécules, acides nucléiques, acides carboxyliques, acides aminés, sont les constituants nécessaires à une vie primitive sous forme de protocellule (Figure I.3-8).

Ces molécules, en plus d'avoir un intérêt en tant que résidus d'une vie passée, sont également les produits résiduels de colonies bactériennes vivantes. Des quantités substantielles de matière organique résiduelle sont généralement associées à de très faibles quantités de microorganismes. Sur un échantillon de sol Antarctique supposé contenir moins de 10^4 microorganismes par gramme, plus de 20 composés organiques ont été identifiés à des taux allant de 0,01 à 1ppm (Quam 1971).

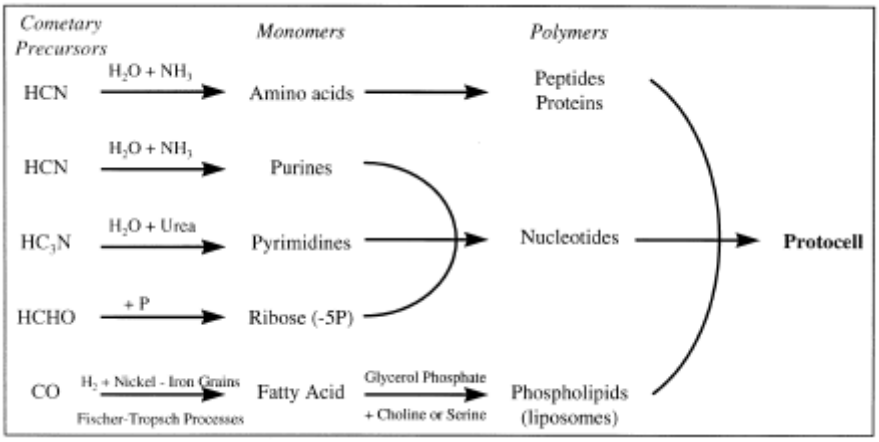


Figure I.3-8 : Les constituants essentiels à la formation d'une cellule vivante (Oro *et al.* 1997).

I.3.5. Pertinence des molécules et du message

Comme il a déjà été avancé, certains acides aminés sont plus enclins à retenir leur excès énantiomérique initial que d'autres. Sous des conditions identiques, certains acides aminés vont racémiser totalement alors que d'autres ne seront pas affectés par la racémisation. En effet, sur les 20 acides aminés du vivant, Glu, Ile et Val sont les plus résistants à la racémisation, alors que Phe, Asp et Ala sont les plus fragiles. Partant d'un même excès initial, une variété de ratio D/L peut donc être retrouvée étant donné les racémisations différentielles des acides aminés, ainsi que les conditions thermiques et aqueuses différentes subies par chacun.

Ces prédictions sont confirmées par les observations ; sur la météorite de Murchison, les acides aminés di-substitués, qui ne sont que difficilement racémisés (exemple : isovaline) pourra

présenter un excès énantiomérique, alors qu'un acide aminé monosubstitué (exemple, Glu) sera retrouvé en mélange racémique. De même, des excès énantiomériques peuvent être retrouvés sur des α-méthyl-α-AA, alors que leurs équivalents α-hydrogéné sont présents en mélange racémique, conformément à la théorie prédite par Cronin (Cronin *et al.* 1997). La substitution par le groupement méthyle de l'atome α-H rend la racémisation plus difficile (Pollock *et al.* 1975) et leur temps de décomposition prend le dessus sur le temps de racémisation (Bada 1991). Les acides aminés α-méthylés peuvent alors être considérés comme la plus grande source d'asymétrie dans le monde prébiotique, et ont donc pu jouer un rôle particulièrement important dans l'évolution chimique de l'homochiralité.

Les conditions anhydres et de températures particulièrement basses sur Mars nous laissent penser que s'il a existé un excès énantiomérique d'un éventuel biotope Martien, il pourrait toujours être détectable aujourd'hui (Bada *et al.* 1995). Une homochiralité de l''acide aspartique, l'acide aminé ayant la plus forte propension à racémiser, serait préservée durant 3.10^{13} années à des températures équivalentes à l'équateur martien (temps de demi-vie de racémisation à 215K) et 10^{27} années aux températures martiennes polaires (150K) dans des conditions anhydres. Une signature homochirale d'une vie passée sur Mars, considérée éteinte depuis que Mars a perdu son atmosphère il y a $3{,}5.10^{9}$ années, pourrait donc être préservée sous la surface martienne, à l'abri des menaces de destruction des molécules (Tableau I.3-1).

Tableau I.3-1 : Demi-vie de racémisation de l'acide aspartique (années). D'après (Bada *et al.* 1995).

	Anhydre	**Aqueux**
150 K	1.10^{27}	
215 K	**3.10^{13} ***	
252 K	9.10^{8}	4.10^{6}
273 K	8.10^{6}	6.10^{4}
300 K	5.10^{4}	8.10^{2}

***** = conditions équivalentes aux conditions à l'équateur martien.

I.4. Les techniques de séparations et d'analyses chirales

Chercher des traces chimiques de vie en cherchant l'homochiralité dans des environnements extraterrestres par des analyses *in situ* nécessite en amont de définir les endroits clés et les molécules cibles, mais également le développement d'une instrumentation efficace pour la recherche d'énantiomères dans des sols pauvres, sous des conditions qui peuvent se révéler difficiles.

De nombreuses méthodes de séparation et d'analyse énantiomérique existent. La plupart ont été développées à des fins médicales et pharmaceutiques, puisqu'il est plus simple de réaliser une synthèse racémique puis de séparer les énantiomères, que de réaliser une synthèse sélective d'un seul énantiomère.

Nombreuses sont les méthodes classiques de séparation et d'analyse de molécules chirales, mais elles sont difficilement compatibles avec les contraintes d'une analyse spatiale. En effet, les techniques de cristallisation énantiosélective (Lorenz *et al.* 2006), avec laquelle Pasteur a lié la chiralité à l'activité optique, de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) (Yesilot *et al.* 2007), d'ultrafiltration sur membranes (Maruyama *et al.* 1990), de dichroïsme circulaire (méthode polarimétrique) (MacDermott *et al.* 1996) (SETH Cigar), de spectrométrie Raman (diffusion de la lumière) (Barron *et al.* 2006) ou d'immunochimioluminescence (Silvaieh *et al.* 2002) sont efficaces pour la séparation et/ou l'analyse chirale au laboratoire, mais sont peu adaptées à une utilisation dans des conditions spatiales. C'est pourquoi nous parlerons essentiellement des méthodes séparatives d'électrophorèse capillaire et de chromatographie aisément couplées à des méthodes analytiques de détection performantes.

I.4.1. Eléctrophorèse Capillaire

Dans les dix dernières années, l'électrophorèse capillaire a été établie comme étant une technique puissante d'énantiosélection analytique, grâce à sa forte résolution et sa flexibilité envers les conditions de séparation. En électrophorèse capillaire, on parle d'une pseudophase, constituée d'un tampon additionné d'un sélectant chiral. Puisque les sélectants chiraux et les produits à analyser possèdent une mobilité électrophorétique dans une même phase, la séparation chirale basée sur leurs interactions énantiosélectives peut être décrit comme une « chromatographie capillaire électrocinétique » (Terabe *et al.* 1985). L'électrophorèse capillaire a été utilisée avec succès pour la séparation énantiomérique d'une très grande variété de molécules chirales.

Elle offre de nombreux avantages pour des études en milieu spatiales, tels qu'une grande efficacité de séparation, une grande vitesse d'analyse, des faibles quantités de produits d'analyse, une simplicité instrumentale ainsi que des coûts de fonctionnement limités. Les séparations peuvent être effectuées malgré une très faible sélectivité observée. Cependant, l'électrophorèse capillaire, de même que la chromatographie en phase gazeuse, repose sur l'utilisation de fins capillaires pour permettre une grande efficacité de séparation. Ainsi, elle ne peut pas être utilisée à grande échelle dans l'industrie pharmaceutique pour produire des kg ou plus d'énantiomères pur. Son manque d'intérêt pharmaceutique a engendré un retard d'informations.

Dans le cadre du développement de nouvelles techniques analytiques pour l'exploration martienne, Skelley et al. (Skelley *et al.* 2003) ont réalisé sur électrophorèse capillaire la séparation chirale d'acides aminés marqués à la fluorescamine, dont l'excitation à 390 nm est réalisée avec des

simples diodes laser compactes bleues. Le succès de cette analyse a permis son utilisation pour des quantifications de protéines, des analyses de composition d'acides aminés ainsi que des analyses de neurotransmetteurs. L'utilisation d'acides aminés marqués à la fluorescamine, autrefois couplée à la HPLC (Cesur *et al.* 2002), est maintenant disponible sur des micropuces d'électrophorèse capillaire. La séparation chirale peut être étendue à l'étude d'autres molécules d'intérêt exobiologiques, telles que les amines, bases nucléiques, nucléosides et nucléotides (Skelley *et al.* 2006) ainsi que des PAH (Stockton *et al.* 2009). Etant donné le succès de la technique de marquage à la fluorescamine, une micropuce spatialisable a été développée pour l'expérience Urey de la mission Exomars 2016 (Skelley *et al.* 2006). Les premières études ont permis la détection d'acides aminés avec une sensibilité voisine du ppt dans des échantillons analogues (désert d'Atacama, Chili) et dans des échantillons de jarrosite prélevés dans des environnements à pH et/ou concentration saline extrêmes (Stockton *et al.* 2009). Cependant, même si la technique de Skelley semble idéale pour l'identification et la quantification d'acides aminés, elle reste discutable sur la pertinence de son utilisation pour la séparation énantiomérique, étant donné le peu d'énantiomères effectivement séparés. De plus, malgré ses nombreux avantages (forte sensibilité (~80 nM), réactions rapides en phase aqueuse et solide), cette méthode reste problématique pour les analyses *in situ*. L'utilisation de phases mobiles liquides dans l'espace peut soulever quelques problèmes. De plus, les volumes d'échantillons utilisés en électrophorèse capillaire sur micropuce ne sont pas compatibles avec les exigences actuelles de l'exploration spatiale. Cette micropuce, aussi puissante soit-elle, reste une innovation technologique qui n'a pas pu encore démontrer une totale fiabilité. Le plus problématique reste le cœur même de cette technique : la fluorescamine utilisée étant elle-même chirale, le marquage engendre donc quatre énantiomères par acide aminé chiral, qui ne peuvent être séparés qu'à pH<9 pour éviter la racémisation du colorant. Le degré de séparation chiral ne peut ainsi pas être satisfaisant, chaque acide aminé produisant quatre stéréoisomères. Cela amène inéluctablement des chevauchements de pics lors de la séparation électrophorétique, diminuant la capacité à résoudre chacun des pics produits. De plus, chaque énantiomère se traduisant par deux pics, la quantification en est compliquée. Même si cette technique de séparation et d'analyse de la chiralité des molécules d'intérêt est prometteuse, elle est encore loin d'être finalisée pour l'exploration extraterrestre.

I.4.2. Chromatographie

"Chromatographie" signifie littéralement "écrire avec la couleur", du grec ancien « Khrôma » qui signifie "couleur" et Graphein qui signifie "écrire". La méthode chromatographique a été proposée pour la première fois par M.S. Tswett en 1903 (Tswett 1903). Il est intéressant de noter ici que cette même année, le premier article sur les possibilités d'analyse spatiale in situ a été publié par le scientifique russe K.E. Tsiolkowsky (Tsiolkovsky 1903). Ces deux chercheurs ont alors été considérés par la communauté scientifique comme de doux rêveurs plutôt que des scientifiques avant-gardistes, et leurs travaux ont reçu comme meilleur accueil le silence. L'ironie veut qu'une centaine d'années plus tard, la chromatographie est étudiée sous tous ses angles et ne se limite plus à la chromatographie d'adsorption qu'avait utilisée Tswett. Elle est en effet, aujourd'hui utilisée comme

technique de séparation de prédilection pour de nombreux aspects de la recherche scientifique, et notamment pour l'analyse spatiale *in situ*.

Le principe de la chromatographie est une séparation des molécules à partir d'un mélange complexe. Ce mélange est entraîné par une phase mobile au contact d'une phase stationnaire. La séparation des constituants du mélange repose sur leur différente vitesse de migration au travers de la phase stationnaire, vitesse régie par les interactions différentielles des composés à l'égard de la phase stationnaire qu'ils rencontrent tout au long de leur migration. Ce comportement dépend des caractéristiques physiques et chimiques des molécules analysées, des propriétés des phases mobiles et stationnaires, et ainsi, des interactions entre ces deux phases et les solutés analysés. Il confère à chacune des molécules une vitesse de migration propre, qui permet la séparation temporelle des constituants du mélange initial. Il s'agit d'une technique de séparation et d'analyse qualitative et quantitative sensible permettant notamment l'analyse de composés à l'état de traces. Comme le dit J. Jacques dans ses Confessions : « Je ne peux m'empêcher, pour ma part, en voyant le rôle que joue désormais la chromatographie dans la vie quotidienne des chimistes qui m'entourent, de m'étonner délicieusement qu'une telle révolution scientifique puisse dépendre d'une technique au principe aussi simple. » (Jacques 1981)

La classification des types de chromatographie peut être effectuée à différents niveaux (Figure I.4-1) :
- Classification selon la nature de la phase mobile (CPG, CPL, CFS (fluide supercritique))
- Classification selon la technologie de mise en œuvre (sur colonne, sur couche mince)
- Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu (deux phénomènes sont particulièrement importants : la polarité des deux phases, et la porosité de la phase stationnaire).
    - Par rétention
        Adsorption
        Partage
        Echangeuse d'ions
        Exclusion stérique
        Paire d'ions, échange de ligands, transfert de charge etc.
    - Par exclusion

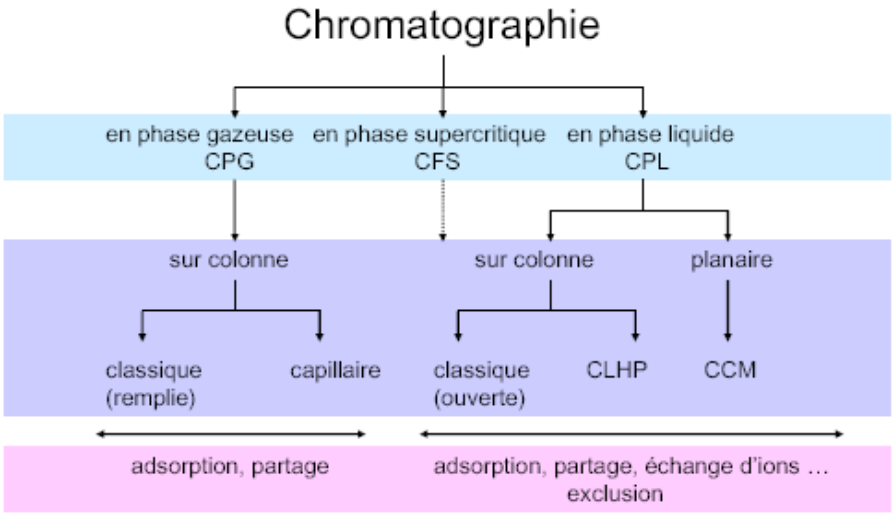


Figure I.4-1 : classification des différents types de chromatographies, selon la phase stationnaire (en haut), la technologie en œuvre (au centre) et la nature des phénomènes en jeu (en bas).

Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte soit de leur gêne stérique vis-à-vis de la phase stationnaire (chromatographie d'exclusion-diffusion), soit de leurs caractéristiques électroniques (chromatographie par échanges d'ions), soit de leurs propriétés de solubilité différentielle entre deux phases liquides (chromatographie de partage), soit de leur adsorption et désorption différentielle sur la phase stationnaire (chromatographie d'affinité).

La chromatographie d'affinité est la plus adapté à la séparation chirale. En fonction de la colonne choisie, elle permet en effet la séparation d'énantiomères. Ce type de chromatographie est basé sur la différence d'affinité entre les substances à analyser à l'égard des deux phases. Le principe de cette séparation s'appuie sur des processus d'adsorption-désorption, dont les équations qui les régissent sont aujourd'hui parfaitement connues. La stabilité du complexe diastéréoisomérique est le rapport de la constante cinétique de formation et de dissociation. Les énantiomères ayant des propriétés physico-chimiques identiques, il faut les placer dans un environnement lui-même chiral pour pouvoir modifier ces propriétés et pouvoir discerner entre elles. C'est pour cela que le choix de la colonne et de la phase mobile (surtout en chromatographie liquide) est relativement important.

I.4.2.a. Chromatographie en Phase Liquide (CPL)

En chromatographie liquide, le sélectant chiral peut être la phase mobile, la phase stationnaire ou les deux. Le choix de la phase mobile est crucial puisqu'il influence directement la sélectivité, la résolution, le temps de rétention et la solubilité des composés. Un changement dans sa composition peut entraîner un inversement de l'ordre d'élution des énantiomères d'un composé.

Parmi les paramètres clés, la sélectivité vis-à-vis des énantiomères et leur temps de rétention sont parmi les plus importants. Ils dépendent notamment de la concentration en sélectant chiral dans les phases, de la vitesse de la phase mobile, du type et de la quantité de modifiants organiques dans

l'éluent, du pH de la phase mobile (très important), de la température, de la concentration de la solution tampon, des constantes de stabilité des adsorbats sur le sélectant chiral et des propriétés d'adsorption des deux stéréoisomères considérés. Le facteur de résolution de molécules possédant deux centres stéréogéniques équivalent est meilleur que celui de ses analogues à un seul centre (Besli *et al.* 2006). Il est bien évident que le sélectant chiral joue un rôle important dans la reconnaissance chirale, mais le support achiral de la phase stationnaire a également une place importante dans cette reconnaissance. Le type de "spacer" (bras de fixation entre le support de la colonne et l'effecteur) affecte non seulement la sélectivité de la séparation, mais aussi l'ordre d'élution des énantiomères.

Les premiers acides aminés analysés de manière automatique l'ont été sur chromatographie liquide par échange d'ions, une procédure introduite en 1958 par Spackman, Stein et Moore (Spackman *et al.* 1958). Il s'agissait de l'entrée dans l'ère de la chromatographie liquide moderne. Aujourd'hui différents autres types de chromatographie liquide sont utilisés dans le but d'obtenir des séparations chirales.

- Chiral Ligand-Exchange Chromatography, avec des sélectants chiraux tels que des dérivés d'acides aminés (Gubitz *et al.* 1994), a été la première technique chromatographique liquide à assurer une séparation complète d'isomères optiques (Kurganov 2001). Elle a été inventée par Davankoy au début des années 1970. En tant que technique pionnière, elle a été la plus largement étudiée d'un point de vue théorique. Les résultats de ces études sont en général adaptables à toute autre technique chromatographique impliquant des interactions soluté-sélectant.

- Aujourd'hui La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est devenue une technique couramment utilisée pour les études énantiomériques. En effet, elle a démontré une grande efficacité pour les séparations chirales analytiques et préparatives mais aussi pour d'autres type de molécules non chirales.

- Ces dernières années, la technique de chromatographie à fluide supercritique (CFS) avec des colonnes à phase stationnaire chirale remplies a émergé rapidement comme technique analytique. Ce type de chromatographie utilise un fluide supercritique ou presque critique, tel que le CO_2, permet une séparation trois à cinq fois plus rapide qu'une HPLC classique avec des séparations équivalentes ou meilleures. Cela grâce aux propriétés de meilleure diffusivité et de moindre viscosité qu'apporte le fluide supercritique (Galaverna *et al.* 1993). Puisque la chromatographie à fluide supercritique commerciale ne cesse de s'améliorer, cette technique devient parfois le choix prioritaire pour les purifications et énantioséparations, apportant une meilleure résolution par unité de temps, une rééquilibration de la colonne rapide et une composition de phase mobile simplifiée. Ces avantages confèrent à cette méthode un développement méthodologique, des analyses et des purifications bien plus rapides que ne le sont avec la HPLC. La possibilité unique en son genre de faire varier la force de la phase mobile en contrôlant sa densité par sa pression et sa température, sa compatibilité avec la quasi-totalité des sélectants chiraux utilisés en HPLC et chromatographie en phase gazeuse, son taux de production en chromatographie préparative, sa faible consommation en

solvants organiques et sa compatibilité avec les détecteurs de HPLC et CPG pourrait rendre ce type de chromatographie particulièrement attrayante pour les futures expériences d'exploration spatiale. Malheureusement, l'utilisation de phase mobile liquide est encore un problème pour le conditionnement et l'emploi sous des conditions drastiques et sous faibles pressions. De plus, le matériel nécessaire à l'obtention d'un fluide supercritique est actuellement rédhibitoire pour de l'analyse spatiale *in situ*.

I.4.2.b. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse permet, comme son nom l'indique, de ne plus utiliser de phase mobile liquide mais gazeuse. Ainsi, tous les problèmes de spatialisation liés à la phase liquide sont éliminés.

De plus, les avantages cumulés de la GC en font une méthode d'analyse de choix dans les laboratoires : grande efficacité à grand débit de gaz vecteur, sensibilité, outils de programmation de température, pas de nécessité d'optimisation de la phase mobile (contrairement à la chromatographie liquide où la composition et le gradient de phase mobile joue un rôle primordial) et la facilité de la coupler à des méthodes d'analyse de pointe, telle que la spectrométrie de masse (MS). L'utilisation d'un spectromètre de masse en tant que détecteur pour la CPG a été possible beaucoup plus tôt que pour la chromatographie en phase liquide puisque les premiers couplages CPG-SM ont été mis au point par Roland Gohlke et Fred McLafferty dans les années 1950.

Comme son nom l'indique la CPG-SM se compose d'un chromatographe en phase gazeuse et d'un spectromètre de masse. La CPG est composée d'un injecteur et d'un four à programmation de température, contenant une colonne, de nos jours généralement capillaire, enduite d'une phase stationnaire choisie selon les composés à étudier. Cette colonne peut varier en longueur, diamètre, et épaisseur de la phase stationnaire. La différence d'affinité et de propriétés physiques et chimiques de chacune des molécules d'un mélange sera alors effective pour une séparation molécule par molécule de ce mélange, lorsqu'il migrera au travers de la colonne poussé par un gaz vecteur neutre (azote, hélium ou hydrogène). Le temps de rétention de chaque molécule permettra sa caractérisation, celui-ci étant identique pour chaque molécule dans des conditions similaires. Chaque molécule éluée est alors envoyée dans le détecteur, en l'occurrence un spectromètre de masse, maintenu dans un vide poussé. Les molécules seront alors ionisées par impact électronique (mode de ionisation le plus courant) ou ionisation chimique, fragmentées, et séparées en fonction du ratio masse sur charge m/z par un quadripôle ou une trappe d'ion. Le signal de chaque ion est ensuite amplifié par une série de dynodes qui permettent alors d'obtenir pour chaque molécule séparée en chromatographie un spectre de masse caractéristique. Chaque molécule se fragmentera selon un schéma répétable et prédictible pour une même énergie d'ionisation. Cette énergie est généralement de 70eV. La masse étant une propriété intrinsèque d'une molécule donnée, l'analyse du spectre de masse de l'ion parent ainsi que des fragments ionisés obtenus permet l'identification de la molécule mère.

En outre, le couplage CPG-SM permet de diminuer la limite de détection moyenne jusqu'au picogramme. Ce qui est un autre avantage non-négligeable de cette méthode (Figure I.4-2).

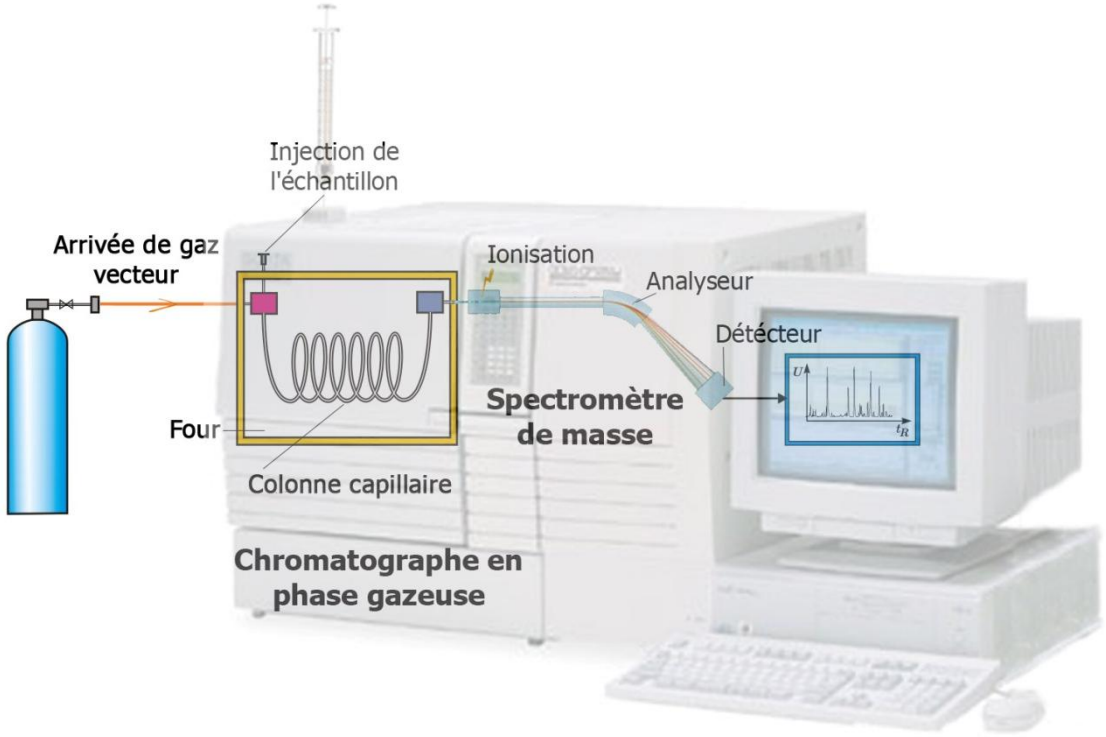


Figure I.4-2 : principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Entre autres exemples d'utilisation de la CPG-SM, les considérations chirales sont parties intégrantes de nombreuses recherches: pharmacologie, parfumerie, cosmétique et exobiologie. La chromatographie énantiosélective est devenue l'outil le plus important pour permettre de résoudre avec précision les énantiomères optiques de molécules telles qu'auxiliaires et intermédiaires métaboliques, précurseurs, médicaments, pesticides, fongicides, herbicides, phéromones, flaveurs et fragrances. Dans un contexte de mises en évidences successives des relations chiralité-activité d'une molécule, et ainsi de législation de plus en plus contraignantes sur la pureté des énantiomères, la chromatographie énantiosélective sur phase stationnaire chirale est devenue l'outil majeur de détermination de la pureté optique des molécules organiques. La CPG-MS est maintenant une technique établie pour la chimie analytique, et en particulier pour l'exploration spatiale.

Grâce à sa puissance d'analyse apportée par la SM, et au pouvoir séparatif important de la CPG, le couplage CPG-MS permet l'analyse de mélanges multi-composants d'énantiomères. Ce couplage permet alors une interprétation précise des spectres, ainsi qu'une détection et analyse possible de molécules même en cas de co-élution ou d'élution rapprochée.

Cependant, la CPG est restreinte aux molécules volatiles, et thermostables. Pour outrepasser cette contrainte, les molécules réfractaires doivent être fonctionnalisées (dérivatisées) avant leur

injection en CPG. En effet, les groupements nucléophile contenant des hydrogènes labiles (=NH, NH_2, OH, COOH, SH etc.) ont tendance à interagir avec la matrice, la colonne chromatographique (adsorption) ou plus simplement former des liaisons hydrogène faibles intra ou intermoléculaires ce qui a pour conséquence de diminuer leur volatilité. Afin de palier à ces problèmes, les liaisons les plus polaires doivent être inactivées. Ces groupements sont alors chimiquement convertis en espèces chimiquement moins réactive, ce qui permet :

- d'améliorer la résolution et de réduire les "trainées" (asymétrie des pics chromatographiques) des composés polaires.
- d'améliorer l'efficacité analytique et de diminuer les limites de détection
- d'améliorer la stabilité des composés analysés
- d'analyser des composés non volatils

Ce dernier point permet une analyse des solutés à des températures plus basses, ce qui est relativement important compte tenu que les phases stationnaires chirales sont sensibles à la racémisation à haute température. La fonctionnalisation chimique est donc une étape importante pour l'étude des composés à haute température d'ébullition.
Enfin, il est important de souligner que les réactions de fonctionnalisation ne changent pas la structure initiale de la molécule. Cela signifie que l'on préserve l'information structurale du soluté analysé.

I.4.3. Spatialisation de la technique d'analyse *in situ*

Parmi toutes les techniques d'analyses énumérées, seule la chromatographie en phase gazeuse remplit le cahier des charges de la spatialisation.

Les appareils d'analyses spatiales *in situ* doivent répondre à des exigences particulières relatives aux environnements et aux conditions d'analyse auxquels ils seront soumis ainsi qu'a leurs conditions de spatialisation (décollage, voyage et atterrissage). Ils doivent faire preuve d'une résistance accrue aux chocs et vibrations, d'une simplicité de construction, d'une automatisation de tout le processus, d'une miniaturisation (petite taille et faible masse) et d'une faible consommation d'énergie. Des exigences additionnelles sont nécessaires pour l'étude analytique elle-même dans des conditions spatiales. Il faut en effet considérer les paramètres suivants :

- le peu de temps alloué à l'étude,
- la faible teneur (potentielle) en composés cibles des échantillons (c'est notamment le cas sur Mars)
- l'importance d'obtenir une forte sensibilité et précision
- un temps de réaction court
- une simplicité d'utilisation
- un nombre limité d'étapes lors de l'analyse
- une automatisation totale de toutes les opérations avec un contrôle à distance des opérations

- une fiabilité de la technique sous toute forme de condition spatiale extrême (à pression atmosphérique autant que sous un vide poussé ou sous fortes pressions, à des températures variant de -100 à +500°C) (Akapo *et al.* 1999).
- une faible quantité de consommables, avec en plus de bonnes capacités de conservation (stabilité sur le long terme), idéalement une limitation dans l'utilisation de liquides – puisqu'il est difficile de conserver et d'utiliser des liquides dans des conditions spatiales – est requis.
- la non-contamination des autres expériences embarquées.

Actuellement seule la chromatographie en phase gazeuse avec comme détecteur la spectrométrie de masse rempli amplement ces conditions d'instrumentation spatiale. D'autre type de détecteurs tel que les détecteurs à conductivité thermique (TCD) répondent aussi aux critères de spatialisation mais n'ont pas non plus les mêmes performances analytiques.

La spectrométrie de masse est donc un puissant instrument d'analyse spatiale, pour le moment, le plus adapté à l'exploration spatiale. A cela s'ajoute l'héritage spatial de la CPG-MS. En effet, cette technique d'analyse bénéficie d'une longue histoire dans les missions spatiales. Cela fait de la CPG-SM une méthode d'analyse particulièrement fiable. En effet, les instruments de vol se doivent d'avoir été testés et optimisés sur plusieurs années en conditions terrestres pour garantir leur absolue fiabilité. Les CPG portables pour la recherche spatiale ont été développés depuis 1962 pour l'exploration lunaire (Oyama *et al.* 1962). Depuis les techniques ont été améliorées et les futurs instruments bénéficient à la fois des progrès des instruments commerciaux mais aussi du retour d'expérience en milieux extraterrestres. Les améliorations encore possible de cette technique, ainsi que ses couplages en amont (réacteur de fonctionnalisation) et aval (détecteurs), permettront de satisfaire le nouveau mantra de la NASA : « faster, better, cheaper » pour les instruments de vol, et les scientifiques sont confiants sur les futurs succès apportés par cette méthode (Brazhnikov *et al.* 1971).

Les missions spatiales embarquant de la CPG-SM

Mars, le passé : les missions Viking

Depuis les années 1970, la chromatographie en phase gazeuse a été employée à plusieurs reprises avec succès lors de missions spatiales. Ainsi, lors des missions martiennes américaines Viking en 1976 (Figure I.4-3), chacun des deux atterrisseurs embarquaient entre autres instruments une CPG-SM pour la détection de molécules organiques, et une CPG pour des expériences biologiques destinées à découvrir une potentielle vie microbienne martienne.

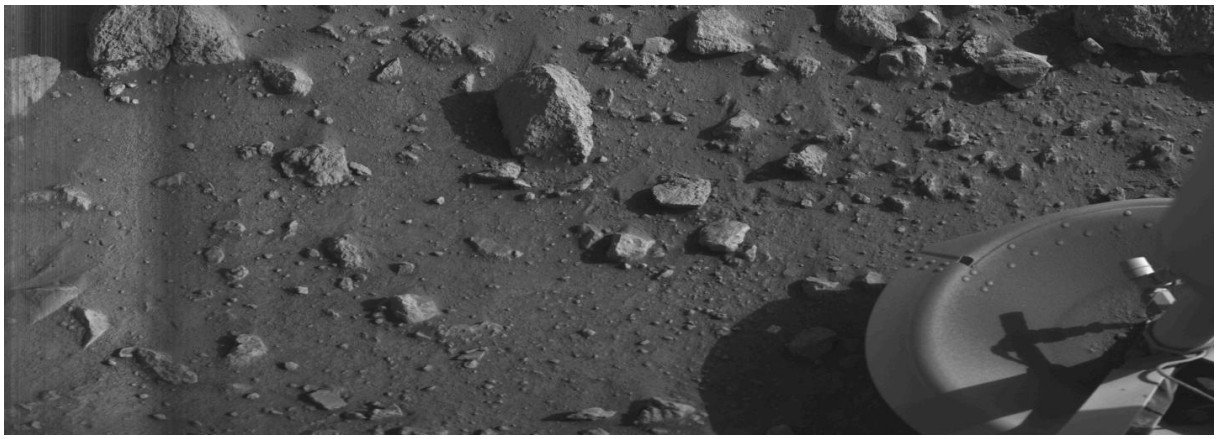


Figure I.4-3 : 1ère photo de la surface de Mars, prise par l'atterrisseur Viking-1 peu après son atterrissage dans Chryse Planitia, le 20 juillet 1976.

Vénus

Plusieurs missions pour Vénus ont également embarqué de la chromatographie en phase gazeuse. En 1978, à la suite de Viking, une mission vers Venus, Pioneer, embarquait elle aussi une CPG destiné à déterminer la composition de la basse atmosphère Vénusienne. La même année, la CPG de la mission Vénéra 12 analysait également la composition de l'atmosphère à la surface de Vénus. Les résultats de cette dernière ont pu être comparés avec succès à ceux obtenus par la mission Pioneer.

Quelques années plus tard, en juin 1985, les vaisseaux Vega 1 et 2 ont également survolé Vénus. Ils ont alors largué deux modules destinés à l'analyse de l'atmosphère et du sol de la planète. Chacun des atterrisseurs (Vega-1 et Vega-2) était freiné par un ballon pour une descente d'environ 1h à travers l'atmosphère. La conception du CPG à bord de chacune des deux sondes a été réalisée par Mukhin (Mukhin *et al.* 1987) (Figure I.4-4) pour l'analyse des gaz et aérosols de la couche de nuages de Vénus (60-55 km d'altitude). De même que les unités de CPG à bord de Vénéra, trois sous-unités CPG étaient arrangées en parallèle, chacune avec une colonne connectée à un détecteur différent.

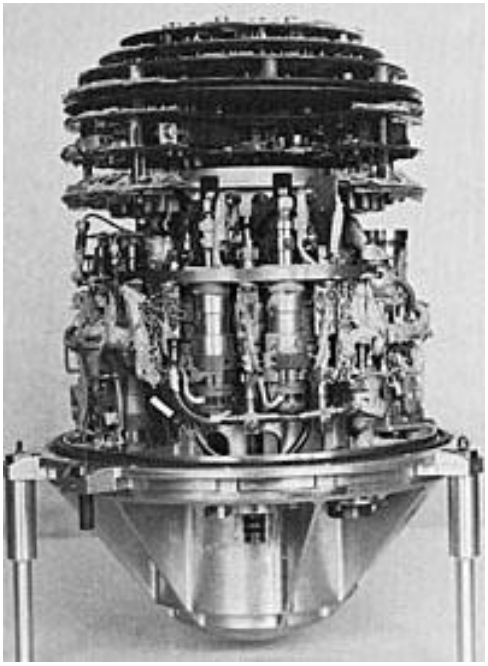
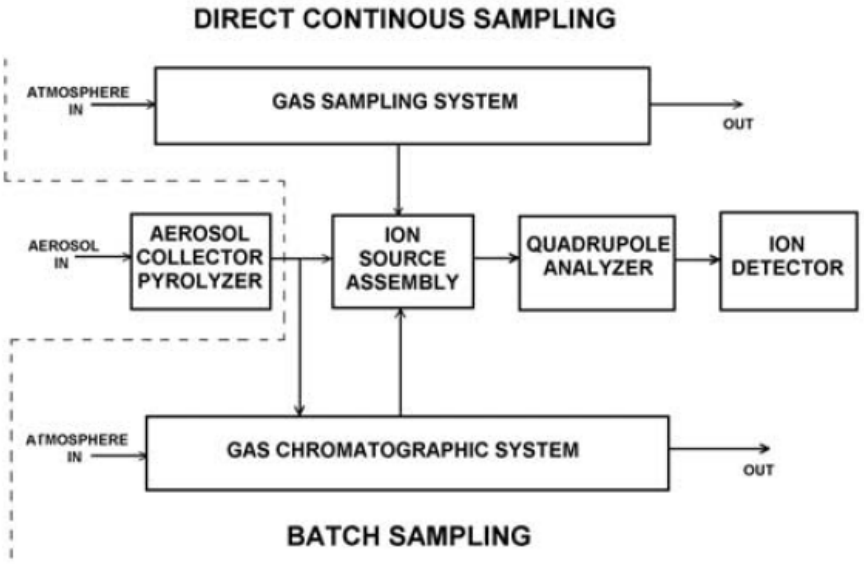


Figure I.4-4 : Le chromatographe en phase gazeuse Sigma-3 des modules atterrisseurs des missions Vega-1 et Vega-2.

Titan

Plus récemment, en 2004, une analyse par CPG-SM de l'atmosphère du plus gros satellite de Saturne, Titan, a également été réalisée sur la sonde Huygens. A bord de la sonde Huygens, six instruments scientifiques étaient présents pour prendre des mesures durant la descente, pour fournir des détails sur la composition chimique de l'atmosphère de Titan, ses nuages, ses conditions climatiques et son sol. Parmi les instruments, un CPG-SM était censé identifier et quantifier de nombreux constituants atmosphériques durant la descente, et mesurer la composition de la surface de Titan au lieu d'impact, avec une sensibilité de 10 à 100 ppb (Figure I.4-6). Le CPG-SM consistait en un système d'échantillonnage, un apport en gaz vecteur (hydrogène), un assemblage de colonnes chromatographiques et un spectromètre de masse. Le système d'échantillonnage des gaz comportait 3 entrées : une pour une analyse directe de l'atmosphère par SM, une pour l'analyse CPG-SM et une troisième pour l'analyse des produits gazeux de l'expérience ACP (Aerosol Collector Pyrolyser) (Israel *et al.* 2005). L'expérience ACP consistait en un chauffage jusqu'à 600°C des échantillons de gaz collectés, puis en l'analyse des produits de dégradation de ces échantillons pyrolysés. L'assemblage de colonne était constitué de 3 colonnes fonctionnant en parallèle (Akapo *et al.* 1999). Chaque colonne était connectée à une source ionique indépendante en spectrométrie de masse. Le détecteur quadrupolaire du spectromètre de masse opérait de 2 à 141 amu. L'instrument pouvait être soit couplé au CPG, soit les échantillons étaient directement injectés en spectrométrie de masse indépendamment (Figure I.4-5).

a)



b)

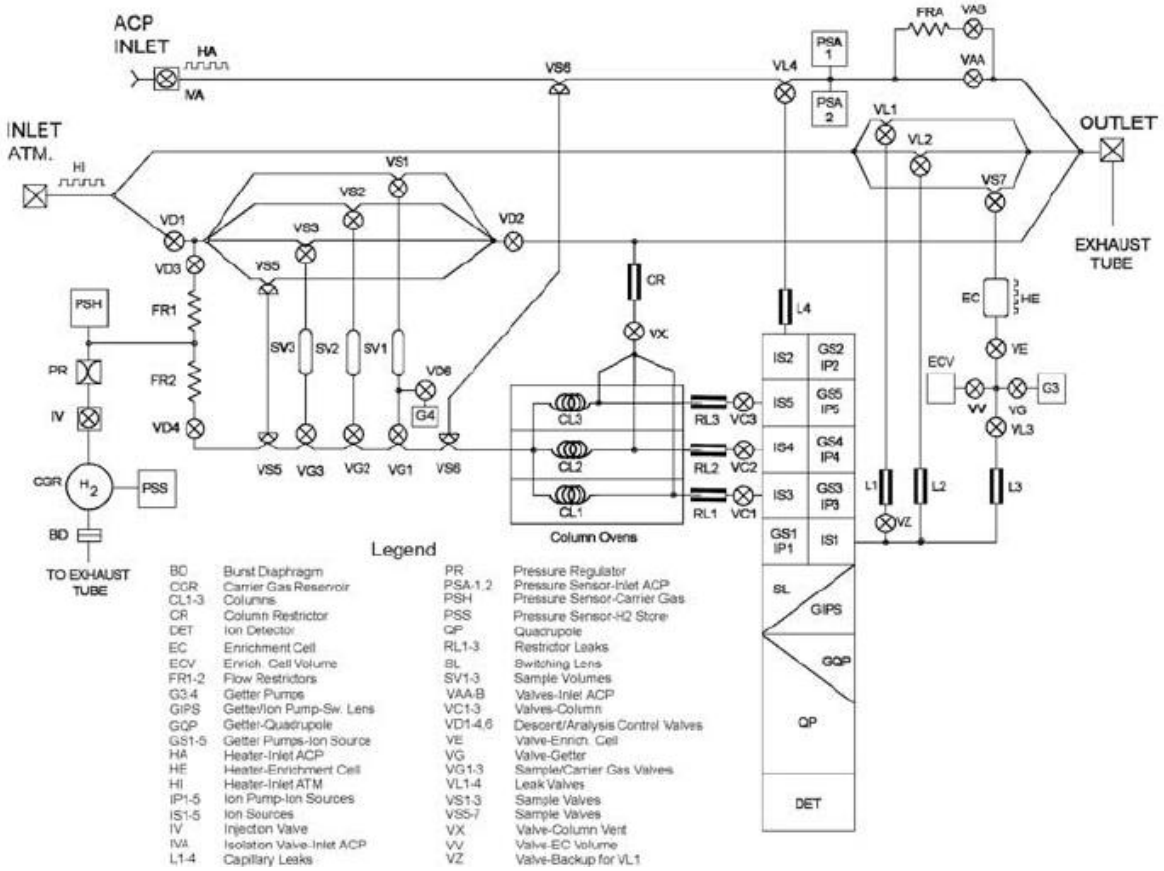


Figure I.4-5 : schéma simplifié (a) puis détaillé (b) du chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse, sur la sonde Huygens. Les différentes voies d'entrée correspondant aux différentes expériences sont détaillées (Niemann *et al.* 2002).

Pour de nombreuses substances (gaz rares et molécules organiques), la limite de détection du SM était calculée à 0,1 ppb. Les colonnes capillaires utilisées dans la mission Cassini-Huygens ont été sélectionnées (Sternberg *et al.* 1999) pour leur compatibilité avec les contraintes expérimentales sévères imposées par l'expérience *in situ* : le temps d'analyse court, la stabilité de la phase stationnaire (au vide, aux rayons cosmiques, au bombardement électronique de haute énergie), la pression du gaz vecteur (1,4-1,9 bar), le flux de sortie à moins de 1m//min et l'analyse isotherme dans la gamme 30-60°C. Une première colonne carbone a été choisie pour la séparation des gaz légers de N_2 à CH_4.

Malheureusement, pendant la mission, la source ionique connectée à cette colonne n'a pas fonctionné et aucune donnée n'a pu en être extraite. Une colonne capillaire WCOT dotée d'une phase stationnaire de carbone vitreux a été choisie pour l'analyse d'hydrocarbures de faible poids moléculaire (C1-C3). Une colonne capillaire WCOT silicosteel dotée d'une phase stationnaire légèrement polaire, cyanopropyl phenyl (CPP) dimethylpolysiloxane (DMPS) a été utilisée pour séparer les hydrocarbures saturés et insaturés en C4 à C8 et les nitriles jusqu'en C4.

Malheureusement une contamination externe des colonnes a pollué les sources ioniques du spectromètre de masse et la plupart des chromatogrammes obtenus étaient difficilement exploitables du fait de la présence d'un fort bruit de fond. Pour pallier à ce problème il aurait suffit, à l'instar de ce qui est fait en laboratoire, de conditionner, à haute température, les colonnes chromatographiques avant leur utilisation.

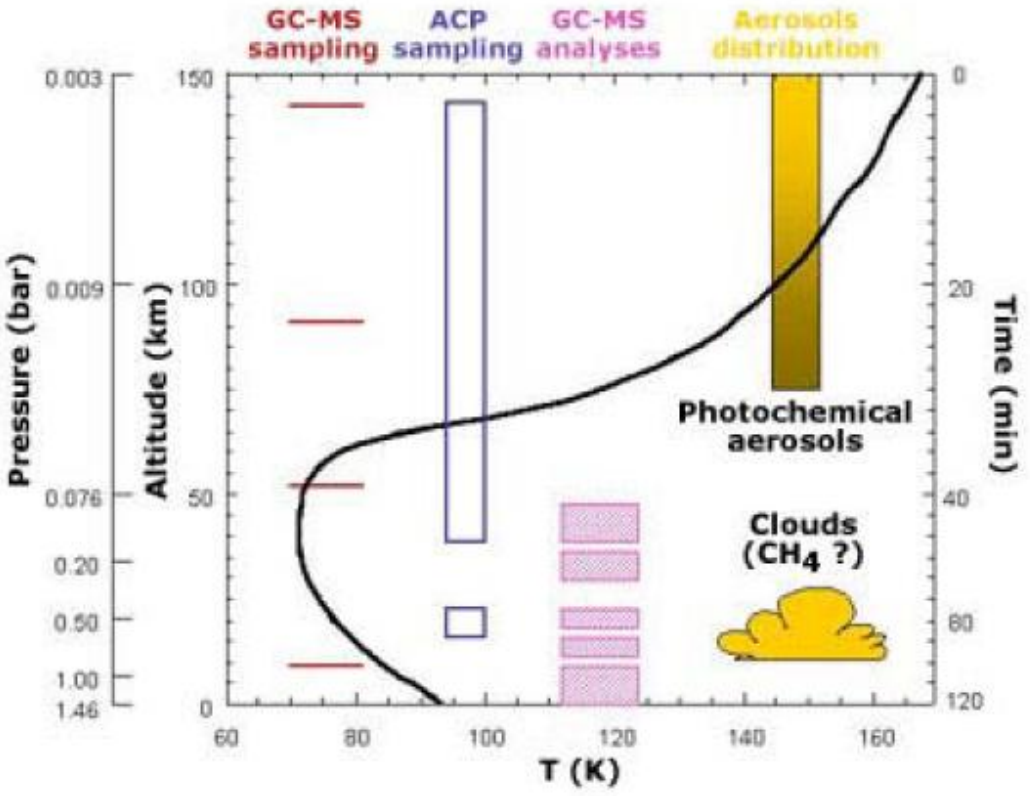


Figure I.4-6 : fonctionnement du GC-MS de la sonde Huygens ; échantillons particulaires collectés et analysés.

Les comètes

Dans un futur proche, des analyses cométaires sont programmées avec une analyse CPG-SM, notamment dans le cadre de l'expérience COSAC (COmetary Sampling And Composition) de la mission Rosetta (Figure I.4-7). Cette analyse sera précédée d'une étape de fonctionnalisation au N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA), qui n'a encore jamais été effectuée *in situ*.

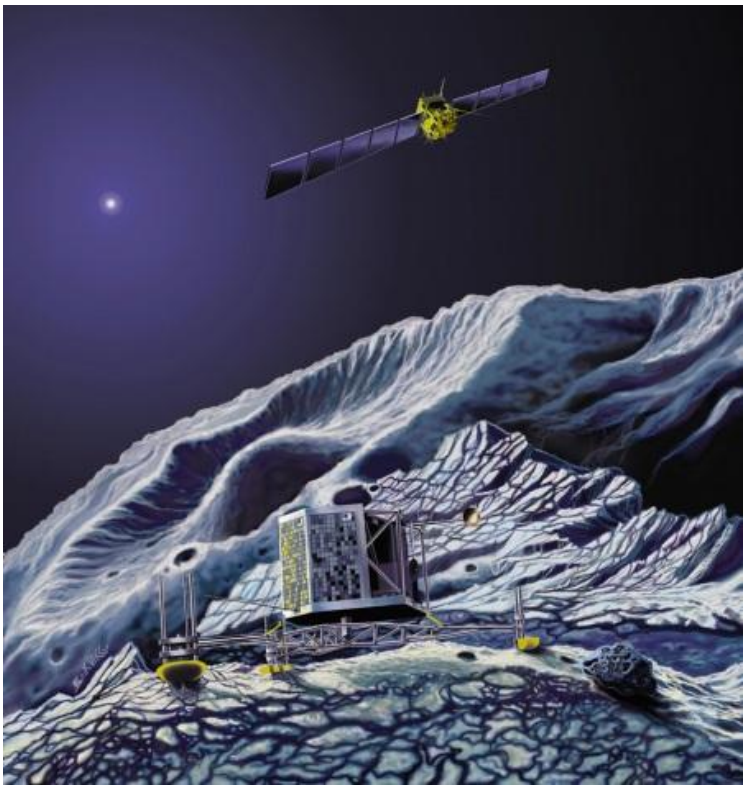


Figure I.4-7 : vue d'artiste de la mission Rosetta et de son atterrisseur Philae à la surface de la comète Churyumov-Gerasimenko.

Parmi les instruments de l'atterrisseur Philae de la mission Rosetta, l'expérience COSAC (COmetary SAmpling and Composition) est dédiée à l'analyse de la composition élémentaire et moléculaire du matériel cométaire. Pour cela, il est composé d'un chromatographe en phase gazeuse et d'un spectromètre de masse à temps de vol. COSAC est l'expérience scientifique la plus récente impliquant un chromatographe en phase gazeuse a avoir été envoyée dans l'espace. Son rôle principal est d'analyser les gaz produits durant le chauffage d'échantillons solides collectés par Philae en surface de la comète. Les échantillons seront préparés selon deux protocoles différents. D'abord, un simple chauffage et une pyrolyse de l'échantillon. Ce traitement évaporera toutes les espèces volatiles présentes dans les glaces et cassera les molécules les plus réfractaires en fragments volatiles. Additionnellement, une procédure de fonctionnalisation antérieure a l'analyse sera pratiquée. Utilisée pour la première fois dans une expérience spatiale, cette procédure repose sur une méthylation des espèces possédant un hydrogène labile, tels les acides aminés. Cette procédure a été développée par Meierhenrich (Meierhenrich *et al.* 2002) à l'université de Brême et utilise le DMF-

DMA en tant qu'agent de fonctionnalisation. Les gaz obtenus après ces deux types de traitement seront ensuite injectés dans une colonne chromatographique par un système de boucle d'injection. Les échantillons obtenus peuvent être injectés jusque dans 4 colonnes simultanément pour permettre des analyses parallèles sur différents types de colonnes. Dans le but d'analyser la gamme la plus étendue possible de composés, notamment les gaz nobles et les nombreuses espèces organiques, le CPG de COSAC contient 8 différentes colonnes chromatographiques connectées en tandem (Figure I.4-8). Trois des colonnes, développée à l'université de Brême, sont dévolues spécifiquement à la séparation d'espèces énantiomériques. Les huit colonnes sélectionnées permettent la séparation d'une grande variété de composés tels que les gaz nobles, les composés polyaromatiques, les composés chiraux tels les hydrocarbures aliphatiques chiraux ou les acides aminés. La configuration instrumentale et les conditions opérationnelles de COSAC lui permettent de détecter entre 10^{-11}-10^{-12} moles de matière. Il devrait apporter des informations importantes à la planétologie, l'exobiologie et la chimie cométaire.

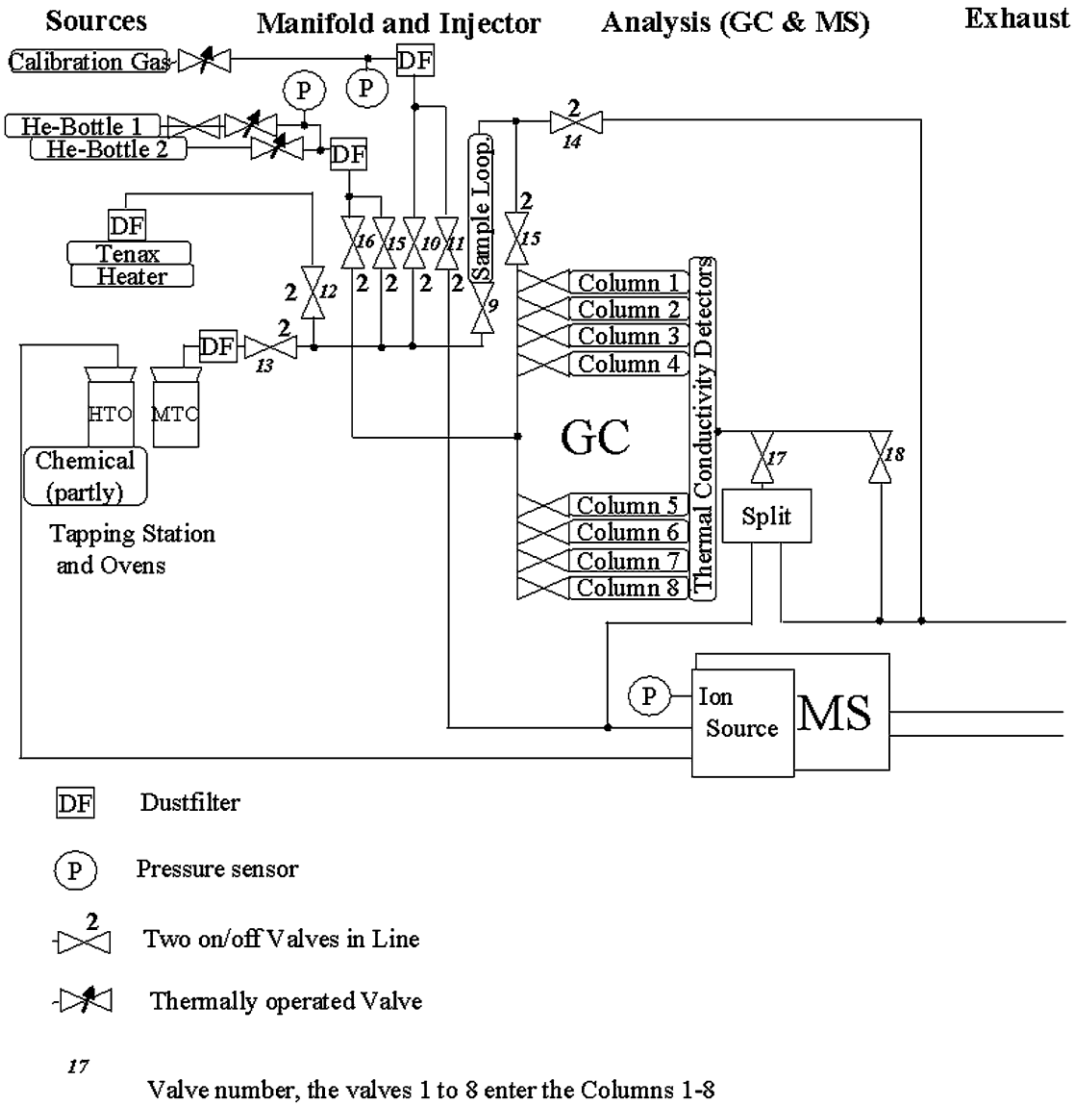


Figure I.4-8 : principe de l'expérience COSAC. HTO = High Temperature OVen, MTO = Medium Temperature Oven. De Goesmann (Goesmann *et al.* 2007).

Mars, le futur : MSL et Exomars

Les futures missions martiennes américaines Mars Science Laboratory (MSL) et européennes Exomars permettront de concrétiser la pertinence et la potentialité d'une analyse CPG-MS précédée d'une fonctionnalisation, pour la détection potentielle de faibles quantités de molécules d'intérêt jusqu'alors invisibles aux appareillages et méthodes utilisées.

MSL

Basé sur l'intérêt qu'apporte la planète Mars et la présence potentielle de vie passée ou présente, le prochain robot Martien, Mars Sample Laboratory (MSL) est prévu pour voyager vers Mars en 2011. L'objectif scientifique principal est de collecter des échantillons de sol et de roches martiens et de les analyser quant à leur teneur en composés organiques. Un des instruments, Sample Analysis at Mars (SAM), est un Pyr/CPG-SM, dédié à l'analyse des composés organiques et inorganiques présents dans l'atmosphère, à la surface et dans le sous-sol martien.

La température du four s'élève à 1100°C, dans le but d'analyser les gaz produits par les molécules modérément réfractaires. La phase gazeuse ainsi obtenue par chauffage sera alors délivrée au système de CPG. Ce système est composé de six colonnes capillaires connectées en parallèles. Ces six colonnes ont été choisies pour permettre une séparation d'une gamme étendue de composés organiques supposés être présents sur Mars. Chaque colonne est couplée à son propre détecteur, un détecteur à conductivité thermique, capable de détecter tout type de composé organique sans le détruire, ainsi qu'au spectromètre de masse de l'expérience globale. Dans le cas de molécules fragiles (facilement dégradées en pyrolyse) ou réfractaires, qui ne peuvent être analysées par chauffage, une réaction de fonctionnalisation est réalisée (Rosenbauer *et al.* 1999). Cette technique incorpore un réactant chimique (Meunier *et al.* 2005)pour convertir les molécules en espèce analysables, tout en conservant leur information structurale. La réaction de silylation a été adoptée comme procédure pour l'analyse de ces composés, grâce à ses performances chimiques et à son adéquation avec les conditions spatiales (Rodier *et al.* 2001). Cette procédure de silylation en une étape, lors de laquelle l'extraction et la fonctionnalisation sont réalisés dans un seul et même dispositif, a été développée au LGPM et au LISA (Buch *et al.* 2009). Des tests en laboratoire ont montré qu'il était possible de détecter de cette manière de détecter la majorité des composés organiques dans des échantillons d'analogues martiens (Buch *et al.* 2006). L'expérience SAM pourrait alors permettre de réaliser une étude chimique complète du sol martien, notamment en répertoriant exhaustivement la matière organique. Cela apportera des informations essentielles sur la possibilité de vie sur Mars.

Exomars

Depuis le début du siècle, un programme spatial fourni a été établi afin d'avoir une idée plus précise de l'évolution de Mars par rapport à celle de notre planète. Les découvertes effectuées par la mission Mars Express en 2004 (présence de grandes quantités de glace d'eau et de dioxyde de

carbone au pôle sud de Mars), par les robots Spirit et Opportunity en 2004 (minéraux ne pouvant être formés que dans des bassins d'eau liquide) ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'existence d'une forme de vie passée ou présente sur Mars. Pour ces raisons, la recherche des molécules organiques et de leur excès énantiomérique sur Mars est d'un intérêt primordial pour comprendre l'origine de la vie. Ainsi, les méthodes chromatographiques qui permettent la détection de composés organiques optiquement actifs et de quantifier les excès énantiomériques des molécules clés ont été développées (Zampolli *et al.* 2007) dans le cadre des prochaines sondes spatiales. Suite à la mission américaine MSL, l'agence spatial européenne (ESA) a programme un robot pour le début de la prochaine décennie. Cette mission, appelée Exomars (Figure I.4-9), permettra la caractérisation du sol martien par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse précédée d'une fonctionnalisation chirale. L'objectif sera donc la recherche de la chiralité du matériel organique, en tant qu'indice de vie à la surface et sous la surface de Mars.

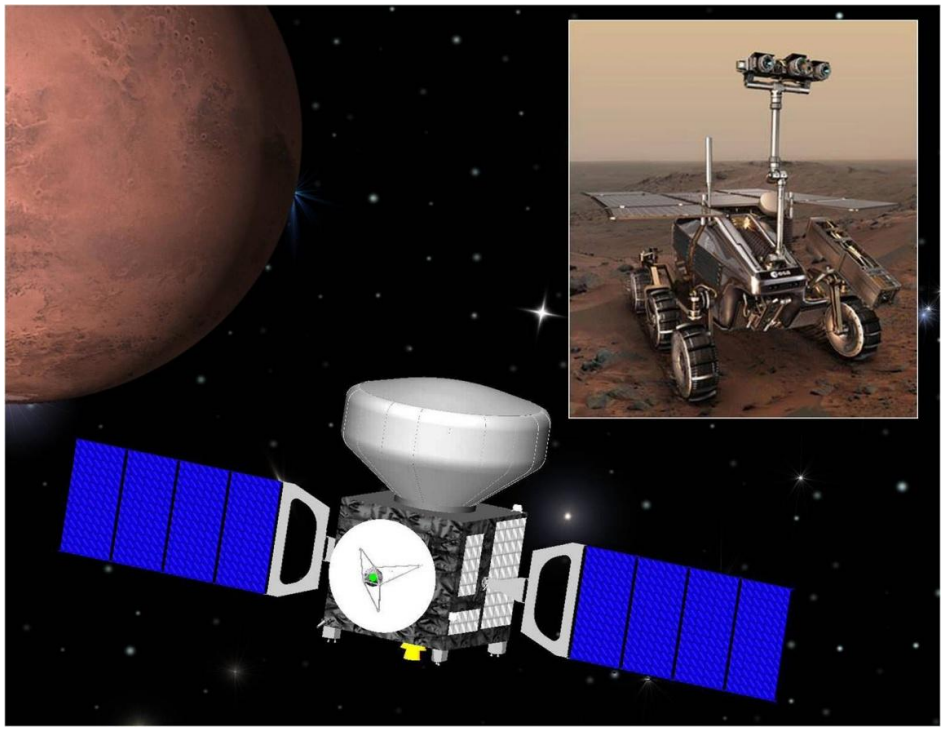


Figure I.4-9 : vue d'artiste de la mission Exomars et gros plan sur son robot Pasteur.

I.5. Les colonnes chromatographiques

Comme déjà dit précédemment, le cœur de l'analyse chromatographique sont ses colonnes. C'est grâce aux colonnes que les composés d'un mélange complexe peuvent être séparés.

En fonction du type de composé à séparer il existe différents types de colonnes chromatographiques. Il est tout d'abord possible de classer les colonnes chromatographiques en fonction de leur mode de fabrication puis en fonction de la composition de la phase stationnaire. Il existe deux grands types de colonnes en CPG : les colonnes remplies ou à garnissage (packed) et les colonnes capillaires (open tubular) (Figure I.5-1).

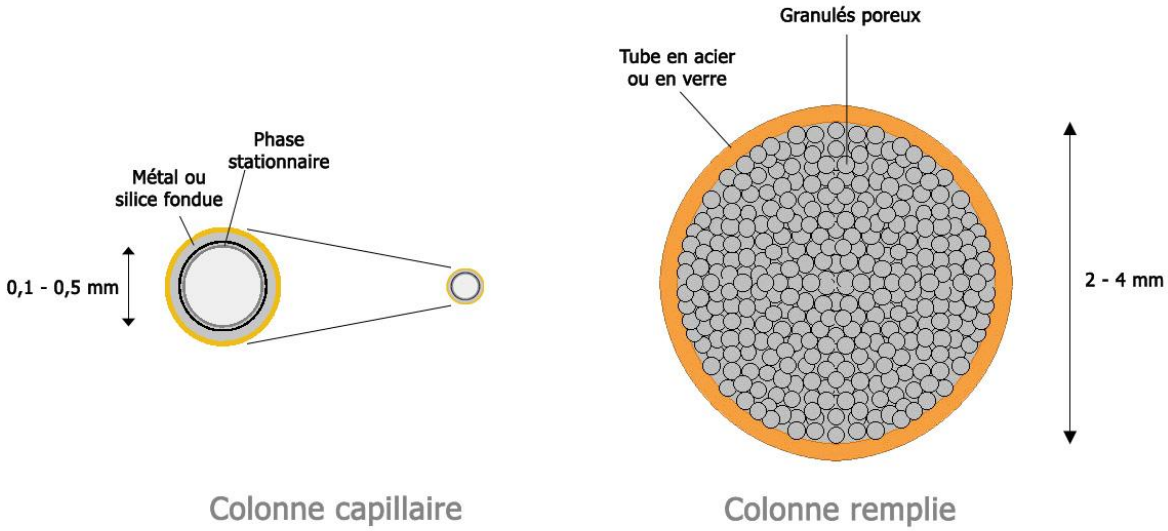


Figure I.5-1 : représentation à l'échelle d'une colonne chromatographique capillaire vs. remplie. Les colonnes remplies, encore utilisées pour l'analyse de gaz, mesure en général de 1 à 6 m, alors que les colonnes capillaires ont une longueur de 10 à 100 m.

Les premières sont constituées d'un matériel de remplissage qui peut être un adsorbant solide on parle de chromatographie Gas-Solide (GSC) ou d'un gel de silice de très faible volatilité, on parle de chromatographie Gas-Liquide (GLC). Les secondes sont les colonnes capillaires. Aujourd'hui, la quasi-totalité des colonnes utilisées sont des colonnes capillaires. Dans ce type de colonnes, les parois internes de la colonne sont recouvertes, ou liées chimiquement à la phase stationnaire, sous forme d'un film régulier de 0,1 à 8 µm d'épaisseur. Les principaux avantages de telles colonnes sont une grande efficacité, un faible débit et une faible capacité d'échantillon. Les premières colonnes chromatographiques utilisées en analyses spatiales étaient de type colonnes remplies. Aujourd'hui, les colonnes capillaires de type PLOT sont employées, ayant un meilleur processus d'immobilisation avec couplages covalents et copolymérisations. Cela leur permet de résister au voyage spatial, principalement aux vibrations du décollage.

Les phases stationnaires peuvent être constituées d'un sélecteur chiral ou achiral. Les colonnes chirales ont été développées spécifiquement pour la séparation énantiomérique.

I.5.1. Les colonnes chromatographiques achirales

Les premières colonnes composées de polymères poreux ont été utilisées par Baum en 1963 (Baum 1963) pour l'étude des caractéristiques thermodynamiques des polyethylènes microporeux en tant que milieu absorptif pour la séparation des alcools, cétones, acétate, paraffines et composés aromatiques. En 1966, Hollis (Hollis 1966; Hollis 1973) a développé des colonnes de polymères poreux pour la séparation des constituants atmosphériques martiens. Ces polymères disposaient d'une bonne résolution pour une large gamme de composés. De plus, ces billes de polymères étaient

mécaniquement stables, résistantes au vide, aux radiations et à des fortes températures allant jusqu'à 250°C. Les premiers résultats promettaient des implications importantes dans la recherche spatiale, et ce type de colonne a donc été naturellement utilisé pour les missions spatiales Viking, Pioneer et Vega.

Novotny (Novotny *et al.* 1975) a développé une colonne Poly MPE-Tenax, pour l'exploration spatiale, notamment pour l'étude de possibles composés martiens sur l'atterrisseur Viking en 1976. Toutes ces colonnes remplies, aussi bien fussent-elles pour l'exploration spatiale ou a but plus commercial, sont aujourd'hui désuètes pour les futures analyses ; en effet, leur temps d'analyse trop élevé et leur manque de sélectivité des mélanges complexes ne sont pas compatibles avec les exigences de plus en plus aigues de la chromatographie. C'est pourquoi de nouvelles colonnes ont fait leur apparition. il s'agit des colonnes capillaires, inventées dès 1957-1958 par Golay (Golay *et al.* 1958) mais limitées en développement suite notamment à un brevet qui a rendu leur étude délicate jusqu'en 1977.

Parmi les colonnes capillaires on distingue les colonnes PLOT (Porous-Layer Open-Tubular), dont la paroi interne est recouverte d'un solide adsorbant poreux, les colonnes SCOT (Support-Coated Open Tubular), dont la phase stationnaire liquide est imprégnée sur un film mince d'un matériau support solide lié à la paroi interne, et les colonnes WCOT (Wall-Coated Open Tubular), dont la paroi interne est recouverte d'une phase stationnaire liquide (Figure I.5-2).

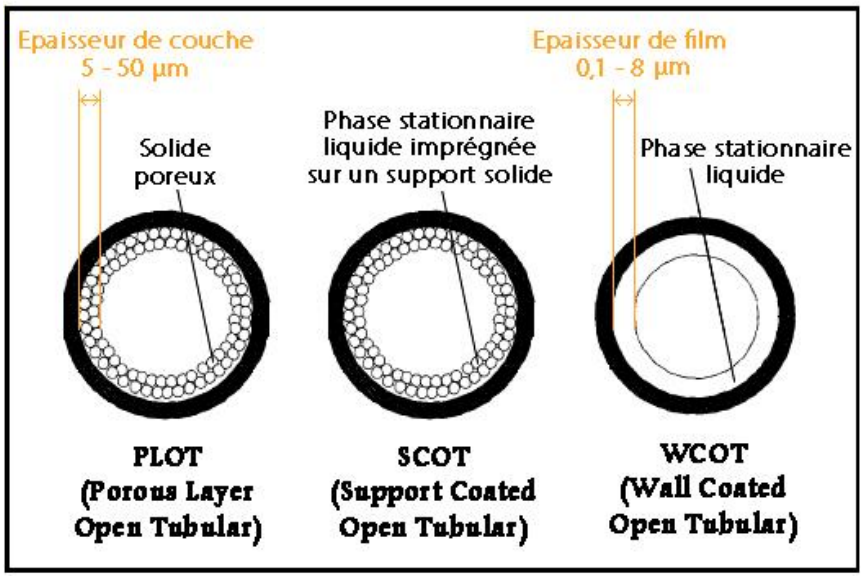


Figure I.5-2 : les différents types de recouvrement en phase stationnaire des colonnes capillaires.

Cependant, les colonnes capillaires achirales, aussi performantes qu'elles soient, ne permettent pas de séparation énantiomérique. C'est pourquoi des phases stationnaires à fort potentiel de séparation chirale ont été développées.

I.5.2. Les colonnes chromatographiques chirales

En chromatographie chirale, le processus de reconnaissance énantiosélective concerne la formation de complexes diastéréomériques labiles entre l'analyte et le sélecteur qui provoque la discrimination chirale. Des informations cruciales au sujet du mécanisme de séparation chromatographique peuvent être obtenues à travers la modélisation moléculaire, la chimie quantique et toutes ces techniques de calculs qui, de nos jours, constituent des pratiques utiles et précieuses pour l'exploration des modèles atomiques de l'énantiosélectivité. Les recherches théoriques ont pour but d'étudier les phénomènes et les mécanismes de reconnaissance chirale dans les colonnes en utilisant les méthodologies de la chimie théorique et de la statistique (Figure I.5-3).

Les figures représentent des exemples typiques d'arrangements à plus basse énergie entre un sélecteur (Whelk-O1) de colonne chirale et un ligand. Dans ces types de calculs en modélisation moléculaire, les interactions entre la phase stationnaire et les ligands sont calculées directement (Del Rio *et al.* 2004).

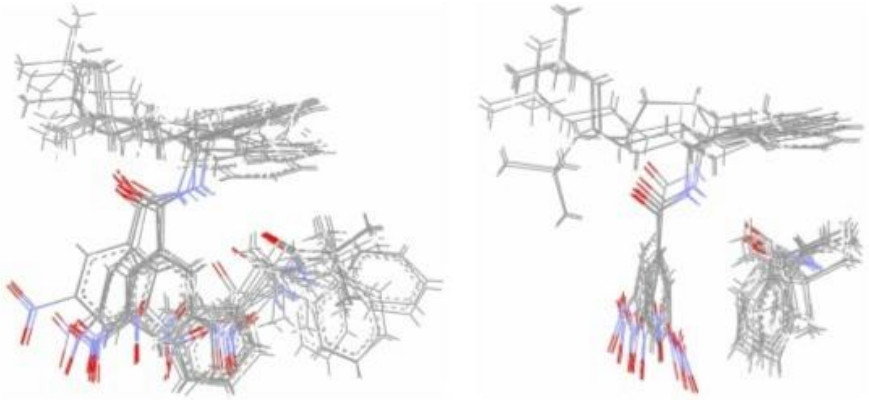


Figure I.5-3 : A gauche, sont représentés les arrangements obtenus avec l'énantiomère qui forme les complexes les moins stables avec la phase stationnaire chirale (premier élué de la colonne). A droite, les arrangements les plus stables avec le deuxième élué.

Le mécanisme de reconnaissance diastéréomérique entre la phase stationnaire et le ligand peut être étudié aussi en utilisant toutes les méthodes, qui ne calculent pas directement les interactions entre la phase stationnaire et les ligands. Ceci inclut le calcul statistique, le traitement des données et en général toutes les méthodes QSER (relations quantitatives structure énantiosélectivité) et QSRR (relations quantitatives structure rétention).

A l'origine, les phases stationnaires chirales ont été développées pour effectuer des séparations préparatives, utilisées comme alternative aux synthèses énantiosélectives compliquées. Cependant, ces préparations nécessitent une capacité de chargement particulièrement élevé et une très forte sélectivité pour un faible nombre de composés voir une seule molécule. Dans le cas d'une séparation énantiomérique de molécules organiques d'intérêt exobiologique, c'est l'inverse qui est requis, à savoir une très bonne sélectivité sur une large gamme de composés, et une faible capacité

de chargement. De ce fait, les stratégies de recherche d'une phase stationnaire optimale seront différentes.

L'idée d'une séparation directe de dérivés énantiomériques d'acides aminés par une phase stationnaire chirale non-racémique a d'abord été avancée par Gilav et al. (Gilav *et al.* 1966). Leur *credo* était que « Si la nature peut le faire, nous aussi ». En effet, il est largement montré que les enzymes peuvent différencier les énantiomères d'une même molécule. Il devenait donc évident que l'on pouvait créer des molécules capables elles-aussi d'interagir différemment avec les énantiomères d'un mélange racémique, pour ainsi les différencier lors d'un passage dans une colonne chromatographique. Cette première tentative de différentiation énantiomérique par GC a été brillamment réalisée sur une colonne capillaire recouverte d'un dérivé d'acide aminé, le L-N-trifluoroacetyl isoleucine lauryl ester, pour différencier des énantiomères d'un mélange racémique de N-trifluoroacetyl α-amino acid ester (Gilav *et al.* 1966). Depuis lors, plus de 24 000 séparations énantiomériques en GC impliquant plus de 8000 composés chiraux ont été documentés dans plus de 2400 publications (Koppenhoefer *et al.* 1994).

Les colonnes chirales sont différenciées par leur mode de reconnaissance sélecteur-sélectant ; les ponts hydrogène, la complexation et l'inclusion sont les trois méthodes les plus utilisées pour la séparation d'énantiomères. Cependant la multitude des composés chiraux rend impossible l'existence d'un sélecteur chiral universel et impose de procéder, sans cesse, à la mise au point de nouvelles phases optiquement actives.

Pour résumer, Les phases stationnaires peuvent être classées en trois grandes catégories :

a) Les phases stationnaires complexes

La synthèse de ces phases a été développée par V.S. Schürig (Schurig 1983), est applicable aux mélanges racémiques ne pouvant être résolus sur les phases chirales à base d'amides du fait de l'absence de fonctions chimiques pouvant conduire à une interaction diastéréoisomérique. Pour la formation de complexe optiquement actif, on recourt alors aux β-dicétones et aux métaux de transition tels que Ni, Co, Rh, Eu ou Mn.

b) Les phases stationnaires dipeptidiques

Ces phases ont d'abord été synthétisées par E. Gil-Av (Gilav *et al.* 1966; Gilav *et al.* 1966). Elles renferment des aminoacides acylés et des esters dipeptidiques.

c) Les phases stationnaires à base de cyclodextrines

Introduites en 1983 par Koscielski (Koscielski *et al.* 1983), elles sont les plus utilisées en chromatographie gazeuse. Elles incorporent de nos jours une grande variété de cyclodextrines modifiées, ce qui permet la résolution d'une quantité considérable de mélanges énantiomériques. Les cyclodextrines sont généralement diluées dans un polymère adéquat, V.

Schürig (Schurig *et al.* 1988), ou plus rarement greffées sur un polysiloxane, V. Schürig (Schurig *et al.* 1990).

I.5.2.a. Ponts hydrogène

La séparation chirale par « ponts hydrogène » peut être réalisée sur des dérivés d'acides aminés chiraux non-racémiques. Les premières colonnes utilisaient, comme cité précédemment, l'ester de N-trifluoroacetyl-L-valyl-L-valine cyclohexyl. L'acide aminé C-terminal n'était pas essentiel pour la reconnaissance chirale, mais la fonction amide additionnelle l'était pour créer des ponts hydrogènes supplémentaires. Cet acide-aminé C-terminal a donc été abandonné au profit d'une amine, créant ainsi la phase diamide (Feibush 1971), plus efficace grâce à sa forte énantiosélectivité et sa polarité réduite, permettant des temps de rétention inférieurs. Alors que les sélectants chiraux étaient employés sous forme de liquides ou dans des solutions de squalane ou de polysiloxane, Frank, Nicholson et Bayer (Frank *et al.* 1977) ont fait un pas considérable en avant en pensant à lier chimiquement le sélectant valine-diamide de Feibush et Gil-Av (L-Valine-tert-butylamide) *via* la fonction amine à un squelette de copolymères diméthylsiloxane et 2-carboxypropylmethylsiloxane par un pont amidique

Le greffage covalent de la phase stationnaire à la paroi du tube et la réticulation de cette dernière ont pour effet d'augmenter sa stabilité et donc sa durée de vie. Le polysiloxane chiral en résultant, appelé Chirasil-Val (Figure I.5-4), possédait d'une part l'énantiosélectivité de l'acide aminé sélectant, et d'autre part les propriétés universellement reconnues pour la GC des polysiloxanes.

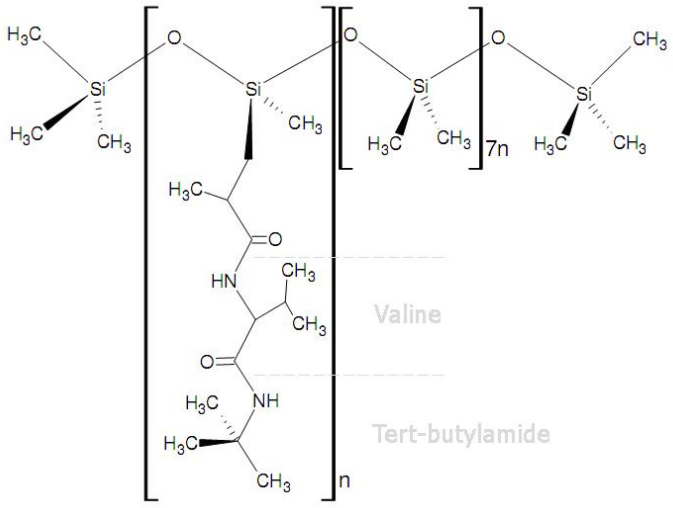


Figure I.5-4 : Structure de la Chirasil-Val™.

Les polysiloxanes ont des propriétés chromatographiques intéressantes : une gamme de température d'utilisation très étendue (350°C pour une substitution méthyle), un greffage sur le tube capillaire via des terminaisons –OH ou $–OCH_3$, une grande flexibilité du squelette siloxane qui permet une grande perméabilité aux solutés, et une grande variété de chaînes latérales qui autorise une gamme de polarité intéressante.

La GC capillaire sur Chirasil-Val, en parallèle avec le marquage énantiomérique, a changé radicalement l'intérêt de la GC et a permis aux utilisateurs de passer d'une chromatographie par échange d'ions à une chromatographie en phase gazeuse, qui était trop compliquée avant. L'utilisation de la Chirasil-Val possédant une stabilité thermique voisine de 200°C a permis à la CPG de devenir une technique sensible, précise, robuste et peu coûteuse pour les études d'énantiomères.

La colonne Chirasil-Val est commercialisée sous sa forme D ou L. Etant donné que ces deux formes vont retenir les énantiomères différemment, cela conduira à une inversion des pics chromatographiques selon la configuration de la phase stationnaire, choisie. Lors d'une analyse d'énantiomères à l'état de traces, cette propriété est indispensable pour permettre une meilleure détection en évitant la coélution par effet de "tailing" du pic de l'énantiomère en excès. Cela permet donc de détecter une racémisation mineure ou un enrichissement mineur d'une solution énantiomérique pure. Pour exemple, une population de 0,04% d'énantiomères D a été détectée dans un mélange de L-Leucine grâce à cette propriété (Koppenhoefer 1990). Malheureusement, ce détecteur valine-diamide est sujet à racémisation suite aux fortes températures et aux contaminations acides dues aux injections, conduisant à une diminution du facteur de séparation α. De plus, la séparation des énantiomères par ponts hydrogènes est donc limitée aux molécules permettant des liaisons hydrogènes. Cette propriété implique souvent une nécessité de fonctionnalisation des analytes, afin d'y ajouter des fonctions appropriées pour des liaisons hydrogènes supplémentaires. Koppenhoefer (Koppenhoefer *et al.* 1995) a apporté une modification supplémentaire au squelette chiral de la Chirasil-val, de manière à obtenir une phase stationnaire plus ordonnée, contrairement aux fragments chiraux distribués aléatoirement le long d'une colonne Chirasil-val. Une structure supramoléculaire hautement ordonnée a donc été proposée, conduisant à la phase stationnaire chirale Chirasil-Calix. Cette nouvelle phase stationnaire génère une colonne à forte efficacité au dessus de 100°C, et une stabilité thermale à des températures allant jusqu'à 200°C. Les calixarènes sont aujourd'hui considérées comme des sélecteurs synthétiques très intéressants en CPG grâce à cette importante stabilité thermale ainsi qu'à leur forme supramoléculaire (liaisons non covalentes ou faibles) de type cavité unique (Hogberg 1980).

Même si cette phase n'améliore pas la sélectivité de la Chirasil-val, et a des taux de séparation équivalents des cyclodextrines modifiées, elle est importante à prendre en compte pour des approches de montage de colonnes en série. Les applications de ces nouveaux types de sélecteurs ont été démontrées pour des séparations chirales d'acides aminés, d'alcools aminés et d'amines (Pfeiffer *et al.* 1999).

Bien que l'utilisation de ce type de colonnes de séparation chirale ait diminué ces dernières années au profit d'autres types d'interaction, les principes inhérents à la reconnaissance énantiomérique ainsi qu'à d'autres phénomènes énantiosélectifs peuvent être résolus simplement par des colonnes chromatographiques sélectionnant les composés sur un principe de ponts hydrogènes.

I.5.2.b. Complexation/coordination

La séparation chirale sur des composés métal-coordination non chiraux via complexation a permis d'étendre la CPG énantiosélective à des composés ne possédant pas les groupes fonctionnels adéquats pour créer des liaisons hydrogènes, et ainsi être séparés sur Chirasil-Val. Elle a également été étudiée pour les principes de reconnaissance chirale. Quatre processus énantiosélectifs ont été distingués (Schurig *et al.* 1992; Schurig 1996). Cette technique de séparation chirale a été utilisée dès 1977 par un dicarbonyl rhodium(I)-3-trifiuoroaceyl-(1R)-camphorate dissout dans du squalane, suite à des expériences infructueuses en 1969. La séparation énantiomérique par coordination a conduit au premier cas de chiro-dichroïsme, où des énantiomères pures rayonnaient en jaune alors qu'un mélange racémique était perceptiblement rouge-vert.

Par un traitement thermique, les phases stationnaires chirasil-métal peuvent être immobilisées sur la surface en verre ou en silice fondue. De manière accidentelle, en introduisant des insaturations sur les fragments de camphre, des nouveaux ligands ont été obtenus pour le nickel(II) (Chirasil-Nickel). La phase chirale de polymères immobilisés augment la thermostabilité des phases stationnaires chirales de type coordination, pour former des phases chirasil-metal, telles que les chirasil-nickel ou chirasil-zinc. La configuration absolue a été prédite indirectement par des règles empiriques qui corrèlent la configuration absolue et l'ordre d'élution des énantiomères appartenant à des séries de composés homologues.

Il s'agissait d'une méthode très efficace pour analyser les composés volatiles qui ne permettaient pas de liaisons hydrogènes, tels que les phéromones, flaveurs et fragrances, avant l'avènement des cyclodextrines. Même si l'utilisation de la CPG de complexation a largement diminué ces dernières années avec l'avènement des cyclodextrines modifiées, les principes inhérents de la reconnaissance énantiomérique ainsi que d'autres phénomènes énantiosélectifs peuvent être élucidés facilement par la GC de complexation.

I.5.2.c. Inclusion (cyclodextrines modifiées)

Les cyclodextrines, aussi appelées cycloamyloses, cycloglucanes ou cyclomaltooligoses, ont été isolées en 1891 par Villiers (Villiers 1891) comme produit de dégradation de l'amidon par la cyclodextrine glycosyle transférase (CGTase) provenant des bactéries *Bacillus macerans* ou *Megaterium.* Elles ont été caractérisées en 1904 par Shardinger (Schardinger 1904) comme étant

des oligosaccharides cycliques, et leur faculté à former des complexes d'inclusion a été établie par Freudenberg et Cramer en 1948 (Freudenberg *et al.* 1948).

Les cyclodextrines (CD) sont des malto-oligosaccharides macrocycliques, composés d'unités de D-glucose liés par des ponts α-(1,4) glycosidiques. Elles existent à l'état naturel en tant que glucanes solubles dans l'eau. Elles sont produites suite à une réaction de trans-glycosylation intramoléculaire lors de la dégradation de l'amidon par des cyclodextrines glucanotransférases. Ces cyclodextrines apparaissent sous trois formes α, β et γ, composées respectivement de six, sept et huit unités glycosyl liées en α-(1,4) (Figure I.5-5). Le diamètre interne variant respectivement de 570 à 950 pm (Figure I.5-6). Chaque unité glucopyranose possède une conformation rigide chaise. Ces molécules présentent une rigidité structurelle à cause de l'existence de liaisons hydrogène entre les hydroxyles des positions 2 et 3 d'unités glucoses adjacentes. Conséquence de quoi, la rotation des OH secondaires est restreinte, alors que celle des OH primaires est libre, avec pour effet une diminution du diamètre effectif de la cavité sur la face primaire (Szejtli 1982).

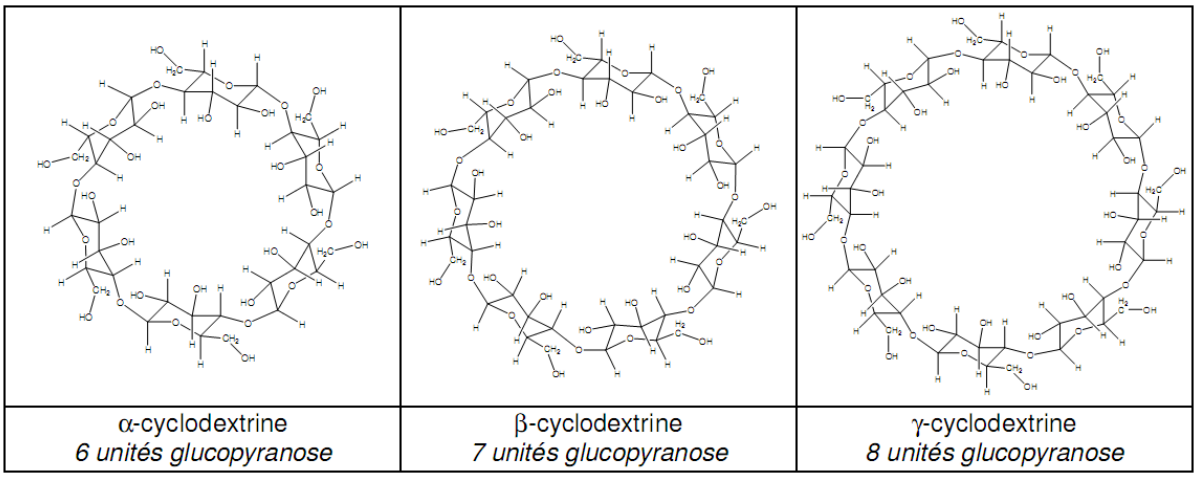


Figure I.5-5 : Formules développées de Cyclodextrine (CD).

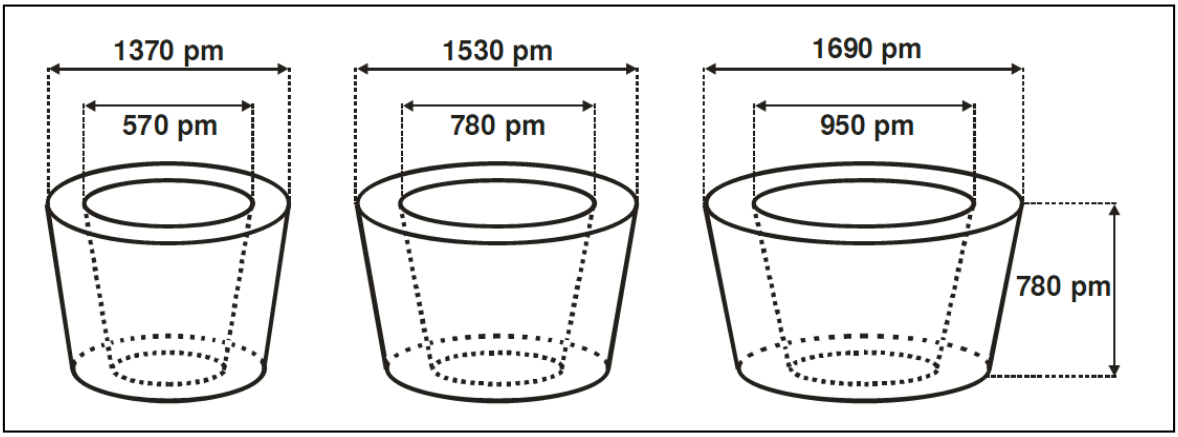


Figure I.5-6 : Taille des cyclodextrines (α-,β-,γ-cyclodextrine).

Les β- cyclodextrines sont les plus accessibles au niveau de leur facilité de synthèse, et sont de ce fait les plus utilisées dans le domaine scientifique. L'arrangement macrocyclique des cyclodextrines est un tore, aussi bien sous forme solide qu'en solution. La cavité interne de ce tore est hydrophobe et la surface externe hydrophile. L'hydrophilie des CD résulte de la présence des multiples groupes OH sur le pourtour extérieur, et le caractère non polaire et hydrophobe de la cavité, de l'absence de ces mêmes groupes. La petite face du tore renferme des fonctions hydroxyles (OH) primaires (position 6) et la grande face des groupes OH secondaires (positions 2 et 3). (Figure I.5-7).

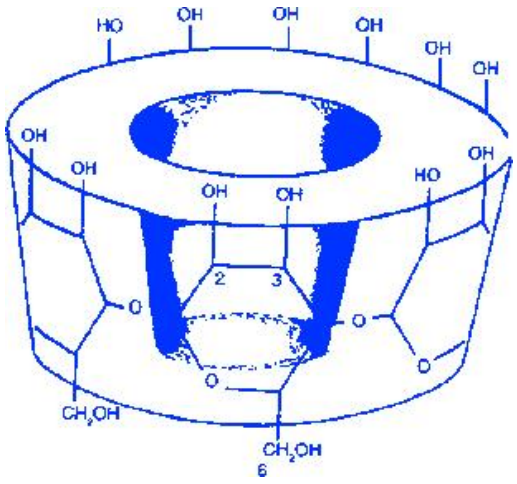


Figure I.5-7 : la répartition spatiale des groupements hydroxyle dans les cyclodextrines.

Du fait de la géométrie en tronc de cône et de l'amphiphilie de cette molécule, elle agit comme hôte pour piéger tout ou partie des molécules chimiques cibles, sans former de liaisons covalentes. Elles sont utilisées pour les séparations chirales grâce à leur capacité à discriminer les isomères potentiels des molécules, entre les groupes fonctionnels, entre les homologues et entre les énantiomères. Les caractéristiques de séparation chirale efficace des structures cyclodextrines proviennent des nombreux centres chiraux qu'elles contiennent. Par exemple, la β-cyclodextrine possède 35 centres stéréogéniques. Deux molécules chirales énantiomères forment avec leur hôte des complexes diastéréoisomères. Les constantes d'équilibre entre la molécule hôte et la molécule invitée sont donc différentes, ce qui permet de les séparer (Figure I.5-8).

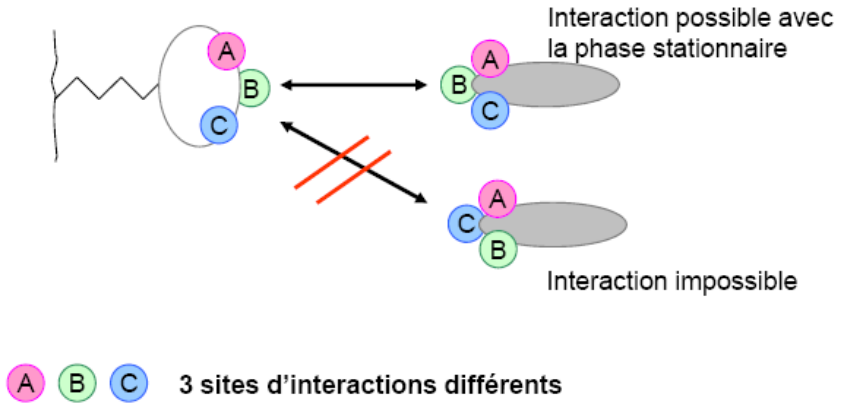


Figure I.5-8 : la chromatographie chirale, règle des 3 points.

On utilise beaucoup les cyclodextrines modifiées pour quantités de raisons. Par exemple, la solubilité dans différents solvants peut être adaptée par une modification judicieuse afin de permettre l'étude des mécanismes de réactions catalysées par des enzymes. La stratégie de modification des CD dépend du but visé. A titre d'illustration, l'obtention d'une CD présentant une excellente solubilité dans l'eau est nécessaire pour la formulation de certains médicaments. La conversion des hydroxyles en sulfates permet d'atteindre cet objectif. Autre exemple, la solubilité dans les solvants organiques est obtenue par silylation des groupes OH. La modification des cyclodextrines s'effectue par réaction des hydroxyles en positions 2 et 3 (autour de la couronne) et en position 6 à la base.

L'utilisation des cyclodextrines modifiées dans des colonnes courtes pour des analyses chirales en CPG a été décrite par Linstrom *et al.* (Lindstrom 1991). La séparation d'énantiomères d'hydrocarbures apolaires en mélange racémique, sur colonnes remplies avec un mélange d'α-cyclodextrine et de formamide a été démontrée antérieurement par Koscielski *et al*. et Sybilska et al. (Koscielski *et al.* 1983; Sybilska *et al.* 1983). Cependant, ces colonnes avaient un temps de vie relativement court et leur efficacité était relativement faible. Juvancz (Juvancz *et al.* 1987; Alexander *et al.* 1988) et ensuite Venama et al. (Venema *et al.* 1989) ont démontré que des β-cyclodextrines perméthylées (heptakis (2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrine) peuvent être employées dans les colonnes capillaires et que ces composés représentent un sélecteur versatile pour la séparation chirale en CPG d'une large gamme de classes de composés. Pour pallier au problème du point de fusion élevé des cyclodextrines perméthylées, deux stratégies ont été employées :

- Schurig Schurig, 1990 #53} a dissout les β-cyclodextrines perméthylées dans des polysiloxanes modérément polaires (OV-1701). De cette manière, les cyclodextrines peuvent être utilisées en tant que dérivés cyclodextrines alkylés/acylés (*eg.* permethylées β-cyclodextrines, ou 3-Bu-2,6-pe-γ-cyclodextrines) diluées dans un polysiloxane approprié.

- Konig (Konig *et al.* 1989) a quant à lui montré que les cyclodextrines per-n-pentylées sont liquides à température ambiante (Lipodex). Le faible point de solidification de ces composés permet

donc leur utilisation en tant que sélecteur sans besoin de dilution, en les utilisant directement pour recouvrir les parois internes des colonnes capillaires.

Cependant, la phase stationnaire perd son énantiosélectivité très rapidement à cause de réarrangement de phase ou de recristallisation des molécules de cyclodextrine. L'approche des cyclodextrines diluées dans des polysiloxanes a donc été étendue à des dérivés liés à des polysiloxane (chirasil-dex). Cette liaison garantie l'énantiosélectivité, la molécule étant à une position fixe dans la couche de phase stationnaire. La liaison empêchera la cyclodextrine de migrer à différentes positions dans le film de surface, ce qui garantie une énantiosélectivité homogène dans toute la phase. Ces liaisons stabilisent également l'énantiosélectivité dans le temps, améliorant ainsi la durée de vie de la colonne. La gamme de température de stabilité s'étend de -25 à 250°C, permettant aux petites molécules fortement volatiles d'être résolues. La préparation détaillée des dérivés γ-cyclodextrines (chirasil-dex immobilisée thermiquement) est décrite par Grosenick et Schurig (Schurig *et al.* 1995; Grosenick *et al.* 1997).

Il existe une grande gamme de cyclodextrines modifiées offrant une gamme plus étendue de séparations chirales, mais la plupart des sélectants ne sont pas encore disponibles en phase stationnaire de type chirasil-dex immobilisée. Elles sont alors utilisées sous forme visqueuse ou diluées dans des polysiloxanes semi-polaires.

Les sélecteurs chiraux les plus populaires sont l'heptakis(2,3,6-O-triméthyl)-β-cyclodextrine (Chirasil-β-dex) (Figure I.5-9a), l'octakis(3-O-butanoyl-2,6-di-O-pentyl)-γ-cyclodextrine (Lipodex E ou Chirasil γ-dex) (Figure I.5-9b) et la 2, 3-di-acetoxy-6-O-tert-butyl dimethylsilyl γ-cyclodextrine (RT-γ-DEXsa) (Figure I.5-9c) utilisés soit dilués en polysiloxane sémipolaire soit en forme polymérique (polydiméthylsiloxane, Chirasil-Dex).

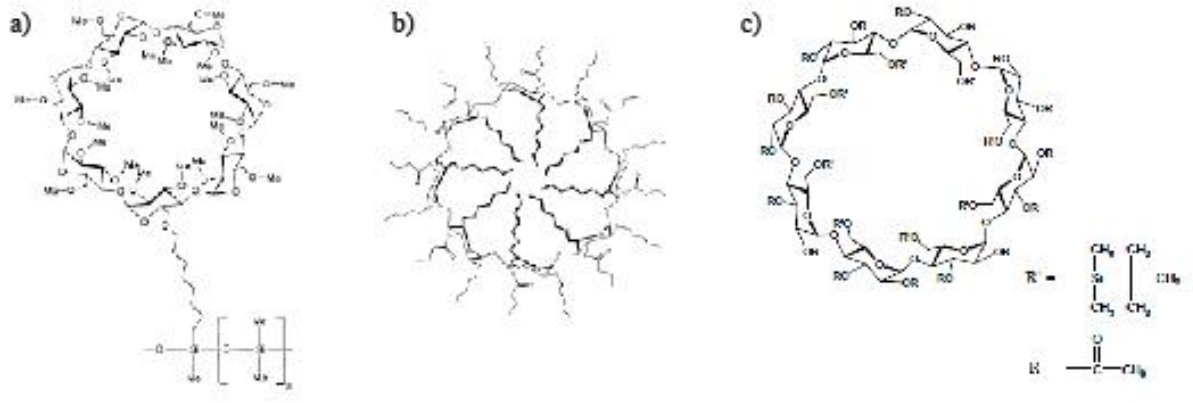


Figure I.5-9 : Représentation des trois types de sélecteurs chiraux les plus populaires : a) l'heptakis(2,3,6-O-triméthyl)-β-cyclodextrine (Chirasil-β-dex), b) l'octakis(3-O-butanoyle-2,6-di-O-pentyl)-γ-cyclodextrine (Lipodex E ou Chirasil γ-dex) et c) la 2, 3-di-acetoxy-6-O-tert-butyl dimethylsilyle γ-cyclodextrine (RT-γ-DEXsa).

L'immobilisation thermique des Chirasil-dex résultantes représente une amélioration de cette approche (Schurig *et al.* 1991; Armstrong *et al.* 1993; Donnecke *et al.* 1996). Les phases stationnaires

immobilisées sur la surface en silice fondue (Guiochon *et al.* 1988; Chester 1989) présentent une rinsabilité aux solvants en cas de contamination de la colonne avec des composés non-volatiles et permettent également des injections de large-volume, ou on-column, et splitless sans détériorer le film de phase stationnaire. En effet, la colonne peut résister à des contacts directs avec des liquides condensés, subir des injections répétées pour tout type de technique d'injection ; la phase stationnaire peut être employée pour des modes chromatographiques impliquant des phases mobiles condensées comme la chromatographie capillaire à fluide supercritique (CSFC) (Schurig *et al.* 1990; Schurig *et al.* 1991; Schmalzing *et al.* 1992), la chromatographie liquide open-tubular (OTLC) (Mayer *et al.* 1992) et l'électrochromatographie capillaire open-tubular (OTCEC) (Mayer *et al.* 1992).

Un pourcentage de cyclodextrines supérieur à la valeur optimale induirait une perte des avantages caractéristiques inhérents aux polysiloxanes, comme une grande efficacité chromatographique (du aux forts coefficients de diffusion), une large gamme de température d'opération, une bonne qualité et stabilité du film. Un pourcentage de cyclodextrines inférieur à sa valeur optimale réduirait les facteurs de séparation (Grosenick *et al.* 1997). Au départ, une valeur de 24% était utilisée. Cela représente statistiquement un atome de silicium de la chaine de polymère sur soixante portant un fragment de cyclodextrine. Une valeur de 40% en masse de cyclodextrines a été par la suite déterminée comme étant la valeur optimale pour obtenir un facteur de séparation élevé ainsi qu'un bon degré d'immobilisation (qui décroit avec l'augmentation du pourcentage de cyclodextrine).

Puisque le squelette siloxane est apolaire et que le pourcentage de cyclodextrine est relativement faible (la concentration de sélectant cyclodextrine dans une colonne Chirasil-dex varie aujourd'hui de 30 à 40% en masse), la polarité globale de la Chirasil-dex est faible, contrairement à des phases de cyclodextrines modifiées diluées dans des solvants polaires ou modérément polaires. Ainsi, les composés polaires sont élués à des températures inférieures, et les facteurs de sélectivité entre deux énantiomères, sous contrôle enthalpique, seront meilleurs.

De part son caractère inerte, la phase permet l'analyse de nombreux composés polaires (possédant des groupements hydroxyle, cétone, aldéhydes, esters et même acides) sans nécessité de fonctionnalisation. Pour des composés avec groupements amines libres, il est cependant recommandé de fonctionnaliser l'échantillon, étant donné qu'une meilleure volatilité permettra une température d'élution inférieure.

Traditionnellement, les séparations sont effectuées sur des colonnes longues (10-25m) et de diamètre interne moyen (250 µm). Les phases stationnaires chirale β-CD alkylées à longues chaînes conduisent à une séparation d'une grande variété d'énantiomères, de même que les chaînes courtes, mais ont une meilleure énantiosélectivité pour la majorité des racémates considérés. Ils permettent des temps d'analyses plus courts en utilisant des colonnes elles-mêmes plus courtes. La perte d'efficacité et de capacité est compensée partiellement par le fort gain en ratio signal/bruit via

l'amélioration de la sensibilité de détection résultant du temps d'analyse court qui permet de diminuer la largeurs de pics chromatographiques. De plus, les colonnes à faible diamètre permettent des températures d'élution faibles, ce qui conduit à des facteurs α de séparation plus élevés. (Lindstrom 1991). En prenant tout cela en compte, nous parvenons à séparer les énantiomères avec des résolutions de pics particulièrement élevées.

Les colonnes Chirasil-Dex ont été utilisées pour des analyses énantiomériques d'huiles essentielles, de flaveurs et fragrances, d'ingrédients de boissons alcoolisées, de chimie clinique, de phéromones, de pesticides, d'alkyl nitrates dans les composés atmosphériques et de composés pharmaceutiques volatiles. Elles sont maintenant utilisées dans un but d'analyses spatiales in situ de composés énantiomériques avec une efficacité importante (Tableau I.5-1).

Tableau I.5-1 : exemples d'application des cyclodextrines.

Technologie alimentaire	Pharmaceutique	Domaine industriel
conservation des aliments	microencapsulation	détergents
préservation de l'odeur	anti-amertume	cosmétique
sucre candy	stabilité thermique	photographie
thé instantané	résistance à l'oxydation	tabac
sauce	photostabilisation	insecticides
Ingrédient de boissons alcoolisées	augmentation de la biodisponibilité	herbicides
	solubilisation	catalyse
	abaissement de la volatilité	techniques de séparation
		Spatiale

La sélection de la meilleure phase stationnaire chirale reste une source d'erreur importante, puisqu'aucune phase stationnaire chirale universelle n'existe aujourd'hui pour la chromatographie. Les CSP à base de cyclodextrine semblent cependant dominer la "hit-list". Mais la faible énantiosélectivité devrait pousser les scientifiques à une meilleure étude des reconnaissances chirales, par exemple par modélisation moléculaire.

I.6. La fonctionnalisation chirale

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que l'analyse de solutés par chromatographie en phase gazeuse avait comme pré-requis que les composés injectés soient volatils et stables. Or il existe un grand nombre de composés d'intérêt tels que des acides aminés, des acides carboxyliques, des amines ou des alcools lourds, qui ne sont pas volatils ou qui sont thermiquement instables dans la gamme de température utilisée en CPG. D'autres composés peuvent tout simplement s'adsorber dans

l'injecteur. Le résultat d'une analyse de ces composés sans fonctionnalisation sera l'obtention de pics non reproductibles (aire, hauteur et forme). Pour pallier à ces problèmes, la fonctionnalisation, encore appelée dérivatisation, s'avère souvent être une méthode simple, rapide et efficace. De plus certains composés répondent difficilement à un détecteur donné. Dans ce cas de figure la fonctionnalisation peut permettre d'améliorer cette réponse. Par exemple un composé fluoré aura une meilleure réponse qu'un composé non fluoré en spectrométrie de masse par impact électronique. Enfin la fonctionnalisation peut être d'un grand recours pour différencier deux ou plusieurs molécules dont les masses moléculaires, à l'état libre, sont très voisines mais qui, souvent, diffèrent par le nombre de fonctions susceptibles d'être substituées.

La fonctionnalisation est donc une procédure par laquelle un composé est chimiquement transformé en un nouveau composé sans en changer la structure moléculaire initiale et qui a comme particularité d'être facilement analysable en CPG. La fonctionnalisation des composants d'un échantillon consiste donc en l'adjonction d'un radical apolaire (conférant à la molécule une plus grande volatilité), en remplacement d'une fonction chimique plutôt polaire (type hydroxyle, aldéhyde ou carboxyle...).

Il existe trois grandes classes de réaction de fonctionnalisation. Elles sont fonction du type de groupement apolaire qui est greffé à la molécule cible.

Les réactions de silylation

La silylation est un processus au cours duquel un atome d'hydrogène actif (-OH, -NH_2, -NHR, -SH) est remplacé dans une molécule par un groupement trialkylesilyle. Il s'agit d'une réaction de fonctionnalisation en une étape, facilement automatisable et consommant peut d'énergie. De plus, la silylation est une technique non-sélective et sensible à une grande variété de composés organiques (dont les acides aminés, acides carboxyliques, nucléobases, amines primaires et secondaires, alcools et amides).

Les réactions d'alcoylation

L'alcoylation remplace un hydrogène labile (mobile) par un radical alcoyle et transforme les alcools en éthers et les acides en esters. Le remplacement d'hydrogène mobile par des radicaux méthyle, éthyle, propyle ou butyle est largement utilisé. Les réactions d'alcoylation regroupent les réactions d'estérification et de transestérification.

Pour la fonctionnalisation d'acides aminés on utilise souvent une estérification. C'est notamment le cas de la procédure qui implique la formation de N(O,S) acyl suivie de l'estérification du ou des groupements d'acides carboxyliques. Le N, N-DiMéthylFormamide-DiMéthylAcétal (DMF-DMA) est un agent de méthylation qui convertit les acides gras, les acides aminés, les amines et les barbituriques en dérivés utiles pour l'analyse CPG. Cette fonctionnalisation est d'autant plus utilisée qu'elle permet une séparation chirale d'énantiomères sur des colonnes chirales appropriées. Les

réactifs de type O-alkylhydroxylamine sont particulièrement utiles dans l'analyse de composés contenant à la fois des groupements hydroxyles et carbonyles tels que les cétostéroïdes et les prostaglandines. Ces composés sont habituellement analysés après une deuxième étape de fonctionnalisation, en triméthylsilyle éthers.

Les réactions d'acylation

L'acylation correspond à la réaction d'un groupement acyle (R-C=O) sur des alcools ou des amines en les transformant en esters ou amides. L'acylation des fonctions chimiques à hydrogène labile est obtenue par un large choix de réactifs.

Cependant dans le cadre de notre travail nous nous intéressons uniquement à la fonctionnalisation qui permettra d'obtenir une séparation chirale de nos composés cibles.

I.6.1. Généralités

Les paires racémiques d'alcools, de diols, d'amines non fonctionnalisés peuvent être résolues sur des phases stationnaires chirales. Cependant, les acides carboxyliques et acides aminés résistent à l'énantioséparation sur colonne capillaire en phase gazeuse, à cause notamment de leur caractère polaire et par conséquent leur faible pression de vapeur. Dans l'injecteur du CPG, ils sont évaporés lentement et migrent difficilement dans la colonne analytique. Lorsqu'ils y parviennent, ces composés non fonctionnalisés ont tendance à induire des étalements de pic dû à leurs effets associatifs avec la phase stationnaire. Une fonctionnalisation de toutes ces molécules réfractaires est donc absolument nécessaire, impliquant souvent une procédure laborieuse en plusieurs étapes, faisant perdre les avantages de la rapidité de l'analyse en CPG. Ainsi en CPG, la plupart des groupements actifs d'une molécule doivent être chimiquement convertis en terminaisons inactives, afin de diminuer la polarité et augmenter ainsi la volatilité dudit composé.

Les acides aminés sont des molécules polaires avec des hydrogènes labiles, caractérisés par une faible volatilité à cause de leurs interactions moléculaires, par liaisons hydrogènes inter et intra moléculaires. Les alkyl esters sont moins polaires que leurs acides aminés correspondants, beaucoup plus volatils, et permettent une séparation chromatographique rapide et efficace. C'est pourquoi l'estérification est le premier choix pour une fonctionnalisation des acides aminés (Meierhenrich *et al.* 2001). Une réaction sur le groupement amine est beaucoup plus courante qu'un marquage du groupement acide carboxylique. La plupart des agents de fonctionnalisation sont donc disponibles pour le groupement amine.

La fonctionnalisation, très souvent utilisée en laboratoire, n'a jamais été tentée dans l'espace, même si des missions sont en cours avec une étape de fonctionnalisation. Dans un but spatial, la méthode de fonctionnalisation se doit d'être automatisable ; elle doit comporter une seule étape de fonctionnalisation, simple et rapide, effectuée dans des conditions réactionnelles non-extrêmes, ne

nécessitant pas d'étapes surnuméraire, sans besoin d'une zone de stockage excessive et sans étape de purification ultérieure. La sensibilité doit être de l'ordre du ppm-ppb, voire meilleure. Le dispositif embarqué devra analyser un petit échantillon, d'un sol surement très pauvre en matière organique, et tous les composés d'intérêt devront être séparés en un seul run avec des bonnes valeurs de résolution. Peu d'agents de fonctionnalisation existent aujourd'hui remplissant toutes les conditions requises pour une utilisation dans les conditions spatiales. L'agent de fonctionnalisation peut être achiral, et la séparation chirale se fera sur une colonne chromatographique chirale, ou l'agent peut être lui-même chiral, permettant une séparation sur colonne chirale ou achirale (respectivement, séparation directe ou indirecte).

La fonctionnalisation nécessaire pour une séparation chirale de molécules réfractaires implique souvent une procédure laborieuse comportant plusieurs étapes (Husek *et al.* 1975; Wang *et al.* 1994; Abe *et al.* 1996; Akapo *et al.* 1999; Hierlemann *et al.* 2001; Rodier *et al.* 2001; Schurig 2002; Szopa *et al.* 2002; Husek *et al.* 2003; Nozal *et al.* 2004), ce qui est totalement incompatible avec une automatisation incontournable lors d'une analyse *in situ*. Il était alors nécessaire de développer des méthodes permettant d'obtenir des carboxylates d'alkyl sans danger et rapidement.

La réaction diastéréoisomérique la plus utilisée est l'estérification du groupement carboxylique avec un alcool chiral (Konig *et al.* 1980; Powers *et al.* 1994), suivie d'une acylation du groupement amine restant. Une autre approche commune est l'acylation du groupement hydroxyle avec des chlorure d'acyle chiraux, ou une carbonylation avec des chloroformiates chiraux après estérification du groupement carboxylique (Powers *et al.* 1994). Nous détaillerons plutôt les méthodes de séparation indirecte, avec des agents de fonctionnalisation non-chiraux : l'acylation avec des chlorures d'acyle, la carbamation aux chloroformiates ou l'estérification par méthylation.

I.6.2. Alkyle-alkoxyle-carbonylation/perfluoroestérification (chloroformiate d'alkyle)

Contrairement à la faible formation d'esters par une fonctionnalisation aux chloroformiates, la même réaction de fonctionnalisation catalysée par la pyridine semble avoir un rendement supérieur. Cette fonctionnalisation chirale a été introduite par Husek (Husek 1991) en 1991. Les chloroformiates (chlorocarbonates) sont des esters dérivés de l'acide chloroformique. Dans la procédure de Husek, le chloroformiate d'éthyle réagit instantanément avec les groupements fonctionnels aminés, carboxyliques et autres groupements fonctionnels des chaînes latérales (excepté les groupements guanidine et hydroxyle aliphatique) des acides aminés en milieu aqueux et en présence d'un catalyseur, la pyridine. Wang (Wang *et al.* 1994) a découvert l'influence de l'alcool sur la réaction du chloroformiate.

Un mélange d'alkyl chloroformiate, d'alcool et de pyridine, en milieu aqueux, forme un complexe réactif, employé pour obtenir l'ester N(O,S)-alkyle alkoxyle carbonyle des acides aminés.

L'incorporation de différents alcools dans le mélange permet de préparer une grande variété d'esters différents. Parmi ceux-là, certains montrent une plus grande sensibilité que les acides aminés fonctionnalisés à l'ethyl chloroformiate selon la méthode de Husek.

Les alcools utilisés avec les chloroformiates d'alkyle ont en général la même chaîne alkylique que le chloroformiate avec lequel il est combiné. Abe *et al*. (Abe *et al.* 1996) et Wang *et al.* (Wang *et al.* 1994) ont testé des paires différentes afin de trouver la meilleure pour une étude quantitative et qualitative des acides aminés fonctionnalisés. Ces études ont également permis d'appréhender les mécanismes de réaction.

Dans ce mécanisme, le chloroformiate réagit avec groupement amine de l'acide aminé, et l'alkyl du chloroformiate correspond à l'alkyl carbamate dans le produit dérivé (alkyle-alcoxyle-carbonylation). Le chloroformiate réagit également sur le groupement acide carboxylique de l'acide aminé pour aboutir à un intermédiaire anhydride acide. A cette étape, la réaction peut évoluer en deux voies possibles : un échange anhydride-alcool se produit pour obtenir le produit principal : l'ester dont le groupement alcoxyle correspond à la structure de l'alcool ajouté. Un produit mineur est également dérivé par décarboxylation de l'anhydride, induite par la pyridine, pour aboutir à l'ester contenant le groupement alkyle du chloroformiate (Figure I.6-1). Cependant, ce produit secondaire n'excède pas 10% (Wang *et al.* 1994).

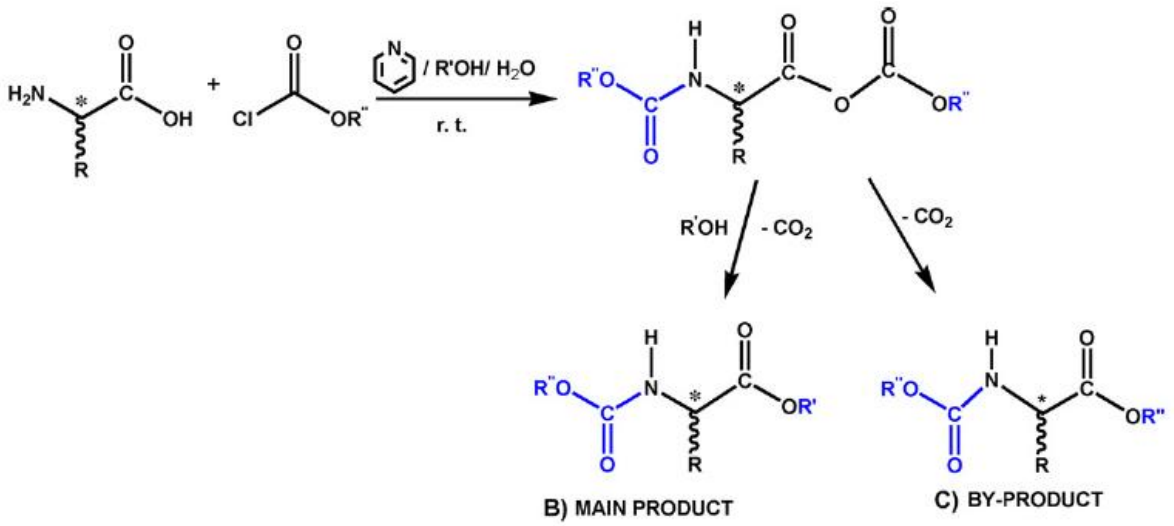


Figure I.6-1 : fonctionnalisation d'un acide aminé par un chloroformiate d'alkyle. La réaction, en présence d'un alcool, de pyridine et d'eau, abouti à un produit intermédiaire anhydride acide. Cet anhydride a deux voies d'évolution possible : un produit principal estérifié dont le groupement alcoxyle (–O-R') correspond à l'alcool, et le carbamate (NH-COOR'') au chloroformiate. Un produit mineur est obtenu par décarboxylation, dans lequel l'ester correspond à l'alkyle du chloroformiate. De (Zampolli *et al.* 2007).

La nature des chloroformiates et des alcools ont été changés dans de nombreuses études, et notamment la possibilité d'utiliser des agents perfluorés a été envisagée. Les dérivés perfluorés sont connus pour leurs propriétés positives vis à vis de la chromatographie gazeuse : forte volatilité et grande affinité électronique. Les conclusions des études sont que la détectabilité des produits fonctionnalisés augmente avec la taille des alcools et avec le nombre d'atomes de fluor présents sur l'alcool. Pour un même alcool, la détectabilité augmente avec la taille du chloroformiate (Wang *et al.* 1994; Abe *et al.* 1996).

Pour l'étude de la séparation énantiomérique des acides aminés, différents chloroformiates (chloroformiate de méthyle, d'éthyle et d'isobutyle) ont été testés en combinaison avec des alcools d'une chaîne alkyle identique ou différente de celle du chloroformiate (méthanol, éthanol, heptafluorobutanol), pour finalement choisir une combinaison d'heptafluorobutanol avec du chloroformiate de méthyle (Zampolli *et al.* 2007). La rapport molaire de chloroformiate et d'alcool a été optimisé dans cette même étude à 1 :2,5.

Il s'agit d'une réaction en une seule étape pendant laquelle il est possible d'estérifier le groupement carboxylique et protéger le groupement amine et les autres groupements susceptibles d'induire une substitution nucléophile. La réaction est simple et cinétiquement rapide, (moins d'une minute). L'analyse CPG des acides aminés fonctionnalisés est rapide puisque tous les composés sont élués en moins de 13 minutes. L'analyse est reproductible (la précision intra- et inter-run est respectivement de 3 et 4%). Elle montre également une grande zone de linéarité et a une limite de détection au niveau du ppb/sub-pmol. Il semble donc s'agir d'une technique compatible avec une séparation énantiosélective simple et automatique pour l'analyse de quantités traces d'acides aminés. Elle peut être aussi utilisée sur une grande variété de composés tels que les acides carboxyliques, les amines, les alcools aminés et les acides aminés. La réaction se produit en milieu aqueux, évitant ainsi une étape d'extraction et évaporation. Elle s'opère à température ambiante, ce qui évite la racémisation imposée par des augmentations de températures, avec des réactifs disponibles dans le commerce et pécuniairement très abordables. Les facteurs de séparation et de résolution obtenus sont particulièrement encourageants.

La séparation énantiomérique, même si elle semble meilleure sur une colonne de type chirasil-val (13/16 acides aminés séparés), peut également être effectuée sur des colonnes capillaires achirales (10/15 acides aminés séparés), beaucoup plus robustes. Zampolli et al. (Zampolli *et al.* 2007) ont testé les 20 acides aminés du vivant dans des quantités allant de 5.10^{-7} to 1.10^{-6} mol par run. Seulement six paires énantiomériques avaient une résolution acceptable, sur les 15 séparées. En plus de ces problèmes de détection, et malgré tous les avantages apportés par cette technique, le temps de réaction est subordonné à l'agitation vigoureuse du mélange. Le rendement décroit avec l'augmentation du temps de réaction. Alors que sous agitation constante, le taux de recouvrement est de 95%, ce rendement tombe à 37% sans étape d'agitation. Ce faible rendement sans agitation permanente rend la technique inadaptée pour l'analyse spatiale *in situ*. De plus, la réaction aboutit à

des composés de forte masse moléculaire, qui peuvent dépasser la limite supérieure d'analyse sur un modèle de CPG-SM spatial, et a de nombreux composés secondaires qui diminuent la précision de l'analyse. De plus, la réaction n'est pas adaptée à un processus simple, puisqu'elle nécessite plusieurs réactifs dans un ordre précis (eau, alcool, pyridine (catalyseur pour une décarboxylation immédiate) puis chloroformiate). Cette combinaison est mélangée dans un bain à ultrasons (Zampolli *et al.* 2007). Les produits fonctionnalisés nécessitent ensuite une étape d'extraction au chloroforme et au NaCl (pour charger la phase aqueuse), suivi d'une agitation, avant l'injection. Cela pour éviter un bruit de fond trop important et pour avoir un meilleur recouvrement. Même si cette dernière étape d'extraction peut être omise aux dépends d'un taux de recouvrement maximal (il descend à 80% sans cette extraction), la procédure entière n'est pas « simple et rapide ». La fonctionnalisation, bien que se produisant en une seule étape, n'est pas nécessairement compatible avec une application automatisée. De plus, les produits et sous produits de réaction détériorent particulièrement les phases stationnaires chirales, et ne peuvent guère être employés que sur des colonnes Chirasil-val ou sur phases achirales, ce qui diminue largement l'énantiosélectivité. Pour terminer, le chloroformiate de méthyle à une forte contrainte de stockage (durée de stockage de 6 mois), ce qui risque de soulever des problèmes dans le cadre d'une analyse spatiale. De plus, et étant donné les masses élevées des composés fonctionnalisés, les températures d'élution sont particulièrement élevées, par exemple la température nécessaire pour éluer la phénylalanine est de 280°C, température bien trop élevée par les phases stationnaires chirales qui ne supportent généralement pas plus que 200°C.

Séparation indirecte

Une fonctionnalisation avec des chloroformiates d'alkyles chiraux permet de séparer les diastéréoisomères formés sur une colonne achirale. Cette propriété est doublement intéressante. D'une part, pour intégrer la séparation énantiomérique sur des missions spatiales où les colonnes (achirales) sont déjà choisies. D'autre part, les phases stationnaires achirales sont plus robustes que les phases chirales.

La méthode de séparation énantiomérique indirecte est le plus souvent une estérification du groupement carboxylique par des alcools chiraux (Kamerling *et al.* 1978; Konig *et al.* 1980; Powers *et al.* 1994) et une acylation des autres groupements réactifs. L'acylation des groupements réactifs avec des chlorures d'acides chiraux est une autre approche, de même que l'est la carbamation par des chloroformiates chiraux après estérification du groupement acide carboxylique (Mitchell *et al.* 1992; Powers *et al.* 1994). Parmi les nombreuses possibilités, la réaction de fonctionnalisation des acides aminés à température ambiante par des chloroformiates est une réaction simple et rapide (Rodier *et al.* 2001). Le chloroformiate de menthyle est une molécule optiquement active, dérivée du noyau menthol (2-isopropyl-5-methylcyclohexanol). En combinaison avec de l'éthanol et de la pyridine, dans un milieu aqueux, il permet de fonctionnaliser les acides aminés en une seule étape et dans des temps courts (13 minutes pour le dernier acide aminé élué, la phénylalanine). Il a été optimisé dans notre laboratoire afin d'essayer de répondre aux exigences requises pour une expérience en conditions spatiales (Rodier *et al.* 2001). Les quantités relatives d'eau, d'alcool et de pyridine par

rapport à l'agent de fonctionnalisation chiral ont été optimisées jusqu'à aboutir à un rendement de fonctionnalisation de 95%. De même que la fonctionnalisation aux chloroformiates non chiraux, cette fonctionnalisation nécessite une agitation pendant la réaction, et une étape d'extraction avant l'injection, pour avoir un rendement optimal. Même si les reproductibilités inter- et intra-run sont relativement bonnes (les coefficients de variation sont respectivement de 4 et 3%), l'étape d'agitation rend la méthode difficilement spatialisable. A cela s'ajoute les températures élevées d'élution (280°C pour la phénylalanine).

I.6.3. Perfluoroacylation/perfluoroestérification

Les produits fonctionnalisés perfluorés sont extrêmement volatils, permettant l'utilisation de phases stationnaires caractérisées par leur température opérationnelle maximale relativement faibles, telles que le sont celles des phases stationnaires chirales. Cependant, les chloroformiates perfluorés ne sont pas disponibles dans le commerce, à cause de leur difficulté de manipulation et de stockage. Il n'était alors possible, avec les chloroformiates, que d'utiliser des alcools perfluorés pour obtenir des dérivés fluorés.

Afin de permettre également la présence de groupements perfluorés sur l'amine des acides aminés fonctionnalisés, une combinaison d'un alcool et d'un anhydride d'acide est utilisée pour la fonctionnalisation. Les deux étapes successives d'estérification du groupement acide carboxylique par chauffage dans un milieu alcoolique acidifié anhydre et d'acylation de l'α-amine et d'autres groupements par chauffage en présence d'un anhydride acide perfluoré, ont été unifiées en une seule étape en utilisant un mélange d'anhydride acide perfluoré et de perfluoro-alcool. Le produit ainsi dérivé est l'ester de N(O,S) perfluoroalkyle perfluoroacyle (Figure I.6-2).

1)

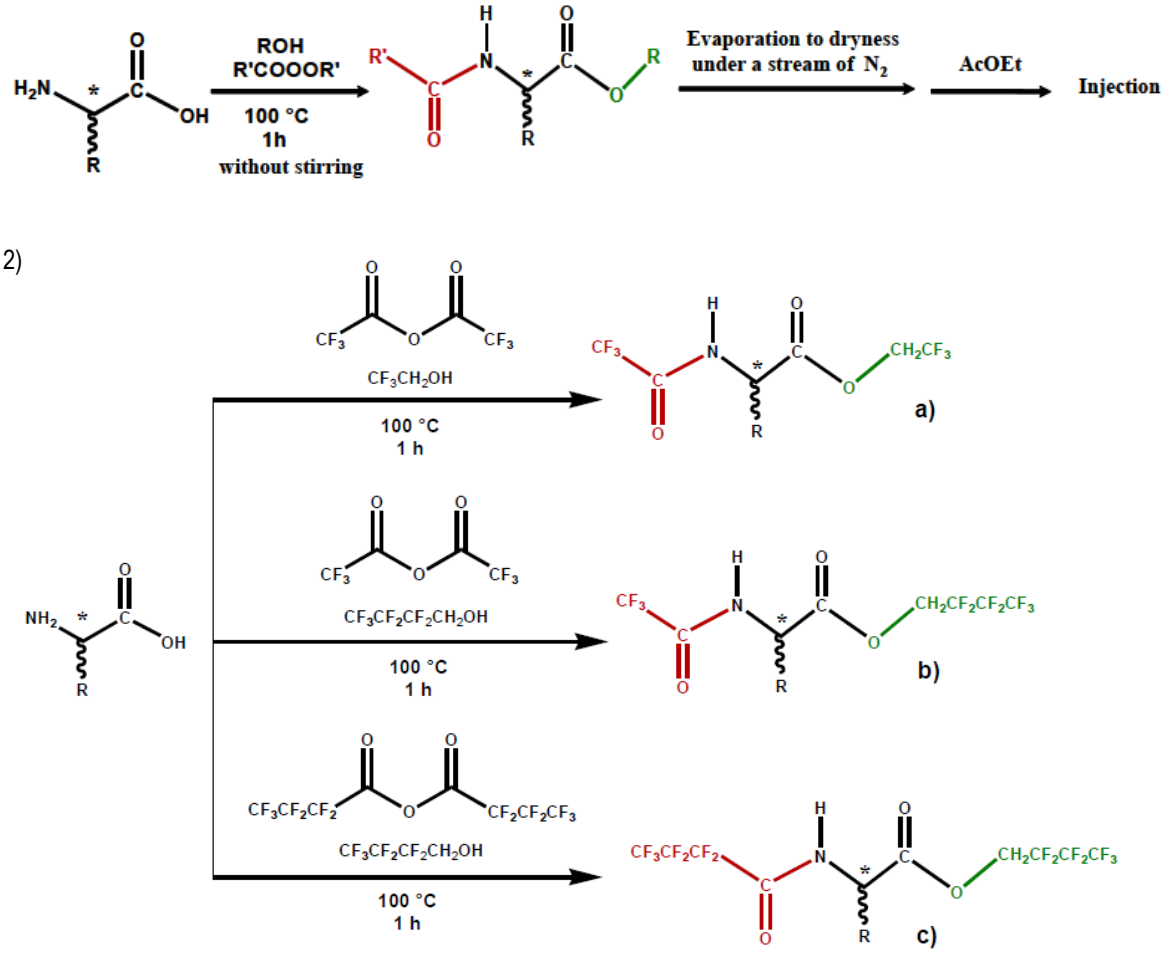


Figure I.6-2 : estérification et acylation simultanées par un perfloroalcool et un perfluoroanhydride. 1) Principe général de la fonctionnalisation. 2) exemples de perfluoroanhydrides et perfluoroalcools utilisés pour la réaction. a) TriFluoroAcetic Anhydride (TFAA) + 2,2,2-TriFluoro-1-Ethanol (TFE), b) TFAA + 2,2,3,3,4,4,4-HeptaFluoro-1-Butanol (HBF), c) HeptaFluoroButyric Anhydride (HFBA) + HBF. De (Zampolli *et al.* 2006).

Des techniques déjà publiées (Mackenzie 1987; Abe *et al.* 1994; Benicka *et al.* 1996) ont montré que les anhydrides trifluoroacétique (TFAA) et heptafluorobutyrique (HFBA) sont les meilleurs anhydrides pour la fonctionnalisation d'acides aminés.

Le HFBA est un agent d'acylation puissant, formant des dérivés stables. Il est utilisé avec son alcool perfluoré correspondant le HFB (2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol), alors que le TFAA est utilisé avec l'alcool TFE (2,2,2(trifluoro-1-ethanol). Le mélange TFAA-TFE semble plus intéressant d'un point de vu qualitatif, alors que le couple HFBA-HFB aboutit à des fonctionnalisats plus intéressants quantitativement. La colonne chiralet Chirasil-val utilisée dans une étude au laboratoire permet d'éluer et de séparer 9 paires énantiomériques d'acides aminés avec des résolutions acceptables, en moins de 44 minutes (Zampolli *et al.* 2006). 14 paires énantiomériques sont séparées sur la colonne capillaire RT-γ-DEXsa (Zampolli *et al.* 2006). Malgré quelques co-élutions, quelques destructions ou transformations dans le processus de fonctionnalisation (en milieu acide), cette procédure s'opère en une seule étape, qui semble adéquate à l'analyse spatiale, et permet une séparation ultérieure sur les

deux types de colonnes intéressantes pour l'énantioséparation, la chirasil-val et la chirasil-dex. Elle permet l'analyse chromatographique de nombreux acides aminés, avec une limite de détection et de quantification relativement faibles, au niveau sub-picomolaire. La procédure est simple et rapide : les réactifs sont ajoutés en même temps, la réaction a lieu sans agitation et sans nécessité d'équipement ou de précaution particulière. Cependant, un inconvénient majeur est le taux de racémisation très important dû à la méthode de fonctionnalisation, allant de 10 à 40%. De plus, l'agent est très corrosif, et aboutit à des composés fonctionnalisés de fort poids moléculaire. La reproductibilité est de surcroît faible puisque allant de 3 à 11% (Zampolli *et al.* 2006).

La perfluoroacylation/esterification et l'alkyle-alkoxyle-carbonylation/esterification sont toutes deux des techniques de fonctionnalisation de laboratoire qui donnent de bons résultats. Cependant, la mise en œuvre de ces dernières est incompatible avec l'analyse spatiale *in situ*. Pour cette raison une autre technique de fonctionnalisation a été identifiée. Il s'agit d'une méthylation via le N,N-dimethylformamide dimethylacetal.

I.6.4. Alkylation (N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA))

La méthylation est la seule alkylation généralement employée pour la fonctionnalisation. Le DMF-DMA appartient à une classe d'agents de méthylation qui permet la fonctionnalisation d'amines primaires, secondaires, d'acides carboxyliques et autres groupes fonctionnels. Cette fonctionnalisation a également été employée pour ajouter des groupements protecteurs aux acides aminés durant certaines synthèses, ainsi que pour des études de marquage d'acides aminés suivi d'une analyse CPG-SM, pour des analyses médicales principalement.

Le DMF-DMA réagit avec les groupements fonctionnels des acides aminés, aboutissant à un produit dérivé stable. Il réagit à haute température et forme un dérivé estérifié et un produit de dégradation volatil, le méthanol (Thenot *et al.* 1972).

La fonctionnalisation au DMF-DMA a notamment été développée pour la séparation énantiomérique d'acides carboxyliques. Meierhenrich (Meierhenrich *et al.* 2001) l'a étudiée dans le cadre de la préparation de la mission Rosetta, pour les acides carboxyliques (Figure I.6-3).

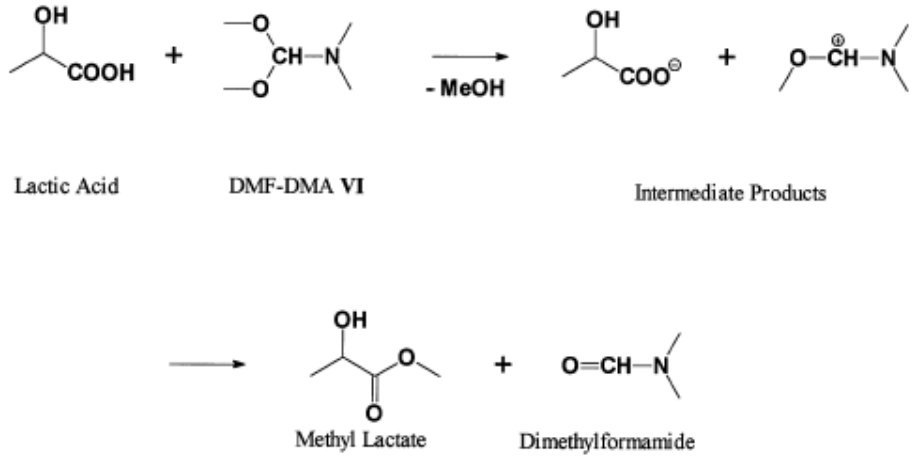


Figure I.6-3 : équation de la fonctionnalisation de l'acide D,L-lactique par le diméthylformamide diméthyl-acétal. D'après (Meierhenrich *et al.* 2001).

Cette fonctionnalisation n'a pas été beaucoup utilisée précédemment pour la détection d'acides aminés. Grubb *et al.* (Grubb *et al.* 1989) ont effectué une évaluation de cette fonctionnalisation sur des acides aminés secondaires N-monosubstitués (Figure I.6-4).

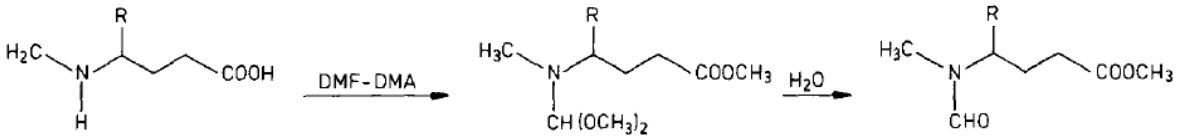


Figure I.6-4 : formation des dérivés N-formyl methyl esters de l'acide 4-methylaminobutanoïque. Le produit intermédiaire serait un produit de transamination, le N-dimethoxymethyl-N-methyl-4-aminobutanoate. D'après (Grubb *et al.* 1989).

Thiemann *et al.* (Thiemann *et al.* 2001) ont utilisé les diméthylformamide dialkyl-acétal pour la fonctionnalisation d'acides aminés. La réaction avait lieu soit en phase liquide, l'acétal liquide étant ajouté sur les acides aminés dissous dans du méthanol, soit à sec, où l'acétal était directement ajouté sur les résidus secs d'acides aminés en Py-CPG. La réaction est instantanée. L'expérience a montré que le diméthylformamide dibutyl-acétal permettait la fonctionnalisation des acides aminés (Figure I.6-5), mais pas leur séparation chirale ultérieure sur colonne chirale. Le diméthylformamide diméthyl-acétal a, quant à lui, permis la séparation énantiomérique de la phénylalanine.

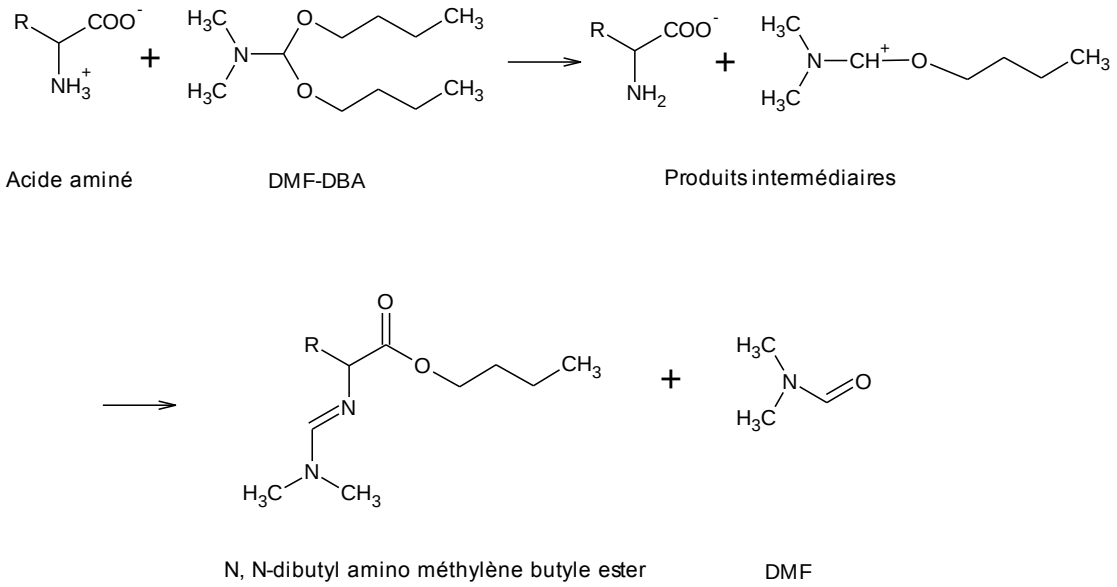


Figure I.6-5 : fonctionnalisation d'un acide aminé au diméthylformamide dibutylacétal (DMF-DBA).

Rodier *et al.* (Rodier *et al.* 2002) a utilisé la méthode de Grubb et Callery (Grubb *et al.* 1989). La température de réaction est inférieure à celle nécessaire dans la méthode de Thiemann, à 100°C contre 200°C. Cependant, la réaction nécessite l'addition d'eau lors de la phase de refroidissement après la réaction au DMF-DMA. La réaction entre le DMF-DMA et l'acide aminé provoque en premier lieu la formation de méthyl esters d'intermédiaires instables d'amide acétal. L'addition d'eau sur ces intermédiaires provoque l'hydrolyse des amides acétals, formant des dérivés N-formyle méthyl esters stables.

Cette dernière étude a permis l'élution de plusieurs acides amines sur colonnes capillaire Chirasil-Val (alanine, acide 4-aminobutyrique, valine, norvaline, isoleucine, acide glutamique et phénylalanine) en moins de 15 minute, mais aucune séparation chirale n'a pu être observée excepté pour la phénylalanine. Cependant, sur colonne Chirasil-Dex, 4 séparations énantiomériques ont pu être observées sur 15 acides aminés élués. La première procédure impliquait une extraction au chloroforme avant injection en chromatographie. Afin de simplifier le protocole, cette étape d'extraction a été supprimée, et les rendements n'en ont pas été significativement affectés. Les précisions intra-run (10 aliquotes d'une même solution standard analysés le même jour) et inter-run (un aliquote de la solution analysé à 8 jours d'intervalle) ont été déterminés cependant à 'seulement' 7,8 et 7,6% (coefficient de variation), respectivement. L'élution de tous les acides aminés étudiés a lieu en moins de 30 minutes, et la température maximale pour éluer le composé le plus lent (phénylalanine) est de 170°C (Rodier *et al.* 2002).

La méthylation au DMF-DMA peut également être appliquée aux acides gras, aux amines primaires et aux acides aminés. La fonctionnalisation est simple, c'est une réaction en une seule étape, le temps de réaction est court, et la procédure de fonctionnalisation nécessite peu d'apport énergétique. Le temps d'analyse ultérieure est lui-même relativement court et nécessite des

températures d'analyses raisonnables ce qui est cohérent avec la faible tolérance des phases stationnaires chirale aux fortes températures. De plus les masses spectrales des produits fonctionnalisés sont faibles, et donc intéressantes pour une analyse en CPG-SM. La procédure facilement automatisable. Elle nécessite uniquement de solubiliser les composés organiques dans le réactifs (DMF-DMA) afin que la réaction se produise. Les produits peuvent être analysés sur tous types de colonnes, cependant, seule la chirasil-dex semble permettre de différencier correctement les énantiomères. La réaction de fonctionnalisation au DMF-DMA aboutit à des composés de faible poids moléculaire, ce qui facilite leur détection sur des SM de vol qui possèdent une gamme d'analyse de masse inférieure à celle des SM utilisés en laboratoire (généralement inférieur à 500 u).
Le fait que la réaction de fonctionnalisation opère en phase gazeuse est d'autant plus intéressant pour une instrumentation spatiale, puisque la manipulation de phases liquides reste difficile. De plus, cet agent ne nécessite pas de conditions particulières de stockage.

Il existe néanmoins quelques inconvénients à cette méthode, notamment la formation de produits de dégradation lors de la réaction, qui peuvent interférer avec les composés d'intérêt sur le chromatogramme. Cela peut être facilement résolu par l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à l'analyse chromatographique.

Le DMF-DMA semble être un composé intéressant pour la détection, l'identification et l'énantiosélection d'acides carboxyliques (Acides lactique, malique and tartrique) (Meierhenrich *et al.* 2001) et d'acides aminés. Il nécessitait cependant une étude plus approfondie de ses propriétés, afin de déterminer précisément ses avantages et ses inconvénients, mais paraît être la technique la plus adaptée vis-à-vis des avantages qu'elle apporte pour l'analyse spatiale *in situ* de molécules organiques.

Cet agent de fonctionnalisation semble être la technique la plus adaptée pour les contraintes opérationnelles des prochaines missions spatiales. Malheureusement, peu d'études approfondies ont été faites sur ce réactif, malgré un avenir prometteur pour cette méthode de fonctionnalisation. Des études étaient donc nécessaires afin d'optimiser l'utilisation de ce réactif. De plus, il est nécessaire d'étudier la racémisation possible des molécules d'intérêt suite aux conditions de fonctionnalisation au DMF-DMA, étant donné que la réaction a lieu à des températures élevées. Les paramètres de l'expérience seraient donc un compromis entre l'efficacité de la fonctionnalisation et la racémisation des composés.

I.7. Objectifs expérimentaux de la thèse

Puisque l'homochiralité des molécules organiques est un indice fort de la présence de vie, puisque Mars est un objet d'étude important quant à la présence de vie, puisque les molécules organiques et leur éventuel excès énantiomérique pourraient y être conservés jusqu'à aujourd'hui, puisque la chromatographie en phase gazeuse est la technique analytique spatialisable actuellement

la plus pertinente, puisque le DMF-DMA est un agent de fonctionnalisation optimal pour permettre l'étude des énantiomères des molécules organiques en milieu extraterrestre, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des molécules organiques chirales par l'agent de méthylation DMF-DMA afin de séparer les énantiomères et de les étudier en CPG-SM *in situ* lors des futures missions martiennes.

Pour cela, nous avons tout d'abord entrepris une recherche bibliographique exhaustive a permis de sélectionner les molécules les plus pertinentes pour la recherche de la vie sur d'autres environnements que la Terre. En effet, différents paramètres sont à prendre en compte : la nature de l'atmosphère, la présence ou non d'eau, le type de sol rencontré (solide, liquide ou gazeux), les conditions physico-chimiques et enfin le plus important la vie telle qu'on la connait sur Terre. De tous ces paramètres et sans être un réel biomarqueur biologique, la chiralité des acides aminés s'est révélée être un bon indice de présence de vie.

La première partie de l'étude porte sur le choix de la colonne chromatographique. Pour cela, plusieurs classes de colonnes chirales ont été étudiées et classées en fonction de leur énantiosélectivité sur des molécules volatiles. Une technique de fonctionnalisation basée sur l'utilisation du DMF-DMA a ensuite été développée et optimisée sur des molécules réfractaires, et a permis de séparer plus de 10 acides aminés sur les 20 du vivant. Les limites de détection et de quantification ont également été déterminées. L'étude est étendue à d'autres types de molécules organiques d'intérêt exobiologiques : des acides aminés non-protéiniques, des acides carboxyliques et des acides nucléiques. Des échantillons solides de l'échantillon sont fonctionnalisés dans un récipient, et un aliquot de l'échantillon est injecté en CPG-SM pour sa caractérisation.

Afin de valider l'ensemble du protocole d'analyse *in situ* de la matière organique nous avons alors choisi de développer un Dispositif de Préparation de l'Echantillon (DPE) permettant d'optimiser chacune des étapes de l'analyse : extraction, fonctionnalisation et injection. Dans ce dispositif, un échantillon de sol peut être déposé, les molécules organiques en être extraites, mises en contact avec l'agent de fonctionnalisation, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse. Cette expérience est élaborée dans un contexte spatial ; chaque étape est pensée pour un usage robotisé. L'extraction des molécules est thermique, la fonctionnalisation nécessite un agent unique et l'analyse en chromatographie en phase gazeuse est optimisée dans ce but. Aucune manipulation supplémentaire n'est nécessaire, ce qui assure une adéquation avec les contraintes imposées. Des tests dans les conditions de la future expérience Mars Organic Molecule Analyser (MOMA) de la mission martienne ExoMars ont alors pu être menés sur des analogues martiens. Ainsi, nous avons développé une expérience globale, sensible, robuste, totalement compatible avec les exigences d'une analyse *in situ*.

Ce travail devrait permettre d'implanter au cours de la mission ExoMars l'extraction et la détection de la chiralité des molécules organiques en général, et en particulier des acides aminés. La découverte d'un excès énantiomérique pourrait apporter des indices quant à la présence d'une vie passée ou présente sur la planète rouge.

I.8. Références

Abe, I., N. Fujimoto and T. Nakahara (1994). "Enantiomer Separation Of Amino-Acids By Capillary Gas-Chromatography Using Cyclodextrin Derivatives As Chiral Stationary Phases." Journal Of Chromatography A 676(2): 469-473.

Abe, I., N. Fujimoto, T. Nishiyama, K. Terada and T. Nakahara (1996). "Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography." Journal Of Chromatography A 722(1-2): 221-227.

Akapo, S. O., J. M. D. Dimandja, D. R. Kojiro, J. R. Valentin and G. C. Carle (1999). "Gas chromatography in space." Journal Of Chromatography A 843(1-2): 147-162.

Alexander, G., Z. Juvancz and J. Szejtli (1988). "Cyclodextrins And Their Derivatives As Stationary Phases In Gc Capillary Columns." Journal Of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications 11(1): 110-113.

Allen, M., B. Sherwood Lollar, B. Runnegar, D. Z. Oehler, J. R. Lyons, C. E. Manning and M. E. Summers (2006). "Is Mars Alive?" Eos 87(41): 433-448.

Anders, E. (1989). "Pre-Biotic Organic-Matter From Comets And Asteroids." Nature 342(6247): 255-257.

Armstrong, D. W., Y. B. Tang, T. Ward and M. Nichols (1993). "Derivatized Cyclodextrins Immobilized On Fused-Silica Capillaries For Enantiomeric Separations Via Capillary Electrophoresis, Gas-Chromatography, Or Supercritical Fluid Chromatography." Analytical Chemistry 65(8): 1114-1117.

Bada, J. L. (1991). "Amino-Acid Cosmogeochemistry." Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences 333(1268): 349-358.

Bada, J. L. and G. D. McDonald (1995). "Amino-Acid Racemization On Mars - Implications For The Preservation Of Biomolecules From An Extinct Martian Biota." Icarus 114(1): 139-143.

Bada, J. L. and S. L. Miller (1987). "Racemization And The Origin Of Optically-Active Organic-Compounds In Living Organisms." Biosystems 20(1): 21-26.

Bada, J. L., X. S. Wang, H. N. Poinar, S. Paabo and G. O. Poinar (1994). "Amino-Acid Racemization In Amber-Entombed Insects - Implications For Dna Preservation." Geochimica Et Cosmochimica Acta 58(14): 3131-3135.

Bailey, J., A. Chrysostomou, J. H. Hough, T. M. Gledhill, A. McCall, S. Clark, F. Menard and M. Tamura (1998). "Circular polarization in star-formation regions: Implications for biomolecular homochirality." Science 281(5377): 672-674.

Bailey, J. M. (1997). "The consequences for amino acid homochirality if L-ribose RNA and not D-ribose RNA had evolved first." Biochemical Society Transactions 25(4): S651-S651.

Bailey, J. M. (1998). "RNA-directed amino acid homochirality." Faseb Journal 12(6): 503-507.

Barak, I. and A. Barnun (1975). "Mechanisms Of Amino-Acids Synthesis By High-Temperature Shock-Waves." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 6(4): 483-506.

Barbier, B., A. Chabin, D. Chaput and A. Brack (1998). "Photochemical processing of amino acids in Earth orbit." Planetary And Space Science 46(4): 391-398.

Barron, L. D. (2008). "Chirality and life." Space Science Reviews 135(1-4): 187-201.

Barron, L. D., F. J. Zhu and L. Hecht (2006). "Raman optical activity: An incisive probe of chirality, and of biomolecular structure and behaviour." Vibrational Spectroscopy 42(1): 15-24.

Basiuk, V. A. (2001). "Some observations on amino acid racemization under pyrolytic temperatures and inorganic oxide-catalyzed intermolecular condensation." Space Life Sciences: Life In The Solar System: Prebiotic Chemistry, Chirality And Space Biology 27(2): 335-340.

Baum, E. H. (1963). "Evaluation Of Microporous Polyethylene As A Low Temperature Gas Chromatographic Support." Journal Of Gas Chromatography 1(11): 13-15.

Beauchamp, P., J. I. Lunine and C. Welch "The Potential for Chemical Evolution on Titan."

Benicka, E., J. Krupcik, I. Spanik, J. Hrouzek and P. Sandra (1996). "Retention behavior of N-TFA-O-alkyl derivatives of selected amino acid enantiomers separated on modified cyclodextrins by HRGC." Journal Of Microcolumn Separations 8(1): 57-65.

Benner, S. A., K. G. Devine, L. N. Matveeva and D. H. Powell (2000). "The missing organic molecules on Mars." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 97(6): 2425-2430.

Benton, M. J. and F. J. Ayala (2003). "Dating the tree of life." Science 300(5626): 1698-1700.

Bernstein, M. P., J. P. Dworkin, S. A. Sandford, G. W. Cooper and L. J. Allamandola (2002). "Racemic amino acids from the ultraviolet photolysis of interstellar ice analogues." Nature 416(6879): 401-403.

Bertrand, M., S. van der Gaast, F. Vilas, F. Horz, G. Haynes, A. Chabin, A. Brack and F. Westall (2009). "The Fate of Amino Acids During Simulated Meteoritic Impact." Astrobiology 9(10): 943-951.

Besli, S., D. B. Davies, A. Kilic, R. A. Shaw, S. Sahin, U. Aylin and S. Yesilot (2006). "Comparison of high-performance liquid chromatography of cyclotriphosphazene derivatives with one or two equivalent stereogenic centres." Journal Of Chromatography A 1132(1-2): 201-205.

Bibring, J. P., Y. Langevin, J. F. Mustard, F. Poulet, R. Arvidson, A. Gendrin, B. Gondet, N. Mangold, P. Pinet, F. Forget and O. team (2006). "Global mineralogical and aqueous mars history derived from OMEGA/Mars express data." Science 312(5772): 400-404.

Blank, J. G., G. H. Miller, M. J. Ahrens and R. E. Winans (2001). "Experimental shock chemistry of aqueous amino acid solutions and the cometary delivery of prebiotic compounds." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 31(1-2): 15-51.

Bolli, M., R. Micura and A. Eschenmoser (1997). "Pyranosyl-RNA: Chiroselective self-assembly of base sequences by ligative oligomerization of tetranucleotide-2',3'-cyclophosphates (with a commentary concerning the origin of biomolecular homochirality)." Chemistry & Biology 4(4): 309-320.

Bonner, W. A. (1991). "The Origin And Amplification Of Biomolecular Chirality." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 21(2): 59-111.

Bonner, W. A. (1995). "Chirality And Life." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 25(1-3): 175-190.

Bonner, W. A. (2000). "Parity violation and the evolution of biomolecular homochirality." Chirality 12(3): 114-126.

Bonner, W. A. and B. D. Bean (2000). "Asymmetric photolysis with elliptically polarized light." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 30(6): 513-517.

Bonner, W. A., Kavasman.Pr and F. S. Martin (1974). "Asymmetric Adsorption Of Alanine By Quartz." Science 186(4159): 143-144.

Bonner, W. A. and E. Rubenstein (1987). "Supernovae, Neutron-Stars And Biomolecular Chirality." Biosystems 20(1): 99-111.

Botta, O. and J. L. Bada (2002). "Extraterrestrial organic compounds in meteorites." Surveys In Geophysics 23(5): 411-467.

Brack, A. (2000). "The exobiology exploration of Mars: a survey of the European approaches." Planetary And Space Science 48(11): 1023-1026.

Brack, A., B. Barbier, M. Bertrand-Urbaniak, F. Boillot, A. Chabin, R. Jacquet and U. Meierhenrich (2001). "Life in the Solar System: Chemical origin, chirality, life on Mars." Exo-/Astro-Biology 496: 49-54.

Brack, A., P. Clancy, B. Fitton, B. Hofmann, G. Horneck, G. Kurat, J. Maxwell, G. Ori, C. Pillinger, F. Raulin, N. Thomas and F. Westall (1999). "An integrated exobiology package for the search for life on Mars." Life Sciences: Exobiology 23(2): 301-308.

Brack, A. and C. T. Pillinger (1998). "Life on Mars: chemical arguments and clues from Martian meteorites." Extremophiles 2(3): 313-319.

Brack, A. and G. Spach (1980). "Beta-Structures Of Polypeptides With L-Residues And D-Residues.3. Experimental Evidences For Enrichment In Enantiomer." Journal Of Molecular Evolution 15(3): 231-238.

Brack, A. and G. Spach (1981). "Enantiomer Enrichment In Early Peptides." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 11(1-2): 135-142.

Brazhnikov, V. V. and L. M. Mukhin (1971). "Gas Chromatography And Space Research." Chromatographic Reviews 15(2-3): 151-194.

Briggs, M. H. and G. Mamikunian (1964). "Organic constituents of carbonaceous chondrites." Life Sci Space Res 2: 57-85.

Brinton, K. L. F. and J. L. Bada (1996). "A reexamination of amino acids in lunar soils: Implications for the survival of exogenous organic material during impact delivery." Geochimica Et Cosmochimica Acta 60(2): 349-354.

Brinton, K. L. F., C. Engrand, D. P. Glavin, J. L. Bada and M. Maurette (1998). "A search for extraterrestrial amino acids in carbonaceous Antarctic micrometeorites." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 28(4-6): 413-424.

Buch, A., D. P. Glavin, R. Sternberg, C. Szopa, C. Rodier, R. Navarro-Gonzalez, F. Raulin, M. Cabane and P. R. Mahaffy (2006). "A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry." Planetary And Space Science 54(15): 1592-1599.

Buch, A., R. Sternberg, C. Szopa, C. Freissinet, C. Garnier, E. J. Bekri, C. Rodier, R. Navarro-Gonzalez, F. Raulin, M. Cabane, A. Stambouli, D. P. Glavin and P. R. Mahaffy (2009). "Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in martian soil: preliminary results." Advances In Space Research 43(1): 143-151.

Buchardt, O. (1974). "Photochemistry With Circularly Polarized-Light." Angewandte Chemie-International Edition In English 13(3): 179-185.

Burmeister, J. (1998). Self-replication and autocatalysis. The molecular origins of life: assembling pieces of the puzzle. Cambridge, Cambridge University Press: 295-312.

Cairns-Smith, A. G. (1982). Genetic Takeover and the Mineral Origins of Life. Cambridge, UK.

Caro, G. M. M., U. J. Meierhenrich, W. A. Schutte, B. Barbier, A. A. Segovia, H. Rosenbauer, W. H. P. Thiemann, A. Brack and J. M. Greenberg (2002). "Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues." Nature 416(6879): 403-406.

Cesur, N., T. I. Apak, H. Y. Aboul-Enein and S. Ozkirimli (2002). "LC determination of amino glutethimide enantiomers as dansyl and fluorescamine derivatives in tablet formulations." Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis 28(3-4): 487-492.

Chamberlin, T. C. and R. T. Chamberlin (1908). " Early terrestrial conditions that may have favored organic synthesis." Science 28(730): 897-911.

Charnley, S. B. and S. D. Rodgers (2008). "Interstellar reservoirs of cometary matter." Space Science Reviews 138(1-4): 59-73.

Chester, T. L. (1989). Microbore Column Chromatography, a Unified Approach to Chromatography. F. J. Yang. New York, Marcel Dekker: 369.

Chyba, C. and C. Sagan (1992). "Endogenous Production, Exogenous Delivery And Impact-Shock Synthesis Of Organic-Molecules - An Inventory For The Origins Of Life." Nature 355(6356): 125-132.

Chyba, C. F. (1990). "Meteoritics - Extraterrestrial Amino-Acids And Terrestrial Life." Nature 348(6297): 113-114.

Cottin, H., M. C. Gazeau and F. Raulin (1999). "Cometary organic chemistry: a review from observations, numerical and experimental simulations." Planetary And Space Science 47(8-9): 1141-1162.

Crawford, R. L., A. Paszczynski, Q. Y. Lang, I. F. Cheng, B. Barnes, T. J. Anderson, R. Wells, C. Wai, G. Corti, L. Allenbach, D. P. Erwin, J. Park, T. Assefi and M. Mojarradi (2001). "In search of the molecules of life." Icarus 154(2): 531-539.

Cronin, J. R. (1989). "Origin of organic compounds in carbonaceous chondrites." Adv Space Res 9(2): 59-64.

Cronin, J. R. and C. B. Moore (1971). "Amino Acid Analyses Of Murchison, Murray, And Allende Carbonaceous Chondrites." Science 172(3990): 1327-&.

Cronin, J. R. and S. Pizzarello (1997). "Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids." Science 275(5302): 951-955.

Cronin, J. R. and S. Pizzarello (1999). "Amino acid enantiomer excesses in meteorites: origin and significance." Advances in Space Research 23(2): 293-299.

Cronin, J. R., S. Pizzarello and G. U. Yuen (1983). "Recent Analyses Of Amino-Acids In The Murchison Meteorite." Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society 186(AUG): 5-GEOC.

Cronin, J. R. and J. Reisse (2005). "Chirality and the origin of homochirality." Gargaud, M. (Ed.), Lectures in Astrobiology 1: 473-514.

Deamer, D. W. (1997). "The first living systems: a bioenergetic perspective." Microbiology And Molecular Biology Reviews 61(2): 239-&.

Del Rio, A., J. M. Hayes, M. Stein, P. Piras and C. Roussel (2004). "Theoretical reassessment of Whelk-O1 as an enantioselective receptor for 1-(4-halogeno-phenyl)-1-ethylamine derivatives." Chirality 16: S1-S11.

Donnecke, J., C. Paul, W. A. Konig, L. A. Svensson, O. Gyllenhaal and J. Vessman (1996). "Immobilization of heptakis(6-O-tert-butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin for capillary gas chromatography and supercritical fluid chromatography and micro-liquid chromatography." Journal Of Microcolumn Separations 8(7): 495-505.

Dose, K. and A. Klein (1996). "Response of Bacillus subtilis spores to dehydration and UV irradiation at extremely low temperatures." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 26(1): 47-59.

Ebbers, E. J., G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbiers, A. Bruggink and B. Zwanenburg (1997). "Controlled racemization of optically active organic compounds: Prospects for asymmetric transformation." Tetrahedron 53(28): 9417-9476.

Elsila, J. E., D. P. Glavin and J. P. Dworkin (2009). "Cometary glycine detected in samples returned by Stardust." Meteoritics & Planetary Science 44(9): 1323-1330.

Engel, M. H. and S. A. Macko (1997). "Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite." Nature 389(6648): 265-268.

Engel, M. H. and S. A. Macko (2001). "The stereochemistry of amino acids in the murchison meteorite." Precambrian Research 106: 35-45.

Engel, M. H. and B. Nagy (1982). "Distribution And Enantiomeric Composition Of Amino-Acids In The Murchison Meteorite." Nature 296(5860): 837-840.

Epstein, S., R. V. Krishnamurthy, J. R. Cronin, S. Pizzarello and G. U. Yuen (1987). "Unusual Stable Isotope Ratios In Amino-Acid And Carboxylic-Acid Extracts From The Murchison Meteorite." Nature 326(6112): 477-479.

Feibush, B. (1971). "Interaction Between Asymmetric Solutes And Solvents - N-Lauroyl-L-Valyl Tert Butylamide As Stationary Phase In Gas Liquid Partition Chromatography." Journal Of The Chemical Society D-Chemical Communications(11): 544-&.

Ferris, J. P., A. R. Hill, R. H. Liu and L. E. Orgel (1996). "Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces." Nature 381(6577): 59-61.

Flores, J. J., W. A. Bonner and G. A. Massey (1977). "Asymmetric Photolysis Of (Rs)-Leucine With Circularly Polarized Uv Light." Journal Of The American Chemical Society 99(11): 3622-3625.

Formisano, V., S. Atreya, T. Encrenaz, N. Ignatiev and M. Giuranna (2004). "Detection of methane in the atmosphere of Mars." Science 306(5702): 1758-1761.

Fox, S. W., K. Harada and P. E. Hare (1972). "Amino-Acid Precursors In Lunar Samples." Space Life Sciences 3(4): 425-431.

Frank, F. C. (1953). "On Spontaneous Asymmetric Synthesis." Biochimica Et Biophysica Acta 11(4): 459-463.

Frank, H., G. J. Nicholson and E. Bayer (1977). "Rapid Gas-Chromatographic Separation Of Amino-Acid Enantiomers With A Novel Chiral Stationary Phase." Journal Of Chromatographic Science 15(5): 174-176.

Freudenberg, K. and F. Cramer (1948). "Die Konstitution Der Schardinger-Dextrine Dextrine-Alpha, Dextrine-Beta Und Dextrine-Gamma." Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-A Journal Of Chemical Sciences 3(11-1): 464-464.

Friedmann, E. I. (1980). "Endolithic Microbial Life In Hot And Cold Deserts." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 10(3): 223-235.

Galaverna, G., R. Corradini, E. Demunari, A. Dossena and R. Marchelli (1993). "Chiral Separation Of Unmodified Amino-Acids By Ligand-Exchange High-Performance Liquid-Chromatography Using Copper(Ii) Complexes Of L-Amino-Acid Amides As Additives To The Eluent." Journal Of Chromatography A 657(1): 43-54.

Garzon, L. and M. L. Garzon (2001). "Radioactivity as a significant energy source in prebiotic synthesis." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 31(1-2): 3-13.

Gilav, E., B. Feibush and Charless.R (1966). "Separation Of Enantiomers By Gas Liquid Chromatography With An Optically Active Stationary Phase." Tetrahedron Letters(10): 1009-&.

Gilav, E., B. Feilbush and R. Charles-Sigler (1966). "Gas Chromatography." Institut of Petroleum 227.

Glavin, D. P. and J. P. Dworkin (2009). "Enrichment of the amino acid L-isovaline by aqueous alteration on CI and CM meteorite parent bodies." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 106(14): 5487-5492.

Goesmann, F., H. Rosenbauer, R. Roll, C. Szopa, F. Raulin, R. Sternberg, G. Israel, U. Meierhenrich, W. Thiemann and G. Munoz-Caro (2007). "COSAC, the cometary sampling and composition experiment on Philae." Space Science Reviews 128(1-4): 257-280.

Gogoberidze, G. and G. Z. Machabeli (2005). "On the origin of the circular polarization in radio pulsars." Monthly Notices Of The Royal Astronomical Society 364(4): 1363-1366.

Golay, M. J. E. and D. H. Desty (1958). Gas Chromatography 1958 (Amsterdam Symposium), Butterworths, London.

Goldanskii, V. I., V. A. Avetisov and V. V. Kuzmin (1986). "Chiral Purity Of Polynucleotides As A Necessary Condition Of Complementarity." Doklady Akademii Nauk Sssr 290(3): 734-737.

Gontareva, N. B., E. A. Kuzicheva and V. N. Shelegedin (2009). "Synthesis and characterization of peptides after high-energy impact on the icy matrix: Preliminary step for further UV-induced formation." Planetary And Space Science 57(4): 441-445.

Grimm, R. E. and H. Y. McSween (1989). "Water And The Thermal Evolution Of Carbonaceous Chondrite Parent Bodies." Icarus 82(2): 244-280.

Grosenick, H. and V. Schurig (1997). "Enantioselective capillary gas chromatography and capillary supercritical fluid chromatography on an immobilized gamma-cyclodextrin derivative." Journal Of Chromatography A 761(1-2): 181-193.

Grubb, M. F. and P. S. Callery (1989). "Derivatization Of N-Methyl And Cyclic Amino-Acids With Dimethylformamide Dimethyl Acetal." Journal Of Chromatography 469: 191-196.

Gubitz, G., S. Mihellyes, G. Kobinger and A. Wutte (1994). "New Chemically Bonded Chiral Ligand-Exchange Chromatographic Stationary Phases." Journal Of Chromatography A 666(1-2): 91-97.

Guiochon, G. and C. L. Guillemin (1988). Quantitative Gas Chromatography for Laboratory Analyses and On-Line Process Control, Elsevier: 105.

Haber, J. (1996). Selectivity in heterogeneous catalytic oxidation of hydrocarbons. Heterogeneous Hydrocarbon Oxidation. B. K. Warren, Oyama, S.T. (Eds), ACS Symposium: 21-34.

Hamilton PB, N. B. (1975). "Comments on the search for amino acids in Apollo 15, 16, and 17 lunar samples. A study in contamination control." Anal Chem(47): 1718-1720.

Harada K, H. P., Windsor CR, Fox SW (1971). "Evidence for compounds hydrolyzable to amino acids in aqueous extracts of Apollo." Science(173): 433-435.

Harada, K. and K. Matsumoto (1970). On the sterically controlled syntheses of dipeptides and their stereochemical courses. Peptides: chemistry and biochemistry. W. B. New York, Wiley: 451-466.

Hare, P. E. and R. M. Mitterer (1966). Non-protein amino acids in fossil shells. Carnegie Institution of Washington Year. 65: 362-364.

Hasselstron, T. and M. C. Henry (1956). "Synthesis of aminoacids by beta-radiation." Science(125): 350-351.

Hazen, R. M., T. R. Filley and G. A. Goodfriend (2001). "Selective adsorption of L- and D-amino acids on calcite: Implications for biochemical homochirality." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 98(10): 5487-5490.

He, Y. J., Z. F. Dai, L. X. Zeng, C. J. Li, F. Qi and S. C. Qi (2008). "Earth's orbital chirality and its possible role in biomolecular evolution." Neuroquantology 6(2): 119-125.

Hegstrom, R. A. (1982). "Beta-Decay And The Origins Of Biological Chirality - Theoretical Results." Nature 297(5868): 643-647.

Hegstrom, R. A. (1987). "Parity Violation And Chiral Symmetry-Breaking Of A Racemic-Mixture." Biosystems 20(1): 49-56.

Hegstrom, R. A. and D. K. Kondepudi (1990). "The Handedness Of The Universe." Scientific American 262(1): 108-115.

Hierlemann, A., H. Baltes and V. Schurig (2001). "Search for extraterrestrial enantioenrichment by using chemical microsensors." Enantiomer 6(2-3): 129-139.

Hogberg, A. G. S. (1980). "Stereoselective Synthesis And Dnmr Study Of 2 1,8,15-22-Tetraphenyl[14]Metacyclophan-3,5,10,12,17,19,24,26-Octols." Journal Of The American Chemical Society 102(19): 6046-6050.

Hollis, J. M., F. J. Lovas and P. R. Jewell (2000). "Interstellar glycolaldehyde: The first sugar." Astrophysical Journal 540(2): L107-L110.

Hollis, O. L. (1966). "Separation Of Gaseous Mixtures Using Porous Polyaromatic Polymer Beads." Analytical Chemistry 38(2): 309-&.

Hollis, O. L. (1973). "Porous Polymers Used In Gc And Lc." Journal Of Chromatographic Science 11(7): 335-342.

Holm, N. G. and E. M. Andersson (1995). "Abiotic Synthesis Of Organic-Compounds Under The Conditions Of Submarine Hydrothermal Systems - A Perspective." Planetary And Space Science 43(1-2): 153-159.

Hoover, R. B. (2008). Microfossils of Filamentous Prokaryotes in CI1 and CM2 Meteorites - art. no. 709703. Instruments, Methods, And Missions For Astrobiology Xi. Bellingham, Spie-Int Soc Optical Engineering. 7097: 9703-9703.

Horneck, G. (1999). "European activities in exobiology in earth orbit: Results and perspectives." Life Sciences: Exobiology 23: 381-386.

Husek, P. (1991). "Rapid Derivatization And Gas-Chromatographic Determination Of Amino-Acids." Journal Of Chromatography 552(1-2): 289-299.

Husek, P. and K. Macek (1975). "Gas-Chromatography Of Amino-Acids." Journal Of Chromatography 113(2): 139-230.

Husek, P., P. Matucha, A. Vrankova and P. Simek (2003). "Simple plasma work-up for a fast chromatographic analysis of homocysteine, cysteine, methionine and aromatic amino acids." Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences 789(2): 311-322.

Irvine, W. M. (1994). Organic-Molecules In The Gas-Phase Of Dense Interstellar Clouds. Life Sciences And Space Research Xxv (4) - Planetary Biology And Origins Of Life. Oxford, Pergamon Press Ltd. 15: 35-43.

Irvine, W. M. (1998). "Extraterrestrial organic matter: A review." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 28(4-6): 365-383.

Israel, G., C. Szopa, F. Raulin, M. Cabane, H. B. Niemann, S. K. Atreya, S. J. Bauer, J. F. Brun, E. Chassefiere, P. Coll, E. Conde, D. Coscia, A. Hauchecorne, P. Millian, M. J. Nguyen, T. Owen, W. Riedler, R. E. Samuelson, J. M. Siguier, M. Steller, R. Sternberg and C. Vidal-Madjar (2005). "Complex organic matter in Titan's atmospheric aerosols from in situ pyrolysis and analysis." Nature 438(7069): 796-799.

Jacques, J. (1981). Confessions d'un chimiste ordinaire. Paris.

Jordan, P. and R. D. L. Kronig (1927). "Movements of the lower jaw of cattle during mastication." Nature 120: 807-807.

Jorissen, A. and C. Cerf (2002). "Asymmetric photoreactions as the origin of biomolecular homochirality: A critical review." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 32(2): 129-142.

Julg, A. (1987). "Asymmetric-Synthesis Of The Alanine Precursor Alpha-Amino-Propionitrile On Kaolinite And L-Homochirality Of Amino-Acids In Proteins." Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii 305(7): 563-565.

Julian, R. R., S. Myung and D. E. Clemmer (2005). "Do homochiral aggregates have an entropic advantage?" Journal Of Physical Chemistry B 109(1): 440-444.

Juvancz, Z., G. Alexander and J. Szejtli (1987). "Permethylated Beta-Cyclodextrin As Stationary Phase In Capillary Gas-Chromatography." Journal Of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications 10(2): 105-107.

Kagan, H. B., Balavoin.G and Moradpou.A (1974). "Can Circularly Polarized-Light Be Used To Obtain Chiral Compounds Of High Optical Purity." Journal Of Molecular Evolution 4(1): 41-48.

Kamerling, J. P., G. J. Gerwig, M. Duran, D. Ketting and S. K. Wadman (1978). "Absolute-Configuration Of Urinary 2-Hydroxybutyric Acid In Patients With Ketosis And Lactic-Acidosis." Clinica Chimica Acta 88(1): 183-188.

Kaplan, I. R., E. T. Degens and J. H. Reuter (1963). "Organic Compounds In Stony Meteorites." Geochimica Et Cosmochimica Acta 27(JUL): 805-&.

Kemp, J. C., G. D. Henson, C. T. Steiner and E. R. Powell (1987). "The Optical Polarization Of The Sun Measured At A Sensitivity Of Parts In 10-Million." Nature 326(6110): 270-273.

Keszthelyi, L. (2001). "Homochirality of biomolecules: Counter-arguments against critical notes." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 31(3): 249-256.

Klabunovskii, E. I. (2001). "Can enantiomorphic crystals like quartz play a role in the origin of homochirality on earth?" Astrobiology 1(2): 127-31.

Kminek, G., O. Botta, D. P. Glavin and J. L. Bada (2002). "Amino acids in the Tagish Lake meteorite." Meteoritics & Planetary Science 37(5): 697-701.

Kobayashi, K., Y. Takano, H. Masuda, H. Tonishi, T. Kaneko, H. Hashimoto and T. Saito (2004). Possible cometary organic compounds as sources of planetary biospheres. Space Life Sciences: Search For Signatures Of Life, And Space Flight Environmental Effects On The Nervous System. Kidlington, Pergamon-Elsevier Science Ltd. 33: 1277-1281.

Konig, W. A. and I. Benecke (1980). "Gas-Chromatographic Separation Of Chiral 2-Hydroxy Acids And 2-Alkyl-Substituted Carboxylic-Acids." Journal Of Chromatography 195(2): 292-296.

Konig, W. A., S. Lutz, M. Hagen, R. Krebber, G. Wenz, K. Baldenius, J. Ehlers and H. T. Dieck (1989). "Cyclodextrins As Chiral Stationary Phases In Capillary Gas-Chromatography.4. Heptakis(2,3,6-Tri-O-Pentyl)-Beta-Cyclodextrin." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 12(1): 35-39.

Koppenhoefer, B. (1990). University of Tübingen.

Koppenhoefer, B., R. Graf, H. Holzschuh, A. Nothdurft, U. Trettin, P. Piras and C. Roussel (1994). "Chirbase, A Molecular Database For The Separation Of Enantiomers By Chromatography." Journal Of Chromatography A 666(1-2): 557-563.

Koppenhoefer, B., U. Muhleck, M. Walser and K. Lohmiller (1995). "Backbone Modification Of Chirasil-Val.2. Introduction Of A Rigid Cyclohexyl Spacer." Journal Of Chromatographic Science 33(5): 217-222.

Koscielski, T., D. Sybilska and J. Jurczak (1983). "Separation Of Alpha-Pinene And Beta-Pinene Into Enantiomers In Gas-Liquid-Chromatography Systems Via Alpha-Cyclodextrin Inclusion Complexes." Journal Of Chromatography 280(1): 131-134.

Krashnopolsky, V. A., J. P. Maillard and T. C. Owen (2004). "Detection of methane in the martian atmosphere: evidence for life?" Icarus 172(2): 537-547.

Kuan, Y. J., S. B. Charnley, H. C. Huang, W. L. Tseng and Z. Kisiel (2003). "Interstellar glycine." Astrophysical Journal 593(2): 848-867.

Kuhn, W. and E. Knopf (1930). "Photochemical creation of optical active substances." Naturwissenschaften 18: 183-183.

Kurganov, A. (2001). "Chiral chromatographic separations based on ligand exchange." Journal Of Chromatography A 906(1-2): 51-71.

Kvenvold.K, J. Lawless, K. Pering, E. Peterson, J. Flores, Ponnampe.C, I. R. Kaplan and C. Moore (1970). "Evidence For Extraterrestrial Amino-Acids And Hydrocarbons In Murchison Meteorite." Nature 228(5275): 923-&.

Kwok, S. (2009). "Organic matter in space: from star dust to the Solar System." Astrophysics And Space Science 319(1): 5-21.

Lee, T. D. and C. N. Yang (1956). "Question Of Parity Conservation In Weak Interactions." Physical Review 104(1): 254-258.

Lerner, N. R. (1995). "Influence Of Murchison Or Allende Minerals On Hydrogen-Deuterium Exchange Of Amino-Acids." Geochimica Et Cosmochimica Acta 59(8): 1623-1631.

Lindstrom, M. (1991). "Improved Enantiomer Separation Using Very Short Capillary Columns Coated With Permethylated Beta-Cyclodextrin." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 14(11): 765-767.

Lorenz, H., A. Perlberg, D. Sapoundjiev, M. P. Elsner and A. Seidel-Morgenstern (2006). "Crystallization of enantiorners." Chemical Engineering And Processing 45(10): 863-873.

MacDermott, A. J., L. D. Barron, A. Brack, T. Buhse, A. F. Drake, R. Emery, G. Gottarelli, J. M. Greenberg, R. Haberle, R. A. Hegstrom, K. Hobbs, D. K. Kondepudi, C. McKay, S. Moorbath, F. Raulin, M. Sandford, D. W. Schwartzman, W. H. P. Thiemann, G. E. Tranter and J. C. Zarnecki (1996). "Homochirality as the signature of life: The SETH Cigar." Planetary And Space Science 44(11): 1441-1446.

Mackenzie, S. L. (1987). "Gas-Chromatographic Analysis Of Amino-Acids As The N-Heptafluorobutyryl Isobutyl Esters." Journal Of The Association Of Official Analytical Chemists 70(1): 151-160.

Mackie, J. C., M. B. Colket and P. F. Nelson (1990). "Shock-Tube Pyrolysis Of Pyridine." Journal Of Physical Chemistry 94(10): 4099-4106.

Mahurin, S., M. McGinnis, J. S. Bogard, L. D. Hulett, R. M. Pagni and R. N. Compton (2001). "Effect of beta radiation on the crystallization. of sodium chlorate from water: A new type of asymmetric synthesis." Chirality 13(10): 636-640.

Managadze, G. (2007). "A new universal mechanism of organic compounds synthesis during prebiotic evolution." Planetary And Space Science 55(1-2): 134-140.

Managadze, G. G. and N. A. Eismont (2009). "A low-orbit experiment on modeling superhigh-velocity impact of a meteorite reproducing abiogenic synthesis of complex organic compounds in torch plasma." Cosmic Research 47(6): 491-499.

Mancinelli, R. L. (2000). "Accessing the martian deep subsurface to search for life." Planetary and Space Science 48: 1035-1042.

Martins, Z., C. M. O. Alexander, G. E. Orzechowska, M. L. Fogel and P. Ehrenfreund (2007). "Indigenous amino acids in primitive CR meteorites." Meteoritics & Planetary Science 42(12): 2125-2136.

Maruyama, A., N. Adachi, T. Takatsuki, M. Torii, K. Sanui and N. Ogata (1990). "Enantioselective permeation of α-amino acid isomers through poly(amino acid)-derived membranes." Macromolecules 23(10): 2748-2752.

Maurette, M. (1998). "Carbonaceous micrometeorites and the origin of life." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 28(4-6): 385-412.

Mayer, S. and V. Schurig (1992). "Enantiomer Separation By Electrochromatography On Capillaries Coated With Chirasil-Dex." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 15(2): 129-131.

Meierhenrich, U., W. H. P. Thiemann and H. Rosenbauer (2001). "Pyrolytic methylation assisted enantioseparation of chiral hydroxycarboxylic acids." Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis 60(1): 13-26.

Meierhenrich, U. J., G. M. M. Caro, J. H. Bredehoft, E. K. Jessberger and W. H. P. Thiemann (2004). "Identification of diamino acids in the Murchison meteorite." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 101(25): 9182-9186.

Meierhenrich, U. J., L. Nahon, C. Alcaraz, J. H. Bredehoft, S. V. Hoffmann, B. Barbier and A. Brack (2005). "Asymmetric vacuum UV photolysis of the amino acid leucine in the solid state." Angewandte Chemie-International Edition 44(35): 5630-5634.

Meierhenrich, U. J., W. H. P. Thiemann, F. Goesmann, R. Roll and H. Rosenbauer (2002). "Enantioselective amino acid analysis in cometary matter planned for the COSAC instrument onboard ROSETTA Lander." Proceedings Of The Second European Workshop On Exo-Astrobiology 518: 477-478.

Meunier, D., R. Sternberg, F. Mettetal, A. Buch, D. Coscia, C. Szopa, C. Rodier, P. Coll, M. Cabane and F. Raulin (2005). "A laboratory pilot for in situ analysis of refractory organic matter in Martian soil by gas chromatography–mass spectrometry." Advances in Space Research: 8.

Mileikowsky, C., F. A. Cucinotta, J. W. Wilson, B. Gladman, G. Horneck, L. Lindegren, J. Melosh, H. Rickman, M. Valtonen and J. Q. Zheng (2000). "Risks threatening viable transfer of microbes between bodies in our solar system." Planetary And Space Science 48(11): 1107-1115.

Miller, S. L. (1953). "A Production Of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions." Science 117(3046): 528-529.

Miller, S. L. and L. E. Orgel (1974). The Origins of Life on the Earth. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.

Mitchell, E. P., L. Evans, P. Schultz, R. Madsen, J. W. Yarbro, C. W. Gehrke and K. Kuo (1992). "Modified Nucleosides In Human Serum." Journal Of Chromatography-Biomedical Applications 581(1): 31-40.

Mortberg, L. (1971). "Nonbiotic Origin Of Optical Activity." Nature 232(5306): 105-&.

Mueller, G. (1953). "The Properties And Theory Of Genesis Of The Carbonaceous Complex Within The Cold Bokevelt Meteorite." Geochimica Et Cosmochimica Acta 4(1-2): 1-10.

Mukhin, L. M., M. V. Gerasimov and E. N. Safonova (1989). "Origin Of Precursors Of Organic-Molecules During Evaporation Of Meteorites And Mafic Terrestrial Rocks." Nature 340(6228): 46-48.

Mukhin, L. M., D. F. Nenarokov, N. V. Porschnev, V. B. Bondarev, B. G. Gelman, G. Israel, F. Raulin, J. Runavot and R. Thomas (1987). "Preliminary calibration results of VEGA 1 and 2 SIGMA-3 gas chromatograph." Advances in Space Research 7(12): 329-335.

Mumma, M. J., R. E. Novak, M. A. DiSanti, B. P. Bonev and N. Dello Russo (2004). "Detection and Mapping of Methane and Water on Mars." Bulletin of the American Astronomical Society 36: 1127.

Mumma, M. J., G. L. Villanueva, R. E. Novak, T. Hewagama, B. P. Bonev, M. A. DiSanti, A. M. Mandell and M. D. Smith (2009). "Strong Release of Methane on Mars in Northern Summer 2003." Science 323(5917): 1041-1045.

Nagy, B. (1965). "Optical Activity In Orgueil Meteorite." Science 150(3705): 1846.
Nagy, B. (1966). "A Study Of Optical Rotation Of Lipids Extracted From Soils Sediments And Orgueil Carbonaceous Meteorite." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 56(2): 389-398.
Nahon, L., G. Garcia, I. Powis, U. Meierhenrichch and A. Brack (2007). Advanced search for the origin of life's homochirality: asymmetric photon induced processes on chiral compounds with far UV circularly polarized synchrotron radiation - art. no. 669403. Instruments, Methods, And Missions For Astrobiology X. Bellingham, Spie-Int Soc Optical Engineering. 6694: 69403-69403.
Navarro-Gonzalez, R., F. A. Rainey, P. Molina, D. R. Bagaley, B. J. Hollen, J. de la Rosa, A. M. Small, R. C. Quinn, F. J. Grunthaner, L. Caceres, B. Gomez-Silva and C. P. McKay (2003). "Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life." Science 302(5647): 1018-1021.
Niemann, H. B., S. K. Atreya, S. J. Bauer, K. Biemann, B. Block, G. R. Carignan, T. M. Donahue, R. L. Frost, D. Gautier, J. A. Haberman, D. Harpold, D. M. Hunten, G. Israel, J. I. Lunine, K. Mauersberger, T. C. Owen, F. Raulin, J. E. Richards and S. H. Way (2002). "The Gas Chromatograph Mass Spectrometer for the Huygens Probe." Space Science Reviews 104(1-2): 553-591.
Novotny, M., J. M. Hayes, F. Bruner and P. G. Simmonds (1975). "Gas-Chromatographic Column For Viking 1975 Molecular Analysis Experiment." Science 189(4198): 215-216.
Nozal, M. J., J. L. Bernal, M. L. Toribio, J. C. Diego and A. Ruiz (2004). "Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection." Journal Of Chromatography A 1047(1): 137-146.
Nuevo, M., G. Auger, D. Blanot and L. d'Hendecourt (2008). "A detailed study of the amino acids produced from the vacuum UV irradiation of interstellar ice analogs." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 38(1): 37-56.
Nuevo, M., U. J. Meierhenrich, G. M. M. Caro, E. Dartois, L. d'Hendecourt, D. Deboffle, G. Auger, D. Blanot, J. H. Bredehoft and L. Nahon (2006). "The effects of circularly polarized light on amino acid enantiomers produced by the UV irradiation of interstellar ice analogs." Astronomy & Astrophysics 457(3): 741-751.
Nuevo, M., U. J. Meierhenrich, L. d'Hendecourt, G. M. M. Caro, E. Dartois, D. Deboffle, W. H. P. Thiemann, J. H. Bredehoft and L. Nahon (2007). "Enantiomeric separation of complex organic molecules produced from irradiation of interstellar/circumstellar ice analogs." Advances In Space Research 39(3): 400-404.
Ohishi, M. (1997). "Observations of "Hot Cores"." Molecules In Astrophysics: Probes And Processes(178): 61-74.
Oparin, A. I. (1924). The Origin of Life. Moscow, Moscow Worker publisher.
Oro, J. (1961). "Comets And Formation Of Biochemical Compounds On Primitive Earth." Nature 190(477): 389-&.
Oro, J. and C. B. Cosmovici (1997). Comets and Life on the primitive Earth, in Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe. S. B. C.B. Cosmovici, and D. Werthimer: 97-120.
Oro, J. and G. Holzer (1979). "Photolytic Degradation And Oxidation Of Organic-Compounds Under Simulated Martian Conditions." Journal Of Molecular Evolution 14(1-3): 153-160.
Oyama, V. I., S. P. Vango and E. M. Wilson (1962). "Application Of Gas Chromatography To The Analyses Of Organics, Water, And Adsorbed Gases In The Lunar Crust." Ars Journal 32(3): 354-360.
Paabo, S., R. G. Higuchi and A. C. Wilson (1989). "Ancient Dna And The Polymerase Chain-Reaction - The Emerging Field Of Molecular Archaeology." Journal Of Biological Chemistry 264(17): 9709-9712.

Pendleton, Y. J. (1997). "Detection of organic matter in interstellar grains." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 27(1-3): 53-78.

Pfeiffer, J. and V. Schurig (1999). "Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography." Journal Of Chromatography A 840(1): 145-150.

Pilling, S., D. P. P. Andrade, R. B. de Castilho, R. L. Cavasso, A. F. Lago, L. H. Coutinho, G. G. B. de Souza, H. M. Boechat-Roberty and A. N. de Brito (2008). Survival of gas phase amino acids and nucleobases in space radiation conditions. Iau: Organic Matter In Space. Cambridge, Cambridge Univ Press. 251: 371-375.

Pizzarello, S. (2004). "Chemical evolution and meteorites: An update." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 34(1-2): 25-34.

Pizzarello, S. and J. R. Cronin (2000). "Non-racemic amino acids in the Murray and Murchison meteorites." Geochimica Et Cosmochimica Acta 64(2): 329-338.

Pizzarello, S., M. Zolensky and K. A. Turk (2003). "Nonracemic isovaline in the Murchison meteorite: Chiral distribution and mineral association." Geochimica Et Cosmochimica Acta 67(8): 1589-1595.

Pollock, G. E., C. N. Cheng, S. E. Cronin and K. A. Kvenvolden (1975). "Stereoisomers Of Isovaline In Murchison Meteorite." Geochimica Et Cosmochimica Acta 39(11): 1571-1573.

Powers, L., S. T. Ciraolo, K. C. Agarwal, A. Kumar, C. Bomont, M. V. Soloviev, F. David, S. Desrochers and H. Brunengraber (1994). "Assay Of The Enantiomers Of 1,2-Propanediol, 1,3-Butanediol, 1,3-Pentanediol, And The Corresponding Hydroxyacids By Gas-Chromatography Mass-Spectrometry." Analytical Biochemistry 221(2): 323-328.

Quam, L. O. (1971). Research in the Antarctic. Washington DC, Amer. Assoc. for the Advancement of Science.

Quinn, R. C., A. P. Zent, F. J. Grunthaner, P. Ehrenfreund, C. L. Taylor and J. R. C. Garry (2005). "Detection and characterization of oxidizing acids in the Atacama Desert using the Mars Oxidation Instrument." Planetary And Space Science 53(13): 1376-1388.

Rau, H. (1983). "Asymmetric Photochemistry In Solution." Chemical Reviews 83(5): 535-547.

Rodante, F. (1992). "Thermodynamics And Kinetics Of Decomposition Processes For Standard Alpha-Amino-Acids And Some Of Their Dipeptides In The Solid-State." Thermochimica Acta 200: 47-61.

Rodier, C., C. Laurent, C. Szopa, R. Sternberg and F. Raulin (2002). "Chirality and the origin of life: In situ enantiomeric separation for future space missions." Chirality 14(6): 527-532.

Rodier, C., R. Sternberg, F. Raulin and C. Vidal-Madjar (2001). "Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography." Journal Of Chromatography A 915(1-2): 199-207.

Rosenbauer, H., S. A. Fuselier, A. Ghielmetti, J. M. Greenberg, F. Goesmann, S. Ulamec, G. Israel, S. Livi, J. A. MacDermott, T. Matsuo, C. T. Pillinger, F. Raulin, R. Roll and W. Thiemann (1999). "The COSAC experiment on the Lander of the ROSETTA mission." Life Sciences: Exobiology 23(2): 333-340.

Sato, I., K. Kadowaki, H. Urabe, J. H. Jung, Y. Ono, S. Shinkai and K. Soai (2003). "Highly enantioselective synthesis of organic compound using right- and left-handed helical silica." Tetrahedron Letters 44(4): 721-724.

Schardinger, F. (1904). "Wien. Klin. Wochenschr." 17: 207.

Schmalzing, D., G. J. Nicholson, M. Jung and V. Schurig (1992). "Enantiomer Separation By Capillary Sfc And Gc On Immobilized Permethyl-Beta-Cyclodextrin - A Systematic Comparison." Journal Of Microcolumn Separations 4(1): 23-28.

Schroeder, R. A. (1974). Kinetics, Mechanism, and Geochemical Application of Amino Acid Racemization in Various Fossils. San Diego, University of California.

Schurig, V. (1983). Asymetric Synthesis, Academic Press.

Schurig, V. (1996). Chromatographic Separations Based On Molecular Recognition. K. J. (Ed.). New York, Wiley: 371-418.

Schurig, V. (2002). "Chiral separations using gas chromatography." Trac-Trends In Analytical Chemistry 21(9-10): 647-661.

Schurig, V. and F. Betschinger (1992). "Metal-Mediated Enantioselective Access To Unfunctionalized Aliphatic Oxiranes - Prochiral And Chiral Recognition." Chemical Reviews 92(5): 873-888.

Schurig, V., M. Jung, S. Mayer, M. Fluck, S. Negura and H. Jakubetz (1995). "Unified Enantioselective Capillary Chromatography On A Chirasil-Dex Stationary-Phase - Advantages Of Column Miniaturization." Journal Of Chromatography A 694(1): 119-128.

Schurig, V., Z. Juvancz, G. J. Nicholson and D. Schmalzing (1991). "Separation Of Enantiomers On Immobilized Polysiloxane-Anchored Permethyl-Beta-Cyclodextrin (Chirasil-Dex) By Supercritical Fluid Chromatography." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 14(1): 58-62.

Schurig, V. and H. P. Nowotny (1988). "Separation Of Enantiomers On Diluted Permethylated Beta-Cyclodextrin By High-Resolution Gas-Chromatography." Journal Of Chromatography 441(1): 155-163.

Schurig, V. and H. P. Nowotny (1990). "Gas-Chromatographic Separation Of Enantiomers On Optically-Active Metal-Complex-Free Stationary Phases.2. Gas-Chromatographic Separation Of Enantiomers On Cyclodextrin Derivatives." Angewandte Chemie-International Edition In English 29(9): 939-957.

Schurig, V., D. Schmalzing, U. Muhleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot and J. C. Buyten (1990). "Gas-Chromatographic Enantiomer Separation On Polysiloxane-Anchored Permethyl-Beta-Cyclodextrin (Chirasil-Dex)." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 13(10): 713-717.

Sephton, M. and I. Gilmour (2000). Macromolecular organic materials in carbonaceous chondrites: A review of their sources and their role in the origin of life on the early Earth. Impacts And The Early Earth. Berlin, Springer-Verlag Berlin. 91: 27-49.

Sephton, M. A. (2002). "Organic compounds in carbonaceous meteorites." Natural Product Reports 19(3): 292-311.

Sephton, M. A., I. P. Wright, I. Gilmour, J. W. de Leeuw, M. M. Grady and C. T. Pillinger (2002). "High molecular weight organic matter in martian meteorites." Planetary And Space Science 50(7-8): 711-716.

Shimoyama, A., K. Harada and K. Yanai (1985). "Amino-Acids From The Yamato-791198 Carbonaceous Chondrite From Antarctica." Chemistry Letters(8): 1183-1186.

Silvaieh, H., M. G. Schmid, O. Hofstetter, V. Schurig and G. Gubitz (2002). "Development of enantio selective chemiluminescence flow- and sequential-injection immunoassays for alpha-amino acids." Journal Of Biochemical And Biophysical Methods 53(1-3): 1-14.

Simoneit, B. R. T., R. E. Summons and L. L. Jahnke (1998). "Biomarkers as tracers for life on early Earth and Mars." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 28(4-6): 475-483.

Skelley, A. M., H. J. Cleaves, C. N. Jayarajah, J. L. Bada and R. A. Mathies (2006). "Application of the mars organic analyzer to nucleobase and amine biomarker detection." Astrobiology 6(6): 824-837.

Skelley, A. M. and R. A. Mathies (2003). "Chiral separation of fluorescamine-labeled amino acids using microfabricated capillary electrophoresis devices for extraterrestrial exploration." Journal Of Chromatography A 1021(1-2): 191-199.

Snow, T. P. (2001). "The unidentified diffuse interstellar bands as evidence for large organic molecules in the interstellar medium." Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy 57(4): 615-626.

Snyder, L. E. (2006). "Interferometric observations of large biologically interesting interstellar and cometary molecules." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 103(33): 12243-12248.

Snyder, L. E., F. J. Lovas, J. M. Hollis, D. N. Friedel, P. R. Jewell, A. Remijan, V. V. Ilyushin, E. A. Alekseev and S. F. Dyubko (2005). "A rigorous attempt to verify interstellar glycine." Astrophysical Journal 619(2): 914-930.

Soai, K. and T. Kawasaki (2008). Asymmetric autocatalysis with amplification of chirality. Amplification Of Chirality. Berlin, Springer-Verlag Berlin. 284: 1-33.

Soai, K., T. Shibata, H. Morioka and K. Choji (1995). "Asymmetric Autocatalysis And Amplification Of Enantiomeric Excess Of A Chiral Molecule." Nature 378(6559): 767-768.

Spackman, D. H., W. H. Stein and S. Moore (1958). "Automatic Recording Apparatus For Use In The Chromatography Of Amino Acids." Analytical Chemistry 30(7): 1190-1206.

Stamper, J. A. (1991). "Review On Spontaneous Magnetic-Fields In Laser-Produced Plasmas - Phenomena And Measurements." Laser And Particle Beams 9(4): 841-862.

Sternberg, R., C. Szopa, D. Coscia, S. Zubrzycki, F. Raulin, C. Vidal-Madjar, H. Niemann and G. Israel (1999). "Gas chromatography in space exploration - Capillary and micropacked columns for in situ analysis of Titan's atmosphere." Journal Of Chromatography A 846(1-2): 307-315.

Stockton, A. M., T. N. Chiesl, T. K. Lowenstein, X. Amashukeli, F. Grunthaner and R. A. Mathies (2009). "Capillary Electrophoresis Analysis of Organic Amines and Amino Acids in Saline and Acidic Samples Using the Mars Organic Analyzer." Astrobiology 9(9): 823-831.

Stockton, A. M., T. N. Chiesl, J. R. Scherer and R. A. Mathies (2009). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Analysis with the Mars Organic Analyzer Microchip Capillary Electrophoresis System." Analytical Chemistry 81(2): 790-796.

Swings, P. and L. Rosenfeld (1937). "Considerations regarding interstellar molecules." Astrophysical Journal 86(4): 483-486.

Sybilska, D. and T. Koscielski (1983). "Beta-Cyclodextrin As A Selective Agent For The Separation Of Ortho-Xylene, Meta-Xylene And Para-Xylene And Ethylbenzene Mixtures In Gas-Liquid-Chromatography." Journal Of Chromatography 261(3): 357-362.

Szejtli, S., Ed. (1982). Cyclodextrins and their inclusion Complexes. Budapest, Akademiai Kiadó.

Szopa, C., R. Sternberg, D. Coscia, F. Raulin, C. Vidal-Madjar and H. Rosenbauer (2002). "Gas chromatography for in situ analysis of a cometary nucleus III. Multi-capillary column system for the cometary sampling and composition experiment of the Rosetta lander probe." Journal Of Chromatography A 953(1-2): 165-173.

Takano, Y., A. Ohashi, T. Kaneko and K. Kobayashi (2004). "Abiotic synthesis of high-molecular-weight organics from an inorganic gas mixture of carbon monoxide, ammonia, and water by 3 MeV proton irradiation." Applied Physics Letters 84(8): 1410-1412.

Takano, Y., J. Takahashi, T. Kaneko, K. Marumo and K. Kobayashi (2007). "Asymmetric synthesis of amino acid precursors in interstellar complex organics by circularly polarized light." Earth And Planetary Science Letters 254(1-2): 106-114.

Terabe, S., K. Otsuka and T. Ando (1985). "Electrokinetic Chromatography With Micellar Solution And Open-Tubular Capillary." Analytical Chemistry 57(4): 834-841.

Thenot, J. P., M. Stafford, E. C. Horning and M. G. Horning (1972). "Fatty-Acid Esterification With N,N-Dimethylformamide Dialkyl Acetals For Gc Analysis." Analytical Letters 5(4): 217-&.

Thiemann, W. H. P. and U. Meierhenrich (2001). "ESA mission ROSETTA will probe for chirality of cometary amino acids." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 31(1-2): 199-210.

Thomas, P. J., C. F. Chyba and C. P. McKay (1997). Comets and the Origins and Evolution of Life. New York, Springer-Verlag.

Tsiolkovsky, K. (1903). "The Exploration of Cosmic Space by Means of Reaction Devices." Naootchnoe Obozreniye (The Scientific Review).

Tswett, M. S. (1903). On a New Category of Adsorption Phenomena and their Application to Biochemical Analysis, Lecture at the meeting of the Biological Section of the Warsaw Society of Natural Scientists.

Ulbricht, T. L. and F. Vester (1962). "Attempts To Induce Optical Activity With Polarized Beta-Radiation." Tetrahedron 18(MAY): 629-&.

Ulbricht, T. L. V. (1981). "Reflections On The Origin Of Optical Asymmetry On Earth." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 11(1-2): 55-70.

van Loon, A. J. (2005). "The needless search for extraterrestrial fossils on Earth." Earth-Science Reviews 68(3-4): 335-346.

Venema, A. and P. J. A. Tolsma (1989). "Enantiomer Separation With Capillary Gas-Chromatography Columns Coated With Cyclodextrins.1. Separation Of Enantiomeric 2-Substituted Propionic-Acid Esters And Some Lower Alcohols With Permethylated Beta-Cyclodextrin." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 12(1): 32-34.

Villanueva, G. L., M. J. Mumma, R. E. Novak and T. Hewagama (2008). "Discovery of multiple bands of isotopic CO2 in the prime spectral regions used when searching for CH4 and HDO on Mars." Journal Of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer 109(6): 883-894.

Villiers, A. (1891). C. R. Acad. Sci. 112: 536.

Walker, J. J., J. R. Spear and N. R. Pace (2005). "Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment." Nature 434(7036): 1011-1014.

Wang, J., Z. H. Huang, D. A. Gage and J. T. Watson (1994). "Analysis Of Amino-Acids By Gas Chromatography-Flame Ionization Detection And Gas-Chromatography Mass-Spectrometry - Simultaneous Derivatization Of Functional-Groups By An Aqueous-Phase Chloroformate-Mediated Reaction." Journal Of Chromatography A 663(1): 71-78.

Williams, K. M. and G. G. Smith (1977). "Critical Evaluation Of Application Of Amino-Acid Racemization To Geochronology And Geothermometry." Origins Of Life And Evolution Of The Biosphere 8(2): 91-144.

Wonnacott, D. M. (1979). The Application of Gas Chromatography to the Resolution of Enantiomeric Mixtures of Amino Acids, Factors Affecting the Racemization of Amino Acids. Logan, UT, Utah State University.

Wright, I. P., M. R. Sims and C. T. Pillinger (2003). "Scientific objectives of the Beagle 2 lander." Acta Astronautica 52(2-6): 219-225.

Yang, J. and S. Epstein (1983). "Interstellar Organic-Matter In Meteorites." Geochimica Et Cosmochimica Acta 47(12): 2199-2216.

Yesilot, S. and B. Cosut (2007). "Comparison of HPLC and NMR characterization of the stereogenic properties of cyclotriphosphazene derivatives containing two equivalent centres of chirality: Cis (meso) and trans (racemic) isomers." Inorganic Chemistry Communications 10: 88-93.

Zagorski, Z. P. (2003). "Radiation chemistry and origins of life on earth." Radiation Physics And Chemistry 66(5): 329-334.

Zampolli, M., D. Meunier, R. Sternberg, F. Raulin, C. Szopa, M. C. Pietrogrande and F. Dondi (2006). "GC-MS analysis of amino acid enantiomers, as their N(O,S)-perfluoroacyl perfluoroalkyl esters: Application to space analysis." Chirality 18(4): 279-295.

Zampolli, M. G., G. Basaglia, F. Dondi, R. Sternberg, C. Szopa and M. C. Pietrogrande (2007). "Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis." Journal Of Chromatography A 1150(1-2): 162-172.

Zolensky, M. E., W. L. Bourcier and J. L. Gooding (1989). "Aqueous Alteration On The Hydrous Asteroids - Results Of Eq3/6 Computer-Simulations." Icarus 78(2): 411-425.

Chapitre II : résumé

La chimie planétaire et interstellaire conduit à la formation de nombreuses molécules prébiotiques importantes. Elles sont de ce fait une voie d'étude intéressante pour l'exobiologie. Comme nous pouvons l'observer sur Terre, l'homochiralité des molécules biologiques est une caractéristique de la vie. Si l'on considère la théorie abiotique de l'homochiralité, des molécules chirales synthétisées dans l'espace pourraient être à l'origine des premières formes de vie sur Terre et pourraient également avoir donné lieu à de la vie sur les autres planètes habitables du système solaire, par exemple Mars.

Le but de cette première étude est de comparer la réponse chromatographique d'un certain nombre de molécules organiques chirales, dans un premier temps des molécules volatiles, afin de déterminer quelle colonne chromatographique est la plus pertinente pour détecter et séparer les molécules organiques chirales. Les études se sont portées sur trois colonnes capillaires chirales différentes ; les phases stationnaires de deux d'entre elles sont composées de cyclodextrines modifiées, et celle de la troisième de dérivés d'acides aminés. Si l'utilisation de la colonne sélectionnée peut être étendue à toutes les missions spatiales censées étudier la chiralité dans l'espace (planètes, comètes *etc.*), la première application de cette étude est pour le projet SAM (Sample Analysis at Mars) sur la mission MSL (Mars Science Laboratory) 2011. C'est pourquoi les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la colonne choisie ont été étudiées le plus exhaustivement possible.

Dans ce même contexte de futures missions martiennes (MSL 2011 et Exomars 2016/2018), la détection et la quantification de molécules organiques énantiomériques revêt une importance considérable. La CPG-SM n'autorise cependant que l'analyse de molécules volatiles. Or, la majorité des molécules organiques d'intérêt exobiologique sont réfractaires (acides aminés, acides carboxyliques *etc.*). C'est pourquoi dans la seconde partie de l'étude, nous avons développé et optimisé une méthode permettant la fonctionnalisation et l'analyse chirale des molécules organiques, en utilisant le N,N-dimethylformamide dimethylacetal (DMF-DMA) comme agent de fonctionnalisation. Ce réactif a la particularité de conserver le ou les centres chiraux de ses molécules cibles. Les température et durée de la réaction, ainsi que les paramètres de séparation chromatographique ont été optimisés afin de respecter les contraintes instrumentales imposées par les conditions d'une analyse en milieu spatial. Ce travail a montré que, en plus de ses qualités intrinsèques telles que la production de produits dérivés de faible masse moléculaire et une grande résistance à des conditions opératoires drastiques, le DMF-DMA permet une réaction simple et rapide sur les composés organiques (trois minutes à 140°C en une seule étape). Cela est en parfaite adéquation avec les besoins d'une analyse *in situ*. Avec cette technique, nous avons réussi à identifier 19 des 20 acides aminés protéiniques, et à séparer les énantiomères de 11 d'entre eux. De plus, nous avons minimisé le pourcentage de composés racémisés en optimisant les conditions de la réaction de fonctionnalisation elle-même.

Le protocole a ensuite été étendu aux autres molécules organiques d'intérêt : les acides carboxyliques et nucléiques. Les résultats ont montré qu'en plus de ses qualités citées au dessus, le DMF-DMA est également un agent de fonctionnalisation universel, capable par un même protocole de fonctionnaliser une gamme étendue de composés d'intérêt. Les études quantitatives de linéarité et la détermination des limites de détection montrent que l'expérience proposée est compatible avec l'analyse quantitative des formes énantiomériques de la majorité des composés recherchés, puisque les limites de détection obtenues sont inférieures au ppb. Une estimation grossière de la quantité de matière organique qui pourrait être détectée sur Mars a été effectuée et indique que la limite de détection de l'expérience est pertinente pour les quantités de matière organique supposée dans les sols à analyser.

Chapter II: abstract

Planetary and interstellar chemistry lead to the formation of many prebiotic important molecules and are therefore a fundamental interesting way for astrobiology. As observed on the Earth, the homochirality of biological molecules is an important characteristic of life. According to the abiotic theory of homochirality, some chiral molecules synthesised in space would have been at the origin of life on the Earth and could be at its origin on other planets holding the required conditions, as Mars.

The aim of the first study is to compare the GC-MS response of some chosen volatile chiral organic molecules on three chiral capillary columns; two coated with a modified cyclodextrin and one with amino-acid derivatives as stationary phase, in order to determine the one which would be the most relevant to detect and separate the organics. Even if the use of this column could be extended to all spatial mission planning to study chirality in space (planets, comets etc.), the first application of this study is the SAM (Sample Analysis at Mars) project in the 2011 MSL mission context. That is the reason why the kinetic and thermodynamic properties of the selected column are widely investigated.

Within this same context of the future space missions to Mars (MSL 2011 and Exomars 2016/2018), the detection and quantification of enantiomeric organic molecules is of major importance. As it is known, GC-MS allows to analyze volatile molecules only. Unfortunately, most of the organic molecules of astrobiological interest are refractory (amino acids, some carboxylic acids…). That's why in the second part of this work, we have developed and optimized a method to derivatize and analyze chiral organic molecules, using N,N-dimethylformamide dimethylacetal (DMF-DMA) as the derivatization reagent. This reagent has the property to keep the chiral centers of his target molecules. The temperature, duration of the derivatization reaction, and chromatographic separation parameters have been optimized to meet instrument design constraints imposed upon space experiment devices. This work demonstrates that, in addition to its intrinsic qualities, such as production of light-weight derivatives and a great resistance to drastic operating conditions, DMF-DMA facilitates simple and fast derivatization of organic compounds (three minutes at 140 ◦C in a single step) that is suitable for an *in situ* analysis in space. Using DMF-DMA as the derivatization reagent, we have successfully identified 19 of the 20 proteinic amino acids and have been able to enantiomerically separate eleven of the potential 19 (glycine being non-chiral). Additionally, we have minimized the percentage of racemized amino acid compounds produced by optimizing the conditions of the derivatization reaction itself. The protocol, when optimized on amino acids, has then been extended to carboxylic and nucleic acids. Results demonstrate that in addition to the above-cited pros, DMF-DMA is also a universal derivatization reagent, allowing the analysis of a wide range of organics. Quantitative linearity studies and the determination of the limit of detections show that the proposed method is also suitable for the quantitative determination of both enantiomeric forms of most of the tested amino acids, as limits of detection obtained are lower than the ppb level of organic molecules already detected in Martian meteorites. A rough study of the quantity of organic matter that could be expected on Mars has been carried out and revealed that the low limit of detection of our experiment is relevant with the soil to be analyzed.

Chapitre II – De la fonctionnalisation et séparation énantiomérique des molécules organiques

L'étude de faisabilité d'une fonctionnalisation chirale des molécules organiques sur des échantillons de sol requiert plusieurs étapes de mises au point et d'optimisation en amont. Comme il a été expliqué dans le paragraphe sur les techniques d'analyse de la chiralité, nous avons choisi de mener cette étude sur un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. Cette méthode nécessite donc une volatilisation des molécules réfractaires que sont les acides aminés et la majorité des acides carboxyliques. Le choix de l'agent de fonctionnalisation est crucial pour une séparation énantiomérique optimale. Le DMF-DMA a été choisi pour ses qualités intrinsèques en tant qu'agent de fonctionnalisation, ainsi que pour la pertinence de son utilisation au niveau spatial (chapitre I.7.4). Le DMF-DMA est un agent de fonctionnalisation achiral, qui protège le ou les centres asymétriques des molécules sur lesquelles il agit, permettant ainsi une séparation énantiomérique directe sur une colonne chirale. Le choix de la phase stationnaire chirale de la colonne chromatographique est donc primordial dans cette séparation. C'est pourquoi une étude comparative de différentes phases stationnaires a été effectuée afin de déterminer laquelle est la plus à-même d'opérer une séparation énantiomérique des composés cibles choisis.

II.1. Etude comparative de la séparation des molécules organiques volatiles

II.1.1. Objectif

Afin de comparer les différentes propriétés énantiosélectives des phases stationnaires chirales pour en sélectionner la plus pertinente, nous avons évalué trois types de colonnes chromatographiques fonctionnant sur des principes de sélection énantiomérique différents. Sur chacune d'entre elles, une étude cinétique et thermodynamique a été menée. Celle possédant les meilleures caractéristiques a été étudiée plus en détail, et les limites de détection dans les conditions optimales d'utilisation de cette colonne ont été déterminées. Après un bref rappel de la théorie de la spectrométrie de masse et des grandeurs cinétiques et thermodynamiques d'étude des colonnes chromatographiques, nous expliquerons le déroulement des expériences, les résultats obtenus et leurs interprétations.

II.1.2. Matériel et méthodes

II.1.2.a. Le hardware

Deux types de chromatographes en phase gazeuse couplés à la spectrométrie de masse ont été utilisés. Le premier est un CPG Shimadzu couplé à un spectromètre de masse Shimadzu GC-MS-QP5050A de type quadrupôle. Le second est un CPG Ultra Trace GC ThermoElectron couplé à un spectromètre de masse ThermoElectron de type trappe ionique Polaris Q.

Généralement, un spectromètre de masse peut être décomposé en trois parties principales : la **source**, où les molécules sont transformées en ions, l'**analyseur**, où les ions sont séparés en fonction de leur masse, et le **détecteur**, où les ions séparés produisent un signal interprétable. Le spectromètre requiert un passage pour les ions dégagé de toute collision et par conséquent fonctionne dans des conditions de vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur.

L'**ionisation** des molécules (Figure II.1-1) est ici réalisée par impact électronique (EI) à 70 eV des molécules sortant de la colonne chromatographique. Le flux d'électrons, produit par effet thermoélectrique par un filament en rhénium de la source ionique, permettra d'ioniser les composés neutres qui seront ensuite fragmentés suivant un schéma reproductible.

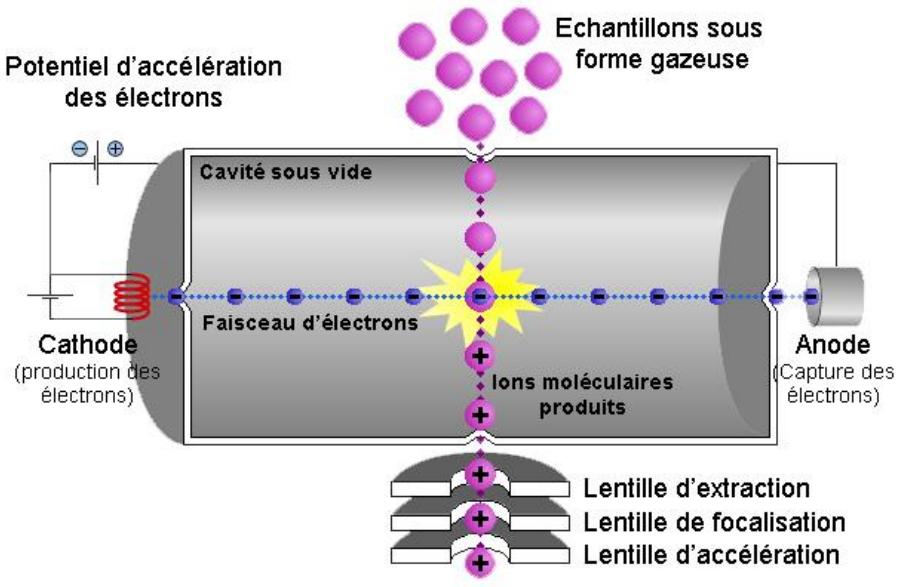


Figure II.1-1 : Schéma descriptif du principe d'ionisation par impact électronique.

Ces ions ainsi créés vont être guidés par des lentilles de la source d'ions vers le système **analytique**, *i.e.* ici un quadrupôle ou une trappe ionique. Les valeurs du vide dans l'analyseur sont en

général 10^{-5} mbar pour un analyseur trappe ionique (orbite circulaire) et 10^{-6} mbar pour un analyseur quadrupolaire.

Le fonctionnement de l'analyse *quadrupolaire* (Figure II.1-2) repose sur la transmission des ions traversant un champ électrodynamique. Il est constitué de quatre électrodes cylindriques parfaitement parallèles, soumises à des potentiels sinusoïdaux, générant un champ électrique dans lequel les ions pourront évoluer. Le mouvement des ions est décrit par des équations dites de Mathieu dont la résolution montre que seuls les ions ayant une valeur du rapport m/z comprise dans une certaine bande possèdent une trajectoire stable et sont transmis par le filtre, les autres ions étant captés par les électrodes. De cette manière, il est possible de contrôler la masse des ions collectés par le détecteur, et d'effectuer une détection en fonction d'une masse particulière voulue (SIM), ou en balayant une gamme de masse déterminée (TIC).

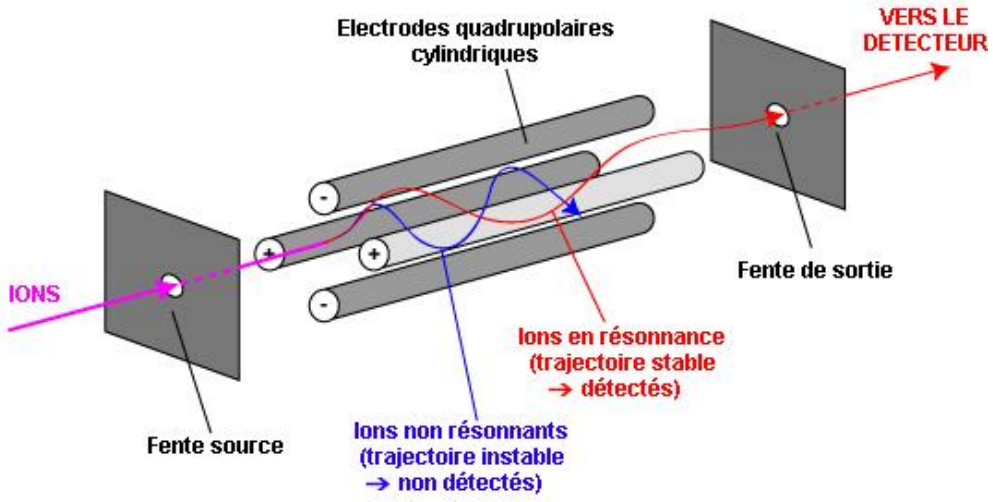


Figure II.1-2 : schéma de l'analyseur quadrupolaire.

Les principaux avantages du spectromètre quadrupolaire résident dans sa souplesse d'utilisation, sa résolution unitaire sur toute sa gamme de masse (10-900 uma pour le Shimadzu QP5050A), sa vitesse de balayage satisfaisante, ainsi que son adaptabilité à différentes interfaces permettant le couplage avec la chromatographie gazeuse ou liquide. Cependant, sa sensibilité limitée par le mode d'analyse en balayage est une contrainte.

Lorsqu'il s'agit d'un analyseur à *trappe ionique* (Figure II.1-3), l'ionisation et l'analyse de la masse ont lieu dans le même espace, suivant des séquences temporelles successives. Il n'y a pas de source d'ionisation séparée, les électrons émis par le filament ionisent les molécules de l'échantillon dans la trappe. Les ions sont produits par un flux d'électrons de courte durée et piégés dans la trappe au moyen de radiofréquences uniquement. Le piège est constitué de trois électrodes à section hyperbolique : une des électrodes est de forme toroïdale et encercle horizontalement la chambre, les deux autres forment des calottes hémisphériques sur le sommet et à la base de cette chambre. Ces

dernières sont électriquement reliées. Une tension en radiofréquence combinée ou non à une tension continue est appliquée entre l'électrode centrale et les deux électrodes calottes. Le champ résultant est alors tridimensionnel. Les trajectoires stables des ions, au sein du champ quadripolaire résultant, sont tridimensionnelles, en forme de huit, et les variations des tensions permettent une sélection et une sortie des ions de la trappe en direction du détecteur. Le domaine de stabilité exploité est défini tel que lorsque les ions en sortent, leur trajectoire radiale reste stable contrairement à celle selon l'axe des z. Un balayage de l'amplitude de la radiofréquence V entraînera donc l'expulsion des ions piégés selon cet axe vers le détecteur. Les ions sont expulsés de la trappe successivement d'après leurs masses croissantes.

Le traitement théorique est basé sur l'équivalence de la force agissant sur l'ion dans un champ quadripolaire et la force dérivée de l'équation de Mathieu ; cette équivalence permet l'application des solutions de l'équation de Mathieu au confinement des ions gazeux (March 1997).

La trappe ionique est largement utilisée comme composant dans les spectromètres de masse faisant partie d'une unité CPG-SM de routine Il est simple, compact, solide et facile d'emploi et le piégeage d'ion se traduit par une bonne sensibilité.

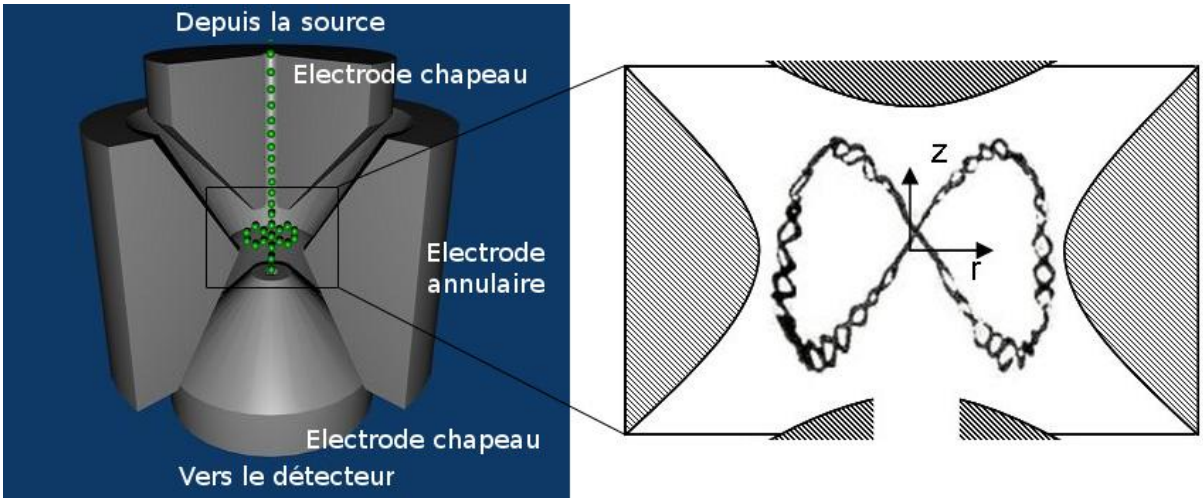


Figure II.1-3 : schéma de l'analyseur à trappe ionique.

Le **détecteur** (Figure II.1-4), quant à lui, est un électro-multiplicateur classique, qui transforme les ions en signal électrique par émission d'électrons secondaires le long d'un tunnel multiplicateur d'électrons.

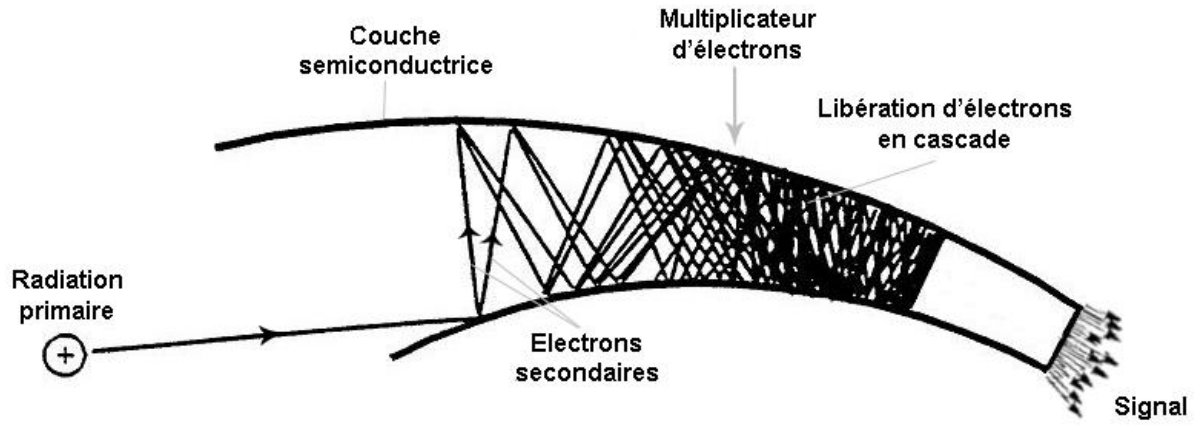


Figure II.1-4 : schéma du détecteur à multiplicateur d'électrons.

Pour le Shimadzu QP5050A, la sensibilité du spectromètre est S/N = 60 pour 100 pg de methyl stearate. Pour le ThermoElectron, elle est de S/N = 38 pour 1 fg d'OFN. Quel que soit le mode de fonctionnement du spectromètre de masse (quadrupôle ou trappe d'ions) la température de la ligne de transfert entre la CPG et le SM a été fixée à 200°C.

Compte-tenu des différentes températures d'ébullition de nos composés d'intérêt, la température de l'injecteur split/splitless a été fixée à 250°C, En effet, la température d'injection doit être supérieure aux températures de volatilisation des composés d'intérêt, pour permettre leur passage dans la colonne en évitant leur perte par condensation sur les parois de l'injecteur.

II.1.2.b. Les molécules cibles

Les molécules cibles de cette étude ont été choisies parmi des molécules chirales volatiles selon différents critères :

- Ces molécules peuvent être des biomarqueurs ou tout marqueur d'une chimie prébiotique active. En effet, malgré de nombreux débats sur le sujet, il est maintenant admis que la chimie seule a été capable de produire plus de 500 composés organiques dans la météorite martienne Murchison, une chondrite carbonée représentative (Cronin *et al.* 1983; Sephton *et al.* 2002; Meierhenrich *et al.* 2004).
- Considérant l'hypothèse du transfert intersidéral et/ou interplanétaire des biomolécules, considérant le bombardement massif aux premiers âges du système solaire et un flux de matière organique météoritique et micrométéoritique annuel important (estimé sur Mars entre $1.9.10^{-5}$ et 4.10^{-4} $g.m^{-2}.an^{-1}$ (Flynn *et al.* 1990)), un autre critère important sur le choix des molécules est l'étude des molécules organiques présumées présentes sur les comètes et/ou météorites, qui auraient pu être apportées à la surface de Mars par ces corps.

Les molécules chirales ont donc été choisies selon la stratégie suivante : i) des composés organiques chiraux volatils qui pourraient être des indicateurs d'une présence de vie à eux-seuls, ii) des composés organiques volatils chiraux qui pourraient être le signe d'une chimie prébiotique, indépendamment de la présence ou absence d'une vie, iii) des composés organiques volatils chiraux détectés sur les comètes ou les météorites. Toutes ces conditions ne sont bien évidemment pas exclusives. C'est pourquoi nous avons retenu les molécules suivantes :

- un groupe d'hydrocarbures, les 3-methylhexane, 3-methylheptane et 2,4-dimethylhexane. En effet, les hydrocarbures sont présents en quantité importante dans les météorites et les comètes, et ont pu ainsi être apportés sur Mars. Les alcanes choisis peuvent être comparés en fonction de la longueur de leur squelette carboné, ainsi que par le nombre de leurs chaines latérales. Ces alcanes ont de plus déjà été étudiés par d'autres auteurs tels que Meierhenrich et al. (Meierhenrich *et al.* 2003).

- un groupe d'alcools, les 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 3-methyl-2-butanol, 2-methyl-1-butanol et 4-methyl-2-pentanol. En effet, la surface martienne étant très oxydante, les alcanes ont pu être oxydés en alcools. (Benner *et al.* 2000)

- un groupe d'esters, les methyl 2-hydroxypropanoate, methyl 2-methylbutanoate, et methyl 3-methylpentanoate. Selon la théorie de Benner, les alcools eux-mêmes peuvent également être oxydés en cétones, tel que la 3-hydroxy-2-butanone, supposée être présente dans les noyaux cométaires (Szopa *et al.* 2003). Puis l'oxydation des cétones conduit aux esters. Les trois esters mentionnés ci-dessus ont été choisis en fonction de la position de leurs chaînes latérales.

- un groupe de composés aromatiques, les α-méthyl-benzèneméthanol, α-éthylebenzèneméthanol, et (1-méthylpropyl)benzène. La présence de ces molécules à la surface de Mars pourrait également être expliquée par la théorie de Benner suite à l'oxydation d'alkylbenzènes. Les composés aromatiques pourraient aussi être présents sur les comètes, d'après la combinaison d'observations et de simulations effectuées.

Toutes ces molécules étudiées sont représentées en figure II.1-5 et listées dans le tableau II.1-1 avec leurs caractéristiques chimiques principales (numéro CAS, formule, masse molaire, température de fusion et densité). Cette liste est non exhaustive, mais permet l'étude d'un large panel de molécules organiques chirales et volatiles.

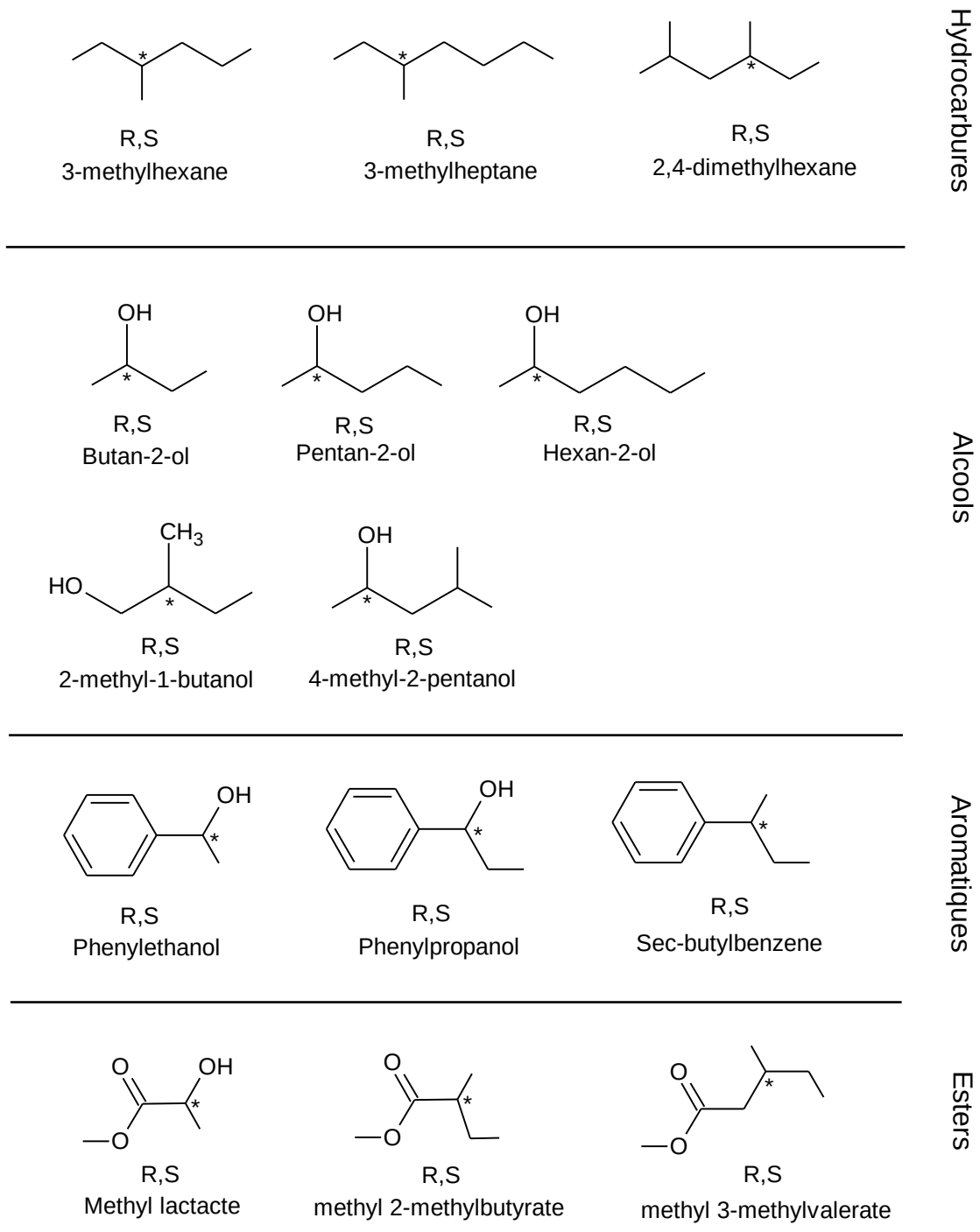


Figure II.1-5 : représentation des 14 composés étudiés, classés en fonction de leurs fonctions chimiques ; hydrocarbures, alcools, aromatiques et esters.

Tableau II.1-1 : molécules choisies pour la sélection de la colonne chromatographique, et leurs principales caractéristiques chimiques à P_{atm} = 1 bar et T = 25°C.

Molécule	Numéro CAS	Formule	Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	Température d'ébullition (°C)	Densité (g/mL)
Alcools groupe 1					
butan-2-ol	15892-23-6	$C_4H_{10}O$	74,12	99-100	0,807
pentan-2-ol	31087-44-2	$C_5H_{12}O$	88,15	118-121	0,809
hexan-2-ol	626-93-7	$C_6H_{14}O$	102,2	137-140	0,814
Alcools groupe 2					
2-methyl-1-butanol	137-32-6	$C_5H_{12}O$	88,15	126-129	0,819
4-methyl-2-pentanol	108-11-2	$C_6H_{14}O$	102,2	130-133	0,808
Aromatiques					
α-methyl-benzenemethanol	60-12-8	$C_8H_{10}O$	122,2	200-203	1,010
α-methyl-benzeneethanol	122-97-4	$C_9H_{12}O$	136,2	217-219	0,993
(1-Methylpropyl)benzene	135-98-8	$C_{10}H_{14}$	134,2	173,3	0,862
Esters					
Met-2-hydroxypropanoate	547-64-8	$C_4H_8O_3$	104,1	144,8	1,093
Met-2-methylbutanoate	868-57-5	$C_6H_{12}O_2$	116,2	113-115	0,885
Met-3-methylpentanoate	2177-78-8	$C_7H_{14}O_2$	130,2	/	0,880
Hydrocarbures					
3-methylhexane	589-34-4	C_7H_{16}	100,2	89-91	0,686
3-methylheptane	589-81-1	C_8H_{18}	114,2	119-120	0,706
2,4-dimethylhexane	589-43-5	C_8H_{18}	114,2	109-111	0,701

Toutes ces molécules sont volatiles, elles peuvent donc être analysées directement par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. Les analyses sont effectuées sur un CPG-SM ThermoElectron (Trace GC-PolarisQ).

Le gaz vecteur est un gaz neutre, de l'hélium alpha 2. La plupart des colonnes chirales sont sensibles à l'hydrolyse. La teneur en eau de l'échantillon ainsi que du gaz vecteur doit donc être réduite au strict minimum. L'oxygène du gaz vecteur doit être filtré du fait de la sensibilité des groupes fonctionnels chiraux à l'oxydation, et cela particulièrement à des températures supérieures à 150°C. Un filtre triple (Restek, USA) permettant de filtrer l'oxygène, l'humidité et les hydrocarbures est donc utilisé.

Les composés, commandés chez Sigma-Aldrich (Strasbourg, France), sont de qualité analytique. Ils ont été commandés en tant que mélanges racémiques. En pratique, tous les énantiomères ont été analysés indépendamment en condition isotherme, sous une gamme de température allant de 30 à 120°C. Les températures optimales d'élution de chacun de ces composés

ont été déterminées. A cette température, une analyse cinétique a été effectuée afin de déterminer les conditions d'efficacité maximale des colonnes. Il a fallu optimiser les conditions chromatographiques et en particulier le débit du gaz vecteur afin d'obtenir la meilleure efficacité de séparation possible. Pour cela, des courbes de Van Deemter-Golay ont été tracées pour différents composés.

Une fois ces paramètres déterminés, une étude thermodynamique des propriétés des différentes colonnes a été menée. Les limites de détection et de quantification ont également été étudiées afin de déterminer la pertinence de l'analyse spatiale *in situ*.

Certains composés ont été dilués dans de l'éthanol. Suite à des problèmes de coélutions pour les études cinétiques, nous avons parfois utilisé comme solvant le dichlorométhane. Nous préciserons au fur et à mesure si le composé a été dilué dans l'éthanol ou dans le dichlorométhane. Cependant le choix du solvant n'a aucune incidence sur les résultats attendus.

II.1.2.c. Les phases stationnaires

Les analyses ont été effectuées sur trois types de colonnes capillaires chirales possédant des phases stationnaires dont les propriétés diffèrent les unes des autres. Le premier type comporte une phase constituée d'acides aminés modifiés (Chirasil-Val) alors que les deux autres possèdent des phases stationnaires composées de cyclodextrines (Chiraldex B-PM et Chirasil-Dex CB).

La Chirasil-Val (Varian) est commercialisée par la société Varian sous le nom de CP-Chirasil-L-Val, référence CP7495. La colonne que nous avons utilisée mesure 25m pour un diamètre interne de 0,25 mm. La phase stationnaire est composée du sélecteur chiral, la L-Valine N-tert-butylamide, lié *via* sa fonction amine à un squelette diméthylsiloxane et à son copolymère (2 carboxypropyl)methylsiloxane par un pont amidique (Figure I.5-4), et déposée en une couche uniforme de 0,12 µm d'épaisseur sur la surface interne d'une colonne capillaire en silice fondue. Le polysiloxane chiral en résultant, appelé Chirasil-Val, possède l'énantio-sélectivité de l'acide aminé sélectant d'une part, et d'autre part les propriétés des polysiloxanes indispensables à la chromatographie. Sur ce type de phase, la séparation énantiomérique s'opère principalement par liaisons hydrogène. Du fait de la fragilité thermique des énantiomères utilisés pour la fabrication de ce type de phase stationnaire, il est important de noter que cette dernière ne tolère donc que des températures d'analyse inférieures à 200°C. La CP-Chirasil Val est donc dédiée à la séparation de composés optiquement actifs tels que les acides aminés. Les deux phases L et D sont disponibles dans le commerce. Pour notre étude nous avons utilisé uniquement la phase L. Avec une phase D les résultats auraient été identiques, à une inversion près des temps de rétention D et L d'un couple d'énantiomères.

La Chiraldex B-PM utilisée pour notre étude est distribuée par la société Astec. Il s'agit d'une colonne de 30 m de longueur pour un diamètre interne de 0,25 mm. Elle contient en tant que sélecteur

chiral des molécules de β-cyclodextrine modifiée, dissoutes dans un polymère poly-diméthylsiloxane (DMPS), lui-même déposé en une couche de 0,12 µm sur les parois internes de la colonne capillaire. Le selecteur chiral est un dérivé 2,3,6-tri-O-methyl de β-cyclodextrine. Ce dernier confère à la phase stationnaire une sélectivité importante pour une large gamme de molécules. Le mode de séparation des molécules est principalement basé sur le principe d'inclusion ainsi que sur un mécanisme de sélection par la taille. Le squelette polysiloxane étant particulièrement inerte, il permet parfois une séparation de composés légèrement polaires sans requérir d'étape de fonctionnalisation. Ces types de colonnes résistent à des températures légèrement plus élevées que la phase stationnaire précédente puisque en programmation de température elle peut atteindre 220°C. Cependant pour des isothermes plus longues il ne faut pas dépasser les 200°C.

La Chirasil-Dex CB est commercialisée par Varian sous le nom de CP7505. La colonne que nous avons utilisée a une longueur de 10 m et un diamètre interne de 0,25 mm. Elle contient une phase stationnaire chirale de β-cyclodextrine modifiée, composée de sept unités glycosyl liées directement à une phase de polydimethylsiloxane (Figure I.5-9a). Cette dernière a une épaisseur de 0,25 µm et est liée de manière covalente à la paroi interne de la colonne capillaire composée de silice fondue. La séparation par inclusions est le mécanisme dominant de séparation énantiomérique. Le fait que les cyclodextrines soient liées directement au squelette polysiloxane empêche les molécules de cyclodextrine de migrer sur le film de surface. L'énantiosélectivité est alors homogène, résultant en un facteur de résolution maximal entre les isomères optiques et en une stabilité de l'énantiosélectivité. Cette stabilité entraîne une amélioration significative de la durée de vie de la colonne. Sa température maximale d'utilisation est de 200°C en isotherme et 225°C en programmation de température.

Théorie des plateaux

Afin de caractériser une colonne nous devons introduire brièvement la notion d'efficacité. La distribution statistique des temps de transit des molécules à travers la colonne est caractérisée par une moyenne qui est le temps de rétention et une variance σ^2 liée à l'étalement des arrivées des molécules. Pour caractériser l'efficacité, en 1941, Martin et Synge (Martin *et al.* 1941) ont considéré la colonne de chromatographie comme une colonne de distillation, constituée de « plateaux théoriques ». Il s'agit de découper une colonne en N petits compartiments cylindriques successifs distincts et imaginaires, ou plateaux théoriques. Les molécules subissent de très nombreux transferts entre la phase mobile et la phase stationnaire, et dans chaque plateau théorique, le soluté est à l'équilibre de répartition entre la phase mobile et la phase stationnaire (Figure II.1-6). On admet que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par glissements successifs et distincts d'un plateau théorique à l'autre.

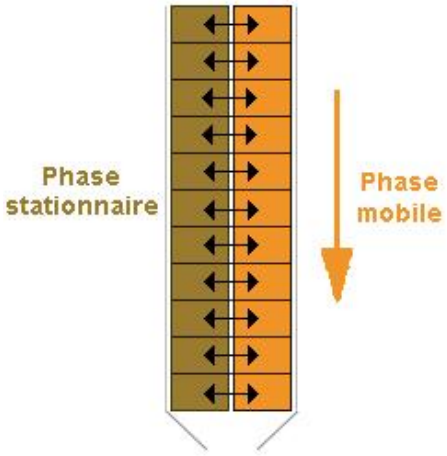


Figure II.1-6 : illustration de la théorie des plateaux. La colonne est subdivisée en N compartiments successifs, dans chacun desquels le soluté est à l'équilibre de répartition entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Plus le nombre N de plateaux théoriques est élevé, plus la colonne est efficace. Ce nombre N de plateau théoriques est calculé par

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{\delta}\right)^2$$ Équation II.1-1

Avec t_R le temps de rétention du soluté, et δ la largeur à mi-hauteur du pic chromatographique. Il est toutefois plus judicieux d'utiliser le nombre de plateaux effectifs car ce dernier dépend directement du temps que le soluté passe réellement dans la colonne :

$$N_{eff} = 5{,}54\left(\frac{t_R - t_M}{\delta}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t'_R}{\delta}\right)^2$$ Équation II.1-2

Avec t_M le temps mort correspondant au temps de rétention d'un soluté non retenu et t'_R le temps de rétention réduit correspondant à la différence : $t'_R = t_R - t_M$

La Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) effective est alors définie comme

$$H_{eff} = \frac{L}{N}$$ Équation II.1-3

L étant la longueur de la colonne. Nous obtenons alors une valeur de H pour les différentes vitesses de gaz vecteur. La courbe obtenue de H en fonction de la vitesse linéaire du gaz vecteur représente la courbe de Van Deemter-Golay. Le minimum de cette courbe correspond à la vitesse de gaz vecteur impliquant une efficacité optimale de la colonne.

Paramètres cinétiques : mesure de l'efficacité d'une colonne chromatographique

Les grandeurs cinétiques caractérisent la largeur et la forme des pics. Elles ont été étudiées à l'aide de l'équation de Van-Deemter-Golay pour plusieurs molécules représentatives. Cela afin de déterminer la pression optimale du gaz vecteur en tête de colonne pour la suite des analyses. La cinétique est liée à l'efficacité de la colonne et donne des informations sur les mécanismes de séparation chromatographique. Pour une colonne capillaire, elle est représentée par l'équation de Golay, qui permet de relier la hauteur d'un plateau théorique (HEPT) à la vitesse moyenne du gaz vecteur (u).

$$\mathrm{HEPT} = \frac{\mathrm{B}}{\mathrm{u}} + \mathrm{Cu} \qquad \text{Équation II.1-4}$$

B est la constante de diffusion longitudinale ou coefficient de diffusion du soluté dans la phase gazeuse, C est la constante de transfert de masse dans la phase stationnaire. Les deux termes B et C contribuent à l'élargissement des pics, ils doivent donc être minimisés.

Le terme B/u correspond à la diffusion longitudinale (Figure II.1-7). Cette diffusion est due à la dispersion des molécules dans la phase mobile, des régions les plus concentrées aux régions les plus diluées (lois de Fick). La largeur de la bande (zone d'élution) augmente au cours du déplacement dans la colonne et cela se répercute sur la largeur du pic du chromatogramme. Plus concrètement, B désigne en fait la tendance naturelle des molécules de solutés à se disperser, c'est-à-dire à se diffuser dans toutes les directions ; cette dispersion est d'autant plus grande que le débit de gaz vecteur est faible. Ce terme est important quand la phase mobile est un gaz. $B/u = 2\gamma D_M/u$ avec γ le facteur d'obstruction ou de sinuosité, lié à l'espace entre les particules de remplissage de la phase stationnaire (égal à 1 pour les colonnes capillaires), et D_M le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

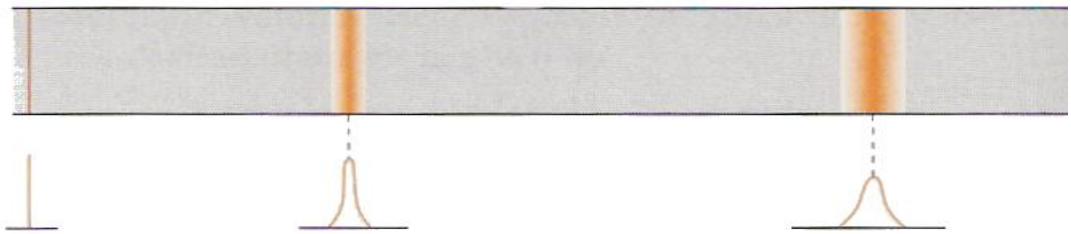


Figure II.1-7 : schématisation de la diffusion longitudinale. Les molécules se dispersent dans la phase mobile au fur et à mesure de l'avancement dans la colonne, aboutissant à un élargissement de pic, et ce d'autant plus que le débit du gaz vecteur est faible.

C.u correspond à la résistance au transfert de masse des molécules entre la phase stationnaire et la phase mobile (et inversement) d'une part, et à l'intérieur de la phase mobile d'autre part (Figure II.1-8). Le coefficient C représente donc les inégalités de passage des molécules d'une

phase à l'autre. Ces phénomènes s'exercent à tout moment de la chromatographie : fixation et élution. Cette résistance empêche la formation de l'équilibre de distribution des composés entre les deux phases. Lors du passage à travers la colonne chromatographique, les solutés sont constamment et réversiblement transférés de la phase mobile à la phase stationnaire. Du temps est nécessaire aux molécules pour passer par diffusion à travers la phase mobile pour atteindre l'interface et entrer dans la phase stationnaire, et chaque molécule du soluté aura un comportement individuel aléatoire. Ce terme C.u devient important lorsque la vitesse du gaz vecteur augmente. Plus u est petit, plus les molécules vont pénétrer dans la phase stationnaire et plus la colonne est efficace.

C.u = (C_M + C_S).u, avec C_M le terme du transfert de masse dans la phase mobile, proportionnel au carré de l'épaisseur moyenne de la couche de phase stationnaire et inversement proportionnel au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile, et C_S le terme de transfert de masse dans la phase stationnaire, proportionnel au carré du diamètre des particules de remplissage et inversement proportionnel au coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire. Le transfert de masse est avantagé par une faible épaisseur de phase stationnaire, un petit diamètre de colonne, une température plus élevée, un coefficient de diffusion plus élevé (phase mobile peu visqueuse) et un faible débit d'éluant.

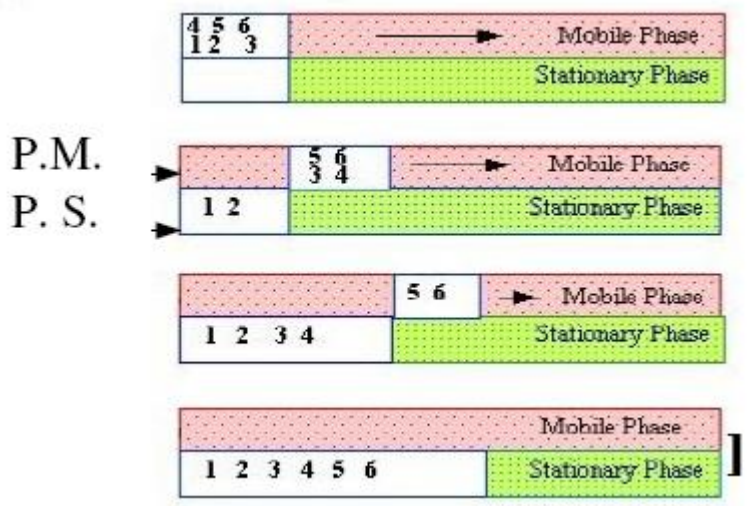


Figure II.1-8 : schématisation du transfert de masse des solutés. Les molécules adoptent un comportement individuel différentiel vis-à-vis de leur diffusion de la phase mobile à la phase stationnaire, ce qui aboutit à un élargissement de pic. Ce phénomène est d'autant plus important que le débit du gaz vecteur est élevé.

En développant les termes dans l'équation II.1-4, nous obtenons cette nouvelle équation de la HEPT :

$$HEPT = \frac{2\gamma D_M}{u} + \left(\frac{d_f^2}{D_M} + \frac{d_p^2}{D_S}\right).u \qquad \text{Équation II.1-5}$$

Représentée graphiquement sur la figure II.1-9.

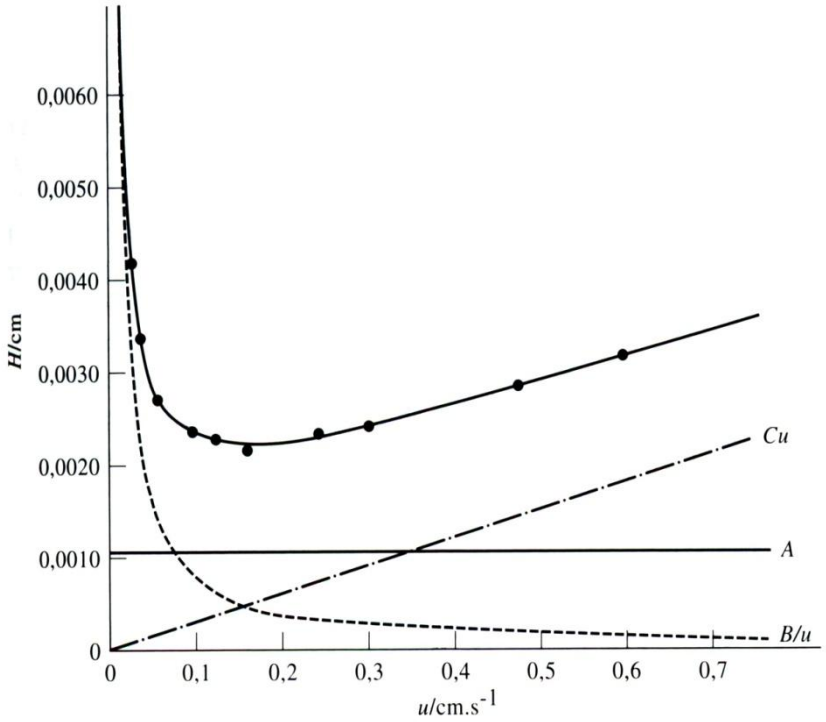


Figure II.1-9 : courbe de Van Deemter-Golay théorique représentant la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) H en fonction de la vitesse linéaire du gaz vecteur (u). L'efficacité maximale de la colonne est obtenue à une HEPT minimum. Les 3 paramètres A, B et C régissent l'efficacité.

L'élargissement longitudinal du pic provient du déplacement des molécules dans des directions parallèles à l'écoulement, alors que l'élargissement dû au transfert de masse provient de la diffusion dans une direction perpendiculaire à l'écoulement (Figure II.1-10).

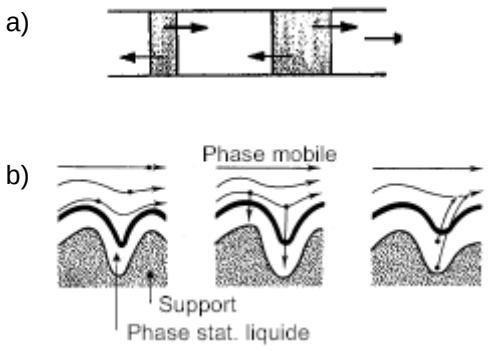


Figure II.1-10 : représentation des causes de l'élargissement des pics. a) la diffusion longitudinale implique des forces de diffusion parallèles à l'écoulement. b) la résistance au transfert de masse implique des forces de diffusion perpendiculaires à l'écoulement.

II.1.3. Résultats et discussion

II.1.3.a. Optimisation des paramètres cinétiques de la séparation chromatographique

Nous avons tracé les courbes de Van Deemter-Golay pour les trois types de colonnes étudiées afin de déterminer la pression optimale d'hélium à appliquer en tête de colonne.
Analysons en détail la courbe Golay obtenue pour la colonne Chirasil-Dex CB. Trois composés représentatifs des familles chimiques tant au niveau structural qu'au niveau des paramètres d'élution (température) ont été étudiés. Ces trois composés sont le 2,4 diméthylhexane, le secbutylbenzène et le phényléthanol. Les températures d'élution pour ces trois composés sont respectivement égales à 30°C, 70°C et 100°C. Une dilution à 1/10 000 a été effectuée pour l'étude des propriétés cinétiques *via* la courbe de Golay. Le butylbenzène a été dilué dans l'éthanol. Pour des raisons de coélution du 2,4 diméthylhexane avec l'éthanol à des vitesses élevées du gaz vecteur, nous avons dilué ce composé dans le dichlorométhane. Pour les mêmes raisons, le troisième composé, le phenyléthanol, a également été dilué dans le dichlorométhane.

1 µL de la solution diluée est injecté, avec un rapport de split de 1/50. En mode split, la vanne de fuite est ouverte et seul un pourcentage précis (1/50) du volume de l'injection est dirigé dans la colonne. On définit alors le rapport de split comme la fraction injectée d'échantillon. Les analyses ont été effectuées à des vitesses linéaires de gaz vecteur variant de 13,6 à 152,9 $cm.s^{-1}$, équivalent à des débits de 0,4 à 4,5 $mL.min^{-1}$.

La HEPT a été calculée selon la formule des équations II.1-2 et II.1-3, avec L = 10 m pour la longueur de la colonne. t'_R est le temps de rétention réduit du temps mort. Le temps mort a été mesuré pour chaque vitesse et température du gaz vecteur par la mesure du temps de rétention du méthane. En effet, sur cette colonne le méthane peut être considéré comme un soluté non retenu. Ce temps mort est affecté logiquement par la vitesse du gaz vecteur, mais ne l'est pas par la température, malgré une dilatation certaine du gaz à des températures supérieures. Chaque mesure est répétée au moins trois fois, de manière à pouvoir calculer l'écart type sur chaque point (Figure II.1-11).

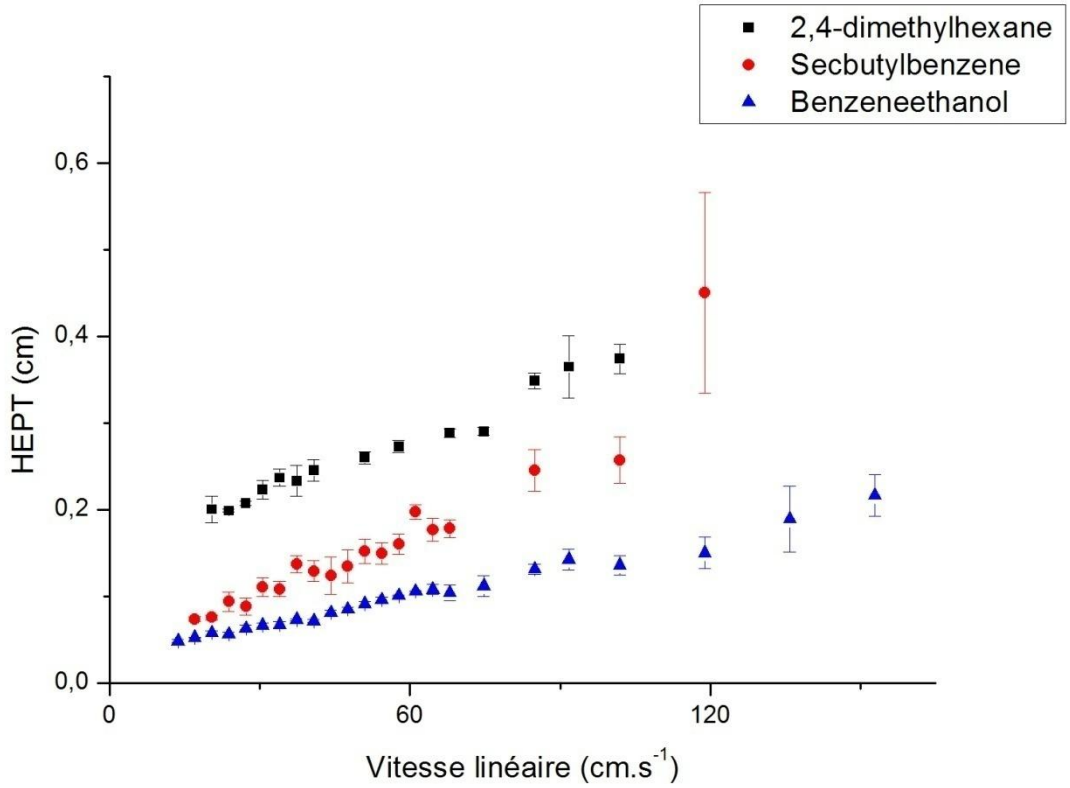


Figure II.1-11 : courbe de Golay. La HEPT (cm) est exprimée en fonction de la vitesse linéaire du gaz vecteur ($cm.s^{-1}$) pour la colonne Chirasil-Dex CB (10m x 0,25mm x 0,25µm).

Nous observons une tendance linéaire croissante pour chacun des composés. D'après l'équation de Golay (HEPT = B/u + C.u), on observe que pour des vitesses linéaires supérieure à 10 $cm.s^{-1}$ l'influence de la diffusion longitudinale est négligeable devant la résistance au transfert de matière. En effet l'influence du terme Cu est prépondérante devant celle du terme B/u. Etant donnée la forte volatilité des solutés et leur temps de rétention très faible, il est probable qu'il n'y ait alors pas de diffusion longitudinale des composés dans le gaz vecteur, ce qui conduit à une annulation du paramètre B/u. La courbe n'est alors dépendante que du paramètre C.u, le comportement des solutés n'est donc sensible qu'au transfert de masse, ce qui conduit à une droite croissante en fonction de la vitesse du gaz vecteur. Cependant il est important de remarquer ici que les limites du chromatographe ont été atteintes en ce qui concerne la vitesse minimale possible du gaz vecteur (0,4 $mL.min^{-1}$, ou 13,6 $cm.s^{-1}$). En effet, les paramètres de l'analyse chromatographique ne nous permettent pas de descendre en dessous de cette valeur.

L'efficacité maximale de la colonne correspond à la HEPT minimale. Ayant une droite croissante, l'efficacité maximale est au débit d'hélium minimal testé, *i.e.* 0,4 $mL.min^{-1}$. Cependant, choisir un faible débit augmente les temps d'analyse. Or, on observe, une faible diminution de l'efficacité (pentes faibles), ce qui nous conduit à pouvoir choisir une valeur de débit supérieure à 0,4 $mL.min^{-1}$. Néanmoins, les composés analysés étant extrêmement volatils, il n'est pas nécessaire de se placer à de grands débits de gaz vecteur au risque de voir l'efficacité de la colonne diminuer. Pour

toutes ces raisons nous avons donc choisi de travailler à un débit de gaz vecteur de 0,6 mL.min^{-1} ou 20,4 cm.s^{-1} comme débit optimal d'hélium.

Les mêmes tests ont également été réalisés sur les deux autres colonnes. Les résultats sont similaires à ceux obtenus sur la colonne Chirasil-Dex CB. La valeur de 0,6 mL.min^{-1} ou 20,4 cm.s^{-1} comme débit optimal d'hélium est choisie pour toutes les expériences à suivre.

II.1.3.b. Le comportement des solutés et grandeurs thermodynamiques

Afin d'étudier le comportement chromatographique des différents composés, nous avons déterminé différentes grandeurs thermodynamiques liées à la rétention et à la séparation des solutés considérés ici. Nous avons donc comparé le facteur de rétention (ou facteur de capacité) k', la résolution et le facteur de sélectivité α pour chacun des solutés et leurs énantiomères respectifs.

Le facteur de capacité permet de comparer les temps de rétention de chaque composé en s'affranchissant de la différence de longueur entre les colonnes ainsi que des volumes morts inhérents à l'appareillage.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \qquad \text{Équation II.1-6}$$

où t_R est le temps de rétention observé du soluté, et t_M le temps mort.

Lorsque plusieurs composés sont présents en solution on parle alors de résolution R_s pour caractériser le degré de séparation de deux pics chromatographiques. Cette grandeur dépend de deux paramètres que sont la distance séparant le sommet des deux pics (facteur thermodynamique) et la largeur de chacun des pics (facteur cinétique). La résolution dépend donc des temps de rétention et de l'efficacité de la colonne :

$$R_S = \frac{t_R^B - t_R^A}{\omega_A + \omega_B} \qquad \text{Équation II.1-7}$$

avec t_R^A et t_R^B les temps de rétention du premier et du second énantiomère élué respectivement. ω correspond à la largeur du pic à mi-hauteur.

La séparation de deux pics l'un par rapport à l'autre est également décrite par le facteur de sélectivité α qui, pour deux pics, est défini comme le rapport des facteurs de capacité :

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a} \qquad \text{Équation II.1-8}$$

où k'_a est le facteur de rétention du premier composé élué, et k'_b le facteur de rétention du deuxième composé (ici, de son énantiomère). t_{Ra} étant alors inférieur ou égal à t_{Rb}, le facteur de sélectivité α sera donc toujours supérieur ou égal à 1.

Pour chaque composé et son énantiomère étudiés, nous avons relevé les temps de rétention et calculé les valeurs des facteurs de capacité ainsi que le facteur de sélectivité. Les k' et α des composés ont ainsi été calculés pour des températures variant entre 40 à 120°C. La rétention des séries homologues et leurs sélectivités énantiomériques ont été étudiées pour chacune des colonnes, Chirasil-Val, CP-Chirasil-Dex et Chiraldex B-PM. Le tableau II.1-2 liste les facteurs k' pour le deuxième énantiomère élué et la sélectivité α de tous les composés étudiés.

Conformément à ce qui est décrit dans la littérature (Berthod *et al.* 1992), pour les deux colonnes, les temps de rétention (et donc les facteurs de rétention) des membres d'une série homologue augmentent proportionnellement avec le nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle principale. Ces temps de rétention sont tous inférieurs à 11 min. Les composés les plus retenus sont les composés aromatiques pour lesquels il a été nécessaire d'augmenter la température de la colonne jusqu'à une valeur moyenne de 120°C. Au contraire, les composés les moins retenus sont les hydrocarbures pour lesquels il a fallu diminuer la température jusqu'à 30°C.

Dans le cas de la cyclodextrine, les pics sont bien de forme gaussienne, sauf pour les esters où un léger "tailing" peut être observé pour les températures les plus élevées. Dans le cas de la Chirasil-Val, les pics observés pour les alcools et les esters présentent un fort "tailing" qui semble dû à la présence des groupements alcools, qui engendrent des interactions trop fortes avec la phase stationnaire. Ce "tailing" peut dans certain cas poser de gros problèmes de quantification.

Tableau II.1-2 : paramètres de rétention (k') et de sélectivité (α) pour les colonnes β-cyclodextrine et Chirasil-Val. Les valeurs de t', k' et α sont données aux températures moyennes d'analyse suivantes : 40°C pour les alcools et les hydrocarbures, 60°C pour les esters et 120°C pour les composés aromatiques. t_1 est le temps de rétention du premier énantiomère élué, t_2 le temps de rétention du deuxième. Pour la Chirasil-Val, lorsque les deux énantiomères coéluent, k' = $k'_1 = k'_2$. Pour les composés dont les énantiomères sont séparés, k'_1 et k'_2 sont représentés.

Soluté	β-cyclodextrine				Chirasil-Val		
	t_1 (min)	t_2 (min)	k'_2	α	t_1 (min)	k' (k'_1/k'_2)	α
butan-2-ol	1,05	1,09	3,95	1,048	1,38	0,29	1
pentan-2-ol	3,05	3,23	13,68	1,064	1,74	0,63	1
hexan-2-ol	8,95	9,43	41,86	1,055	2,64	1,46	1
2-méthyl-1-butanol	7,41	7,74	34,18	1,046	2,16	1,01	1
4-méthyl-2-pentanol	7,68	8,44	37,36	1,102	2,17	1,03	1
phényl éthanol	3,75	5,65	9,44	1,593	17,98	15,45 / 15,71	1,017
phényl propanol	6,12	10,01	17,50	1,699	6,93	5,35 / 6,02	1,126
sec-butylbenzène	1,25	1,25	1,31	1	4,14	2,79	1
méthyl lactate D/L	3,73	4,44	6,21	1,2287	1,87	0,75 / 0,78	1,046
Me-2-méthylbutyrate	2,12	2,40	2,90	1,183	1,53	0,43	1
Me-3-méthylvalérate	4,36	5,98	8,71	1,434	2,17	1,03	1
3-méthylhexane	4,73	4,73	7,52	1	1,56	0,57	1
3-méthylheptane	5,33	11,29	19,34	2,248	2,36	1,38	1
2,4-diméthylhexane	7,74	7,74	12,95	1	1,93	0,96	1

: 40°C
: 60°C
: 120°C

Les résultats obtenus sur la Chirasil-Val montrent une efficacité très limitée de cette colonne vis-à-vis de la séparation des paires énantiomériques. En effet, quelle que soit la température, seuls trois composés ont pu être différenciés de leur molécule spéculaire respective : un ester, le méthyl lactate, et deux composés aromatiques, le phényléthanol et le phénylpropanol.

Les résultats obtenus sur la colonne β-cyclodextrine montrent que la séparation des énantiomères a été observée pour la majorité des composés ($\alpha \geq 1$), excepté le sec-butylbenzène, le 3-méthylhexane et le 2,4-diméthylhexane. Les coefficients de séparation pourraient être améliorés soit par l'optimisation de la géométrie de la colonne, soit par l'utilisation d'autres types de cyclodextrines de (α ou γ) ou simplement de phases stationnaires comportant des substituants de polarités différentes.

En résumé, les deux colonnes présentent des pouvoirs de séparation bien différents : si la séparation est assez bonne dans le cas de la colonne à base de β-cyclodextrine, elle est pratiquement inexistante dans le cas de la colonne Chirasil-Val. De plus, même si ces colonnes ont des géométries différentes, elles contiennent des quantités de phase stationnaire équivalentes ($1{,}96.10^{-6}$ m^3 pour la β-cyclodextrine et $2{,}45.10^{-6}$ m^3 pour la Chirasil-Val). Par conséquent, la différence des pouvoirs de séparation entre ces deux colonnes est majoritairement imputable à la nature de la phase stationnaire et non pas à la géométrie de la colonne. Du fait de l'absence de séparation sur la colonne Chirasil-Val, la suite de cette étude sera menée uniquement sur les deux colonnes a base de β-cyclodextrine, l'une chimiquement greffée (CP-Chirasil β-CD Dex CB Varian) et l'autre diluée (ChiralDex β-CD CB B-PM Astech). Sur ces deux colonnes, les données concernant l'évolution de k' et de α en fonction de la température, obtenues pour les séries d'alcools, d'hydrocarbures, d'esters et d'aromatiques présentent les mêmes tendances quelque soit le type de colonne à base de cyclodextrine. Nous n'avons donc présenté que les résultats concernant la colonne CP-Chirasil β-CD Dex CB Varian. De plus, compte-tenu du comportement chromatographique des alcools identique à celui des autres classes de composés, nous ne détaillerons donc ici que les résultats obtenus pour deux séries homologues de composés, les alcools méthylés et les alcools non méthylés. Ainsi, pour tous les composés, quelle que soit la phase stationnaire, les temps de rétention augmentent quand la température de la colonne diminue (Tableau II.1-3) : une température plus basse abaisse l'agitation thermique spontanée des molécules qui sont alors plus stables, et créent plus facilement des liens avec la phase stationnaire. Avec l'augmentation des temps de rétention les pics énantiomériques (s'ils sont suffisamment étroits) se séparent mieux. Il semble donc préférable de travailler avec une température de colonne la plus basse possible, 30°C est ici la température la plus basse accessible. En deçà de cette température le chromatographe n'arrive plus à stabiliser la température.

Tableau II.1-3 : valeurs des facteurs de capacité pour le 1er composé élué, et du facteur de sélectivité pour une série d'alcools méthylés et non méthylés. Résultats obtenus sur une colonne CP-Chirasil-Dex, 10m x 0,25mm x 0,25µm.

Temperature de la colonne (°C)	Composés racémiques				
	Facteur de retention k'				
	Butan-2-ol	Pentan-2-ol	Hexan-2-ol	2-met-1-butanol	4-met-2-pentanol
40	3,77	12,86	39,68	32,68	33,91
50	2,14	7,00	20,09	17,00	17,27
60	1,23	3,95	10,68	9,18	9,05
70	0,68	2,23	5,00	5,73	4,82
80	0,27	1,32	3,23	2,86	2,68
100	0,20	0,55	1,00	0,81	0,77
	Facteur de sélectivité α				
	Butan-2-ol	pentan-2'ol	hexan-2-ol	2-metbutan-1-ol	4-met-2-pentanol
40	1,048	1,064	1,055	1,046	1,102
50	1,064	1,052	1,048	1,035	1,082
60	1,00	1,046	1,038	1,030	1,070
70	1,00	1,00	1,018	1,032	1,057
80	1,00	1,00	1,014	1,00	1,034
100	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

D'un point de vu structural on observe (Tableau II.1-1) qu'à poids moléculaire identique il n'y a pas de grande différence de volatilité. En effet, pour des composés à poids moléculaires identiques deux à deux, le pentan-2-ol et le 2-methyl-1-butanol d'un côté (PM 88), l'hexanol et le 4-methyl-2-pentanol de l'autre (PM 102), le fait d'être ramifié ou linéaire n'a pas d'influence systématique sur la volatilité de la molécule. En effet, le pentanol est plus volatil qu'un composé de même poids moléculaire mais ramifié (2-met-1-butanol), alors que l'hexanol l'est moins qu'un composé ramifié de même poids moléculaire (4-méthyl-2-pentanol).

De manière générale, à température constante, les facteurs de rétention des composés d'une même série augmentent lorsque la température d'ébullition augmente. Cette évolution est normale au regard de la volatilité des composés étudiés.

Compte-tenu de la forte polarité des composés, leur élution est essentiellement liée à leur point d'ébullition. Le facteur de rétention d'un composé diminue donc logiquement avec l'augmentation de la température de la colonne (Tableau II.1-3). Le facteur d'énantiosélectivité varie quant à lui selon le même schéma, jusqu'à une valeur de 1 pour tous les composés à 100°C. Seul le 4-methylpentan-2-ol a une valeur de 1,03 à 100°C. A cette température il y a donc coélution des deux énantiomères pour quasiment tous les composés étudiés. On constate également que plus le facteur de rétention du composé est faible, plus la température de coélution d'une paire énantiomérique est faible.

Diverses propriétés expliquent cette séparation : la taille des cyclodextrines (sept glucoses pour la β-cyclodextrine) qui est particulièrement appropriée à l'étude des petites molécules volatiles, les mécanismes d'inclusion spécifiques à la disposition des cyclodextrines, et les liaisons dipolaires. Lors d'une étude mécanistique, Berthod *et al.* (Berthod *et al.* 1992) ont démontré qu'au moins deux mécanismes différents pouvaient conduire à une séparation énantiomérique par les CD. La première implique la formation de complexes d'inclusion, l'autre des interactions externes avec les CD. Actuellement, une majorité d'énantiomères semblent être résolus plutôt par des associations externes ou associations multiples que par des processus d'inclusion. Cependant, il est probable que la quasi-totalité des composés soient séparés par une combinaison de ces deux mécanismes. La reconnaissance énantiomérique multimodale apporte un avantage certain au regard de la grande variété de classes de composés résolus sur ces colonnes.

Le fait que la rétention chromatographique réponde à des forces de type liaisons hydrogène, inclusions, dispersions, interactions dipole-dipole, électrostatiques et hydrophobes (Schurig *et al.* 1990; Venema *et al.* 1991; Berthod *et al.* 1992; Schreier *et al.* 1995) ne suffit pas à prédire le comportement (rétention, sélectivité...) d'un soluté vis-à-vis d'une phase stationnaire de type cyclodextrine. De plus, même si une interaction avec le sélectant chiral est un pré-requis à la séparation énantiomérique, une interaction forte n'est pas nécessaire à une énantiosélectivité efficace (Lipkowitz *et al.* 1997). Il est donc important de s'attacher à comprendre les mécanismes physico-chimiques qui permettent la séparation énantiomérique.

II.1.3.c. Paramètres thermodynamiques : mécanismes de séparation

L'étude précédente a permis de sélectionner la colonne à base de cyclodextrine, et de déterminer les paramètres optimaux de séparation des solutés cibles. Afin de comprendre les mécanismes qui expliquent cette séparation, nous avons choisi d'effectuer une étude thermodynamique des deux colonnes à base de cyclodextrine précédemment décrites. Pour cela, et sur chacune d'entre elles, nous avons déterminé les paramètres thermodynamiques suivants :

- Enthalpie ($\Delta H°$) : énergie d'interaction de la molécule avec la phase stationnaire de la colonne capillaire chirale. Il s'agit d'une énergie d'adsorption. Elle est déterminée par la nature et la force des interactions moléculaires en jeu entre les solutés et les phases stationnaire et mobile.
- Entropie ($\Delta S°$) : elle correspond à une part de l'énergie d'adsorption. L'entropie standard est la mesure du degré de liberté ou du caractère aléatoire du soluté dans les deux phases mobile et stationnaire.
- Energie de Gibbs ou enthalpie libre ($\Delta G°$) : la différence d'enthalpie libre permet de caractériser l'énantiosélectivité.

Les entropie et enthalpies de partage permettent l'étude des principes de séparation des colonnes chirales. Comprendre ces principes de séparation doit permettre d'extrapoler, et limiter les études empiriques pour la sélection des colonnes de vol. En effet, aucun système chromatographique

n'est exclusivement contrôlé soit par l'enthalpie standard soit par l'entropie standard. Cependant si l'enthalpie standard domine alors on parle d'une distribution énergétiquement contrôlée, inversement si l'entropie standard domine on parlera d'une distribution entropiquement contrôlée. Il est donc important de pouvoir quantifier chacune de ces énergies afin de mieux comprendre les mécanismes de séparation chromatographique.

La séparation de molécules en CPG peut être étudiée de façon théorique grâce aux principes de thermodynamique générale. Pour cela, il est nécessaire d'introduire un certain nombre de définitions.

Facteur de rétention

Pour un soluté A en équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile on peut écrire la constante de partage K ainsi :

$$K_A = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$ Équation II.1-9

ou $[A]_S$ et $[A]_M$ sont respectivement les concentrations ($mol.L^{-1}$) du soluté A dans la phase stationnaire et mobile.

Par définition l'enthalpie libre $\Delta G°$ s'écrit alors sous la forme :

$$\Delta G° = -RT\ln(K_A)$$ Équation II.1-10

Or l'enthalpie libre s'écrit également en fonction de l'enthalpie standard et de l'entropie :

$$\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°$$ Équation II.1-11

où $\Delta H°$ et $\Delta S°$ sont les enthalpie et entropie standards pour le transfert du soluté de l'état gazeux à l'état adsorbé. On obtient alors une nouvelle relation où le coefficient de partage K est fonction de $\Delta H°$ et $\Delta S°$:

$$Ln(K_A) = -\frac{\Delta H°}{RT} + \frac{\Delta S°}{R}$$ Équation II.1-12

Or la constante de partage peut s'exprimer en fonction du facteur de rétention k'. En effet, par définition le facteur de rétention correspond au rapport de masse du soluté A dans la phase

stationnaire et mobile. Ce dernier peut également être écrit en fonction du rapport de volume (ϕ) de phase stationnaire et mobile V_S et V_M :

$$k'_A = \frac{m_S}{m_M} = \frac{[A]_S}{[A]_M}\frac{V_S}{V_M} = \frac{[A]_S}{[A]_M}\phi$$ Équation II.1-13

En combinant les équations II.1-9 et II.1-13, l'équation II.1-12 devient :

$$Ln(k'_A) = -\frac{\Delta H°}{RT} + \frac{\Delta S°}{R} + \ln\phi$$ Équation II.1-14

La linéarité de ln(k') en fonction de 1/T est attestée sur la figure II.1-12 pour les deux types de colonnes. De ce fait, l'enthalpie standard $\Delta H°$ est facilement déduite des pentes des droites. Les $\Delta H°$ et k' à 100°C obtenus sur les deux colonnes sont listés dans le tableau II.1-4.

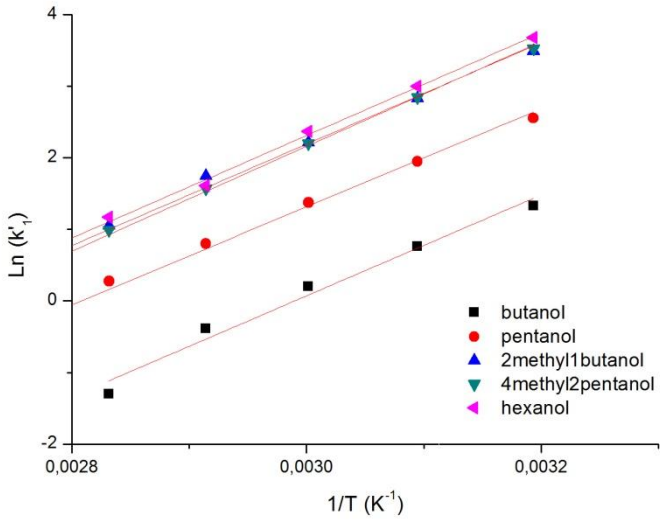


Figure II.1-12 : courbes de ln(k') en fonction de 1/T pour les alcools sur la colonne Chirasil-Dex (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Tableau II.1-4 : - ΔH° et k' obtenus pour les colonnes Chirasil-Dex (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm) et ChiralDex-PM (30 m x 0,25 mm x 0,12 µm). Les calculs des k' sont effectués sur le premier énantiomère élué, à 100°C. Les - ΔH° sont déterminés à partir de la pente de la droite ln(k') = f(1/T) sur des températures variant de 30 à 100°C.

	Composé chiral	CP-Chirasil (liée) β-CD Dex CB (Varian)		Chiraldex (dissoute) β -CD B-PM (Astec)	
		k' à 100°C	- ΔH (kcal.mol^{-1})	k' à 100°C	- ΔH (kcal.mol^{-1})
Hydrocarbures	3-Methylhexane	0,20	9,8	0,12	10,4
	2,4-Dimethylhexane	0,28	10,4	0,16	11,0
	3-Methylheptane	0,38	10,7	0,22	11,1
Alcools	Butan-2-ol	0,20	10,9	0,26	10,4
	Pentan-2-ol	0,55	11,5	0,44	12,8
	Hexan-2-ol	1,00	12,2	0,83	13,6
	2-Methyl-1-butanol	0,81	12,6	0,76	14,3
	4-Methyl-2-pentanol	0,77	10,6	0,72	13,7
Esters	Methyl lactate	0,65	12,1	0,60	14,3
	Methyl-2-methylbutyrate	0,36	12,1	0,27	13,6
	Methyl-3-methylvalerate	0,80	12,8	0,64	12,4
Aromatiques	1-Phenyl ethanol	15,20	15,6	9,29	15,1
	1-Phenyl propanol	29,23	16,8	17,2	16,7
	Sec-butyl benzene	2,74	12,3	14,8	12,2

Exception faite du secbutylbenzène et du butanol, tous les composés sont plus retenus sur la colonne β-CD greffée. La rétention supérieure des alcools, molécules polaires, sur la β-CD greffée par rapport à la β-CD diluée, indique que la colonne β-CD greffée est plus polaire que son équivalent dilué, et induit de ce fait plus d'interactions polaires, ce qui aboutit à un facteur de rétention supérieur pour les composés les plus polaires. Les ΔH° sont similaires sur les deux colonnes, en général inférieurs pour la β-CD greffée, excepté pour les aromatiques, un ester et un alcool, le butanol, où la β-CD diluée montre un facteur enthalpique inférieur.

Pour les deux colonnes, les composés les plus retenus sont les aromatiques. Même si pour le secbutylbenzène il existe une différence relative avec le composé le moins retenu (3-methylhexane) de plus de 10 fois supérieure sur la β-CD diluée que sur la β-CD greffée, les ΔH° sont sensiblement identiques.

Facteur de sélectivité

Le comportement chromatographique des molécules chirales et de leurs énantiomères a d'abord été évalué grâce à leurs facteurs de rétention k'. D'après l'équation II.1-14, la variation de ce

facteur de rétention k' avec la température permet de déterminer les paramètres thermodynamiques de rétention.

La séparation chromatographique de deux énantiomères peut également être qualifiée grâce au facteur de sélectivité α. Ce dernier s'exprime comme le rapport des constantes de partage du soluté B et A (B étant le soluté le plus retenu) :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$ Équation II.1-15

En première approximation, la différence d'énergie libre d'association pour une paire énantiomérique peut être estimée à partir du facteur de sélectivité α comme suit :

$$\Delta G^{\circ}_B - \Delta G^{\circ}_A = - RT \ln(\alpha)$$ Équation II.1-16

En combinant les équations II.1-12 et II.1-15, on obtient une relation qui lie le coefficient de sélectivité aux paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° :

$$R \ln(\alpha) = \frac{\Delta H^{\circ}_A - \Delta H^{\circ}_B}{T} + \Delta S^{\circ}_B - \Delta S^{\circ}_A$$ Équation II.1-17

Les valeurs enthalpiques $\Delta(\Delta H°)$ et entropiques $\Delta(\Delta S°)$ correspondantes sont obtenues en mesurant la valeur a d'une même paire spéculaire à différentes températures et en traçant la courbe RLn(α) en fonction de 1/T :

$$R \ln(\alpha) = \frac{\Delta(\Delta H°)}{T} + \Delta(\Delta S°)$$ Équation II.1-18

La pente de la droite correspond alors à la différence d'enthalpie, et l'ordonnée à l'origine à la différence d'entropie (Figure II.1-13).

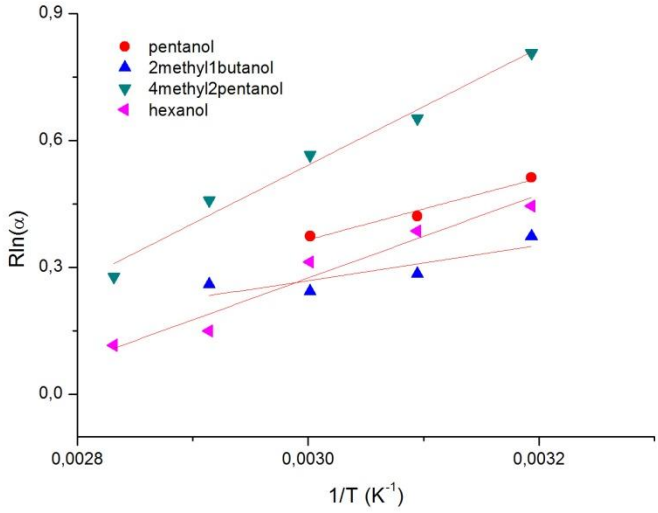


Figure II.1-13 : courbes de Rln(α) en fonction de 1/T pour les alcools sur colonne Chirasil-Dex (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Pour un même composé, la réponse est toujours linéaire (Figure II.1-13). Cela signifie que la différence d'enthalpie est bien constante sur toute la gamme de température étudiée. La pente de ces différentes droites permet d'obtenir la valeur de $\Delta(\Delta H°)$ pour chacun des solutés étudiés (Tableau II.1-5). Il est ensuite aisé d'en déduire la valeur de $\Delta(\Delta G°)$.

Tableau II.1-5 : α, Δ(ΔH), Δ(ΔS) et Δ(ΔG) obtenus pour les colonnes Chirasil-Dex (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm) et ChiralDex-PM (30 m x 0,25 mm x 0,12 µm). Les calculs des α sont effectués aux températures indiquées, selon les composés. Les Δ (ΔH°) sont déterminés à partir de la pente de la droite R ln(α) = f(1/T) sur des températures variant de 30 à 100°C, et les Δ(ΔS) à partir de leurs ordonnées à l'origine. De ces deux paramètres sont calculés les Δ(ΔG) d'après l'équation II.1-16..

	Composé chiral	CP-Chirasil (liée)		β -CD Dex CB (Varian)		Chiraldex (dissoute)		β -CD B-PM (Astec)	
		$\Delta_{D,L}(\Delta H)$ (kJ.mol^{-1})	α	$\Delta_{D,L}(\Delta S)$ (J.mol^{-1})	$\Delta_{D,L}(\Delta G)$ (J.mol^{-1})	$\Delta_{D,L}(\Delta H)$ (kJ.mol^{-1})	α	$\Delta_{D,L}(\Delta S)$ (J.mol^{-1})	$\Delta_{D,L}(\Delta G)$ (J.mol^{-1})
Hydrocarbures	3-Methylhexane	0	1,00	0	0	-0,17	1,03	-0,77	62,2
	2,4-Dimethylhexane	0	1,00	0	0	-0,20	1,03	-0,89	69,5
	3-Methylheptane	-14,60	2,25	-46,39	2041,9	-0,12	1,04	-0,72	98,8
Alcools	Butan-2-ol	-1,2	1,05	-3,3	122,9	-0,32	1,07	-1,52	184,6
	Pentan-2-ol	-1,2	1,06	-3,3	146,7	-0,25	1,05	-1,18	142,9
	Hexan-2-ol	-1	1,06	-2,8	146,7	-0,06	1,01	-0,28	33,0
	2-Methyl-1-butanol	-0,7	1,05	-1,8	122,9	-0,24	1,05	-1,13	137,6
	4-Methyl-2-pentanol	-1,1	1,10	-2,8	240,0	-0,30	1,06	-1,42	171,7
Esters	Methyl lactate	-4,46	1,23	8,78	521,2	-0,67	1,38	-4,89	811,0
	Methyl-2-methylbutyrate	-1,18	1,18	-2,56	416,8	-0,15	1,05	-0,93	132,4
	Methyl-3-methylvalerate	-1,49	1,43	-4,34	900,6	-0,26	1,10	-1,62	230,8
Aromatiques	1-Phenyl ethanol	-2,03	1,59	-4,37	1167,6	-0,62	1,07	-2,10	205,7
	1-Phenyl propanol	-1,73	1,70	-3,93	1336,1	-0,26	1,02	-0,84	71,1
	Sec-butyl benzene	0	1,00	0	0	0	1,00	0	0

: 40°C
: 60°C
: 120°C

Pour une colonne donnée, la valeur de α décroît avec l'augmentation de la température (Tableau II.1-5). Les facteurs de séparation des deux colonnes sont comparés dans le tableau II.2-5. Les températures d'analyse diffèrent selon les composés, puisque certains composés ne sont pas élués à une température inférieure à 100°C (phényléthanol et phénylbutanol). Cependant à cette température (100°C) aucune séparation chirale n'est observée pour les autres composés, qui ont une température d'élution plus faible. C'est pourquoi les températures ont été adaptées à chacun des composés ; 40°C pour les alcools et les hydrocarbures, 60°C pour les esters, et 120°C pour les aromatiques. Les valeurs de $\Delta(\Delta H°)$, $\Delta(\Delta S)$ et $\Delta(\Delta G)$ sont également représentées sur ce tableau, calculées d'après la pente et l'ordonnée à l'origine de la droite $\ln(\alpha)$ *vs.* 1/T ou par la différence entre les $\Delta(H°)$ calculés d'après les pentes des droites ln(k'1) et ln(k'2) *vs.* 1/T. Les valeurs de $\Delta(\Delta G)$ permettent de quantifier l'énantiosélectivité de chaque couple d'énantiomères en fonction de la colonne utilisée.

Des valeurs de α similaires sont observées sur les deux types de colonnes, avec néanmoins une meilleure énantiosélectivité attestée par les valeurs plus importantes de $\Delta(\Delta G)$ pour les composés élués sur la β-CD greffée. Une différence dans les enthalpies standards des deux énantiomères de chaque composé supérieure pour la majorité des composés analysés montre une discrimination chirale supérieure pour la β-CD greffée que pour la β-CD déposée.

II.1.3.d. Réponse chromatographique, limite de détection et limite de quantification

Le débit optimal d'hélium déterminé, la meilleure colonne sélectionnée, une étude de sensibilité est maintenant nécessaire à la qualification de la colonne CP-Chirasil β-CD Dex CB Varian.

Puisque le débit d'hélium optimal est le même sur toute la zone de températures nécessaires à l'élution de tous les composés étudiés, ce flux peut être utilisé pour régler le chromatogramme par une vitesse de gaz vecteur constante tout au long de l'analyse. Contrairement au flux constant, la température optimale d'élution des composés est différente pour chacun, selon la nature des composés ; c'est pourquoi nous avons élaboré un programme de température de manière à obtenir le meilleur profil d'élution pour chaque composé. Les profils observés aux différentes températures testées pour les études thermodynamiques nous ont permis de déterminer le programme de température optimal suivant vis-à-vis de ces 14 composés : 30°C pendant 3 minutes, suivi d'une augmentation de température jusqu'à 46°C avec une rampe de température de 20°C.min^{-1}, puis 25°C.min^{-1} jusqu'à 55°C, une stabilisation à cette température durant 1'34'', une augmentation à 15°C.min^{-1} jusqu'à 70°C, et enfin une augmentation à 20°C.min^{-1} jusqu'à 120°C, et une stabilisation à cette température maximale durant 10 min. Nous obtenons ainsi ce chromatogramme (Figure II.1-14), où tous les composés sont élués en 10,31 min.

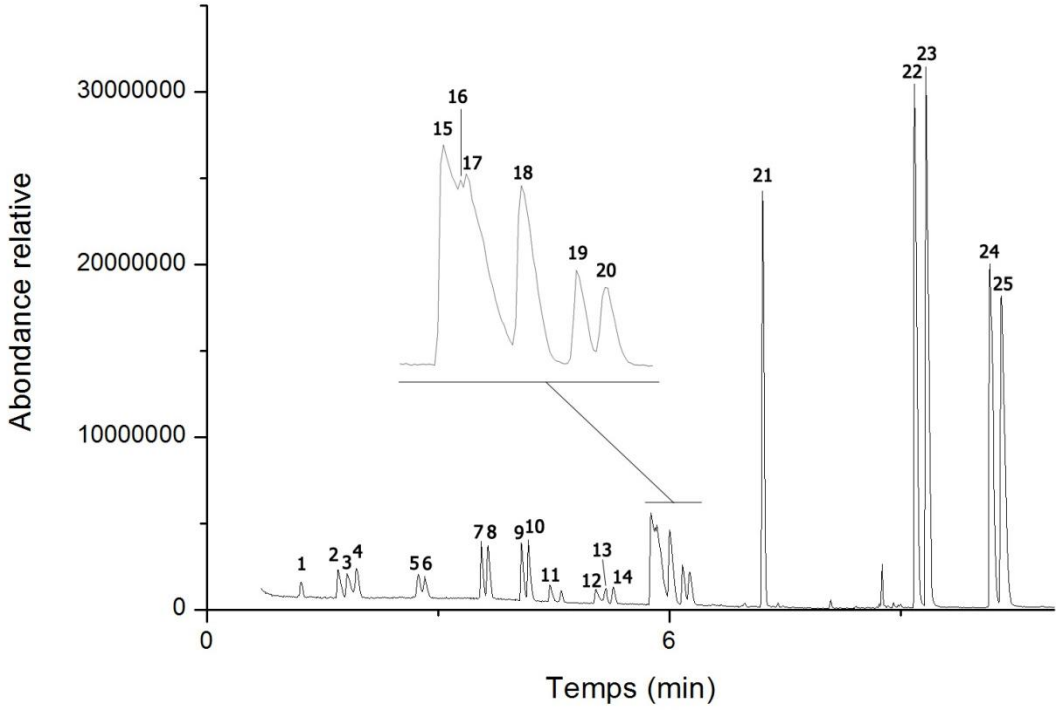


Figure II.1-14 : chromatogramme des 14 composés élués sur la colonne Chirasil-Dex (10m x 0,25mm x 0,25µm). Programme de température 30°C 3 min, 20°C.min^{-1} jusqu'à 46°C, 25°C.min^{-1} jusqu'à 55°C, stabilisation à 55°C durant 1 min 34 sec, 15°C.min^{-1} jusqu'à 70°C puis 20°C.min^{-1} jusqu'à 120°C, stabilisation 10 min. 1 : 3-methylhexane ; 2, 3 : 2-butanol ; 4 : 2,4-dimethylhexane ; 5, 6 : 3-methylheptane ; 7, 8 : methyl-2-methylbutyrate ; 9, 10 : 2-pentanol ; 11, 12 : methyllactate ; 13, 14 : methyl-3-methylvalerate ; 15, 17 : 2-methyl-1-butanol ; 16, 18 : 4-methyl-2-pentanol ; 19 : secbutylbenzene ; 20, 21 : phenylethanol ; 22, 23 : phenylpropanol.

Seuls les 3-methylhexane, 2,4-dimethylhexane et secbutylbenzène ne présentent pas de séparation énantiomérique. Les 2-methyl-1-butanol et 4-methyl-2-pentanol sont partiellement coélués. Cependant, leurs spectres de masse permet de les différencier et nous observons une bonne séparation chirale de chacun des deux composés.

En utilisant le programme de température décrit précédemment, nous avons choisi quatre composés représentatifs pour une étude quantitative permettant de déterminer la limite de détection. A cet effet, les courbes de calibration du méthyllactate, du phenyléthanol, du propanol et du secbutylbenzène ont été réalisées. Pour chaque composé, l'aire du pic est intégrée. Ces aires de pics chromatographiques, obtenus en analyse full-scan, sont analysés selon leur pic de base sur le logiciel et sont ensuite reportés sur un graphe en fonction de la quantité initiale de soluté injecté. Les pics de base pour le méthyllactate, phényléthanol, propanol et secbutylbenzène sont respectivement m/z = 45, m/z = 79, m/z = 45 et m/z = 105. Chaque point représente une moyenne de trois injections, et l'écart-type calculé est représenté en barres d'erreurs.

Pour déterminer la limite de détection expérimentale du CPG-SM sur ces composés, les solutions ont été diluées en série, d'une concentration « saturant » la réponse chromatographique à une concentration « trace » pour laquelle le soluté n'est plus visible. Cela correspond à des dilutions effectuées de 1/500 à 1/100 000 000. En tenant compte de la masse moléculaire des composés, d'un

volume d'injection de 1 µL et d'un rapport de split de 50, les quantités injectées varient de $1{,}3.10^{-3}$ à 420 fmol selon le composé (Tableau II.1-6).

Tableau II.1-6 : quantité de composé injectée dans le chromatographe extrapolée selon la gamme de dilution utilisée, régression linéaire et R^2 pour chacun des premiers énantiomères des 4 composés représentatifs étudiés ; méthyllactate, phényléthanol, pentanol et secbutylbenzène.

Composé	Quantité injectée (fmol)	Régression linéaire	R^2
Methyl lactate	4.2-420	y = 69030x - 210277	0,996
Phenylethanol	$3.3.10^{-2}$-330	y = 502068x - 6649	0,988
Pentanol	1.8-37	y = 214868x - 144413	0,996
Secbutylbenzene	$1.3.10^{-3}$-260	y = 3.67.106x + 27390	0,917

Pour déterminer la linéarité de la réponse malgré les dilutions de 10 en 10, nous avons représenté les aires de pic en fonction de la quantité injectée sur une échelle logarithmique (Figure II.1-15).

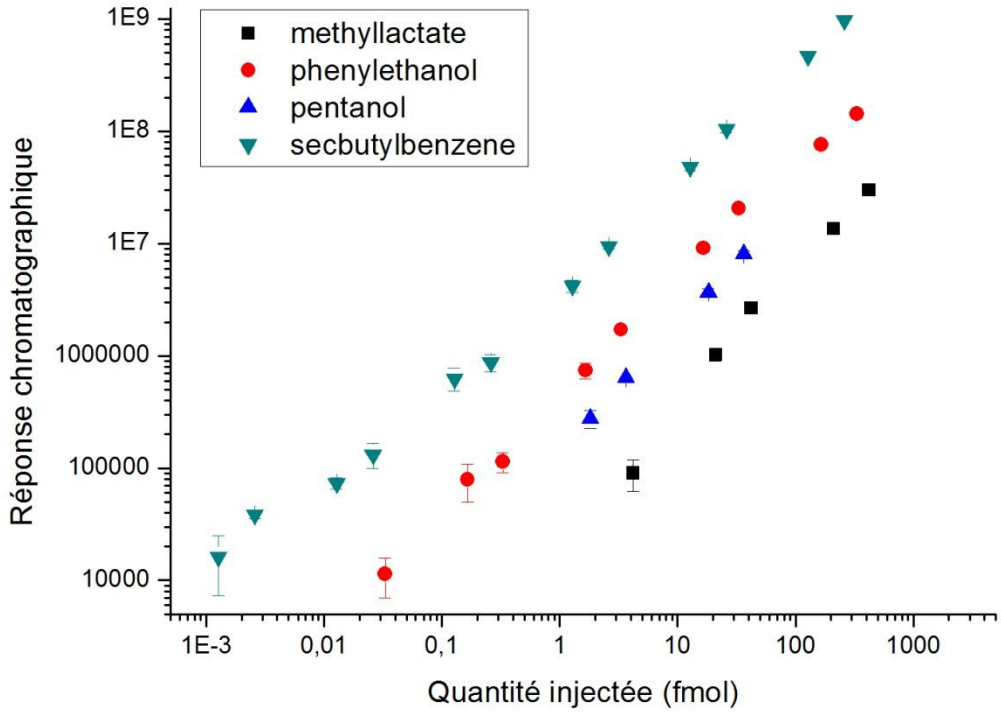


Figure II.1-15 : courbe de linéarité en échelle logarithmique de la réponse chromatographique des quatre composés étudiés (méthyllactate, phenylethanol, pentanol et secbutylbenzene). La réponse chromatographique en ordonnée correspond à l'aire du pic.

Pour déterminer la pente de la régression linéaire, et pour une meilleure représentativité des faibles concentrations qui se retrouvent « écrasées » par les fortes dilutions, nous avons effectué chacune des régressions linéaires pour les 4 à 6 solutions les plus diluées. Pour le méthyllactate, 5 dilutions de 4,2 à 420 fmol, pour le phénylethanlol 5 dilutions de 0,033 à 3,3 fmol, pour le pentanol, 4 dilutions de 1,83 à 36,6 fmol et pour le secbutylbenzène, 6 dilutions de 1,28.10-3 à 0,26 fmol. Les droites de régressions ainsi que les R^2 sont reportés dans le tableau II.1-6.

Le composé ayant la plus forte réponse est le secbutylbenzène, celui ayant la plus faible réponse est le méthyllactate. Les droites de régressions ainsi déterminées ont ensuite été extrapolées à toutes les valeurs de dilution effectuées, et nous en obtenons la figure II.1-16. Sur ce graphe, nous observons une forte linéarité de la réponse chromatographique par rapport à la quantité injectée, autant aux faibles quantités injectées pour lesquelles les droites de régression ont été établies, que pour les dilutions les plus faibles représentées dans cette figure.

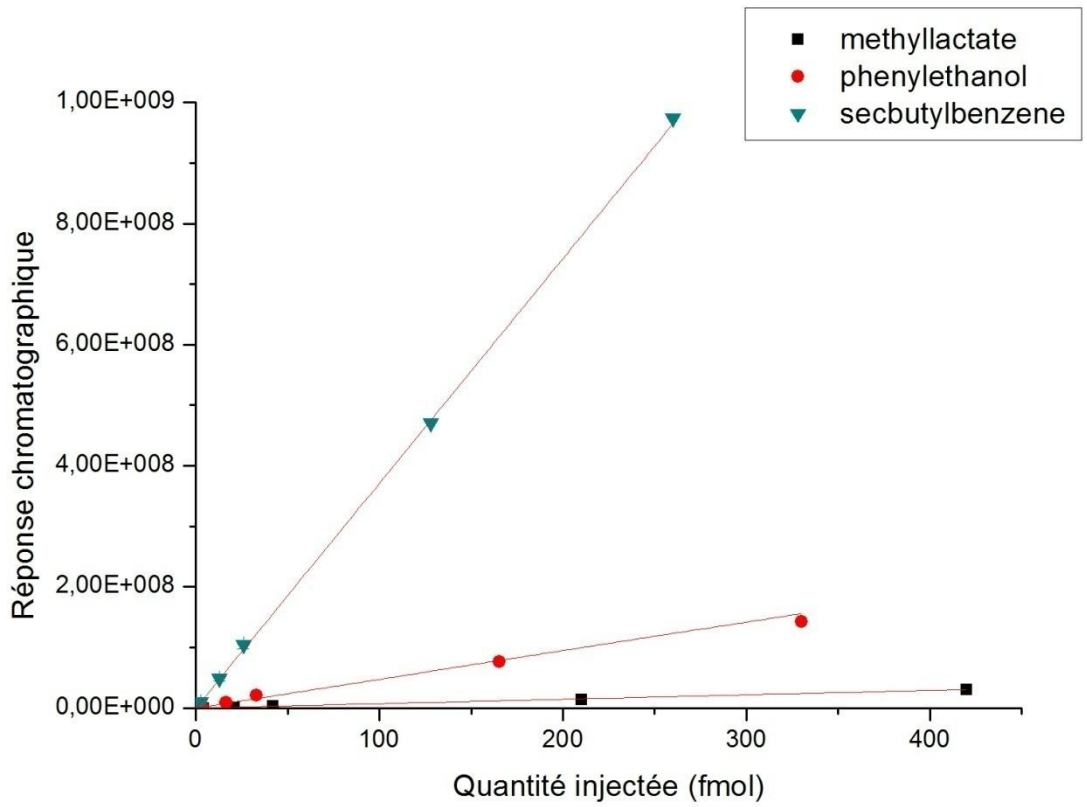


Figure II.1-16 : résultats de l'étude de linéarité du methyllactate, phenylethanol et secbutylbenzene avec leur droite de régression respective. Le graphe représente la réponse chromatographique, considérée comme l'aire du pic chromatographique en fonction de la quantité injectée du composé aux différentes dilutions effectuées. Les dilutions les plus importantes ne sont volontairement pas visibles sur ce graphe pour une meilleure lisibilité, mais la linéarité est démontrée pour les plus fortes et les plus faibles concentrations.

Etant donnée la bonne linéarité de la réponse établie par les valeurs du coefficient de corrélation ($R^2 > 0,9$), nous avons effectué une étude quantitative afin de déterminer les limites de détection et de quantification de la méthode de séparation pour les composés étudiés précédemment. Pour avoir une bonne précision de mesure, les limites de détection X_{LOD} et de quantification X_{LOQ} sont déterminées comme la concentration en analytes aboutissant à un signal respectivement égal à $Y_{LOD} = y_b + 6\sigma_b$ et $Y_{LOQ} = y_b + 20\ \sigma_b$, où y_b est le signal moyen d'un blanc généré par dix injections et σ_b est sa déviation standard. Pour chaque composé analysé, le blanc est déterminé comme l'aire du pic correspondant en mode SIM au pic de base du composé en question. Les limites de détection et de quantification sont alors calculées comme étant égales à $X_{LOC} = 6sb/S$ et $X_{LOQ} = 20\sigma_b/S$, où S est la pente de la droite de calibration. En comparaison avec cette limite de détection théorique, nous pouvons déterminer la limite de détection expérimentale, représentée par un rapport signal/bruit compris entre 3 et 7. Ces résultats sont présentés dans le tableau II.1-7 ci-dessous.

Tableau II.1-7 : concentration expérimentale minimum détectable. Ce minimum est estimé par un rapport signal/bruit compris entre 3 et 7.

Composé	S/N = 3 Aire	S/N = 7 Aire	Expérimental 3 < S/N < 7	Concentration (fmol injectés)
Methyl lactate	5326	12427	8386	2,1
Phenylethanol	23492	54815	34093	0,1
Pentanol	3937	9187	-	-
Secbutylbenzene	10757	25101	16143	0,00128

Un des composés coéluant avec le pentanol lors des analyses nous empêche de quantifier ce dernier à des concentrations faibles, et induit fatalement une erreur de mesure des pics à des concentrations plus élevées. Cependant, cette contribution a été déterminée comme négligeable aux concentrations où nous avons réalisé la mesure, grâce à l'analyse du spectre de masse. Ainsi, nous pouvons déterminer une limite de détection théorique de ce composé, qui ne correspond pas à la limite de détection expérimentale.

Nous avons pu comparer la limite de quantification et les limites de détection théorique et expérimentale de chacun des quatre composés analysés.

Tableau II.1-8 : les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont déterminées comme la concentration en analytes aboutissant à un signal de respectivement $Y_{LOD} = y_b + 6\sigma_b$ et $Y_{LOQ} = y_b + 20\ \sigma_b$, où y_b est le signal moyen d'un blanc généré par dix blancs et sb est sa déviation standard. Ces valeurs sont calculées pour le methyllactate, phenylethanol, pentanol et secbutylbenzene. La LOD expérimentale est calculée pour un rapport signal/bruit compris entre 3 et 7.

Composé	LOD (fmol)	LOQ (fmol)	LOD expérimentale 3 < S/N < 7
Methyl lactate	0,050	0,168	2,1
Phenylethanol	0,027	0,091	0,1
Pentanol	0,017	0,057	-
Secbutylbenzene	0,0026	0,0087	0,0013

Les limites de détection et quantification de tous les composés sont de l'ordre du dixième au centième de femtomoles, ce qui atteste d'une sensibilité extrême de la méthode. En effet, pour chacun des composés analysés sur la β-CD, la limite de détection est établie entre $2{,}6.10^{-3}$ et $2{,}7.10^{-2}$ fmol. Cette limite est en cohérence totale avec les concentrations de composés similaires découverts dans les météorites, notamment dans les chondrites carbonées. Par exemple, Benner a trouvé une concentration de l'ordre du ppm pour chaque alcool (Benner *et al.* 2000), ce qui correspond à 10 pmol si l'on considère une analyse (probable) de 1 mg de météorite. L'utilisation de cette colonne en CPG-SM est donc suffisamment sensible pour détecter la présence de ces composés d'intérêt exobiologique dans un environnement spatial.

II.1.4. Conclusion

Ces résultats nous ont permis de sélectionner la colonne chirale la plus appropriée, capable de détecter et de séparer les molécules organiques volatiles cibles. Entre la séparation par mécanisme de ponts hydrogènes majoritaires (Chirasil-Val) et par mécanisme prépondérant d'inclusions (phases stationnaires cyclodextrines), il apparaît que seules les phases cyclodextrines permettent de séparer efficacement la majorité des énantiomères. Deux types de dépôts de ces phases sont alors étudiés, une phase β-cyclodextrine diluée dans une phase polysiloxane et ensuite déposée sur les parois internes de la colonne (Chiraldex), et une phase cyclodextrine greffée (Chirasil-Dex). Les études cinétiques et thermodynamiques sur ces deux colonnes différentes ont permis d'apprécier le pouvoir de rétention et de séparation énantiomérique de ces deux colonnes, et de choisir la Chirasil-Dex pour la suite des expériences. En effet, l'efficacité et la résolution de cette dernière pour la séparation énantiomérique sont supérieures pour une large gamme de composés, des hydrocarbures aux aromatiques en passant par des esters et des alcools. Cette colonne montre des comportements chromatographiques en accord avec les exigences de séparation énantiomériques de classes variées de composés, ainsi qu'une adéquation avec les contraintes des analyses spatiales (robustesse, résistance à la température, fiabilité).

Ce type de colonne β-cyclodextrine sera donc utilisé pour les études suivantes, afin de développer une méthode capable de détecter et d'analyser *in situ* la chiralité de molécules organiques réfractaires d'intérêt exobiologique dans des environnements extraterrestres.

II.2. Etude de la séparation chirale des acides aminés biogéniques

Dans le chapitre précédent, l'étude de molécules chirales volatiles d'intérêt exobiologique nous a permis de choisir la colonne chromatographique la plus adaptée à la séparation chirale de ces dernières. Toutes ces molécules étaient volatiles et ne présentaient de ce fait aucune difficulté pour leur analyse en chromatographie en phase gazeuse. Ces molécules, comme nous l'avons décrit, ont un intérêt exobiologique puisque nous les retrouvons sur des corps extraterrestres, et qu'elles peuvent être importantes dans les systèmes vivants. Cependant, ces molécules ne sont pas des biomarqueurs, elles peuvent être synthétisées abiotiquement. Malgré leur intérêt exobiologique, elles ne sont donc pas les composants clés des systèmes vivants et ne sont pas les cibles prioritaires si l'objectif est la détection d'une éventuelle vie extraterrestre.

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, les molécules d'intérêt sont des molécules complexes, produits de dégradation de toute forme de vie (telle que nous la connaissons). L'ADN se dégrade en bases nucléiques ou nucléotides, les acides gras vont se décomposer en acides carboxyliques, et les protéines en acides aminés. Les monomères ou les produits de dégradation de ces polymères de la vie doivent être passés au crible si l'on recherche des traces de vie. Cependant, ces molécules et macromolécules, aussi essentielles soient-elles pour la vie, peuvent aussi résulter d'une synthèse abiotique, comme en atteste leur présence dans les météorites récupérées sur Terre. Certaines de ces molécules et en particulier les acides aminés doivent alors être regardés selon un angle particulier, celui de la chiralité. Or, contrairement aux alcools, esters, hydrocarbures et aromatiques étudiés dans la première partie, les acides aminés ne sont pas volatils et difficilement analysables directement par chromatographie en phase gazeuse. Il résulte de cela que nous devons introduire une étape préalable à l'analyse chromatographique. Cette étape est appelée étape de fonctionnalisation. Elle permet, grâce à un agent de fonctionnalisation qui préservera le centre d'asymétrie de la molécule, de diminuer la polarité de la molécule ainsi que sa température d'ébullition, ce qui autorise une analyse et une séparation chirale des produits ainsi fonctionnalisés.

Nous allons alors étudier la faisabilité de l'analyse chirale de composés organiques réfractaires d'intérêt exobiologique. Pour ce faire, nous mènerons une étude approfondie sur les 20 acides aminés du vivant, qui conduira d'abord à une optimisation des paramètres d'analyse chromatographique, puis à une optimisation des paramètres de la fonctionnalisation, et enfin nous montrerons qu'il est possible d'effectuer un couplage de toutes les étapes dans un seul et même réacteur afin de rendre la méthode entièrement automatisable et spatialisable.

II.2.1. Matériels et méthodes

II.2.1.a. Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse

Toutes les expériences présentées dans ce chapitre ont été menées sur un CPG-SM Shimadzu QP 5050ª couplé à détecteur quadrupolaire de même marque. Le voltage absolu du détecteur est fixé à 1 kV. L'analyse s'étend des m/z = 40 u à m/z = 500 u. Le CPG est équipé d'un injecteur split/spliless qui permet des injections avec un rapport de split de 1 à 100. Pour chaque analyse, une seringue Hamilton de 1 ou de 2 µL permet d'injecter 1µL de solution. Entre chaque injection, la seringue est rincée dix fois à l'acétone et dix fois à l'éthanol pour limiter toute contamination chimique et biologique. Compte-tenu des résultats du chapitre précédent, la colonne chromatographique utilisée est une CP-Chirasil Dex avec un revêtement métallique, d'une longueur de 30 m (contrairement aux 10 m de la colonne de l'étude précédente), de diamètre interne 0,25 mm et d'épaisseur de phase stationnaire de 0,25 µm. La température maximale d'utilisation de cette colonne est de 200°C, température au-delà de laquelle le « bleeding » de la colonne devient trop important et la dégradation de la phase stationnaire devient significative. Pour limiter la pollution en tête de colonne et augmenter la durée de vie de cette dernière, l'insert contient de la laine de verre (Varian) traitée au dimethyldichlorosilane (DMCS). De l'Hélium pur alpha 2 (99,999 %) est utilisé comme gaz vecteur. Le logiciel d'acquisition des données est le GC-MS Solution Version 1.01 Real Time Analysis, et celui de traitement des données est le Shimadzu GC-MS Post Run Analysis.

II.2.1.b. Molécules

Les molécules cibles

Dans un premier temps, nous avons étudié les 20 acides aminés protéiniques (Figure II.2-1). Chacun d'entre eux a été acheté sous sa forme énantiomérique gauche et sous sa forme spéculaire, chez Sigma-Aldrich ou chez Fluka (Strasbourg, France). Avant leur fonctionnalisation, tous les acides aminés sont dilués dans une solution de 0,1 mol.L^{-1} d'acide chlorhydrique afin d'obtenir une concentration de solution mère comprise entre 10^{-2} et 10^{-1} M, selon l'acide aminé.

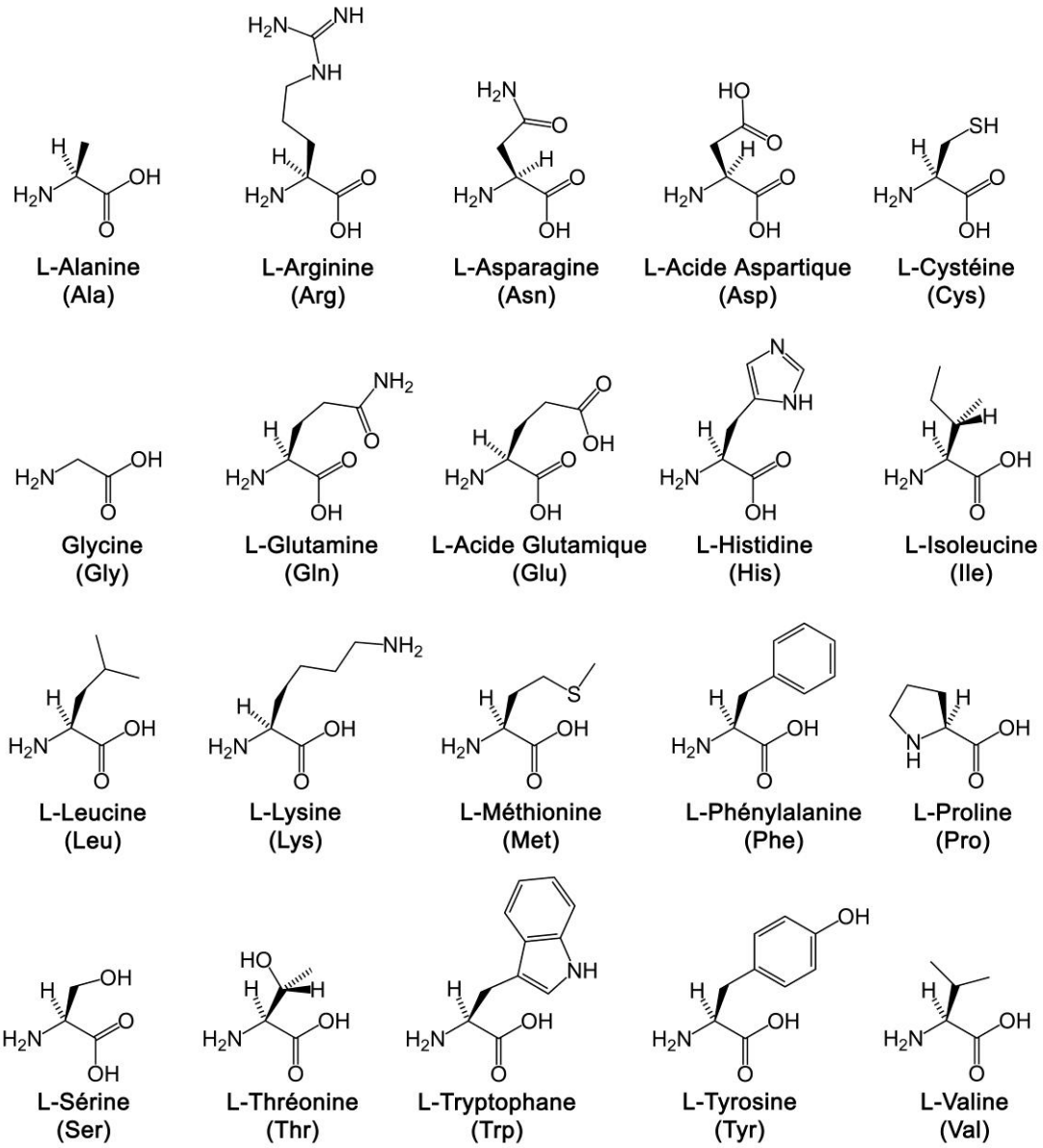


Figure II.2-1 : formule développée des 20 acides aminés du vivant, leurs noms et trigrammes.

L'étalon interne

Afin de pouvoir calculer les rendements de fonctionnalisation, nous avons choisi d'utiliser la technique de l'ajout d'un étalon interne. Le principe de l'étalonnage interne repose sur l'ajout dans la solution à doser d'une quantité parfaitement connue d'une molécule de référence appelée étalon interne. En effet, la réponse du spectromètre de masse n'est pas parfaitement proportionnelle à la concentration du soluté étudié. L'ajout d'un étalon interne permet donc de s'affranchir de ce biais mais elle permet également de s'affranchir des erreurs inhérentes à la préparation de l'échantillon, à l'injection et à l'appareillage. La molécule choisie comme étalon interne l'est en fonction des critères suivants :

- ne pas être contenue dans le mélange à étudier
- pouvoir être séparée des autres constituants du mélange
- avoir des propriétés physico-chimiques proches des molécules à analyser
- ne pas réagir aves d'autres composés de la solution (en particulier le solvant et les réactifs de fonctionnalisation)

En fonction de ces critères nous avons choisi le méthyl laurate (Figure II.2-2) de chez Fluka, CAS 111-82-0, de masse molaire M = 214,35 g.mol-1, et de température d'ébullition $T_{éb}$ = 262°C). Sa volatilité est suffisamment faible pour être utilisé avec des acides aminés à faible température d'élution. De plus il ne coélue avec aucun des composés d'intérêt, et possède un spectre de masse caractéristique qui permet son identification sans doute possible.

Pour nos expériences, le méthyl laurate a été dilué à 10^{-2} mol.L^{-1} dans un solvant compatible avec le réactif de fonctionnalisation utilisé : l'acétate d'éthyle. 1 µL de cet étalon est ajouté après la fonctionnalisation afin d'éviter une dégradation de ce dernier lors de la réaction.

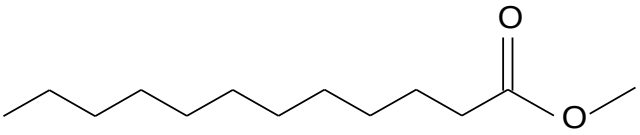


Figure II.2-2 : formule développée du méthyl laurate, ou ester méthylique de l'acide dodécanoïque.

L'agent de fonctionnalisation : le DMF-DMA

L'agent de fonctionnalisation, le N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA, figure II.2-3), est fourni par Sigma-Aldrich. Sa pureté est supérieure à 99%. Le DMF-DMA est un agent de méthylation des composés polaires, qui inactive les sites actifs contenant des hydrogènes labiles. Cette méthylation permet ainsi d'éliminer les liaisons inter et intramoléculaires rendant ainsi la molécule cible plus volatile. D'autre part cette méthylation au DMF-DMA préserve les éventuels centres chiraux des molécules cibles. Ces deux propriétés font du DMF-DMA un agent de fonctionnalisation d'intérêt pour l'analyse en CPG-SM de l'énantiomérie des molécules organiques réfractaires.

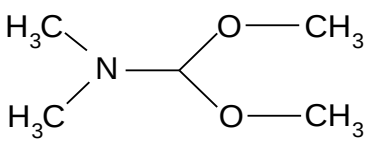


Figure II.2-3 : N,N-diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA).

II.2.1.c. Procédure de fonctionnalisation

Les hydrogènes labiles des molécules d'eau réagissent avec le DMF-DMA, aboutissant à une réaction parasite. C'est pourquoi une élimination totale des molécules d'eau est nécessaire avant la fonctionnalisation. Nous effectuons alors une évaporation complète de l'eau de l'échantillon, sous flux d'azote, avant d'effectuer la réaction de fonctionnalisation. Le flux d'azote permet d'accélérer le processus d'évaporation, réalisé à faible température pour préserver l'intégrité des échantillons (40°C). En effet, les acides aminés sont sensibles à la température, et une évaporation à trop forte température peut les dénaturer. Des études ont montré que la dégradation peut être considérée comme négligeable jusqu'à une température d'évaporation de 120°C. Cependant, nous avons vu que la chaleur et le degré d'hydratation de ces acides aminés sont les causes majeures du phénomène de racémisation. C'est pourquoi la phase d'évaporation est réalisée à plus faible température (40°C) sous un flux continu d'azote afin que cette étape reste la plus rapide possible (de l'ordre de la minute). Cette rapidité d'évaporation est due aux très faibles quantités évaporées, de l'ordre du µL.

La fonctionnalisation au DMF-DMA que nous proposons est une procédure en une seule étape. Pour chaque réaction, 20µL d'agent de fonctionnalisation sont ajoutés directement dans un pilulier en verre de 1 mL contenant le résidu sec de l'échantillon d'acide aminé. Le pilulier est alors directement placé dans un bain d'huile afin d'effectuer la réaction de fonctionnalisation. A température ambiante, la fonctionnalisation n'a pas lieu. Cette réaction est température-dépendante.

II.2.2. Résultats et discussion

II.2.2.a. Optimisation de l'analyse chromatographique

Les expériences étant menées en chromatographie en phase gazeuse, il est nécessaire de déterminer les meilleurs paramètres de l'analyse chromatographique avant de passer aux études d'optimisation de la fonctionnalisation elle-même. C'est pourquoi toutes les variables de l'analyse chromatographique ont été minutieusement étudiées puis déterminées, de manière à travailler dans les conditions optimales de fonctionnement de l'appareillage. Les deux paramètres critiques de l'analyse sont la température de la colonne chromatographique et la pression du gaz vecteur en tête de colonne qui détermine le débit auquel seront effectuées les séparations.

Détermination de la vitesse optimale du gaz vecteur

Cette vitesse est optimale pour une colonne et pour un composé donné. Typiquement, elle dépend du type de phase stationnaire utilisée, de la taille des grains de cette phase, de l'épaisseur de la phase stationnaire, de la géométrie de la colonne, de la température de cette dernière et du soluté lui-même. Etant donné que nous étudions 20 composés, il est donc nécessaire de déterminer une vitesse optimale pour quelques composés représentatifs et de choisir le meilleur compromis pour tous

les composés. Cet optimum permet de s'assurer que la résolution chromatographique sera la meilleure possible pour un temps d'analyse le plus court possible et pour le plus grand nombre de composés d'un mélange complexe.

Pour cela, trois acides aminés fonctionnalisés ont été étudiés. En fonction de la température à laquelle ces composés sont élués, nous avons choisi trois isothermes de température différentes. Pour l'alanine : T_e = 118°C, pour la leucine : T_e = 156°C et pour la phénylalanine : T_e = 190°C. Comme dans le chapitre précédent, cette vitesse optimale de la phase mobile a été déterminée en recherchant la hauteur minimum de plateau théorique. Cette hauteur minimale de plateau théorique est déterminée en traçant la courbe HEPT = f (vitesse He). Pour notre étude, la HEPT est calculée comme étant le rapport de la longueur de la colonne L (ici 30 m) sur N, le nombre de plateaux théoriques. Le nombre N de plateaux théoriques est déterminé d'après l'équation II.1-2.

La gamme de vitesse de gaz vecteur étudiée est comprise entre 20 et 67 $cm.s^{-1}$ pour chacun des solutés. La courbe de Van Deemter-Golay résultant de cette étude cinétique, représentant la HEPT en fonction de la vitesse linéaire moyenne de l'hélium, est présentée en figure II.2-4.

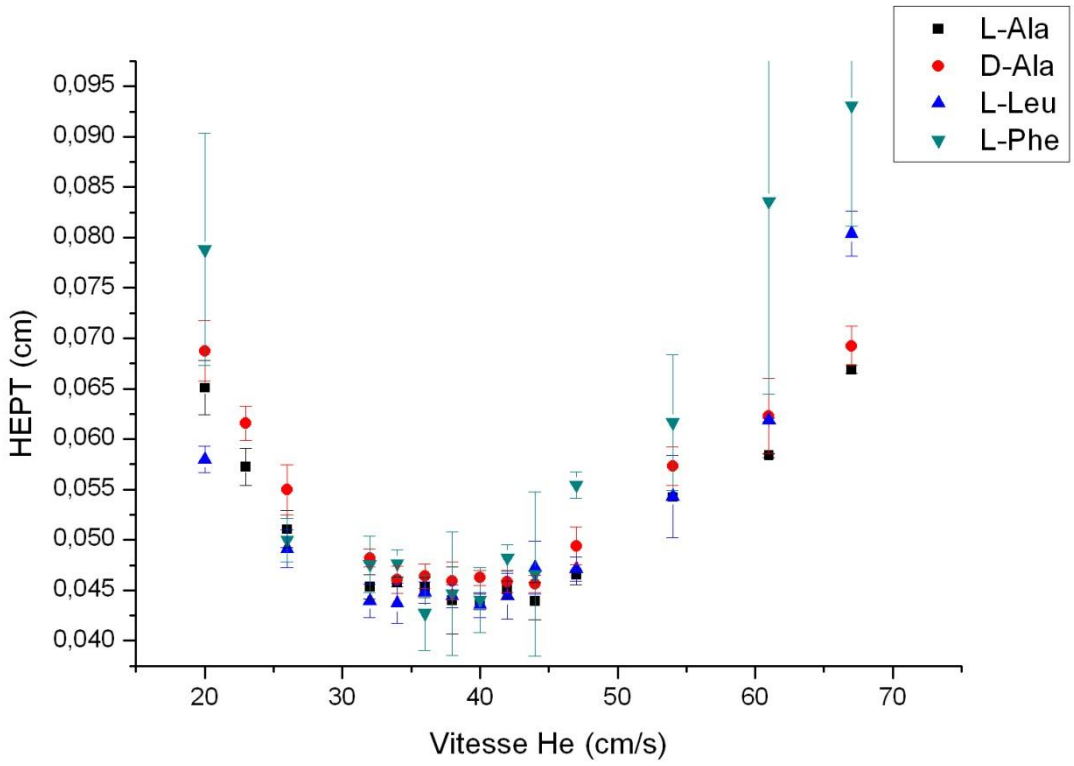


Figure II.2-4 : évolution de la HEPT en fonction de la vitesse linéaire moyenne de gaz vecteur (hélium) pour 3 acides aminés fonctionnalisés avec le DMF-DMA (20 µL de DMF-DMA, 140°C – 3 min). Chaque point représente la moyenne de 3 expériences et les lignes verticales les barres d'erreur. 1 µL de chaque solution a été injecté avec un rapport de split de 1/80 dans un injecteur à 250°C. L'isotherme de température a été choisi en fonction des aminés. Pour l'alanine, la leucine et la phénylalanine, elle est respectivement de 118, 146 et 190°C.

Les trois acides aminés se comportent selon un même schéma. L'étude montre que les deux énantiomères d'une même molécule peuvent avoir des réponses différentes, montré sur la courbe par une efficacité différente pour la L-Ala et la D-Ala. Cependant le comportement cinétique est très proche. En effet, la pente de la droite correspondant au terme C de l'équation de Van Deemter, c'est-à-dire au transfert de masse, est sensiblement la même pour les deux énantiomères. Cela prouve que pour ces énantiomères les interactions soluté-phase stationnaire sont similaires. Les coefficients de diffusion des solutés L et D sont donc proches, dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.
La phénylalanine, quant à elle, montre une pente plus élevée aux vitesses de gaz vecteur supérieures à la vitesse correspondant au minima de la HEPT, ce qui atteste d'une résistance supérieure au transfert de masse de ce soluté. Les coefficients de diffusion de la phénylalanine dans la phase stationnaire sont donc supérieurs à ceux évalués pour les autres acides aminés étudiés. Cela est certainement dû à la présence d'un noyau aromatique qui rend cette molécule plus soluble dans la phase stationnaire (meilleure affinité chimique).

Inversement, la première partie de la courbe de Van Deemter-Golay montre une diffusion longitudinale supérieure pour l'alanine que pour la phénylalanine, due à une température d'ébullition et à une taille plus élevées de la phénylalanine limitant ainsi sa mobilité différentielle au sein du gaz.

L'efficacité maximale de la colonne, qui correspond au minimum de la courbe, est obtenue pour les trois composés étudiés pour une gamme relativement restreinte de la vitesse de gaz vecteur, comprise entre 30 à 42 $cm.s^{-1}$. Pour des vitesses linéaires d'hélium plus faibles, la diffusion longitudinale prédomine et aboutit à un élargissement des pics et ainsi à une baisse de l'efficacité de la colonne, et *a contrario*, pour des vitesses supérieures à 42 $cm.s^{-1}$, le transfert de masse limitera l'efficacité de la colonne.

Puisque cette étude d'optimisation a pour objectif une application spatiale, le temps d'analyse est un critère important. Etant donné qu'il n'y a pas de perte significative de l'efficacité à la vitesse d'analyse la plus rapide dans la gamme de 30 à 42 $cm.s^{-1}$, nous choisirons alors la vitesse de gaz vecteur la plus élevée : 42 $cm.s^{-1}$. Cette vitesse de gaz vecteur correspond à un débit d'hélium de 1,2 $mL.min^{-1}$. Ce flux est choisi pour toute la suite des analyses pour assurer une séparation efficace de tous les acides aminés sans compromettre la rapidité de l'expérience.

Néanmoins, il est à noter que si une analyse qualitative se révèle suffisante, l'analyse peut être effectuée à des vitesses de gaz vecteur largement supérieures tout en gardant une efficacité encore acceptable.

II.2.2.b. Optimisation de la programmation de température pour la séparation chromatographique chirale des acides aminés

La température d'élution de chaque acide aminé à été prise en compte, et le programme de température a été élaboré expérimentalement de manière à obtenir un compromis entre une simplicité de programmation et un rendu optimal de la séparation énantiomérique de chacun des acides aminés. Il a été montré un effet important de la température initiale de la programmation sur la qualité de la séparation des acides aminés, probablement dû à un temps de séjour dans la colonne plus important, qui permet d'augmenter les interactions soluté/phase stationnaire et ainsi d'améliorer la séparation énantiomérique. Cependant, un temps de séjour trop long peut élargir les pics chromatographiques, et peut mettre en péril la séparation chirale par recouvrement mutuel de deux pics aux temps de rétention proches.

Nous avons ainsi abouti au programme de température suivant : une température initiale à 70°C maintenue pendant 5 min, suivie d'un gradient linéaire de température de 3°C.min^{-1} jusqu'à 190°C, température maximale d'utilisation de la colonne. Puis une isotherme de 10 min à cette même température. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été fixées respectivement à 250 et 200°C. Compte-tenu des concentrations initiales des acides aminés et d'un volume d'injection établi à 1µL, un rapport de split de 80 a été fixé pour obtenir une réponse chromatographique facilement quantifiable.

Après avoir déterminé ces paramètres, nous pouvons alors commencer la collecte des données expérimentales sur la fonctionnalisation.

II.2.2.c. Librairie de masse spectrale et informations structurelles des molécules d'intérêt

Le DMF-DMA a déjà été utilisé pour des fonctionnalisations d'acides aminés, mais aucune étude systématique sur les mécanismes et propriétés de réaction pour une application *in situ* à l'analyse de molécules organiques chirales n'est référencée dans la littérature. La réaction de fonctionnalisation se déroule selon le schéma représenté sur la figure II.2-5. Elle mène à la formation d'une amidine ester de l'acide aminé initial. Ces produits finaux, bien que plus lourds, vont avoir une volatilité supérieure, par inhibition de leurs groupements réactifs. Ils seront donc plus volatils que l'acide aminé mère correspondant, permettant une analyse en CPG et une température d'analyse compatible avec les températures maximales d'utilisation des phases stationnaires chirales. Il est de plus important de noter ici que le composé final n'est alourdi que d'un m/z = 14 u pour une fonction acide carboxylique et d'un m/z = 55 u pour une fonction amine. Pour un acide aminé, le supplément « de base » de m/z est donc de 69 u.

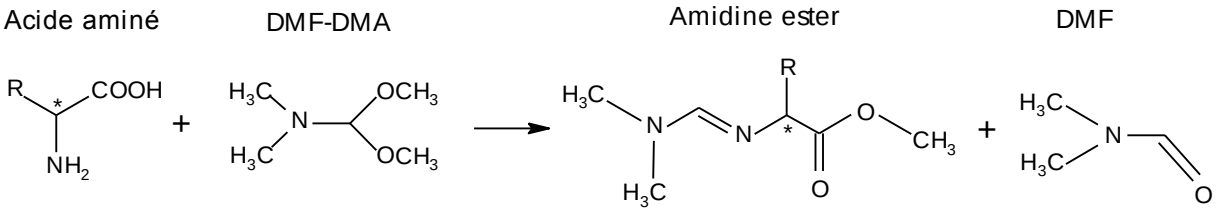


Figure II.2-5 : la réaction de fonctionnalisation d'un acide aminé au DMF-DMA. Le centre chiral de l'acide aminé est conservé sur l'amidine ester nouvellement formée.

Le but de cette étude est de comprendre les conditions et les limites techniques et expérimentales de la fonctionnalisation de molécules organiques chirales, afin de déterminer les meilleures conditions analytiques pour une réaction de fonctionnalisation destinée à être spatialisée. Pour ce faire, nous avons étudié en détail les paramètres suivants : température et durée de la réaction, efficacité de la réaction, résolution énantiomérique, temps d'analyse et détectabilité en spectrométrie de masse. La validation de la méthode sera complétée par une étude quantitative sur la précision et la sensibilité de la méthode, à savoir ses limites de détection et de quantification.

En étudiant les effets relatifs des différents paramètres de la réaction, tels que le temps et la température de fonctionnalisation, la séparation chromatographique, les aspects quantitatifs de la méthode, les informations structurelles des produits de la réaction et les spectres de masse ainsi générés, nous sommes en mesure d'affirmer que les paramètres de la réaction qui seront proposés ici aboutissent aux résultats optimaux.

Librairie de spectre de masse et fragmentation des acides aminés

Tout d'abord nous avons référencé les caractéristiques spectrales des acides aminés. Chacun d'entre eux a été caractérisé séparément sur une colonne Chirasil-Dex. Pour chacun de ces acides aminés, la température d'élution, le temps de rétention et le spectre de masse ont été déterminés. Ces spectres de masse ont permis de compléter la librairie NIST avec les acides aminés fonctionnalisés au DMF-DMA. Cette librairie était particulièrement incomplète et ce travail a permis de la rendre efficace pour une recherche spectrale sur les 20 acides aminés du vivant.

La réaction de fonctionnalisation au DMF-DMA peut générer des sous-produits de dégradation qui peuvent nuire à une identification correcte de chacun des acides aminés s'ils sont étudiés en mélange complexe. Néanmoins, certains sous-produits de fonctionnalisation peuvent également aider à l'identification d'un acide aminé. C'est la raison pour laquelle chacun des acides aminés du vivant a été analysé séparément. Ainsi, pour chacun d'entre eux nous avons pu correctement discriminer les acides aminés fonctionnalisés de leurs sous-produits de réaction associés. La librairie de spectres de masse est représentée dans le tableau II.2-1.

Tableau II.2-1 : temps de rétention et fragments de masse principaux avec leurs intensités relatives des 19 acides aminés fonctionnalisés au DMF-DMA détectés. Les temps de rétention doubles correspondent aux deux énantiomères. La vitesse du gaz vecteur est à 1,2 $mL.min^{-1}$, le programme de température du CPG-SM (Shimadzu GC-MS QP5050A) est 70°C durant 5 minutes, 3°C jusqu'à 190°C puis plateau 190°C durant 10 min. Le champ d'analyse de masse est compris entre m/z = 40 et m/z = 350 u. La colonne utilisée est une Chirasil-Dex de longueur 30m.

Acide aminé	Temps de rétention (min)	Fragments de masse (m/z) en u et leurs intensités relatives
Thréonine	18.32 – 19.01, 22.3 - 23.2	84(100) 57(71) 42(20) 44(16) 56(14) 40(12) 71(12)
Sérine	18.42 – 19.57	70(100) 42(85) 43(30) 44(25) 40(20) 69(18) 41(16)101(13)... 129(4)
Alanine	20.14 – 20.94	44(100) 99(62) 42(25) 56(13) 158(6)
Glycine	22.44	44(100) 42(39) 85(36) 112(8) 144(7)
Valine	24.42 – 24.55	44(100) 143(45) 127(34) 42(25) 46(14) 57(11) 41(10)
Leucine	28.19	44(100) 141(53) 156(32) 42(30) 85(24) 40(15) 73(14) 99(13)
Isoleucine	28.13	44(100) 143(55) 42(28) 141(27) 156(24) 73(19) 41(16)
Proline	35.40 – 35.77	98(100) 70(94) 43(44) 41(43) 68(19) 42(17) 44(13)...129(10) 157(7)
Acide aspartique	35.92 – 36.08	44(100) 157(41) 42(30) 99(18) 115(14) 156(11)57(11) 216(9)
Asparagine	35.92 – 36.08	44(100) 157(40)40(30) 42(29) 143(18) 99(15) 115(14) 156(10) 57(10) 45(9)
Cystéine	36.47 – 36.59	44(100) 143(50) 42(20) 46(11) 40(9) 57(5) 159(5) 204(2)
Méthionine	40.01	44(100) 157(45) 42(35) 61(33) 111(28) 112(28) 144(23) 40(19) 143(18) 84(17) 57(16) 45(13) 97(12) 159(11) 218(6)
Acide glutamique	40.32	44(100) 40(44) 42(40) 111(38) 171(26) 57(17) 157(16) 46(16) 143(15) 73(14) 230(9) 199(8)
Glutamine	40.32	44(100) 111(69) 42(49) 171(36) 157(26) 41(23) 46(23) 57(23) 84(19) 170(19) 230(14) 199(13)
Phénylalanine	44.73 – 44.88	44(100) 143(63) 40(30 42(21) 45(11) 175(9) 73(6) 57(5)
Lysine	46.89	44(100) 70(42) 46(41) 42(33) 85(28) 99(23) 40(23) 185(17) 199(11) 142(10) 257(7) 242(7) ET 44(100) 115(62) 42(45) 46(41) 40(25) 143(18) 242(18) 157(17) 257(7)
Tyrosine	47.68 – 47.77	121(100) 44(57) 40(38) 192(19) 42(16) 143(16) 130(12) 45(10) 143(18) 242(18) 157(17) 257(7)
Histidine	49.42	(100) 42(93) 57(52) 192(52) 40(52) 112(39) 96(21) 137(15) 84(14) 164(8)
Arginine	51.38	44(100) 42(40) 98(34) 184(27) 99(26) 100(22) 43(21) 72(21) 46(21) 57(15) 125(14) 256(13)

L'amidine ester de certains acides aminés à chaîne latérale simple aboutit à une fragmentation, et donc à un spectre de masse relativement simple à interpréter. Il n'en est pas toujours de même pour certains acides aminés plus lourds. Par exemple les acides aminés possédant sur leur chaîne latérale des groupements ionisables vont augmenter la complexité du spectre de

masse en créant des molécules partiellement ou entièrement fonctionnalisées. De plus, la présence d'un deuxième centre asymétrique dans la molécule, comme pour la thréonine et l'isoleucine, engendre des difficultés supplémentaires d'interprétation puisque quatre formes isomériques peuvent être détectées. Néanmoins, pour réaliser l'analyse chirale d'une molécule cible, il est important de connaître les schémas de fragmentation de ses 2 formes spéculaires.

Tous les fonctionnalisats des acides aminés au DMF-DMA montrent un schéma de fragmentation caractéristique. Les pics majoritaires présents dans tous les spectres des amidine esters peuvent être observés à m/z = 44 u et m/z = 42 u. Ces deux masses correspondent respectivement à l'ion $(CH_3)_2N^+$, provenant de la partie amine de la molécule, et à l'ion iminium $(CH_2)N^+(CH_2)$. D'autres ions présents sur le spectre de masse sont détectés à m/z = 59 u. Cette masse peut être attribuée à une coupure de la liaison entre le C_α et le carbone du groupement carbonyl suivi d'une perte de l'ion C^+OOCH_3, ou d'une coupure interne de différentes liaisons dans l'ion moléculaire lui-même. Le fragment m/z = 57 u, récurrent dans une majorité des composés, correspond à la rupture de la double liaison N=C de la partie amine. Le fragment à m/z = 72 u correspond au clivage du groupement latéral et de la partie amine de l'acide aminé fonctionnalisé ($CHCOOCH_3$). Le fragment à m/z = 143 u correspond quant à lui au plus gros fragment identique dans tous les dérivés d'acides aminés fonctionnalisés au DMF-DMA, à savoir la molécule fonctionnalisée amputée de son groupement latéral alkyle, noté R. Ces différents fragments sont représentés sur la figure II.2-6.

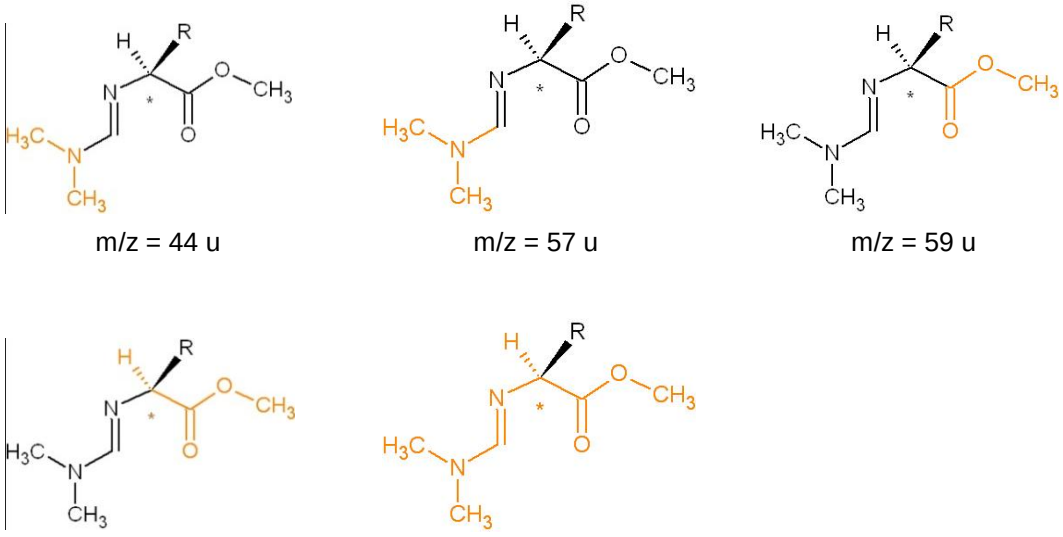


Figure II.2-6 : Formule développée des principaux fragments identifiables.

Pour mieux appréhender ces clivages et les groupements fonctionnalisés, prenons des exemples caractéristiques. A partir de la formule développée et du spectre de masse de chacune des molécules, nous avons été en mesure de proposer un patron de fragmentation. Le schéma de fragmentation des acides aminés non fonctionnalisés, sur la base de données NIST, a été

grandement utile pour connaître les liaisons les plus aptes à être clivées, et ainsi reproduire le même schéma sur certain des acides aminés fonctionnalisés.

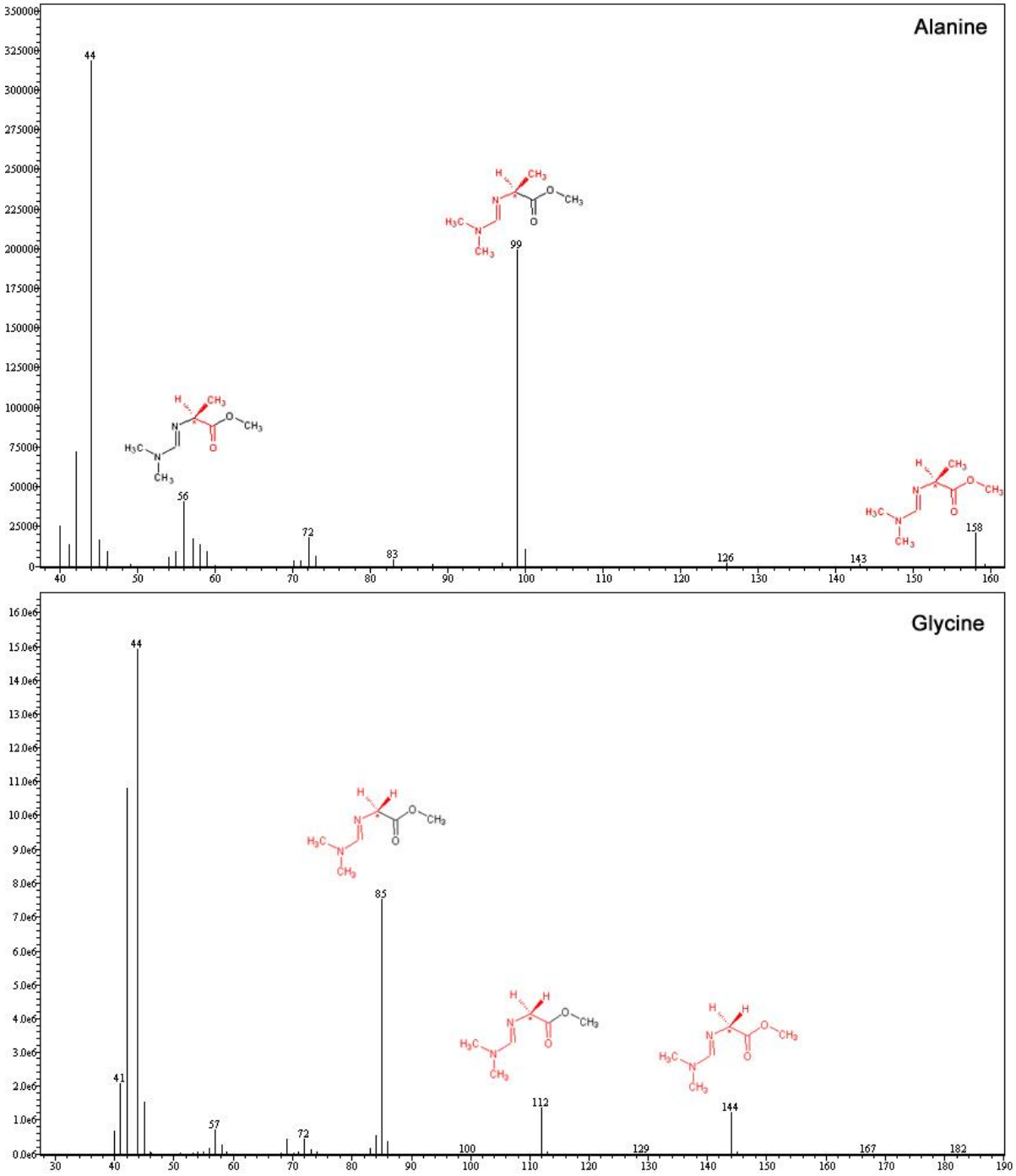


Figure II.2-7 : spectres de masse détaillés de l'alanine et la glycine réalisés sur un quadrupôle à 70 eV. Les fragments inférés des masses sont surlignés en rouge sur la molécule.

Pour les acides aminés possédant des groupements latéraux simples, comme la glycine (-H) ou l'alanine (-CH_3) (Figure II.2-7), le schéma de fragmentation reste simple, les fragmentations ioniques ne pouvant se faire que sur un nombre restreint de liaisons. Les spectres de masse en résultant ne possèdent alors que peu de fragments m/z caractéristiques, et ceux-ci sont facilement identifiable à la molécule mère.

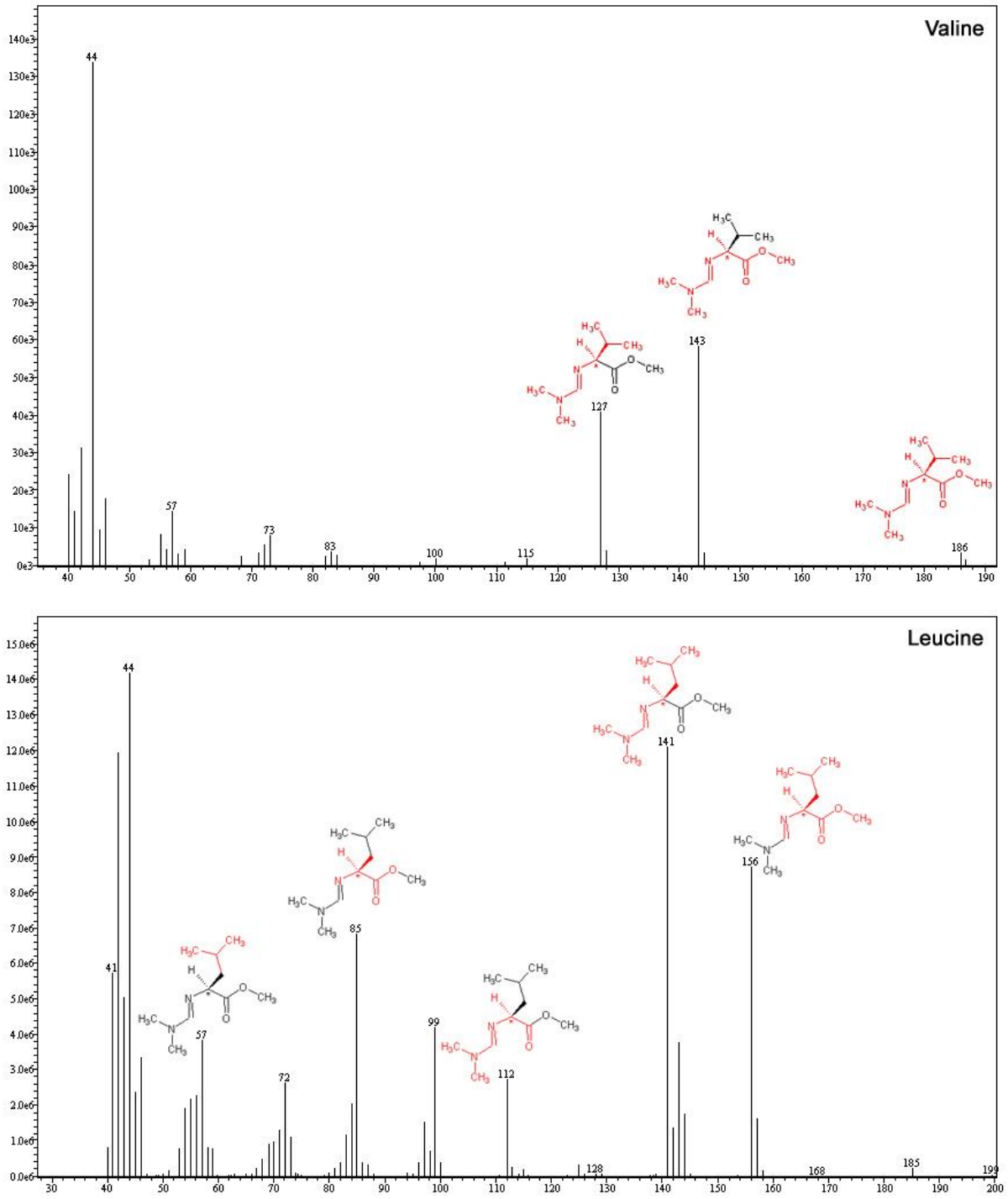
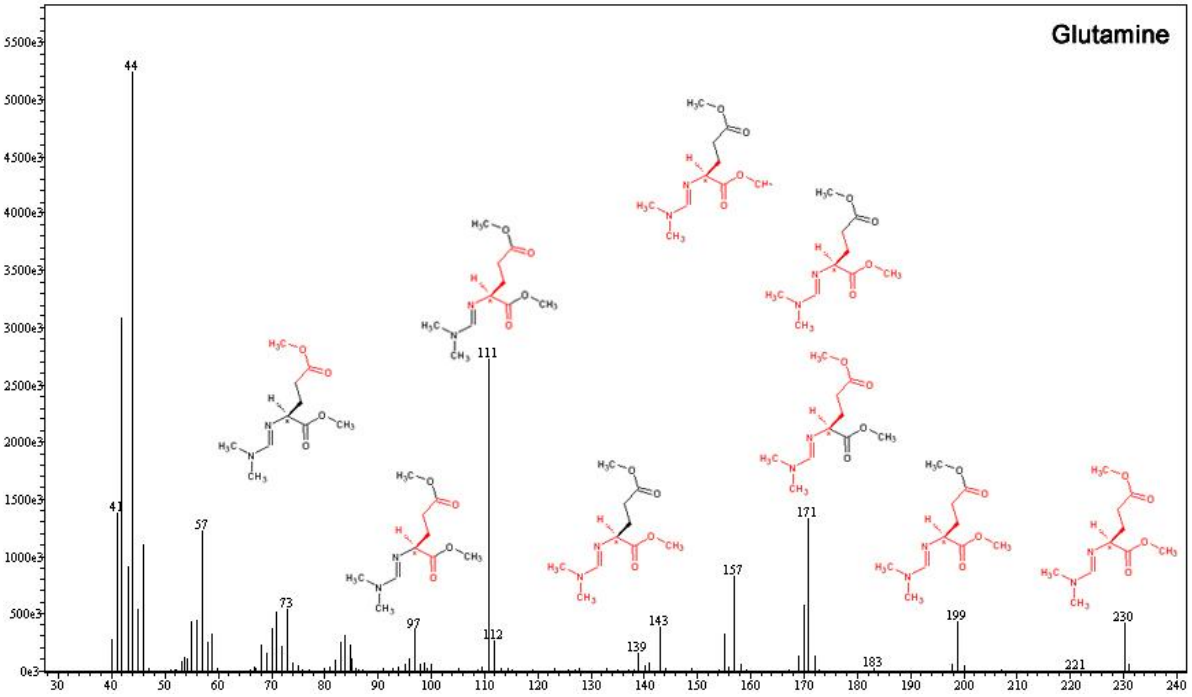
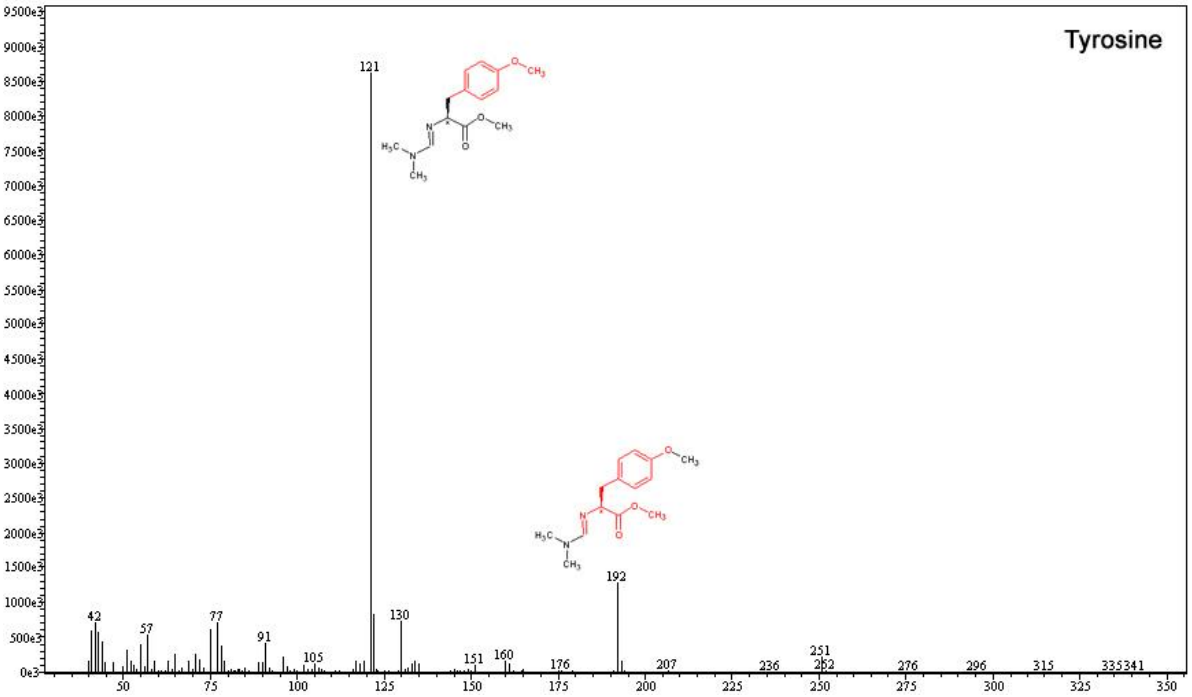


Figure II.2-8 : spectres de masse détaillés de la valine et la leucine réalisés sur un quadrupôle à 70 eV. Les fragments inférés des masses sont surlignés en rouge sur la molécule.

Lorsque les chaînes latérales s'allongent, telles que pour la valine ($CH(CH_3)_2$) et la leucine ($CH_2CH(CH_3)_2$) (Figure II.2-8), les schémas de fragmentation se complexifient, et les fragments caractéristiques des molécules mères se multiplient du fait de la plus grande possibilité de fragmentations et de réarrangements de l'ion moléculaire.





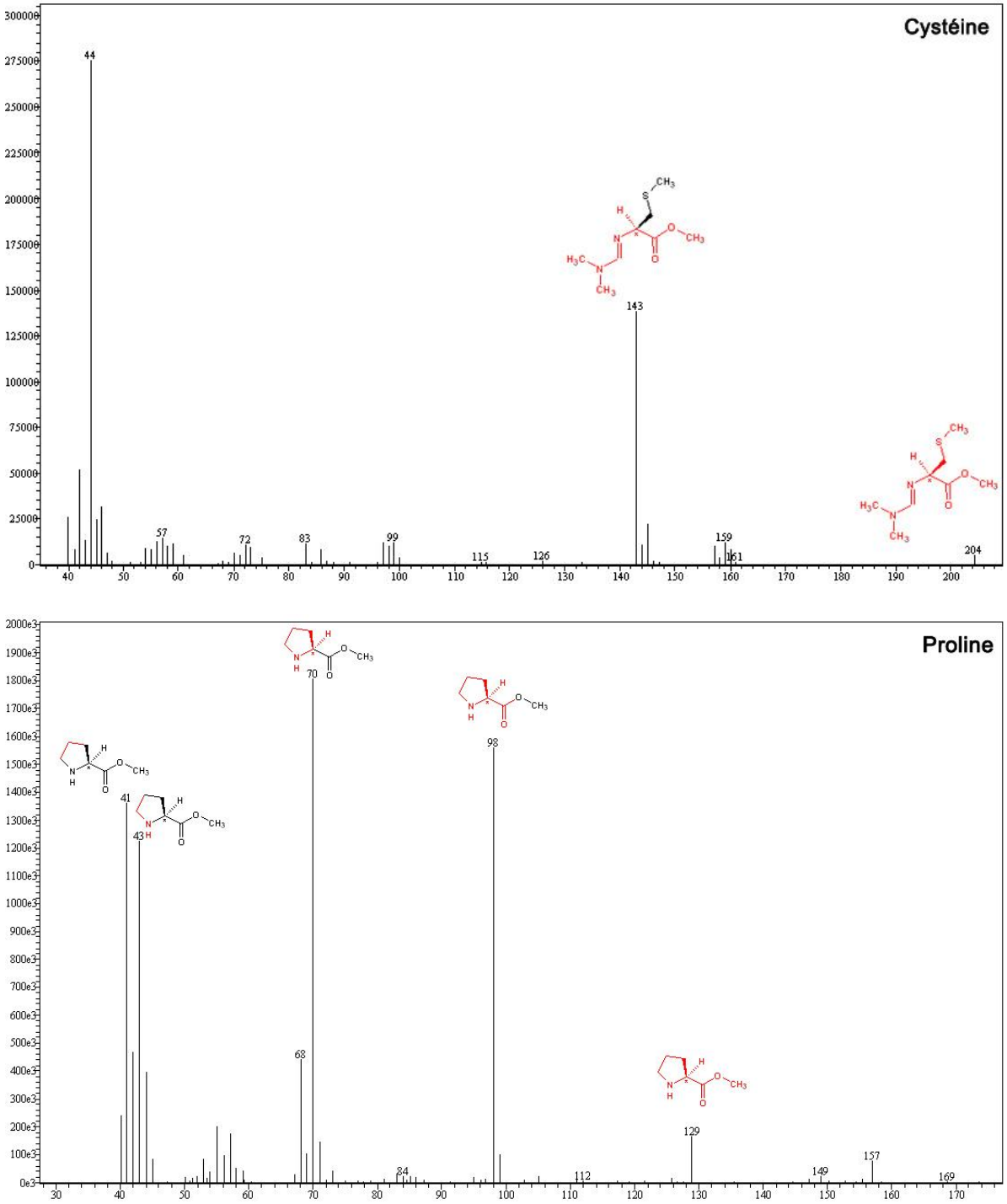


Figure II.2-9 : spectres de masse détaillés de la glutamine, la tyrosine cystéine et la proline réalisés sur un quadrupôle à 70 eV. Les fragments inférés des masses sont surlignés en rouge sur la molécule.

Les acides aminés possédant des chaînes latérales réactives, telles que des groupements OH, SH ou COOH, ont des comportements différents vis-à-vis de la fonctionnalisation. En effet, si certains d'entre eux ont été déterminés comme totalement fonctionnalisés grâce à l'étude de leur spectre de masse respectif, d'autres, tels que la sérine ou la thréonine, comportant chacun des fonctions hydroxyle sur leur chaîne latérale, ne le sont pas. Les fonctions OH latérales de ces derniers restent donc polaires et non fonctionnalisées, impliquant la possibilité de réarrangements de type

Mac-Lafferty. La tyrosine, en revanche, qui possède un groupement hydroxyle sur son cycle aromatique, montre un spectre de masse caractéristique d'une amidine ester méthylée correspondant à la fonctionnalisation de son groupement hydroxyle. De même que pour la cystéine, acide aminé soufré, son spectre de masse nous a permis de prouver la fonctionnalisation de son groupement thiol. L'observation du spectre de masse de la glutamine et de l'asparagine fonctionnalisées montre que l'on obtient les mêmes schémas de fragmentation que pour respectivement l'acide glutamique et l'acide aspartique fonctionnalisés. Lors de la fonctionnalisation de la glutamine et de l'asparagine, il y a donc une désamidation de ces derniers. Le groupement amide des glutamine et asparagine est labile à la température et aux conditions acides. Etant donné que même à des températures douces nous observons la désamidation, nous pouvons penser que ce phénomène est dû à la chimie de la fonctionnalisation sur ce type de composé.

Dans le cas de la proline, l'amine liée au carbone asymétrique est secondaire et non primaire comme dans les autres acides aminés protéiques, et cette amine n'est alors pas fonctionnalisée, comme en atteste le schéma de fragmentation présenté par le spectre de masse (Figure II.2-9).

Pour certains des acides aminés, la fonctionnalisation suivie de l'analyse CPG-SM aboutit à de multiples espèces séparées indépendantes des sous-produits de réaction. Ces espèces proviennent essentiellement d'une fonctionnalisation incomplète ou différentielle des molécules possédant plusieurs centres d'attaque du DMF-DMA, ou d'un réarrangement ou dégradation de la molécule durant la phase de chauffage dénaturante de la fonctionnalisation.

L'arginine en est un exemple : elle possède trois fonctions labiles (2 fonctions amines et une fonction acide carboxylique) mais ne présente pas de fonctionnalisation sur son NH_2 de la chaîne latérale, dû à la faible réactivité du groupement guanidine (C entouré de 3 N dont un avec une double liaison). Cependant, l'arginine est représentée sur le chromatogramme (Figure II.2-10) par plusieurs pics chromatographiques, et cela sur une période d'élution relativement étendue (de 40 à 52 min). Il est important de mentionner que les résultats obtenus pour l'arginine sont répétables tant sur le plan qualitatif (nombre de pics observés) que sur le plan quantitatif (rapport des aires obtenues pour chacun des pics). Afin de simplifier les calculs nous avons utilisé pour les calculs quantitatifs le pic de l'arginine qui a pu être interprété par son spectre de masse comme étant celui de l'arginine dont l'amine de la chaîne latérale n'est pas fonctionnalisée. Cependant, lorsque les différents produits de fonctionnalisation incomplète sont correctement identifiés (temps de rétention et spectre de masse) alors ils peuvent être utilisés lorsque le pic chromatographique de référence est difficilement observable.

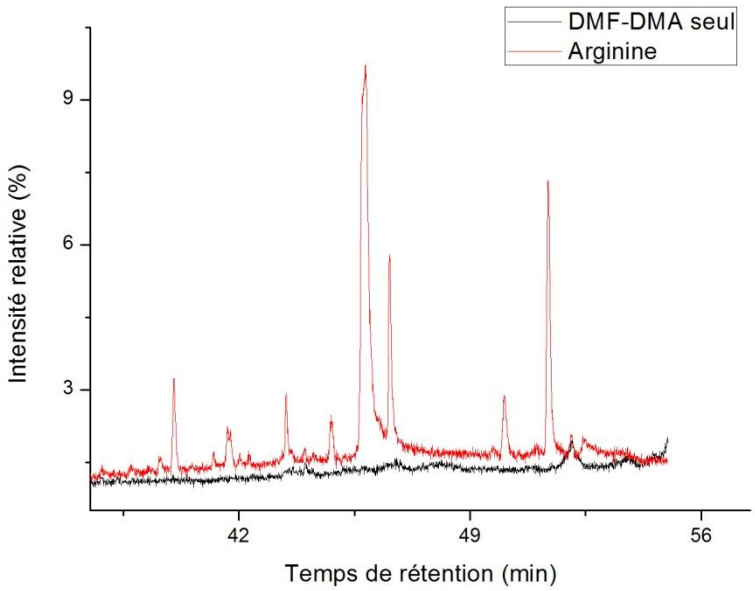


Figure II.2-10 : chromatogramme de l'arginine fonctionnalisée au DMF-DMA. 10 µL d'une solution d'arginine à 10^{-1}M ont été évaporés puis fonctionnalisés par 20 µL de DMF-DMA. En noir, le DMF-DMA seul chauffé dans les mêmes conditions que la fonctionnalisation (3 minutes – 140°C). Tous les pics observés sur le chromatogramme de l'arginine possèdent des spectres de masse différents, maissont reproductibles, tant qualitativement que quantitativement ; ils sont ainsi caractéristiques de l'arginine. Le pic à 51,4 est utilisé pour les études et considéré comme « le pic de l'arginine ».

Concernant la lysine, il s'agit d'un acide di-aminé, possédant un groupement amine primaire sur sa chaîne latérale. La fonctionnalisation de ce composé aboutit à 2 pics chromatographiques dont les temps de rétentions sont proches, mais dont les spectres de masse sont différents. Cette différence nous permet d'affirmer qu'il ne s'agit donc pas d'une séparation énantiomérique. L'explication est que la lysine peut se retrouver sous forme mono- ou bi-amidinée, ces deux espèces dérivées de la lysine étant éluées à des temps de rétention différents et produisant des spectres de masse différents. L'étude du schéma de fragmentation nous permet d'affirmer que le premier pic détecté correspond à l'amidine ester bi-fonctionnalisée, c'est-à-dire fonctionnalisée sur ses deux groupements amine, le deuxième pic correspondrait alors à cette même molécule mais partiellement fonctionnalisée. Ces deux pics aux temps de rétention très proches sont donc caractéristiques de la lysine.

Il est également important de mentionner ici que la présence de sous-produits de fonctionnalisation, liée à une fonctionnalisation incomplète ou à une dégradation thermique vont induire une diminution du signal lié au produit originel. Le signal de la molécule native en sera donc d'autant plus réduit que les sous-produits sont nombreux, jusqu'à la suppression totale de la détection si aucun des pics chromatographiques n'atteint la limite de détection liée à l'appareillage et l'analyse.
Lors de la réaction de fonctionnalisation au DMF-DMA, quelques autres acides aminés lourds (tryptophane, tyrosine…) produisent des sous-produits de dégradation détectables par GPC-SM.

Heureusement, ces produits d'une part n'interfèrent pas avec notre analyse, et d'autre part ne coéluent avec aucun de nos composés analysés.

Concernant le tryptophane, seul acide aminé non détecté après fonctionnalisation, nous observons sur son chromatogramme de nombreux pics non identifiables à des produits de fonctionnalisation, cela même lorsqu'il est injecté en très grande quantité (de l'ordre du milligramme). Ces pics identifiables et permettant une analyse quantitative pourraient éventuellement faire l'objet d'une étude approfondie afin de déterminer s'ils sont des produits de dégradation. Cependant, ils n'apparaissent que pour des concentrations trop élevées et incompatibles avec les teneurs potentiellement présentes lors d'une analyse *in situ*.

En conclusion, les analyses des différents schémas de fragmentation des acides aminés en fonction du spectre de masse nous ont permis :

- de connaître l'impact de la réaction de fonctionnalisation sur les groupements réactifs des acides aminés, et ainsi d'en établir la quantitativité de la réaction.
- de savoir distinguer le pic chromatographique du composé des pics des produits de dégradation.
- d'identifier une molécule mère inconnue à partir de son spectre de masse

Ce travail nous a permis de constituer une librairie complète des spectres de masse permettant d'identifier et d'étudier les acides aminés protéiques fonctionnalisés au DMF-DMA. Nous pouvons passer à l'étape suivante qui est l'optimisation des paramètres de la réaction de fonctionnalisation.

II.2.2.d. Optimisation de la fonctionnalisation

Pour déterminer les conditions de la réaction aboutissant au meilleur rendement en un temps minimal d'analyse tout en limitant le taux de racémisation, nous avons fait varier les deux paramètres essentiels de la réaction : la durée et la température de la fonctionnalisation. Pour s'affranchir de la répétabilité de l'injection et de celle de la réponse chromatographique inter-run, nous avons utilisé un étalon interne : le méthyl laurate. Ainsi pour les analyses quantitatives nous avons considéré l'aire du pic du composé d'intérêt rapportée à l'aire de l'étalon interne. Après avoir stoppé la réaction de fonctionnalisation en enlevant le pilulier du bain d'huile, un volume de 1µL de l'étalon interne a été ajouté. La concentration du méthyl laurate préparé dans de l'acétate d'éthyle est de 10^{-2} mol.L^{-1}. Les études sont effectuées en mode TIC (Total Ion Chromatogram), c'est-à-dire en mode d'analyse full-scan.

Pour chaque acide aminé, l'efficacité relative de la fonctionnalisation a été estimée pour des réactions ayant lieu à des températures allant de 80 à 160°C, et pour une durée de 30 secondes à 60 minutes. Grâce à cette fonctionnalisation, les acides aminés ont été rendus volatils, ce qui permet alors leur analyse chromatographique. L'échantillon résultant de toutes ces manipulations est alors injecté dans le CPG-SM.

Optimisation de la température et du temps de la réaction de fonctionnalisation

Les résultats obtenus montrent qu'une même tendance très générale existe en fonction de la variation de température ou du temps de réaction, pour la majorité des acides aminés étudiés. Cette tendance s'exprime par une augmentation du rendement de la réaction avec la durée et la température de la réaction jusqu'à un maximum ou un plateau avant de décroître (Figure II.2-11 et Figure II.2-12). Cependant cette décroissance n'est pas observée lorsque la température de fonctionnalisation est suffisamment basse pour ne pas dégrader l'acide aminé sur la durée. Il est toutefois important de remarquer que dans ce cas le rendement de fonctionnalisation n'est pas à son maximum (Figure II.2-12).

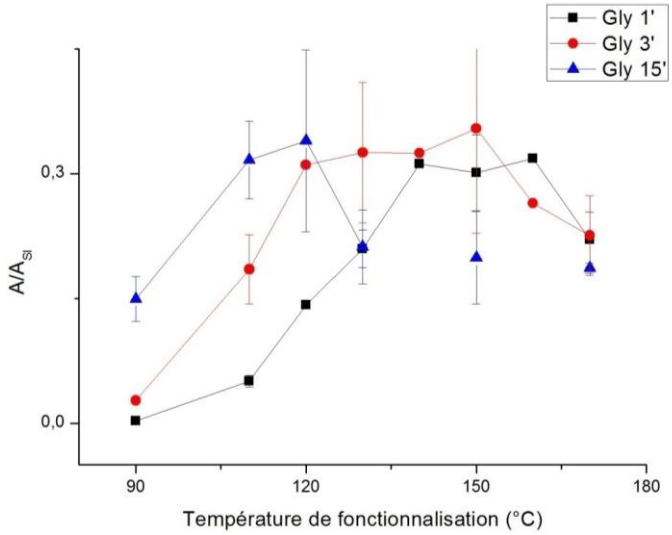


Figure II.2-11 : rendement relatif de la fonctionnalisation en fonction de la température de fonctionnalisation pour différentes durées de fonctionnalisation pour la glycine fonctionnalisée avec 20 µL de DMF-DMA. L'étalon interne consiste en 1 µL de méthyl laurate dilué à 10^{-2} M dans de l'acétate d'éthyle.

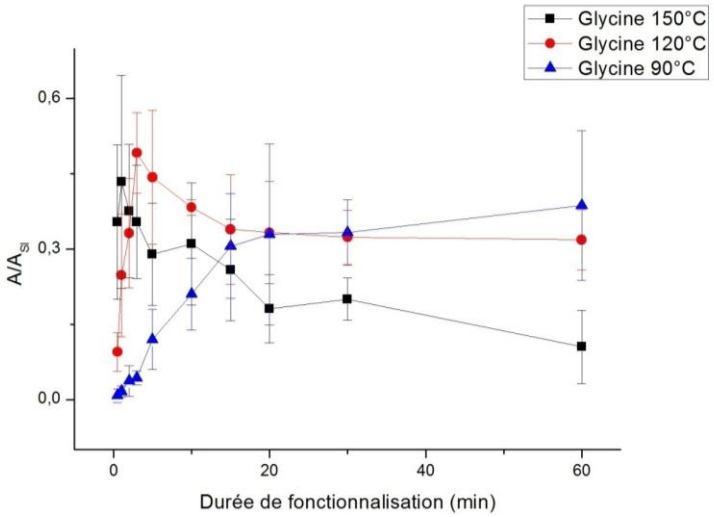


Figure II.2-12 : rendement relatif de la fonctionnalisation en fonction de la durée de la fonctionnalisation pour différentes températures de fonctionnalisation pour la glycine fonctionnalisée avec 20 µL de DMF-DMA. L'étalon interne consiste en 1 µL de méthyl laurate dilué à 10^{-2} M dans de l'acétate d'éthyle.

Une analyse plus fine des courbes obtenues, figure II.2-13, montre qu'il existe 3 types de comportements des acides aminés face à l'augmentation de la température et de la durée de fonctionnalisation.

Ainsi, il existe des acides aminés sensibles à la température et, à ces températures critiques, la durée de la fonctionnalisation devient elle aussi un paramètre critique. C'est notamment le cas de la thréonine (Figure II.2-13,b). Pour ce type de composé, nous observons tout d'abord une augmentation du rendement de fonctionnalisation avec la durée de la réaction, et cela même à des températures relativement faibles comme 80°C. Dès 100°C, nous observons une dégradation importante du composé à partir de 30 minutes. Puis, plus la température augmente, plus la durée de la fonctionnalisation devient un paramètre critique. En effet au dessus de 120°C, la dégradation de l'acide aminé a lieu de plus en plus tôt pour devenir quasi instantanée à 140°C et 160°C. Cette extrême fragilité de la thréonine à partir de 140°C peut s'expliquer de deux manières. D'une part il peut s'agir tout simplement d'une dégradation de la molécule fonctionnalisée avec la température. Cependant cette dégradation ne semble pas être observée dans la colonne à des températures du même ordre. D'autre part, rappelons que le groupement hydroxyle qui se trouve sur la chaîne latérale de la thréonine n'est pas méthylé donc non protégé chimiquement. Ce groupement étant très réactif, il sera plus à-même de participer à des réactions intra ou intermoléculaires engendrant une transformation chimique de la molécule cible. Il est alors possible qu'à partir d'une durée ou d'une température de fonctionnalisation faible, ce groupement labile se méthyle et aboutisse ainsi à une autre molécule fonctionnalisée, éluée à un temps de rétention différent. Cette possibilité a été prise en compte, mais aucun pic chromatographique n'a pu être identifié comme tel. Néanmoins, cette hypothèse d'une transformation de ce composé, même s'il n'a pu être identifié pour l'instant, est plus vraisemblable que la dégradation de la thréonine sous les conditions de la fonctionnalisation.

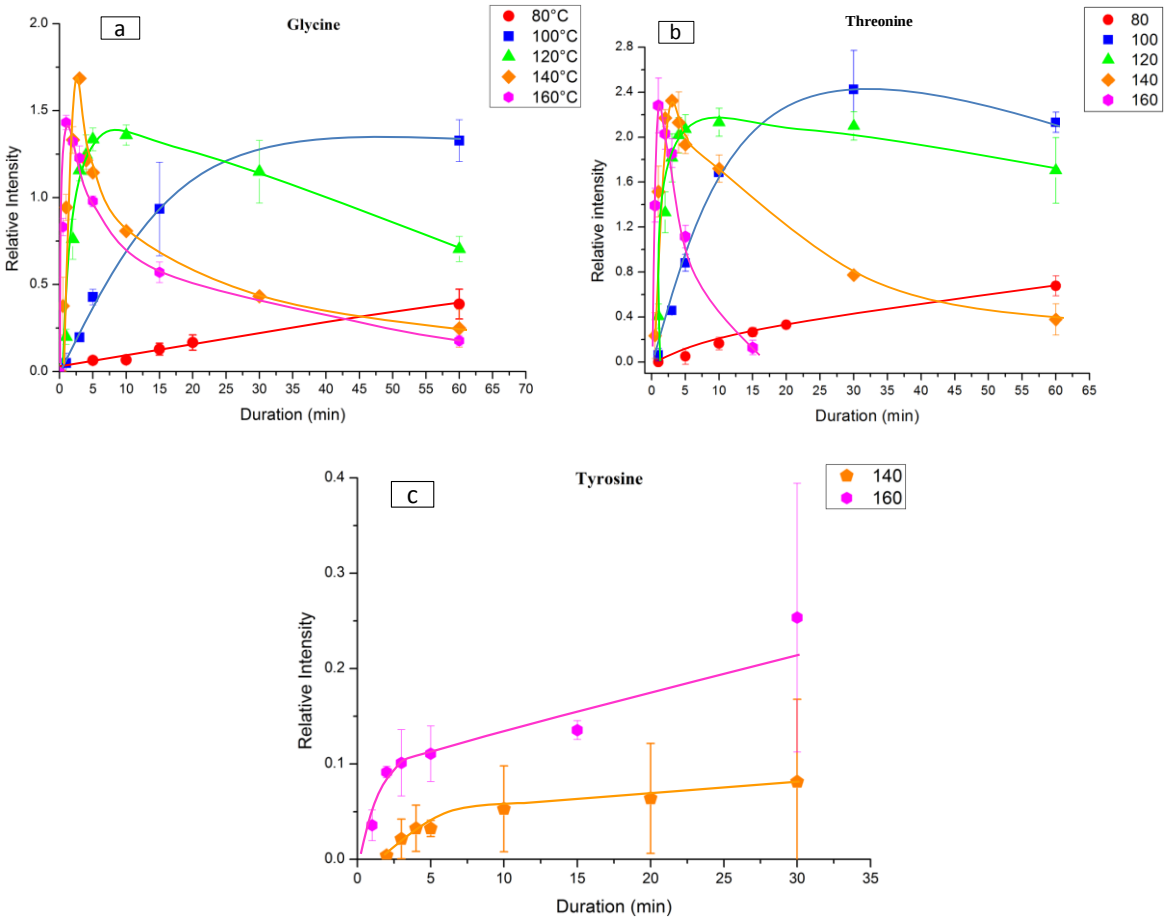


Figure II.2-13 : efficacités relatives de la fonctionnalisation (A/A_{SI}) en fonction de la durée de fonctionnalisation (en minutes) pour a) la glycine, b) la thréonine et c) la tyrosine. 0,5 µL de solution d'acide aminé à 10-1 M a été fonctionnalisé (par 20 µL de DMF-DMA) pour chaque point. Chaque groupe de points de couleur identique correspond à une température donnée de fonctionnalisation. 3 répétitions minimum par analyse ont été réalisées.

A l'opposé, il y a des composés plus résistants à la fonctionnalisation. La tyrosine fait partie de ces composés. A des températures inférieures à 140°C, quelle que soit la durée de la réaction, aucune fonctionnalisation ne peut être observée. Pour les hautes températures testées, 140°C et 160°C, les durées de la fonctionnalisation n'ont pas été suffisantes pour atteindre un plateau. Le rendement maximal obtenu (à défaut d'atteindre l'optimal) l'est ici pour une température de 160°C durant 60 minutes. Nous n'atteignons alors pas le stade où la dégradation prend le dessus sur la formation des fonctionnalisats. Cela atteste de la difficulté de la réaction sur ce composé, sans doute dû à la présence de son cycle sur sa chaîne latérale. En outre, il est possible d'imaginer le scénario inverse à celui de la thréonine. En effet, nous avons vu que pour la tyrosine, le groupement hydroxyle porté par un carbone du cycle est méthylé, contrairement à la thréonine. Il n'est pas impossible qu'à des températures inférieures, il existe un composé fonctionnalisé dont ce groupement OH latéral n'est pas méthylé. Ce composé aurait un temps de rétention et un spectre de masse différent de celui observé et caractérisé pour la tyrosine, et a donc pu passer inaperçu malgré sa recherche sur les chromatogrammes. Ce composé détecté et décrit comme n'existant qu'à des températures et des

durées importantes de fonctionnalisation ne serait alors que l'espèce créée dans les conditions les plus extrêmes de la réaction, sans pour autant représenter la totalité du composé potentiellement analysable. Quoi qu'il en soit, si la tyrosine est présente dans les futurs échantillons analysés, la fonctionnalisation au DMF-DMA sera incomplète, et la détection sera alors biaisée ou très difficile.

Entre ces deux extrêmes se trouvent les composés au comportement intermédiaire. Plus la température et le temps de fonctionnalisation augmente, plus leur rendement augmente, jusqu'à un maximum à partir duquel le rendement de fonctionnalisation commence à chuter et devient de plus en plus faible au fur et à mesure que le temps de réaction augmente. Cette décroissance est d'autant plus rapide que la température de fonctionnalisation est importante. Les facteurs thermodynamique et cinétique influencent la réaction de fonctionnalisation. Il s'agit typiquement du cas de la glycine. A faible température, *i.e.* 80°C, le rendement thermodynamique de la fonctionnalisation augmente avec la durée sans toutefois atteindre d'optimum. Cela se traduit à 80°C par une augmentation linéaire du rendement de 30 secondes à 1h de fonctionnalisation. A 100°C, l'augmentation du rendement en fonction du temps est plus rapide, jusqu'à atteindre un optimum aux limites des durées étudiées (1h). Dans cette gamme de température on observe donc à la fois un effet thermodynamique et cinétique sur la réaction de fonctionnalisation. Aux températures supérieures, le profil est typique : on observe tout d'abord une augmentation du rendement de fonctionnalisation en fonction du temps jusqu'à atteindre un maximum, puis apparait une diminution du rendement. Cette diminution est attribuée à la dégradation des acides aminés avant leur fonctionnalisation.

Dans la gamme de température 100-160°C, le rendement maximum (et optimum) de fonctionnalisation est relativement constant et indépendant de la température de réaction. Cependant le rendement maximum est décalé vers des temps de réaction beaucoup plus courts. L'augmentation de la température n'a alors que peu d'influence sur le rendement maximum atteint mais par contre influence le facteur cinétique. Dans cette gamme de température c'est donc le facteur cinétique qui est prépondérant. En revanche, et comme nous l'avons vu précédemment, à des températures inférieures à 100°C, le rendement de la fonctionnalisation augmente continuellement sans que l'on observe de dégradation. C'est notamment le cas de la glycine à 80°C.

Nous pouvons d'ores et déjà conclure que puisque à des températures inférieures à 100°C le rendement de fonctionnalisation maximal n'est jamais atteint, et cela quel que soit l'acide aminé, alors la gamme de 80-100°C ne sera pas la plus propice à la fonctionnalisation des acides aminés considérés.

Afin de choisir le meilleur couple température de réaction - durée de fonctionnalisation, ces deux paramètres ne peuvent être étudiés séparément. En effet, comme nous avons pu le constater précédemment, les paramètres température et temps de réaction sont étroitement liés, de sorte qu'il existe un effet de synergie entre les deux. Toute la difficulté est donc de trouver le meilleur compromis entre la durée et la température de fonctionnalisation. L'autre difficulté est de trouver un couple

durée/température de fonctionnalisation qui corresponde à un optimum pour tous les acides aminés étudiés, sachant qu'il existe des disparités entre les acides aminés cibles vis-à-vis de la réaction de fonctionnalisation. Pour cela nous avons représenté sur un même graphe (Figure II.2-14) l'évolution de la température et du temps de fonctionnalisation en fonction du rendement. Afin de déterminer les meilleurs paramètres de durée et température, nous avons donc mené une étude croisée entre l'influence de durée et de la température de fonctionnalisation sur le taux de fonctionnalisation. Pour simplifier les résultats et leur interprétation, nous n'avons reporté que le comportement de chaque acide aminé en fonction de l'optimum de durée de réaction pour chaque température étudiée.

De plus, il est important que la durée de réaction soit suffisamment courte pour permettre une compatibilité avec les techniques spatiales. A durée courte, pour une efficacité égale, il faut alors augmenter la température de fonctionnalisation. Cette température ne doit cependant pas être trop élevée pour permettre d'avoir un plateau de rendement optimum suffisamment long pour ne pas risquer d'être dans la gamme de temps et de température qui engendre une dégradation des acides aminés cibles. Pour les expériences *in situ*, la température devra donc être choisie en fonction de la durée de la fonctionnalisation. Par exemple, si des temps de réaction courts sont imposés, il est alors nécessaire d'utiliser des températures de réaction élevées.

L'étude permet de confirmer l'imbrication étroite des deux paramètres temps et température de réaction. Plus la température de fonctionnalisation augmente, plus la durée optimale de réaction devient courte. D'après ces résultats, il est alors possible de dire que le taux de fonctionnalisation maximal est atteint lorsque la réaction a lieu à des températures douces, c'est-à-dire vers 100°C. A cette température, à l'exception de la tyrosine et de la lysine, le taux de formation des produits fonctionnalisés « plafonne » plusieurs minutes, en fonction des acides aminés, avant de décroître lentement. On observe également que la réaction de fonctionnalisation est également efficace pour des températures supérieures à 100°C, et qu'un accroissement de la température de réaction peut permettre de diminuer le temps nécessaire à la fonctionnalisation.

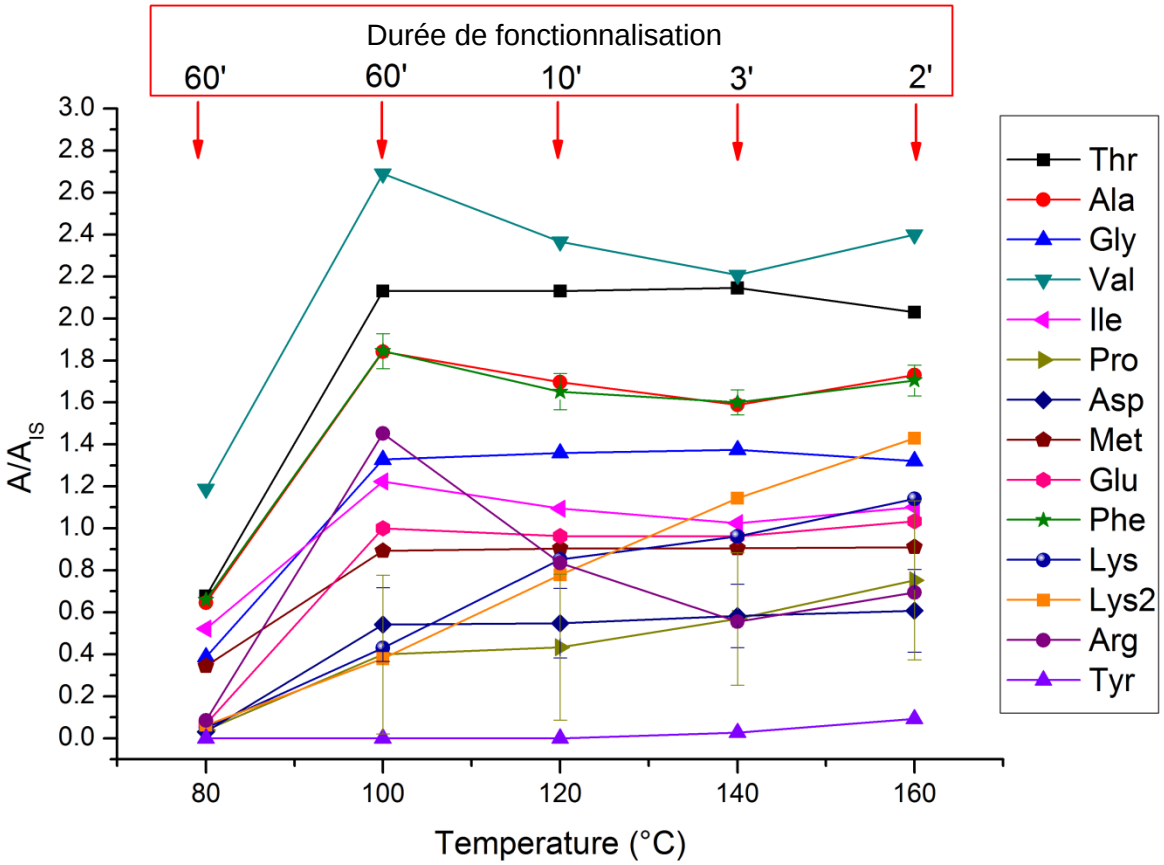


Figure II.2-14 : analyse croisée du rendement de la fonctionnalisation en fonction de la durée et de la température de celle-ci. En abscisse, les températures de fonctionnalisation, de 80 à 160°C. En ordonnée, le rendement relatif (aire du pic sur aire du standard interne). Pour chaque température, la durée optimale a été déterminée, et seule cette dernière est représentée sur le graphe. Les barres d'erreur représentées correspondent au pourcentage de racémisation des acides aminés aux températures étudiées. Pour une solution mère de 10^{-2} mol.L^{-1}, les solutions d'acides aminés sont telles que : 5 + 5 µL L,D-Thr, 10 + 10 µL L,D-Ser, 0,5 µL Gly, 2 + 2 µL L,D-Ala, 0,5 + 0,5 µL L,D-Val, 0,5 + 0,5 µL L,D-Ile, 5 + 5 µL L,D-Pro, 2 + 2 µL L,D-Asp, 30 + 30 µL L,D-Cys, 0,2 + 0,2 µL L,D-Met, 1 + 1 µL L,D-Glu, 25 + 25 µL L,D-Tyr, 0,1 + 0,1 µL L,D-Phe, 8 + 8 µL L,D-Lys, 50 + 50 µL L,D-His, 10 + 10 µL L,D-Arg. Après évaporation de l'eau, la fonctionnalisation a été effectuée avec 20 µL de DMF-DMA. Chaque point est une moyenne d'au moins 3 répétitions.

Cependant comme nous l'avons déjà relevé aux températures extrêmes (160°C) nous observons beaucoup plus de sous-produits de dégradation qu'à des températures inférieures.

La figure II.2-14 permet d'observer que pour tous les acides aminés sauf la tyrosine et la thréonine et pour toutes les températures excepté 80°C, le taux de fonctionnalisation maximal a été pu être atteint. Il est ainsi possible de conclure qu'une durée optimale de fonctionnalisation existe pour la plupart des températures étudiées 100-160°C. Si la réaction de fonctionnalisation continue au delà de ce temps optimal, il se produit une dégradation importante du composé parent aboutissant à une baisse du rendement général de la réaction. Nous avons donc le choix entre une température relativement douce (vers 100°C) et un temps de réaction long (20-60 min) ou une température de fonctionnalisation plus élevée (140°C-160°C) et des temps de réaction de l'ordre de la minute.

Il est intéressant de noter que la résistance des acides aminés à la chaleur ou a des durées élevées de fonctionnalisation ne correspond pas aux critères de résistance des acides aminés face

aux UV ou à d'autres radiations ionisantes, ou aux chocs. Par exemple, les acides aminés acides (Asp, Glu) libres sont plus susceptibles à la dégradation face aux UV que les autres acides aminés. L'acide aspartique fait cependant partie des plus "résistants" dans nos conditions expérimentales. La survie des acides aminés face aux chocs (cométaires) dépend de paramètres cinétiques intrinsèques à la molécule. Ces chocs infligent à la molécule des contraintes mécaniques et une température élevées, deux paramètres indissociables dans les études. Pierazzo *et al.* (Pierazzo *et al.* 1999) ont étudié différents acides aminés et leur cinétique de dégradation suite à un choc vertical. Pour cela ils ont utilisé l'équation d'Arrhenius sous la forme : $dM = -M\,A\,e^{-\frac{E_a}{RT(t)}}dt$ ou E_a est l'énergie d'activation, M la masse du matériel organique et A la constante pré-exponentielle. Ils ont alors classé la résistance des acides aminés en fonction de la valeur de A. Ils ont ainsi pu montrer que les acides aminés avec des valeurs élevées de A, comme l'alanine et la leucine, ont une fraction de survie virtuellement nulle en impact vertical. Pour ceux montrant une valeur intermédiaire de A, glycine, lysine et valine, la fraction de survie est faible. Pour ceux avec un A faible (Asp, Glu, phe et Asn), le taux du survie est non-négligeable pour un impact cométaire vertical (Pierazzo *et al.* 1999). En somme, les acides dicarboxyliques (Asp et Glu) ont une meilleure survie aux chocs, ce qui correspond bien à nos résultats expérimentaux. La proline a la moindre survie face aux chocs, or, elle fait partie des plus résistants dans nos conditions de température. Trois hypothèses peuvent expliquer ces différences de comportement. La première serait une différence comportementale intrinsèque différentielle des acides aminés face aux conditions qui lui sont imposées ; un composé pourra être résistant face aux radiations ionisantes, mais peu à la chaleur, et vice-versa. La deuxième hypothèse concerne le fait de ne pouvoir quantifier la dégradation. L'efficacité observée est relative (rendement relatif), et est le résultat de l'efficacité de la fonctionnalisation combinée à la possible dégradation des acides aminés. Les profils de dégradation des composés peuvent varier significativement d'un composé à l'autre sans qu'une différence du profil d'efficacité globale n'apparaisse. Pour la proline, qui paraît très résistante à la température, mais ne l'est pas aux chocs, sa résistance apparente peut provenir d'une hausse de l'efficacité de la fonctionnalisation particulièrement importante malgré une dégradation efficace de la molécule, montrant ainsi une hausse de l'efficacité apparente avec la température, et laissant croire à une résistance particulièrement importante de la proline face à la température de la réaction de fonctionnalisation. Enfin une dernière hypothèse, certainement la plus probable, est que la fonctionnalisation protège les acides aminés. En effet, l'ajout de groupements CH_3 et $(CH_3)N\text{-}CH=$ peu polaires permet de stabiliser les acides aminés vis-à-vis des températures extrêmes et donc de donner l'impression d'une meilleure résistance des acides aminés parents.

Avant de faire un choix final sur le couple température et durée de fonctionnalisation, nous devons considérer quelques points importants. Tout d'abord, d'un point de vue spatialisation, la réaction se doit d'être peu consommatrice d'énergie et si possible durant une période de temps relativement restreinte. Toutefois ce paramètre est à nuancer car des temps relativement courts peuvent nécessiter des pointes énergétiques importantes qu'il n'est pas forcément possible d'obtenir sur un rover.

A cela s'ajoute une autre difficulté majeure à prendre en compte lors de l'optimisation de la fonctionnalisation : la racémisation. En effet, nous n'en n'avons pas encore discuté ici mais il ne faut surtout pas oublier que nous nous intéressons à la chiralité des acides aminés, et de ce point de vue l'absence de racémisation engendrée par la réaction de fonctionnalisation est un élément crucial de l'étude. Les conditions réactionnelles doivent donc minimiser la possibilité de générer des produits racemisés d'acides aminés, afin d'être applicables pour la détection d'excès énantiomériques. Lorsque la température de la réaction augmente, il en va de même pour le risque de racémisation. Le même phénomène est observé pour la durée de la fonctionnalisation. Ainsi, avant de statuer sur les paramètres optimaux de la réaction de fonctionnalisation, il est nécessaire d'étudier l'influence de l'impact de la température et du temps de fonctionnalisation sur la racémisation des acides aminés. Nous avons donc d'abord étudié la racémisation des composés en fonction de la température et de la durée de la racémisation. Pour cela, chaque acide aminé a été mesuré dans chacune des conditions de température et de temps sous forme L ou sous forme D, pour établir le pourcentage de racémisation, cela à partir d'un composé énantiomériquement pur.

La racémisation

Pour tous les acides aminés chiraux, tout carbone asymétrique lié à un hydrogène et adjacent à un groupement accepteur d'électron, tel que le groupement acide carboxylique des acides organiques, pourra facilement échanger cet hydrogène en présence d'une molécule de H_2O ou de OH^-. De plus, cet atome α-H pourra également être attaqué par une autre base. Durant cet échange d'hydrogène ou cette attaque basique, les trois groupements fonctionnels restant liés au carbone central vont se réarranger pour produire un ion moléculaire plan. Un ion hydrogène pourra alors venir se lier sur l'une ou l'autre des faces de l'ion moléculaire plan avec une chance égale, produisant indépendamment une forme ou sa spéculaire, et ainsi racémiser le composé en le convertissant d'un énantiomère à l'autre (Basiuk 2001). Ce processus de racémisation est exacerbé lorsque la température augmente ou tout simplement avec l'accroissement de la durée de chauffage.

Pour étudier la probabilité de former des acides aminés fonctionnalisés racémisés pendant la réaction, chacun des acides aminés est injecté dans la colonne sous sa forme L uniquement, puis D uniquement. Les barres d'erreurs présentes sur la figure II.2-14 représentent le taux de racémisation pour chacune des valeurs. Exception faite de la proline et de l'acide aspartique, aucune racémisation n'a pu être observée pour des réactions de fonctionnalisation à 80°C, et cela quelle que soit la durée de la réaction.

A des températures de réaction élevées, une augmentation de la durée de la fonctionnalisation est directement liée à une augmentation du taux de racémisation. De plus, plus la température de la réaction est haute, plus le taux de racémisation augmente rapidement en fonction de la durée de fonctionnalisation.

Aux faibles températures (80-100°C) les temps de réaction sont élevés puisque de l'ordre de l'heure, ce qui, en plus d'un faible rendement sur un grand nombre d'acides aminés, implique une augmentation non négligeable de la racémisation de beaucoup de ces acides. De la même façon, aux températures extrêmes (160°C) le pourcentage de racémisation est plus élevé qu'aux autres températures et cela bien que le temps de réaction soit beaucoup plus faible. 160°C est donc une température incompatible avec nos objectifs expérimentaux et cela même si cette température permet de fonctionnaliser les plus réfractaires de nos acides (thréonine, tyrosine *etc*.). Cette difficulté de l'efficacité de la fonctionnalisation *vs.* racémisation est illustrée sur la figure II.2-15 ci-dessous. Nous pouvons observer que pour la proline, une fonctionnalisation à 90°C entraîne peu de racémisation, mais un rendement faible. Pour une fonctionnalisation à 120°C, la racémisation s'accentue, mais le rendement de l'acide aminé est optimal. Lorsque la fonctionnalisation est effectuée à une température élevée (150°C), non seulement l'acide aminé racémise presque totalement, mais la forte température entraîne une destruction de l'acide aminé et ainsi un rendement non-optimal. De plus, moins d'acides aminés de la forme initiale sont détectés, au profit de la forme racémisée. C'est pourquoi le choix de température de fonctionnalisation est indissociable de l'étude de la racémisation des composés.

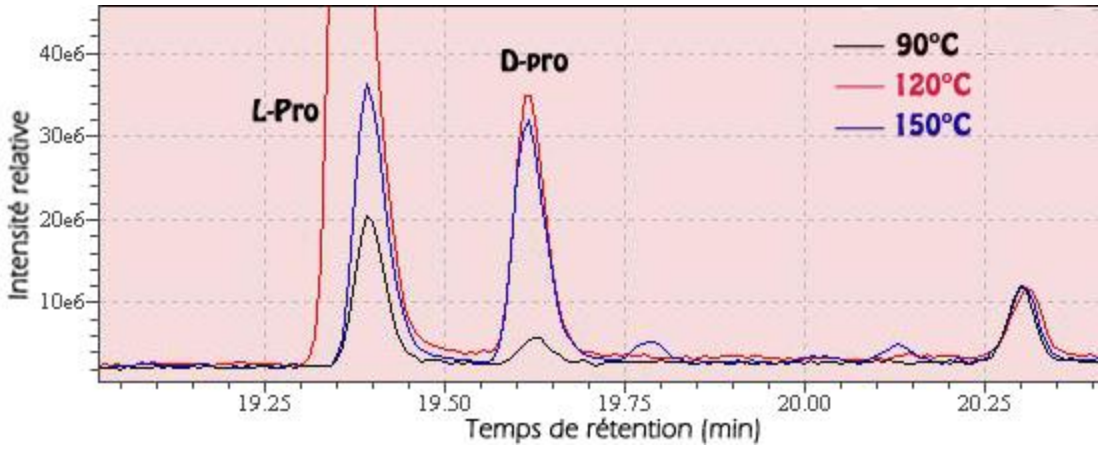


Figure II.2-15 : chromatogramme de la L-proline fonctionnalisée avec 20µL de DMF-DMA durant 3 minutes à différentes températures. Le pic de la D-Pro est le résultat de la racémisation de la L-Pro durant la fonctionnalisation.

De manière générale le meilleur compromis entre le taux de racémisation, la température et le temps de réaction semble être le couple 140°C – 3 min. En effet, pour la plupart des acides aminés testés, la température de 140°C permet d'atteindre en très peu de temps le rendement optimum de fonctionnalisation. De plus à cette température la dégradation n'est pas instantanée une fois le rendement maximum atteint, ce qui signifie qu'une marge d'erreur d'au moins 20% est acceptable sur le temps de réaction fixé ici à 3 min. Enfin, pour le couple 140°C – 3 min le taux de racémisation est minimisé à savoir qu'il n'est pas nul pour tous les acides aminés cibles mais qu'il correspond au meilleur compromis expérimental possible à obtenir dans nos conditions.

Il est également important de relever qu'à 140°C pendant 3 minutes, les acides aminés difficilement fonctionnalisables, tels que la tyrosine, lysine et proline, n'atteignent pas leur rendement

optimum de fonctionnalisation. Cependant sous ces conditions, tous ces acides peuvent tout de même être observés, alors qu'ils ne l'étaient pas ou que difficilement à des températures inférieures.

Afin d'obtenir le meilleur compromis entre le rendement de fonctionnalisation et l'obtention d'un faible taux de racémisation, les réactions se feront à 140°C durant 3 minutes. En effet, pour les 20 acides aminés du vivant étudiés, ces paramètres de réaction permettent d'obtenir le meilleur compromis entre le rendement de la fonctionnalisation, le nombre d'acides aminés détectables et le pourcentage de racémisation. Une température réactionnelle élevée (140°C) pendant une durée relativement courte permet à la fonctionnalisation de franchir les barrières énergétiques permettant la fonctionnalisation des acides aminés tels que la tyrosine tout en empêchant la dégradation des composés fragiles ainsi que leur racémisation.

Afin de quantifier exactement le taux de racémisation dans nos conditions expérimentales (140°C – 3 min), une étude a été menée pour déterminer pour chaque acide aminé le taux exact de racémisation. Nous avons donc reporté dans le tableau II.2-2 le ratio L/D et l'excès énantiomérique. Le pourcentage d'excès énantiomérique, noté ee, est défini comme suit :

$$ee = 100\,\frac{AA_M - AA_m}{AA_M + AA_m}$$ Équation II.2-1

avec AA_M l'énantiomère majoritaire et AA_m l'énantiomère minoritaire.

Comme on peut l'observer dans le Tableau II.2-2, les produits racémisés ne sont détectés que pour les acides aminés Asx, Pro, Ser et Tyr. Parmi ceux-là, un seul montre une racémisation totale, la tyrosine. Les autres ne sont que partiellement racémisés. Ces racémisations n'étant pas totales, cela ne pose pas de problème pour déterminer l'excès initial, étant donné que le pourcentage de racémisation induit par la méthode est répétable et précisément connu. Il sera donc possible, à partir de la détermination de l'excès final, de remonter à l'excès initial, en connaissant parfaitement le taux de racémisation du composé.

Nous considérons un rapport L/D de 0,94 à 1,06 comme rapport équivalent à un mélange entièrement racémique, théoriquement 1,00. En effet, la moyenne de l'incertitude mesurée sur 4 à 6 des répétitions d'acides aminés pris au hasard est de 0,06. Ainsi, un rapport L/D variant de 0,94 à 1,06 ne pourrait statistiquement pas être différencié d'un mélange racémique, dû au biais analytique. Cette valeur est une moyenne et peut varier d'un acide aminé à l'autre de 2 à 9%.

Tableau II.2-2 : excès énantiomérique et ratio L/D des acides aminés fonctionnalisés séparés. L'écart type a été calculé sur une base de 3 à 7 répétitions selon l'acide aminé. La fonctionnalisation a été effectuée à 140°C durant 3 minutes dans un bain d'huile.

Acide aminé	ee (%)	Rapport L/D	Ecart type
L-Thréonine	100	∞	ND
D-Thréonine	100	0	ND
L-Sérine	40,7	2,43	0,51
D-Sérine	38,6	0,41	0,09
D-Alanine	100	0	ND
L-Alanine	100	∞	ND
D-Valine	100	0	ND
L-Valine	100	∞	ND
L-Proline	43,9	3,22	1,31
D-Proline	45,1	0,38	0,10
D-Acide Aspartique	77,2	0,13	0,01
L-Acide Aspartique	85,3	12,7	1,16
D-Asparagine	55,2	0,29	0,03
L-Asparagine	61,9	4,34	0,91
D-Cysteine	100	0	ND
L-Cysteine	100	∞	ND
D-Phenylalanine	100	0	ND
L-Phenylalanine	100	∞	ND
L-Tyrosine	0	1	ND
D-Tyrosine	0	1	ND

Tentatives d'amélioration des conditions expérimentales

- Racémisation

Au vu des résultats contradictoires de Szopa *et al.* (Szopa *et al.* 2002) et de Luzzana *et al.* (Luzzana *et al.* 1999) sur l'effet que peut avoir la pression d'oxygène sur le taux de racémisation, nous avons effectué une fonctionnalisation des acides aminés dans un environnement sous azote. De même que Luzzana *et al.*, (Luzzana *et al.* 1999) aucun effet significatif n'a pu être relevé quant au pourcentage de racémisation en présence d'oxygène atmosphérique ou en atmosphère réduite en oxygène. Ainsi, ces conditions étant contraignantes et n'apportant aucune amélioration significative, les expériences ont toutes été menées sous atmosphère d'oxygène.

- Rendement

Les ultrasons sont souvent considérés comme un moyen puissant d'accélérer de nombreuses étapes des processus analytiques dans des échantillons liquides (Davis *et al.* 2000). Cette forme d'énergie a déjà été utilisée afin de faciliter et d'accélérer la fonctionnalisation de composés d'intérêt exobiologique (Priego-Lopez *et al.* 2003; Zampolli *et al.* 2007). La fonctionnalisation au DMF-DMA assistée par ultrasons a donc été étudiée. Nous avons alors effectué la fonctionnalisation dans un bain d'eau à ultrasons. Aucune différence significative n'a pu être observée entre le rendement de la réaction avec ou sans assistance aux ultra-sons. Malheureusement, le manque de contrôle de la température de la réaction et l'interdiction de température supérieure à 80°C pour ne pas dégrader les piézo-électriques du bain à ultrasons ne nous a pas permis d'atteindre les rendements obtenus dans nos conditions expérimentales (140°C – 3 min).

Une étape supplémentaire d'extraction au chloroforme subséquente à la fonctionnalisation a été employée avec succès par Zampolli (Zampolli *et al.* 2007). Le même protocole a donc été testé pour une fonctionnalisation au DMF-DMA. Il s'agit d'ajouter au mélange après fonctionnalisation, 200µL de chloroforme et un petit volume (20µL) de solution saturée en NaCl. Après 10 secondes d'agitation puis 2 minutes de décantation, 1µL de la phase chloroformée inférieure est alors injectée dans le chromatographe. Les résultats montrent un rendement significativement inférieur par rapport à une analyse sans cette étape d'extraction. De plus, l'extraction au chloroforme dilue la solution initiale, y augmentant ainsi la limite de détection de cette technique. De plus l'ajout d'étape supplémentaire n'est pas pour faciliter la spatialisation de cette technique.

La dernière technique employée pour tenter d'améliorer le rendement de fonctionnalisation est l'addition d'un solvant en sus du DMF-DMA. En effet, le DMF-DMA, bien que considéré comme un agent-solvant, peut se révéler peu solvatant. Pour cette raison, il peut être nécessaire d'ajouter un solvant tel que la pyridine. Un rapport 3:1 a été utilisé. Cependant, les résultats n'ont pas montré de différence significative dans le rendement de la fonctionnalisation avec ou sans ajout de pyridine lors de la réaction. Cependant, lors de l'analyse d'acides aminés adsorbés sur une matrice solide, l'ajout d'un solvant peut être d'un grand secours pour extraire les composés adsorbés.

Ces trois tentatives d'amélioration du rendement se sont donc révélées inefficaces, excepté pour l'assistance aux ultra-sons, où nous nous sommes confrontés à une limitation technique. Ces améliorations sont cependant généralement des freins à la spatialisation dès qu'il s'agit d'ajouter des étapes supplémentaires à un processus relativement simple et cela d'autant plus lorsque ces étapes n'apportent peu ou pas d'améliorations notables.

II.2.2.e. Séparation chromatographique et résolution des paires énantiomériques

Une fois les conditions de température et de temps de fonctionnalisation choisis nous nous sommes intéressés à la séparation chromatographique des acides aminés et de leurs énantiomères. Nous avons ainsi pu déterminer pour chacun d'entre eux l'ordre d'élution des paires énantiomériques ainsi que leur résolution R.

Séparation chirale

Dans un premier temps, un mélange contenant les 20 acides aminés protéiques a été injecté et séparé selon les conditions chromatographiques et de fonctionnalisation précédemment déterminées comme optimales. Le chromatogramme est représenté en figure II.2-16.

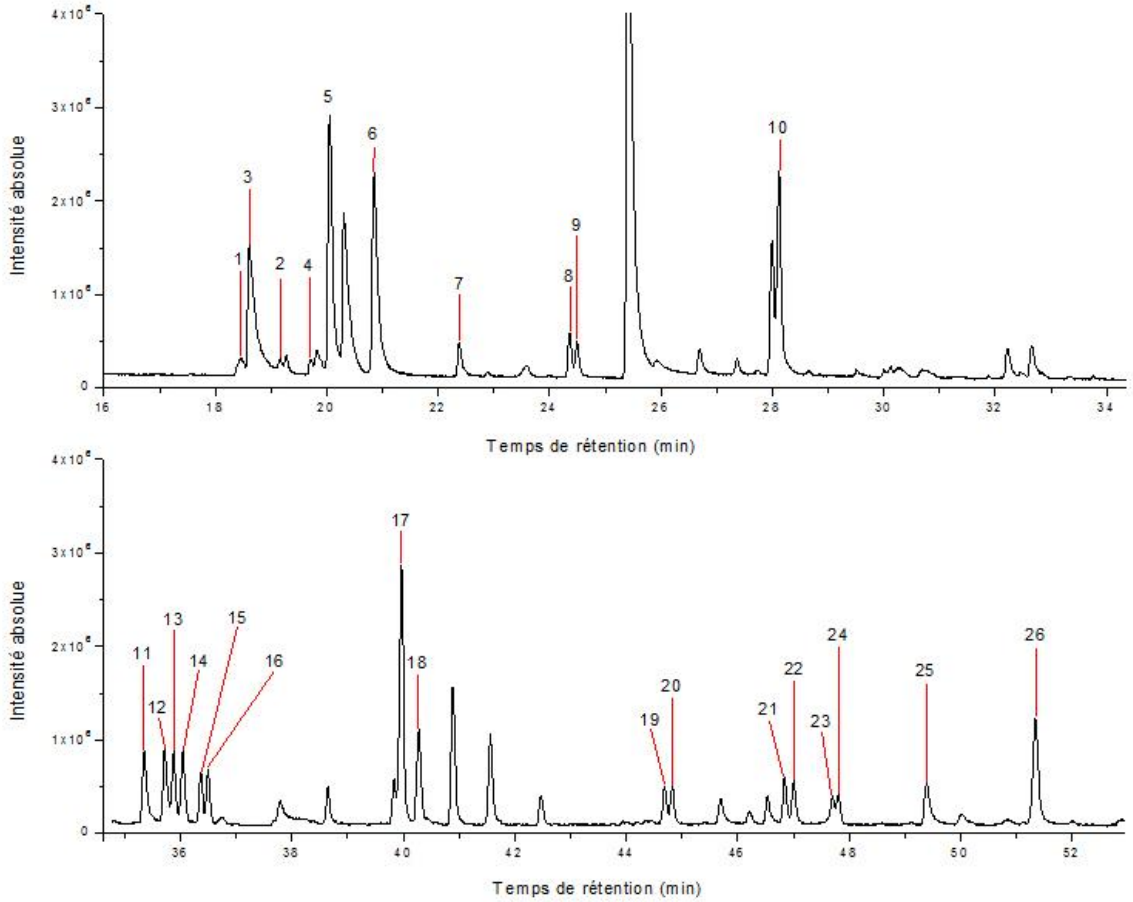


Figure II.2-16 : chromatogramme complet des acides aminés séparés. La fonctionnalisation a eu lieu par 20 µL de DMF-DMA chauffé 3 minutes à 140°C. Injection d'1 µL du mélange. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/80, détecteur 200°C, colonne 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C. Détection en spectrométrie de masse 40 u < m/z < 350 u. La concentration des acides aminés est la même que décrite en Figure II.2-14. 1 : L-Thr, 2 : D-Thr, 3 : L-Ser, 4 : D-Ser, 5 : D-Ala, 6 : L-Ala, 7 : Gly, 8 : D-Val, 9 : L-Val, 10 : D+L-Ile, 11 : L-Pro, 12 : D-Pro, 13 : D-Asp, 14 : L-Asp, 15 : D-Cys, 16 : L-Cys, 17 : D+L-Met, 18 : D+L-Glu, 19 : D-Phe, 20: L-Phe, 21 : D+L-Lys, 22 : D+L-Lys, 23 : D- ou L-Tyr, 24 : L ou D Tyr, 25 : D+L-His, 26 : D+L-Arg.

Cependant, l'étude du mélange d'acides aminés fonctionnalisés soulève un certain nombre de problèmes que nous rappelons brièvement ci-dessous :

- une coélution entre la leucine et l'isoleucine fonctionnalisées. Toutefois, leur spectre de masse respectif diffère légèrement entre l'un et l'autre de ces deux acides aminés fonctionnalisés. Les rapports m/z restent les mêmes, mais les proportions relatives des fragments détectés sont différents. Cela trouve aisément une explication par le fait que certaines liaisons seront plus facilement cassées sous l'impact électronique selon la disposition des groupements CH_3 sur la chaîne latérale.
- une coélution entre l'énantiomère L de la cystéine et le méthyl laurate, l'étalon interne. Les spectres de masse différents de ces deux composés permettent leur résolution en spectrométrie de masse, ainsi qu'une quantification en mode SIM lors de l'analyse.
- une désamidation de la glutamine et de l'asparagine en acide glutamique et acide aspartique. Nous nommerons alors l'un ou l'autre des composés Glu et Gln par Glx, et le couple Asn/Asp par Asx.
- une absence de détection du tryptophane, l'acide aminé le plus lourd de notre échantillon. Puisqu'aucune indication n'est en faveur d'une absence de fonctionnalisation de ce composé, il est probable que cette absence vienne de la technique chromatographique elle même. Ce composé aromatique, hydrophobe et apolaire ayant une chaîne latérale comportant un hétérocycle indole semble nécessiter une température d'élution supérieure à la température limite (200°C) utilisable avec ce type de colonne chirale.

Afin de déterminer l'ordre d'élution entre les formes L et D de chaque acide aminé, un mélange constitué de la forme homochirale L puis D est injecté. On constate alors que les acides aminés suivants sont bien séparés : Thr, Ser, Ala, Val, Pro, Cys, Asx, Phe et Tyr. La thréonine et l'isoleucine sont les deux acides aminés présentant deux carbones asymétriques, donc deux centres de chiralité. Cette propriété confère à ces composés quatre formes énantiomériques différentes. Ces quatre formes devraient correspondre à 4 pics distincts sur le chromatogramme ayant le même spectre de masse.

Pour l'isoleucine, nous n'observons pas quatre pics chromatographiques correspondant aux quatre isomères mais uniquement deux pics correspondant aux deux diastéréoisomères de l'isoleucine (R,R et S,S) et de l'alloisoleucine (R,S et S,R). L'arginine, dû à la faible réactivité de son résidu guanidine, n'est que difficilement détectée. La détection et l'identification des Glx et Asx est difficile, puisque comme nous l'avons déjà relevé les acides Gln et Asn sont convertis en Glu et Asp par déamidation durant la phase de fonctionnalisation. Cependant, les spectres de masse observés pour l'Asn et l'Asp sont légèrement différents, ainsi que le sont ceux des Glu et Gln. Le composé issu de la déamidation des Gln et Asn semble donc être légèrement différent des Asp et Glu, permettant ainsi par une analyse des spectres de masse de les différencier sans grande difficulté. Ainsi, l'acide aminé Asx présente également une séparation chirale, ce qui implique que les Asn et Asp peuvent être résolus.

En définitif, si on omet la glycine qui ne présente pas de centre de chiralité, tous les acides aminés excepté le tryptophane sont détectés, et 10 des 18 acides aminés détectés sont séparés chiralement en une analyse à partir du mélange des 20 acides aminés cibles.

En résumé, parmi tous les acides aminés détectés, la méthode que nous proposons permet donc de séparer sans ambigüité les énantiomères de la thréonine, sérine, alanine, valine, proline, acide aspartique, asparagine, cystéine, phénylalanine et tyrosine. Cette séparation chirale est d'autant plus intéressante que l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique, l'alanine, la valine et la glycine sont des composés qui ont déjà été détectés dans des micrométéorites (Glavin *et al.* 2004). Il convient maintenant de caractériser cette séparation énantiomérique d'un point de vue thermodynamique.

Résolution chromatographique

La résolution chromatographique permet la mesure la qualité de la séparation. Nous avons donc, pour chacun des acides aminés, déterminé la résolution comme suit :

$$R_s = 2\frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$ Équation II.2-2

avec ω la largeur du pic à sa base, et t_r les temps de rétention des composés.

Les R_s ont été calculés pour les produits dont nous obtenons une séparation chirale, et sont reportés dans le tableau II.2-3.

Tableau II.2-3 : ordre d'élution des énantiomères des 10 acides aminés séparés, et résolution.

Acide aminé	Ordre d'élution	Rs
Thréonine	L D	4.73
Sérine	L D	6.36
Alanine	D L	6.59
Valine	D L	0.83
Proline	L D	1.67
Acide aspartique	D L	0.97
Asparagine	D L	0.85
Cystéine	D L	0.60
Phénylalanine	D L	0.84
Tyrosine	ND*	0.70

* racémisation totale

L'ordre d'élution des deux formes spéculaires a pu être déterminé en injectant les formes L et D indépendamment. Pour la thréonine, sérine et proline, la forme L est éluée avant la forme D sur cette colonne et dans ces conditions. L'ordre inverse est observé expérimentalement pour la majorité des autres acides aminés séparés, à savoir l'alanine, la valine, l'acide aspartique, l'asparagine, la cystéine et la phénylalanine, où la forme D est éluée plus rapidement que son opposé optique L. L'isoleucine, la leucine, la méthionine, la glutamine, l'acide glutamique, l'histidine et l'arginine ne sont pas séparées de leur molécule miroir, les deux formes étant parfaitement coéluées.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la tyrosine est un cas particulier, dans le sens où quelle que soit la forme injectée D ou L, les deux pics sont visibles à aire égale. Il semble alors qu'une racémisation totale de cet acide aminé ait lieu dans les conditions de l'expérience. Le fait est que la tyrosine, lorsqu'elle est visible, ne l'est que sous forme racémique, quelles que soient les conditions utilisées. Il est par conséquent impossible d'en identifier la forme D ou L.

Aucune relation claire n'a pu être établie entre les propriétés physico-chimiques des acides aminés (polarité, température d'ébullition, poids moléculaire, taille de la chaine latérale, acidité etc.) et les caractéristiques chromatographiques (temps de rétention, ordre d'élution, aire du pic réponse *etc.*). Cela peut s'expliquer par une multitude de paramètres impliqués dans la séparation chromatographique, qui agissent à différents niveaux du soluté, des phases stationnaire et mobile, et qui restent difficilement interprétables. Cependant, nous avons pu déterminer ces paramètres expérimentalement, ce qui permet une identification précise des composés.

II.2.2.f. Etudes quantitatives

Une étude quantitative va tout d'abord nous permettre d'établir un rapport direct entre l'aire des pics chromatographiques et la concentration de l'acide aminé correspondant. Ainsi pour un mélange inconnu il sera aisé de déterminer la concentration de chaque acide aminé étudié ici. Puis nous déterminerons les limites de détection et de quantification de chacun des acides aminés détectés.

Pour une analyse quantitative, nous utilisons la même méthode déjà détaillée dans la première partie. En utilisant les conditions chromatographiques et de fonctionnalisation précédemment choisies, une courbe de calibration a donc été tracée avec une solution standard de chacun des acides aminés fonctionnalisés. L'échelle de concentration étudiée s'étale de 0,3 pmol à 2,3 nmol, et cela pour chaque acide aminé cible. La linéarité de la réponse chromatographique a été vérifiée.

La solution mère de chacun des acides aminés a été préparée à une concentration de 10^{-1} mol.L^{-1}. 1 µL de la solution mère (correspondant à 10^{-7} mol) est évaporée sous un flux constant d'azote jusqu'à assèchement total avant l'introduction du solvant de fonctionnalisation. La réaction de

fonctionnalisation est réalisée par ajout de 20 µL de DMF-DMA sur le résidu sec. Le mélange est alors porté à 140°C durant 3 min, et 1 µL de solution étalon est ajouté *a posteriori*. La solution finale injectée dans le CPG-SM a donc une concentration de $4{,}8.10^{-3}$ mol.L^{-1}.

Afin d'évaluer les limites de détection de la technique analytique développée, la solution initiale a été diluée jusqu'à ce qu'aucun signal ne soit plus détecté.

Linéarité – Courbe de calibration

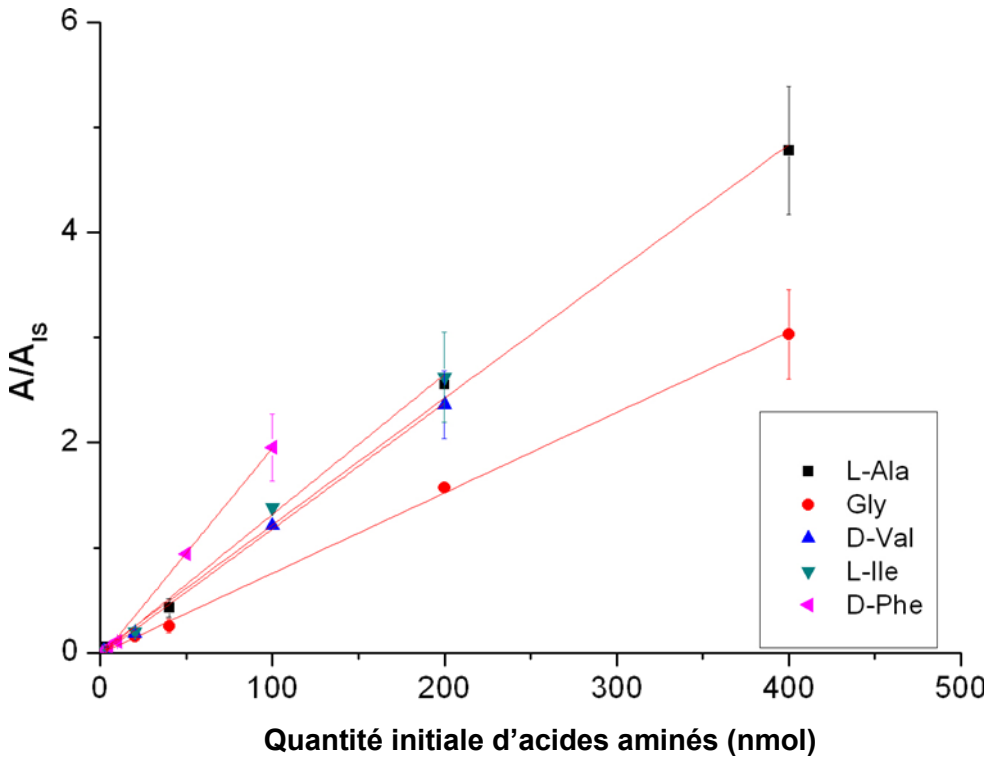


Figure II.2-17 : courbes d'étalonnage de la glycine, la L-alanine, la D-valine, la L-isoleucine et la D-phénylalanine. La réponse chromatographique correspond à l'aire du pic rapportée à l'aire de l'étalon interne, elle est tracée en fonction de la quantité initiale d'acides aminés de l'échantillon en nmol.

Une série de 5 concentrations croissantes d'acides aminés fonctionnalisés (quantité initiale de 12 à 288 nmol, quantité injectée équivalente à 5-120 pmol) a été utilisée pour cette étude. Afin d'obtenir une courbe de calibration pour chacun des acides aminés, l'aire du pic de chaque soluté, obtenue en mode TIC, est reportée sur un graphe en fonction de la quantité d'acide aminé injecté calculée. Chaque point de la courbe de calibration représente la valeur moyenne d'au moins trois réplicats. Une régression linéaire est ensuite appliquée aux points reportés sur le graphe (Figure II.2-17). Les paramètres de cette régression linéaire sont reportés dans le tableau II.2-4. La linéarité de la réponse chromatographique en fonction de la quantité d'acides aminés fonctionnalisés injectée est notamment attestée par les valeurs des coefficients de corrélation R^2 tous supérieurs à 0,92, avec

pour une grande majorité supérieur à 0,99, ce qui va nous permettre d'inférer les limites de détection et de quantification des composés.

Tableau II.2-4 : la quantité initiale, l'équivalent en quantité injectée dans le CPG, l'équation de régression linéaire de la droite d'étalonnage et son R^2 sont représentés pour chaque énantiomère des acides aminés.

Acide aminé	Quantité initiale (nmol)	Quantité injectée (pmol)	Régression linéaire	R^2
D-Ala	2-800	1.1-460	Y = 0,51893x - 0,06266	0,998
L-Ala	2-800	1.1-460	Y = 0,27684x - 0,02633	0,999
Gly	2-800	1.1-460	Y = 0,29966x + 0,00569	0,999
D-Val	1-400	0.6-220	Y = 0,26205x - 0,06192	0,997
L-Val	1-400	0.6-220	Y = 0,25717x - 0,06424	0,997
Ile	1-400	0.6-220	Y = 0,30053x - 0,08292	0,996
L-Pro	10-4000	5.7-2280	Y = 0,3175x - 0,09295	0,988
D-Pro	10-4000	5.7-2280	Y = 0,28725x - 0,05132	0,991
D-Asp	1-400	0.6-220	Y = 0,17784x + 0,01751	0,995
L-Asp	1-400	0.6-220	Y = 0,1926x - 0,0228	0,999
D-Phe	0.5-200	0.3-100	Y = 0,21815x - 0,07822	0,997
L-Phe	0.5-200	0.3-100	Y = 0,19868x - 0,06207	0,998
L-Thr	3-1200	1.7–680	Y = 0,04324x + 0,04853	0,951
D-Thr	3-1200	1.7–680	Y = 0,04544x + 0,05349	0,955
L-Ser	5-2000	2.8–1140	Y = 0,11878x - 0,00322	0,999
D-Ser	5-2000	2.8–1140	Y = 0,01648x + 0,02357	0,926

Limites de détection et limites de quantification

La détermination des limites de détection et de quantification permettra notamment de prévoir la quantité minimale d'acides aminés cibles susceptibles d'être détectés et analysés dans un échantillon. Comme lors de l'étude quantitative précédente (paragraphe II.1.3.f), la limite de détection X_{LOD} est déterminée en fonction de la concentration de l'analyte, aboutissant à la valeur du signal suivant : $Y_{LOD} = y_b + 6\sigma_b$, avec y_b la moyenne de l'aire de 10 blancs.

Pour chacun des acides aminés testés, la limite de détection théorique de la méthode a été déterminée comme étant comprise dans une échelle de concentration de 80 ppb à 1,3 ppm selon l'acide aminé étudié. Les résultats sont reportés dans le tableau II.2-5. Les limites de détection théoriques ont été comparées aux limites de détection expérimentales, qui consistent en une dilution et détection du fonctionnalisat de l'acide aminé jusqu'à un rapport signal/bruit compris entre 3 et 7 (Tableau II.2-5).

Tableau II.2-5 : limites de détection et de quantification théoriques extrapolées à partir de la courbe d'étalonnage des acides aminés. La limite de détection expérimentale est également reportée, correspondant à un rapport signal/bruit compris entre 3 et 7.

Acide aminé	LOD*	LOQ*	LOD expérimentale 3 < S/N < 10	
			pmol	ppm
D-Ala	0,6	2,0	2,3	0,18
L-Ala	1,2	3,8	2,3	0,18
Gly	1,1	3,6	2,3	0,15
D-Val	0,6	2,0	1,1	0,12
L-Val	0,6	2,1	1,1	0,12
Ile	0,5	1,8	1,1	0,13
L-Pro	4,8	16,2	11,4	1,3
D-Pro	5,4	17,9	11,4	1,3
D-Asp	0,9	9,0	1,1	130
L-Asp	0,8	2,8	1,1	130
D-Phe	0,4	1,2	0,5	0,08
L-Phe	0,4	1,3	0,5	0,08
L-Thr	11,6	38,6	3,4	0,36
D-Thr	10,8	36,0	3,4	0,36
L-Ser	6,7	22,4	5,7	0,6
D-Ser	49,8	166,1	5,7	0,6

* = en pmol injectés

Mode Single Ion Monitoring (SIM)

Afin d'améliorer les limites de détection et de quantification, il est possible d'utiliser le spectromètre de masse en mode SIM. Contrairement au mode SCAN qui balaye toutes les masses m/z dans l'échelle de masse choisie, le mode SIM permet de ne balayer que les masses sélectionnées au préalable. Ainsi il est possible de ne se focaliser que sur les masses m/z représentatives des acides aminés ciblés. Ainsi en mode SIM une sensibilité supérieure d'un facteur 10 est souvent observée comparé au mode SCAN. Cependant, cette méthode nécessite une analyse individuelle, ou un « run », pour chaque composé ciblé, ce qui ralentit le temps d'analyse global. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas utilisé le mode SIM pour cette étude.

II.2.3. Conclusion

Le DMF-DMA est donc ici l'agent de fonctionnalisation approprié : simple, efficace, universel, de faible poids moléculaire, protégeant les centres chiraux des molécules sur lesquelles il agit. Il reste cependant une propriété important à déterminer qui est cruciale pour une utilisation dans les conditions spatiales : sa stabilité à la température et dans le temps.

II.3. Stabilité du DMF-DMA

Nous savons déjà que le DMF-DMA est un produit relativement stable à des températures inférieures à 30°C pendant des durées allant jusqu'à plusieurs mois. Cependant, et en vue de sa spatialisation, une étude approfondie de ses limites d'utilisation doit être envisagée. En effet, durant un probable voyage vers la planète Mars le DMF-DMA sera amené à subir des écarts de température plus ou moins importants. Néanmoins la température maximale que verra le réactif de fonctionnalisation sera inférieure à 100°C. Le voyage n'est donc pas une phase critique pour le DMF-DMA. Ce qui peut l'être sera la phase de stérilisation de l'ensemble de l'expérience avant son envol. Cette phase de stérilisation est en effet essentielle pour éliminer toute trace de contamination chimique et surtout biologique des expériences réalisées *in situ*. Sur les missions Mars Science Laboratory et Exomars, cette stérilisation sera très certainement réalisée par chauffage entre 110°C et 125°C sur des périodes de temps pouvant aller de quelques minutes pour les températures les plus élevées à plusieurs heures pour les températures les plus faibles (Tableau II.3-1).

Tableau II.3-1 : spécifications de durée de stérilisation en fonction de la température et du type de matériel.

	Température			
	110°C	115°C	120°C	125°C
Matériel de surface	32 h	18 h	11 h	6 h
Matériel encapsulé	156 h	90 h	52 h	30 h

Nous avons alors entrepris de tester la résistance à la température du DMF-DMA et par conséquent de ses propriétés de fonctionnalisation dans une gamme de température comprise entre 100 à 200°C.

Nous avons utilisé pour cela une solution standard d'acides aminés composée d'alanine, de valine et d'isoleucine, l'objectif étant de vérifier l'efficacité du DMF-DMA sur la fonctionnalisation de ces acides aminés. Si le DMF-DMA est dégradé par le chauffage, alors le rendement relatif de fonctionnalisation devrait diminuer. Afin de pouvoir comparer les différentes expériences entre elles et faire une étude quantitative, le méthyl laurate est utilisé comme étalon interne.

II.3.1. Mode opératoire

Afin de tester la résistance du DMF-DMA à la température nous avons placé ce dernier dans des flacons en verre opaque à raison de 80 µL par flacon. Ces derniers ont ensuite été scellés hermétiquement avant d'être portés à la température choisie dans un four régulé précisément, et cela pour des durées croissantes allant de 1h à 24 h. La solution d'acides aminés est préparée à partir de standards pur d'alanine, valine et isoleucine (Fluka, France). La concentration respective de chacun des acides aminés en solution est de 5.10^{-2} mol.L^{-1}. La solution d'étalon interne utilisée est le méthyl laurate dilué dans de l'acétate d'éthyle à la concentration exacte de 10^{-2} mol.L^{-1}.

Une fois le DMF-DMA porté à la température souhaitée durant un temps donné, 20 µL de cette dernière sont ajoutés à 30 µL de la solution d'acides aminés préalablement évaporée sous flux d'azote. Le mélange est alors chauffé à 140°C pendant 3 min, et 1 µL de la solution d'étalon interne est ajouté. 1 µL de cette solution est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse. Pour chaque point au minimum 3 réplicats sont réalisés.

II.3.2. Résultats et discussion

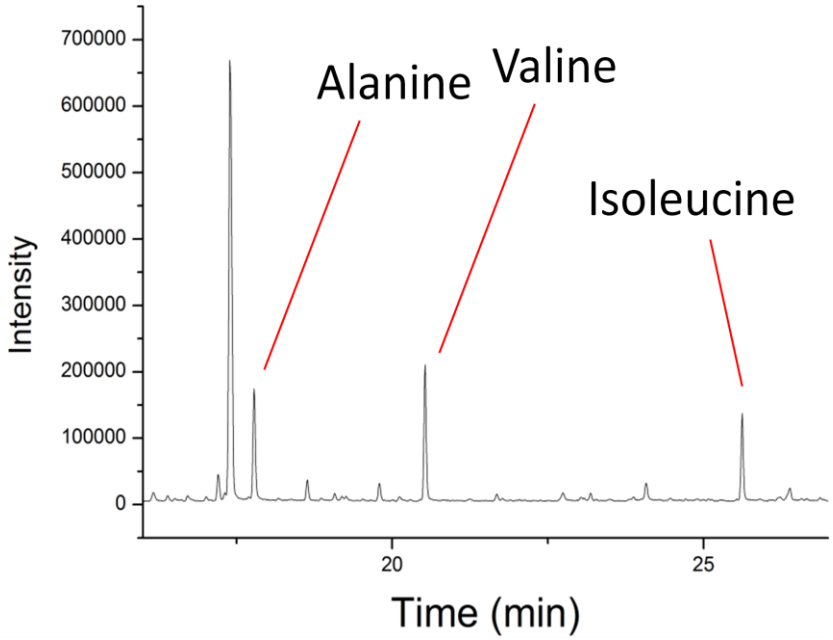


Figure II.3-1 : séparation chromatographique de l'alanine, valine et isoleucine. Colonne Chirasil-Dex. Conditions chromatographiques : 70 à 190°C avec un gradient de température de 3°C.min^{-1}

L'aire des pics chromatographiques résultants (Figure II.3-1) est intégrée, et nous avons reporté sur la figure II.3-2 le rapport entre l'aire du pic étalon et l'aire du pic de l'acide aminé fonctionnalisé, en fonction de la température et de la durée d'exposition préalable du DMF-DMA à cette température.

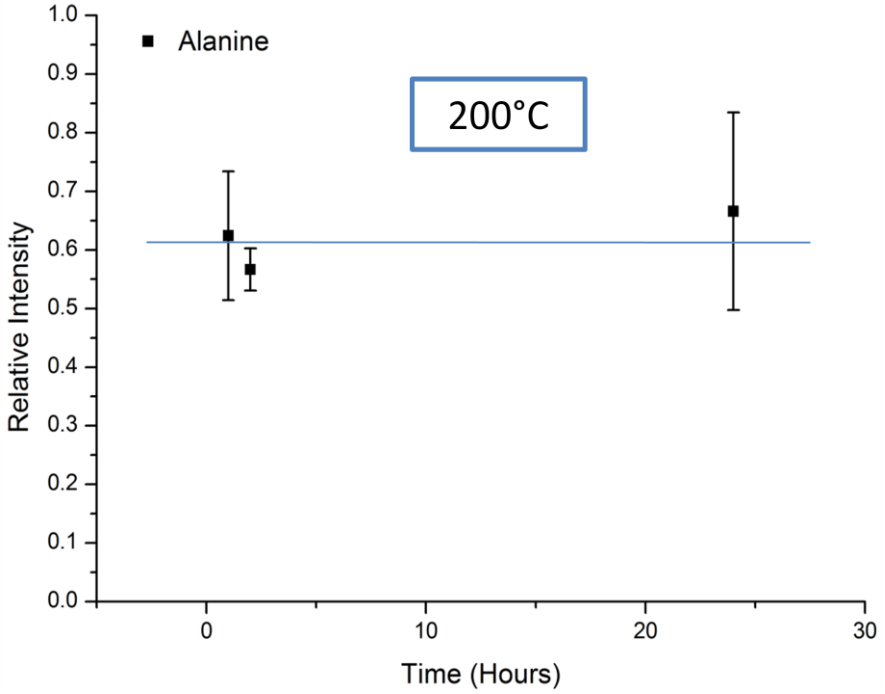


Figure II.3-2 : rapport de l'aire du pic de l'alanine sur celle du methyl laurate après exposition du DMF-DMA à 200°C pendant des durées variant de 1 à 24h. 3 réplicats ont permis d'évaluer l'erreur liée à la répétabilité.

II.3.3. Conclusion

Même si nous pouvons observer une dégradation de l'agent de fonctionnalisation lorsque ce dernier est longuement exposé à des températures élevées (200°C), son pouvoir de fonctionnalisation reste intact et le chromatogramme des 3 acides aminés observés après fonctionnalisation reste sensiblement le même pour du DMF-DMA chauffé ou du DMF-DMA non chauffé. La résistance de ce dernier est donc attestée pour les températures requises lors d'une analyse spatiale.

II.4. Les autres composés d'intérêt exobiologique

Comme il a été discuté dans le premier chapitre, certaines macromolécules présentent plus d'intérêt que d'autres dans la recherche de traces de vie. C'est le cas des acides aminés, des acides carboxyliques et des acides nucléiques. Les études précédentes ont été menées sur les acides aminés que l'on retrouve dans les protéines du vivant. Or, ces 20 acides aminés ne sont qu'une portion des acides aminés d'intérêt. En effet, 74 acides aminés ont déjà été détectés dans les météorites. Or, même si la détection d'acides aminés protéiniques sur Mars serait une première pour l'exobiologie, il n'en est pas moins vrai que la détection d'autres molécules d'intérêt exobiologique permettrait une grande avancée notamment dans la compréhension de la chimie martienne. En effet, si l'on s'intéresse à l'apport extraterrestre de matériel organique, les météorites comporteraient alors

des composés qualitativement similaires à ceux que l'on pourrait retrouver sur Mars. Par exemple l'acide aminé prédominant dans ces météorites est souvent l'acide aminoisobutyrique (AIB). L'intérêt de sa détection est grand, même si ce composé ne présente pas d'énantiomérie. Nous avons alors également choisi d'autres composés organiques tels que des acides aminés non protéiniques, des acides carboxyliques et des bases nucléiques détectés dans des météorites martiennes.

II.4.1. Les acides aminés non protéiniques

En complément des 20 acides aminés du vivant, nous avons donc également caractérisé six autres acides aminés : l'acide aminoisobutyrique (AIB), l'acide D- et L-aminobutyrique, D- et L-norvaline, D- et L alloisoleucine et D- et L-norleucine.

Comme pour les 20 acides aminés protéiniques nous avons détaillé dans le tableau II.4-1 ci-dessous les temps de rétention de chaque composé séparé ainsi que les principaux fragments m/z de leur spectre de masse.

Tableau II.4-1 : caractéristiques chromatographiques d'autres acides aminés fonctionnalisés par 20 µL de DMF-DMA 3 minutes à 140°C. Parmi ces acides aminés se retrouvent ceux détectés sur les météorites. Les temps de rétention sont indiqués en minutes sur la colonne chromatogphique chirale Chirasil-Dex. Les m/z principaux des spectres de masse des composés fonctionnalisés sont indiqués avec leurs intensités relatives.

Acide aminé	Temps de rétention (min)	Spectre de masse (m/z) en u et intensités relatives
AIB	19.2	113(100)-44(90)-72(24)-97(6)-172(5)-157(4)
Acide D-aminobutyrique	23.1	44(100)-113(61)-42(22)-43(18)-143(7)-172(5)
Acide L-aminobutyrique	23.5	44(100)-113(61)-42(22)-43(18)-143(7)-172(5)
DL-Norvaline	26.4	44(100)-127(58)-142(24)-42(24)-57(14)-143(11)
DL-Alloisoleucine	27.9	44(100)-143(69)-141(35)-42(26)-156(24)-73(19)
DL-Norleucine	30.4	44(100)-141(59)-156(32)-143(12)-85(9)-57(8)

Parmi les acides aminés non protéiniques étudiés, seul l'acide aminobutyrique a pu être séparé selon ses inverses optiques. La norvaline, l'alloisoleucine et la norleucine, bien que chiraux, ne peuvent être résolus par la méthode de fonctionnalisation et d'analyse utilisée.

II.4.2. Les acides carboxyliques

Parmi les autres composés à étudier, les acides carboxyliques possèdent un intérêt particulier, puisqu'ils sont considérés selon la théorie de Benner (Benner *et al.* 2000) comme les produits stables de dégradation des alcanes, alcools, esters, cétones... et comme particulièrement résistants face aux différents types de dégradation. Ils sont alors de bons candidats à rechercher *in situ*, notamment sur et dans le sol martien. Les acides carboxyliques choisis pour l'étude présentent plusieurs intérêts :

- ils sont d'intérêt exobiologique, puisque d'après Benner, la dégradation des alcanes produiraient des acides acétiques, celle du naphtalène et autres PAH de l'acide phthalique, benzène-tricarboxylique et benzène-hexacarboxylique (mellitique), et celle des acides carboxyliques polyfonctionnels de l'acide oxalique.
- Certains sont étudiés au laboratoire vis-à-vis de leur dégradation sous influence des conditions ionisantes et oxydantes supposées à la surface de Mars.
- L'un d'entre eux (l'acide méthylsuccinique) présente une chiralité.

Dix acides carboxyliques ont donc également été caractérisés : l'acide 1,2,4-benzène-tricaboxylique, l'acide propionique, l'acide butyrique, l'acide succinique, l'acide oxalique, l'acide acétique, l'acide formique, l'acide glycolique, l'acide valérique et l'acide méthylsuccinique.

Tableau II.4-2 : caractéristiques chromatographiques d'autres acides carboxyliques fonctionnalisés au DMF-DMA ; leurs temps de rétention sur la colonne chromatographique Chirasil-Dex ainsi que leurs fragments principaux en spectrométrie de masse sont reportés.

Acide carboxylique	Temps de rétention (min)	Spectre de masse (m/z) en u et intensités relatives
Acide 1,2,4-benzène-tricarboxylique	50.3	221(100)-222(12)-75(6)-252(6)-103(5)-193(5)
Acide propionique	12.4	44(100)-45(50)-101(33)-72(32)-57(28)-88(3)
Acide butyrique	15.9	44(100)-45(98)-43(74)-72(41)-87(33)-115(25)-58(13)-100(11)
Acide succinique	16.7	115(100)-55(93)-59(63)-114(30)-87(22)-45(13)
Acide oxalique	18.0	85(100)-200(57)-185(36)-40(31)-44(30)-101(30)-113(24)-58(21)
Acide acétique	18.7	58(100)-42(17)-43(14)-59(6)-130(2)-73(2)
Acide formique	18.8	58(100)-44(17)-42(14)-40(10)-59(4)-130(2)
Acide glycolique	19.6	88(100)-73(41)-44(40)-45(40)-133(30)-146(27)
Acide valérique	22.5	70(100)-43(85)-85(83)-103(74)-57(69)-55(54)-115(4)-130(4)
Acide méthylsuccinique	22,2 – 25,2	72(100)-59-129-142-173-114-101-100

Comme observé dans le tableau II.4-2, la majorité des acides carboxyliques étudiés étant de poids moléculaires relativement faibles, ils peuvent être facilement séparés et détectés grâce à notre technique de fonctionnalisation au DMF-DMA et notre technique d'analyse CPG-SM. Seul l'acide mellitique, qui possède un poids moléculaire plus élevé, n'a pas pu être détecté. L'acide méthylsuccinique, présentant une chiralité, peut être différencié selon ses deux énantiomères.

II.4.3. Les bases nucléiques

Enfin, les acides nucléiques sont également intéressants, en tant que monomères de l'ADN. Les bases nucléiques seules, bien qu'intéressantes en soi, ne possèdent pas de chiralité, même si il a été supposé qu'elles pouvaient différer (voire être différenciées) selon que le plan de la base soit tourné vers l'ose (conformation syn) ou vers l'extérieur (conformation anti), par rotation autour de la liaison N-osidique.

Cependant, les nucléosides, ces glycosylamides, bases azotées liées à un cycle ribose ou désoxyribose, vont présenter d'une part un intérêt biologique important, et d'autre part une chiralité, le ribose ou désoxyribose pouvant être D ou L. Dans les systèmes vivants, les monomères de l'ADN et de l'ARN ne seront composés que de sucres D.

Enfin, les nucléotides vont présenter un intérêt particulier, en tant que vrais monomères de l'ADN. Ils peuvent résulter d'une dégradation de l'ADN ou d'une synthèse *ab initio*, et sont des nucléosides liés à un (mono-), deux (di-) ou trois (tri-) groupements phosphates. Un de ces nucléotides particuliers, celui constitué de la base T, est la molécule support de l'énergie dans les systèmes vivants. Il s'agit de l'ATP, ou adénosine-tri-phosphate, que nous avons déjà évoqué précédemment. Sa détection est donc d'autant plus intéressante qu'elle a une double signification biotique.

Les bases nucléiques sont différenciées en bases puriques (adénine, guanine, hypoxanthine) et pyrimidiques (thymine, uracile, cytosine). Les nucléosides en résultant sont l'adénosine, l'uridine, la guanosine, la cytidine et la thymidine, alors que les nucléotides seront nommés par la nomenclature du nucléoside suivi du nombre de phosphates (Figure II.4-1).

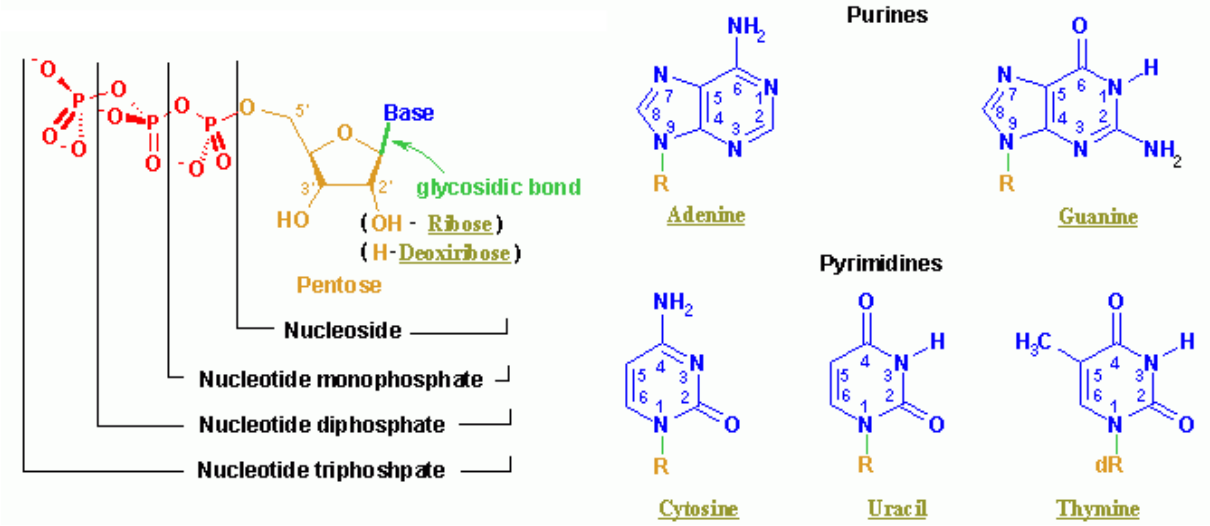


Figure II.4-1 : représentation des bases nucléiques composant l'ADN et l'ARN. A gauche, la dénomination générique des acides nucléiques en fonction de l'association de la base au ribose et aux phosphates.

Tableau II.4-3 : caractéristiques chromatographiques des acides nucléiques fonctionnalisés au DMF-DMA : leur temps de rétention sur la colonne Chirasil-Dex, leurs fragments principaux en spectrométrie de masse de ces derniers.

Acide nucléique	Temps de rétention (min)	Spectre de masse (m/z) en u
Uracile	30,6	42 – 55 – 140 – 82 – 82
Thymine	31,6	154 – 68 – 69 – 42 – 97 – 96 – 155
Cytosine	39,83	180 – 124 – 165 – 110 – 95 – 109 – 179 – 44
Guanine	45,09	194 – 109 – 55 – 67 – 42 – 82
Cytidine	39,83	180 – 124 – 165 – 110 – 95 – 109 – 179 – 44
Xanthine	41,4	194 – 109 – 193 – 195
Hypoxanthine	36,6	164 – 163 – 135 – 107 – 134 – 79

Il est cependant intéressant de remarquer que le temps de rétention ainsi que le spectre de masse de la cytidine sont similaires à celui de la base associée, la cytosine. Cependant, il a été observé, sur le chromatogramme de la cytidine, un nombre plus important de pics aux alentours du pic principal. Ces pics pourraient être caractéristiques de la fragmentation du nucléoside en son sucre et sa base. Nous pouvons alors penser en extrapolant qu'une déphosphorylation de la cytidine phosphate pourrait conduire à des pics caractéristiques autour du pic de la cytosine. S'il en est de même pour chacun des acides nucléiques, leur détection permettrait de différencier entre les bases, les nucléosides ou les nucléotides, afin de déterminer le niveau de complexité de la molécule. L'adénine, son nucléoside adénosine et son nucléotide triphosphate associé (ATP) n'ont malheureusement pas pu être détectés. Si nous considérons le même phénomène que pour la cytosine/cytidine, une analyse très détaillée du chromatogramme et des spectres de masse de l'adénine devrait être réalisée, afin d'espérer pouvoir repérer sur les échantillons de sol la molécule universellement impliquée dans les systèmes énergétiques vivants, l'ATP.

Nous avons pu montrer par cette dernière expérience une propriété importante et essentielle de la fonctionnalisation au DMF-DMA : son universalité envers de nombreuses molécules d'intérêt exobiologique. En une seule analyse, des acides aminés protéiques et non protéiques, des acides carboxyliques de différents poids moléculaires et des acides nucléiques peuvent être séparés et analysés. Cette universalité est importante pour une analyse spatiale lors de laquelle les cibles ne sont pas précisément connues. Le DMF-DMA se conforte donc en tant qu'agent de fonctionnalisation optimal : simple, efficace, universel, de faible poids moléculaire et protégeant les centres chiraux des molécules sur lesquelles il agit.

II.5. Pertinence de ces valeurs par rapport aux valeurs attendues sur Mars

Nous avons déjà précisé dans le chapitre bibliographique que des composés organiques sont apportés continûment sur Mars comme sur Terre par le flux météoritique, micrométéoritique et cométaire permanent. Ce flux carboné dépend du flux de matière interstellaire déposé, ainsi que des concentrations en matière carbonée de ces corps.

Les comètes peuvent contenir jusqu'à 20% en masse de matière organique carbonée, les météoritiques de type CM (qui représentent 2% des météorites totales) contiennent 5% (w/w) de matière organique carbonée (dont 1 % de cette matière sont des acides aminés), et les micrométéorites carbonées (80% des micrométéorites) contiennent jusqu'à 2% de matière organique carbonée. Or il est important de remarquer ici que l'ordre de grandeur de la limite de détection obtenue pour le développement de notre technique d'analyse semble compatible avec les concentrations de ces mêmes molécules retrouvées dans les micrométéorites (de 100 ppb à 100 ppm pour chaque acide aminé) ou sur les météorites (de 4 à 60 ppm pour tous les acides aminés). D'après le flux météoritique supposé sur Mars, il est donc possible d'estimer que 1 ppb à 250 ppm de chaque acide aminé pourraient être présents à la surface de la planète. Si ces calculs se révèlent corrects (il existe différents paramètres qui pourraient les fausser, ou d'autres paramètres qui n'ont pas été pris en compte), il est alors possible d'utiliser la réaction de fonctionnalisation au DMF-DMA sous les conditions analytiques que nous avons déterminées pour analyser ces molécules *in situ*. L'instrument et la méthode seraient alors suffisamment sensibles pour détecter et séparer les énantiomères des acides aminés éventuellement présents à la surface de Mars.

Cependant nous allons étudier plus en détail les différents apports de matière carbonée exogène (les micrométéorites, les météorites, les comètes et la poussière interstellaire) et endogène sur Mars.

II.5.1. Les sources exogènes

II.5.1.a. Les micrométéorites

Les micrométéorites de 10^{-14} à 10^{6} g représentent environ 20% de l'influx exogène sur Terre, mais quasiment la totalité des apports de matière organique (Anders 1989; Flynn *et al.* 1990; Maurette 1998). En effet, presque 80% des apports de matière exogène le sont par des objets de 10^{8} à 10^{18} g, dont la taille, et par conséquent la puissance de l'impact, est incompatible avec la survie du matériel organique.

Sur Terre, l'apport de cette gamme de taille 10^{-14} à 10^{6} g est évaluée à 16100 T.an^{-1} d'après les observations à court terme. Les observations sur le long terme l'évaluent à 78000 T.an^{-1} (Figure II.5-1). Le ratio des collisions entre Mars et la Terre est évalué entre 0,75 et 0,17. En prenant les valeurs extrêmes, l'extrapolation au flux martien est donc de 2700 à 59000 tonnes par an.

Cependant, seule une gamme intermédiaire va nous intéresser quant à son contenu en matière organique carbonée. Les molécules présentes sur les micrométéorites trop petites (<10^{-12}g) sont trop sujettes à destruction par les UV atmosphériques. La résistance à la décélération dans l'atmosphère augmente avec la taille de la micrométéorite, entraînant un échauffement par frottement atmosphérique ainsi que par l'impact. La température critique pour la dépose de matériel organique correspond à la température moyenne de pyrolyse du matériel carboné, soit 600°C (environ 900K). Les micrométéorites qui ne dépassent pas cette température sont alors les seules considérées comme capables de déposer leur matériel organique. Sur Terre, la limite supérieure de taille acceptable est égale à environ 10^{-6} g, soit une centaine de µm de diamètre. Or, sur Mars, la plus faible gravité et donc l'accélération moins forte des particules permettra aux micrométéorites d'une taille de 700 µm d'avoir un échauffement similaire à celui de micrométéorites d'une taille de 100 µm sur Terre. La gamme des micrométéorites qui nous intéressera alors vis-à-vis de sa matière organique sera 10^{-12} à 10^{-4} g (ce qui correspond à des diamètres de 1 µm à 600 µm), soit 72 % du total micrométéoritique.

Parmi eux, nous avons vu que les corps de la gamme 10^{-7} à 10^{-4} g (64%) n'ont que 90% de chance de survie lors de la traversée de l'atmosphère martienne. Nous pouvons supposer que puisqu'un certain pourcentage atteint les 1600°C, un pourcentage non négligeable doit être compris entre 600 et 1600°C, permettant la survie du corps mais pas de matière organique. Puisque nous n'avons pas de moyen de quantifier cela, nous n'en tiendrons pas compte, en gardant à l'esprit qu'il s'agit ici d'une limite supérieure.

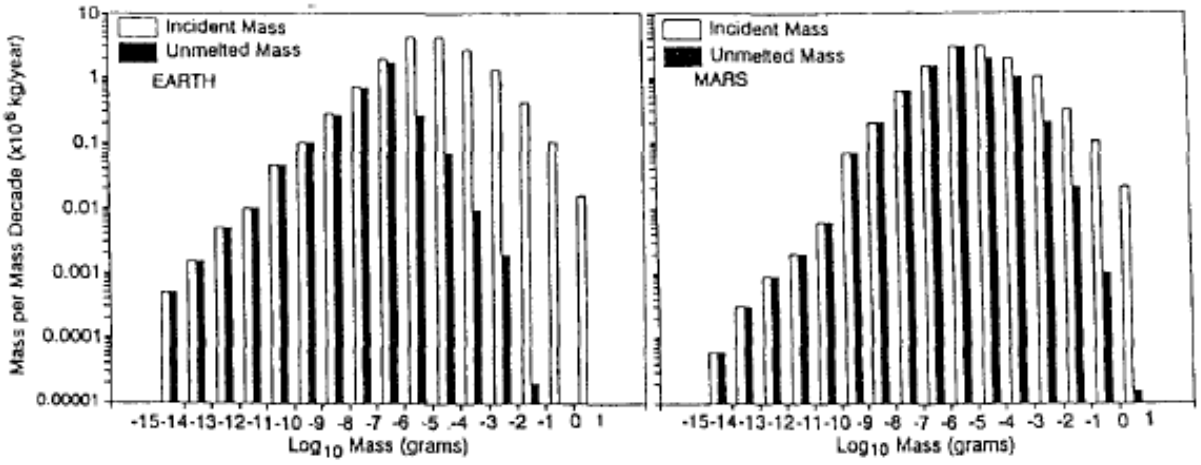


Figure II.5-1 : les flux micrométéoritiques mesurés sur Terre (gauche) et calculés sur Mars (droite) pour chaque gamme de masse sont montrés en parallèle avec la masse résistant à la vaporisation ou la fusion lors de l'entrée atmosphérique. De Flynn (Flynn 1996).

Les micrométéorites ne dépassant pas cette température sont alors les seules à être considérées comme capables de déposer leur matériel organique. En somme, 20,46% du total micrométéoritique de 2700 à 59000 $T.an^{-1}$ ne subiront pas d'échauffement supérieur à la limite de 900K et seront alors considérées comme apportant leur matière carbonée organique à la surface martienne. Ce flux micrométéoritique est compris entre 552 et 12071 $T.an^{-1}$.

De plus, parmi les micrométéorites, 80% sont des micrométéorites carbonées, avec une concentration moyenne de matière carbonée organique d'environ 2% à 10%. Si, comme concentration en matière carbonée organique nous ne considérons que la limite inférieure de 2%, nous obtenons alors un influx de matière carbonée d'environ 8,8 à 193 $T.an^{-1}$, soit $6{,}0.10^{-8}$ à $1{,}31.10^{-6}$ $g.m^{-2}.an^{-1}$ de matière carbonée sur la planète Mars.

En considérant ce flux constant sur les 4 derniers milliards d'années, nous atteignons 240 à 5240 $g.m^{-2}$ de matière carbonée apportée sur Mars. Or la production de sol par apports exogènes est considérée égale à $1m.Ga^{-1}$, soit en 4 Ga à une épaisseur de 4 mètres. Une surface martienne de 1 m² nous donne donc un volume de $4m^3$ d'apport de sol qui contiendrait potentiellement une quantité de matière carbonée d'environ 240 à 5240 g. La densité du sol martien ayant pour valeur moyenne 4, nous avons donc 240 à 5240 g de matière carbonée pour 16,1 g de sol, soit un rapport de 0,0015 à 0,0328 %, correspondant à une échelle de 1500 à 32800 ppm de matière carbonée.

Il est supposé que lors de la phase de bombardement intense, 2.1 à 10^3 fois plus de matériel fut apporté durant les premiers 500 Ma. En reprenant les valeurs d'apport en matière carbonée augmentées d'un facteur 10^3, et en considérant une dilution de ces molécules dans 2 km de régolithe (Biemann *et al.* 1976), nous obtenons alors un apport en molécules organiques de 376 à 8190 ppm.

Ces résultats de la phase de bombardement intense sont une limite supérieure étant donné que des proportions plus petites de matière organique intacte ont probablement survécu. Cela est du à la haute température de la croûte et de l'atmosphère, et à la vaporisation récurrente des océans sur Mars.

Tableau II.5-1 : fraction d'apport micrométéoritique (3ème colonne) par gamme de masse et taille. Fraction de survie du matériel organique parmi ces gammes de taille (4ème colonne). De ces 3ème et 4ème colonnes est calculée la 5ème colonne correspondant à la fraction d'apport micrométéoritique n'ayant pas subi d'élévation de température > 900K, soit susceptible de contenir de la matière organique.

Masse	Taille (densité 1)	Fraction d'apport par taille (%)	Fraction < 900K (survie organique - %)	Fraction de l'apport micrométéoritique susceptible de contenir de la matière organique (%)
$10^{-14} – 10^{-13}$	0,3 – 0,6	0,5	100	0,25
$10^{-13} – 10^{-12}$	0,6 – 1		100	
$10^{-12} – 10^{-11}$	1 – 3		100	**0,25**
$10^{-11} – 10^{-10}$	3 – 6		100	
$10^{-10} – 10^{-9}$	6 – 12	1	95	**0,95**
$10^{-9} – 10^{-8}$	12 – 27	2	88	**1,76**
$10^{-8} – 10^{-7}$	27 – 60	5	75	**3,75**
$10^{-7} – 10^{-6}$	60 – 120	12	46	**5,52**
$10^{-6} – 10^{-5}$	120 – 270	26	24	**6,24**
$10^{-5} – 10^{-4}$	270 – 580	26	7	**1,82**
$10^{-4} – 10^{-3}$	580 – 1240	17	1	**0,17**
$10^{-3} – 10^{-2}$	1240 – 2680	8	0	0
$10^{-2} – 10^{-1}$	2680 – 5760	2	0	0
$10^{-1} – 10^{0}$	> 5 mm	0,5	0	0
$10^{0} – 10^{1}$	> 5 mm		0	0
$10^{1} – 10^{2}$	> 5 mm		0	0
$10^{2} – 10^{3}$	> 5 mm		0	0
$10^{3} – 10^{4}$	> 5 mm		0	0
$10^{4} – 10^{5}$	> 5 mm		0	0
$10^{5} – 10^{6}$	> 5 mm		0	0
Total		**100**		**20,46**

Les micrométéorites de diamètre supérieur à 2 mm pourraient également pouvoir contribuer à l'apport de matière organique carbonée. Elles ne représentent cependant que moins de 3% de la masse totale des micrométéorites, et la matière organique s'en trouve réduite à des zones localisées à l'intérieur de la micrométéorite. C'est pourquoi nous avons volontairement omis les plus grosses micrométéorites pour le calcul global de l'apport en matière organique carbonée sur Mars.

II.5.1.b. Les météorites

Les météorites, de taille intermédiaire 10^1 à 10^8g, peuvent également déposer du matériel organique, puisqu'il est montré que les températures pyrolitiques (supérieures à 600°C) ne s'étendent pas à plus de 1 mm de profondeur dans la météorite (Sears 1975), protégeant ainsi le matériel présent à l'intérieur de la météorite. Nous observons sur Terre une masse d'apport météoritique non carbonées de 2,9 T.an-^{1}, et d'apport météoritique carbonées de 0,19 T.an^{-1}. En considérant la fraction martienne de ces apports à 75% de l'apport terrestre, nous obtenons donc respectivement 2,18 et 0,14 T.an^{-1}.

Les quantités d'apport en matière carbonée se trouvent donc être 0,1 et 2,5-5% respectivement, soit 2,9 et 4,7-9,4 kg.an^{-1} respectivement en apport continu sur les 4 derniers milliards d'années, soit 4 à 5 ordres de grandeurs moindre que l'apport micrométéoritique.

II.5.1.c. Les comètes

Il semblerait qu'une comète frappant la Terre n'apporterait que destruction et mort. Cependant, les estimations nous font considérer un apport cométaire en matière organique carbonée de deux ordres de grandeur supérieurs à l'apport météoritique.

II.5.1.d. Les poussières interplanétaires

La Terre accrète de la poussière interstellaire lorsque le système solaire passe à travers les nuages interstellaires. Cette source de matériel exogène est indépendant des modèles considérés pour le bombardement intense tardif. Greenberg (Greenberg 1981) estime que durant les 700 premiers millions d'années, la Terre serait passée à travers 4 ou 5 nuages interstellaires, accrétant ainsi 10^6-10^7 kg.an^{-1} de molécules organiques à chaque passage de 6.10^5 années. Considérant le rapport de surface martien par rapport à la surface terrestre de 28%, 0,36 à 3,6 ppm de matière organique carbonée auraient ainsi été déposés sur Mars.

II.5.1.e. Les sources endogènes

Précédemment nous avons listé les différentes sources exogènes de matière organique sur Mars. Cependant à l'instar de la Terre, il peut également y exister des sources endogènes de matière organique. Ce sont ces différentes sources qui sont l'objet de cette discussion-ci.

La présence de sources hydrothermales sur Terre permet un apport endogène estimé entre 10^4 et 10^8 kg.an^{-1}. Sur Mars, considérons cet apport rapporté au rapport de surface Mars/Terre, soit 28%, ce qui correspond a une production d'environ $5{,}6.10^7$ kg.an^{-1} (Elderfield *et al.* 1996), pendant les 500 premiers millions d'années de Mars, lorsqu'elle était encore active.

En considérant une atmosphère primitive riche en CO_2, la photolyse UV et les décharges électriques créent, sur Terre, des molécules organiques avec respectivement un même ordre de grandeur et un ordre de grandeur inférieur comparé aux sources hydrothermales. Sous ces conditions atmosphériques, l'apport exogène (micrométéorites, météorites…) est supérieur à l'apport endogène considéré ici.

En revanche, si l'atmosphère ne correspond pas à l'atmosphère primitive de la Terre, mais plutôt à une atmosphère réductrice imaginée par Miller, alors l'apport endogène atmosphérique deviendrait supérieur à l'apport exogène.

Les chocs provenant des impacts géants peuvent également être à la base de la production de matière organique, et notamment d'acides aminés. La synthèse organique utilise l'énergie apportée par le choc. Il s'agit de la synthèse d'acides aminés par chimie des chocs, qui dépend grandement de l'atmosphère. Ne connaissant pas exactement sa composition, et en prenant en compte une atmosphère riche en CO_2, cette chimie aurait un impact négligeable sur l'apport en acides aminés. Nous ne le considérerons donc pas dans nos estimations.

Estimation de la dégradation de la matière organique carbonée martienne

En considérant à la fois l'apport exogène à travers les micrométéorites, les météorites, les comètes, les poussières interstellaires et l'apport endogène en matière organique carbonée, nous obtenons au final une estimation d'environ 26 à 10344 ppm de matière organique carbonée. Cette estimation ne tient absolument pas compte de la possible destruction du matériel organique. En effet, il a été montré qu'il existait une décomposition des organiques sous UV à une vitesse de $3{,}1.10^{-1}$ $g.m^{-2}.an^{-1}$, soit un taux excédant le taux auquel ils sont déposés par apport continu (Stoker *et al.* 1997). Or, nous avons vu et considéré que les molécules organiques sont protégées du rayonnement UV ou de la couche d'oxydation par recouvrement immédiat des molécules et protection par migration à des profondeurs relativement faibles.

Puisque les micrométéorites sont la contribution majeure de cette matière carbonée, estimons la proportion d'acides aminés parmi cette matière organique. La limite inférieure sur les météorites est de 1% d'acides aminés parmi toute la matière organique carbonée. Il a été trouvé sur les micrométéorites 80 ppm d'AIB (Maurette 1998), l'acide aminé majoritaire, soit près de 1% de la matière organique carbonée. Il y aurait donc entre 0,26 et 103,44 ppm d'acides aminés dans le sol martien. En considérant les 74 acides aminés trouvés dans la météorite de Murchison, cela représente une quantité moyenne pour chaque acide aminé de 3,5 ppb à 1,39 ppm.

Cette estimation, bien que remplie d'incertitudes à chacune des étapes du calcul, donne tout de même une approximation très utile des valeurs que l'on peut espérer trouver dans le sol martien.

II.5.2. Conclusion

En essayant d'être le plus exhaustif possible nous venons de lister le maximum de sources d'apport de matière carbonée sur Mars en les quantifiant. Nous avons également tenté de considérer la destruction des ces composés organiques *via* des processus atmosphériques tels que les UV ou l'oxydation. Pour ce faire nous avons utilisé comme seul modèle à notre disposition : la Terre. Toutes les valeurs estimées sont reportées dans le tableau II.5-2 ci-dessous.

On observe que les valeurs estimées de matière organique sur Mars sont compatibles avec les limites de détection de notre technique analytique de détection des acides aminés et de leurs énantiomères. En effet, les limites de la méthode expérimentale sont inférieures aux estimations de la matière organique supposée présente sur Mars.

Dans le cas d'une concentration en acides aminés correspondant à la limite inférieure estimée à 3,6 ppb, alors une analyse de 28 mg de sol martien serait nécessaire pour obtenir la valeur limite de 1 pmol (0,1 ng) (l'ordre de grandeur de la limite de détection) d'un acide aminé en particulier, alors que seuls 0,07 mg de sols seraient nécessaires pour cette détection si on considère la quantité la plus optimiste d'acides aminés dans le sol martien.

Or les chiffres disponibles actuellement pour les deux prochaines missions martiennes Mars Science Laboratory avec l'expérience Sample Analysis at Mars et Exomars avec l'expérience Mars Organic Molecule Analyzer prévoient pour toutes les deux de prélever environ 50 à 100 mg de sol martien pour chaque expérience, ce qui correspond environ au double de la quantité nécessaire calculée ci-dessus. Evidemment ces chiffres supposent que l'extraction de la matière organique du sol martien soit totale.

Tableau II.5-2 : estimation de la matière carbonée organique susceptible d'être retrouvée sur Mars, dans les limites inférieures (pessimiste) et les limites supérieures (optimiste) des variables proposées par les différents auteurs.

	Terre (T/an)	Mars (T/an)	< 900K (T/an)	Carbonés (T/an)	Qt C org (T/an)	Qt C org (g/m²/an)	Qt C org (g/m²) 4 Ga	Qt C org (ppm) *	Qt C org (g/m²) 500Ma LHB	Qt C org (ppm)	Total C org (ppm)
Pessimiste		17 %	20,46 %	80%	2%				2.102 fois >	Régolithe 2 km	
	16100	2700	552	442	8,832	6,01.10-8	240	**15**	6010	**0,75**	**15,75**
Optimiste		75 %	20,46 %	80%	10%				103 fois >	Régolithe 100 m	
	78000	59000	12071	9657	965,7	6,57.10-6	26277	**1642**	3285000	**8213**	**9855**
Météorites NC	2,9	2,18			0,1% = 0,00218	1,483.10-11	0,059	0,00369	7,415	0,0093	**0,013**
Météorites C	0,19	0,143			3% = 0,0043	2,925.10-11	0,117	0,00731	14,625	0,018	**0,135**
Comètes											**10**
Poussière interstellaire					280-2800	1,90.10-6 – 1,90.10-5	5,7 – 57	0,36 – 3,6			**0,36 – 3,6**
Endogène					56000	3,81.10-4			190476	476	**476**

* = densité du sol martien considéré à 4 g/cm3

	Ppm C	Ppm AA	Ppm AA chaque	Quantité sol nécessaire pour détéction de 1 pmol = 0,1 ng
Pessimiste	26,3	0,26	0,0035	28 mg
Optimiste	10344,7	103	1,39	0,07 mg

II.6. Comparaison Chirasil-Val et Chirasil-Dex

Toutes les études décrites précédemment ont été effectuées sur la colonne chromatographique Chirasil-Dex, colonne amplement décrite dans les différents paragraphes. Toutes les classes de composés chiraux ou non, des plus polaires aux plus apolaires, sont susceptibles de montrer une séparation sur les dérivés cyclodextrine. Les composés chiraux peuvent de surcroît résoudre leurs énantiomères. La séparation des solutés ne peut pas être expliquée par la forme moléculaire, sa taille ou les fonctions présentes sur le soluté ou le sélectant (α, β ou γ). Cela est dû à une reconnaissance multimodale. Du fait de l'amphiphilie de cette molécule, elle agit comme hôte pour piéger tout ou partie des molécules chimiques, sans former de liaisons covalentes. C'est le phénomène d'inclusion, mode de fonctionnement principal de la Chirasil-Dex. Les cyclodextrines vont également séparer les constituants injectés par des ponts hydrogènes, des forces de dispersion, des interactions dipôle-dipôle, des interactions électrostatiques et/ou des forces hydrophobes (Schurig *et al.* 1990; Venema *et al.* 1991; Berthod *et al.* 1992; Schreier *et al.* 1995). Les comportements différents des composés sur une même colonne chromatographique laissent supposer des comportements d'autant plus différents si nous utilisons une autre colonne capillaire, à savoir la Chirasil-Val. Cette colonne, également décrite précédemment, est la colonne censée différencier le mieux les énantiomères des acides aminées, sa phase stationnaire étant elle-même composée d'un acide aminé modifié. Cette colonne retient principalement les solutés par des liaisons hydrogènes. Cette différence modale de reconnaissance par rapport à la Chirasil-Dex laisse présager un comportement complémentaire de cette colonne vis-à-vis des composés que nous souhaitons étudier. De plus, les études de fonctionnalisation chirale aux chloroformiates et aux alkyls anhydres ont pu attester d'une séparation chirale complémentaire de certains acides aminés sur une colonne ou sur l'autre (Zampolli *et al.* 2006; Zampolli *et al.* 2007). Des acides aminés fonctionnalisés en leur N-TFA méthyl ester ont également été analysés sur les deux types de colonnes (Schurig *et al.* 1999).

Le comportement typique est une élution plus rapide des D acides aminés par rapport à leur inverse optique sur une colonne de type Chirasil-L-Val, inversement sur une colonne de type Chirasil-D-Val. Cependant, l'inconvénient majeur de la Chirasil-Val est sa tendance à racémiser sa phase stationnaire. Une température élevée ou des contaminants acides, fréquemment introduits lors d'une injection, vont accélérer cette racémisation. Le taux de racémisation est cependant faible à une température du four inférieure à 185°C, mais augmente dramatiquement à partir de cette température d'analyse. De plus, la Chirasil-Val a tendance à perdre des fragments de son squelette polysiloxane (bleeding contenant de l'azote), ce qui empêche l'utilisation d'un détecteur à azote.

Sur la Chirasil-Dex en revanche, les cyclodextrines étant des oligosaccharides dérivés du D-glucose, l'inversion simultanée de tous les centres chiraux est impossible, rendant la racémisation de la phase stationnaire impossible. La colonne peut être conditionnée jusqu'à 220°C sans perte significative d'énantiosélectivité, et aucune épimérisation (inversion à un centre chiral) n'est généralement observée jusqu'à 250°C. Des acides forts peuvent cependant mener à une perte

d'énantiosélectivité. Mais l'inconvénient majeur de la Chirasil-Dex par rapport à la Chirasil-Val est qu'elle n'existe que sous la forme d'une seule phase, rendant l'inversion de pic impossible, contrairement à la Chirasil-Val qui existe sous sa forme D et L (inversion de l'ordre d'élution des inverses optiques). Les acides aminés sur la Chirasil-Dex n'ont pas un ordre d'élution déterminé, et seule une injection séparée des deux formes de chacun d'entre eux permet de déterminer l'ordre d'élution des inverses optiques.

Chacune des deux phases stationnaires montre un comportement distinct compte-tenu de leur stabilité thermique et de leur énantiosélectivité propre vis-à-vis des solutés fonctionnalisés. Les ordres d'élution des composés et la séparation énantiomérique diffèrent ainsi selon la colonne utilisée. Globalement, les colonnes β-cyclodextrines montrent donc un comportement complémentaire aux Chirasil-Val pour une séparation énantiomérique des acides aminés.

Cependant, et malgré un comportement théorique différent de ces deux phases, vérifié expérimentalement, aucune séparation énantiomérique n'a pu être observée sur la Chirasil-Val après une fonctionnalisation au DMF-DMA. Les acides aminés étudiés, bien que séparés et détectés, ne présentent aucune discrimination quant à leurs énantiomères. Une étude plus approfondie pourrait être menée afin de déterminer les éventuelles conditions dans lesquelles cette séparation chirale pourrait avoir lieu. Cependant, au regard des résultats peu encourageants de cette colonne et compte-tenu des bons résultats obtenus avec la colonne Chirasil-Dex, nous n'avons pas exploré plus en détails les possibilités analytiques pour la séparation chirale sur la Chirasil-Val.

II.7. Discussion générale

Le premier objectif de ce travail était d'optimiser et valider la méthode de fonctionnalisation au DMF-DMA suivie d'une séparation chirale des molécules organiques d'intérêt exobiologique. Les composés choisis l'ont été pour leur pertinence biologique (indice de vie), ainsi que pour leurs caractères physico-chimiques variés. Parmi les 20 acides aminés protéiques, donc du monde vivant, certains sont polaires, et donc hydrophiles, d'autres non-polaires, plutôt hydrophobes. Certains sont chargés, d'autres non. Certains contiennent un cycle aromatique, certains sont soufrés, certains possèdent une chaîne latérale réactive qui permettra des poly-méthylation par l'agent de fonctionnalisation. La proline a une chaîne latérale en forme d'anneau pyrrolidone, qui va contacter l'azote de son groupement aminé, et ainsi empêcher la réaction du DMF-DMA sur son groupement aminé. La proline ne sera qu'estérifiée sur son groupement carboxylique.

Quatre acides aminés ont une chaîne latérale fortement ionisée et donc chargée à pH neutre : l'acide aspartique, l'acide glutamique, tous deux portant un groupement acide carboxylique supplémentaire sur leur chaîne latérale, et la lysine et l'arginine, dont la chaîne latérale porte un groupement aminé. Ces groupements vont être particulièrement réactifs, et seront fonctionnalisés

efficacement par le DMF-DMA. Un autre acide aminé, l'histidine, porte une charge positive plus faible à pH neutre.

Les deux acides aminés Asp et Glu ont leur équivalent où leur groupement acide est changé en un groupement amide (-$CONH_2$). Il s'agit alors de l'asparagine et de la glutamine. Ces deux acides aminés sont non chargés à pH neutre, mais restent polaire et hydrophiles. Cependant, une déamidation de ces deux composés semble se produire à la température de la réaction de fonctionnalisation, ce qui aboutit à la détection des deux équivalents Asp et Glu.

La sérine et la thréonine, quant à elles, ont un groupement hydroxyle polaire mais non ionisable, donc non réactionnel, sur leur chaîne latérale. Ils ne seront alors pas la cible d'une méthylation supplémentaire dans le cadre de notre fonctionnalisation.

Les acides aminés contenant des cycles, comme la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine sont très hydrophobes ; c'est également le cas de leurs congénères dont la chaîne latérale consiste en une succession de groupements éthyle et méthyle. On dit d'eux qu'ils sont aliphatiques. L'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine sont tous des acides aminés aliphatiques. On inclut généralement dans cette famille la méthionine, dont la chaîne latérale plutôt aliphatique contient un soufre non réactif. Notons que la tyrosine, malgré son caractère hydrophobe dû au cycle benzène, possède un groupement –OH qui, à l'instar de la sérine et de la thréonine, lui permet d'être la cible d'une méthylation au DMF-DMA.

La cystéine est une classe un peu à part, possédant à l'extrémité de sa chaîne latérale un groupement sulfhydryle réactif (dans des conditions oxydantes, une cystéine forme fréquemment un pont disulfure avec une autre cystéine pour donner un dimère qu'on appelle cystine. Les cystéines contribuent à maintenir la structure tridimensionnelle de très nombreuses protéines grâce à cette faculté). Dans le cas de la fonctionnalisation au DMF-DMA, une méthylation est observée sur le soufre.

Suite à la réaction au DMF-DMA, l'acide aminé fonctionnalisé peut être analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Cette méthode analytique permet une analyse qualitative précise des solutés séparés, permettant d'une part de résoudre (qualitativement et quantitativement) les coélutions par une analyse spectrale en mode SIM et d'autre part de remonter à la molécule mère à partir du patron de fragmentation en masse. Inversement, un composé particulier peut être recherché en prédisant sa fragmentation et en recherchant directement sur le chromatogramme un tel patron de fragmentation ou pic de base. Il est alors intéressant d'étendre cette propriété à l'analyse *in situ* : la recherche d'un composé particulier pourra se faire *a posteriori*, à partir du chromatogramme obtenu, en déterminant en laboratoire ou *in silico* son spectre de masse et en le « screenant » sur le chromatogramme de référence.

L'analyse chromatographique est optimisée de sorte que le temps d'analyse soit suffisamment court pour être spatial-compatible, et suffisamment long pour permettre une élution optimale des composés, et éviter les coélutions par un chromatogramme relativement étendu et spécifique.

La fonctionnalisation est cependant une réaction se produisant à chaud, et bien que la technique analytique permette aisément de remonter à la molécule mère, une dégradation par l'agent de fonctionnalisation lui-même empêcherait l'identification du composé initial. C'est le cas pour les deux acides aminés Asn et Gln, qui semblent perdre leur groupement amide durant la fonctionnalisation, les indifférenciant de l'Asp et Glu. Les acides aminés sont sensibles à la dégradation par la température, pouvant mener à leur décarboxylation ou à la formation de nouveaux composés. Cependant, la réaction de fonctionnalisation étant rapide, la dégradation des acides aminés est supposée limitée dans l'échantillon. Cette dégradation n'est pas quantifiable, et le rendement estimé de la réaction n'est qu'un rendement relatif. En effet, nulle détection n'est possible sans fonctionnalisation, il n'est alors pas possible de connaître l'effet minimum de dégradation imposé par la réaction de fonctionnalisation. C'est pour cela que l'on considère comme un rendement de 100% le rendement maximal dans les conditions les moins dégradantes. Les autres points sont relatifs à ce maximum.

Il est certain qu'une dégradation se produit durant la réaction de fonctionnalisation. Lorsque la dégradation augmente avec la température ou la durée de la fonctionnalisation proportionnellement moins vite que l'efficacité de la réaction, le rendement de la réaction présente un accroissement absolu. A une certaine durée ou température, la réaction atteint un plateau absolu, qui correspond à un équilibre entre l'efficacité de la réaction et le taux de dégradation. Lorsque la dégradation devient supérieure à l'accroissement de l'efficacité de la réaction, une baisse absolue du rendement est observée. Le profil de dégradation est cependant impossible à identifier, puisque le profil du rendement n'est pas défini. Il n'est alors pas possible de discerner entre les deux effets, et seul le résultat global de la dégradation et de l'efficacité est visible. Nous pouvons supposer que la dégradation croît linéairement avec la température et la durée de la réaction, et que l'efficacité croît linéairement jusqu'à une durée et/ou une température limite, à partir de laquelle l'efficacité atteint un plateau. Cela pourrait expliquer le profil général observé de la réaction de fonctionnalisation.

La température optimale semble donc un compromis entre deux effets : avec une décroissance de température, la fréquence de collisions particulaires dans la chambre de réaction diminue, résultant en la décroissance de taux de recouvrement pour la méthylation pyrolytique. Des températures supérieures ou des temps de réaction supérieurs de la méthylation au DMF-DMA cause des réactions secondaires, menant à des produits de dégradation.

L'observation de différents pics de certains solutés sur le chromatogramme accentue l'idée que la dégradation existe même à des températures clémentes. Cette dégradation, inévitable, est alors considérée à son minimum lorsque nous choisissons comme optimum de fonctionnalisation le maximum (relatif) de rendement, c'est à dire une réaction à 140°C durant 3 minutes. Cette

combinaison correspond alors au maximum d'efficacité pour un minimum de dégradation. Elle permet de détecter 19 des 20 acides aminés du vivant, et de différencier et quantifier les énantiomères de 10 parmi les 18 acides aminés chiraux détectés, avec un Rs satisfaisant.

Cette dégradation pourrait se révéler limitante vis-à-vis des limites de détection de nos composés. Ces limites ont été estimées théoriquement et pratiquement, et les deux approches donnent des ordres de grandeur similaires de l'ordre du picomole, voire de la dizaine de picomoles pour les composés les moins facilement détectables. Une estimation de la quantité d'acides aminés possiblement présents sur Mars en fonction de l'apport endogène et exogène de matière organique carbonée provenant de différentes sources cosmiques, et en fonction de la composition quantitative et qualitative en acides aminés sur les météorites retrouvées sur Terre, laisse penser qu'il y aurait entre 3,6 ppb et 1,4 ppm de chaque acide aminé. Ces quantités sont parfaitement compatibles avec les limites de détection et de quantification de la méthode de fonctionnalisation et d'analyse élaborée, puisqu'il faudrait alors analyser de 0,07 à 27 mg de sol.

Etant donné que les acides aminés sont soumis à des conditions dégradantes, il est légitime de se poser la question de la racémisation. En effet, dans des conditions hydratées, les solutés sont plus sensibles à la racémisation qu'à la dégradation. Après les études de racémisation, il devient évident que ce paramètre n'est pas limitant dans l'étude, puisqu'un seul acide aminé, la tyrosine, montre une racémisation totale. Les autres acides aminés ne montrent soit aucune racémisation, soit une racémisation partielle mais quantifiable. Le fait de quantifier la racémisation permet de remonter à l'excès énantiomérique initial avant racémisation du composé par les conditions de la réaction de fonctionnalisation. Cependant, le taux de racémisation peut dépendre de l'excès énantiomérique initial, et une étude approfondie de la cinétique de racémisation de chaque composé devrait être effectué pour évaluer le taux de racémisation en fonction de l'excès énantiomérique initial.

La fonctionnalisation est non seulement efficace sur les acides aminés, mais également sur les acides carboxyliques et acides nucléiques, comme il a pu être montré.

II.8. Conclusion

Lorsqu'on le compare à d'autres agents de fonctionnalisation potentiels tels que le chloroformiate de méthyle ou les esters de perfluoroacyle/perfluoroalkyles, le DMF-DMA présente des avantages significatifs pour des applications spatiales. Le tableau II.8-1 souligne les avantages de la technique de DMF-DMA pour l'application spatiale, comparés aux deux autres méthodes optimisées et adaptées précédemment dans notre laboratoire pour les mêmes objectifs.

Malgré quelques coélutions (cystéine – ML, Leu – Ile...), destructions (le tryptophane, l'histidine mènent à différents pics, mélanges entre le produit intégral et des produits de dégradation) ou

transformations (les groupement amides des Gln et Asn sont acide et température-labiles, menant aux Glu et Asp respectivement), la fonctionnalisation au DMF-DMA suivie d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne Chirasil-Dex couplée à un spectromètre de masse semble alors une méthode expérimentale idéale pour une analyse *in situ* des composés organiques d'intérêt exobiologique : le DMF-DMA est un agent réactif efficace, stable à haute température pendant des temps supérieurs aux temps de chauffage auxquels il serait exposé lors des missions spatiales, encore actif à une température de réaction aussi élevée que 190°C, universel sur tout type de molécules, qui aboutit à des composés hautement volatils de faibles poids moléculaires compatibles avec les performances des spectromètres de masse embarqués. L'analyse chromatographique en aval permet la détection des composés fonctionnalisés avec une résolution énantiomérique des composés, et des limites de détection et quantification compatibles avec les quantités supposées sur Mars. L'analyse en spectrométrie de masse permet une identification précise de chacun des composés, et une séparation des composés coélués. Il s'agit alors d'une méthode expérimentale simple, rapide, nécessitant peu de solvant et aucun cofacteur, des conditions opératoires modérées (140°C), en une seule étape (donc facilement automatisable), réalisable dans un seul four à réaction, peu consommatrice en temps et en énergie. Les avantages de la technique de fonctionnalisation au DMF-DMA l'indique alors comme pertinente pour son implémentation dans l'expérience MOMA.

Les trois minutes d'incubation à 140°C adoptés pour la procédure représentent un compromis entre l'efficacité de la fonctionnalisation, le nombre de composés détectés et le taux de destruction et/ou de racémisation de ces composés. L'universalité de la fonctionnalisation au DMF-DMA et son utilité et efficacité dans la séparation chirale ont été démontrées sur une gamme étendue de molécules organiques d'intérêt exobiologique. En conclusion, la cumulation de toutes ces caractéristiques fait du DMF-DMA le meilleur réactif actuel pour la recherche de traces de vie *in situ*.

Tableau II.8-1 : avantages et inconvénients des trois agents de fonctionnalisation chirale principaux, pour leur utilisation spatiale.

	Avantages	Inconvénients
Chloroformiates d'alkyles	◆ une étape, réaction rapide ◆ Agent non spécifique, actif pour une large gamme d'analytes ◆ Réaction en milieu aqueux ◆ Conditions douces de réaction ◆ Reproductible	◆ Besoin d'une forte agitation ◆ Produits de haut poids moléculaire ◆ Nombreux réactifs requis ◆ Agent à stocker à basse température ◆ Détériore les colonnes cyclodextrine ◆ Dérivés secondaires
Alkyles anhydres	◆ Procédure en une étape ◆ Faible limite de détection	◆ Racémisation ◆ Produits de haut poids moléculaire ◆ Mauvaise reproductibilité (3 – 11%) ◆ Très corrosif
DMF-DMA	◆ Réaction en une seule étape, simple et rapide ◆ Faible limite de détection et de quantification ◆ Agent non spécifique, pour une large gamme d'analytes ◆ Stable à haute température (200°C) ◆ Produits de faible poids moléculaire ◆ Temps d'analyse court ◆ Peu de racémisation	◆ Dérivés secondaires ◆ Reproductibilité

Cependant, tout ce développement n'a été fait que sur des produits purs en solution, et l'application directement sur échantillons solides sera développée dans le chapitre suivant. En effet, l'agent de fonctionnalisation dans l'expérience spatiale sera stocké au fond du four à réaction ou sera introduit dans l'échantillon et isolé du reste du four par une feuille métallique thermofusible. A cette température, le DMF-DMA sera alors relâché et mis en contact avec le sol martien, pour extraire et fonctionnaliser toutes les molécules organiques cibles contenues dans l'échantillon. L'analyse de la fonctionnalisation directement sur l'échantillon solide ajoute une étape supplémentaire et critique d'extraction des molécules cibles. Ce sont ces aspects qui seront développés dans le chapitre suivant.

II.9. Bibliographie

Anders, E. (1989). "Pre-Biotic Organic-Matter From Comets And Asteroids." Nature 342(6247): 255-257.

Basiuk, V. A. (2001). "Some observations on amino acid racemization under pyrolytic temperatures and inorganic oxide-catalyzed intermolecular condensation." Space Life Sciences: Life In The Solar System: Prebiotic Chemistry, Chirality And Space Biology 27(2): 335-340.

Benner, S. A., K. G. Devine, L. N. Matveeva and D. H. Powell (2000). "The missing organic molecules on Mars." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 97(6): 2425-2430.

Berthod, A., W. Y. Li and D. W. Armstrong (1992). "Multiple Enantioselective Retention Mechanisms On Derivatized Cyclodextrin Gas-Chromatographic Chiral Stationary Phases." Analytical Chemistry 64(8): 873-879.

Biemann, K., J. Oro, P. Toulmin, L. E. Orgel, A. O. Nier, D. M. Anderson, P. G. Simmonds, D. Flory, A. V. Diaz, D. R. Rushneck and J. A. Biller (1976). "Search For Organic And Volatile Inorganic-Compounds In 2 Surface Samples From Chryse-Planitia Region Of Mars." Science 194(4260): 72-76.

Cronin, J. R., S. Pizzarello and G. U. Yuen (1983). "Recent Analyses Of Amino-Acids In The Murchison Meteorite." Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society 186(AUG): 5-GEOC.

Davis, J., M. J. Moorcroft, S. J. Wilkins, R. G. Compton and M. F. Cardosi (2000). "Electrochemical detection of nitrate at a copper modified electrode under the influence of ultrasound." Electroanalysis 12(17): 1363-1367.

Elderfield, H. and A. Schultz (1996). "Mid-ocean ridge hydrothermal fluxes and the chemical composition of the ocean." Annual Review Of Earth And Planetary Sciences 24: 191-224.

Flynn, G. J. (1996). "The delivery of organic matter from asteroids and comets to the early surface of Mars." Earth Moon And Planets 72(1-3): 469-474.

Flynn, G. J. and D. S. McKay (1990). "An Assessment Of The Meteoritic Contribution To The Martian Soil." Journal Of Geophysical Research-Solid Earth And Planets 95(B9): 14497-14509.

Glavin, D. P., G. Matrajt and J. L. Bada (2004). "Re-examination of amino acids in Antarctic micrometeorites." Space Life Sciences: Steps Toward Origin(S) Of Life 33(1): 106-113.

Greenberg, J. M. (1981). Chemical evolution of interstellar dust - a source of prebiotic material? Comets and the Origins of Life. C. Ponnamperuma. Dordrecht, Reidel: 111 - 127.

Lipkowitz, K. B., B. Coner, M. A. Peterson and A. Morreale (1997). "Enantioselective binding in gas chromatography: A computational study of chiral selection by permethyl-beta-cyclodextrin." Journal Of Physical Organic Chemistry 10(5): 311-322.

Luzzana, U., T. Mentasti, J. Opstvedt, E. Nygard, V. M. Moretti and F. Valfre (1999). "Racemization kinetics of aspartic acid in fish material under different conditions of moisture, pH, and oxygen pressure." Journal Of Agricultural And Food Chemistry 47(7): 2879-2884.

March, R. E. (1997). "An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry." Journal Of Mass Spectrometry 32(4): 351-369.

Martin, A. J. P. and R. L. M. Synge (1941). "A new form of chromatogram employing two liquid phases I. A theory of chromatography 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins." Biochemical Journal 35: 1358-1368.

Maurette, M. (1998). "Carbonaceous micrometeorites and the origin of life." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 28(4-6): 385-412.

Meierhenrich, U. J., G. M. M. Caro, J. H. Bredehoft, E. K. Jessberger and W. H. P. Thiemann (2004). "Identification of diamino acids in the Murchison meteorite." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 101(25): 9182-9186.

Meierhenrich, U. J., M. J. Nguyen, B. Barbier, A. Brack and W. H. P. Thiemann (2003). "Gas chromatographic separation of saturated aliphatic hydrocarbon enantiomers on permethylated beta-cyclodextrin." Chirality 15: S13-S16.

Pierazzo, E. and C. F. Chyba (1999). "Amino acid survival in large cometary impacts." Meteoritics & Planetary Science 34(6): 909-918.

Priego-Lopez, E. and M. D. L. de Castro (2003). "Ultrasound-assisted derivatization of phenolic compounds in spiked water samples before pervaporation, gas chromatographic separation, and flame ionization detection." Chromatographia 57(7-8): 513-518.

Schreier, P., A. Bernreuther and M. Huffer (1995). Analysis of Chiral Organic Molecules. Berlin, Walter de Gruyter.

Schurig, V., M. Juza, M. Preschel, G. J. Nicholson and E. Bayer (1999). "Gas-chromatographic enantiomer separation of proteinogenic amino acid derivatives: Comparison of Chirasil-val and Chirasil-gamma-dex used as chiral stationary phases." Enantiomer 4(3-4): 297-303.

Schurig, V. and H. P. Nowotny (1990). "Gas-Chromatographic Separation Of Enantiomers On Optically-Active Metal-Complex-Free Stationary Phases.2. Gas-Chromatographic Separation Of Enantiomers On Cyclodextrin Derivatives." Angewandte Chemie-International Edition In English 29(9): 939-957.

Sears, D. W. (1975). "Thermoluminescence Studies And Pre-Atmospheric Shape And Mass Of Estacado Meteorite." Earth And Planetary Science Letters 26(1): 97-104.

Sephton, M. A., I. P. Wright, I. Gilmour, J. W. de Leeuw, M. M. Grady and C. T. Pillinger (2002). "High molecular weight organic matter in martian meteorites." Planetary And Space Science 50(7-8): 711-716.

Stoker, C. R. and M. A. Bullock (1997). "Organic degradation under simulated Martian conditions." Journal Of Geophysical Research-Planets 102(E5): 10881-10888.

Szopa, C., R. Sternberg, D. Coscia, F. Raulin, C. Vidal-Madjar and H. Rosenbauer (2002). "Gas chromatography for in situ analysis of a cometary nucleus III. Multi-capillary column system for the cometary sampling and composition experiment of the Rosetta lander probe." Journal Of Chromatography A 953(1-2): 165-173.

Szopa, C., R. Sternberg, F. Raulin and H. Rosenbauer (2003). "What can we expect from the in situ chemical investigation of a cometary nucleus by gas chromatography: First results from laboratory studies." Planetary And Space Science 51(13): 863-877.

Venema, A., H. Henderiks and R. Vongeest (1991). "The Enantioselectivity Of Modified Cyclodextrins - Studies On Interaction Mechanisms." Hrc-Journal Of High Resolution Chromatography 14(10): 676-680.

Zampolli, M., D. Meunier, R. Sternberg, F. Raulin, C. Szopa, M. C. Pietrogrande and F. Dondi (2006). "GC-MS analysis of amino acid enantiomers, as their N(O,S)-perfluoroacyl perfluoroalkyl esters: Application to space analysis." Chirality 18(4): 279-295.

Zampolli, M. G., G. Basaglia, F. Dondi, R. Sternberg, C. Szopa and M. C. Pietrogrande (2007). "Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis." Journal Of Chromatography A 1150(1-2): 162-172.

Chapitre III : résumé

La recherche de vie ailleurs que sur Terre est un but majeur de l'exobiologie, et des expériences sont développées dans ce but. En effet, une mission martienne européenne, Exomars, est prévue pour 2018. Elle déposera un robot à la surface de Mars, capable d'effectuer des expériences *in situ*. Une de ces expériences aura pour objectif de détecter des molécules organiques et d'analyser leur chiralité. En effet, détecter des organiques tels que des acides aminés, des acides carboxyliques ou des acides nucléiques apporteraient des éléments de réponses à différentes questions que se posent les exobiologistes notamment en ce qui concerne la résistance de ces molécules sur le sol martien, mais y trouver un excès énantiomérique serait un indice fort envers une origine biotique de ces composés. C'est pourquoi nous développons des expériences capables de détecter et de séparer les énantiomères de ces molécules.

Dans le chapitre précédent, nous avons déterminé qu'utiliser un CPG-SM équipé d'une colonne chromatographique chirale Chirasil-Dex est la méthode d'analyse la plus pertinente pour détecter des composés d'intérêt exobiologique chiraux tels que des acides aminés. Une étape de fonctionnalisation des molécules organiques réfractaires avec le DMF-DMA a été développée et optimisée dans ce but. L'étape suivante est donc d'effectuer cette fonctionnalisation directement sur les sols d'intérêt. Malheureusement, la majorité des molécules du sol y sont fortement liées, de sorte qu'une fonctionnalisation seule n'est pas suffisante pour les extraire. Une étape d'extraction doit être impérativement effectuée en amont de la fonctionnalisation. La meilleure procédure d'extraction a été établie comme étant une thermodésorption courte (inférieure à 15 min) à haute température (300°C).

Le but de l'étude présentée dans ce chapitre est de réussir à combiner la thermodésorption et la fonctionnalisation dans un seul et même réacteur et en une seule étape (one pot - one step), en prenant en compte toutes les contraintes dues a une analyse *in situ* sur Mars. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons conçu un réacteur répondant aux exigences d'une analyse spatiale et permettant une étude entièrement robotisée. Dans ce réacteur, le sol doit être déposé, et les molécules doivent successivement en être extraites, fonctionnalisées puis injectées dans le CPG-SM. Après que chaque étape ait été optimisée individuellement, l'extraction et la fonctionnalisation sont considérées liée l'une a l'autre dans le réacteur. La liberté d'action sur la température de fonctionnalisation est alors restreinte par une contrainte technique supplémentaire ; la température doit être supérieure ou égale à la température d'extraction. La fonctionnalisation consiste en une seule étape d'injection d'un petit volume (15 µL) de DMF-DMA pour les expériences en laboratoire, ou d'une diffusion de ce même volume à partir d'une capsule thermolabile déjà présente dans le réacteur, pour s'approcher des conditions expérimentales martiennes. Différentes températures et durées de thermodesorption ont été testées, en combinaison avec différentes températures et durées de fonctionnalisation. Les résultats montrent qu'à partir d'une faible quantité d'un sol analogue martien, pauvre en matière organique (50 mg de sol du désert d'Atacama), nous avons réussi, après une courte thermodésorption à température moyenne (200°C, 5 min) et fonctionnalisation (220°C, 45 sec),

à extraire et à identifier différentes familles de molécules organiques, et à séparer les énantiomères de certaines d'entre elles.

Chapter III: abstract

Finding life elsewhere than on the Earth is one of the goals of exobiology. Experiments are developed in this purpose. Indeed, a European Martian mission, Exomars, is scheduled for 2018. It will release a rover at the surface of Mars, able to perform experiments *in situ*. One of these experiments is to detect organic molecules and analyze their chirality. Indeed, detecting organic molecules such as amino, carboxylic and nucleic acids would be a clue on resistance of these compounds, but finding an enantiomeric excess would be a clue for biotic origin of these compounds. That's why we developed experiments able to detect and separate the enantiomers of molecules.

We have determined in the former chapter that GC-MS using a Chirasil-Dex chiral chromatographic column is the most relevant to analyze the molecules of interest. A step of derivatization of the refractory organics with DMF-DMA has been developed and optimized in this purpose. The next step is to perform the derivatization directly on the soil of interest. Unfortunately, most of the molecules on the soil are bonded so that a simple derivatization step isn't sufficient to extract them. An extraction step preceding the derivatization must be performed. This extraction step has been investigated, and thermodesorption at high temperature (300°C) during a short time (15 min) is chosen to be the best.

The aim of the study is to combine thermodesorption and derivatization in a single device and single step, taking into account all the constraints of the system which would fly to Mars, in order to analyze the organic content of soils *in situ*. That's why, at first, a reaction chamber has been conceived meeting the requirements of a spatial analysis able to perform the whole analyze robotically. In this reaction chamber, the target soil should be dropped, and the molecules have to be successively extracted, derivatized and injected in the GC-MS. After each step has been optimized independently, the ultimate aim is to optimize both steps at once in the reactor. The derivatization has to occur at the same temperature than extraction or higher, for technical reasons. It is a simple step which consists only of an injection of a small volume (15 µL) of dimethyl-formamide dimethylacetal (DMF-DMA) for ground experiments, or diffusion from a thermolabile capsule for the robot-like experiment. Different temperatures and duration of thermodesorption have been tested, in combination with variable temperatures and duration of derivatization. Results show that from a small amount (50 mg) of a Martian analogue soil containing only traces of organics (soil from the Atacama desert), after a short thermodesorption at mild temperature (200°C – 5 min) and derivatization (220°C – 45 sec), we can detect different kinds of organic molecules, and even separate enantiomers of some of them.

Chapitre III – De la conception et la réalisation de l'expérience spatialisable

III.1. Introduction

Trouver la vie ailleurs que sur la Terre est une des ambitions majeures de l'exobiologie. Dans cette optique plusieurs expériences spatiales ont été envoyées ou sont en cours de développement. C'est en particulier le cas pour la mission européenne Exomars, dont le lancement est prévu pour 2016-2018. Elle devrait déposer un rover à la surface de Mars, capable d'effectuer des expériences *in situ*. Parmi ces expériences, l'une d'entre elles, MOMA, aura pour objectif de détecter des molécules organiques et d'analyser leur chiralité. C'est pourquoi à la fois dans le cadre d'un contrat CNES R&T et de la mission Exomars, nous avons développé une procédure analytique, présentée dans le chapitre précédent, capable de détecter et de séparer les énantiomères des molécules organiques.

Cependant, si de la matière organique extraterrestre est présente dans le sol martien, alors il faudra préalablement l'extraire. C'est dans le but d'analyser le contenu organique des sols, nous avons également développé un système sous la forme d'un réacteur capable d'extraire et de fonctionnaliser ces composés cibles dans une même enceinte.

L'objectif de cette recherche est le développement et la réalisation d'un système complet de transformation d'échantillon *in situ* qui permette l'extraction, la volatilisation, la focalisation et le transfert de molécules d'intérêt exobiologique à partir d'un échantillon solide dans un système d'analyse utilisant la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). En effet, la CPG est une technique d'analyse chimique très performante compatible avec les contraintes d'une mission spatiale telles que la miniaturisation, l'automatisation et la faible consommation en énergie. Elle présente, de plus, l'avantage de pouvoir être aisément couplée d'une part (en amont) à un système de préparation de l'échantillon (par exemple : pyrolyseur) et d'autre part à un système de détection approprié comme la spectrométrie de masse (SM). C'est la raison pour laquelle cette technique a été largement utilisée avec succès dans le passé (missions Viking, Venera…) et est actuellement présente dans celles qui sont en préparation comme MSL (SAM), Phobos Grunt (GAP) et Exomars 2018 (MOMA).

Dans une première phase le LISA, avec le soutien financier du CNES, a développé et adapté aux "conditions spatiales" plusieurs méthodes d'extraction (Buch *et al.* 2003; Buch *et al.* 2006; Buch *et al.* 2009) et de fonctionnalisation chimique (Rodier *et al.* 2001; Freissinet *et al.* 2010) compatibles avec la chromatographie en phase gazeuse, permettant pour certaines de préserver la chiralité des molécules traitées (séparation énantiomérique, homochiralité) (Zampolli *et al.* 2006; Zampolli *et al.*

2007; Freissinet *et al.* 2010). Ces travaux ont conduit à la réalisation d'un premier réacteur prototype (Meunier *et al.* 2005) qui a permis une première "qualification" des différentes techniques d'extraction et de fonctionnalisation développées avec les contraintes d'une expérimentation spatiale.

Dans une deuxième phase, toujours avec le soutien financier du CNES, nous avons conçu et fait réaliser par la société Mécano ID (Toulouse), un Dispositif de Préparation d'Échantillon (DPE) (livré fin juin 2008) sur lequel deux brevets ont été déposés. Ce dispositif est constitué d'un réacteur en titane (4 ml) et d'un système de plaques thermostatées qui permettent de réguler la température entre 20 et 500°C. Le DPE est également muni d'un capteur de pression, qui permet de suivre la formation de la phase gazeuse générée dans le réacteur entre 0 et 4 bars, et d'un sonicateur.

La troisième phase de cette étude à permis de mettre au point et de valider le processus analytique au sein du DPE. Il a ainsi été possible de proposer "une recette analytique" de détection de la matière organique extraterrestre pour l'expérience MOMA et de la tester sur un prototype de four MOMA. Le processus d'analyse peut être décomposé en trois grandes étapes temporelles :

1) - l'extraction
2) - la volatilisation ou fonctionnalisation
3) - L'injection

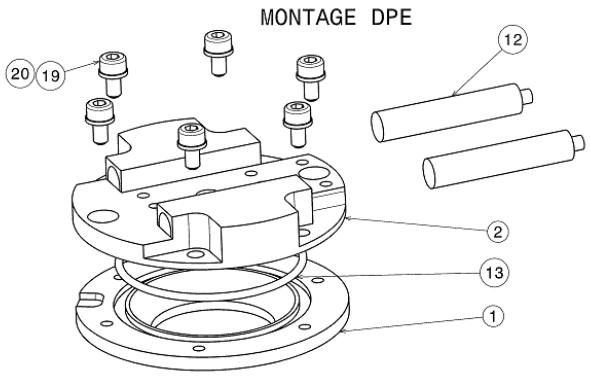
III.2. Le Dispositif de Préparation de l'Échantillon (DPE)

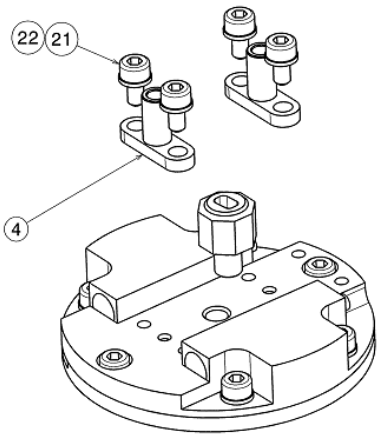
Le DPE a été conçu pour être un élément constitutif d'une chaîne d'analyse qui comprend en amont un système de prélèvement d'échantillon, et en aval un instrument d'analyse telle que la chromatographie en phase gazeuse qui permet l'analyse des molécules traitées par le DPE, l'ensemble devant être miniaturisé et automatisé pour une utilisation spatiale. L'objectif du DPE conçu pour cette étude est de disposer d'un moyen d'essai qui permette de démontrer la faisabilité de la préparation de l'échantillon dans des conditions représentatives de celles rencontrées *in situ*.
L'introduction de l'échantillon solide et des réactifs nécessaires se fait manuellement. Le DPE doit alors démontrer sa capacité à transformer et transférer les molécules ciblées qualitativement et quantitativement dans le système d'analyse CPG-SM.

III.2.1. Descriptif du Dispositif de Préparation d'Échantillon

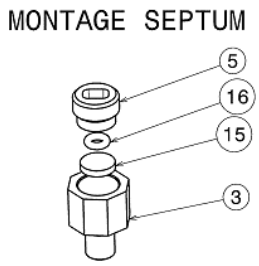
Le cœur du DPE est un réacteur en titane (Figure III.2-1) constitué d'une partie basse et d'une partie haute, chacune étant totalement indépendante l'une de l'autre. L'étanchéité entre ces deux partie est réalisée grâce à un joint de type Kalrez et 6 vis et rondelles en titane. Le volume interne du DPE est d'environ 4 mL avec un diamètre interne moyen de 26 mm. Ce réacteur est pourvu sur sa partie haute d'un septum (Figure III.2-1) qui permet l'introduction de liquide ou gaz *via* une seringue.

Ce septum permet également l'introduction de la sonde à ultrason qui fait partie du système d'analyse. La partie supérieure du DPE comprend deux cartouches chauffantes permettant d'assurer un chauffage modéré du DPE. Un thermocouple miniature est placé dans la partie inférieure et supérieure du DPE afin de contrôler et réguler sa température.





MONTAGE INTERFACE SUR DPE



Nomenclature de MID_754_ASS_11000_DPE

Numero	Quantite	Reference	Description du produit	Definition	Traitement
1	1	MID_754_3DE_11001	SUPPORT ECHANTILLON	TA6V	SILCOSTEEL
2	1	MID_754_3DE_11002	ENCEINTE	TA6V	SILCOSTEEL
3	1	MID_754_3DE_11003	SUPPORT SEPTUM	INOX 316	
4	2	MID_754_3DE_11004	EMBOUT GAZ DPE	INOX 316	
5	1	MID_754_3DE_11013	BOUCHON SUPPORT SEPTUM 2	INOX 316	
6	2	MID_754_3DE_11006	LAME SUPPORT	INOX 316	
7	1	MID_754_3DE_11007	SUPPORT LAME	TA6V	
8	1	MID_754_3DE_11008	SUPPORT RIGIDE DPE	INOX 316	
9	1	MID_754_3DE_11009	ENTRETOISE	INOX 316	
10	1	MID_754_3DE_11010	ENTRETOISE 2	INOX 316	
11	1	MID_754_3DE_11014	VIS DE PRESSION M3	INOX 316	
12	2	RESISTANCE THERMIQUE ENCEINTE	H1/4 x 1.2 x 100		
13	1	JOINT TORIQUE DPE	KALREZ 7075		
14	1	VIS DE PRESSION SUPPORT DPE	VIS PRESSION M3 TETON LONG		
15	1	SEPTUM	SEPTA THERMOLITE _6		
16	1	JOINT TORIQUE INTERFACE	JOINT TORIQUE VITON 1.8x1.2	FLUOROCARBONE	

Numero	Quantite	Norme	Description du produit	Definition
17	4	DIN 912	VIS CHC - M2.5 x 6	INOX
18	4	NF E 25514	RONDELLE PLATE Z Ø2.5	INOX

Numero	Quantite	Norme	Description du produit	Definition
19	8	DIN 912	VIS CHC - M3 x 6	TITANE
20	8	NF E 25514	RONDELLE PLATE Z Ø3	TITANE

Numero	Quantite	Norme	Description du produit	Definition
21	6	DIN 912	VIS CHC - M3 x 6	INOX
22	6	NF E 25514	RONDELLE PLATE Z Ø3	INOX

Figure III.2-1 schéma du DPE et nomenclature.

L'introduction de l'échantillon solide est réalisée en démontant la partie inférieure du DPE (Figure III.2-2). Pour se faire il suffit de retirer les 6 vis de la partie supérieure du DPE (Figure III.2-2). Une fois désolidarisée du reste du montage cette partie du DPE peut être nettoyée, séchée, pesée sans aucune contrainte.

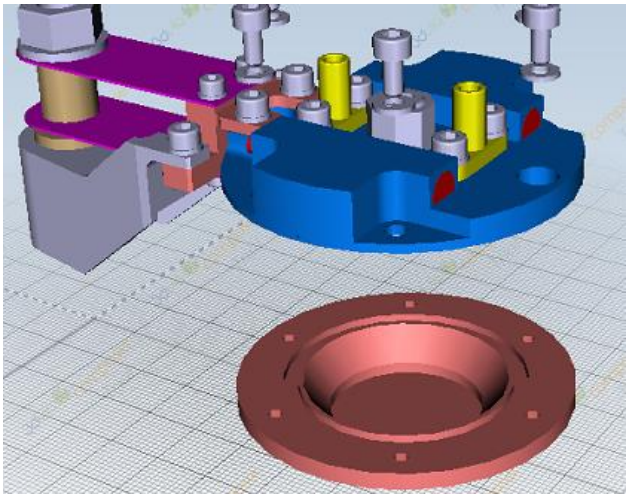


Figure III.2-2 : ouverture du DPE pour introduction de l'échantillon.

Pour son utilisation le DPE est placé sur un axe vertical rigide (Figure III.2-3) indépendant du mouvement du plateau rotatif sur lequel il est positionné (Figure III.2-3). Le DPE est maintenu sur cet axe par deux plaques semi-rigides qui lui donne un degré de liberté suivant l'axe vertical. Ce degré de liberté permet de ne pas endommager le DPE lors de sa mise en pression sur les plaques froides ou chaudes décrites plus bas. Cependant, lors des manipulations du DPE effectuées en position de repos (position 1 sur le plateau rotatif) il est possible de fixer le DPE sur un support rigide (Figure III.2-3). Ainsi il n'y aucun risque de déformation des plaques semi-rigide et il est alors possible, sans risque, d'ouvrir le DPE ou d'introduire via le septum des liquides dans le DPE

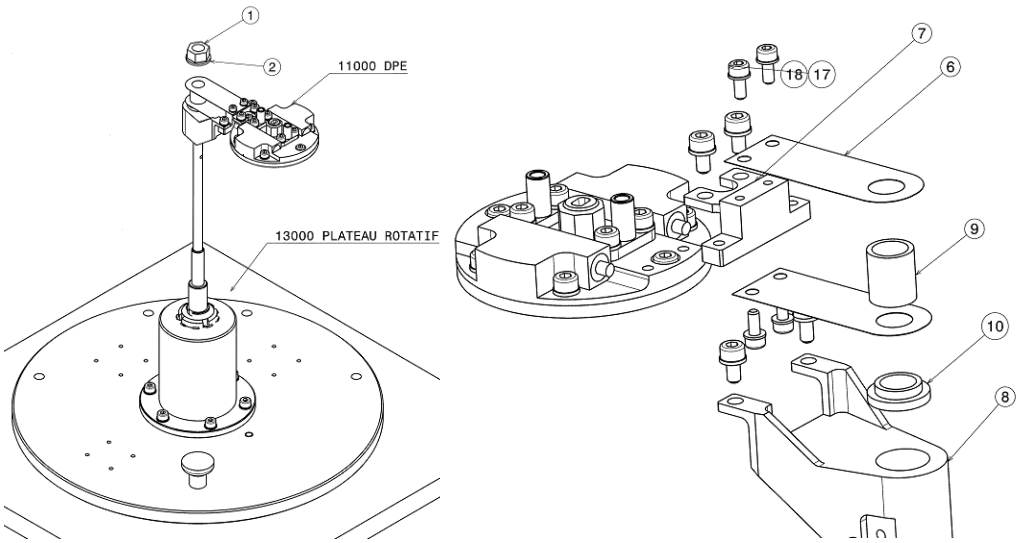


Figure III.2-3 : support du DPE et son plateau rotatif (cf. nomenclature Figure III.2-1).

Les montés et descentes en température du DPE sont obtenues par utilisation de deux plaques identiques qui peuvent être, en fonction de la configuration, soit chaudes soit froides (Figure III.2-4). Pour cela trois cartouches chauffantes assurent la montée en température de chacune de ces deux plaques. Les plaques chaudes/froides sont positionnées sur plateau rotatif et deux brides (Figure III.2-5) permettent en fonction des besoins d'appliquer au choix le DPE directement sur l'une des deux plaques. Les deux brides sont des vérins à levier qui sont actionnés manuellement par deux poignées rigides.

Un thermocouple miniature placé dans chacune des plaques chauffantes permet de contrôler sa régulation thermique. La commande de température des plaques chauffantes est réalisée au moyen d'une boucle de contrôle basée sur la température de ces dernières. Elle est assurée grâce à un régulateur PID auto-réglable qui commande l'alimentation des résistances chauffantes.

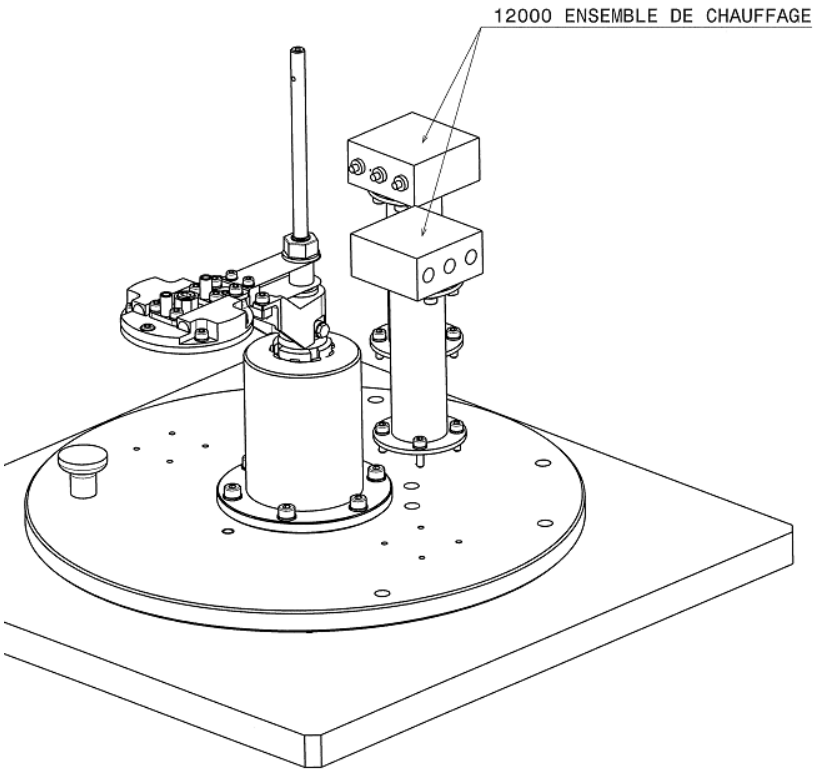


Figure III.2-4 : DPE et les deux plaques chauffantes (chaudes et/ou froides).

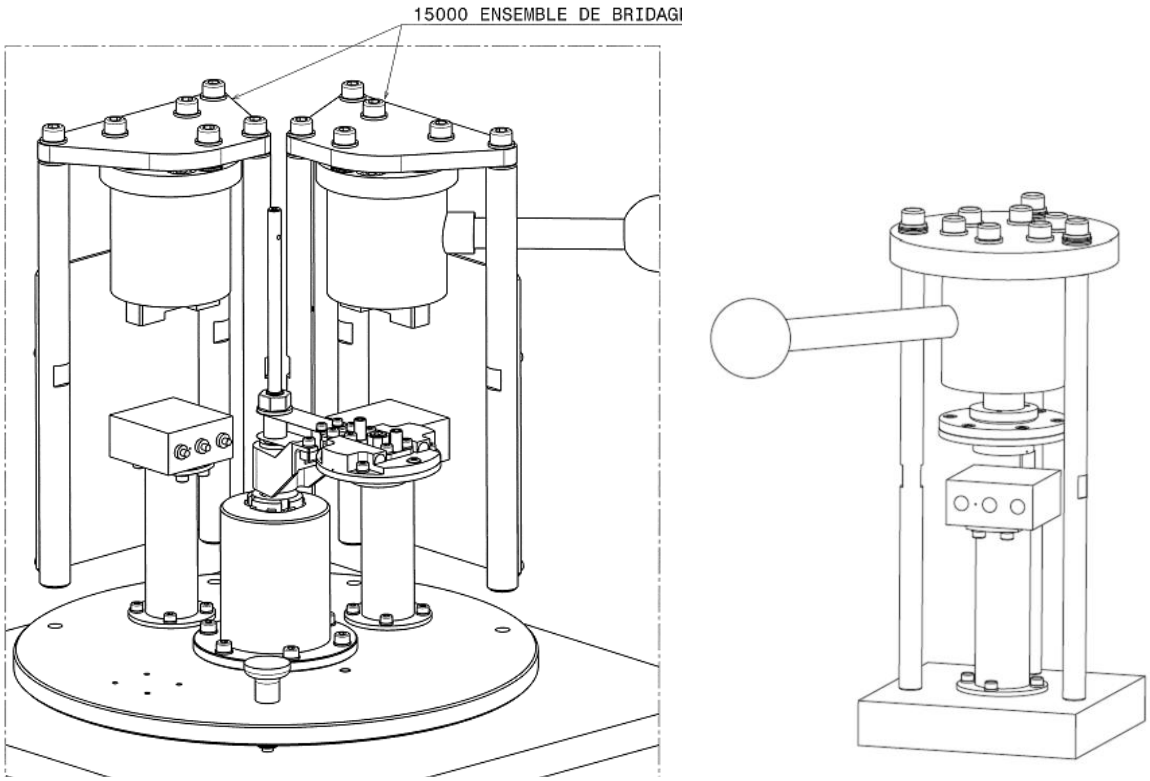
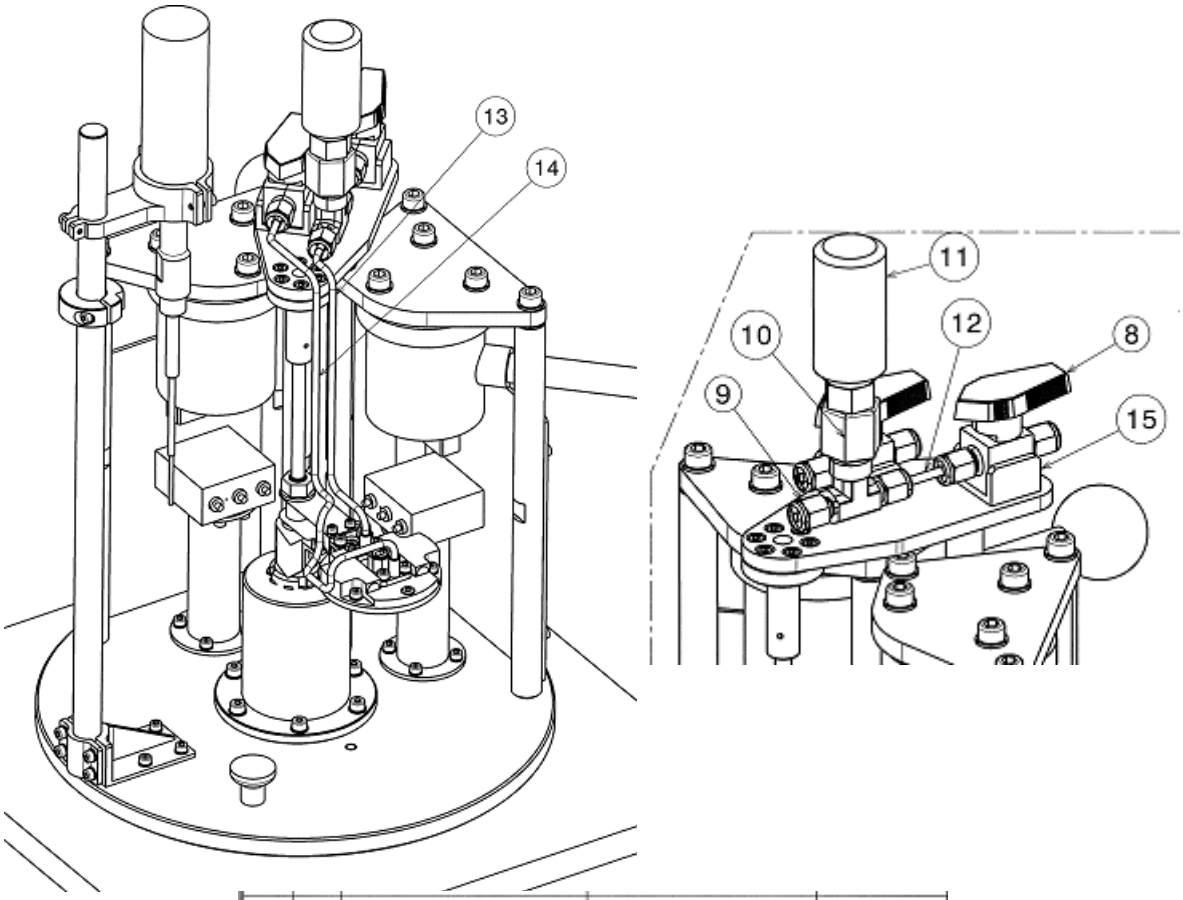


Figure III.2-5 : Ensemble DPE, plaques chaudes/froides et leurs deux brides.

Le DPE est connecté via du tube 1/16'' à une entrée de gaz et une sortie elle même connectée à un injecteur de chromatographie en phase gazeuse (Figure III.2-6). Les deux tubes de connexion, entrée et sortie, sont thermostatés à l'aide d'une résistance de type Thermocoax® qui permet d'atteindre une température de 250°C. Deux vannes Swagelok sont positionnées en amont et en aval du DPE de sorte qu'il puisse être isolé de l'extérieur. De plus un capteur de pression (Figure III.2-6) est positionné en sortie du DPE et en amont de la vanne à gaz. Ainsi il est possible de connaitre la pression au sein du DPE à tout moment de l'expérience.



8	2	VANNE	SWAGELOK SS-2P4T	
9	1	TE	SWAGELOK SS-200-3	
10	1	ADAPTATEUR 1/4 - 1/8	SWAGELOK SS-4-RA-2	
11	1	CAPTEUR DE PRESSION	TECSIS 3249	
12	1	MID_754_3DE_16003	TUBE GAZ 1/8' 1	INOX
13	1	MID_754_3DE_16004	TUBE GAZ 1/8' 2	INOX
14	1	MID_754_3DE_16005	TUBE GAZ 1/8' 3	INOX
15	2	MID_754_3DE_16006	SUPPORT VANNE	INOX

Figure III.2-6 : DPE dans son environnement.

Une sonde ultrasons a également été ajoutée afin d'accélérer les étapes d'extraction de la matière organique lorsque cela est nécessaire. Cette sonde est placée sur un axe rigide vertical et positionné sur le plateau rotatif (Figure III.2-7). Ainsi lorsque l'on tourne le plateau pour mettre en phase le DPE et la sonde, alors cette dernière est centrée au niveau du septum du DPE. Il suffit alors d'abaisser la sonde verticalement pour l'insérer de manière étanche dans le DPE.

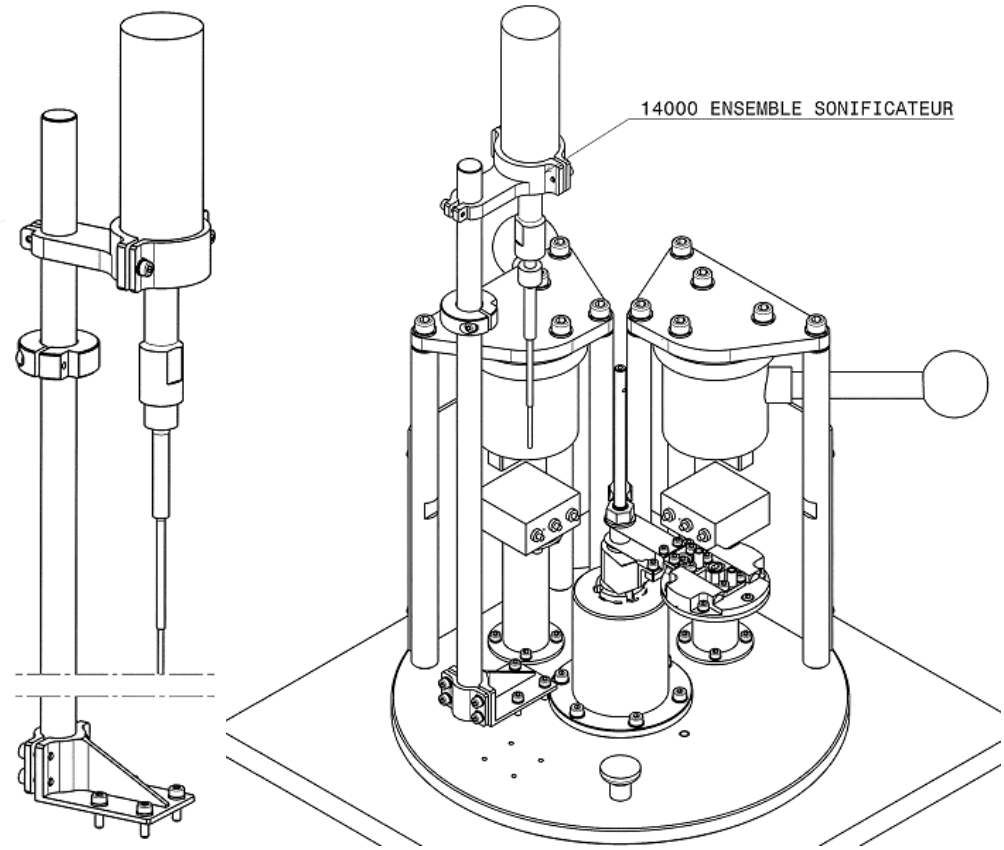


Figure III.2-7 : DPE et sa sonde ultrasons.

Une interface d'acquisition et de commande des régulations (Figure III.2-8) permet de réguler et de contrôler la température de chaque élément du DPE via une interface Homme-Machine (Figure III.2-9). Cette dernière interface est programmée sous Labview®. Les modules qui peuvent être contrôlés et commandés en température sont les suivants (Figure III.2-10) :

- DPE supérieur (deux cartouches chauffante). La température maximale utile est d'environ 250°C.
- Plaques chaudes/froides (trois cartouches chauffantes). Température limite régulée à 550°C.
- Résistance Thermocoax® chauffante sur les tubes d'entrée et sortie du DPE. La température maximale utile est de 250°C.

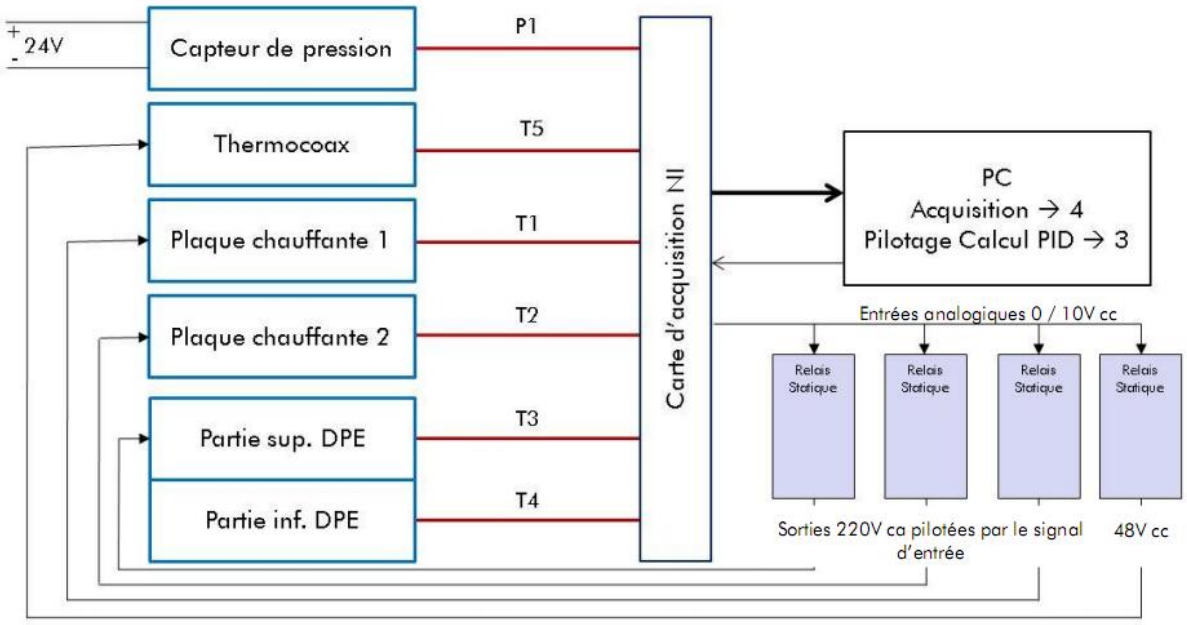


Figure III.2-8 : équipement de test et de contrôle du DPE.

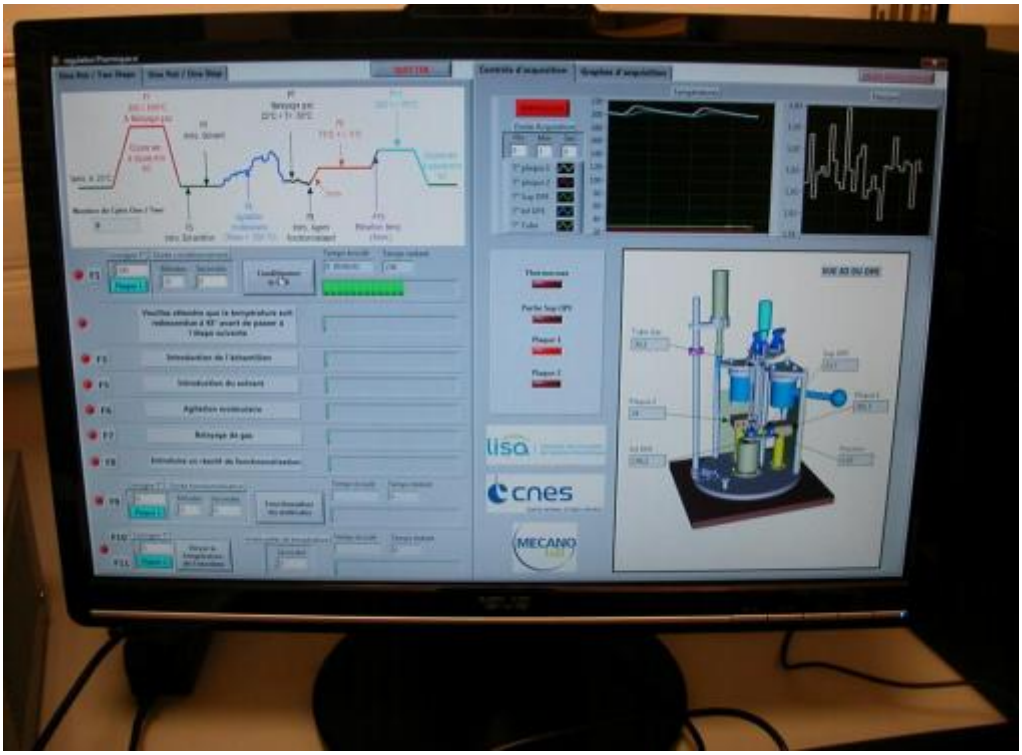


Figure III.2-9 : interface Homme-Machine.

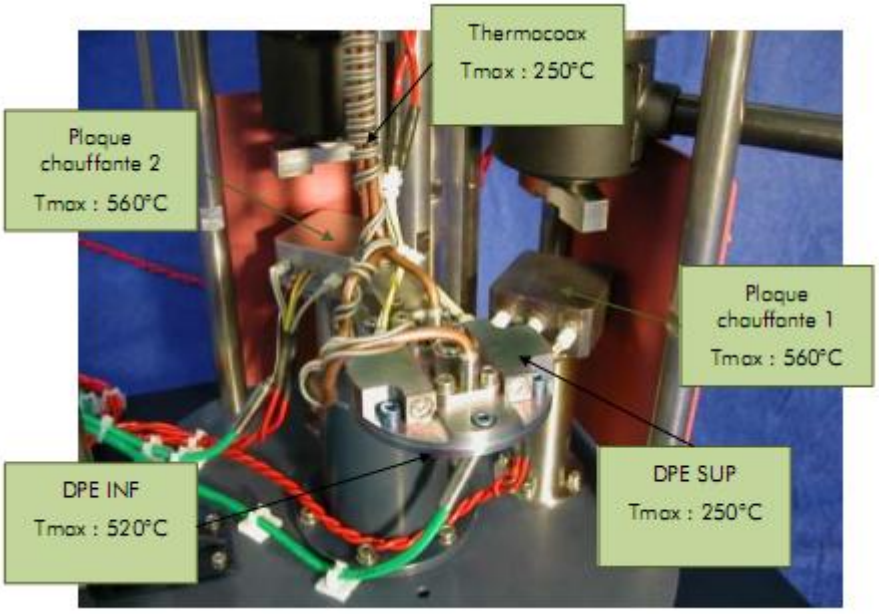


Figure III.2-10 : zones chauffantes du DPE et de ses modules externes.

Chacun de ces modules est alimenté par une alimentation externe basse tension directement reliée à l'interface d'acquisition et de commande.

L'ensemble DPE et ses différents modules sont présentés figure III.2-11 et figure III.2-12. Malgré des dimensions relativement importantes pour un tel outil (300 x 300 x 350 mm) il est important de noter que le réacteur n'occupe qu'un volume d'environ 5 mL. De plus, comme précisé plus avant ce prototype n'est qu'une première étape avant la miniaturisation pour des applications spatiales et doit permettre de valider l'ensemble de la procédure analytique d'analyse de la matière organique extraterrestre contenue dans des matrices solides.

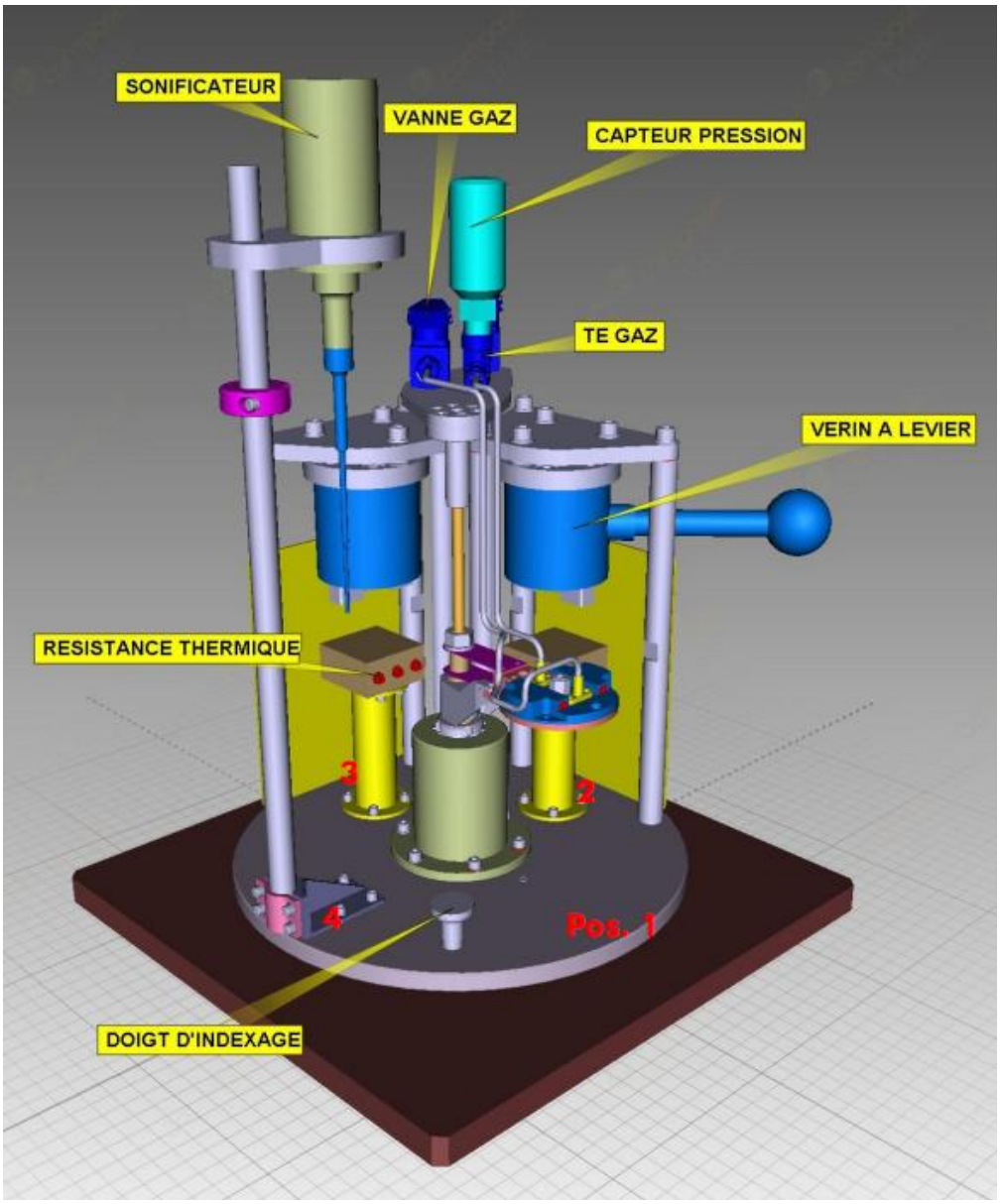


Figure III.2-11 : schéma du DPE et de ses différents modules.

Figure III.2-12 : photographie du DPE et de ses différents modules (plaques froides/chaudes, vérins de levier, sonotrode, *etc.*).

III.2.2. Principe général de fonctionnement du Dispositif de Préparation de l'Echantillon (DPE)

Le DPE été élaboré à partir d'un dossier correspondant à l'expression fonctionnelle du besoin. Ce cahier des charges à notamment été réalisé en collaboration étroite avec le CNES. A partir de ce cahier des charges correspondant au besoin fonctionnel deux grands types de procédés analytiques ont permis la réalisation du DPE. Ces deux procédures sont les suivantes :

- one pot - two steps
- one pot - one step

L'objectif final étant de réaliser une extraction de la matière organique contenue dans une matrice solide, liquide ou gazeuse puis de volatiliser cette matière organique en utilisant pour cela une technique de fonctionnalisation lorsque cela est nécessaire, et enfin de procéder au transfert des composés volatils dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse.

III.2.2.a. One pot - two steps

Cette procédure d'analyse consiste à réaliser dans un même lieu, le DPE, et en deux étapes, l'extraction des composés organiques issus d'une matrice solide (du sol en général) et leur fonctionnalisation.

La procédure est la suivante :

1) extraction solide-liquide de la matière organique
2) évaporation du solvant
3) injection du réactif de fonctionnalisation sur les résidus d'extraction
4) réaction de fonctionnalisation
5) transfert des composés fonctionnalisés dans l'injecteur du CPG

En effet, des études antérieures ont montré qu'une extraction solide-liquide avec un mélange eau-isopropanol (Buch *et al.* 2003; Meunier *et al.* 2007) suivie d'une fonctionnalisation au MTBSTFA permettait d'extraire un large spectre de composés organiques d'intérêt exobiologique.

III.2.2.b. One pot - one step

Cette procédure d'analyse consiste à réaliser dans un même lieu, le DPE, et en une seule étape, l'extraction des composés organiques issus d'une matrice solide (du sol en général) et leur fonctionnalisation.

La procédure est la suivante :

1) Thermodésorption
2) Libération du réactif de fonctionnalisation
4) réaction de fonctionnalisation
5) transfert des composés fonctionnalisés dans l'injecteur du CPG

La thermodésorption sera explicitée et étudiée de façon détaillée dans les paragraphes suivants. Cependant elle permet par chauffage à température relativement élevée durant un laps de temps réduit de désorber la matière organique non volatile contenue dans une matrice solide tel qu'un sol.

Durant cette thermodésorption le réactif de fonctionnalisation est encapsulé dans une enveloppe métallique dont un des orifices est composé d'un eutectique qui font à une température donnée et choisie préalablement.

III.2.2.c. Principe mécanique

Comme nous l'avons déjà explicité plus avant, afin d'opérer à la fois la procédure one pot - two steps et one pot - one step le système DPE comprend à la fois un réacteur et différents modules dont nous allons détailler l'utilité et le fonctionnement.

Pour toutes les procédures qui seront détaillées ici, nous considérons que le banc de test est dans la configuration suivante :

- L'ensemble des capteurs suivants sont branchés et l'acquisition des paramètres activée : sondes de températures (partie inférieure et supérieure du DPE, plaque chaude et froide, lignes de transferts d'entrée et de sortie du DPE) et manomètre
- l'équipement de test et de contrôle est connecté et le programme de commande actif
- Le DPE est en position 1, position de repos
- Les régulations thermiques ne sont pas activées
- La sonde ultrasons est en position haute
- Les vannes d'entrée et de sortie du DPE sont fermées
- Le réacteur n'est pas monté sur l'interface rigide
- Le septum et le joint torique Kalrez sont montés

1) Le DPE et ses deux cartouches chauffantes (Figure III.2-1)

Le DPE comprend sur sa partie supérieure deux cartouches chauffantes qui permettent de maintenir ce dernier à une température maximum de 250°C.

Ces cartouches peuvent être utilisées en complément de la plaque chaude lors de l'extraction solide-liquide ou encore lors de la volatilisation des composés fonctionnalisés pour les transférer dans l'injecteur du chromatographe. Dans ce dernier cas les lignes de transferts (entrée et sortie) du DPE sont thermostatées à 200°C grâce à la résistance Thermocoax® (Tableau III.2-1).

Tableau III.2-1 : procédure de transfert des composées organiques volatils du DPE vers l'injecteur du chromatographe.

N° action	Description de l'activité	Spécifications et résultats
1	Placer le plateau tournant en position 2 (au dessus de la plaque chaude 1)	
2	Mettre en pression le DPE sur la plaque de chauffe 1	
3	Régler la température de consigne T3 (température de la partie supérieure du DPE), T4 (partie inférieure du DPE) et T5 (Thermocoax®) à 200°C	
4	Démarrer les régulations thermiques	
5	Attendre que le temps nécessaire pour la volatilisation soit effectué	Stabilité < ±5°C
6	Ouvrir les vannes d'entrée et de sortie du DPE.	Le gaz vecteur (hélium ou azote) du chromatographe balaye le DPE.
7	Attendre que le transfert des composés volatilisés du DPE vers l'injecteur du CPG soit effectué.	
8	Arrêter les régulations thermiques	
9	Relâcher la pression du réacteur	
10	Replacer le plateau en position 1	

2) Plaque chaude (Figure III.2-4 et Figure III.2-5)

La plaque chaude est en inox et contient trois cartouches chauffantes. Elle permet des montées extrêmement rapides en température du DPE (Tableau III.2-2). En effet, lorsque le DPE initialement à température ambiante est mis en pression sur la plaque chaude préchauffée à 550°C alors le DPE atteint la température de 500°C en moins de 15 secondes. La température de la plaque est ensuite régulée à 500°C.

Tableau III.2-2 : procédure de montée en température du DPE sur la plaque chaude N°1.

N° action	Description de l'activité	Spécifications et résultats
1	Démarrer la régulation thermique de la plaque chauffante 1 (T1) à 550°C	
2	Attendre que la régulation thermique soit stable à 550°C	Stabilité < ±5°C
3	Placer le plateau tournant en position 2	
4	Mettre en pression le DPE sur la plaque chaude 1	
5	Attendre que le DPE atteigne 500°C A 500°C la régulation thermique basculera sur la température T4 du réacteur	Durée de la montée < 15 secondes
6	Attendre le temps de la thermodésorption	
7	Arrêter la régulation thermique	
8	Relâcher la mise en pression du réacteur	
9	Replacer le plateau en position 1 ou en position 3 pour un refroidissement rapide (cf. étape suivante)	

3) Plaque froide (Figure III.2-4 et Figure III.2-5)

Au niveau conception la plaque froide est identique à la plaque chaude, elle contient également 3 cartouches chauffantes ce qui lui permet d'être également utilisée en tant que plaque chaude.

En mode plaque froide la température de ce module correspond à la température ambiante. A l'inverse de la plaque chaude, la plaque froide permet des descentes extrêmement rapides en température. Ainsi lorsque le DPE initialement à 500°C est mis en pression avec la plaque froide, il passe de 500°C à environ 70°C en moins de 15 secondes (Tableau III.2-3).

Tableau III.2-3 : procédure de descente en température du DPE sur la plaque froide 2.

N° action	Description de l'activité	Spécifications et résultats
1	Relâcher la mise en pression du réacteur sur la plaque chaude N°1	
2	Placer le plateau en position 3 sur la plaque froide 2 (T2)	
3	Mettre en pression le DPE sur la plaque froide	
4	Attendre que le DPE atteigne 70°C. la régulation thermique basculera sur la température T3 du réacteur (partie supérieure) si besoin est	Durée du refroidissement < 15 secondes
5	Relâcher la mise en pression	
6	Replacer le plateau en position 1	

4) Sonde ultrasons (Figure III.2-7)

Comparée à une extraction solide-liquide classique, la sonde à ultrasons permet d'accélérer d'au moins un facteur 20 l'extraction de molécules organiques contenues dans un sol. Pour ce faire la sonde est positionnée grâce au plateau rotatif au centre du DPE face au septum et descendue dans le cœur du DPE via son axe vertical (Tableau III.2-4).

Tableau III.2-4 : Procédure d'extraction solide-liquide assistée par ultrasons.

N° action	Description de l'activité	Spécifications et résultats
1	Le DPE est monté sur son interface rigide en position 1	
2	Le volume de solvant nécessaire à l'extraction est introduit *via* le septum à l'aide d'une seringue	
3	Démonter le DPE de son interface rigide	
4	Placer le plateau tournant en position 4 (au dessous de la sonde ultrason)	
5	Mettre en place la sonde ultrasons dans le DPE	
6	Mettre la sonde ultrasons en fonctionnement	La température maximum du DPE doit être inférieure à 100°C
7	Attendre que l'extraction solide-liquide assistée par ultrasons soit terminée	
8	Retirer la sonde à ultrasons et la fixer en position haute	
9	Replacer le plateau en position 1	

III.3. Mise point d'un point d'un protocole expérimental d'analyse de la matière organique pour le spatial

Pour la mise au point de ce protocole analytique nous avons utilisé la procédure dite "one pot - one step" présentée dans le paragraphe précédent. En effet, afin de respecter les contraintes imposées par les expériences SAM et MOMA, il nous a semblé plus opportun de ne pas utiliser la technique d'extraction solide-liquide qui nécessite deux étapes et une évaporation de solvant. Cependant, cette procédure n'est pas pour autant abandonnée par le laboratoire mais elle ne fait pas partie de l'étude présentée ici.

L'avantage du processus "one pot - one step" est qu'il permet d'effectuer en un même lieu (le réacteur) et en quasiment une seule étape l'extraction et la fonctionnalisation de composés organiques réfractaires contenus dans une matrice solide. Pour cela et pour remplacer l'extraction par solvant nous avons développé une nouvelle technique dite de thermodésorption qui consiste en un chauffage relativement élevé de l'échantillon de sol sur un laps de temps relativement court. Ainsi les composés réfractaires sont arrachés et extraits de leur matrice et deviennent alors accessibles à la fonctionnalisation. Avant de pouvoir utiliser la technique de thermodésorption il a fallu mettre au point les différents paramètres de cette extraction (température, temps, masse d'échantillon, etc.) et

s'assurer de la compatibilité de cette technique avec la fonctionnalisation. Cette dernière s'effectuant en même temps ou à la suite de l'étape d'extraction.

Cependant avant d'optimiser les paramètres de la thermodésorption il a fallu choisir le type de sol qui sera étudié. En effet l'optimisation et la mise au point de la thermodésorption ne nécessitent pas forcément l'utilisation de sols de types analogues martiens alors que pour la validation du processus complet d'extraction et de fonctionnalisation il est indispensable d'utiliser des terres représentatives d'un sol extraterrestre (analogues, météorites, micrométéorites).

III.3.1. Les différentes matrices utilisées

III.3.1.a. Analogue

La réponse des microorganismes et/ou de leurs molécules fossiles aux sulfates, aux oxydants ou aux caractéristiques des sols récemment trouvés sur Mars doivent être pris en compte, de même que l'impact des radiations sur ces sols. De la même façon, les résultats de la méthode d'analyse (extraction, fonctionnalisation) peuvent diverger en fonction de la composition de la matrice étudiée. Par exemple certains réactifs de fonctionnalisation sont sensibles à l'eau. Ainsi, dans l'espoir de se rapprocher de sols extraterrestres, et en particulier du sol martien, les analogues sont de bons substituts. De nombreux sols parmi lesquels les jarosites de la Panoche Valley en Californie et les sols oxydants du désert d'Atacama au Chili (Figure III.3-1) ont été identifiés comme étant parmi les meilleurs analogues martiens connus à l'heure actuelle sur Terre.

Le désert d'Atacama est sujet à une puissante chimie de surface oxydante, et est extrêmement aride, avec une pluviométrie de seulement quelques millimètres sur des dizaines d'années. Il s'agit d'un des déserts les plus arides au monde (McKay, 2003). Ces conditions existent depuis 10-15 millions d'années, faisant de ce désert un des meilleurs analogues martien connu sur Terre. Il est essentiellement dépourvu de vie, même les algues hypolithiques trouvées dans d'autres déserts arides n'y se sont pas établies. De ce fait, ces sols sont extrêmement dégarnis en carbone. En effet, le sol de la région de Yungay, dans la partie la plus aride du désert d'Atacama, a une température moyenne comprise entre 10°C et 30°C avec seulement 2 à 3 mm de précipitations durant les 4 dernières années. Il contient de larges dépôts en nitrate (n'ayant pas subit de décomposition biologique). Ces dépôts salins sont également connus pour contenir des espèces particulièrement oxydantes. Cependant, ce désert, bien qu'excellent analogue Martien, ne reste qu'un analogue, et il existe de nombreuses différences significatives entre Mars et Atacama, notamment vis à vis de la disponibilité en eau, du flux solaire, de la composition chimique et de la minéralogie. Toutefois, des analogues de composés oxydants permettent des processus chimiques similaires. L'analyse d'échantillons de sols d'Atacama ont permis de conforter la théorie de Benner, selon laquelle les acides carboxyliques devraient exister abondamment dans les sols oxydants. Ces expériences (Navarro-Gonzalez *et al.* 2003; Navarro-Gonzalez *et al.* 2004) ont montré que ces sols contenaient

effectivement une grande concentration d'acides carboxyliques sous forme d'acide benzenecarboxylique, et d'autres composés organiques d'intérêt biologique en moindre concentration, comme de l'urée ou des acides aminés.

Le sol du désert d'Atacama est donc un excellent site pour tester les méthodologies mises en œuvre pour la caractérisation *in situ* de molécules organiques. La faible concentration en matière organique est un challenge pour les instruments et les expériences. Les limites de détection développées sur le sol d'Atacama seront donc en parfaite adéquation avec les limites de détection nécessaires pour les analyses du sol de Mars.

Figure III.3-1 : sol aride du désert d'Atacama (Chili).

Cependant, la mise au point d'une technique analytique d'extraction et d'analyse *in situ* de composés d'intérêt exobiologique nécessite d'optimiser un grand nombre de paramètres thermodynamiques et cinétiques ce qui nécessite un grand nombre d'expérimentations et des concentrations en composés organiques relativement élevées. En effet, durant l'optimisation les limites de détection et de quantification de la technique sont largement supérieures à celles nécessaires pour la détection des organiques présents dans les sols analogues. Or, comme nous venons de le voir, les sols analogues sont relativement pauvres en composés organiques les rendant peu appropriés à la mise au point des différents paramètres de la technique d'analyse. De plus, la quantité d'échantillon d'analogues martiens est relativement restreinte et ne permet pas l'utilisation d'un tel sol pour toutes ces phases de recherche. Pour toutes ces raisons, il est indispensable de travailler avec un sol beaucoup plus riche en composés cibles, C'est pourquoi nous établissons d'abord les variables de l'expérience sur un sol de jardin.

III.3.1.b. Sol de Jardin

Pour établir les paramètres de l'expérience, nous utilisons donc un sol considéré comme riche en matière organique : un sol de jardin. Pour une raison de proximité géographique, nous récoltons de la Terre dans le Parc de Sceaux (Figure III.3-2). Il s'agit d'un sol sur lequel nous nous attendons à trouver un taux élevé de molécules organiques. En effet, étant un sol de type "riche", il est supposé contenir de nombreux microorganismes, relarguant à leur mort la matière organique qu'ils contenaient. Un cycle du carbone développé y est donc présent, supposant ainsi être une source importante de matière organique.

Pour notre travail, ce sol est asséché (50°C - 48h) puis stocké sous vide pour limiter les traces de contamination et d'humidité. Pour s'affranchir de l'incertitude de la composition du sol, ce dernier a été caractérisé par des méthodes classiques d'extraction et d'analyse (soxhlet, utltrasons, micro-ondes).

Figure III.3-2 : Site de prélèvement du sol de "jardin", 92 Sceaux, France.

III.3.2. Caractérisation du sol de jardin

Afin de connaître les molécules cibles présentes dans le sol dit de jardin nous avons caractérisé qualitativement ce sol. Pour ce faire 3 techniques d'extraction ont été utilisées : l'extraction par soxhlet, par ultrasons et micro-ondes. Pour chacune de ces techniques deux types de solvants ont été envisagés : l'eau et l'isopropanol.

Pour chaque technique le protocole est sensiblement le même. 3 g de sol sont contactés avec 10 mL de solvant. Ce dernier peut être composé de solvant pur (eau ou isopropanol) ou d'un mélange 50/50 d'eau et d'isopropanol. Le temps d'extraction est fonction de la technique utilisée. Pour le soxhlet 12 à 24 h d'extraction sont nécessaires alors que pour les ultrasons et les micro-ondes 30 min suffisent. Les résultats de l'analyse qualitative sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (Tableau III.3-1).

Tableau III.3-1 : Analyse qualitative du sol de jardin (Parc de Sceaux, France) par extraction aux ultrasons.

Extraction Ultrasons – 6g de sol – extraction eau/isopropanol (1/1) 60°C 6 minutes		
Acide acétique	Alanine	Urée
Acide benzoïque	Glycine	Uracile
Acide pentanoïque	Valine	Thymine
Acide succinique	leucine	Cytosine
Acide methylsuccinique	Proline	Propan-1,2,3-tri-ol
Acide fumarique	Sérine	Acide benzoïque, 4-ol
Acide dodécanoïque	Acide phosphorique	Acide heptanedioïque
Acide octanedioïque	Acide tetradécanedioïque	Acide octadécanoïque
Acide 1,3,5-benzenetricarboxilique		

A partir de cette caractérisation nous allons pouvoir choisir quelques molécules cibles essentiellement parmi les acides aminés et optimiser la technique d'extraction *in situ* par thermodésorption.

III.3.3. Mise au point de la thermodésorption comme technique d'extraction *in situ*

L'objectif de ce travail est de montrer qu'il est possible de développer pour les futures missions extraterrestres et en particulier martiennes (MSL et ExoMars) une technique d'extraction de la matière organique extraterrestre compatible avec les contraintes actuelles de la spatialisation, à savoir une faible consommation d'énergie, des dimensions et un poids limité et peu ou pas de liquide embarqué. C'est dans ce but que la thermodésorption couplée à la fonctionnalisation a été développée au laboratoire, La fonctionnalisation permettant de volatiliser rapidement les molécules désorbées.

III.3.3.a. Principe de la thermodésorption

Le principe de la thermodésorption est relativement simple. Il consiste en un chauffage rapide plus ou moins élevé d'un échantillon solide localisé dans une enceinte hermétique de sorte que les composés réfractaires ou semi-volatils physisorbés sur ou dans la matrice puissent être désorbés. Les forces de liaison entre la matrice et les molécules cibles peuvent être de diverses natures physiques et chimiques incluant les forces d'attraction faibles de type Van der Waals et les forces électrostatiques développées par des dipôles et des ions. Or ces liaisons peuvent être aisément détruites grâce à un apport d'énergie thermique correspondant à l'énergie d'activation de désorption de la molécule considérée.

Tout l'enjeu de cette technique est donc d'extraire sans détruire. En effet, une température trop importante sur un laps de temps trop grand induirait une pyrolyse, à savoir la dégradation des organiques une fois extraits. Or le but visé est d'extraire ces composés de leur matrice sans dégrader leur squelette. Pour ce faire il est donc important d'optimiser correctement à la fois la température mais aussi le temps de chauffe et de pouvoir contrôler précisément ce temps. C'est notamment tout l'enjeu du développement du DPE (Paragraphe III.2 ci-dessus) qui permet justement un contrôle du temps de chauffe à 10 secondes prêt, jusqu'à une température de 500°C.

III.3.3.b. Principe de la fonctionnalisation

A la suite de l'étape de thermodésorption il est indispensable de volatiliser les composés désorbés afin de les séparer et les analyser par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Pour ce faire et en tenant compte des contraintes de la spatialisation nous avons réalisé l'étape de fonctionnalisation directement sur la matrice solide. Une fois l'étape de thermodésorption effectuée quelques µL (15 à 50 µL) de réactif de fonctionnalisation (DMF-DMA ou autres) sont ajoutés dans le réacteur via un septum ou une capsule de fonctionnalisation développée pour cet usage. Les composés ainsi fonctionnalisés sont alors transférés dans l'injecteur du chromatographe.

III.3.3.c. La thermodésorption

Procédure expérimentale

Comme explicité précédemment la mise au point de la thermodésorption comme technique d'extraction de composés réfractaires nécessite que l'on détermine les paramètres optimaux de temps et de températures. Nous avons donc choisi d'optimiser notre technique sur six composés d'intérêt exobiologique contenu dans le sol de jardin : la glycine, l'alanine, la leucine, la proline, la norvaline et l'acide succinique. Une comparaison avec une extraction solide-liquide assistée par ultrason a ensuite été réalisée.

1 g de sol est confiné dans le réacteur DPE et chauffé dans une gamme de température comprise entre 300 et 500°C pour une période de temps comprise entre quelques seconde et 30 minutes. Les composés thermodésorbés sont ensuite repris dans 2 mL d'un mélange d'eau et d'isopropanol (50/50). Le surnageant est alors séparé du sol et le solvant est évaporé. La fonctionnalisation des composés extraits (résidus secs) est alors opérée avec 30 µL de réactif de DMF-DMA. Les fonctionnalisats sont ensuite séparés et détectés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Afin de pouvoir effectuer une analyse quantitative relative nous avons utilisé comme étalon interne 1µ de méthyl laurate.

Afin de comparer l'efficacité de la thermodésorption avec une extraction solide-liquide en milieu eau-isopropanol (50/50) nous avons également utilisé 1 g de sol mélangé à 3 mL de solvant. Le mélange a été placé dans un bain à ultrason (35kHz, 220V) durant 15 minutes. Le surnageant à ensuite été prélevé et évaporé et la fonctionnalisation réalisée sur le résidu sec.

Le CPG utilisé est un ThermoElectron Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse à détection quadripolaire DSQ II ThermoElectron. Le débit de gaz vecteur (He, alpha2) est de 1 $mL.min^{-1}$ avec un split de 1/15. La colonne capillaire est une CP-Chirasil DEX CB d'une longueur de 30m, WCOT, d'un diamètre interne de 0,25mm et d'une épaisseur de phase de 0,25 µm. Sa température d'opération maximum est de 200°C. Le programme de température du four chromatographique débute à une température de 70°C qui est maintenue constante durant 5 minutes, suivie d'une augmentation de température à raison de 3°C/min jusqu'à 190°C, puis d'une stabilisation de 10 minutes à ce plateau maximum.

Résultats et discussion

Les résultats de la thermodésorption obtenus sur le sol de jardin sont présentés figure III.3-3. Le profil de réponse vis à vis des cinq acides aminés et de l'acide succinique est toujours le même : une augmentation de l'efficacité de désorption du composé avec la durée de chauffage, suivi d'un plateau plus ou moins important, puis d'une diminution de l'efficacité. Cette diminution est attribuée à une dégradation thermique au-delà d'un certain temps de chauffage. Plus la température est élevée, plus le plateau optimal est court. C'est pourquoi les conditions optimales qui sont choisies sont une température de chauffe de 300°C durant 8 à 15 minutes. Au delà de cette température, le plateau de l'optimum est trop court, et le risque est donc trop élevé de dégrader les molécules. Cependant, il est impensable qu'aucune dégradation n'ait lieu aux courtes durées de chauffage. Comme il en a été discuté pour la fonctionnalisation et son profil d'efficacité (même profil), l'augmentation apparente d'efficacité consiste en une augmentation différentielle entre le réarrangement des molécules (les rendant disponibles à la fonctionnalisation ultérieure et ainsi à leur volatilisation) et la dégradation. Le plateau correspond à un équilibre entre ces deux phénomènes, et la diminution finale correspond à une diminution du nombre de molécules "à réarranger" mais à une dégradation égale, voire

supérieure, des molécules. Malheureusement, la dégradation intrinsèque ne peut être quantifiée, et seul le résultat des deux phénomènes superposés est visible et analysable.

A 300 °C durant moins de 15 minutes, l'énergie apportée par la chaleur est alors utilisée pour casser les liaisons physiques ou chimiques de la molécule avec le sol et/ou réarranger les molécules de manière à les rendre accessibles au réactif de fonctionnalisation ultérieur. Cette énergie n'est pas suffisante pour dégrader thermiquement la molécule. En revanche, à long terme, toutes les molécules ont été désorbées et sont alors vulnérables à la température puisque la matrice solide ne joue plus son rôle protecteur. L'énergie thermique supplémentaire serait alors utilisée pour dégrader et/ou pyrolyser les molécules.

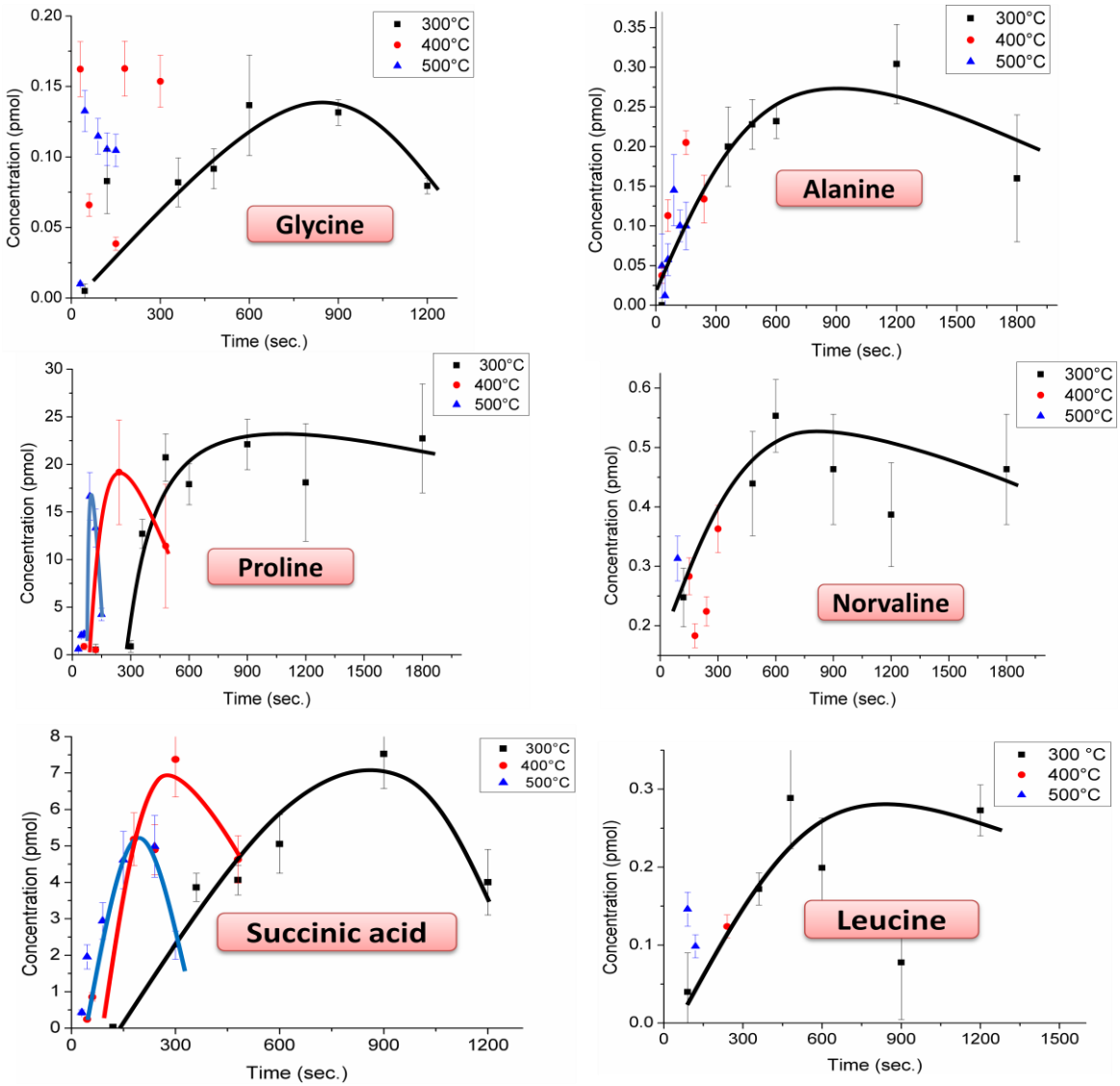


Figure III.3-3 : Profil d'extraction des composés réfractaires désorbés du sol de jardin par thermodésorption à températures croissantes (300 à 500°C) sur des durées variant de 0 à 1800 secondes. Après thermodésorption, les composés sont fonctionnalisés puis analysés par CPG-SM.

III.3.3.d. Comparaison thermodésorption - extraction solide-liquide assistée par ultrasons

Afin de quantifier l'efficacité relative de la thermodésorption, cette dernière a été comparée à une extraction solide-liquide assistée par ultrasons. L'extraction par solvant est réalisée dans un mélange eau/isopropanol (50/50) durant 15 minutes. La thermodésorption est réalisée à 300°C durant 15 minutes.

Les résultats présentés dans le tableau III.3-2 tendent à prouver que la thermodésorption est plus efficace que la technique de référence à savoir l'extraction solide-liquide assistée par ultrasons. En effet, quelle que soit la molécule considérée parmi les sept choisies, on observe au minimum un facteur 10 en faveur des concentrations extraites *via* la thermodésorption.

Outre le fait que la thermodésorption est plus aisément réalisable au niveau spatial car elle ne nécessite aucune gestion de liquide ainsi qu'aucune évaporation ou séparation solide/liquide préalable, elle est également thermodynamiquement plus efficace. Et cela sur sept des composés cibles sélectionnés. Cette différence peut s'expliquer par la présence dans l'échantillon de sol de jardin d'une partie organique soluble et une autre insoluble. Or l'extraction solide-liquide ne permet pas d'atteindre les organiques contenus dans la partie insoluble. La thermodésorption permettrait quant à elle d'atteindre à la fois la partie soluble et insoluble.

Tableau III.3-2 : Comparaison de l'extraction solide-liquide assistée par ultrasons et de la thermodésorption sur 1 g de sol de jardin.

Composé détecté	Extraction par solvant (pmol.g^{-1})	Thermodésorption 300°C – 15 min (pmol.g^{-1})
Glycine	$2{,}1.10^{-2}$	$3{,}30.10^{-1}$
DL-Alanine	$3{,}38.10^{-1}$	1,31
DL-Proline	2,32	55,2
DL-Norvaline	ND	1,58
DL-Leucine	$1{,}65.10^{-2}$	$1{,}94.10^{-1}$
DL-Norleucine	ND	$3{,}75.10^{-1}$
Acide succinique	3,25	18,8

ND : non détecté

III.4. Application à l'expérience MOMA de la thermodésorption suivie de la fonctionnalisation au DMF-DMA

III.4.1. Contraintes de la spatialisation

L'intérêt de la thermodésorption est qu'elle permet de combiner à la fois la désorption des molécules physisorbées dans un sol et la fonctionnalisation de ces dernières, tout cela en une seule étape et en un seul lieu. Ainsi la thermodésorption suivie par la fonctionnalisation permet de répondre positivement aux contraintes applicables au système lors d'un vol et d'une analyse *in situ* du sol martien.

A la suite des deux études concernant l'optimisation de la thermodésorption et de la fonctionnalisation (Paragraphes II.2.2.d et III.3.3.c), il semblerait logique de chauffer le réacteur contenant le sol jusqu'à 300°C durant 10 minutes, de le refroidir à 140°C, d'injecter le DMF-DMA, d'attendre 3 minutes que la réaction de fonctionnalisation soit optimale, et d'injecter les composés volatilisés dans l'injecteur porté à 200°C.

Malheureusement, il faut ici prendre en compte les contraintes techniques liées à la spatialisation de l'expérience elle-même. Ces contraintes sont de loin supérieures pour une expérience automatisée *in situ* que pour une expérience réalisée en laboratoire sous le joug des expérimentateurs. Une des contraintes concerne l'injection du DMF-DMA. En laboratoire, cet apport est réalisé par injection directe par seringue *via* un septum localisé sur la partie supérieure du réacteur. Or l'expérience *in situ* n'aura pas cette fonctionnalité. En effet il sera impossible de délivrer dans le réacteur autre chose que l'échantillon à analyser.

Pour pallier ce problème, le DMF-DMA sera encapsulé dans une petite capsule de volume 20 µL qui possède un orifice composé d'un eutectique qui a la propriété de fondre à une température donnée choisie par l'expérimentateur. Ainsi il est possible de libérer l'agent de fonctionnalisation à cette même température sans aide extérieure (Figure III.4-1).

Cette capsule sera présente dans le réacteur et subira donc les différentes températures liées à la thermodésorption et aux procédures de stérilisation. Toutes ces procédures sont des contraintes fortes pour la fonctionnalisation et la thermodésorption. En effet, cela implique que la température de fonctionnalisation soit impérativement supérieure à la température de thermodésorption, pour ne pas libérer le DMF-DMA durant la première phase.

Malheureusement, la température optimale de thermodésorption est de 300°C, et celle de fonctionnalisation de 140°C. Compte tenu de l'ordre temporel de chacune de ces étapes il y a une incompatibilité si on ne veut pas que le réactif de fonctionnalisation soit délivré durant la thermodésorption. Nous devons alors nous attacher à trouver le meilleur compromis possible entre la

température et le temps de thermodésorption et la température de fonctionnalisation. La température de thermodésorption doit être suffisamment élevée pour que la thermodésorption soit efficace et suffisamment faible pour la fonctionnalisation puisse avoir lieu sans racémiser les acides aminés chiraux contenus dans la matrice.

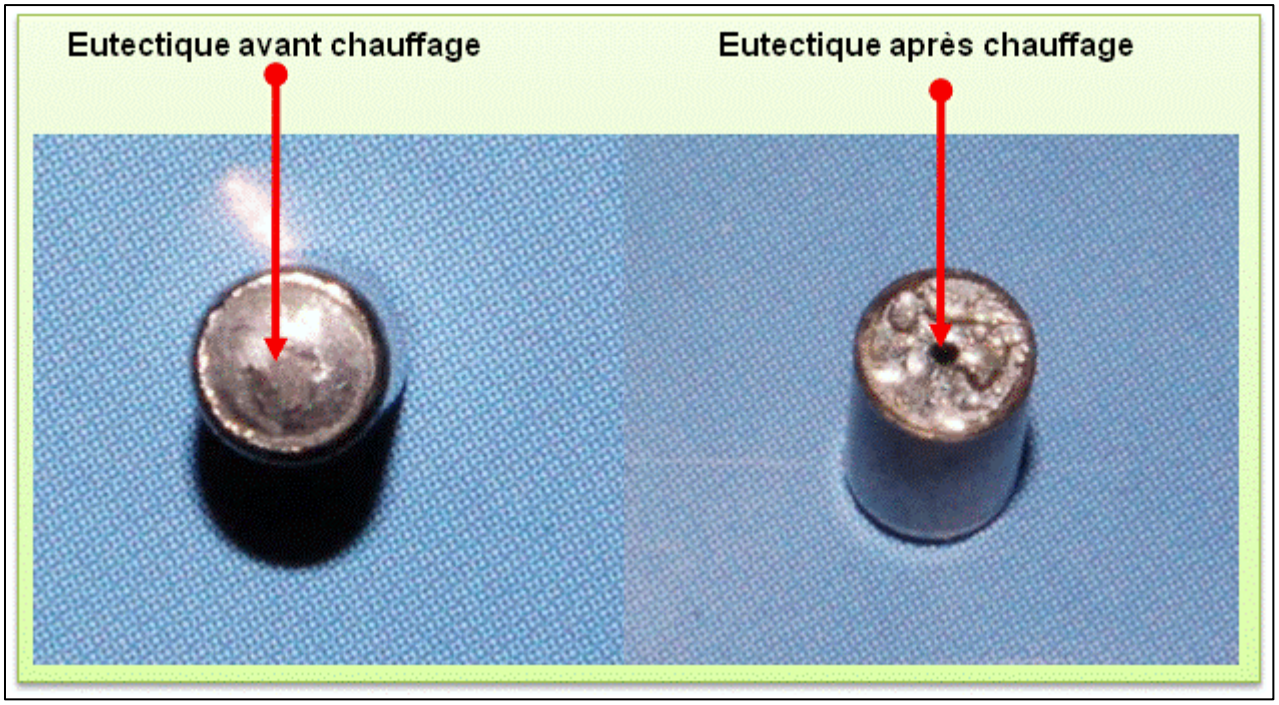


Figure III.4-1 : capsule de fonctionnalisation de l'expérience MOMA.

Pour des questions de temps, cette étude n'est que préliminaire. Il s'agissait dans un premier temps de prouver que la technique de thermodésorption couplée à la fonctionnalisation était envisageable pour une expérience *in situ*. Pour ces raisons, seules des données qualitatives ont été recherchées. Dans un second temps il faudra reprendre ce travail afin d'obtenir des données quantitatives permettant de caractériser précisément cette technique (LOD, LOQ etc.).

III.4.2. Procédure expérimentale

Les principaux paramètres contrôlables et optimisables sont la température et la durée de la thermodésorption ainsi que celles de la fonctionnalisation. Comme lors de l'étude sur la comparaison des deux techniques (thermodésorption et extraction assistée par ultrasons) 200 mg d'échantillon de sol de jardin ou d'Atacama sont disposés dans le réacteur accompagnés de 15µL de réactif de fonctionnalisation (DMF-DMA) encapsulés. Une fois le réacteur fermé hermétiquement, il est balayé par un flux d'hélium afin d'éliminer l'oxygène qui pourrait induire des réactions d'oxydation, ces dernières étant facilitées par les fortes températures. Le circuit d'hélium est ensuite détourné pour isoler le réacteur, alors sous pression atmosphérique d'hélium. Le four est ensuite chauffé à des températures comprises entre 100 et 300°C par paliers de 50°C, durant un temps compris entre

quelques secondes et 30 minutes. La procédure de fonctionnalisation est ensuite appliquée telle que déterminée précédemment, à savoir 15 µL de DMF-DMA dispensés à la température de fonctionnalisation choisie. Après quelques secondes à quelques minutes de fonctionnalisation, le réacteur est de nouveau balayé par de l'hélium afin de transférer les composés extraits et fonctionnalisés dans l'injecteur du chromatographe. Cette étape de transfert a lieu durant 30 secondes.

Les meilleures températures et durée de thermodésorption sont alors déterminées, et prises en compte afin d'opérer la fonctionnalisation dans les meilleures conditions. La fonctionnalisation est alors testée à la température choisie proche de celle de la thermodésorption sur un temps allant de 15 secondes à 2 minutes. Le sol d'Atacama est ensuite utilisé afin de valider les paramètres de l'expérience dans des conditions proche de l'analyse martiennes *in situ*.

Le CPG utilisé est un ThermoElectron Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse à détection quadripolaire DSQ II ThermoElectron. Le débit de gaz vecteur (He, alpha2) est de 1 $mL.min^{-1}$ avec un split de 1/15. La colonne capillaire est une CP-Chirasil DEX CB d'une longueur de 30m, WCOT, d'un diamètre interne de 0,25mm et d'une épaisseur de phase de 0,25 µm. Sa température d'opération maximum est de 200°C. Le programme de température du four chromatographique débute à une température de 70°C qui est maintenue constante durant 5 minutes, suivie d'une augmentation de température à raison de 3°C/min jusqu'à 190°C, puis une stabilisation 10 minutes à ce plateau maximum.

III.4.3. Résultats et discussion

Comme précisé plus avant, les résultats présentés ici sont des résultats préliminaires obtenus en fin de thèse. Une étude quantitative nécessitant beaucoup plus de temps, seule une étude qualitative a donc été effectuée pour approcher les meilleures couples de température et de temps pour la thermodésorption et la fonctionnalisation.

III.4.3.a. Optimisation de la température

Une rapide étude qualitative de l'influence de la température sur l'intégralité du processus de thermodésorption/fonctionnalisation a été menée. Cette étude a été réalisée sur une échelle de températures restreinte puisque étendu de 200 à 300°C. A cela plusieurs raisons. Nous avons tout d'abord tenu compte de la température de stérilisation de l'ensemble de l'expérience. En effet, compte-tenu du fait que les réactifs de fonctionnalisation seront stockés dans une capsule thermolabile il n'est pas envisageable de réaliser cette étape à une température inférieure à la température de stérilisation. De plus, les résultats détaillés et présentés dans le paragraphe précédent

tendent à prouver que l'optimum de thermodésorption se trouve aux environs de 300°C. Enfin il est inutile de dépasser cette température de 300°C puisque la fonctionnalisation sera inefficace.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau III.4-1. On retiendra de ces résultats qu'aucun acide aminé n'a pu être détecté pour des températures supérieures à 200°C alors que quelques composés ont pu être identifiés à 200°C. Contrairement à ce que l'on pourrait en déduire hâtivement la limitation en température n'est pas liée à la thermodésorption mais bien à la fonctionnalisation qui suit l'étape d'extraction. Cela est une confirmation que la fonctionnalisation au DMF-DMA doit être effectuée à une température égale ou inférieure à 200°C sous peine de ne fonctionnaliser aucun des composés extraits. Il semble maintenant évident qu'une température trop élevée de fonctionnalisation détruira les molécules organiques lors de la réaction. Or cette température de fonctionnalisation ne peut être établie à une température inférieure à celle de la thermodésorption, ainsi le couplage thermodésorption-fonctionnalisation à 300°C sera moins efficace car plus destructeur que la même expérience à 200°C.

Tableau III.4-1 : matière organique détectée pour différentes températures de thermodésorption. La thermodésorption est réalisée pendant 10 minutes. La fonctionnalisation est réalisée à la température de la thermodésorption.

Température de thermodésorption (°C)	Molécules détectées
200	Ala – Gly – Val
250	ND
300	ND

III.4.3.b. Optimisation de la durée de la thermodésorption

Compte-tenu des précédents résultats, cette seconde série d'expériences a été menée à une température de thermodésorption égale à 200°C. Cette valeur est inférieure à la température optimale de thermodésorption déterminée précédemment (paragraphe III.3.3.c ci-dessus) mais elle a l'avantage de permettre la fonctionnalisation à des températures plus clémentes comparé aux 300°C (valeur optimale de thermodésorption seule).

Avec une température de thermodésorption de 200°C nous avons fait varier la durée de la thermodésorption entre 5, 10 et 15 minutes. La fonctionnalisation a été opérée en présence de 15 µL de DMF-DMA durant 30 secondes à la température de 220°C. Ce paramètre n'agit que sur l'efficacité de la thermodésorption, sans avoir de conséquence directe sur l'efficacité de la fonctionnalisation. La conséquence indirecte est bien sûr une différence de quantité de molécules disponibles à la fonctionnalisation.

Tableau III.4-2 : acides organiques détectés à différents temps de thermodésorption (200°C) suivi par une fonctionnalisation de 30 secondes à 220°C.

Durée de thermodésorption à 200°C (min)	Molécules détectées
5	Val (x2) – Gly – Ile – Pro – Asp – Gln – AIB
10	Val (x2) – Gly – Ile – Asp – Gln – AIB
15	Val – Gly – Ile – Gln

Dans le domaine de durée étudié il apparaît (Tableau III.4-2) que plus la durée de thermodésorption est courte, plus un nombre élevée de molécules organiques fonctionnalisées peuvent être détectées. En effet, pour un temps de thermodésorption de 5 min, on détecte sept acides aminés différents alors qu'après 10 et 15 min seuls six et quatre de ces acides sont respectivement détectés. D'un point de vue purement qualitatif une durée de 5 minutes à 200°c semble la plus efficace.

III.4.3.c. Optimisation de la durée de fonctionnalisation

Pour ces conditions de la thermodésorption (200°C, 5 minutes), le temps de fonctionnalisation a été varié. La modulation est donc effectuée sur la durée de cette fonctionnalisation : 15'', 30", 45", 1', 1'30 et 2'. Parmi ces six durées étudiées il semble qu'un temps de 45" de fonctionnalisation est préférable. En effet pour ce paramètre la réponse chromatographique est meilleure ce qui signifie que le rendement de la réaction est plus important.

Au regard de ces premiers résultats, les paramètres optimaux du couplage thermodésorption-fonctionnalisation obtenus sont les suivants : 5 minutes de thermodésorption à 200°C, suivi d'une fonctionnalisation à 220°C durant 45 secondes.

A la suite de ces premiers résultats les paramètres de thermodésorption ont été repris afin d'optimiser le temps de cette première étape avec une fonctionnalisation de 45". De plus l'étude des résultats obtenus dans le tableau III.4-2 ne montre aucun optimum de thermodésorption. En effet le manque de points expérimentaux entre 0 et 5 minutes ne permet pas de conclure quant à la durée optimale. Nous avons donc entrepris d'étudier des durées de thermodésorption comprises entre 0 à 30 minutes (Tableau III.4-3).

Tableau III.4-3 : acides organiques détectés à différents temps de thermodésorption (200°C) suivi par une fonctionnalisation de 45 secondes à 220°C.

Durée de thermodésorption à 200°C (min)	Molécules détectées
0	Val – Lys – T - Norval
1	Val (x2) – Lys – T – Norval
2	Lys – T – U – Norval
4	Gly – Val (x2) – Asn - Lys – T – U – Norval
5	Ala – Gly – Val (x2) – Asn - Lys – T – U – Norval
7,5	Ala (x2) – Gly – Val (x2) – Lys – T – U – Norval
10	Ser - Ala – Gly – Val (x2) – Lys – T – U – Norval
30	-

L'observation des résultats compilés dans le tableau III.4-3 montre que pour des durées comprises entre 4 et 10 minutes de thermodésorption le nombre de composés détectés est plus important que pour des durées comprises entre 0 et 2 min et entre 10 et 30 min. En deçà de 4 min, certaines molécules ne sont pas détectées. Au-delà de 10 minutes, la seule valeur de temps disponible est 30 minutes. A cette durée, aucun composé ne peut être détecté. 5 minutes semblent donc toujours être la valeur optimale de thermodésorption à 200°C.

III.4.3.d. Influence de la quantité de sol et de réactif

Une étude préliminaire sur la qualité du signal final recueilli en fonction de la quantité de sol initiale montre une différence quantitative de la réponse chromatographique en fonction de la quantité de sol initial analysé (0,05g *vs.* 0,2g). Moins de sol à analyser tend à donner des intensités de pics supérieures. Cela est probablement dû à la meilleure disponibilité du réactif sur les molécules d'intérêt, plutôt que sur le sol ou sur des espèces parasites. Cela sous-entendrait alors que de nombreuses molécules disponibles après thermodésorption ne sont pas fonctionnalisées par manque d'interactions avec le solvant. En effet, le DMF-DMA, en excès dans les expériences des chapitres précédents sur des solutions pures, se retrouve sur les échantillons de terre à interagir avec de nombreuses molécules du sol, notamment des molécules d'eau hyper-réactionnelles. Le sol lui-même peut être une source d'interaction et de chélation du réactif. Cette propriété peut être observée par l'absence des pics caractéristiques du DMF-DMA, indiquant que le composé n'est plus en excès par rapport à l'échantillon.

Nous retenons donc ces paramètres pour la suite de notre étude, à savoir une analyse de 50 mg de sol soumis à 5 minutes de thermodésorption et 45 secondes de fonctionnalisation à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA.

III.4.4. Proposition et tests de la procédure d'analyse des composés réfractaires pour l'expérience MOMA

III.4.4.a. Méthodologie

Les différentes expériences présentées ci-dessus nous ont permis d'obtenir des informations préliminaires quant au choix de la température et de la durée de thermodésorption et de fonctionnalisation. Ces valeurs sont le résultat d'un compromis, entre l'efficacité de la thermodésorption et de la fonctionnalisation. C'est pourquoi ils ne correspondent pas aux valeurs optimales déterminées pour la thermodésorption ou la fonctionnalisation étudiées séparément. Les résultats obtenus nous amènent donc à proposer comme protocole d'extraction les paramètres suivants : une première étape de thermodésorption à 200°C durant 5 minutes, suivie d'une fonctionnalisation à environ 220°C durant 45 secondes.

Entre chaque expérience, le réacteur DPE est parfaitement nettoyé à l'aide de trois solvants différents. Un premier lavage à l'eau assisté par ultrasons permet d'éliminer le plus gros de la pollution. Puis un lavage à l'alcool permet d'éliminer une potentielle contamination bactérienne. Enfin un dernier lavage à l'acétone est effectué afin d'éliminer d'éventuelles traces d'organiques ou d'eau résiduelle.

Avant chaque nouvelle expérience sur le sol de jardin ou d'Atacama deux types de blanc sont réalisés. Le premier consiste en une injection de quelque µL de réactif de fonctionnalisation à 220°C puis un second sans ajout de réactifs mais par simple chauffage du DPE à 220°C. Cette double procédure permet de s'assurer de l'absence de toute impureté volatile et/ou réfractaire. En cas de blanc positif le réacteur est de nouveau nettoyé et un nouveau blanc est effectué. Cela jusqu'à obtention d'un chromatogramme ne présentant aucune trace de pollution.

Nous allons maintenant présenter les résultats d'une expérience complète réalisée d'abord avec 50 mg de sol de jardin, sol qui nous a permis d'optimiser la méthodes de thermodésorption couplée à la fonctionnalisation, puis sur 50 mg d'un analogue martien, sol prélevé dans le désert d'Atacama au Chili. Pour chacun de ces sols l'analyse chromatographique est réalisée en mode analytique SIM. En effet, l'analyse d'une faible quantité (50 mg) d'un sol aussi riche soit-il, implique que la quantité de composés organiques détectés puisse être faible, et cela d'autant plus si les composés cibles recherchés ne sont pas majoritaires. Or un facteur de sensibilité de l'ordre de 10 est observé en faveur du mode de dépouillement SIM comparé au mode full scan. Il est donc important de pouvoir effectuer l'interprétation de chacun des chromatogrammes obtenus en mode SIM. Il est toutefois important de noter qu'ici l'acquisition des données a été réalisée en mode full scan. L'acquisition en mode SIM nécessite que les composés recherchés soit parfaitement identifiés dans l'échantillon, or cela n'est pas le cas pour nos échantillons et en particulier pour le sol d'Atacama. Cependant, il faut garder à l'esprit que ce mode d'acquisition peut néanmoins être extrêmement utile pour une recherche de composés parfaitement ciblés. Ce mode d'acquisition permet de gagner encore un facteur 10 en sensibilité.

Une autre difficulté relative à l'identification des composés traces est la coélution. Il n'est effectivement pas rare qu'un composé trace soit coélué avec un autre composé dont la concentration est dans le meilleurs des cas inférieure ou égale à celle du composé recherché. Dans ce cas bien particulier le mode SIM n'est pas toujours suffisant pour identifier de façon certaine le composé cible. Il est alors nécessaire de vérifier que le temps de rétention du composé détecté corresponde bien au temps de rétention du composé pur. Il est donc essentiel d'avoir au préalable établi une librairie de spectres de masse ainsi que des caractéristiques d'élution des composés recherchés dans les conditions précises de l'expérience.

L'exemple de la valine détectée dans l'échantillon de sol de jardin est particulièrement parlant. Le chromatogramme de la figure III.4-2 (haut) représente, en mode TIC (Total Ion Curent), les deux énantiomères d'un mélange standard de valine D et L élués respectivement à 20,32 et 20,45 minutes. Le chromatogramme (TIC) du milieu (Figure III.4-2) est celui du sol de jardin thermodésorbé à 200°C durant 5 minutes puis fonctionnalisé à 220°C durant 45 secondes. Pour détecter les molécules cibles d'intérêt, le mode SIM sur le fragment m/z = 143 u, caractéristique de la valine (Figure III.4-3, haut), est nécessaire. En effet, l'acquisition en mode SIM (m/z = 143 u, pic de base de la valine), nous permet d'observer deux pics chromatographiques correspondant à deux composés élués respectivement à 20,30 et 20,42 minutes.

Le spectre de masse correspondant au composé élué à 20,42 min (Figure III.4-3, bas) permet d'identifier clairement le spectre de la valine mais ce dernier est extrêmement bruité. Ce bruit de fond est le résultat d'une faible quantité de matière organique qui implique de travailler dans des domaines de concentration proche de la limite de détection de l'appareillage. Dans notre cas précis le bruit de fond n'est pas le seul responsable de la présence d'autres fragments intenses tels que les pics à m/z = 87 u et 97 u. Ils sont le résultat de coélutions avec d'autres composés organiques contenus dans le sol. Dans ce cas précis, l'identification de la D,L-valine est donc grandement facilitée par l'utilisation des temps de rétention obtenus dans les même conditions chromatographiques, à l'aide de standards.

Il est ainsi possible par comparaison à la fois des spectres de masse et des temps de rétentions de confirmer ou non, la présence d'un composé cible contenu en faible concentration dans l'échantillon analysé.

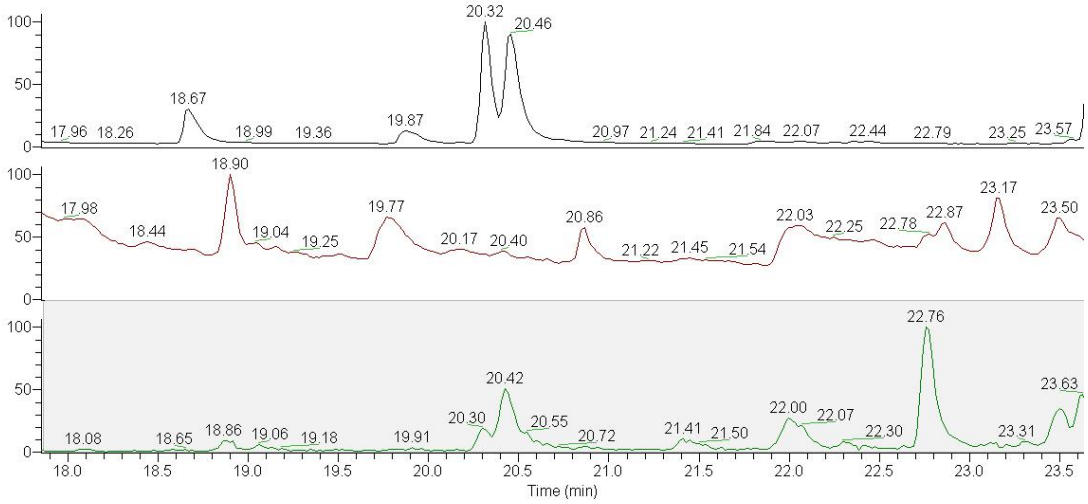


Figure III.4-2 : chromatogramme (full scan) d'un standard de D,L-valine (0,5 + 0,5 µL d'une solution à 10^{-1}M évaporés puis fonctionnalisés 3 min à 140°C avec 20 µL de DMF-DMA) (haut), chromatogramme de 50 mg d'un sol de jardin thermodésorbé 5 min à 200°C puis fonctionnalisé 45 secondes à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA, en mode full scan (milieu) et SIM (m/z=143 u) (bas). Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

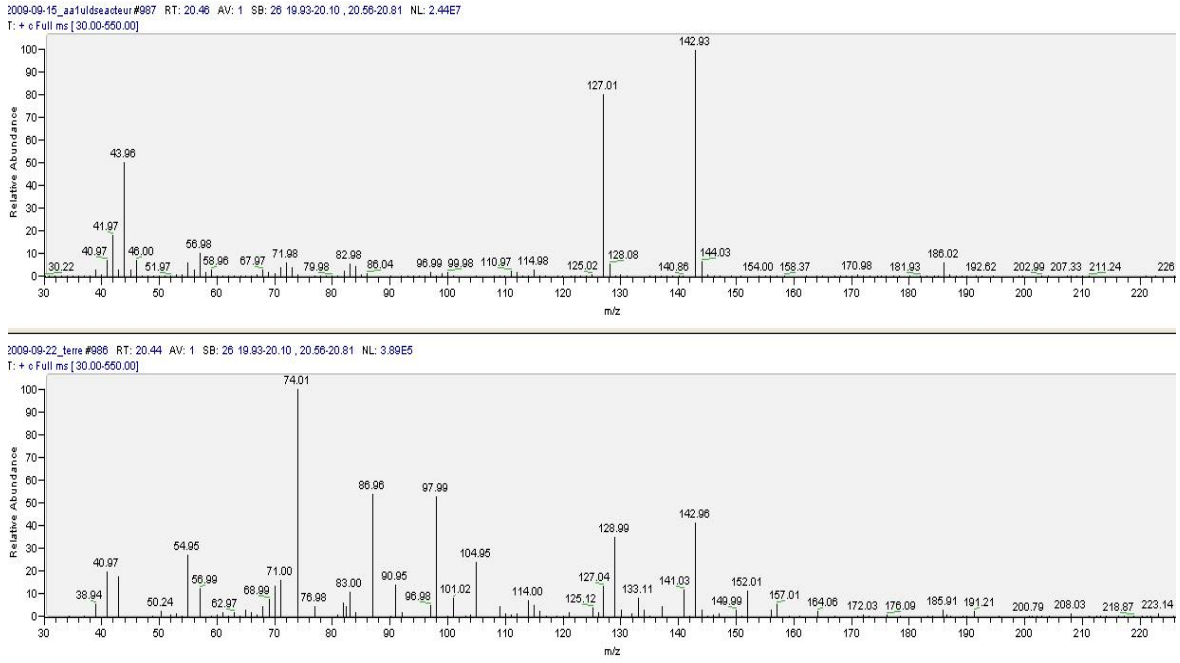


Figure III.4-3 : spectre de masse du standard de valine à Tr = 20,42 min (haut) et de la valine dans le sol de jardin à Tr = 20,44 min (bas). Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

III.4.4.b. Sol de jardin

Une fois les paramètres analytiques et chromatographiques établis nous avons réalisé une analyse complète du sol de jardin à partir de 50 mg de cet échantillon. Cette masse est en effet représentative de la masse qui sera disponible sur l'expérience MOMA pour chaque analyse

chimique. Les différents chromatogrammes et spectres de masse obtenus après analyse de cet échantillon de sol sont présentés en figure III.4-4(a, b, c et d). Comme explicité ci-dessus, chaque composé identifié dans ces chromatogrammes l'a été grâce à son spectre de masse et son temps de rétention obtenu à partir de standards purs.

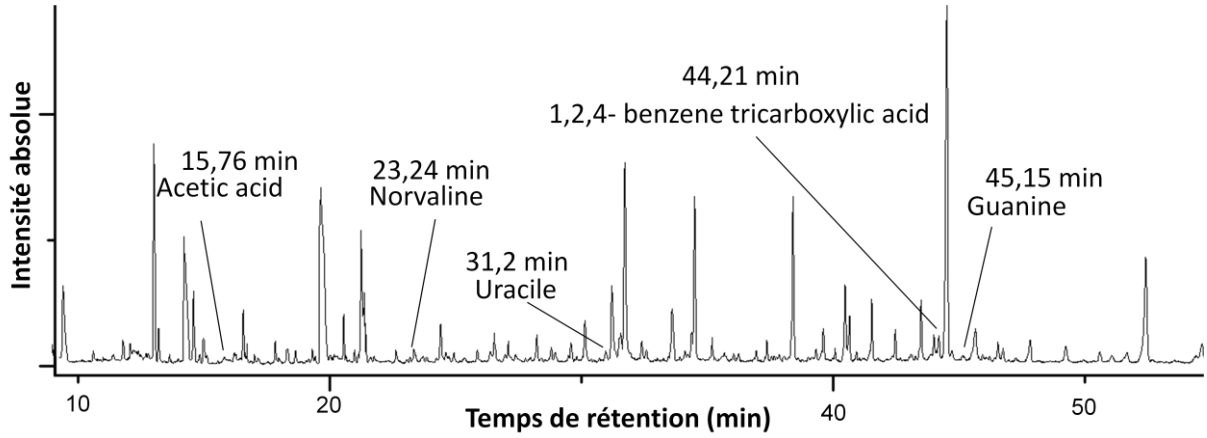


Figure III.4-4 (a) : chromatogramme full-scan de 50 mg de sol de jardin thermodésorbés 5 min à 200°C puis fonctionnalisés 45 secondes à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

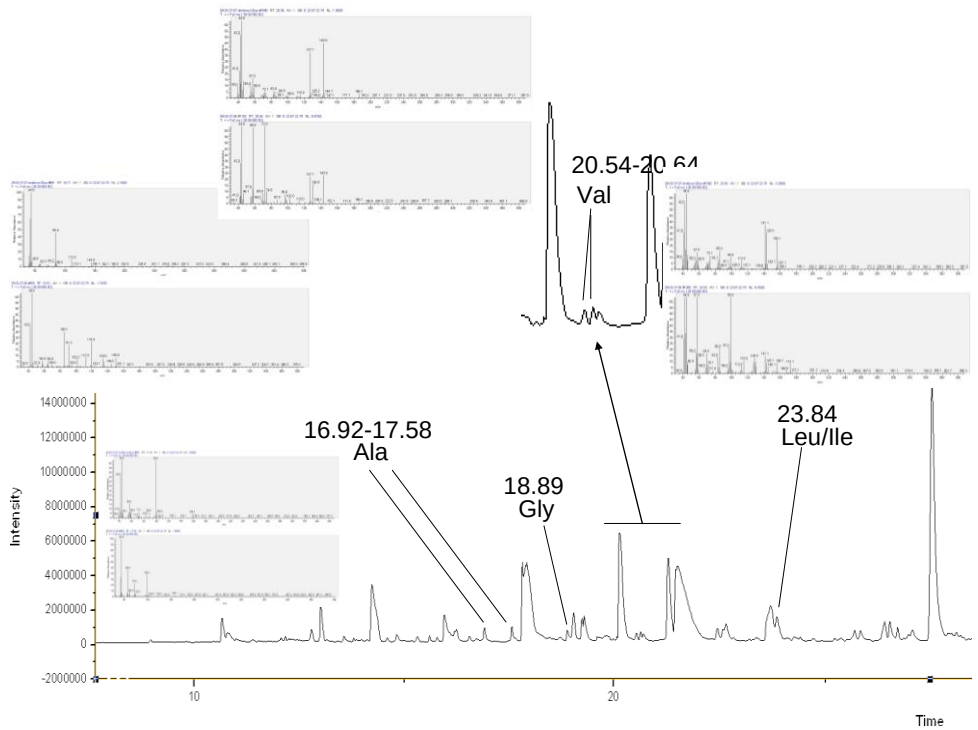


Figure III.4-4 (a) : chromatogramme full-scan de 50 mg de sol de jardin thermodésorbés 5 min à 200°C puis fonctionnalisés 45 secondes à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

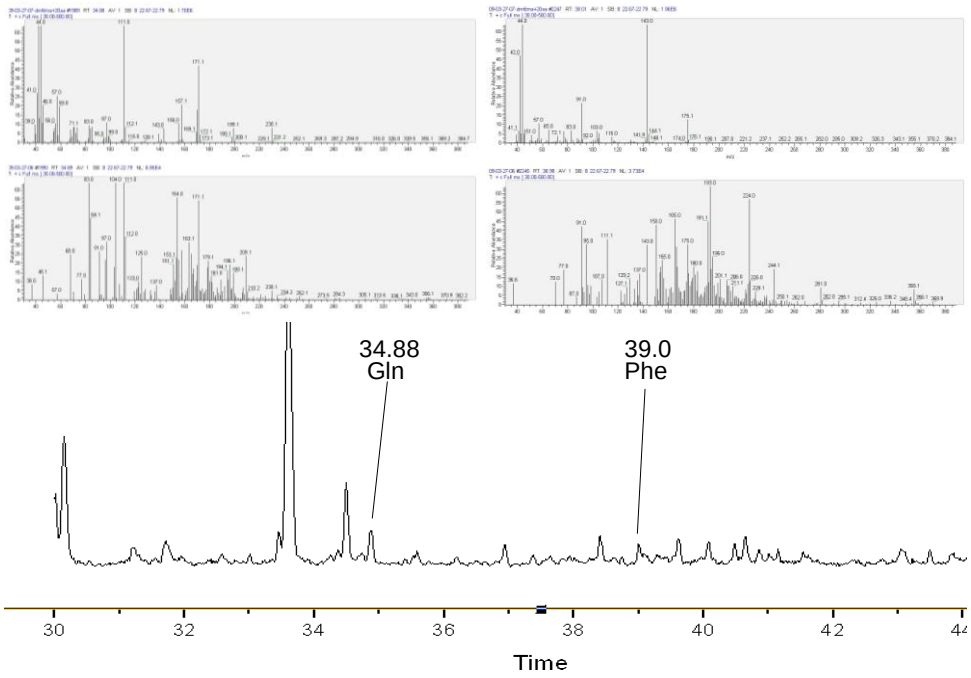


Figure III.4-4 (b) : chromatogramme full-scan de 50 mg de sol de jardin thermodésorbés 5 min à 200°C puis fonctionnalisés 45 secondes à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

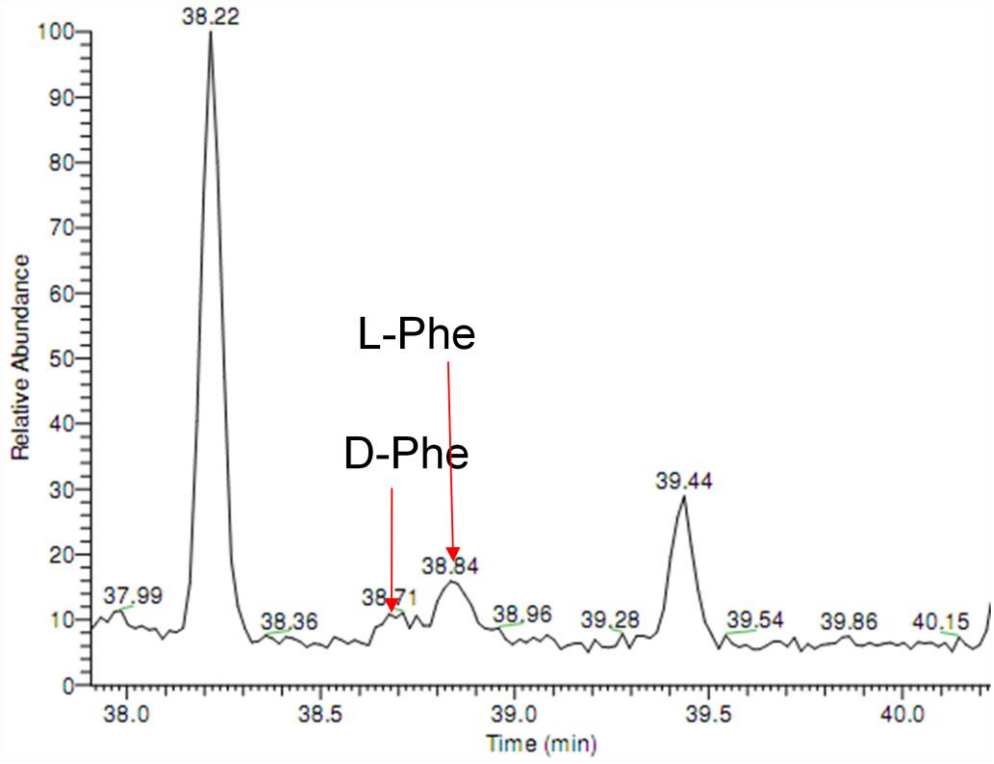


Figure III.4-4 (c) : chromatogramme full-scan de 50 mg de sol de jardin thermodésorbés 5 min à 200°C puis fonctionnalisés 45 secondes à 220°C avec 15 µL de DMF-DMA. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

Parmi les composés d'intérêt que nous avons pu détecter sur le sol de jardin, nous pouvons citer des acides aminés protéiques tels que l'alanine, la glycine, la valine, la leucine et/ou l'isoleucine, la glutamine et la phénylalanine. Parmi ces acides aminés certains présentent une séparation énantiomérique. C'est en particulier le cas de l'alanine, de la valine et de la phenylalanine. Nous observons également un acide aminé non-protéique (la norvaline) ; des acides carboxyliques (l'acide acétique et l'acide 1,2,4 benzène tricarboxylique) et même deux bases azotées (la guanine et l'uracile). D'autres composés organiques constituent le sol jardin mais nous ne nous somme intéressés ici qu'aux composés les plus pertinents en terme d'exobiologie.

Parmi les trois acides aminés pour lesquels une séparation chirale est obtenue, on observe sur la figure III.4-4(b) que la forme D n'est pas marginale. Or il pourrait se révéler étrange de retrouver des acides aminés protéiques de forme D dans les sols naturels. Cependant, cela peut parfois s'expliquer par la présence de molécules organiques résiduelles de dégradation bactérienne. En effet, les bactéries sont constituées d'une membrane et d'une paroi. Or, les acides aminés constituant la paroi des bactéries peuvent se retrouver sous forme D. La cause évolutive de cette caractéristique, bien qu'inconnue, est supposée être une auto-protection des peptidoglycanes de la bactérie contre ses propres enzymes protéolytiques (Voet *et al.* 1995), afin de dégrader la matière organique sans se dégrader elle-même, et afin de développer une résistance aux enzymes protéolytiques omniprésents qui coupent les protéines "naturelles" formées de L-AA. Les acides aminés D-Glu, D-Asp et D-Ala, constituants de la chaîne peptidique de la muréine des parois bactériennes, se retrouvent donc régulièrement dans les sédiments de dégradation bactérienne sur Terre. Cependant, il apparaît sur la figure III.4-4 que la forme D de la phénylalanine est minoritaire par rapport à la forme L, ce qui atteste que si racémisation il y a eu, elle n'est pas totale. La thermodésorption à haute température ainsi que la fonctionnalisation en suivant préservent donc un excès énantiomérique initial.

III.4.4.c. Sol du désert d'Atacama

Après avoir testé la technique d'extraction sur un sol de jardin, et cela même avant l'optimisation complète (qualitatif et quantitatif) de cette technique, il était intéressant et indispensable de la tester sur un sol particulièrement pauvre en matière organique : le sol du désert d'Atacama.
Le même processus d'extraction a donc été effectué afin d'extraire, d'un point de vue qualitatif, le maximum de molécules de ce sol pour les analyser. Les paramètres de séparation et la détection sont identiques aux analyses précédentes. De cette analyse, nous obtenons comme meilleur chromatogramme celui représenté ci-dessous :

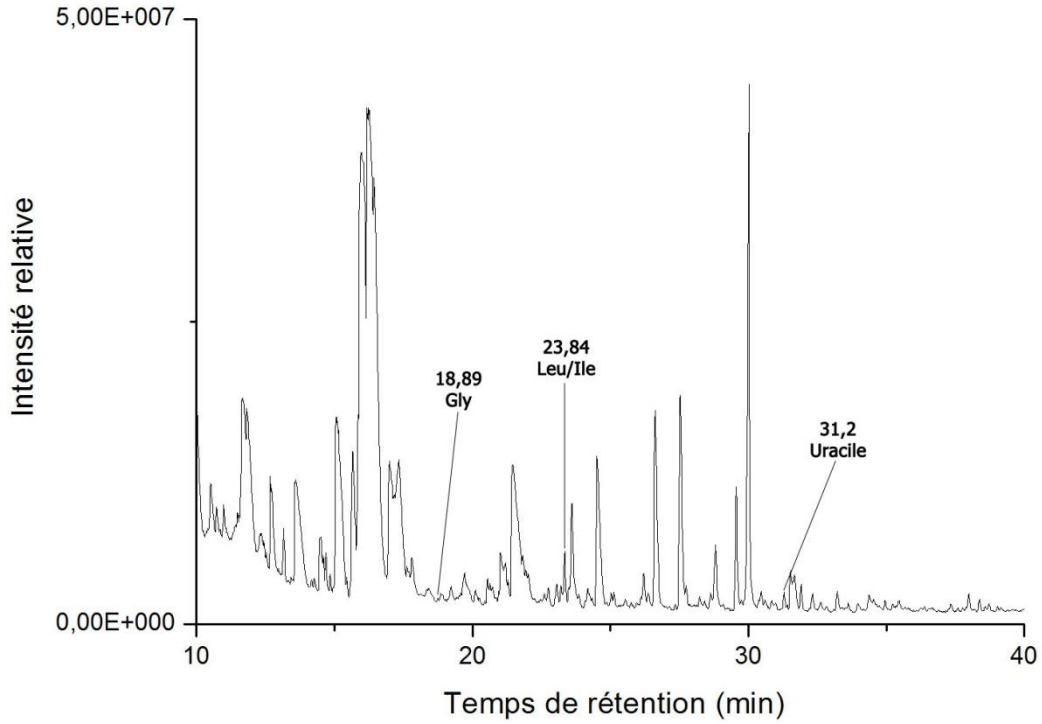


Figure III.4-5 : chromatogramme full-scan après thermodésorption (5 min, 200°C) et fonctionnalisation (15 µL DMF-DMA, 220°C, 45 sec) de 50 mg de sol du désert d'Atacama. Paramètres du CPG : injecteur 250°C, rapport de split 1/15, détecteur 200°C, colonne Chirasil-Dex 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, 70°C 5 min, augmentation de température 3°C/min jusqu'à 190°C, isotherme 10 min à 190°C.

Malgré le peu d'expériences réalisées sur ce sol du désert d'Atacama, il a néanmoins été possible de détecter de la glycine et de la leucine et/ou isoleucine, deux acides aminés protéiques, ainsi que de l'uracile, une base constituante des acides nucléiques du vivant.

Le chromatogramme (Figure III.4-5) contient un grand nombre de pics chromatographiques, preuve que le sol du désert d'Atacama contient d'autres composés organiques que ceux clairement détectés. Ces difficultés d'interprétation ont différentes causes. Tout d'abord il est bien évident que les faibles concentrations en composés organiques cibles (acides aminés, bases nucléiques etc.) introduisent une difficulté de lecture des spectres de masse. Par exemple, il est intéressant de comparer les spectres de masse de l'uracile pure injectée directement, de l'uracile détectée dans des sols riches, et de l'uracile détectée dans le sol d'Atacama.

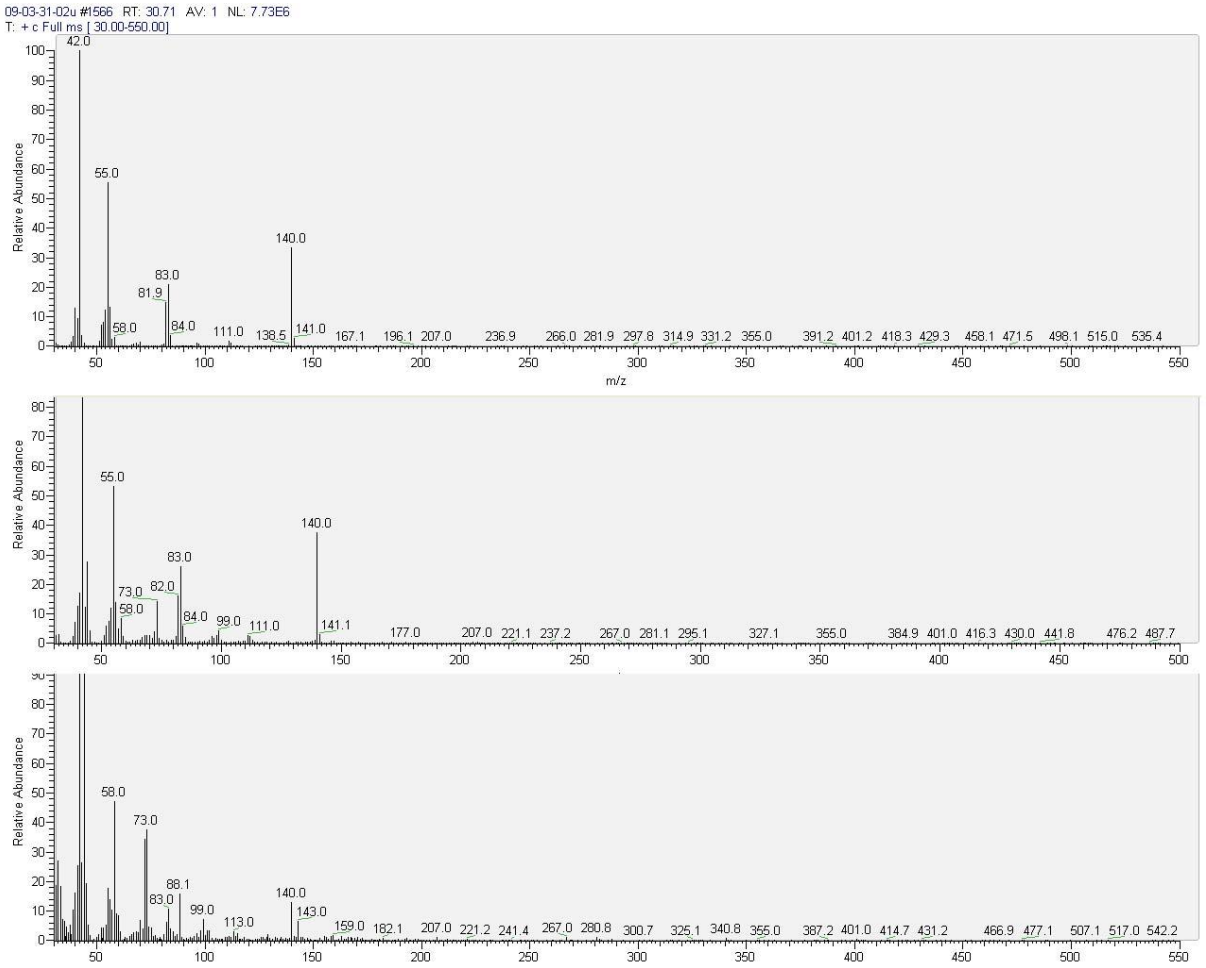


Figure III.4-6 : spectres de masse de l'uracile fonctionnalisée au DMF-DMA pur (haut), dans le sol de jardin (milieu) et dans le sol du désert d'Atacama (bas).

Sur le sol de jardin, l'uracile est parfaitement identifiée par son spectre de masse (Figure III.4-6 (milieu)). De plus, la comparaison avec le spectre de l'uracile pure (Figure III.4-6 (haut)) semble prouver que l'uracile ne coélue pas avec d'autres molécules, puisque son spectre de masse est exempt d'impureté. En revanche, sur le sol d'Atacama, le signal est beaucoup moins net, et il est plus difficile d'identifier l'uracile. Le rapport signal sur bruit s'en trouve drastiquement diminué. La détection est donc effectuée par screening des pics de bases des molécules d'intérêt aux alentour de leurs temps de rétention respectifs.

Une autre difficulté vient se greffer et s'ajouter aux problèmes liés aux faibles concentrations d'organiques présents dans le sol du désert d'Atacama. Il s'agit d'une part d'un problème issu des lacunes dans la connaissance des temps de rétention de chacun des composés détectés mais également et surtout de manquement dans la librairie de spectres de masse NIST. En effet, une des grandes difficultés de l'interprétation des spectres de masse des produits fonctionnalisés est qu'ils sont souvent absents des différentes librairies dédiées à la spectrométrie de masse. Le composé parent est souvent présent alors que c'est rarement le cas de son confrère fonctionnalisé. C'est aussi la raison pour laquelle la plupart des composés fonctionnalisés par le DMF-DMA ont du être ajoutés à la librairie NIST par nos soins.

III.5. Conclusion

Il était évident que le couplage de l'extraction des molécules d'intérêt exobiologique et de la fonctionnalisation de ces molécules extraites dans un même dispositif soulèverait de nombreux problèmes techniques et expérimentaux. C'est pourquoi pour s'y préparer, nous avons en amont préparé le terrain en optimisant indépendamment chacune des étapes du traitement de l'échantillon jusqu'à son analyse par CPG-SM. L'analyse chromatographique a été optimisée dans une première partie, puis la fonctionnalisation, puis l'extraction des molécules par thermodésorption. Pour toutes ces optimisations un Dispositif de Préparation de l'Echantillon (DPE) a été développé et deux brevets déposés.

Malheureusement, et suite aux contraintes liées à l'expérimentation spatiale d'ExoMars (MOMA), il n'a pas été possible d'utiliser la totalité des optimisations indépendantes, puisque l'expérience dans son ensemble et dans le dispositif "spatialisable" omet une caractéristique : le refroidissement actif de l'échantillon après la thermodésorption. Ainsi, les températures de thermodésorption et de fonctionnalisation restent malheureusement étroitement liées l'une à l'autre, et l'utilisation d'une forte température pour la thermodésorption (300°C, optimum) suivi d'une plus faible température pour la fonctionnalisation (140°C, optimum) n'est pas possible sur MOMA. Il a donc fallu rechercher un compromis entre la température et le temps de thermodésorption et la température et la durée de fonctionnalisation. Soit une température suffisamment élevée pour permettre la thermodésorption, et suffisamment faible pour ne pas dénaturer le DMF-DMA, et permettre la fonctionnalisation des molécules extraites. Par manque de temps seule une étude qualitative à été menée. Différents paramètres de durées et de températures, à la fois de la thermodésorption et de la fonctionnalisation, ont alors été testés. Le meilleur compromis semble être une thermodésorption à 200°C durant 5 minutes, suivie de 45 secondes de fonctionnalisation à 220°C.

Malheureusement, si cette température permet de sauver les molécules de la dégradation thermique, elle ne permet pas d'extraire de manière optimale tous les composés organiques du sol, qui restent alors inaccessibles à la fonctionnalisation. C'est d'ailleurs pour cette raison que d'autres techniques de fonctionnalisation et d'extraction seront utilisées sur MOMA : thermochimiolyse et fonctionnalisation au MTBSTFA (N-(t-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide). Malgré ces difficultés, il a été possible, grâce à cette méthode, de détecter plusieurs acides aminés protéiques, non protéiques, acides carboxyliques et bases nucléiques dans un sol de jardin, supposé riche. La méthode est d'autant plus intéressante qu'elle à également permis la détection des molécules organiques dans un sol extrêmement pauvre, considéré actuellement comme un des meilleurs analogues martiens sur Terre, le sol oxydant et aride du désert d'Atacama.

Ces résultats positifs sont particulièrement prometteurs pour l'étude des traces de vie extraterrestres dans une expérience *in situ* sur le sol martien. En effet, la méthode que nous avons développée, même si elle reste à être validée et optimisée, présente un système simple, automatisé,

possédant toutes les conditions requises d'une analyse spatiale, pour détecter des molécules traces dans des sols complexes.

III.6. Perspectives

Tous ces résultats nous poussent à investir plus profondément ce champ de recherche prometteur. Le développement d'un nouveau réacteur spatialisable plus performant, l'optimisation quantitative du couplage entre la thermodésorption et la fonctionnalisation, la préconcentration des échantillons avant l'analyse, l'utilisation d'un refroidissement actif du système d'analyse, une hydrolyse acide supplémentaire, la recherche de plus en plus d'espèces de plus en plus complexes de molécules organiques sont des éléments essentiels de la spatialisation de cette expérience afin de rechercher des traces de vie passées ou présentes *in situ*.

En effet, afin d'améliorer le rendement de détection, une étape de **préconcentration** des solutés peut être ajoutée en amont de l'injection dans le CPG. Cette préconcentration par piégeage à froid ou sur un piège physique de type Tenax® ou Carboseive permettrait d'avoir une injection ponctuelle, plus précise que les 30 secondes de balayage effectués pour injecter les fonctionnalisats à l'état gazeux depuis le four à réaction jusqu'au CPG. Le piégeage à froid consiste alors en une condensation à -40°C de tout l'échantillon sur un support de type bille de verre, alors que le piégeage sur Tenax® ou Carbosieve ne nécessite pas de refroidissement drastique de l'échantillon. L'injection se fait ensuite par chauffage rapide du piège à 200°C.

De plus, une des limitations de l'appareillage spatial (MOMA) est le manque de **refroidissement actif**. Autant le chauffage du dispositif est rapide, autant le refroidissement est lent car passif. Cette caractéristique n'autorise donc pas d'effectuer une étape chaude suivie immédiatement d'une étape plus douce avec un delta de température important. C'est pourquoi l'étape de fonctionnalisation ne peut se faire à une température inférieure à celle de la thermodésorption. Pour cela il faudrait envisager le développement d'un réacteur spatialisable avec refroidissement actif par plaque froide ou CO_2, N_2 liquide. Ainsi il serait alors envisageable d'utiliser des températures plus adéquates pour l'une et l'autre des étapes, thermodésorption et fonctionnalisation. En effet, nous pourrions envisager une thermodésorption optimale à 300°C, un pic de température à 310-320°C pour faire fondre la capsule et libérer le DMF-DMA, puis une baisse de température jusqu'à 140°C en quelques secondes pour réaliser la fonctionnalisation. Malheureusement, puisque seul le refroidissement passif est possible pour l'instant, il faut se contenter d'un compromis qui n'est l'optimal ni de la thermodésorption, ni de la fonctionnalisation, mais l'optimal des deux étapes réunies dans les conditions imposées.

Comme nous l'avons vu, l'étude présentée dans ce chapitre n'est qu'à ses débuts et malgré les nombreux paramètres testés, toutes les combinaisons ne l'ont pas été. Une analyse croisée

impliquant précisément **toutes les températures et toutes les durées de thermodésorption et de fonctionnalisation** devraient être effectuée afin de déterminer le meilleur trio.

Nous avons également vu que la **quantité de sol** initiale influence la réponse chromatographique. Moins de sol à analyser tend à donner des intensités de pics supérieures. Cela est probablement dû à la meilleure disponibilité du réactif sur les molécules d'intérêt, plutôt que sur le sol ou sur des espèces parasites. Cela sous-entendrait alors que de nombreuses molécules disponibles après thermodésorption ne sont pas fonctionnalisées par manque d'interactions avec le solvant. Un meilleur équilibre entre la **quantité de réactif** ajouté et la **masse de sol** considérée doit alors être mis au point.

Nous nous sommes intéressés tout au long de cette étude à des molécules présentant un intérêt exobiologique direct, c'est-à-dire des molécules d'importance dans la vie telle que nous la connaissons. Or, les molécules d'aujourd'hui ne sont pas nécessairement celles d'autrefois, et les acides aminés d'aujourd'hui peuvent dériver de précurseurs. Dans ce cas, la **recherche des précurseurs** semble pertinente à la recherche de traces de vie lorsqu'on parle d'une vie semblable à la vie terrestre à ses débuts. Une étude exhaustive des précurseurs des molécules organiques du vivant reste cependant impossible. Toutefois, certains composés sont retrouvés dans les météorites et pourraient être des précurseurs des molécules organiques d'aujourd'hui, si l'on considère la théorie de l'apport extraterrestre. Un exemple parlant est le cas des **acides aminés α-méthylés**. Ces acides aminés non protéiques se retrouvent dans les météorites, et sont plus stables que leur homologue α-H. Stables vis à vis de la dégradation, mais également stables vis à vis de la racémisation.

Ces prédictions sont confirmées par les observations ; sur la météorite de Murchison, les **acides aminés di-substitués**, qui ne sont que difficilement racémisés par substitution de proton (exemple : isovaline) pourra présenter un excès énantiomérique, alors qu'un acide aminé mono-substitué (exemple : glutamate) sera dans un mélange racémique. De même, des excès énantiomériques peuvent être retrouvés sur des α-methyl-α-AA, alors que leurs comparses α-hydrogène sont présents en mélange racémique, conformément à la théorie prédite par Cronin (Cronin *et al.* 1997). La substitution par le groupement méthyle de l'atome α-H rend la racémisation plus difficile (Pollock *et al.* 1975) et leur temps de décomposition prend le dessus sur le temps de racemisation (Bada 1991). Les acides aminés α-methylés peuvent alors être considérés comme la plus grande source d'asymétrie dans le monde prébiotique (Pizzarello *et al.* 2000), et ont donc pu jouer un rôle particulièrement important dans l'évolution chimique de l'homochiralité. Cette propriété est alors particulièrement intéressante pour déterminer un éventuel excès énantiomérique initial, les acides aminés di-substitués étant donc plus susceptibles d'avoir porté jusqu'à Mars et maintenu jusqu'à aujourd'hui leur intégrité chimique ainsi qu'énantiomérique.

La majorité des études concernant la détection d'acides aminés sur des météorites ou dans des simulations de synthèse dans le milieu interstellaire passe par une étape d'**hydrolyse acide** de

l'échantillon afin de recueillir le matériel organique. Cette hydrolyse a deux effets principaux : casser les ponts chimiques, en particulier la liaison peptidique de peptides et protéines, et l'oxydation de fonctions chimiques réduites spécifiques en groupements acide carboxylique et aminés. Sans cette étape d'hydrolyse acide, une plus faible quantité d'acides aminés est recouvrée, d'un facteur 2 à 5 pour les météorites telle Murchison (Shock *et al.* 1990), et d'un facteur 10 pour les simulations de formation de molécules organiques dans le milieu interstellaire (Nuevo *et al.* 2008). Cependant, Nuevo et al. (Nuevo *et al.* 2008) ont montré qu'en sus d'une différence quantitative des acides aminés détectés avec ou sans hydrolyse acide, il en existait une différence qualitative. Cela pose naturellement la question des transformations chimiques générées par cette hydrolyse. Si l'hydrolyse acide, bien qu'augmentant le rendement de l'extraction, se révèle créer de nouvelles espèces par transformation ou dégradation de dérivés, de précurseurs ou de polypeptides d'acides aminés, alors cette technique d'extraction dénaturante doit être limitée pour ne pas biaiser les résultats de l'échantillon. En effet, il s'agit d'une extraction agressive pouvant créer de nouvelles espèces, et ainsi aboutir à des faux-positifs. Cette hydrolyse acide pourrait être testée sur les sols que nous analysons, afin d'estimer la quantité d'acides aminés possiblement présents sur nos échantillons. Cependant, une étude sur les possibles transformations chimiques de cette réaction devra aussi être menée afin de s'assurer de la non-dénaturation du matériel initial. Cette hydrolyse acide pourrait alors améliorer le rendement de notre extraction par thermodésorption, et ainsi diminuer encore la limite de détection de l'expérience.

L'hydrolyse acide, malgré ses potentiels inconvénients, permet néanmoins de casser les ponts peptidiques des molécules. Ainsi, elle permettrait de déceler autant des traces des monomères des molécules d'intérêt tels que les acides aminés, mais également de **polymères peptidiques**. Ces polypeptides ne pourraient être des molécules rémanentes d'une vie éteinte depuis des milliards d'années, étant donnée la fragilité relative des liaisons peptidiques. Il s'agirait alors d'une vie récemment éteinte, voire existante aujourd'hui, qui pourrait produire de telles molécules. Or, la vie martienne en surface est aujourd'hui impossible. Malgré cela, des oasis martiens dans le régolithe peuvent exister, et si une vie a été présente un jour sur Mars, elle pourrait avoir subsisté jusqu'à présent. Cette éventualité doit être prise en compte pour la recherche des traces de vie, puisqu'elle aboutirait à des concentrations en molécules d'intérêt considérablement supérieures aux concentrations supposées jusqu'à présent. En effet, on estime le nombre de bactéries, dans un sol riche, à 10^8 à 10^9 bactéries/g de sol. Or, une bactérie est constituée de 1,5 à 15 fg d'ADN par cellule (E. coli : 5 fg/cellule), et de 40 à 600 fg de protéines par cellule (50 à 70 % de la masse sèche d'une bactérie est représentée par ses protéines) (150 fg/cellule d'*E. coli*). Ce qui représente pour 1g d'un sol 'normal' une quantité de 0, 15 à 15 µg d'ADN et de 4 à 600 µg de protéines par gramme de sol. Ainsi, il devient intéressant de rechercher, en plus des monomères libres présents, des monomères insérés dans des polymères, voies dans des cellules. Pour cela, une étape antérieure peut être envisagée. A partir d'un échantillon de sol, une lyse cellulaire par choc thermique peut être envisagée sans ajouter de réactifs supplémentaires. Cet éclatement bactérien permettrait de libérer tous les composés macromoléculaires des éventuelles cellules. Ces polymères, notamment nucléiques et

peptidiques, sont ensuite monomérisés grâce à des enzymes, telle la benzonase (nucléase pour les ADN, ARN, simple et double brins, linéaire, circulaires etc.) et la protéinase K (protéinase universelle), ou une carboxy- ou amino-peptidase. Ces étapes, peu coûteuses en temps, en réactifs et en manipulation, pourraient ainsi déceler des traces de vie présentes par comparaison des résultats avec et sans la digestion enzymatique des polymères.

Des tests devraient être effectués sur le sol de jardin, pour valider la méthode d'une part, et pour déterminer des courbes de calibration entre le rendement de l'expérience et la quantité de cellules bactériennes présentes.

Une étude spécifique sur les **phases chirales** devrait être effectuée. En effet, dans cette étude, nous avons montré que la colonne capillaire chirale Chirasil-Dex est la plus efficace vis à vis des acides aminés fonctionnalisés au DMF-DMA. Cependant, cette étude n'a pas été poussée plus loin que les acides aminés protéiques, et la Chirasil-Val sous certaines conditions peut se révéler être une bonne alternative à ces composés, ainsi qu'aux autres molécules d'intérêt.

Si la colonne Chirasil-Val s'avère positive, il serait alors intéressant d'envisager un **couplage en série des deux types de colonnes** pour utiliser les propriétés séparatives des deux types. En effet, la composition de la matière extraterrestre qu'il sera nécessaire d'analyser n'est pas connue. Ainsi, il est nécessaire d'être préparé à l'analyse d'une variété de constituants organiques à la fois polaire et apolaire. La colonne doit donc être capable d'analyser autant les molécules apolaires non-fonctionnalisées que les molécules polaires fonctionnalisées, et l'agent de fonctionnalisation doit ne pas être spécifique, pour ne pas que la chiralité soit omise par le CPG à cause de la résolution incomplète de molécules cibles inconnues. Puisque les différentes molécules nécessitent différentes colonnes pour leur résolution optimale, la combinaison des deux phases chirales les plus efficaces pourrait être un atout supplémentaire dans cette difficile tâche, pour tenter d'obtenir une colonne finale la plus versatile possible. Il a été tenté un mélange des différentes phases aux propriétés différentes.
Mais la Chirasil-Dex et Chirasil-Val liées aux polysiloxanes a été un échec, dû aux polarités différentes des polymères, menant à la formation de gouttelettes dans les colonnes (Pfeiffer *et al.* 1999) ou à des incompatibilités/immiscibilités des différents polymères, résultant en un mélange binaire absolument non-homogène. Pour passer outre cette immiscibilité, un lien chimique de précurseurs adéquats des sélectants simultanément à une matrice polymérique est une solution à envisager. Cette solution est d'autant plus intéressante qu'il a déjà été créé des colonnes mixtes fonctionnelles (un sélecteur Chirasil-Calix combiné avec une beta-cyclodextrine perméthylée (Chirasil-β-Dex), tous deux liés sur une matrice polysiloxane) présentant une sélectivité énantiomérique résultante des deux colonnes individuelles, en une seule colonne Chirasil-Calix-Dex. Cette colonne est capable des liaisons hydrogène apportées par la Chirasil-Calix, ainsi que des inclusions apportées par la Chirasil-Dex. Les solutés séparés sur la phase mixte mais pas sur la phase diamide présentera un profil de séparation de la Chirasil-Dex, et inversement, les solutés séparés sur la phase mixte mais pas sur la phase Chirasil-Dex présentera le profil de séparation de la Chirasil-Calix. Cela montre que les effets sont

additifs, et pas synergiques ou inhibitoires. L'énantiosélectivité des sélecteurs chiraux individuels est donc retenue sur une colonne mixte. Cependant, la Chirasil-CalixVal est difficile à synthétiser, et la contribution achirale défavorable de la cavité aromatique du resorcinarène sont des inconvénients majeurs.

Levkin et al. (Levkin *et al.* 2006) ont alors choisi une même longueur de spacers (C11) pour garantir une même accessibilité des sélecteurs par les solutés dans la matrice polymérique. La Chirasil-ValC11 (N-Acyl-L(D)-Valine-tert-butyle) est donc une amide liée à un polysiloxane par une chaîne longue en C11, et est une colonne chirale relativement universelle envers les acides aminés. La longue chaîne connectant le sélecteur au polymère rend la mobilité du groupement di-amide dans la phase stationnaire similaire à celle des molécules de cyclodextrine. 24 % w/w de sélecteur diamide, enrichi avec seulement 8% w/w de sélecteur cyclodextrine montre une amélioration considérable de la séparation énantiomérique de la proline, de l'aspartate (Levkin *et al.* 2007) et d'alcools non-fonctionnalisés.

Cependant, les facteurs de séparations sont moins forts que sur les phases individuelles. Cela est le résultat d'une concentration inférieure du sélectant dans les phases mixtes que dans les phases simple-mode (pour la Chirasil-Dex, 8% w/w contre 20% w/w).

Dans la plupart des cas, seulement un des deux sélecteurs joue sur l'énantiodiscrimination. Si les deux sélecteurs y participent, il peut y avoir soit compensation (cas défavorable, dû à l'ordre d'élution inversé des énantiomères sur les phases individuelles. Il peut alors y avoir inversion de pic, ou coélution), soit synergie (cas favorable). Mais puisque la Chirasil-Val existe sous ses deux formes L et D, l'inversion de pics en résultant transformera les cas défavorables en favorables et vice-versa.

La sélection de la meilleure phase stationnaire chirale reste donc un challenge pour les chromatographistes, et les recherches sur les phases mixtes ou sur le couplage de colonne devrait permettre d'obtenir une séparation chirale la plus versatile et la plus universelle possible, avec comme but ultime de séparer tous les composés d'intérêt en exobiologie. La recherche de phases optimales et le couplage de celles-ci pourraient alors être une avancée importante dans le travail de détection de traces de vie *in situ* par analyse chromatographique.

III.7. Bibliographie

Bada, J. L. (1991). "Amino-Acid Cosmogeochemistry." Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences 333(1268): 349-358.

Buch, A., D. P. Glavin, R. Sternberg, C. Szopa, C. Rodier, R. Navarro-Gonzalez, F. Raulin, M. Cabane and P. R. Mahaffy (2006). "A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas chromatography mass spectrometry." Planetary And Space Science 54(15): 1592-1599.

Buch, A., R. Sternberg, D. Meunier, C. Rodier, C. Laurent, F. Raulin and C. Vidal-Madjar (2003). "Solvent extraction of organic molecules of exobiological interest for in situ analysis of the Martian soil." Journal Of Chromatography A 999(1-2): 165-174.

Buch, A., R. Sternberg, C. Szopa, C. Freissinet, C. Garnier, E. J. Bekri, C. Rodier, R. Navarro-Gonzalez, F. Raulin, M. Cabane, A. Stambouli, D. P. Glavin and P. R. Mahaffy (2009). "Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in martian soil: preliminary results." Advances In Space Research 43(1): 143-151.

Cronin, J. R. and S. Pizzarello (1997). "Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids." Science 275(5302): 951-955.

Freissinet, C., A. Buch, R. Sternberg, C. Szopa, C. Geffroy-Rodier, C. Jelinek and M. Stambouli (2010). "Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry." Journal of Chromatography A 1217: 731-740.

Levkin, P. A., A. Levkina, H. Czesla, S. Nazzi and V. Schurig (2007). "Expanding the enantioselectivity of the gas-chromatographic chiral stationary phase Chirasil-Val-C-11 by doping it with octakis(3-O-butanoyl-2,6di-O-n-pentyl)-gamma-cyclodextrin." Journal Of Separation Science 30(1): 98-103.

Levkin, P. A., A. Ruderisch and V. Schurig (2006). "Combining the enantioselectivity of a cyclodextrin and a diamide selector in a mixed binary gas-chromatographic chiral stationary phase." Chirality 18(1): 49-63.

Meunier, D., R. Sternberg, F. Mettetal, A. Buch, D. Coscia, C. Szopa, C. Rodier, P. Coll, M. Cabane and F. Raulin (2005). "A laboratory pilot for in situ analysis of refractory organic matter in Martian soil by gas chromatography–mass spectrometry." Advances in Space Research: 8.

Meunier, D., R. Sternberg, F. Mettetal, A. Buch, D. Coscia, C. Szopa, C. Rodier, P. Coll, M. Cabanec and F. Raulin (2007). "A laboratory pilot for in situ analysis of refractory organic matter in Martian soil by gas chromatography-mass spectrometry." Advances In Space Research 39(3): 337-344.

Navarro-Gonzalez, R., F. A. Rainey, P. Molina, D. R. Bagaley, B. J. Hollen, J. de la Rosa, A. M. Small, R. C. Quinn, F. J. Grunthaner, L. Caceres, B. Gomez-Silva and C. P. McKay (2003). "Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life." Science 302(5647): 1018-1021.

Navarro-Gonzalez, R. and F. Raulin (2004). Preface - Steps toward the origin(s) of life: endogenous sources and chemistry. Space Life Sciences: Steps Toward Origin(S) Of Life. Kidlington, Pergamon-Elsevier Science Ltd. 33: 79-80.

Nuevo, M., G. Auger, D. Blanot and L. d'Hendecourt (2008). "A detailed study of the amino acids produced from the vacuum UV irradiation of interstellar ice analogs." Origins Of Life And Evolution Of Biospheres 38(1): 37-56.

Pfeiffer, J. and V. Schurig (1999). "Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography." Journal Of Chromatography A 840(1): 145-150.

Pizzarello, S. and J. R. Cronin (2000). "Non-racemic amino acids in the Murray and Murchison meteorites." Geochimica Et Cosmochimica Acta 64(2): 329-338.

Pollock, G. E., C. N. Cheng, S. E. Cronin and K. A. Kvenvolden (1975). "Stereoisomers Of Isovaline In Murchison Meteorite." Geochimica Et Cosmochimica Acta 39(11): 1571-1573.

Rodier, C., R. Sternberg, F. Raulin and C. Vidal-Madjar (2001). "Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography." Journal Of Chromatography A 915(1-2): 199-207.

Shock, E. L. and M. D. Schulte (1990). "Summary And Implications Of Reported Amino-Acid-Concentrations In The Murchison Meteorite." Geochimica Et Cosmochimica Acta 54(11): 3159-3173.

Voet, D. and J. G. Voet (1995). Biochimie. D. B. Université.

Wright, I. P., M. M. Grady and C. T. Pillinger (1989). "Organic Materials In A Martian Meteorite." Nature 340(6230): 220-222.

Zampolli, M., D. Meunier, R. Sternberg, F. Raulin, C. Szopa, M. C. Pietrogrande and F. Dondi (2006). "GC-MS analysis of amino acid enantiomers, as their N(O,S)-perfluoroacyl perfluoroalkyl esters: Application to space analysis." Chirality 18(4): 279-295.

Zampolli, M. G., G. Basaglia, F. Dondi, R. Sternberg, C. Szopa and M. C. Pietrogrande (2007). "Gas chromatography-mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis." Journal Of Chromatography A 1150(1-2): 162-172.

Conclusion générale

La recherche de vie extraterrestre est devenue un des enjeux majeurs des prochaines explorations spatiales. La première étape de cette quête est donc de définir ce que l'on appelle "la vie" et de déterminer quels pourraient être les indices de cette vie. La seconde étape est la recherche, l'analyse et la détection de ces indices de vie, *in situ*. Une des difficultés pour identifier des traces de vie est précisément le manque de connaissance sur ce que nous devrions chercher. Pour élaborer des instruments capables de chercher des traces de vie, il est indispensable de faire une comparaison avec les biomarqueurs ou bioindicateurs organiques terrestres, des composés ou caractéristiques qui nous révèleraient de manière sûre ou sous forme d'indices la présence d'une vie passée ou présente. Même si la vie n'est pas définie de manière universelle, nous sommes capables d'en déterminer de façon implicite ou explicite ce qui la caractérise.

Une des caractéristiques du vivant les plus universelles est l'homochiralité. Universelle dans le sens où elle pourrait s'appliquer à une forme de vie basée sur d'autres molécules que celles connues sur Terre. L'homochiralité est la particularité qu'ont certaines molécules à n'exister que sous une seule des deux formes énantiomériques possibles. L'énantiomérie est une isomérie optique caractérisée par le fait qu'une molécule possédant un carbone asymétrique existe sous deux formes, non superposables mais symétriques l'une de l'autre dans un miroir. Bien qu'ayant une même formule brute et les mêmes fonctions, les deux énantiomères peuvent posséder des propriétés physiques, chimiques et biologiques radicalement différentes. Lorsque ces molécules sont impliquées dans des polymères du vivant, une seule de ces deux formes est utilisée. C'est ce que l'on nomme homochiralité du vivant. Elle s'applique pour les acides nucléiques, monomère de l'ADN, où seule la forme D du ribose est utilisée, pour les acides carboxyliques, produits de dégradation des acides gras, et pour les acides aminés, monomères des protéines, qui ne se retrouve que sous leur forme L dans (presque) tous les systèmes vivants connus. Une recherche de ces molécules organiques et de leur forme énantiomérique dans un environnement extraterrestre semble donc une méthode très pertinente pour la recherche de traces de vie extraterrestre.

Dans le cadre de futures missions spatiales telle que l'expérience MOMA de la mission Exomars en 2018, dédiées à la recherche de ces traces de vie, nous avons développé une technique intégrale d'analyse des molécules organiques chirales issus de sols pauvres en composés organiques. Pour les analyses *in situ* de molécules organiques, la meilleure technique et l'instrumentation la plus fiable reste la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Les colonnes utilisées sont des colonnes chirales, capables de séparer les isomères optiques des molécules possédant un ou plusieurs centres asymétriques. Un des inconvénients majeurs de la CPG est l'impossibilité d'analyser des molécules si elles ne sont pas volatiles. Or, la plupart des molécules d'intérêt sont réfractaires. Une étape de fonctionnalisation est alors nécessaire et suffisante pour

rendre les molécules volatiles et analysables en CPG-SM. L'agent de fonctionnalisation choisi est le diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA). Parmi les agents de fonctionnalisation capables de protéger les centres chiraux des molécules, le DMF-DMA est le meilleur compromis entre le rendement de la fonctionnalisation, l'universalité de ses molécules cibles et la simplicité de son protocole de réaction. En amont de ces étapes d'analyse et de fonctionnalisation, il faut s'assurer de la disponibilité sur le sol des molécules d'intérêt. Or, il a été montré qu'une fonctionnalisation brute du sol ne permettait pas de détecter ces molécules. Une étape d'extraction est alors nécessaire afin de rendre les molécules organiques disponibles à la fonctionnalisation, et donc à la séparation chromatographique. Cette étude implique donc trois étapes :

1- extraction
2- fonctionnalisation
3- analyse par CPG-SM des molécules d'intérêt

Dans un premier temps nous avons optimisé les étapes de fonctionnalisation et d'analyse en CPG-SM sur les 20 acides aminés du vivant. Ce travail montre qu'en plus de ses qualités intrinsèques telles qu'un faible poids moléculaire et une grande résistance à des conditions opératoires drastiques, le DMF-DMA permet une fonctionnalisation simple et rapide, pertinente pour une analyse spatiale.
Des tests de résistance à la température ont été effectués sur le DMF-DMA. Nous avons montré que ce réactif résistait à une température de 200°C durant plus d'une journée. Ces conditions de résistance sont alors en parfaite adéquation avec les contraintes de stérilisation et de conservation du DMF-DMA durant un voyage vers Mars.

La mesure des limites de détection (LOD) montre que la méthode de fonctionnalisation proposée est appropriée pour une analyse quantitative des énantiomères de nombreux acides aminés, puisque la LOD est inférieure au ppb, quantité qui a été détectée pour ces mêmes molécules d'intérêt dans des météorites martiennes.

La racémisation a été également étudiée dans les conditions de l'expérience. En effet, puisque l'intérêt de l'étude est de conserver les centres chiraux pour différencier les énantiomères, la technique perdrait tout son intérêt si elle aboutissait à une racémisation totale de tous les composés chiraux. Heureusement, et grâce aux conditions relativement douces que nous avons pu établir comme optimales, la racémisation n'est pas un problème majeur, puisqu'une majorité des composés n'est pas racémisée dans les conditions de l'expérience. Lorsque racémisation il y a, excepté pour la tyrosine qui montre une racémisation totale, cette dernière peut être quantifiée, et de la thermodynamique de racémisation il est possible de remonter jusqu'à l'excès énantiomérique initial.

Cette étude de fonctionnalisation a été étendue à d'autres molécules d'intérêt que sont les acides aminés non protéiques, des acides carboxyliques, et des bases et acides nucléiques. Tous ces composés ont pu être détectés, voire séparés selon leurs énantiomères, ce qui atteste de la très grande universalité de la méthode de fonctionnalisation proposée. Cette universalité et la versatilité de

la technique est un point essentiel pour la spatialisation d'une expérience puisqu'elle limite l'utilisation d'un trop grand nombre de réactifs et de procédures.

De cette étude, il a été possible de créer une librairie de masse de tous les composés d'intérêt fonctionnalisés au DMF-DMA, librairie qui s'enrichira au fil des expériences et des composés analysés. Cette librairie de masse est absolument indispensable à l'analyse des sols complexes comme celui du désert d'Atacama, puisque seule la spectrométrie de masse couplée à l'analyse chromatographique permet d'assigner les composés sur un chromatogramme. De plus, pour une meilleure sensibilité d'analyse, il est possible, grâce aux librairies de masse, et pour la recherche d'un composé d'intérêt en particulier, de faire une recherche par m/z (mode SIM). Ce mode, comparé au Total Ion Curent (TIC) où une large gamme de m/z est scannée, permet une meilleure sensibilité analytique. Il est par contre impossible de l'utiliser sans connaître précisément les spectres de masse des solutés recherchés.

L'étude suivante a permis de développer et d'optimiser indépendamment de la fonctionnalisation une étape de thermodésorption compatible avec l'exploration spatiale. Ce processus d'extraction est complexe, puisqu'il s'agit de retrouver parmi un mélange complexe de molécules plus ou moins adsorbées sur un sol les composés qui nous intéressent et de les séparer chiralement. Grâce à la thermodésorption nous avons été capables d'extraire rapidement et simplement une large gamme de composés organiques issus d'une matrice solide. Les résultats de l'optimisation de cette technique prouvent qu'un chauffage à 300°C durant 15 minutes permet d'atteindre un palier et un maximum d'extraction pour six composés cibles (cinq acides aminés et un acide carboxylique).

Si nous considérons que les molécules adsorbées dans le sol le sont de la même manière que sur les météorites étudiées sur Terre, alors la matière organique est présente sous deux formes, une partie insoluble, résistante aux tentatives d'extraction classique qui représentant 60 à 70% du carbone organique, et une partie soluble. Parmi la fraction soluble se trouvent des molécules réfractaires et des molécules volatiles. Les molécules réfractaires, parmi lesquelles se trouvent les acides aminés, les acides nucléiques et les acides carboxyliques, ne peuvent être analysés en chromatographie gazeuse sans une étape de fonctionnalisation préalable. Sans thermodésorption, aucune molécule d'intérêt ne peut être détectée et cela même avec l'étape de fonctionnalisation réalisée directement sur le sol. Il est donc indispensable de coupler la thermodésorption à une étape de fonctionnalisation.

Cependant pour réaliser la fonctionnalisation les contraintes de l'expérience MOMA imposent de stocker le DMF-DMA dans une capsule thermolabile. Grâce à l'utilisation d'un eutectique cette capsule permet la libération du réactif à une température donnée. Bien que nous ayons prouvé que le DMF-DMA était capable de résister à 200°C durant 24 heures, il n'est pas envisageable d'effectuer la

fonctionnalisation à des températures beaucoup plus élevées. La température de thermodésorption se trouve ainsi limitée par la température de la fonctionnalisation.

Afin d'optimiser l'étape de thermodésorption couplée à l'étape de fonctionnalisation une étude préliminaire à été menée. Pour un volume de DMF-DMA (15 µL) et de sol donnés (50 mg), les paramètres qui influent sur le rendement d'extraction-fonctionnalisation sont les températures et durées de thermodésorption et de fonctionnalisation. Les tests préliminaires effectués sur un sol de jardin, censé être riche en matière organique suite à la dégradation de la faune et de la flore locales, nous ont permis de trouver un couple température-durée pour la thermodésorption (200°C - 5 minutes) et la fonctionnalisation (220°C - 45 secondes). Grâce à cette optimisation qualitative nous arrivons à détecter de nombreuses espèces de molécules organiques d'intérêt exobiologique, et même à obtenir une séparation chirale de certaines d'entre elles. Afin de valider notre procédure nous avons réalisé cette même expérience sur un des meilleurs analogues martien sur Terre, *i.e.* le sol du désert d'Atacama. Sur cette terre, où la vie est réduite à son strict minimum, et où l'apport en matière organique est faible, il a néanmoins été possible de distinguer plusieurs espèces de molécules carbonées de fort intérêt exobiologique, comme quelques acides aminés et acides carboxyliques.

Comme il a déjà été avancé, certains acides aminés sont plus enclins à retenir leur excès énantiomérique initial que d'autres. Sous des conditions identiques, certains acides aminés vont racémiser totalement alors que d'autres ne seront pas affectés par la racémisation. En effet, sur les 20 acides aminés du vivant, Glu, Ile et Val sont les plus résistants face à la racémisation, alors que Phe, Asp et Ala le sont le moins. Partant d'un même excès initial, une variété de ratio D/L peut donc être retrouvée étant donné les racémisations différentielles des acides aminés, ainsi que les conditions thermiques et aqueuses qu'elles auront subies. Les conditions anhydres et de températures particulièrement basses sur Mars nous laissent penser que s'il a existé un excès énantiomérique d'un éventuel biotope Martien, il pourrait toujours être détectable aujourd'hui (Bada, 1995). Une homochiralité de l''acide aspartique, l'acide aminé ayant la plus forte propension à racémiser, serait préservée durant 3.10^{13} années à des températures équivalentes à l'équateur martien (temps de demi-vie de racémisation à 215K) et 1027 années aux températures martiennes polaires (150K) dans des conditions anhydres. En conditions aqueuses, ces valeurs chutent à 8.10^{2} années à 300K, contre 5.10^{4} années en conditions sèches à cette température. Une signature homochirale d'une vie passée sur Mars, considérée éteinte depuis que Mars a perdu son atmosphère il y a $3{,}5.10^{9}$ années), pourrait donc être préservée sous la surface martienne. Si cette extinction s'est produite plus récemment, comme supposé par Pillinger (Wright *et al.* 1989) après des analyses de la matière carbonée et ses rapports isotopiques dans une météorite martienne, c'est-à-dire il y a seulement 180 millions d'années, il serait d'autant plus facile de détecter cet excès énantiomérique. Excès encore plus présent si la vie y existe toujours.

La question de savoir si la vie est commune ou rare dans l'Univers a des implications philosophiques profondes. Il est actuellement incompris comment la vie est apparue sur Terre. Même si des hypothèses sont avancées sur l'apparition des molécules prébiotiques, il existe un fossé conceptuel infranchissable entre le monde abiotique et la chimie biotique. Il devient alors impossible de déterminer si ces mécanismes sont courants. Mais si la vie est apparue ailleurs, cela montrerait alors que les mécanismes n'ont pas opéré une seule fois, mais au moins deux. Si deux, cela peut alors signifier que la vie peut être commune à travers tout l'univers.

Avant que des échantillons ne nous soient retournés sur Terre par des futures missions spatiales, les mesures *in situ* restent alors la seule source de matériels non altérés pour les analyses moléculaires. Mars est candidate idéale pour cette recherche. Planète étrange, voisine *alter ego* de la Terre, objet de fantasmes célestes, Mars a connu à ses débuts des conditions compatibles avec la vie. Cependant, la recherche de vie sur Mars a jusqu'à présent été effectuée sans succès. Une partie de la communauté scientifique pense que des recherches plus approfondies sont vaines, une perte de temps et d'argent, alors qu'une partie plus optimiste des chercheurs reste persuadée de l'intérêt et de la potentielle fructuosité d'une telle recherche. Il est très simple de prouver que la vie sur Mars existe ou a existé : d'en trouver un exemple suffit. En revanche, prouver qu'elle n'existe pas est une tâche quasi-impossible, puisque même des résultats négatifs prolongés pourraient être mis sur le compte d'une mauvaise zone de recherche, et la potentialité d'une vie dans une zone plus profonde, plus inaccessible reste envisageable.

Les extrêmophiles terrestres montrent que les frontières spatiales, temporelles et environnementales qui restreignent la survie et la viabilité de la vie microbienne sur Terre sont beaucoup plus larges qu'on ne le pensait. La vie a plus d'imagination que les scientifiques. Des espèces barophiles, hyperthermophiles, cryophiles, vivant dans des sources hydrothermales ou dans des roches des profondeurs, des glaciers aux calottes polaires, ont étonné la communauté scientifique. Quand bien même, comment pouvons-nous prétendre limiter le potentiel de la vie d'après uniquement ce que nous connaissons de notre planète ? C'est pourquoi il n'est pas vain de penser à une vie sur Mars, autant passée que présente. Si vie il y a eu, des traces de cette vie doivent subsister aujourd'hui. Il est ironique de constater que la recherche principale d'une « vie extraterrestre » est basée sur la recherche d'organismes morts, ou de traces qu'ils pourraient avoir laissées à long terme après leur mort.

Dans le cas de Mars, le problème a été compliqué par les croyances émotionnelles d'une planète semblable à la Terre. Cette ressemblance, pour le moins actuelle, a été démontrée comme étant un mythe. Mars est un lieu d'émerveillement, et le restera même si finalement elle se révèle dépourvue de toute forme de vie. La distance et l'isolement de celle qui n'était qu'une étoile froide et étrangère ont aujourd'hui disparus pour laisser place à un monde familier, une planète amie, un compagnon de la Terre dans l'éternelle solitude de l'Univers. Aujourd'hui, nous ne savons toujours pas s'il y a eu ou s'il y a de la vie sur Mars. Mais une chose est certaine : c'est qu'un jour, il y en aura.

C. Freissinet, R. Sternberg, A. Buch, C. Geffroy-Rodier, C. Szopa and P. Mahaffy. Enantiomeric separation of volatile organics on Mars by gas chromatography: investigation of three types of chromatographic columns in the aim of the analysis of Martian soil. Journal of Chromatography A. En préparation

C. Freissinet, A. Buch, R. Sternberg, C. rodier and M. Stambouli. Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry . Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 731–740.

C. Freissinet, A. Buch, M. Stambouli, R. Sternberg. A review on the clues for the spatial analysis of chirality. Nova Sciences.

A. Buch, R. Sternberg, C. Szopa, **C. Freissinet**, C. Garnier, J. El Bekri, C. Rodier, R. Navarro-González, F. Raulin, M. Cabane, M. Stambouli, D.P. Glavin, P.R. Mahaffy. Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in Martian soil: preliminary results. Advances in Space Research, 43 (2009) Issue 1, 143-151

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 731–740

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Search for evidence of life in space: Analysis of enantiomeric organic molecules by N,N-dimethylformamide dimethylacetal derivative dependant Gas Chromatography–Mass Spectrometry

C. Freissinet[a,b,*], A. Buch[a], R. Sternberg[b], C. Szopa[c], C. Geffroy-Rodier[d], C. Jelinek[e], M. Stambouli[a]

[a] Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM), Ecole Centrale Paris, Grande voie des vignes, 92295 chatenay-Malabry, PressUniverSud, France
[b] Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA), UMR CNRS 7583, Université Paris XII, Créteil, France
[c] UPMC University Paris 06, Université Versailles St-Quentin, CNRS/INSU, LATMOS-IPSL, Route des Gâtines, 91371 Verrières le Buisson Cedex, France
[d] Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles (SRSN), UMR CNRS 6514, Université de Poitiers, Poitiers, France
[e] Mid-Atlantic Mass Spectrometry Laboratory, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 August 2009
Received in revised form 29 October 2009
Accepted 2 November 2009
Available online 10 November 2009

Keywords:
Chirality
Derivatization
DMF-DMA
GC–MS
Amino acid
Organic matter
Mars
Space exploration
Exomars

ABSTRACT

Within the context of the future space missions to Mars (MSL 2011 and Exomars 2016), which aim at searching for traces of life at the surface, the detection and quantitation of enantiomeric organic molecules is of major importance. In this work, we have developed and optimized a method to derivatize and analyze chiral organic molecules suitable for space experiments, using N,N-dimethylformamide dimethylacetal (DMF-DMA) as the derivatization agent. The temperature, duration of the derivatization reaction, and chromatographic separation parameters have been optimized to meet instrument design constraints imposed upon space experiment devices. This work demonstrates that, in addition to its intrinsic qualities, such as production of light-weight derivatives and a great resistance to drastic operating conditions, DMF-DMA facilitates simple and fast derivatization of organic compounds (three minutes at 140 °C in a single-step) that is suitable for an *in situ* analysis in space. By using DMF-DMA as the derivatization agent, we have successfully identified 19 of the 20 proteinic amino acids and been able to enantiomerically separate ten of the potential 19 (glycine being non-chiral). Additionally, we have minimized the percentage of racemized amino acid compounds produced by optimizing the conditions of the derivatization reaction itself. Quantitative linearity studies and the determination of the limit of detection show that the proposed method is also suitable for the quantitative determination of both enantiomeric forms of most of the tested amino acids, as limits of detection obtained are lower than the ppb level of organic molecules already detected in Martian meteorites.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

To search for traces of life in extraterrestrial settings, it is mandatory to analyze obtained extraterrestrial samples for known terrestrial organic biomarkers. Ideally, presence of these biomarkers will provide non-disputable evidence that the sample's planetary source has supported some form of life. Thus, terrestrial biomarkers must be either a remnant, or a characteristic of life, and must indicate life only. There are several known classes of organic compounds that could be used as possible life indicators: amino acids, the monomer building blocks of proteins, biologically active nucleic acids and their associated sugars such as the monomers of DNA and RNA, and lipids or their carboxylic acids degradation products. While these compounds are not functional biomarkers in and of themselves, the analysis of their optical activity/chirality should be a good complementary diagnostic tool from which to derive evidence of biotic or prebiotic activity. It is important to note that unlike the amino or nucleic acid classes, carboxylic acid compounds are highly resistant to decomposition in oxidizing soils like those predicted on Mars [1,2]. As such, detecting lipid-derived carboxylic degradation products in extraterrestrial samples is the most likely scenario.

Because of the conditions under which they are operated, space instruments for *in situ* analysis must meet several stringent design requirements. Miniaturization (small size and mass), a low energy consumption/power intake, high mechanical and shock strength, resistance to vibration, and simplicity of construction [3,4] are all necessary if an instrument is to be included in a space mission. Gas Chromatography (GC) coupled with mass spectrometry [5] instruments fulfils these requirements. Given the compatibility of GC instrumentation with space experimentation demands it is unsur-

* Corresponding author at: Ecole Centrale Paris, LGPM Grande voie des vignes 92295 Chatenay-Malabry France.
E-mail address: caroline.freissinet@ecp.fr (C. Freissinet).

0021-9673/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chroma.2009.11.009

prising that GC has already been selected for inclusion into the next generation of Mars surface exploration rovers, i.e. the NASA/MSL with SAM experiment and the ESA/Exomars with MOMA experiment. Unfortunately, GC instruments can only be used to analyze molecules which are volatile and thermally stable. As such, in their unadulterated state, few or none of the proposed terrestrial organic biomarkers would be compatible with a GC–MS experiment. However, it has been demonstrated that refractory molecules can be derivatized prior to GC analysis to facilitate their detection by GC–MS [8]. Within the context of the proposed NASA/MSL and the ESA/Exomars missions, all GC experimentation designed for terrestrial biomarker detection will thus include a pre-experiment chemical derivatization procedure [6,7].

To date, the most popular derivatizing agent used in conjunction with GC–MS experimentation is (N-(t-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide, MTBSTFA) [2,6,9–13]. However, MTBSTFA is unsuitable for enantiomeric separation of amino acids. To separate amino acid enantiomeric pairs, other alternate derivatizating procedures have been developed. Alkylalkoxycarbonylation-esterification (alkyl chloroformate) [14–16] is one such example. A one-step reaction mechanism, alkylalkoxycarbonylation-esterification effectively esterifies the carboxylic group of the amino acid residue but protects the amino terminus (or other groups susceptible of nucleophilic substitutions) from derivatization. However, while the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction is effective in derivatizing amino acids so as to facilitate their enantiomeric separation, unfortunately, the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction is not compatible with the experimental restrictions imposed upon space experiments. First, the rapidity of the reaction time of the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction assumes a *sine qua non* step of vigorous stirring. As the yield of recovery decreases with an increase in the reaction time, without perpetual shaking to ensure homogenization, recovery rates from the reaction decrease dramatically. The type of perpetual reaction agitation needed to maximize product recovery rates cannot be achieved for *in situ* analyses in conjunction with space missions. Moreover, the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction produces heavy molecular weight derivatives and by-products, the detection of which can only be achieved in a relatively high mass range of the mass spectrometer. Space mass spectrometers are often mass (m/z) limited, and thus, can detect only low mass derivatives. The respective weights of the derivatives and the by-products produced from the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction extend beyond the range of detection for this class of mass spectrometric instruments. Additionally, the reaction products generated using the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction can be separated by Chirasil-val stationary phases only. In fact, the reaction mixture physically deteriorates the commonly used cyclodextrin-based columns. Finally, the reagents used in the Alkylokoxycarbonylation-esterification reaction need to be stored at low temperatures, making the reaction especially incompatible with space missions [17].

An alternate derivatization technique used to facilitate enantiomeric separation of amino acids is perfluoroacylation/perfluoroesterification. This reaction can be performed automatically, in a single step, and requires no mixing device. Additionally, the technique displays a detection sensitivity that is compatible with space sample analysis [18,19]. Despite its advantages over the alkylalkoxycarbonylation-esterification method, however, there are several major features of the perfluoroacylation/perfluoroesterification method that make it ill-suited for space experimentation. First, the derivatization generates a high rate of racemized amino acid products, ranging from 10 percent to 40 percent of the parent product. Like the alkylalkoxycarbonylation-esterification reaction, perfluoroacylation/perfluoresterification generates derivatives of higher molecular weight than would be optimal for detection by space mass spectrometers. Moreover, the perfluoro-agent is highly corrosive and potentially damaging to both the GC-column and instrument. Lastly, reproducibility of the perfluoroacylation/perfluoroesterification reaction ranges from 3 percent to 11 percent, far lower than would be ideal for a space mission [18–22].

DMF-DMA dependant derivatization has been proposed as alternate chiral-based separation technique for amino acid compounds [23–25]. In fact, in March 2004, when the ESA/Rosetta mission was launched, the mission incorporated a novel, single step DMF-DMA-based strategy for amino acid derivatization developed by Meierhenrich et al. [27]. This technique represents the first derivatization technique to be incorporated into a space mission. Currently, this workflow has been incorporated in the COSAC experiment [28] based on a multi-capillary GC coupled with mass spectrometric instrumentation [29,30], and it should allow for the derivatization and subsequent chiral separation of any amino acids present at the surface of comet 67P/Churyumov-Gerasimenko. However, information regarding the applicability of using this technique for space applications is largely missing from the field [10,26]. While Meierhenrich co-workers did report the specific type of chiral columns used during chemical separation [28] and determined whether the selected columns could resist space constraints [31], no mention was given to the nature of their exact procedure or the choice of their specific experimental parameters. It has been well demonstrated that the DMF-DMA reaction is largely unaffected by high temperature (DMF-DMA derivatization still occurs at temperatures >190 °C when heat is maintained for more than one hour), leads to the production of low molecular weight products required for experimentation compatible with space mission analyses (limiting the MS instrument mass range required for detection), and the reaction can be readily automated. Thus, even despite the dirth of direct research on the topic, one can conclude that the DMF-DMA reaction is well-suited for space applications. DMF-DMA as a derivatization agent is therefore of great interest for use in potential analytical experiments proposed for future Mars exploration missions and it is only a lack of data that has prevented evaluating the potential of incorporating the technique into future Martian probes.

The aim of this paper is to study the mechanism of DMF-DMA-based derivatization and to use said analysis to develop a simple, competitive, and automated chiral derivatization procedure to be incorporated into the SAM and MOMA Mars experiments. The designed derivatization procedure must enable the *in situ* analysis of molecules of exobiological interest, such as amino acids, within the constraints of a space experiment. As our work shows, using DMF-DMA derivatization, we were able to detect and characterize all 20 proteinic amino acids by GC using the chiral capillary column (Chirasil-Dex) that will be used in the SAM and MOMA experiments. In fact, the Chirasil-Dex column proved to be the most effective capillary column for separation of the derivatives we generated with the DMF-DMA reaction [26].

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

For all experiments within this study, all 20 proteinic amino acids, in both L and D forms, purchased from Sigma–Aldrich and Fluka (Strasbourg, France). Sigma–Aldrich and Fluka also supplied the derivatization grade N,N-dimethylformamide dimethylacetal (DMF-DMA) used. Methyl Laurate (Fluka), diluted to 10^{-2} mol L^{-1} in ethyl acetate was used as the internal standard solution. One μL of the diluted methyl laurate solution was added to each derivatized

sample with a Research Eppendorf P10 pipette, precision of ±2.5 percent.

2.2. Derivatization process

Prior to derivatization, all amino acid samples were dissolved in distilled water to obtain standard stock solutions with concentrations ranging between 10^{-2} and 10^{-1} mol L^{-1}. The labile hydrogen of water molecules reacts with DMF-DMA, leading to an overreaction of the derivatization mechanism. To prevent amino acid degradation as a result of this overreaction, before addition of the derivatization solvents, water within the amino acid solutions was completely evaporated under constant dry nitrogen flow. Placing the reaction under constant nitrogen flow served to increase the rate of the evaporation process. The temperature of the evaporation process was kept sufficiently low so as to not induce degradation of any amino acid compounds. For technical facilities, the temperature of evaporation was fixed at 40 °C.

Our proposed DMF-DMA derivatization reaction is a simple one-step procedure. For each reaction performed, 20 μL of the derivatizing agent, DMF-DMA, was added directly to a small, one mL glass jar containing the dried amino acid sample. The reaction vial was then immediately placed in an oil-bath for incubation. Temperature of the oil-bath varied from 80° to 160°, depending on the specific parameters of the experiment. The derivatization reaction was also time-dependant; experimental samples were placed in the heated oil-bath for times ranging from 30 s to 60 min. Immediately after the reaction vial was removed from the oil-bath, one μL of the standard solution (methyl laurate 10^{-2} mol L^{-1} in ethyl acetate) was added to the reaction mixture. The resultant sample was injected into the GC–MS for analysis. Because of the derivatization reaction, the injected molecules were volatile, and therefore vaporizable, thus enabling GC–MS analysis. The derivatization reaction scheme for amino acids is illustrated in Fig. 1. For amino acid samples, the derivatization reaction leads to formation of an amidine ester.

2.3. Gas chromatography mass spectrometric analysis

All experiments were performed using a Shimadzu Gas Chromatography/Mass Spectrometer QP 5050A. For each GC–MS analysis, a one μL syringe from Hamilton was used to inject one μL of solution into the GC–MS. Before each injection, the syringe was carefully washed ten times with acetone to avoid chemical contamination, and then again with ethanol to prevent biological contamination. The QP 5050A GC/MS instrument was operated in quadrupole detection mode with the absolute detector voltage set at one kV. The GC–MS was equipped with a split/splitless injector, the temperature of which was set to 200 °C. For all experiments, the QP 5050A GC–MS was outfitted with Varian's CP-Chirasil DEX CB capillary column (Chirasil-β-dex (eptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrine), WCOT Ultimetal type, 30 m length, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μm film thickness. Maximum operating temperature of the column never exceeded 200 °C. To enhance overall lifetime of the Chirasil-Dex column, the liner was coated with DMCS-treated glass wool purchased from Varian (France). Pure helium (99.999 percent) was used as the carrier gas for the GC–MS. Shimadzu LabSolutions GC–MS solution Version 1.01. Real Time Analysis software controlled data acquisition and Shimadzu GC–MS Post run Analysis software was used to facilitate data analysis.

To determine each of the amino acids' unique spectral characteristics, each amino acid was initially characterized separately on the Chirasil-Dex column. Results generated were used to expand the existing NIST mass spectral library of DMF-DMA amino acids derivatives.

3. Results and discussion

As previously explained, DMF-DMA has already been used to derivatize amino acids, but no systematic study of the reaction mechanism for *in situ* analyses of chiral organics has been published [10]. Given the potential applicability of the derivatization reaction for space experimentation, DMF-DMA derivatization seems very promising for future *in situ* analyses, like the planned Exomars Martian mission. Indeed, the derivatization reaction is simple, and easily automated. DMF-DMA remains active for over an hour at temperatures as high as 190 °C, and, contrary to all other derivatizating agents, has a low mass, leading to the formation of low mass derivative products. Given that space mass spectrometers are often mass (m/z) limited and can thus only detect low mass derivatives, this last feature makes DMF-DMA especially attractive as a space derivatization agent. The proposed aim of this study was to determine the best analytical conditions for a derivatization reaction for space applications. To this end, we studied the following parameters: reaction temperature and duration, derivative efficiency enantiomeric resolution, analysis time, and MS detectability. Method validation was completed by investigating the precision, detection (LOD), and quantification limits (LOQ) of our technique. By studying the relative effect of different reaction parameters, such as the time and temperature of derivatization, the chromatographic separation, the quantitative aspects of the method, the structural information of the derivatives, and the mass spectra generated, we have been able to ensure that the parameters of the proposed reaction produce optimal results.

3.1. GC optimization

To ensure all experiments were completed in the shortest time possible without compromising chromatographic resolution, MS detection sensitivity, or the MS detection range, operating temperature parameters and instrument settings were determined prior to experimental data collection. The main factors tested to determine experimental settings were those thought to be most critical for analyte separation. Following experimentation to determine optimal settings for the instrument's helium carrier gas flow rate, split ratio, initial column temperature, and subsequent temperature profile, the following parameters were adopted: the split ratio was set to 80, and the temperature profile consisted of a starting temperature of 70 °C held for duration of five minutes, a linear gradient increasing 3 °C/min, and a ten minute temperature plateau held at the maximum temperature of 190 °C. Once temperature

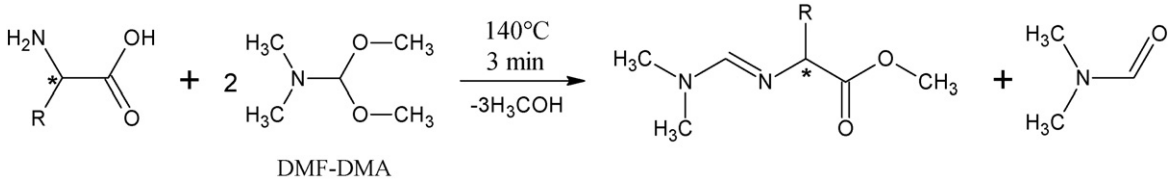


Fig. 1. Scheme of the derivatization reaction between amino acid and DMF-DMA. If a chiral center (*) exists, then it is conserved.

parameters were selected, optimum mobile phase velocity was determined by searching for the minimum height equivalent to a theoretical plate (HETP). Optimizing mobile phase velocity can dramatically decrease the time needed to complete an analysis, a key requirement of space experimentation. Typically, the HETP calculation depends upon the nature of the solute, the stationary phase used, the column geometry imposed, and the temperature during operation. For our study, the HETP was determined by calculating the ratio HETP = L/N with L, the column length and N the number of theoretical plates, N being determined through this equation: $N = 5.54(t_R/w_h)^2$, with the half-height of the chromatographic peak, and t_R the retention time. The HETP was then plotted as a function of the helium carrier gas velocity to provide Golay curves for three separate amino acids: Alanine, Leucine and Phenylalanine. Each measurement was taken three times to ensure satisfactory precision. As Golay curves are plotted for isothermal measurements, reference temperatures were selected for each amino acid. From our previously determined temperature programming, Alanine, Isoleucine, and Phenylalanine elute at 20.2, 28.2 and 44.6 min, respectively. Elution temperatures for these three amino acids were thus selected at 118, 146 and 190 °C, respectively. The Golay curves obtained are plotted in Fig. 2. The maximum efficiency obtained for all three tested amino acids was with a linear velocity ranging from about 30 to 42 cm s^{-1}. As the aim of our optimization study was to limit the time of analysis, we selected the highest velocity, i.e. 42 cm s^{-1}, as the carrier gas velocity for all subsequent studies. As the graph and chromatograms indicate, a carrier gas velocity of 42 cm s^{-1} is equivalent to a GC flow rate of 1.2 mL min^{-1}. Using this flow rate for all experimentation ensured efficient separation of all amino acid species without compromising rapid instrument analysis and runtime.

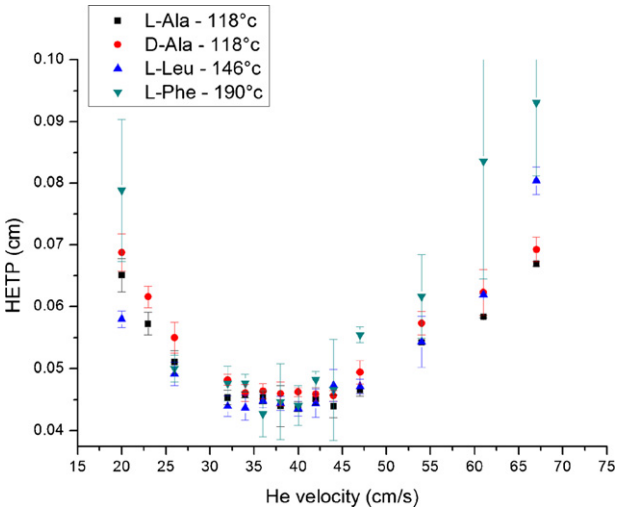


Fig. 2. Evolution of HETP versus U_{mean} different amino acids derivatized with DMF-DMA. The points represent the mean of the experimental data and the lines represent the error bars statistically estimated.
Derivatization with 20 μL DMF-DMA, 3 min at 140 °C. Injection of 1 μL of the mixture. GC settings: injector 250 °C, split mode 1/80, detector 200 °C. Isothermal temperature is depending of the amino acid studied: 118, 146 and 190 °C respectively for alanine, leucine and phenylalanine. Mass detector range, m/z from 40 to 350 u.

3.2. Mass spectra library and structural information on the derivatives

Our experimental results have been added to the pre-existing NIST mass spectral library for all 20 amino acids derivatives. Because the DMF-DMA derivatization reaction generates spurious by-products in addition to the primary amino acid product, many parent amino acid compounds were represented on the GC chromatogram as multiple derivatized products. Thus, to confidently identify and distinguish each derivatized amino acid, it was necessary to analyze each DMF-DMA derivative reaction one at a time. The mass spectra generated for all derivatives are listed in Table 1.

All DMF-DMA derivatives show a similar, characteristic fragmentation pattern. Prominent peaks are present in all MS/MS spectra at $m/z = 44$ amu and $m/z = 42$ amu, corresponding to the ion $(CH_3)_2N^+$ generated from the amine part of the molecule and the iminium ion $(CH_2)N^+(CH_2)$ respectively. Other ions present in

Table 1
Retention time for the L and D enantiomers, and characteristic peaks of mass spectra of the amino acid derivatives.

Amino acid	Retention time (min)	Mass fragments (m/z) in u and their relative intensity
Threonine	18.32–19.01, 22.3–23.2	84(100) 57(71) 42(20) 44(16) 56(14) 40(12) 71(12)
Serine	18.42–19.57	70(100) 42(85) 43(30) 44(25) 40(20) 69(18) 41(16) 101(13). 129(4)
Alanine	20.14–20.94	44(100) 99(62) 42(25) 56(13) 158(6)
Glycine	22.44	44(100) 42(39) 85(36) 112(8) 144(7)
Valine	24.42–24.55	44(100) 143(45) 127(34) 42(25) 46(14) 57(11) 41(10)
Leucine	28.19	44(100) 141(53) 156(32) 42(30) 85(24) 40(15) 73(14) 99(13)
Isoleucine	28.13	44(100) 143(55) 42(28) 141(27) 156(24) 73(19) 41(16)
Proline	35.40–35.77	98(100) 70(94) 43(44) 41(43) 68(19) 42(17) 44(13) 129(10) 157(7)
Aspartic acid	35.92–36.08	44(100) 157(41) 42(30) 99(18) 115(14) 156(11) 57(11) 216(9)
Asparagine	35.92–36.08	44(100) 157(40) 40(30) 42(29) 143(18) 99(15) 115(14) 156(10) 57(10) 45(9)
Cysteine	36.47–36.59	44(100) 143(50) 42(20) 46(11) 40(9) 57(5) 159(5) 204(2)
Methionine	40.01	44(100) 157(45) 42(35) 61(33) 111(28) 112(28) 144(23) 40(19) 143(18) 84(17) 57(16) 45(13) 97(12) 159(11) 218(6)
Glutamic acid	40.32	44(100) 40(44) 42(40) 111(38) 171(26) 57(17) 157(16) 46(16) 143(15) 73(14) 230(9) 199(8)
Glutamine	40.32	44(100) 111(69) 42(49) 171(36) 157(26) 41(23) 46(23) 57(23) 84(19) 170(19) 230(14) 199(13)
Phenylalanine	44.73–44.88	44(100) 143(63) 40(30 42(21) 45(11) 175(9) 73(6) 57(5)
Lysine	46.89	44(100) 70(42) 46(41) 42(33) 85(28) 99(23) 40(23) 185(17) 199(11) 142(10) 257(7) 242(7) ET 44(100) 115(62) 42(45) 46(41) 40(25) 143(18) 242(18) 157(17) 257(7)
Tyrosine	47.68–47.77	121(100) 44(57) 40(38) 192(19) 42(16) 143(16) 130(12) 45(10) 122(10) 73(8) 251(4)
Histidine	49.42	44(100) 42(93) 57(52) 192(52) 40(52) 112(39) 96(21) 137(15) 84(14) 164(8)
Arginine	51.38	44(100) 42(40) 98(34) 184(27) 99(26) 100(22) 43(21) 72(21) 46(21) 57(15) 125(14) 256(13)

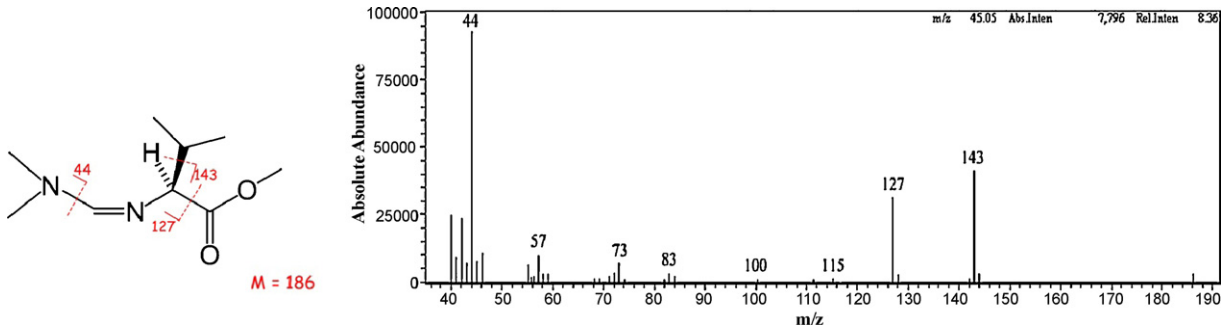


Fig. 3. Mass spectrum of valine amidine ester, and its proposed fragmentation pattern (the collision energy is 70 eV).

MS/MS spectra are detected at $m/z = 59$ amu, or can be attributed to an α-C-C cleavage of the carbonyl group with consecutive loss of the ion C^+OOCH_3, or from internal cleavage at various points within the molecular ion itself. An example of the fragmentation mechanism proposed for the amidine ester of Valine is reported in Fig. 3. Fragmentation of the amidine ester of Valine represents the simplest model observed. For a few of the derivatized amino acid products, derivatization and subsequent GC–MS/MS analysis generated multiple chemically separate species. These species can be attributed to either an incomplete derivatization of the parent amino acid or a molecular rearrangement of the molecule in the gas phase. Lysine is one such example. As the Lysine residue contains two amine groups (NH_2) and one carboxylic group, Lysine derivatives can be either mono or bi-amidinated. These two possible Lysine derivative species elute at different chromatographic retention times and produce different mass spectra. Similarly, Arginine is represented on the chromatogram by several different chromatographic peaks over a wide elution period. In cases where several peaks were observed from a single amino acid, the most prominent peak (largest peak area) within the reference spectra was chosen as the signature reference peak to be used in the rest of the study to identify the amino acid from the amino acid mixture.

3.3. Optimization of the derivatization procedure

To determine the optimal reaction conditions needed to produce maximum product yield with the lowest yield of racemization, the influence of temperature and reaction length on the efficiency of the derivatization reaction was studied. To ascertain a reaction's response sensitivity, the peak areas of the considered compound and the internal methyl laurate standard were determined on the Total Ion Chromatogram (TIC) (obtained using the instrument's full-scan mode) and subsequently compared. For each amino acid, the relative efficiency of the derivatization reaction has been estimated for reactions occurring at temperatures ranging from 80 to 160 °C for 30 s to 60 min. The obtained results show that similar trends exist as a function of varied temperature or reaction time for most of the amino acids studied. Here, we present results for three of the studied 20 amino acids (Fig. 4). As demonstrated in Fig. 4, DMF-DMA is able to derivatize all of the amino acids at temperatures as high as 160 °C. However, it must be mentioned that heating the DMF-DMA reaction to 160 °C generates more spurious by-product species than when the reaction is heated at lower temperatures. At 120 °C, the relative rate of derivatization increases for the first six seconds of the reaction (Fig. 4a), and then slowly decreases as the reaction is prolonged. Optimal reaction time can thus be determined; for our experiments, this reaction time was reached in about nine minutes. For higher reaction temperatures (140 and 160 °C), a similar pattern is observed (Fig. 4a and b), but an exponential-shaped increase in derivatization production occurs, followed by a drastic drop in the concentration of derivatized prod-

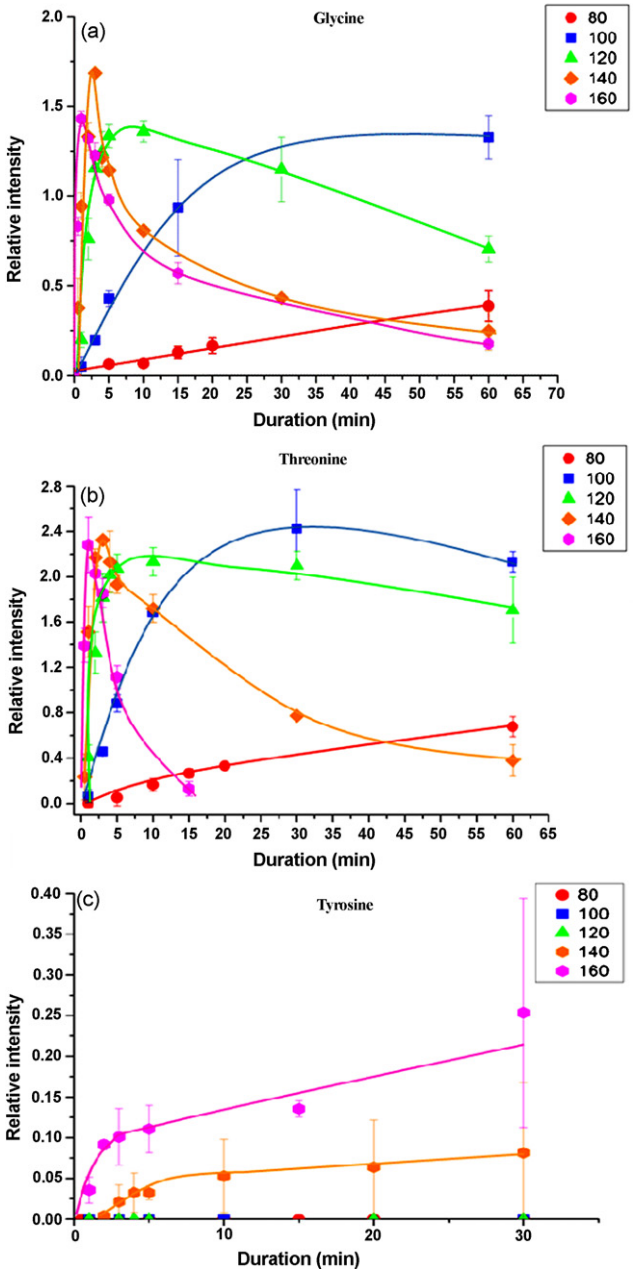


Fig. 4. (a, b and c) Plots of relative efficiency of derivatization (A/AIS) depending on the duration of derivatization (in min) for glycine, threonine and tyrosine. 0.5 μL of Gly 10^{-1} mol L^{-1} has been derivatized (20 μL of DMF-DMA) for each point. Each set of points represents a temperature of derivatization. There are 3 repetitions for each point and the mean is represented on the plot.

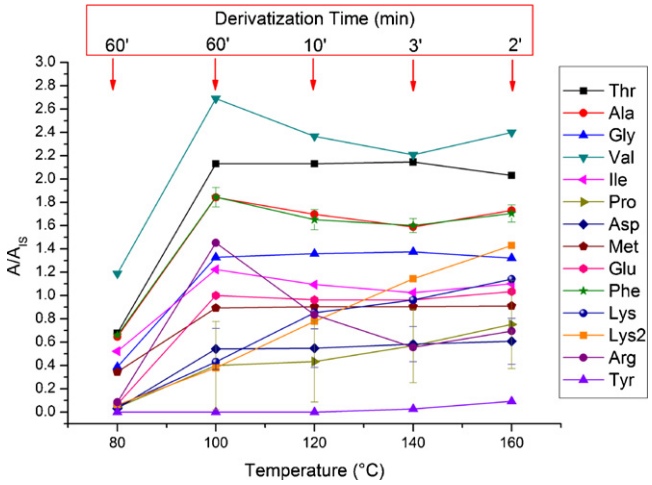


Fig. 5. Relative efficiency of derivatization depending on the temperature of derivatization, from 80 to 160 °C. For each temperature, the optimal duration of derivatization has been determined. 80 °C-60 min, 100 °C-60 min, 120 °C-10 min, 140 °C-3 min and 160 °C-2 min.
Error bar represents the racemization percentage of amino acids at the studied temperatures.
From the mother solution at 10^{-2} mol L^{-1}, amino acid solution are made as following: 5 + 5 μL L,D-Thr, 10 + 10 μL L,D-Ser, 0.5 μL Gly, 2 + 2 μL L,D-Ala, 0.5 + 0.5 μL L,D-Val, 0.5 + 0.5 μL L,D-Ile, 5 + 5 μL L,D-Pro, 2 + 2 μL L,D-Asp, 30 + 30 μL L,D-Cys, 0.2 + 0.2 μL L,D-Met, 1 + 1 μL L,D-Glu, 25 + 25 μL L,D-Tyr, 0.1 + 0.1 μL L,D-Phe, 8 + 8 μL L,D-Lys, 50 + 50 μL L,D-His, 10 + 10 μL Arg. After water evaporation, derivatization has been done with 20 μL DMF-DMA. Each point is the mean of at least 3 repetitions.

uct caused by amino acid degradation. At higher temperatures, degradation of the parent amino acid compound can be observed for even the shortest derivatization durations. With the exception of reactions incubated at 80 °C, for all reactions studied, the maximum derivatization rate was obtained for reactions at every temperature point. Thus, we can conclude that an optimal derivatization duration does exists for most of the temperatures tested. If the derivatization reaction is allowed to extend beyond this time, parent compound degradation occurs, leading to an overall decrease in the relative derivatization yield. Our determined optimum is reported in Fig. 5 as a function of reaction time and temperature. In the 100–160 °C temperature range, the maximum rate of derivatization is relatively constant regardless of the reaction temperature. For ExoMARS experiments, then, the temperature used will be dictated by the time allocated for the derivatization step. For example, if shorter times for the derivatization reaction are required, it will be necessary to use higher temperatures. For temperatures lower than 100 °C, we observe that the derivatization yield increases continuously regardless of reaction time. For example, as shown in Fig. 4a, for derivatization of Glycine at 80 °C, the percent product yield never reaches a maximum within experimental conditions (60 min). Thus, we can conclude that for the time parameters used in our study, the maximum derivatization yield cannot be reached for temperatures lower than 100 °C.

However, even if this is the general trend, not all amino acids demonstrate this characteristic behaviour. Some amino acids are more resistant to derivatization than others. Indeed, Tyrosine (Fig. 4c) is the extreme case. At lower temperatures (80 or 100 °C), regardless of reaction time, no derivatization of the Tyrosine parent species has been observed. Even at the highest temperature and longest reaction time tested, the rate of formation of the Tyrosine derivative continued to increase, never reaching a maximum point. The highest reaction yield we were able to generate was obtained using the upper limits of our experiment; reaction conditions consisting of 160 °C heat applied for 60 min. If Tyrosine is present in a sample collected during space experimentation, derivatization with DMF-DMA will be incomplete, and detection of the residue will be hindered.

In order to determine the best temperature and reaction duration settings, we have also studied the evolution of the derivatization rate as a function of the temperature (Fig. 5). To simplify results, we have only reported how derivatization of each amino acid varies as a function of the previously determined optimal temperature and reaction time (Fig. 4). As our data demonstrates, the maximum derivatization yield is achieved when the derivatization reaction proceeds at a temperature of 100 °C. With the exception of Tyrosine and Lysine derivatives, at a temperature of 100 °C, the rate of formation of derivatized products plateaus midway through the reaction. From our analysis, we can deduce that our derivatization technique is well-suited for reaction temperatures kept higher than 100 °C, and that an increase in the temperature of the reaction can limit the overall time required for the derivatization process. Before making a final decision regarding the temperature and duration of the derivatization step, however, several important points needed to be considered. First, for use as a space application, *in situ* derivatization needs to be both minimally energy and time consuming. Second, the derivatization reaction must be applicable for detection of enantiomeric excess. Lastly, reaction conditions must minimize the possibility of generating racemized amino acid products. As reaction temperatures increase, so to does the risk of generating racemized products. The same phenomenon is observed with derivatization duration. Thus, before determining temperature parameters and reaction duration, it became necessary to study the influence of DMF-DMA derivatization upon racemized amino acid formation.

3.4. Racemization

For all chiral amino acids, any asymmetric carbon bound to hydrogen and adjacent to an electron-withdrawing group, such as the oxygen-rich carboxyl of organic acids, will easily exchange that hydrogen when in the presence of an H_2O or OH^- molecule. Additionally, this alpha-hydrogen atom may also be attacked by another base. During hydrogen exchange or base attack, the three remaining functional groups of the amino acid molecule will rearrange, producing a planar molecular ion. A hydrogen ion can then bond on either side of the plane with equal likelihood, thus racemizing the compound, i.e. converting the molecule from one configuration to the other [32]. This racemization process will only be enhanced during reactions with increasing temperature and heating duration.

To investigate the probability of generating racemized amino acids during the DMF-DMA derivatization process, each amino acid compound has been injected onto the GC-column in its L-form only. Error bars present on Fig. 5 represent the rate of racemization reported for each value. Excepted for Proline and Aspartate, the two amino acids that display significant racemization, no racemization has been observed for derivatization reactions heated to 80 °C, regardless of the duration with which the reaction was allowed to proceed (Fig. 5). As shown in Fig. 5, racemization is a kinetically controlled reaction. Indeed, at higher reaction temperatures, an increase in the duration of derivatization is directly linked to an increase in the rate of racemization. The higher the reaction temperature, the faster the rate of racemization increases as a function of the reaction's duration. For most of the amino acid compounds tested, when the DMF-DMA derivatization reaction proceeds at 140 °C, less time is needed to fully derivatize the parent amino acid, highest yield for most amino acids is detected, and products from the derivatization reaction separate better under the chromatographic conditions of the experiment than when the derivatization reaction is allowed to proceed at different temperatures. However, under these conditions, some hardly derivatized amino acids can still be observed. When the reaction proceeds at

lower temperatures, however, derivatized Tyrosine groups cannot be detected at all, and Lysine and Proline residues are only partially derivatized, thus making their detection difficult. At higher reaction temperatures (160 °C), a high percent yield of racemized product occurs, making these higher temperature reactions incompatible with experimental objectives (Fig. 5).

To facilitate the most advantageous compromise between racemization and derivatization yield, reactions were allowed to proceed for three minutes at a temperature of 140 °C. In fact, for all 20 amino acids, these reaction settings produced the most optimal products in regards to product yield, number of amino acids derivatized, and percent racemization. Indeed, using a higher reaction temperature ensured that the derivatization reaction occurred when the energetic barrier was intense; the short reaction duration helped prevent both degradation of the thermally fragile components and racemization.

An extensive study was undertaken to determine how to minimize the occurrence of racemization for the three minute, 140 °C reaction. In Table 2, we have reported the L/D ratio and the enantiomeric excess, calculated as followed by Eq. (1).

Enantiomeric excess:

$$E_e\,(\%) = 100\frac{L - D}{L + D} \quad (1)$$

As demonstrated in Table 2, racemized products were not observed for any amino acid except for Asn, Asp, Pro, Ser and Tyr. Four of those amino acids (Asn, Asp, Pro and Ser) displayed partial racemization; only Tyrosine displayed complete racemization. For Asn, Asp, Pro and Ser, racemization generated by derivatization will not pose a problem for space applications if the racemization rate is well determined. Indeed, identifying the exact rate of racemization allows the initial value of enantiomeric excess to be elucidated from a simple back-calculation.

It has been suggested that oxygen pressure could affect racemization rate [29]. We thus derivatized our amino acid compounds in a nitrogen-enriched environment. Like Borjesson et al. [33], we also detected no significant difference in percent racemization between derivatization reactions within the presence or absence of oxygen. As such, we decided not to continue in oxygen-free conditions.

Table 2
Enantiomeric excess and D/L ratio of all the separated amino acids. Standard deviation (SD) has been calculated on 3–7 repetitions depending on the AA. Derivatization conditions are 140 °C during 3 min.

Amino Acid	E_e (percent)	L/D ratio	SD
L-Threonine	100	∞	ND
D-Threonine	100	0	ND
L-Serine	40.7	2.43	0.51
D-Serine	38.6	0.41	0.09
D-Alanine	100	0	ND
L-Alanine	100	∞	ND
D-Valine	100	0	ND
L-Valine	100	∞	ND
L-Proline	43.9	3.22	1.31
D-Proline	45.1	0.38	0.10
D-Aspartic acid	77.2	0.13	0.01
L-Aspartic acid	85.3	12.7	1.16
D-Asparagine	55.2	0.29	0.03
L-Asparagine	61.9	4.34	0.91
D-Cysteine	100	0	ND
L-Cysteine	100	∞	ND
D-Phenylalanine	100	0	ND
L-Phenylalanine	100	∞	ND
D-Tyrosine	0	1	ND
L-Tyrosine	0	1	ND

We are using an L/D ratio of 0.94 to 1.06 as the ratio equivalent for racemic mixture, theoretically determined at 1.00. Indeed, the mean of the typical uncertainty for the L/D ratio measurement on four to six repetitions of randomly picked amino acids is about 0.06 and thus a L/D ratio of 0.94 to 1.06 would be statistically indistinguishable from a racemic mixture. This value is a mean, it can vary for each amino acid studied from two to nine percent, and a detailed analysis of each compound should be completed to determine the enantiomeric excess analysis of spectra.

3.5. Chromatographic separation of the amino acids enantiomeric pairs

All the proteinic amino acids have been separated using the chromatographic conditions previously selected (Fig. 6). However under these conditions, some of derivatized amino acids co-elute:

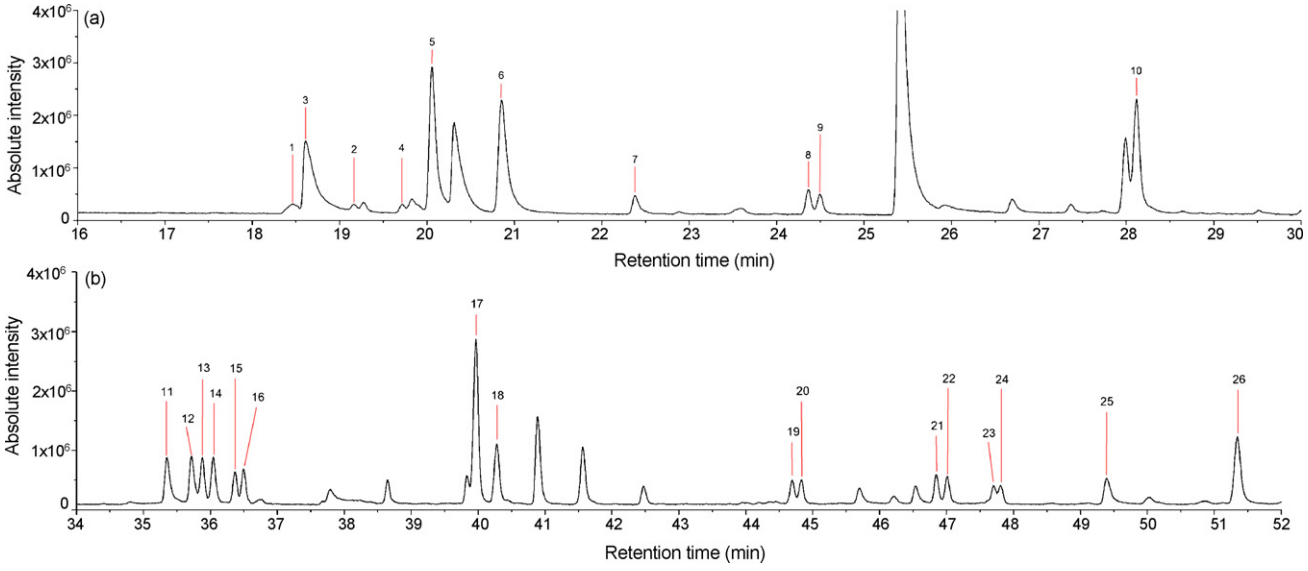


Fig. 6. (a, b) Chromatograms with all the separated amino acids. Derivatization with 20 μL DMF-DMA, 3 min at 140 °C. Injection of 1 μL of the mixture. GC settings: injector 250 °C, split mode 1/80, detector 200 °C, column 70 °C 5 min, increasing temperature rate 3 °C/min up to 190 °C, isotherm 10 min at 190 °C. Mass detector range, *m/z* from 40 to 350 uma. Amino acids have been run, in the concentrations described in Fig. 5.
1: L-Thr, 2: D-Thr, 3: L-Ser, 4: D-Ser, 5: D-Ala, 6: L-Ala, 7: Gly, 8: D-Val, 9: L-Val, 10: D + L Ile, 11: L-Pro, 12: D-Pro, 13: D-Asp, 14: L-Asp, 15: D-Cys, 16: L-Cys, 17: D + L Met, 18: D + L Glu, 19: D-Phe, 20: L-Phe, 21: D + L-Lys, 22: D + L Lys, 23: D or L Tyr, 24: L or D Tyr, 25: D + L His, 26: D + L Arg.

Table 3
Order of enantiomeric separation for the 10 observed amino acids. Retention time with the defined parameters of the GC run, D/L order and resolution.

Amino acid	Order L/D	R_s
Threonine	L D	4.73
Serine	L D	6.36
Alanine	D L	6.59
Valine	D L	0.83
Proline	L D	1.67
Aspartic acid	D L	0.97
Asparagine	D L	0.85
Cysteine	D L	0.60
Phenylalanine	D L	0.84
Tyrosine	ND*	0.70

* Complete racemization.

Glutamine co-elutes with Glutamate, Asparagine with Aspartic Acid, and Lysine co-elutes with Isoleucine. All but one proteinic amino acid is detected (Fig. 6). As Tryptophan is the heaviest of the 20 amino acids, and contains no derivatizable side chain groups, Tryptophan does not elute of the Chiral-Dex column at even the upper temperature limit (200 °C) of the column. To determine the chromatographic separation between the L and D forms of each amino acid, mixtures consisting of both members of the enantiomeric pair were injected onto the GC–MS and analyzed. Ten of the tested amino acids display chiral separation on the chromatogram (Fig. 6): Thr, Ser, Ala, Val, Pro, Cys, Asn, Asp, Phe and Tyr (Glycine is not a chiral amino acid). Threonine and Isoleucine have two asymmetric carbons. As such, Threonine is detected as two pairs of eluted compounds. The diastereoisomers of Isoleucine (R,R or S,S) and allo-Isoleucine (R,S or S,R) can be distinguished chromatographically, but do not separate enantiomerically. Due to low reactivity of its Guanidine group, Arginine is hardly detected. Glutamine and Glutamic Acid display identical elution profiles, as do Glutamine and Glutamic Acid, but each amino acid produces slightly different mass spectra. However, thanks to SIM chromatographic analysis, it is possible to identify even co-eluted amino acids.

Among all amino acids detected, our proposed method enables us to clearly separate the enantiomers of Threonine, Serine, Alanine, Valine, Proline, Aspartic Acid, Asparagine, Cysteine, Phenylalanine and Tyrosine. This chiral separation is relevant to space applications as Aspartic Acid, Serine, Glutamic Acid, Alanine, Valine, and Glycine have already been detected in micrometeorites [34].

For each amino acid, the resolution $R_S = 2(t_{r_2} - t_{r_1}/\omega_1 + \omega_2)$, which measures the quality of separation with ω the width of the peak at its base, has been evaluated for each (Table 3). The elution order for each enantiomeric pair was determined by injecting first the racemic mixture and then, the isolated L or D form (Table 3). For Threonine, Serine and Proline, the L form elutes before the D form. The opposite is true and experimentally observed for Alanine, Valine, Aspartic Acid, Asparagine, Cysteine, and Phenylalanine whereby the D-form elutes prior to the L-form. For Isoleucine, Leucine, Methionine, Glutamine, Glutamic Acid, Histidine and Arginine, only one peak is detected, the two forms are superimposed on the chromatogram and co-elute. No clear relation has been found between the physicochemical properties of an amino acid (acidity, size of the side-chain, etc.) and its chromatographical characteristics (order of elution, peak area, etc.). Some heavy compounds present in the reaction process produced several detectable by-products. Fortunately, for our experimental aims, these by-products did not interfere with analysis. However, if these compounds are the product of thermal degradation, during space experimentation, signal from the native molecule may become suppressed, and the detection limit of the experiment will be decreased. In conclusion, ten enantiomeric pairs have been separated with satisfactory R_S values (Table 3), we were able to elute 19 of a potential 20 amino acid compounds, and of those 19, 10 compounds could be quantitatively separated into distinguishable enantiomeric pairs.

3.6. Quantitative analysis: relative response, linearity and detection and quantification limits

For quantitative analysis, a calibration curve has been plotted with standard solutions for each of the derivatized amino acids, Using the previously determined chromatographic and derivatization conditions, 0.3 pmol to 2.3 nmol of each amino acid have been analyzed. Here we have investigated the linearity of the response, and also calculated the limits of detection and quantification from our experimental measurements.

The mother solution of each amino acid consisted of a concentration equal to 10^{-1} mol L^{-1}. Once obtained, one μL (equalling 10^{-7} mol) of the mother solution was evaporated under constant nitrogen flow prior to the introduction of the derivatization solvents. The derivatization reaction thus consisted of dried amino acid residue, 20 μL of DMF-DMA, plus a volume of one μL of standard solution. The final solution injected into the GC–MS instrument has a concentration of $4.8.10^{-3}$ mol L^{-1}. To elucidate the limit of detection for the GC–MS instrument, this initial solution was then serially diluted until detection of the derivatized product was no longer possible.

Table 4
Linear regression and standard deviation for each amino acid.

AA	Initial amount (nmol)	Injected amount (pmol)	Regression equation	R^2
D-Ala	2–800	1.1–460	$Y = 0.51893x - 0.06266$	0.998
L-Ala	2–800	1.1–460	$Y = 0.27684x - 0.02633$	0.999
Gly	2–800	1.1–460	$Y = 0.29966x + 0.00569$	0.999
D-Val	1–400	0.6–220	$Y = 0.26205x - 0.06192$	0.997
L-Val	1–400	0.6–220	$Y = 0.25717x - 0.06424$	0.997
Ile	1–400	0.6–220	$Y = 0.30053x - 0.08292$	0.996
L-Pro	10–4000	5.7–2280	$Y = 0.3175x - 0.09295$	0.988
D-Pro	10–4000	5.7–2280	$Y = 0.28725x - 0.05132$	0.991
D-Asp	1–400	0.6–220	$Y = 0.17784x + 0.01751$	0.995
L-Asp	1–400	0.6–220	$Y = 0.1926x - 0.0228$	0.999
D-Phe	0.5–200	0.3–100	$Y = 0.21815x - 0.07822$	0.997
L-Phe	0.5–200	0.3–100	$Y = 0.19868x - 0.06207$	0.998
L-Thr	3–1200	1.7–680	$Y = 0.04324x + 0.04853$	0.951
D-Thr	3–1200	1.7–680	$Y = 0.04544x + 0.05349$	0.955
L-Ser	5–2000	2.8–1140	$Y = 0.11878x - 0.00322$	0.999
D-Ser	5–2000	2.8–1140	$Y = 0.01648x + 0.02357$	0.926

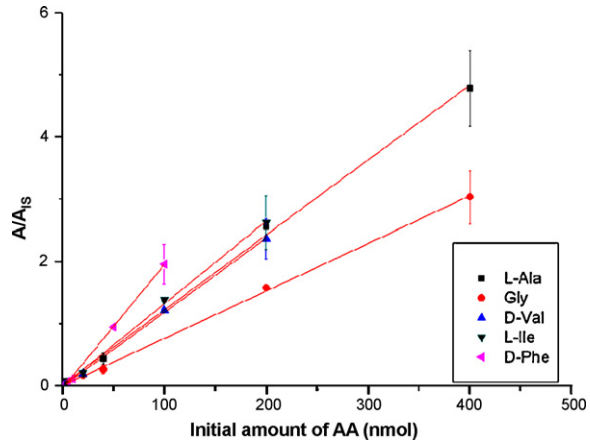


Fig. 7. Calibration curves of response of some amino acids (Gly, L-Ala, D-Val, L-Ile, D-Phe) at different concentrations.

Table 5
Experimental and theoretical limit of detection and limit of quantification of the separated Amino Acids derivatized with DMF-DMA.

Amino acid	LOD*	LOQ*	Experimental LOD 3 < S/N < 10	
			pmol	ppm
D-Ala	0.6	2.0	2.3	0.18
L-Ala	1.2	3.8	2.3	0.18
Gly	1.1	3.6	2.3	0.15
D-Val	0.6	2.0	1.1	0.12
L-Val	0.6	2.1	1.1	0.12
L-Ile	0.5	1.8	1.1	0.13
D-Ile	0.5	1.8	1.1	0.13
L-Pro	4.8	16.2	11.4	1.3
D-Pro	5.4	17.9	11.4	1.3
D-Asp	0.9	3.0	1.1	130
L-Asp	0.8	2.8	1.1	130
D-Phe	0.4	1.2	0.5	0.08
L-Phe	0.4	1.3	0.5	0.08
L-Thr	11.6	38.6	3.4	0.36
D-Thr	10.8	36.0	3.4	0.36
L-Ser	6.7	22.4	5.7	0.6
D-Ser	49.8	166.1	5.7	0.6

* Injected pmol.

3.7. Linearity/calibration curve

As a series of five sequential experiments, increasing amounts (starting amounts equal to 12–288 nmol, injected amounts equal to 5–120 pmol) of derivatized amino acid product were injected into the GC–MS for analysis. To obtain calibration curves for each experiment, the peak area of each eluted compound, obtained in the MS TIC mode, was plotted as a function of the amount of amino acid product injected. Each point in the resultant calibration curves represents the average value of three replicate measurements. To determine peak area, computational analysis was completed using the least-squares method, the regression parameters of which are reported in Table 4. The strong linearity of the calibration curves is demonstrated by the determined squared correlation coefficient values, all of which are close to 1. Calculated calibration curves are shown in Fig. 7.

3.8. Detection limit and quantification limit

The linearity of the applied method allows us to infer the resolution and quantification limits of the experiment. Once inferred, the resolution limit of the experiment can be used to predict the minimal quantity of amino acid needed for detection and analysis. The detection limit X_{LOD} was determined as a function of the analyte concentration, yielding a signal value $Y_{LOD} = y_b + 6\sigma_b$, whereby y_b is the blank average signal generated from ten blank responses. Following determination of the $X_{LOD,}$ the LOD could then be experimentally derived (Table 5).

For each amino acid tested, we determined the limit of detection for our technique to be between 80 ppb to 1.3 ppm. This LOD range is consistent with the concentration found in micrometeorites (from 100 ppb to 100 ppm each amino acid [30,35] or meteorites (from 4 to 60 ppm all together) [36–40]. From the meteoritic flux that we suppose on Mars, we can infer that 1 ppb to 250 ppm of each amino acid will be present on the planet. If this calculation is correct, using our DMF-DMA derivatization reaction, our GC–MS instrument will be sufficiently sensitive to detect the Martian amino acid compounds.

4. Conclusions

When compared to other potential derivatizating agents such as methylchloroformate derivatives or perfluoroacyl/perfluoroalkyl esters, DMF-DMA provides significant advantages for space-related applications. Table 6 highlights the advantages of the DMF-DMA

Table 6
Advantages and drawbacks of 3 derivatizating agents, with regards to spatial application.

	Advantages	Drawbacks
Methyl chloroformate [24]	• One-step, fast reaction • Non-selective reagent for a wide range of analyte • Reaction in aqueous medium • Within mild conditions • Reproducible	• Requires vigorous stirring. • High molecular weight derivatives • Many reagents required • Reagent storage at low temperature • Deteriorates cyclodextrin based-columns • By-products
Perfluoroacylation/perfluoroesterification Alkyl anhydre [14]	• One-step procedure • Low detection and quantification limit	• Racemization • High molecular weight derivatives • Poor reproducibility (3–11 percent) • Very corrosive
DMF-DMA	• Simple and fast one-step reaction • Low detection and quantification limit • Non-selective reagent for a wide range of analyte • Stability (>160 °C) • No corrosive • Low mass derivatives • Short analysis time • Low racemization	• Between-run reproducibility • By-products

technique for space use when compared to the two other methods optimized and adapted in our laboratory for the same objectives. As detailed in Table 6, reliance upon DMF-DMA derivatization gives rise to lower weight derivatized molecules most compatible with space mass spectrometry performance. Moreover, the derivatization reaction facilitates the enantiomeric-based separation of ten of the 19 potential amino acids when all 19 are eluted during a single column run. DMF-DMA is stable and still active at high temperatures (up to 190 °C) essential for space analysis. Similarly, the low time and energy consumption of the DMF-DMA technique facilitates its implementation in the MOMA experiment. Additionally, DMF-DMA derivatization is a rapid one-step reaction (without any cofactor) that can occur under relatively low temperatures (140 °C), allowing for injection of the derivatives obtained directly onto the GC–MS system. Because the reaction occurs in one step, the entire process can easily be automated. Reagents needed for the reaction will be stored at the bottom of the reactor (oven) and isolated from the rest of the oven through a smelted foil. DMF-DMA will then be released at the chosen temperature (140 °C) and contact the Martian soil samples in order to extract and derivatize all targeted organic compounds. Analysis of the target organic compounds will occur rapidly and reproducibly. The three-minute incubation at 140 °C adopted for the procedure represents a compromise between the efficiency of derivatization, the number of derivatives generated, and the destruction rate and/or racemization of these derivatives. The universality of DMF-DMA derivatization and its overall utility and efficiency in chiral-based separation has been demonstrated using the widest possible range of amino acid compounds. In conclusion, it is the culmination of all of these features that makes DMF-DMA the best chemical to use in the *in situ* search for life.

References

[1] S.A. Benner, K.G. Devine, L.N. Matveeva, D.H. Powell, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (2000) 2425.
[2] A. Buch, D.P. Glavin, R. Sternberg, C. Szopa, C. Rodier, R. Navarro-Gonzalez, F. Raulin, M. Cabane, P.R. Mahaffy, Planet. Space Sci. 54 (2006) 1592.
[3] S.O. Akapo, J.M.D. Dimandja, D.R. Kojiro, J.R. Valentin, G.C. Carle, J. Chromatogr. A 843 (1999) 147.
[4] J.R. Valentin, LC GC-Mag. Sep. Sci. 7 (1989) 248.
[5] R. Sternberg, A. Buch, C. Szopa, C. Vidal-Madjar, F. Raulin, Gas chromatography in space exploration, in: I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole (Eds.), Encyclopaedia of Separation Science, Academic Press, London, 2007, p. 1.
[6] A. Buch, C. Marchetti, D. Meunier, R. Sternberg, F. Raulin, J. Chromatogr. A 999 (2003) 165.
[7] C. Rodier, R. Sternberg, C. Szopa, A. Buch, M. Cabane, F. Raulin, Adv. Space Res. 36 (2) (2005) 195.
[8] C.F. Poole, Handbook of Derivatives for Chromatography, Heyden, 1997.
[9] D. Meunier, R. Sternberg, A. Buch, C. Szopa, C. Rodier, M. Cabane, F. Raulin, Adv. Space Res. 39 (3) (2007) 337.
[10] C. Rodier, C. Laurent, C. Szopa, R. Sternberg, F. Raulin, Chirality 14 (2002) 527.
[11] C. Rodier, F. Raulin, C. Vidal-Madjar, J. Chromatogr. A 915 (2001) 199.
[12] M.C. Pietrogrande, M.G. Zampolli, F. Dondi, C. Szopa, R. Sternberg, F. Raulin, J. Chromatogr. A (2005) 255.
[13] A. Buch, R. Sternberg, C. Szopa, C. Freissinet, C. Garnier, C. Rodier, R. Navarro-González, F. Raulin, M. Cabane, D.P. Glavin, P.R. Mahaffy, Adv. Space Res. 43 (2009) 143.
[14] P. Husek, K. Macek, J. Chromatogr. 113 (1975) 139.
[15] J. Wang, Z.H. Huang, D.A. Gage, J.T. Watson, J. Chromatogr. A 663 (1994) 71.
[16] P. Husek, P. Matucha, A. Vrankova, P. Simek, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 789 (2003) 311.
[17] M.G. Zampolli, G. Basaglia, F. Dondi, R. Sternberg, C. Szopa, M.C. Pietrogrande, J. Chromatogr. A 1150 (2007) 162.
[18] M. Zampolli, D. Meunier, R. Sternberg, F. Raulin, C. Szopa, M.C. Pietrogrande, F. Dondi, Chirality 18 (2006) 279.
[19] E. Watson, S. Wilk, Anal. Biochem. 59 (1974) 441.
[20] A. Miki, M. Katagi, K. Zaitsua, H. Nishiokaa, H. Tsuchihashi, J. Chromatogr. B 865 (2008) 25.
[21] A. Lapin, M. Karobath, J. Chromatogr. 193 (1980) 95.
[22] E. Borjesson, L. Torstensson, J. Chromatogr. A 886 (2000) 207.
[23] M.F. Grubb, P.S. Callery, J. Chromatogr. 469 (1989) 191.
[24] C. Birkemeyer, A. Kolasa, J. Kopka, J. Chromatogr. A 993 (2003) 89.
[25] D.W. Johnson, Rapid. Commun. Mass Spectrom. 15 (22) (2001) 2198.
[26] V. Schurig, M. Juza, M. Preschel, G.J. Nicholson, E. Bayer, Enantiomer 4 (1999) 297.
[27] U.J. Meierhenrich, W.H.P. Thiemann, F. Goesmann, R. Roll, H. Rosenbauer, Chirality 13 (2001) 454.
[28] F. Goesmann, H. Rosenbauer, R. Roll, C. Szopa, F. Raulin, R. Sternberg, G. Israel, U. Meierhenrich, W. Thiemann, G. Munoz-Caro, Space Sci. Rev. 128 (2007) 257.
[29] C. Szopa, R. Sternberg, D. Coscia, F. Raulin, C. Vidal-Madjar, H. Rosenbauer, J. Chromatogr. A 953 (2002) 165.
[30] C. Szopa, R. Sternberg, F. Raulin, H. Rosenbauer, Planet. Space Sci. 51 (2003) 863.
[31] C. Szopa, U.J. Meierhenrich, D. Coscia, L. Janin, F. Goesmann, R. Sternberg, J.-F. Brun, G. Israel, M. Cabane, R. Roll, F. Raulin, W. Thiemann, C. Vidal-Madjar, H. Rosenbauer, J. Chromatogr. A 982 (2002) 303.
[32] V.A. Basiuk, Chiral. Space Biol. 27 (2001) 335.
[33] U. Luzzana, T. Mentasti, J. Opstvedt, E. Nygard, V.M. Moretti, F. Valfre, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2879.
[34] D.P. Glavin, G. Matrajt, J.L. Bada, Adv. Space Res 33 (2004) 106.
[35] K.L.F. Brinton, C. Engrand, D.P. Glavin, J.L. Bada, M. Maurette, Orig. Life Evol. Biosph. 28 (1998) 413.
[36] T.J. Wdowiak, G.C. Flickinger, J.R. Cronin, Astrophys. J. 328 (1988) L75.
[37] O. Botta, J.L. Bada, Surv. Geophys. 23 (2002) 411.
[38] A.a.M. Brack, P., Encyclopedia of Astronomy and Astrophysics, 2002, p. 2211.
[39] S. Pizzarello, G.W. Cooper, G.J. Flynn, Meteorites and the Early Solar System II, Univ. Ariz. Press, Tucson, 2006, p. 625.
[40] P. Ehrenfreund, D.P. Glavin, O. Botta, G. Cooper, J.L. Bada, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (2001) 2138.

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Advances in Space Research 43 (2009) 143–151
ADVANCES IN SPACE RESEARCH (a COSPAR publication)
www.elsevier.com/locate/asr

Development of a gas chromatography compatible Sample Processing System (SPS) for the in-situ analysis of refractory organic matter in martian soil: preliminary results

A. Buch [a,*], R. Sternberg [b], C. Szopa [c], C. Freissinet [a,b], C. Garnier [a,b], El J. Bekri [a], C. Rodier [d], R. Navarro-González [e], F. Raulin [b], M. Cabane [c], M. Stambouli [a], D.P. Glavin [f], P.R. Mahaffy [f]

[a] *Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux, Ecole Centrale Paris, Grande voie des vignes, 92295 Chatenay-Malabry, France*
[b] *Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques, UMR 7583 CNRS, Université Paris 7 -12, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, Cedex, France*
[c] *Service d'Aéronomie, SA/IPSL, 91371Verrrières-le-Buisson, France*
[d] *Laboratoire de Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles, UMR 6514, 86022 Poitiers, France*
[e] *Laboratorio de Química de Plasmas y Estudios Planetarios, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-543, México D.F. 04510, Mexico*
[f] *NASA Goddard Space Flight Center, Code 699, Greenbelt, MD 20771, USA*

Received 13 November 2006; received in revised form 4 April 2008; accepted 1 May 2008

Abstract

In the frame of the 2009 Mars Science Laboratory (MSL) mission a new sample preparation system (SPS) compatible with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) has been developed for the in situ analysis of complex organic molecules in the Martian soil. The goal is to detect, if they exist, some of the key compounds that play an important role in life on Earth including carboxylic acids, amino acids and nucleobases.

Before analysis by GC–MS, all the targeted refractory compounds trapped in the soil sample must be extracted and chemically transformed (derivatization). The extraction is carried out in a two step process which requires the separation and evaporation of the extraction solvent in order to concentrate the organic compounds of interest. To improve the compatibility of the technique for spaceflight a one step procedure is performed using only a thermal processing for the extraction step.

These two extraction methods are followed by a derivatization step which uses MTBSTFA (*N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide).

The sample preparation methods have been tested on "spiked" soil and on Atacama Desert soil coming from the aridest part of the desert located in Chile. All the targeted compounds have been detected by these two procedures, demonstrating the applicability of the technique for in-situ analysis. The one step procedure has been successfully tested on Atacama soil samples with a laboratory pilot reactor, developed for this study, within representative space operating conditions.
© 2008 COSPAR. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Derivatization; Extraction solid–liquid; GC–MS; Amino acids; Carboxylic acids; Ultrasound; Mars; Isopropanol; Water; Atacama

1. Introduction

Recent evidence for sedimentary processes and standing liquid water on Mars from the Mars Exploration Rovers (Ksanfomality, 2003) supports the idea that Mars may have once been habitable. Even if life never arose or

* Corresponding author. Tel.:+33 1 41131199; fax: +33 1 41131597.
E-mail address: arnaud.buch@ecp.fr (A. Buch).

0273-1177/$34.00 © 2008 COSPAR. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.asr.2008.05.001

became extinct, the subsequent cooling of Mars and the lack of extensive tectonic recycling may have enabled molecular evidence of prebiotic or biotic activity to be preserved in ancient sediments.

In 1972, the Viking GC–MS experiments did not detect any organic compounds of Martian origin above the part per billion levels in the upper 10 cm of surface fines (Biemann et al., 1977). Significant amounts of non-volatile products, such as amino acids and carboxylic acids, would not have been extracted by the Viking pyrolysis procedure and detected by the GC–MS instruments EPSL PNAS (Glavin et al., 2001; Benner et al., 2004). These organic compounds play an important role in terrestrial biochemistry. Thus, the goal of our work is to develop a new in-situ technique in order to extract these key organic compounds from the Martian soil using chemical derivatization techniques already developed in support of the Rosetta lander mission to a comet (Meierhenrich et al., 2001). Derivatization capability is also currently being implemented on the Sample Analyses at Mars (SAM) GC–MS instrument on the 2009 Mars Science Laboratory (MSL) rover.

In the future, instruments designed to search for a broader range of organic compounds on Mars, especially those that are important in life on Earth, will require an improved ability to extract and detect non-volatile organic species in samples that are better protected from oxidants and ultraviolet radiation (Soffen et al., 1976). The discovery of traces of organic compounds in Martian surface samples could give us clues about potential past prebiotic chemistry or perhaps extinct or extant life on Mars. We are presently developing an advanced GC–MS based capability to carry out a sensitive and broad survey of trace organic species contained in solid phase Martian samples.

The extraction of amino and carboxylic acids from a solid matrix such as the Atacama Desert soil can be achieved using a variety of well-established methods. The most classical and conventional is the Soxhlet extraction that normally requires a large volume of solvent (up to 250 mL) and heating a mixture of soil and solvent up to 24 h for PAHs and pesticides extraction (2004; Saim et al., 1997). To minimize the power consumption involved in long extraction times (24 h at 100 °C), new extraction techniques such as microwave extraction (MAE) (Youn Yuen Shu et al., 2003; Saim et al., 1997; Ganzler et al., 1986; Ganzler et al., 1990; Paré et al., 1994; Cortazar et al., 2005), supercritical fluid extraction (SFE) (Saim et al., 1997; Lopez-Capel and Wilkins, 1999; Schantz et al., 1997.) and accelerated solvent extraction (ASE) (Heemken et al., 1997; Saim et al., 1997; Lopez-Capel and Wilkins, 1999) have been developed to reduce the extraction time, consumption of energy, solvent volume required for extraction (Babic et al., 1998) and improve the extraction yield (Pool et al., 1990; Salisova et al., 1997).

Another well accepted extraction technique is ultrasonic extraction. Sonication provides a more efficient contact between the solid and solvent then the common shake-flask method, usually resulting in a greater recovery of the analyte. Song et al. (2002) used the ultrasonic method for PAH extraction with a mixture of acetone and dichloromethane from low polluted dried and moist soil. The ultrasonic extraction procedure used in their study was much less time-consuming and used less solvent than the Soxhlet procedure. Priego-Lopez and Luque de Castro (2003) obtained a similar result for the extraction of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons from soil. They demonstrated that 10 ml of solvent was sufficient compared to 100 mL with the classical method, and only 10 min were required to reach thermodynamical equilibrium compared to 24 h using classical heating extraction. In a previous paper (Buch et al., 2006) we have shown that solvent extraction process assisted by ultrasonication was a fast and efficient method to determine the organic composition of a Martian analog soil.

Another technique is thermal desorption where the sample soil is heated at moderate temperature to extract organic compounds. For example, at low pressure and in the temperature range 350–450 °C, Risoul et al., 2002 extract polychlorinated biphenyl contained in a soil. Sublimation heating under Martian ambient conditions coupled with chemical derivatization has also been used to extract nucleobases from Escherichia coli bacteria (Glavin et al., 2006). Our new SPS technique that includes a one pot, one-step extraction and derivatization process requires less energy and solvent consumption compared to previous extraction techniques.

In the frame of the Sample Analysis at Mars (SAM) project (for Mars Science Laboratory, MSL 2009), we develop a space instrument sub-system, based on gas chromatography, for the in situ analysis of the Martian atmosphere and soil. The primary objective of this system is the detection of organics, including "key prebiotic" species expected to be present in the soil such as amino and carboxylic acids. The analysis is carried out as following: (1) extraction of the organic matter from the soil, (2) derivatization of the organic extracted compounds, and (3) GC–MS analysis. To test the feasibility of the method, we have analyzed a variety of Mars analog materials including soil samples from the Atacama Desert in Northern Chile.

2. Analysis procedures

Two methods of extraction have been carried out and tested. The first is a two step solvent extraction performed on a spiked "clean" soil and on the Atacama soil (AT02-27, latitude: S 27°. 16′ 17″, longitude: W 70° 17′ 40.8″). The extraction solvents used for this study is a mixture of water and isopropanol (1:1). The derivatization step was applied on the extracted compounds after separation and evaporation of the solvent.

The second method is a one step/one pot extraction/derivatization procedure performed on Atacama soil heated from 300 to 500 °C and directly contacted with the derivatizing agent.

3. Materials and methods

3.1. Chemicals

Individual amino acid standards (>99% purity) including glycine, alanine, valine, leucine, serine and proline were purchased from Aldrich. A concentrated stock solution (1×10^{-3} M) was prepared by mixing each amino acid standard in double-distilled water. The derivatization reagent was *N*-methyl-*N*-(*tert*.-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MTBSTFA), and pyrene was used as an internal standard (100 ng/L in cyclohexane). Both were

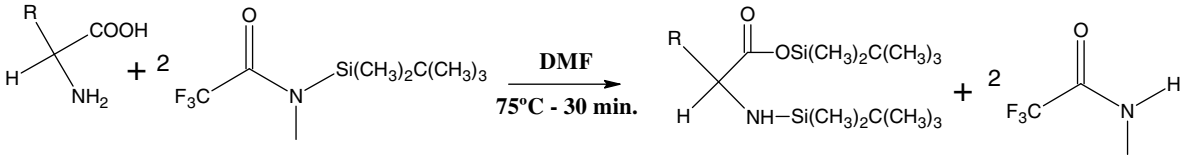


Fig. 1. Scheme of the derivatization reaction of amino acid.

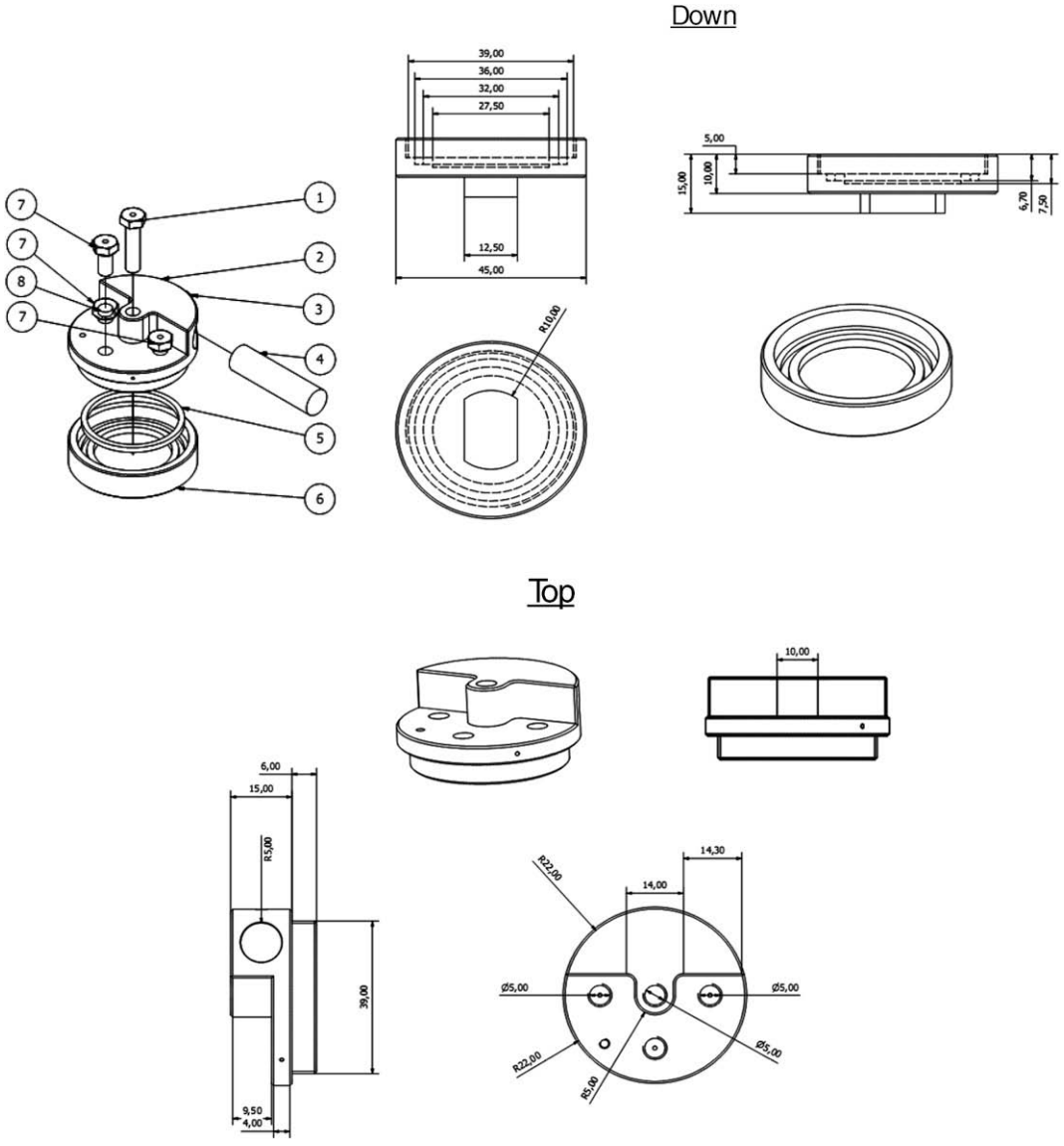


Fig. 2. Scheme of the chemical reactor (figure is in millimeter). 1: screws, 2: top side, 3: screw for heater cartridge, 4: heater cartridge, 5: seal, 6: Down side, 7: screws, 8: septum.

obtained from Sigma–Aldrich and dimethylformamide (DMF) was purchased from Fluka. Triple distilled isopropanol and water (ultra pure MilliQ) were also used in the analyses.

3.2. Instrumentation

The analyses of amino and carboxylic acids in the Atacama extracts were performed using a Shimadzu GC–MS instrument operated in quadrupole detection mode. The temperature of the split/splitless injector (using in splitless mode) was 250 °C and the detector was set at 270 °C. Helium was used as the carrier gas at a constant flow of 1.3 ml/min. An RTX 5MS capillary column (95% dimethylpolysiloxane, 5% diphenyl; 15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) from Restek (USA) programmed at 4 °C/min from 100 to 270 °C was used in the analyses. For each GC run, the relative abundance of each extracted organic compound was determined from the MTBSTFA derivative/pyrene peak area ratio.

A specific reactor designed and developed for this study (Meunier et al., 2007) has been used.

This laboratory pilot (Fig. 2) with an internal volume of 1.5 ml is directly connected to the GC–MS instrument via the sampling loop of a six port sampling valve.

3.3. Procedures

3.3.1. Extraction/derivatization

For the classical extraction experiments, 1.5 g of Atacama soil was placed inside a 10 ml glass vial and then 2 ml of solvent (50:50 mixture of water and isopropanol) was added. The capped vials were then placed in an ultrasonic bath at a frequency of 38 kHz set at 60 °C for 1 h. Ultrasonic assistance accelerates the extraction process (Buch et al., 2003). After ultrasonic treatment, the vials were centrifuged and the supernatant transferred into another 5 ml glass vial and evaporated at 35 °C under a stream of dry nitrogen. The samples were then derivatized (Klein, 1979; Rodier et al., 2001) by adding 30 μL MTBSTFA and 10 μL DMF to the extracted residue, the vial capped and heated at 70 °C for 30 min (Fig. 1). The temperature, duration of heating, and reagent volumes used in the derivatization experiments were optimized to achieve maximum yields. After the samples cooled to room temperature, 5 μL pyrene (100 ng/L) was added as an internal standard. Finally, 1 μL of each derivatized solution was injected directly into the GC–MS.

4. Results and discussion

In the first part of this study, the thermal stability of the amino acids was investigated at elevated temperatures. A temperature range of 200–500 °C has been used for the successive analyses of amino acids contained in liquid and solid matrixes and submitted to the different sample processing procedures described above. In a second part of this investigation, a "one pot" sample processing method using a chemical reactor compatible

Table 1
Yield of recovery of amino acids after heating at 200 and 300 °C and derivatization

	200 °C	300 °C
Alanine	18.0% ± 1.2%	ND
Valine	19.0% ± 1.6%	ND
Leucine	18% ± 1.1%	ND
Serine	11.0% ± 0.9%	ND

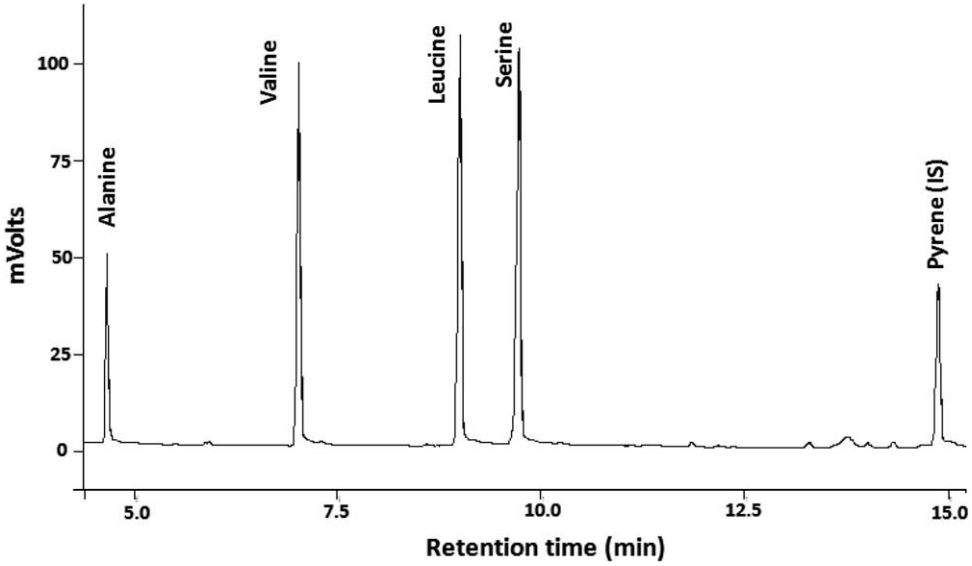


Fig. 3. GC–MS analysis of the amino acids mixture (10^{-3} M each) derivatized by MTBSTFA treatment. A 15 m × 0.25 mm CPSIL 5CB fused-silica WCOT column, operated in the split mode (1:100) was programmed at 4 °C min^{-1} from 140 to 209 °C with an inlet internal helium pressure of 19.5 kPa.

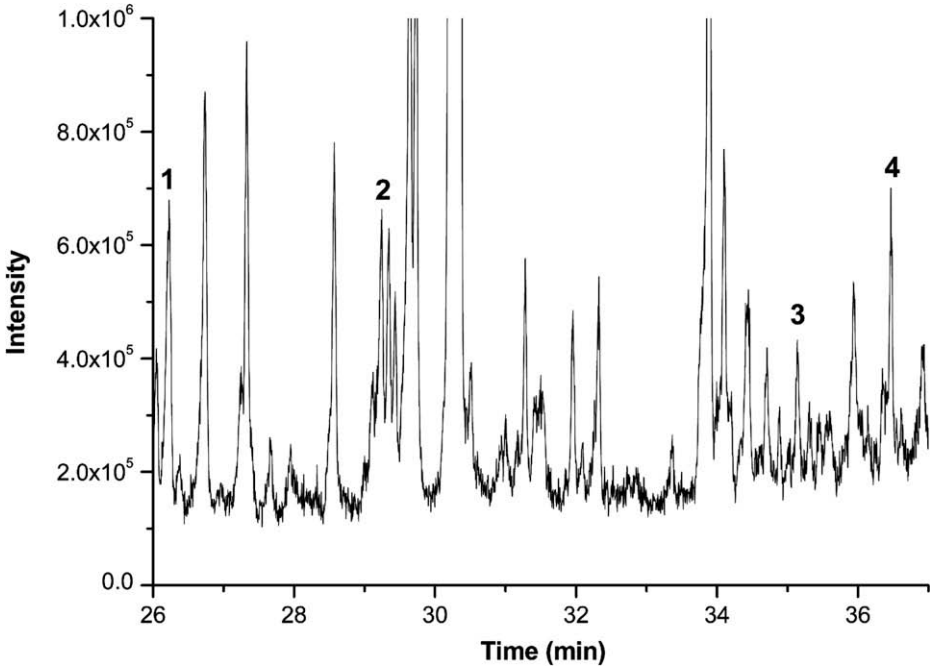


Fig. 4. GC–MS analysis spiked Fontainebleau soil with of the amino acids mixture (10^{-3} M each). Extracted by a mixture of water and isopropanol and derivatized by MTBSTFA treatment. A 30 m × 0.25 mm CPSIL 5CB fused-silica WCOT column, operated in the split mode (1:20) was programmed at 4 °C min^{-1} from 90 to 270 °C with an inlet internal helium pressure of 19.5 kPa. 1: alanine, 2: valine, 3: proline, 4: serine, 5: pyrene.

with spacecraft instrument operating conditions was tested (Fig. 2).

4.1. Amino acids in solution

The temperature effect on a mixture of standard amino acids diluted in water has been studied. The dried sample was heated first, and then derivatized using 10 μL of DMF, 30 μL of MTBSTFA and 5 μL of pyrene used as internal standard. A volume of 0.5 μL of the derivatized compounds was injected in GC/MS. (Fig. 3).

The results show that if the mixture of amino acids is heated at 200 °C for 5 min, only 10–20% of the initial amino acids are recovered after derivatization (Table 1) compared to 100% recoveries when the standard is kept at room temperature (Rodier et al., 2001). If the temperature is increased up to 300 °C for the same duration, none of the amino acids can be detected after derivatization.

Our results demonstrated the low thermal stability of amino acids (Ito et al., 2006) when submitted to temperatures higher than 200 °C.

4.2. Amino acids "spiked" in standard soil sample

In the second step, in order to test the thermal resistance of amino acids when adsorbed onto sand, a mixture of four amino acids including alanine, valine, proline serine, was added to a sample sand of Fontainebleau (10^{-6} mol/g). After a complete evaporation of the solvent (water) the spiked soil was heated at 300 °C for 5 min. Before the derivatization and the injection in the GC/MS, the solvent extraction procedure, described above, was carried out in order to extract the adsorbed amino acids.

At 300 °C none of the amino acids were detected, contrary to previous studies which have shown (Buch et al., 2003) a yield of recovery for solvent extraction with isopropanol and water ranging from 60% to 100% (Fig. 4). These results prove that amino acid adsorption onto a solid matrix does not increase the amino acids thermal stability. However, the adsorption which takes place on (and/or in) clean sand sample at laboratory during a limited time (a few hours) is not comparable to the same process which could occur over a large time scale (several billion years) in the Martian soil.

4.3. Amino acids "naturally" trapped in Atacama soil sample

The Atacama Desert is extremely arid and the temperature is remarkably uniform throughout the year (2 °C variation). Navarro-González et al. (2003) have shown that the Atacama Desert soil contains an unidentified non-chirally specific oxidant that rapidly destroys organic molecules. It has been suggested that similar oxidants were present in the soils analyzed by Viking (Klein, 1979; Yen et al., 2000). The dry conditions in the Atacama Desert likely inhibit the biological production of reducing species and could enhance the survival of photochemically produced oxidants. Navarro-González et al. (2003) also reported the virtual absence of any culturable micro-organisms in samples that contain very low levels of organic

Table 2
Comparison of organic compounds detected by classical extraction assisted by ultrasonication and Heating at 500 °C before classical extraction

Organic compounds detected by classical extraction	Heating at 500 °C before extraction
Glycine	√
Alanine	√
Proline	√
L-Aspartic acid	√
Urea	√
Acetic acid	√
Benzoic acid	√
Butanoic acid	ND
Propanedioic acid	√
Heptanoic acid	ND
Octanoic acid	ND
Butanedioic acid	√
Propanoic acid	√
Malonic acid	√
Hexanoic acid	ND
Pentanoic acid	√
4-Methyl pentanoic acid	√
Dodecanoic acid	√
Tridecanoic acid	ND
Tetradecanoic acid	√
Pentadecanoic acid	√
Hexadecanoic acid	√
Octadecanoic acid	√
Pentandecanoic acid	√
Hexanedioic acid	√
Nonanedioic acid	√
Nonanoic acid	√
Decanoic acid	ND
Undecanoic acid	ND
Heptadecanoic acid	ND
Pentanedioic acid	ND
Phosphoric acid	√
1,2 Benzendicarboxylic acid	√
1,2 Benzendicarboxylic acid bis(2-methylpropyl) ester	√
Nonadecanoic acid	ND

ND, not detected.

material. Since in many respects the Atacama Desert soils are similar to the Mars surface fines analyzed by Viking, these samples provide a valuable analog material for the testing of future Mars in-situ instrumentation.

In order to determine which organic compounds are contained in the Atacama soil (AT02-27, latitude: S 27° 16′ 17″, longitude: W 70° 17′ 40.8″), the classical solvent extraction has been performed. 3.5 g of soil was exposed to a mixture of water and isopropanol (1:1) and an ultrasonic extraction treatment is performed for 1 h. After derivatization and GC–MS analysis, at least 9 organic compounds, the list of which is reported in Table 2, have been detected. 6 carboxylic and 2 amino acids were detected in the Atacama soil extract with concentrations ranging from 5.10^{-10} to 9.10^{-9} mol.g^{-1}.

To test the possibility of a thermal desorbtion of the amino acids and carboxylic acid adsorbed and trapped in a real Martian analogue, 1.5 g of Atacama soil was heated at 500 °C for 5 min. After the solvent extraction and derivatization steps the results obtained showed the presence of amino acid and carboxylic acids (Fig. 5).

Compared to the results obtained without heating the soil (Table 2), this experiment showed that the majority of the amino and carboxylic acids were still present in the heated soil and were not destroyed. Therefore we can assume that the amino acids are strongly adsorbed and a part of the heating energy is used to break the adsorption link between soil and amino acids.

4.4. "One pot" sample processing method on "spiked" atacama sample

In order to be able to perform a "one-pot" extraction and derivatization approach, more compatible with space instrumentation, we have devised experiments for direct derivatization on the spiked Atacama soil. We found that when MTBSTFA alone is added directly to the sample, the yield of the derivatization reaction is less than 5% (Table 3). These low derivatization yields could be due to either a chemical deactivation of MTBSTFA by the mineral matrix or chemical binding of the organics to the soil, which could also inhibit derivatization. In order to check the possible chemical deactivation of MTBSTFA by the oxidative molecules contained in the soil, we added 30 μL MTBSTFA to a "non-spiked" sample of Atacama soil (0.5 g) and placed the vial (containing the soil and MTBSTFA) in an ultrasonic bath for 15 min. After sonication, the supernatant MTBSTFA was used to derivatize a standard mixture of amino acids (0.1 mol). The recovery of amino acids ranged from 99% to 100% and demonstrated that the MTBSTFA is not deactivated by minerals in the soil. Because of the low derivatization efficiency when using MTBSTFA alone, an organic solvent (DMF) was added to the derivatizing agent. A mixture of 70 μL of MTBSTFA and 30 μL of DMF was added directly to 0.5 g of spiked Atacama soil under ultrasonic process for 30 min. The results in Table 3 show that the recoveries varied from 28% for glycine up to 100% for leucine and lysine. Therefore, when DMF is used in combination with MTBSTFA, organic compounds can be extracted from the solid sample and derivatized in a single step.

4.5. "One pot/one step" space compatible sample processing system

To be closer to space operating conditions requiring less energy and less complexity a "one pot/one step" sample processing method has been developed. For that purpose a laboratory pilot (reactor) has been developed (Meunier et al., 2007). A mass of 500 mg of "known content" Atacama sample has been heated in the sealed reactor for 5 min at 500 °C (Fig. 6) and subsequently cooled down to room temperature. Then the MTBSTFA derivatized agent and the DMF solvent were added to the sample and derivatized volatile organic compounds were flushed from the

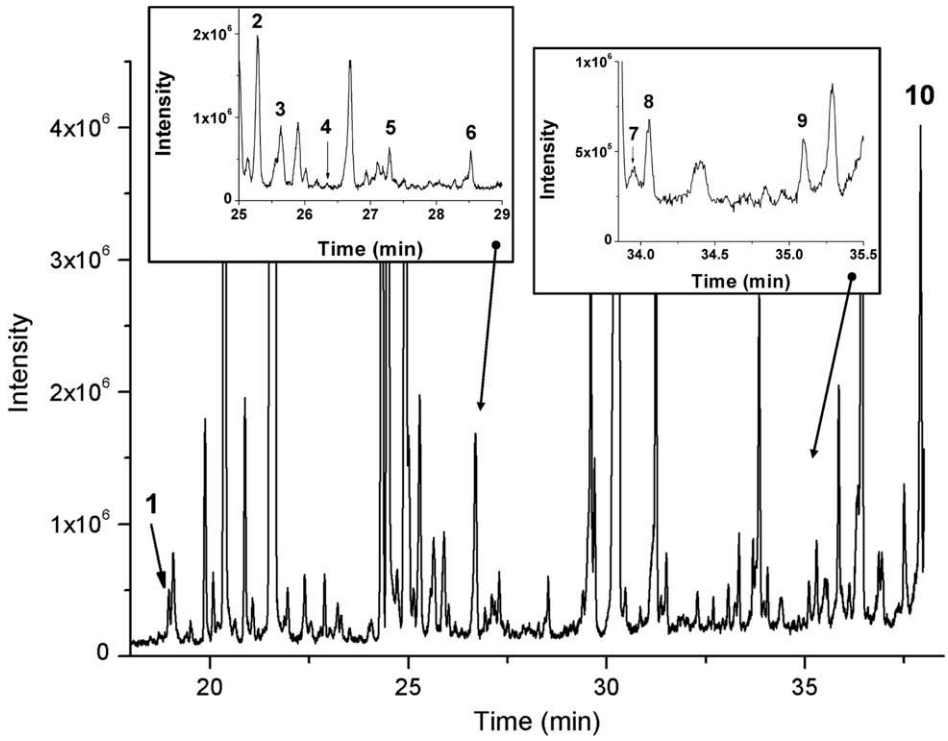


Fig. 5. GC–MS analysis spiked Fontainebleau soil with of the amino acids mixture (10^{-3} M each). Extracted by a mixture of water and isopropanol and derivatized by MTBSTFA-DMF treatment. Same experimental conditions as Fig. 2. 1: 4-methyl pentanoic acid, 2: hydroxyethanoic acid, 3: 2-hydroxypropanoic acid, 4: alanine, 5: nonanoic acid, 6: urea, 7: aspartic acid, 8: dodecanoic acid, 9: proline, 10: pyrene.

Table 3
Derivatization recoveries with and without DMF

Name	Recovery (%) on doped Atacama soil (0.1 mol AA)	
	MTBSTFA	DMF/MTBSFA
L-Alanine	0.9 ± 0.2	52.1 ± 1.0
Glycine	0.5 ± 0.3	28.0 ± 0.3
L-Valine	3.3 ± 1.1	91.7 ± 0.9
L-Leucine	5.1 ± 0.6	100.0 ± 1.6
L-Isoleucine	6.3 ± 0.6	92.0 ± 0.8
L-Proline	0.3 ± 0.3	39.8 ± 0.2
L-Methionine	ND	52.9 ± 1.2
L-Serine	ND	99.9 ± 0.9
L-Threonine	ND	98.3 ± 0.5
L-Phenylalanie	ND	64.6 ± 1.1
L-Aspartic acid	ND	56.7 ± 0.5
L-Glutamic acid	ND	39.7 ± 0.2
L-Lysine	ND	99.0 ± 1.3
L-Tyrosine	5.2 ± 1.2	33.7 ± 1.0

ND, not detected.

reactor with He carrier gas to the chromatographic column inlet of the GCMS. Fig. 5 illustrates the results obtained for this experiment. We can observe that the majority of amino and carboxylic acids in the Atacama soil is recovered.

5. Conclusion

The results obtained in this work showed that amino acids are fragile organic compounds that are not able to survive temperatures higher than 200 °C when they are in solution or even adsorbed "artificially" through laboratory experiment on cleaned soil sample. However, it was demonstrated that when amino acids are strongly bound chemically to a soil, they can withstand temperatures up to 500 °C for less than 5 min. Moreover this thermal processing facilitates the desorption of the amino acids, without significant chemical degradation, and thus can replace the solvent extraction in the sample preparation.

This work has permitted the development and testing of a spaceflight compatible Sample Processing System to be coupled to a GCMS instrument for in situ analysis of organic compounds of exobiological interest. Our "one pot/two step" method with solvent extraction and sonication enabled the qualitative and quantitative GC–MS analysis of amino and carboxylic acids in representative Martian analogue samples. Our preliminary results of the "one pot/one step" method obtained with the same Martian analogues allowed the detection of most of the targeted molecules. The optimization of this method is currently in progress.

The main objective of the Sample Processing System development, supported by the CNES Research and Technology (R&T) program, is a possible integration into the GC–MS experiments of the next Mars exploratory missions such as the NASA MSL 2009 and the European Exomars 2013.

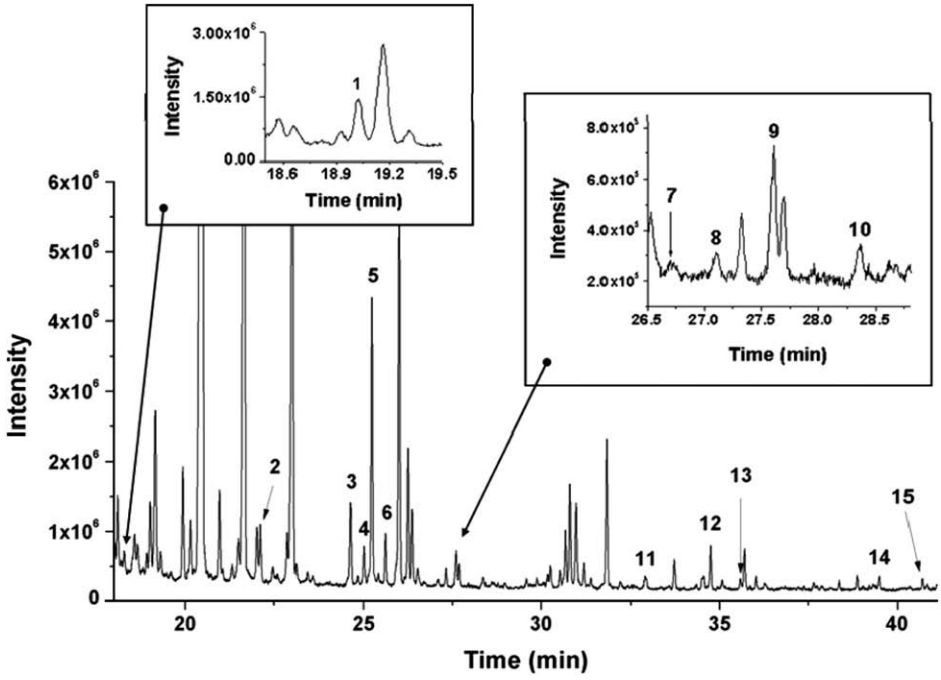


Fig. 6. GC–MS analysis of Atacama soil heated at 500 °C during 5 min. and derivatized by MTBSTFA-DMF treatment. Same experimental conditions as Fig. 4. 1: 4-methyl pentanoic acid, 2: heptanoic acid, 3: benzoic acid, 4: octanoic acid, 5: hydroxyethanoic acid, 6: 2-hydroxypropanoic acid, 7: alanine, 8: glycine, 9: nonanoic acid, 10: valine, 11: dodecanoic acid, 12: phosphoric acid, 13: 1,2 benzendicarboxylic acid, 14: pentandecanoic acid, 15: 1,2 benzendicarboxylic acid bis(2-methylpropyl)ester.

References

Babic, S., Petrovic, M., Kastelan-Macan, M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. J. Chromatogr. A 823, 3–9, 1998.

Bakan, G., Ariman, S. Persistent organochlorine residues in sediments along the coast of mid-Black Sea region of Turkey. Marine Pollut. Bull. 48, 1031–1039.

Benner, S.A., Devine, K.G., Matveeva, L.N., Powell, D.H. The missing organic molecules on Mars. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2425–2430, 2004.

Biemann, K., Oró, J., Toulmin III, P., Orgel, L.E., Nier, A.O., Anderson, D.M., Simmonds, P.G., Flory, D., Diaz, A.V., Rushneck, D.R., Biller, J.E., Lafleur, A.L. The search for organic substances and inorganic volatile compounds in the surface of Mars. J. Geophys. Res. 82, 4641–4658, 1977.

Buch, A., Sternberg, R., Meunier, D., Rodier, C., Laurent, C., Raulin, F., Vidal-Madjar, C. Solvent extraction of organic molecules of exobiological interest for in situ analysis of the Martian soil. J. Chromatogr. A 999, 165–174, 2003.

Buch, A., Glavin, D.P., Sternberg, R., Szopa, C., Rodier, C., Navarro-Gonzalez, R., Raulin, F., Cabane, M., Mahaffy, P.R. A new extraction technique for in situ analyses of amino and carboxylic acids on Mars by gas xhromatography mass spectrometry. Planet. Space Sci., Special Astrology Issue 54 (15), 1592–1599, 2006.

Cortazar, E., Bartolomé, L., Delgado, A., Etxebarria, N., Fernandez, L.A., Usobiaga, A., Zuloaga, O. Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and sulphalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction. Anal. Chem. Acta 534, 247–254, 2005.

Ganzler, K., Salgo, A., Valko, K. Microwave extraction A novel sample preparation method for chromatography. J. Chromatogr. A 371, 299–306, 1986.

Ganzler, K., Szinai, I., Salgo, A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. J. Chromatogr. 520, 257–262, 1990.

Glavin, D.P., Schubert, M., Botta, O., Kminek, G., Bada, J.L. Detecting pyrolysis products from bacteria on Mars. Earth Planet. Sci. Lett. 185, 1–5, 2001.

Glavin, D.P., Cleaves, H.J., Buch, A., Schubert, M., Aubrey, A., Bada, J.L., Mahaffy, P.R. Sublimation extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry: a new technique for future in situ analyses of purines and pyrimidines on Mars. Planet. Space Sci. 54 (15), 1584–1591, 2006.

Heemken, O.P., Theobald, N., Wenclawiak, B.W. Comparison of ASE and SFE with soxhlet, sonication and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. Anal. Chem. 69 (11), 2171–2180, 1997.

Ito, M., Gupta, L.P., Masuda, H., Kawahata, H. Thermal stability of amino acids in seefloor sediment in aqueous solution at hight temperature. Org. Geochem. 37, 177–188, 2006.

Klein, H.P. The viking mission and the search for life on Mars. Rev. Geophys. Space Phys. 17, 1655–1662, 1979.

Ksanfomality, L.V. Water flows and pools on mars. Astronomicheskii Vestnik 37 (5), 397–413, 2003.

Lopez-Capel, E., Wilkins, R.M. 1999. 11th Symposium on Pesticide Chemistry. Human and environmental exposure to xenobiotics, Cremona, Italy, September 11–15.

Meierhenrich, U., Thiemann, H.-P., Rosenbauer, H. Pyrolytic methylation assisted enantioseparation of chiral hydroxycarboxylic acids. J. Anal. App. Pyrolysis 60, 13–26, 2001.

Meunier, D., Sternberg, R., Mettetal, F., Buch, A., Coscia, D., Szopa, C., Rodier, C., Coll, P., Cabane, M., Raulin, F. A laboratory pilot for in situ analysis of refractory organic matter in Martian soil by gas chromatography-mass spectrometry. Adv. Space Res. 39 (3), 337–344, 2007.

Navarro-González, R., Rainey, F.A., Molina, P., Bagaley, D.R., Hollen, B.J., de la Rosa, J., Small, A.M., Quinn, R.C., Grunthaner, F.J., Cáceras, L., Gomez-Silva, B., McKay, C.P. Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. Science 302, 1018–1021, 2003.

Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R., Stafford, S.S. Microwave-assisted process (MAP^{TM}): a new tool for the analytical laboratory. Trends Anal. Chem. 13, 176–184, 1994.

Priego-Lopez, E., Luque de Castro, M.D. Ultrasound-assisted extraction of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons from soil prior to gas chromatography-mass detection. J. Chromatogr. A 1018, 1–6, 2003.

Pool, S.K., Dean, T.A., Oudsema, J.W., Poole, C.F. Sample preparation for chromatographic separations: an overview. Anal. Chim. Acta 236, 3–42, 1990.

Rodier, C., Sternberg, R., Raulin, F., Vidal-Madjar, C. Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography. J. Chromatogr. A 915, 199–207, 2001.

Risoul, V., Renauld, V., Trouvé, G., Gilot, P. A laboratory pilot study decontamination of soils polluted by PCBs. Comparison with thermogravimetric analysis. Waste Management 22, 61–72, 2002.

Saim, Nor'Ashikin, Dean, J.R., Abdullah, Md., Pauzi, Zakaria, Z. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction. J. Chromatogr. A. 791, 637–663, 1997.

Salisova, S., Toma, S., Mason, T.J. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from Salvia officinalis. Ultrason. Sonochem. 4 (2), 131–134, 1997.

Schantz, M.M., Nichols, J.J., Wise, S.A. Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference materials. Anal. Chem. 69, 4210–4219, 1997.

Soffen, A.O., Nier, M., McElroy, B. Structure of the neutral upper atmosphere of Mars. Science 194, 1298–1300, 1976.

Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.M. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. Chemosphere 48 (9), 993–1001, 2002.

Yen, A.S., Kim, S.S., Hecht, M.H., Frant, M.S., Murray, B. Evidence that the reactivity of the martian soil is due to superoxide ions. Science 289, 1909–1912, 2000.

Yuen ShuYoun, Long Lai Teh, Lin Huann-shyang, Yang, Thomas C., Chang Chi-Peng Study of factors affecting on the extraction efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils using open-vessel focused microwave-assisted extraction. Chemosphere 52 (10), 1667–1676, 2003.

Résumé :

La recherche de vie extraterrestre et en particulier de vie sur Mars est devenue un des enjeux majeurs des prochaines explorations spatiales. Dans ce cadre, la recherche de molécules organiques et l'étude de leur énantiomérie pourrait permettre d'obtenir les premiers indices en faveur d'une présence passée ou présente de vie sur cette planète. En effet la vie telle que nous la connaissons est uniquement basée sur des acides aminés L et sucres D. Ces molécules organiques et leur éventuel excès énantiomérique pourraient avoir été conservés dans les conditions martiennes.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) est actuellement la technique analytique spatialisable la plus pertinente pour la détection de composés organiques volatils. Afin de rendre volatils les composés réfractaires tels que les acides aminés, nous proposons une fonctionnalisation chimique au diméthylformamide diméthyl-acétal (DMF-DMA). Cette fonctionnalisation couplée à une séparation chromatographique sur une colonne chirale est une technique parfaitement adaptée à la séparation énantiomérique et à la spatialisation. Nous avons donc mis au point une méthode de **fonctionnalisation des molécules organiques chirales par l'agent de méthylation DMF-DMA afin de séparer les énantiomères et de les étudier *in situ* en CPG-SM lors des futures missions martiennes**.

Cette technique d'analyse des molécules réfractaires chirales a ensuite été adaptée à une utilisation spatiale. Ainsi, la méthode d'analyse est constituée d'un four réactionnel dans lequel l'échantillon solide est placé, les molécules d'intérêt exobiologique sont ensuite successivement extraites et fonctionnalisées au DMF-DMA pour être analysées en CPG-SM. Les résultats ont permis de montrer qu' à partir d'une faible quantité de sols d'analogues martiens (50 mg de sol du désert d'Atacama, Chili) et après optimisation de chacune des étapes, plusieurs types de molécules organiques présentes à l'état de traces ont pu être détectées, telles que des acides aminés, des acides carboxyliques et des bases nucléiques. Parmi ces molécules chirales, plusieurs ont pu être séparées selon leur forme énantiomérique. Le protocole est élaboré dans les limites technologiques et opératoires d'une analyse spatiale ; chaque étape est pensée pour un usage robotisé. Nous avons ainsi développé une expérience globale, sensible et robuste, totalement compatible avec les exigences d'une analyse *in situ*. C'est la raison pour laquelle cette expérience sera intégrée sur la prochaine mission martienne Exomars 2016/2018 afin de rechercher des traces de matière organique à la surface et en subsurface de Mars. La découverte d'un excès énantiomérique, voire d'une homochiralité, apporterait des indices forts quant à la présence d'une vie passée ou présente sur la planète rouge.

Mots-clés : fonctionnalisation, homochiralité, DMF-DMA, Mars, indices de vie, molécules organiques, chromatographie, spectrométrie de masse, traitement d'échantillons.

Abstract:

Looking for extraterrestrial life, particularly on Mars, has become a challenging aim for future space missions. In this framework, looking for organic molecules and studying their enantiomeric properties could lead to the first clues of an extinct or extant life on this planet. Indeed, life as we know it consists in one of the two specular forms of organic molecules only, and it has been shown that conditions at Mars could preserve, at least partially, this enantiomeric excess.

Gas Chromatograph coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS) is nowadays the most pertinent space-compatible analytical tool for the detection of volatile organics. In order to transform refractory molecules such as amino acids into volatile ones, we are putting forward a chemical derivatization with dimethylformamide dimethyl-acetal (DMF-DMA). This reaction, when coupled with an analytical step using a chiral chromatographic column, is perfectly adapted to enantiomeric separation within the space constraints. This thesis develops a **method of derivatization of the chiral organic molecules with methylation reagent DMF-DMA in order to separate and analyze *in situ* the enantiomers by GC-MS during the future Martian missions.**

This analytical tool consists in a reaction chamber into which the solid sample is dropped. From this sample, the molecules of interest are successively extracted and derivatized with DMF-DMA to be detected by GC-MS. From a low quantity of Martian analogue soil (50 mg of Atacama soil) and after a complete optimization of each step, numerous molecules of different kinds present at traces levels have been successfully detected, such as amino, carboxylic and nucleic acids. Among these molecules, some of the chiral ones have been resolved regarding their enantiomeric forms. The whole procedure is elaborated within the technological and operational limits imposed by a space experiment, each step having been designed to be carried out robotically. Thus, we have developed a complete experiment, sensitive, robust and entirely meeting the requirements of an *in situ* analysis. That is the reason why this experiment has been selected to be integrated onboard the next Martian mission Exomars 2016/2018 in order to search traces of organic matter at Mars surface and subsurface. Determining an enantiomeric excess, or even homochirality, would be a remarkable breakthrough regarding the presence of an extinct or extant life on the red planet.

Key-words: derivatization, homochirality, DMF-DMA, Mars, life remnants, organic molecules, chromatography, mass spectrometry, sample treatment.